



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA, MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

MESTRADO EM IMUNOLOGIA / GENÉTICA E BIOTECNOLOGIA

MARINA MARQUES PARDINI

**PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO E INTERFERON-GAMA
POR CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGUE
PERIFÉRICO DE BOVINOS INFESTADOS
ARTIFICIALMENTE POR *Boophilus microplus***

JUIZ DE FORA
2008

MARINA MARQUES PARDINI

**PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO E INTERFERON-GAMA
POR CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGUE
PERIFÉRICO DE BOVINOS INFESTADOS
ARTIFICIALMENTE POR *Boophilus microplus***

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas na área de Imunologia.

Orientadora: Ana Paula Ferreira

JUIZ DE FORA
2008

Pardini, Marina Marques.

Produção de óxido nítrico e interferon – gama por células mononucleares do sangue periférico de bovinos infestados por *Boophilus microplus* / Marina Marques Pardini. -- 2008.
105 f. il.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) –
Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2008.

1. Doenças dos bovinos –.
2. Bovinos – Parasitologia.
3. Parasitos – Patogenicidade. Título.

CDU 619:636.2

TERMO DE APROVAÇÃO

MARINA MARQUES PARDINI

PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO E INTERFERON-GAMA POR CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGUE PERIFÉRICO DE BOVINOS INFESTADOS ARTIFICIALMENTE POR *Boophilus microplus*

Dissertação de Mestrado submetida à banca examinadora do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Área de Concentração em Imunologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas – Área de Concentração em Imunologia.

Aprovada em: ____ / ____ / ____

Banca examinadora:

Ana Paula Ferreira, Doutorado em Imunologia (USP)
Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia, ICB – UFJF
(Orientadora)

Marco Antônio Machado, Doutorado em Genética Molecular (UFV)
Laboratório de Genética Molecular, EMBRAPA Gado de Leite – Juiz de Fora
(Membro interno)

Maria Aparecida de Souza, Doutorado em Imunologia Básica e Aplicada
(USP/FMRP) / Instituto de Ciências Biomédicas – UFU
(Membro externo)

Juiz de Fora
2008

DEDICATÓRIA

A Deus,
À minha filha Sofia,
Ao meu pai Jaime (*in memoriam*),

Que embora não tenham contribuído na prática para a realização desse trabalho,
nos vários momentos de dificuldades e desânimo que enredaram esse projeto foram
a força que me impulsionou a continuar o mestrado,
dando-lhe sentido e razão.

Estavam sempre no meu pensamento.

Pensando em meu pai, almejei realizar seus sonhos paternos para uma filha.

Sonhos que ele teve para mim.

Coisas que não entendia

e agora entendo....

pensando em minha filha,

pensei em realizar meus sonhos maternos para ela.

Pensando em Deus.. .vi, mais uma vez, que tudo posso N'Aquele que me fortalece.

Nada e ninguém no mundo me fará desistir!

AGRADECIMENTOS:

A Deus, meu sustento e minha força, agradeço sua doce presença - mesmo que eu não a tenha percebido – a me amparar nos momentos de desalento, conflito e apreensão... nesses dois anos em que vivi tantas transformações pessoais, inicialmente paralelas e, ao final, superpostas a esse mestrado.

À minha mãe, Suzana, e às minhas irmãs, Larissa e Laura, agradeço o incentivo durante toda vida, a paciência, a tolerância com minha impulsividade - nesse momento em que o humor oscilou mais que o normal. Sou grata especialmente pela preocupação, carinho e cuidado com a Sofia.

Ao meu pai, Jaime, que já partiu deixando saudade, agradeço os valores que me ensinou, os quais contribuíram muito para que eu chegasse até aqui.

À minha filha Sofia, que, durante o mestrado, cresceu dentro da minha barriga encostada nas bancadas de laboratório, sou agradecida por me mostrar - mesmo sem a mínima intenção de fazê-lo – que é necessário discernir a devida importância e valor que atribuímos a cada coisa, para sentirmo-nos mais leves e livres...

Agradeço ao Robson e à Blides, o incentivo, o apoio financeiro e o afetuoso acolhimento em seu lar nesse período de tantos apertos! Especialmente, sou grata pelo cuidado e carinho dispensados à Sofia e a mim.

Ao Inácio, que, à sua maneira, esteve ao meu lado, suportando meu estresse, meus choros e minha ansiedade devido às dificuldades do mestrado. Agradeço especialmente por ser esse pai dedicado, que tem dado todo amor e amparo à Sofia durante meus momentos de ausência.

Agradeço à família Fernandes Mendonça o apoio, o gentil acolhimento em sua casa, o carinho dispensado à Sofia e a mim. Meu agradecimento especial à Raquel Mendonça por sua generosidade, amizade e pela ajuda com o inglês.

Agradeço às meninas da república Vaca Amarela por abrirem as portas de casa e as portas do coração para mim, sou grata pelo amparo e carinho nos momentos difíceis que passei durante o mestrado! Especialmente à Gislene Lacerda por sua amizade e por me disponibilizar tão generosamente seu computador!

Aos colegas do Laboratório de Imunologia da UFJF agradeço as inúmeras ajudas, festinhas, risadas nos momentos de tensão, tornando o ambiente científico mais produtivo. Agradeço especialmente à Izabelly e à Lívia por me ajudarem nos procedimentos de cultura celular. Minha gratidão a todos que compartilharam da

minha maternidade e, assim, das minhas preocupações, ansiedades e alegrias.

Sou grata especialmente ao Caio César de Souza Alves – praticamente meu co-orientador, por participar de todas as etapas desse trabalho, por me ajudar a tomar decisões, dispondo sempre de enorme paciência para ensinar-me... entre outras coisas, que no mundo científico a perspicácia vale mais que o perfeccionismo.

Meu agradecimento especial à Caroline de Souza Almeida, Ana Maria do Carmo, Michelle Vicentini e Suelen Perobelli – ora minhas terapeutas, ora meus abrigos, ora abrigos dos meus pertences, mas sempre amigas de verdade! Não foram apenas companheiras do mestrado, essas meninas entraram de cabeça na minha complexa vida – de livre e espontânea vontade... ou pressão, e me ajudaram a enxergar soluções em meio às minhas confusões e inquietações.

Agradeço à Prof.^a Ana Paula Ferreira sua contribuição em meu crescimento acadêmico-científico e humano. Sou grata, principalmente, por sua amizade e compreensão durante a realização desse trabalho, pois em várias ocasiões sua orientação ultrapassou o nível científico e se estendeu à minha vida pessoal.

À Prof.^a Maria Aparecida de Souza, exemplo de sabedoria e humildade, sou grata pela amizade, por confiar em mim e incentivar o desenvolvimento das minhas potencialidades, pelo auxílio nos experimentos, sugestões e críticas nesse trabalho.

Ao Prof.^o Marco Antônio Machado, minha gratidão por confiar esse projeto ao nosso Laboratório e pela compreensão com minhas condições para desenvolvê-lo.

Ao Prof.^o Joaquim Hernán Patarroyo, pesquisador do Departamento de Veterinária no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária da Universidade Federal de Viçosa, agradeço o fornecimento dos antígenos de *B. microplus*.

Finalmente, agradeço à EMBRAPA e aos professores do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas - UFJF envolvidos nesse projeto por todo apoio técnico e pelo auxílio financeiro que tornou viável a realização desse trabalho.

Sem essas pessoas, e muitas outras que não coube citar, esse mestrado jamais teria se consolidado. Devo essa conquista àqueles que acreditaram em mim, quando eu mesma achava que seria impossível ser mãe – na plenitude dessa missão e, ao mesmo tempo, *tentar* ser “mestra” – diante das condições em que me encontrava. Não se tratava de uma escolha entre um e outro, mas de discernir prioridades, e mesmo que não tenha feito o melhor trabalho do mundo, fiz o que foi possível com o melhor que eu podia dar de mim nesse momento... e consegui!

Enfim, sei que estarei eternamente em formação...

A VERDADE

*A porta da verdade estava aberta,
Mas só deixava passar
Meia pessoa de cada vez.
Assim não era possível atingir toda a verdade,
Porque a meia pessoa que entrava
Só trazia o perfil de meia verdade,
E a sua segunda metade
Voltava igualmente com meios perfis
E os meios perfis não coincidiam verdade...
Arrebentaram a porta.
Derrubaram a porta,
Chegaram ao lugar luminoso
Onde a verdade esplendia seus fogos.
Era dividida em metades
Diferentes uma da outra.
Chegou-se a discutir qual
a metade mais bela.
Nenhuma das duas era totalmente bela
E carecia optar.
Cada um optou conforme
Seu capricho,
sua ilusão,
sua miopia.*

Carlos Drummond de Andrade

*“Não importa onde você vai parar...
Em que momento da vida você cansou...
O que importa é que sempre é possível
e necessário recomeçar.
Recomeçar é dar uma chance a si mesmo...
É renovar as esperanças na vida e,
e mais importante...
Acreditar em você de novo!”*

Carlos Drummond de Andrade

RESUMO

As infestações por carrapatos em bovinos reduzem a produtividade do gado de corte e leiteiro causando grandes perdas econômicas à pecuária. Os prejuízos acarretam desde debilidade física e transmissão de doenças ao rebanho, como anaplasiose e babesiose, até a morte dos indivíduos mais vulneráveis. Os carrapatos permanecem por longos períodos fixados em seus hospedeiros sendo expostos ao sistema de defesa do bovino, o que provoca inflamação e ativa elementos da resposta imune humoral e celular do hospedeiro. Em contrapartida, componentes imunogênicos da glândula salivar do carrapato modulam a resposta bovina para perfis de citocinas favoráveis à hematofagia. Existem poucos estudos sobre mecanismos imunes que guiam a interação parasito-hospedeiro e determinam o sucesso ou não do parasitismo. Trabalhos recentes apontam para importância de fatores genéticos relacionados à resistência ao carrapato em determinadas raças bovinas, além de estudos que mostram o papel crítico das citocinas na prevenção e progressão de quadros patológicos. O objetivo desse trabalho foi avaliar a resposta imunológica de bovinos infestados artificialmente pelo carrapato *Boophilus microplus* através de ensaios de proliferação celular e detecção de óxido nítrico (NO) e interferon-gama (IFN- γ) em células mononucleares do sangue periférico a fim de verificar diferentes níveis de resistência bovina. Seis bovinos mais resistentes e seis mais susceptíveis de uma população F₂ de 332 animais, originária do cruzamento de F₁ (½ Holandês : ½ Gir), foram selecionados com base na contagem de carrapatos e valor genético. Amostras de sangue foram coletadas nos pontos 0, 5º e 12º dias pós-infestação para cultura de células e estimulação *in vitro* com antígenos do *B. microplus*. A proliferação celular e os níveis de NO e IFN- γ foram avaliados respectivamente pelos métodos de MTT, Griess e ELISA. As células dos animais resistentes (R) tenderam ao aumento de proliferação no 5º dia quando estimuladas com antígenos do carrapato retornando aos níveis iniciais no 12º dia. Já nos animais susceptíveis (S), a estimulação pareceu inibir a proliferação das células no dia 0 e não alterou os índices do 5º e 12º dia. Apesar disso, não houve diferença significativa na proliferação celular entre os grupos R e S. Quando as células obtidas no dia 0 foram cultivadas na ausência de estímulo, os níveis de NO dos animais R tenderam a ser mais altos que dos animais S. A estimulação com antígenos de carrapato pareceu inibir a produção de NO no 5º dia por células de animais R. Também não houve diferença significativa nas produções de NO e de IFN- γ entre os grupos R e S. Os resultados sugerem que o NO possa ter um papel no início da resposta imune que delinea o mecanismo de resistência ao carrapato, uma vez que as alterações mais importantes foram detectadas até o 5º dia após a infestação. É possível que o mecanismo de resistência esteja associado à regulação negativa da resposta imune a fim de não incitar a modulação desta pelo carrapato, porém sendo eficaz o suficiente para eliminá-lo. A avaliação da resposta imunológica nos primeiros momentos após a fixação do carrapato no couro bovino, bem como um acompanhamento mais detalhado dos pontos temporais da infestação poderia fornecer dados mais conclusivos.

Palavras-chave: *B. microplus*, gado, proliferação celular, óxido nítrico, interferon-gama.

ABSTRACT

Tick infestations in cattle reduce its beef and dairy productivity causing great economic losses to livestock. The potential damages are physical weakness, transmission of diseases to the herd, as anaplasmosis and babesiosis, and even vulnerable animals deaths. Thus, the tick control has been considered priority in tropical regions worldwide. The ticks remain fixed to their hosts for long periods being exposed to the cattle defense system; it causes inflammation and activates the host's humoral and cellular immune response. Nevertheless, immunogenic components of the salivary gland of cattle tick modulate the response to profiles of cytokines that promote the blood-feeding. There are few studies approaching immune mechanisms that lead to host-parasite interaction and determine the success or unsuccessful of parasitism. Recent works suggest the importance of genetic factors related to the resistance to ticks in *Bos taurus* and *Bos indicus* breeds. In addition, studies show the critical role of cytokines in the prevention and progression of diseases. The aimed of this work was to evaluate the immune response in cattle artificially infested by *Boophilus microplus* through cell proliferation assays and detection of nitric oxide (NO) and interferon-gamma (IFN- γ) in peripheral blood mononuclear cells, in order to establish different resistance levels in Girolando breed. Six tick-resistant and six tick-susceptible animals from a F₂ population of 332 animals originated from crossing cattle F₁ (1/2 Holstein : 1/2 Gir) were selected based on the ticks counting and breeding value. Blood samples were collected for cell culture and stimulation in vitro with antigens of *B. microplus* in the points 0, 5 and 12 days after infestation. The cell proliferation and the NO and IFN- γ levels were evaluated by MTT, Griess and ELISA, respectively. There was a tendency of increasing proliferation of resistant animals (R) cells in the 5th day when they were stimulated with the tick antigens, returning to initial levels at 12th day. In the other hand, for the susceptible animals (S) the stimulation seemed to inhibit proliferation of cells in day 0, and did not altered the rates of 5th and 12th day. There was no significant difference between the cell proliferation of the groups R and S. When the cells obtained in the day 0 were cultured in the absence of stimulation, the levels of NO of animals R tended to be higher than that of the animals S. The stimulation with tick antigens inhibited the NO production by cells of animals R in the 5th day. In addition, there was no significant difference in NO and IFN- γ production between the groups R and S. The results suggest that NO may play a role in the early immune response that outlines the mechanism of resistance to ticks, since the most important changes were detected until the 5th day after the infestation. It is possible that the resistance mechanism is associated to the downregulation of immune response in order not to encourage the modulation by the ticks, although being effective enough to eliminate it. An evaluation of the immune response in the first moments after the tick fixation to cattle leather, as well as a more detailed monitoring of the temporal points of the infestation, could provide more conclusive data.

Keywords: tick *Boophilus microplus*, cattle, cell proliferation, nitric oxide, interferon-gamma.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Perfil do carrapato <i>B. microplus</i>	22
Figura 2	Ciclo evolutivo e biológico de <i>B. microplus</i> .	26
Figura 3	Perfis dos bovinos da raça Holandesa, Gir e sua mestiça Girolando	42
Figura 4	Esquema dos cruzamentos realizados para obtenção dos bovinos experimentais resistentes e susceptíveis	58
Figura 5	Ciclo de desenvolvimento da fêmea <i>B. microplus</i> .	59
Figura 6	Esquema dos métodos utilizados para seleção dos 6 bovinos mais resistentes e dos 6 mais susceptíveis da população F ₂ .	60
Figura 7	Equação para cálculo da concentração de proteínas pelo método quantitativo de absorção UV (280 / 260 nm).	62
Figura 8	Ilustração da técnica de separação de células (Ficoll-Hypaque).	63
Figura 9	Esquemas de coleta de sangue e cultura das células bovinas: pontos temporais e condições experimentais.	64
Figura 10	Equação para cálculo da porcentagem de proliferação celular.	65
Figura 11	Equação química da síntese de óxido nítrico.	66
Figura 12	Equação química representativa da reação de Griess.	67
Figura 13	Esquema do complexo imune formado no método ELISA sanduíche.	68
Figura 14	Seqüência resumida do ELISA formato sanduíche.	69
Figura 15	Proliferação das células obtidas dos animais R e S nos dias 0, 5 e 12 após infestação por <i>B. microplus</i> e cultivadas <i>in vitro</i> por 48 h.	72
Figura 16	Produção de NO por células obtidas de animais R e S nos dias 0, 5 e 12 após infestação por <i>B. microplus</i> e cultivadas <i>in vitro</i> por 48 h.	74
Figura 17	Produção de NO por células obtidas de bovinos R e S nos dias 0, 5 e e 12 após infestação por <i>B. microplus</i> e cultivadas <i>in vitro</i> por 48h.	75
Figura 18	Produção de IFN- γ por células obtidas de animais R e S nos dias 0, 5 e 12 após infestação por <i>B. microplus</i> e cultivadas <i>in vitro</i> por 48 h.	76

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Bm	<i>Boophilus microplus</i> (carrapato de bovinos)
R	Grupo de bovinos resistentes à infestação pelo carrapato
S	Grupo de bovinos susceptíveis à infestação pelo carrapato
EGS	Extrato de glândulas salivares do carrapato
PS	Proteínas salivares: antígenos das glândulas salivares do carrapato
PI	Proteína intestinal: antígeno do intestino do carrapato
NO	'Nitric oxide' (Óxido nítrico)
NOS	'Nitric oxide sintase' (Enzima óxido nítrico sintase)
IFN-γ	'Interferon-gamma' (interferon-gama)
IL-1α	Interleucina 1 alfa
IL-1β	Interleucina 1 beta
IL-2	Interleucina 2
IL-3	Interleucina 3
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
IL-7	Interleucina 7
IL-8	Interleucina 8
IL-9	Interleucina 9
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
IL-15	Interleucina 15

IL-18	Interleucina 18
TNF-α	'Tumor necrose factor alfa' (Fator de necrose tumoral alfa)
TNF-β	'Tumor necrose factor beta' (Fator de necrose tumoral beta)
TGF-β	'Transformation and growing factor beta' (Fator de crescimento e transformação beta)
GM-CSF	'Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor' (Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos)
TRL	'Toll-like receptors' (Receptores do tipo 'toll-like')
MHC	'Major Hystocompatibilite complex' (Complexo de histocompatibilidade principal)
CD	'Cluster of diffentiation' (Grupamento de diferenciação: marcador fenotípico de linfócitos)
PAMP	Padrões moleculares associados ao patógeno
PPR	Receptores de reconhecimento padrão
Ig	Imunoglobulinas (anticorpos)
AA	Ácido aracdônico
PG	Prostaglandina
PGE2	Prostaglandina E2
PBMC	'Peripheral blood mononuclear cells' (células mononucleares do sangue periférico)
PMN	Células polimorfonucleares
APC	'Antigen presenting cell' (células apresentadoras de antígenos)
NK	'Natural Killer' (células matadoras naturais)
LT	Linfócito T
LTh	Linfócito T 'helper' (auxiliadores)
LTc	Linfócito T citotóxico
LTreg	Linfócito T regulatório

LB	Linfócito B
ConA	Concanavalina A
PHA	'Phytohemagglutinin' (fitohemaglutinina)
PBS	'Phosphate buffered saline' (solução tampão salina fosfatada)
PWN	'Pokeweed mitogen' (mitógeno)
RPMI	Meio líquido para cultura de células
SFB	Soro fetal bovino
DMSO	'Dimethyl sulfoxide' (dimetilsulfóxido): $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$
MTT	3-(4,5 dimetiltiazol-2yl)-2-5-difenil-2H tetrazolato de bromo
NADPH	'Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate' (Fosfato dinucleótido adenina nicotinamida)
NEED	N-(1-naftil) etilenodiamina
TPB	Tristezas parasitárias bovinas
BmTI	'Boophilus microplus trypsin inhibitors' (Inibidores de tripsina do carrapato)
ELISA	'Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay' (Ensaio Imunoenzimático)
dpi	Dias pós-infestação (com o carrapato <i>Boophilus microplus</i>)
LPS	Lipopolissacárido (endotoxina presente na parede celular bacteriana)
P	Geração parental: primeiros indivíduos cruzados de uma população em estudo - pais da prole F ₁ .
F₁	Geração filial 1: primeiros descendentes da geração parental P.
F₂	Geração filial 2: resultado da autofecundação da geração F ₁ .
APC	'Antigen presenting cell' (célula apresentadora de antígeno)
PCR	'Polymerase Chain Reaction' (reação em cadeia da polimerase)
UV	Radiação ultravioleta
NO₃⁻	Nitrato
NO₂⁻	Nitrito

CO₂	Gás carbônico
O₂	Oxigênio
Ca²⁺	Cálcio
H₃PO₄	Ácido fosfórico
NaNO₂⁻	Nitrito de sódio
rpm	Rotações por minuto (refere à centrifugação)
ppm	Partes por milhão: a concentração ppm em massa expressa a massa de soluto (disperso), em µg, existentes em 1 g (1 milhão de µg) de solução)
OD	'Optical density' (Densidade óptica)
g	Força centrífuga
nm	Nanômetros: unidade de comprimento (1 nm = 1,0×10 ⁻⁹ metros)
µg	Microgramas
mg	Miligramas
µL	Microlitros
mL	Mililitros
mm	Milímetros
°C	Grau Celsius

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	20
1.1 O carrapato <i>Boophilus microplus</i>	21
1.1.1 Histórico e distribuição.....	23
1.1.2 Classificação.....	23
1.1.3 Ciclo biológico de <i>B. microplus</i>	24
1.1.4 Importância econômica.....	27
1.1.5 Transmissão de doenças	28
1.1.6 Elementos importantes no parasitismo.....	29
A) Glândula salivar e saliva	29
B) Hemolinfa e tubo digestivo.....	30
1.1.7 Controle do carrapato	31
A) Controle químico	31
B) Controle biológico	32
C) Controle imunológico	33
1.2 Resistência dos bovinos ao carrapato.....	38
1.2.1 Mecanismos de resistência	38
1.2.2 Variação genética entre raças	40
1.3 Aspectos básicos da resposta Imunológica	43
1.3.1 Imunidade inata e adquirida (celular e humoral)	43
1.3.2 Óxido nítrico	45
1.3.3 Interferon-gama	47
1.3.4 Proliferação celular	48
1.4 Relação parasito-hospedeiro.....	49
1.4.1 Resposta Imune bovina contra o carrapato	50
1.4.2 Mecanismos de evasão e modulação do carrapato	53
2. OBJETIVOS.....	57
3. METODOLOGIA.....	58
3.1 Obtenção de bovinos F ₂ (Gir X Holandês)	58
3.2 Infestação artificial.....	59
3.3 Determinação do nível de resistência ao carrapato	60
3.4 Obtenção das amostras de sangue periférico bovino.....	61
3.5 Obtenção dos antígenos do carrapato	61

3.6	Determinação da concentração proteica do EGS.....	62
3.7	Separação de células sanguíneas bovinas	62
3.8	Culturas de células bovinas	64
3.9	Avaliação da proliferação celular pelo método MTT	65
3.10	Dosagem de óxido nítrico (NO) pelo método de Griess.....	66
3.11	Dosagem de interferon-gama (IFN- γ) pelo método ELISA.....	68
3.12	Análise estatística.....	70
4.	RESULTADOS.....	71
4.1	Avaliação da proliferação celular.....	71
4.2	Avaliação da produção de Óxido Nítrico	73
4.3	Avaliação da produção de interferon-gama.....	76
5.	DISCUSSÃO.....	77
6.	CONCLUSÕES.....	86
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	89

1 INTRODUÇÃO

O *Boophilus microplus*, principal espécie de carrapato bovino, é um dos grandes entraves na pecuária de países localizados em zonas tropicais e subtropicais do mundo, onde esse ectoparasito encontra condições favoráveis de sobrevivência e desenvolvimento (WILLADSEN e JONGEJAN, 1999).

Os prejuízos causados ao rebanho, como reduções no ganho de peso, na produção de leite e na qualidade do couro, diminuição da fertilidade, ocorrências de doenças secundárias e até perdas por morte, refletem no desempenho produtivo e econômico dos sistemas de produção de carne e leite e, juntamente com os custos relativos a tratamentos com carrapaticidas, afetam a competitividade desses produtos no mercado externo (HORN e ARTECHE, 1985; TEODORO *et al.*, 2004).

O Brasil deixa de produzir 26 milhões de arroba de carne/ano e 4 bilhões de litros de leite/ano, gerando prejuízos da ordem de R\$ 2,24 bilhões (MARTINEZ *et al.*, 2004). Minas Gerais possui uma grande área explorada para produção leiteira, o que o posiciona entre os principais estados produtores de leite do país; contudo, a produtividade alcançada nos rebanhos mineiros é baixa e, dentre suas causas, os aspectos relacionados à saúde ocupam grande destaque (ROCHA, 1996-a/b; 1997).

Ainda não está claro como os mecanismos imunes guiam a interação parasito-hospedeiro determinando o sucesso ou não do parasitismo. Trabalhos apontam para fatores genéticos relacionados à resistência ao carrapato nas raças bovinas *Bos taurus* e *Bos indicus* (TEODORO *et al.*, 2004) e para o papel crítico das citocinas na regulação da interface parasito-hospedeiro (GILLESPIE *et al.*, 2001).

Os carrapatos permanecem por longos períodos fixados nos hospedeiros sendo expostos ao seu sistema de defesa, o que provoca inflamação e ativa a imunidade humoral e celular (WILLADSEN e JONGEJAN, 1999). Em contrapartida, componentes imunogênicos da glândula salivar do carrapato modulam a resposta bovina para perfis de citocinas favoráveis à hematofagia (WIKEL, 1996).

Diante da necessidade de desenvolvimento de métodos alternativos de controle que diminuam a dependência de produtos químicos, a caracterização da resposta imune que confere aos bovinos o perfil de resistência ao carrapato e a

compreensão dos mecanismos imunológicos que guiam a interação parasito-hospedeiro constituem dados cruciais a serem empregados nos novos estudos.

Dessa forma, este trabalho propõe a avaliação da resposta imunológica de bovinos F₂ (Gir X Holandês) infestados artificialmente por *B. microplus* através de ensaios *in vitro* de proliferação celular e detecção de óxido nítrico (NO) e interferon-gama (IFN- γ) em células mononucleares do sangue periférico (PBMC) a fim de caracterizar diferentes níveis de resistência em animais mestiços Gir X Holandês.

1.1 O CARRAPATO *Boophilus microplus*

A subclasse *Acari*, da classe *Arachnida*, à qual pertencem os carrapatos e outros ácaros, constitui um grupo muito heterogêneo, apresentando diversidade de hábitos e habitats (GUIMARÃES *et al.*, 2001).

Os carrapatos são aracnídeos hematófagos e estão divididos em dois grupos principais, os *Argasidae* (pequenos carrapatos) e os *Ixodidae* (grandes carrapatos). Cerca de 80% (683 espécies) são *Ixodidae*, destacando-se os gêneros *Amblyomma*, *Boophilus*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Hyalomma*, *Ixodes* e *Rhipicephalus* (JONGEJAN e UILENBERG, 2004).

A espécie *Boophilus microplus* (Fig.1) foi descrita pela primeira vez por Canestrini em 1887, e seu nome de origem grega significa: *Boo* = boi, *philus* = “amigo”, *microplus* = menor, ou seja, “menor amigo do boi”.

Dentre as cinco espécies que compõem o gênero *Boophilus*, essa é a única encontrada no Brasil (PEREIRA, 1982), sendo considerada a mais prejudicial para a bovinocultura brasileira (EVANS *et al.*, 2000).

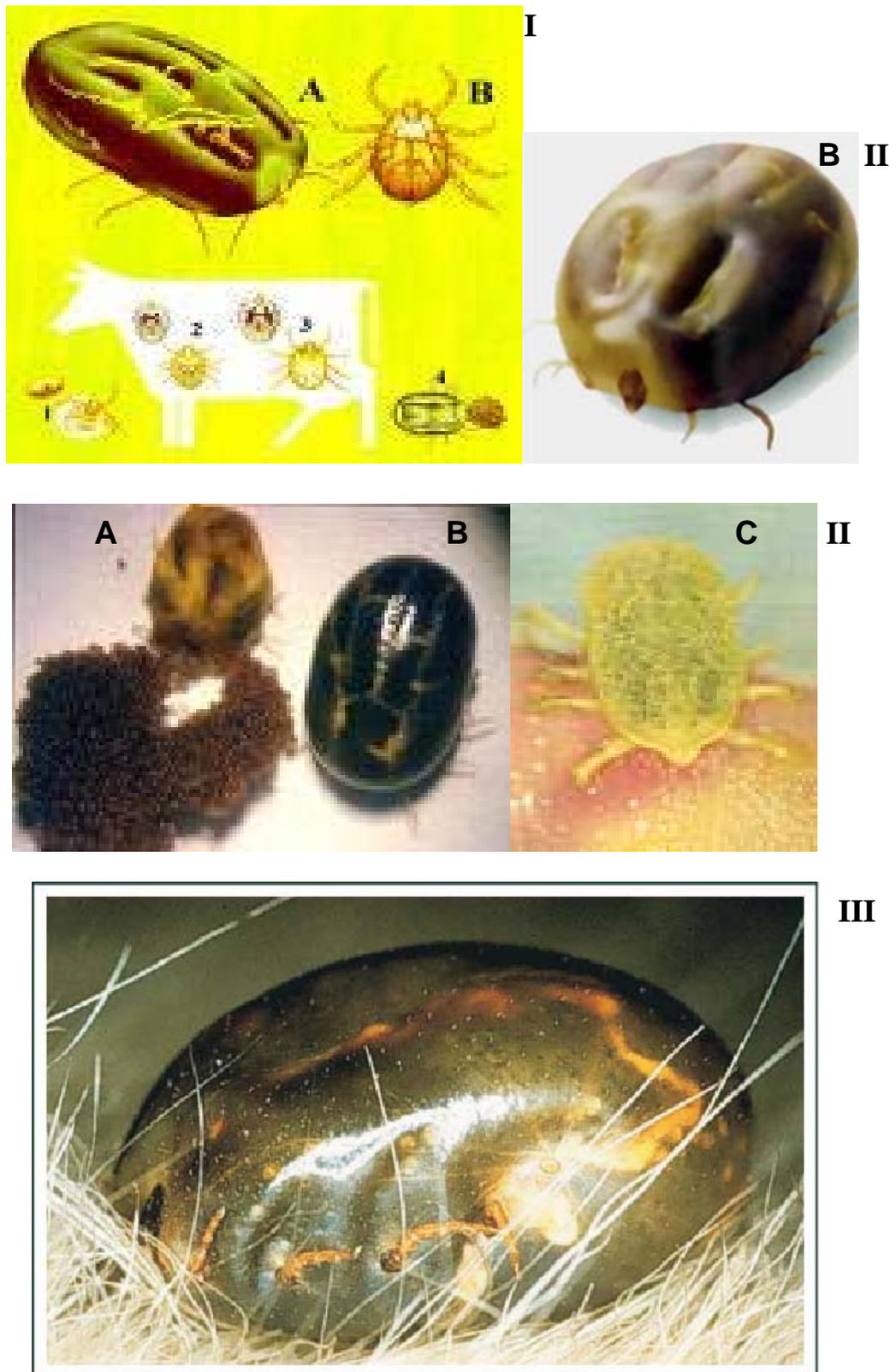


Figura 1 – Perfil do carrapato *B. microplus*. I) Dimorfismo sexual entre fêmea (A) e macho (B) durante os diferentes estágios do ciclo. II) Variação do aspecto morfológico da fêmea: (A) teleógina após a oviposição, (B) teleógina ingurgitada e (C) fêmea adulta imatura. III) Fêmea ingurgitada de *Boophilus microplus* fixada na pele de bovino. O tamanho da teleógina varia de 1,9 a 2,5 mm de comprimento por 1,1 a 1,6 mm de largura antes de ingurgitar e atinge 13 mm de comprimento por 8 mm de largura quando ingurgitada.

1.1.1 HISTÓRICO E DISTRIBUIÇÃO DE *B. microplus*

B. microplus é originário do sudeste da Ásia, notadamente da Índia e da ilha de Java. A expansão desse carrapato para as zonas tropicais se deu em função de expedições exploradoras que movimentavam mercadorias e animais, e ele se estabeleceu dentro dos climas demarcados pelos paralelos 32° Norte e 32° Sul (NUÑES *et al.*, 1982). Atualmente, possui ampla distribuição mundial, estando presente na Austrália, México, África, América Central e América do Sul (JONGEJAN e UILENBERG, 2004).

No Brasil, sua introdução parece ter ocorrido no início do século XVIII pela vinda de animais comprados do Chile, via Rio Grande do Sul. Hoje, sua presença é registrada em todos os estados do país, e isso se deve, principalmente, às condições climáticas ótimas com temperaturas médias anuais superiores a 17°C e índices pluviométricos acima de 500mm (HORN, 1983).

1.1.2 CLASSIFICAÇÃO DE *B. microplus*

De acordo com FLECHTMANN (1990), *B. microplus* possui a seguinte classificação, descrita por sua posição sistemática e os respectivos autores:

Filo – Arthropoda , Von Siebold & Slannius, 1845;

Subfilo – Chelicerata, Heymons, 1901;

Classe – Aracnida, Lamarck, 1802

Subclasse – Acari, Leach, 1817;

Ordem – Parasitiformes, Renter, 1909;

Subordem – Metastigmata, Canestrini, 1891; Ixodides, Leach, 1815;

Família – Ixodidae, Murray, 1887;

Gênero – Boophilus, Canestrini, 1887.

1.1.3 CICLO BIOLÓGICO DE *B. microplus*

B. microplus é um parasito monoxeno, isto é, depende apenas de um hospedeiro em seu ciclo biológico, preferencialmente o bovino (ANDREOTTI, 2002). Outras espécies podem comportar-se como hospedeiros, entre os quais, búfalos, jumentos, ovinos, caprinos, cães, gatos, porcos, veados, onças, preguiças, cangurus e coelhos (ARTHUR, 1960).

O ciclo biológico de *B. microplus* (Fig.2) é composto por duas fases complementares, a de vida parasitária, que se inicia quando a larva se fixa no hospedeiro; essa fase depende menos das influências do clima, sendo constante nas diversas regiões onde o carrapato está estabelecido. E a de vida livre, que se inicia com a queda da fêmea ao solo; essa fase é vulnerável às interferências climáticas, especialmente temperatura e umidade do ar (GONZALES, 1995).

Sob condições climáticas favoráveis, o período de vida livre dura em torno de 32 dias, durante os quais o carrapato não se alimenta e sobrevive exclusivamente das suas reservas (FARIAS, 1995), sendo dividido em pré-postura (3 dias), postura (15 dias), eclosão (7 dias) e larvas infestantes (7 dias) (GONZALES, 1995). A teleógina (fêmea fecundada e ingurgitada - repleta de sangue) se desprende do hospedeiro e cai no solo, onde busca um local abrigado, úmido e escuro para realizar a postura de cerca 2.000 a 4.000 ovos. A fêmea morre após a postura dos ovos e esses sofrem embriogênese. Aproximadamente após 7 dias da oviposição, as larvas eclodem e, em até seis dias, tornam-se infestantes. As larvas sobem nas pastagens por geotropismo negativo (VERÍSSIMO, 1996), localizando o hospedeiro por odor, vibrações, sombreamento, estímulo visual e gradiente de concentração de CO₂ (SONENSHIME, 1993). O período de atividade das larvas na vegetação ocorre nas primeiras horas da manhã e ao final da tarde, quando a temperatura é mais amena (GONZALES, 1995). Em presença de umidade alta e temperaturas amenas, as larvas podem sobreviver até oito meses (HITCHCOCK, 1955).

A fase parasitária dura em média 21 dias, as larvas infestantes tendem a fixar-se nas regiões mais finas da pele do hospedeiro, as quais favorecem seu desenvolvimento, tais como base da cauda, interior das orelhas, úbere, mamas,

escroto, regiões perineal, perianal, vulvar, virilha e entrepernas (FARIAS, 1995). Essas regiões preferenciais de fixação são determinadas em função da espessura, vascularização e temperatura da pele, bem como pela dificuldade de acesso às lambidas do hospedeiro (WAGLAND, 1978; ANDREOTTI, 2002; AVELINO e NETO, 2004).

As larvas fixadas alimentam-se de plasma e sofrem mudas cuticulares originando ninfas no 8° dia após fixação. Essas se alimentam de sangue, se distendem (metaninfas) e passam por nova muda, transformando-se em um indivíduo sexuado, macho ou fêmea. O macho jovem, denominado neandro, torna-se adulto no 15° dia após fixação, recebendo o nome de gonandro; enquanto a fêmea jovem, denominada neógina, torna-se adulta (semi-ingurgitada) no 18° dia após fixação, recebendo o nome de partenógina.

Nesse período ocorre o acasalamento e a fêmea fecundada continua seu repasto sanguíneo até o ingurgitamento total, quando é denominada teleógina. No 21° dia, elas desprendem-se do hospedeiro e caem no solo, dando prosseguimento à fase não parasitária, enquanto os machos continuam sobre o hospedeiro se alimentando ocasionalmente e fecundando outras fêmeas (FARIAS, 1995).

As larvas de *B. microplus* alimentam-se preferencialmente de plasma, apenas nos momentos que precedem o rápido ingurgitamento das fêmeas é que o sangue torna-se o principal constituinte alimentar (BENNETT, 1974). Nesta fase, a ingestão de sangue atinge valores em torno de 0,3 a 0,5 mL (SEIFERT, 1970) e a fêmea pode aumentar seu peso em até 200 vezes (KEMP *et al.*, 1982).

Além de temperatura e umidade do ar, a luminosidade, as estações do ano (GUARAGNA *et al.*, 1988), a forma de criação do bovino (a pasto ou estabulado), o tipo de pastagem (THOMPSON *et al.*, 1978) e o grau de resistência do hospedeiro (MORAES *et al.*, 1986) também influenciam no tempo de duração do ciclo biológico do carrapato (ROBERTS, 1968), no número e tamanho dos carrapatos, no peso das teleóginas e no volume de ovos postos (HEWETSON, 1972).

A

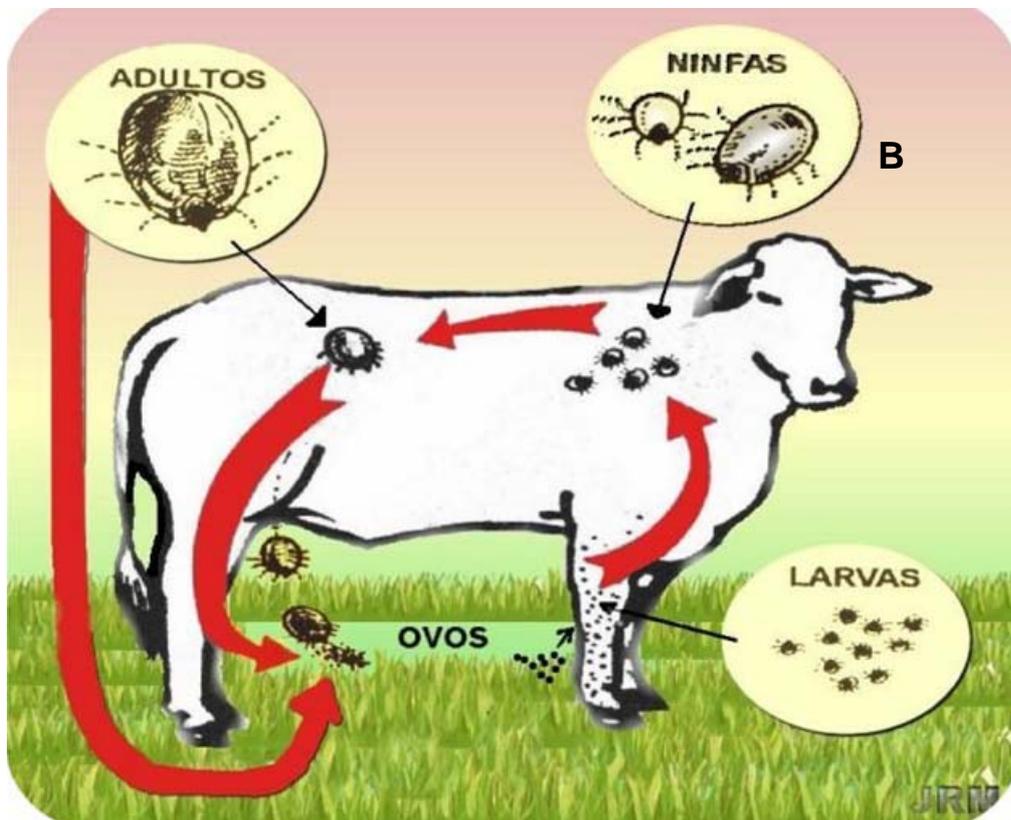


Figura 2 – Ciclo evolutivo (A) e biológico (B) do carrapato *Boophilus microplus*.

1.1.4 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DO CARRAPATO

O *B. microplus* ocasiona grandes perdas econômicas na produção de carne, leite e couro em países tropicais e subtropicais (SUTHERST *et al.*, 1983). Os danos causados ao bovino pela infestação por carrapatos variam de acordo com o grau de resistência e idade do animal, o nível da infestação e se o parasito está atuando como vetor para outras enfermidades (RADOSTIS, GAY E BLODD, 2000).

Os prejuízos econômicos causados pelo carrapato ocorrem de forma direta pelo efeito da picada no bovino e suas conseqüências, como irritabilidade, perda de sangue acarretando anemia, supressão do apetite e baixa conversão alimentar causando redução no peso e na produção de leite, miíases cutâneas secundárias e danos no couro diminuindo sua qualidade, queda de fertilidade, transmissão de doenças e mortalidade. Entre as perdas indiretas estão o custo do controle químico, incluindo o produto, os equipamentos e a mão de obra, os resíduos deixados nos produtos de origem animal e a poluição do ambiente decorrente do uso de acaricidas (HORN, 1983; GONZALES e SERRA-FREIRE, 1992).

Infestações por carrapatos acarretam prejuízos mundiais estimados em sete bilhões de dólares anuais (DE CASTRO, 1997). E no Brasil, a estimativa é de 2,24 bilhões de reais, sendo que o país deixa de produzir 26 milhões de arrobas de carne/ano e 4 bilhões de litros de leite/ano (MARTINEZ *et al.*, 2004). Segundo Leite (1988), o *B. microplus* está presente em 100% dos rebanhos destinados à produção leiteira da região Sudeste brasileira.

Estudos recentes na Austrália calcularam uma perda anual de quatro milhões de dólares na criação de gado, sendo 51% devido a perdas na produção de leite, carne e couro e 49% devido aos custos do controle do carrapato (JONSSON *et al.*, 2000). Segundo Honer e Gomes (1990), se um bovino infestado com carrapatos não for tratado pode sofrer perdas de 18 a 47 kg de peso/ano, e de acordo com ERVIN *et al.* (1987), uma infestação com média de 40 carrapatos por bovino causa perda na produção de US\$ 40/animal. Furlong e colaboradores (1996) utilizaram fêmeas mestiças Holandês-Zebu e verificaram queda de 23% na produção de leite por vaca infestada com uma média de 105 carrapatos/animal.

1.1.5 TRANSMISSÃO DE DOENÇAS

Um dos principais impactos da infestação por carrapatos sobre a pecuária refere-se à transmissão de doenças ao gado, pois além das debilidades geradas pela ação direta da picada, o bovino ainda é afetado pelos sintomas adicionais de mais uma patogenia (KAUFMAN, 1989).

Os carrapatos são vetores de uma variedade de microorganismos patogênicos que são inoculados junto com a saliva durante a hematofagia: protozoários, riquetsias, espiroquetas e vírus (JONGEJAN e UILENBERG, 2004).

O *B. microplus* é o principal vetor de *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis* e *Babesia bigemina*, responsáveis por mortes de bezerros ou animais adultos expostos ao carrapato pela primeira vez (VERÍSSIMO *et al.*, 1996). No Brasil destacam-se dois gêneros: a riquetsia *Anaplasma* e o protozoário *Babesia* que juntamente com o carrapato formam o complexo conhecido como Tristeza Parasitária Bovina (TPB).

A habilidade dos vetores artrópodes em transmitir patógenos pode ser atribuída a moléculas com atividade farmacológica imunomoduladora como a prostaglandina E₂ (PGE₂), e depende também do tipo de resposta imune do bovino (Th1 ou Th2) (BOWMAN *et al.*, 1995; DICKINSON *et al.*, 1976).

Parece que componentes imunogênicos da glândula salivar do carrapato ativam células Th2 (IL-4, IL-10), e inibem o estímulo de células Th1 (IL-2, IFN- γ) criando um microambiente ótimo para o desenvolvimento de patógenos (WIKEL e BERGMAN, 1997; WIKEL e ALARCON-CHAIDEZ, 2001; BROSSARD e WIKEL, 2004).

Além disso, a IL-10, como outros componentes glicosilados presentes na saliva, pode diminuir a atividade de macrófagos prevenindo a destruição de agentes infecciosos (GANAPAMO *et al.*, 1997). Sendo assim, os agentes patogênicos que estão na presença de saliva do carrapato são mais infectantes do que na sua ausência (WIKEL, 1996).

1.1.6 ELEMENTOS IMPORTANTES NO PARASITISMO (IMUNÓGENOS)

A) GLÂNDULA SALIVAR E SALIVA DO CARRAPATO

A glândula salivar é vital para o sucesso biológico dos carrapatos ixodídeos, além de ser a maior rota de transmissão de patógenos. Suas principais funções incluem absorção de vapor de água proveniente de ar insaturado, excreção do excesso de fluido para concentrar o sangue ingerido e secreção de proteínas bioativas e componentes lipídicos (SAUER *et al.*, 2000).

Aproximadamente 0,4 mL de excesso de fluido são excretados de volta ao hospedeiro via glândula salivar concentrando o alimento ingerido (SAUER *et al.*, 2000). Kaufman e Phillips (1973) estimaram que, durante o ciclo alimentar do *Dermacentor andersoni*, 80% do alimento total ingerido é excretado e, desses, em torno de 75% ocorre via salivação. Em *B. microplus* foi demonstrada excreção de água via salivação (TATCHELL, 1967).

Durante fixação e alimentação do parasito, os ácinos glandulares crescem marcadamente em tamanho (massa e conteúdo protéico aumentam 25 vezes) sem aumentar o número de células (COONS e ALBERTI, 1999).

As glândulas salivares contêm altos níveis de prostaglandinas (PG), as quais são derivadas do ácido aracônico (AA). Os AA constituem 9% do total de ácidos graxos do carrapato e estão aumentados em mais de 41 vezes durante a alimentação, servindo de fonte para produção de PG. Supõe-se que esse aumento seja proveniente da dieta, uma vez que carrapatos não possuem mecanismos para sintetizar AA (BOWMAN *et al.*, 1995). No entanto, são capazes de acumular 3H-AA nos fosfolipídeos glandulares, provavelmente, por intermédio da dopamina que estimula canais de cálcio aumentando a concentração de AA livres na glândula salivar (BOWMAN *et al.*, 1997).

A saliva possui composição semelhante à da glândula salivar, uma vez que serve como meio de transporte para as substâncias secretas por essa última. Assim, contém, além de excesso de fluido, um amplo número de proteínas e moléculas

lipídicas (BOWMAN *et al.*, 1997) com atividade antiagregação plaquetária, anticoagulante, antiinflamatória, imunossupressora, ativadora de células T e inibidora do sistema complemento (RIBEIRO, 1989), como as PGs (QIAN *et al.*, 1998).

Altas concentrações de PGE₂ e PGE₂ μ foram detectadas na saliva do *Amblyomma americanum* (BOWMAN *et al.*, 1997) e nas glândulas salivares de *B. microplus* (DICKINSON *et al.*, 1976), assim como foram encontradas proteínas ligantes de histamina na saliva de *Rhipicephalus appendiculatus* (PAESEN *et al.*, 1999).

B) HEMOLINFA E TUBO DIGESTIVO DO CARRAPATO

A hemolinfa de carrapatos é rica em serinoproteases, que são moléculas relacionadas com a oxidação da tirosina em melanina - mecanismo de defesa de insetos. Também contém inibidores de proteases, que além de controlarem essas reações (CHERQUI *et al.*, 2001), atuam na hemóstase de artrópodes (MULENGA *et al.*, 2000), agem sobre enzimas de fungos e bactérias (KANOST, 1999) e inibem as serinoproteases do hospedeiro envolvidas nos processos de coagulação sanguínea e ativação de citocinas (GORDON e ALLEN, 1991).

Inibidores de serinoproteases estão distribuídos durante o desenvolvimento do ciclo de *B. microplus*, e o isolamento de diferentes formas indica a existência de formas estágio-específicas (WILLADSEN e MCKENNA, 1983).

A concentração desses inibidores diminui rapidamente no início da fase parasitária, sugerindo que o inibidor seria secretado para o interior do hospedeiro após a fixação da larva (WILLADSEN e RIDING, 1980). Recentemente, foi descrito que a concentração dos inibidores de tripsina de *B. microplus* (BMTIs) difere durante as fases de ovo para larva (ANDREOTTI *et al.*, 2001), indicando um possível papel nos processos de fixação e alimentação do carrapato (ANDREOTTI *et al.*, 2002). Inibidores de trombina, proteína importante na coagulação do hospedeiro, também foram isolados em *B. microplus* (HORN *et al.*, 2000).

Além disso, foi demonstrado que a hemolinfa contém lectinas, as quais estão relacionadas com o reconhecimento de agentes estranhos e transmissão de patógenos nos invertebrados (KOVÀR *et al.*, 2000); peptídeos homólogos à defensina de escorpião (NAKAJIMA *et al.*, 2003) e fragmentos de hemoglobina bovina (FOGAÇA *et al.*, 1999), exercendo ação antimicrobiana no carrapato.

O tubo digestivo contém uma substância hemolítica que facilita a digestão sanguínea, confirmada pela presença de hemolisina (RIBEIRO, 1988). Carrapatos não possuem a capacidade de sintetizar heme, portanto o *B. microplus* capta essa molécula pela degradação da hemoglobina proveniente do sangue ingerido, em seguida ocorre a ligação de lipoproteínas da hemolinfa ao grupo heme, que transportam-no do tubo digestivo para os tecidos (MAYA-MONTEIRO *et al.*, 2000).

Apesar de exercerem ação imunorregulatória, os elementos secretados e inoculados durante a alimentação do parasito constituem importantes antígenos para os bovinos e podem induzir respostas imunes celular e humoral, além da formação de memória imunológica, por isso são alvos de estudos científicos, especialmente daqueles que investem na produção de novas vacinas como forma alternativa de controle do carrapato.

1.1.7 CONTROLE DO CARRAPATO

A) CONTROLE QUÍMICO

O uso de acaricidas é a principal forma de controle profilático e terapêutico de carrapatos nos rebanhos bovinos, principalmente por meio de aspersão ou banho de solução aquosa (PRUETT, 1999). Os sistemas dorsal, injetável e por bolos gástricos têm sido incrementados nos últimos anos, bem como vêm sendo desenvolvidas outras formas de administração dos produtos com o objetivo de facilitar o manejo e aumentar a eficiência dos produtos.

Embora, atualmente, seja o único método eficaz, essa prática acarreta inúmeras desvantagens, pois além de dispendiosa, deixa resíduos químicos nos

produtos de origem animal, causa poluição das cadeias alimentares e do ambiente e favorece o aparecimento de linhagens de carrapatos resistentes, diminuindo o período de proteção e aumentando o custo de tratamento (BULLMAN *et al.*, 1996; JONGEJAN e UILENBERG, 2004).

No Brasil, o combate aos carrapatos é feito principalmente pelo uso de arsenicais, organofosforados, carbamatos, diamidinase e piretróides. No entanto, verifica-se o aparecimento de cepas resistentes condicionadas principalmente pela intensidade de uso e aplicação incorreta do produto (LEITE, 1988).

B) CONTROLE BIOLÓGICO

O controle biológico também vem sendo estimulado apesar de sua resposta ainda pouco expressiva. Os métodos incluem a seleção de bovinos resistentes aos carrapatos (HONER e GOMES, 1990), cultivo de pastagens que dificultam a sobrevivência das larvas (SUTHERST *et al.*, 1982), rotação de pastagens (ELDER *et al.*, 1980), manejo de predadores naturais (ALVES BRANCO *et al.*, 1983) e formigas (GONZALES, 1995), uso de patógenos como o fungo *Beauveria bassiana* (CORDOVÉS, 1997) e a bactéria *Cedecea lapagei* (BRUM, 1988) e a utilização de compostos naturais como pesticidas (DAVEY *et al.*, 2001).

Embora a seleção de raças resistentes ao carrapato esteja entre as alternativas mais promissoras, existem grandes dificuldades em se aferir a resistência dos animais em base rotineira, como ocorre com as características produtivas, inviabilizando programas de seleção para resistência (TEODORO *et al.*, 2004). Entretanto, alternativas estão sendo estudadas no Brasil e no mundo inteiro e, brevemente, poderão contribuir significativamente na identificação de animais com genótipos mais resistentes a esses ectoparasitos.

O incremento de programas de seleção considerando a resistência de bovinos ao *B. microplus* tem apostado na exploração de genes de efeito maior (FRISCH, 1994; FRISCH *et al.*, 2000), assim como na utilização de marcadores moleculares (MARTINEZ *et al.*, 2004) associados à resistência para compreender melhor a fisiologia e o complexo mecanismo de resistência ao carrapato.

B) CONTROLE IMUNOLÓGICO

Uma alternativa que vem sendo intensamente estudada e desenvolvida nas últimas cinco décadas é o controle do carrapato por meio de imunização do rebanho, baseado na observação de ocorrência de resistência natural do bovino adquirida depois de repetidas infestações com o ectoparasito (ROBERTS, 1968; WAGLAND, 1975; WILLADSEN *et al.*, 1989; BARRIGA *et al.*, 1993).

Uma das primeiras observações da resistência adquirida foi realizada por Trager, em 1939, que verificou aquisição de resistência em cobaias e coelhos infestados por *Dermacentor variabilis* a futuras infestações, havendo redução no número e peso de carrapatos ingurgitados. Essa proteção também foi desenvolvida pela inoculação de extratos de larvas e pode ser transferida a outro animal pela doação de soro sensibilizado (DA SILVA VAZ JUNIOR, 1997).

Njau e Nyindo (1987), infestando coelhos com *R. appendiculatus* e *Rhipicephalus evertsi* observaram queda no número de carrapatos após sucessivas infestações e aumento de anticorpos contra glândula salivar a partir da primeira infestação. Enquanto Shapiro e colaboradores (1987) verificaram redução de 80% no peso dos carrapatos associada à presença de anticorpos contra antígenos de glândula salivar e intestino do parasito.

Vacinas são potencialmente importantes no controle de agentes causadores de doenças, principalmente por não serem agentes químicos, por terem um menor custo se associado à sua validade e porque o desenvolvimento de resistência é mais lento do que para os produtos químicos (WILLADSEN, 1997).

Bovinos infestados naturalmente com carrapatos desenvolvem linfócitos T (LT) e B (LB) de memória, o que proporciona uma resposta mais eficiente em reinfestações (WIKEL, 1996). A participação dos linfócitos na indução e manutenção de uma imunidade eficaz está bem definida, embora não esteja esclarecida a importância de cada tipo de resposta, celular ou humoral, na proteção contra o carrapato (LEAL *et al.*, 2003).

No processo de vacinação já está determinado que o maior mecanismo protetor é a imunidade humoral, através da produção de anticorpos que neutralizam antígenos do carrapato ou agem diretamente em órgãos importantes para o

parasitismo (glândulas salivares, hemolinfa e tubo digestório) após a ingestão do sangue sensibilizado (WILLADSEN e KEMP, 1988; WILLADSEN *et al.*, 1989; DE LA FUENTE *et al.*, 1998; GARCIA-GARCIA, *et al.*, 2000.).

Willadsen (1987), comparando a resposta imunológica gerada contra a infestação natural e a desenvolvida por vacinação com extrato de *B. microplus*, concluiu que, na primeira, a resposta é efetuada principalmente por hipersensibilidade imediata, causando rejeição das larvas; e na segunda, a resposta é efetuada principalmente por anticorpos contra a fase adulta causando lesões no sistema digestivo, reduzindo o número de carrapatos ingurgitados, o peso, a fecundidade e viabilidade dos ovos.

Wikel e Allen (1977) comparando atividade humoral e celular por meio de transferência de soro e gânglios linfáticos após infestação *D. andersoni* sugeriram que, além da resposta humoral, existe maior eficiência quando a imunidade celular participa do processo de desenvolvimento de resistência contra o carrapato.

Muitos ensaios de imunização de hospedeiros com diferentes antígenos de carrapato vêm sendo realizados. Extrato de glândula salivar (EGS) de *D. Andersoni* (WIKEL, 1981) e *A. americanum* (BROWN *et al.*, 1984) associado ao adjuvante de Freund incompleto resultou em proteção de cobaias desafiadas com larvas.

Brown (1988) verificou produção de anticorpos contra antígenos do intestino do carrapato em cobaias e coelhos infestados com *A. americanum*, sugerindo regurgitamento durante o processo de alimentação.

Extratos de membranas intestinais de *B. microplus* extraídos com diferentes forças iônicas e detergentes, quando utilizados em vacinação de bovinos associados ao adjuvante saponina, protegeram entre 65 e 78%, exceto o extraído com alta força iônica (WONG e OPDEBEECK, 1989).

Quando esses antígenos foram obtidos por ultrasonicação e centrifugação diferencial, induziram proteção de mais de 90% contra infestações com larvas (JACKSON e OPDEBEECK, 1989).

De acordo com Opdebeeck e Daly (1990), tanto bovinos infestados com *B. microplus* quanto bovinos vacinados com extrato de membranas intestinais deste carrapato associado ao adjuvante saponina produziram resposta celular e humoral, mas o nível de anticorpos foi maior nos animais vacinados.

A vacinação de bovinos com extratos totais de fêmeas adultas de *B. microplus* e posterior desafio com larvas não gerou uma correlação entre os níveis

de anticorpos e proteção, e somente metade dos bovinos apresentou proteção eficaz (JONHSTON *et al.*, 1986). Dos carrapatos que se desenvolveram, 60% das fêmeas apresentou lesões no intestino, dificuldade de ingurgitamento e de postura (KEMP *et al.*, 1986).

Lee e Opdebeeck (1991) imunizaram bovinos com imunoprecipitados de anticorpos monoclonais contra antígenos intestinais do carrapato adulto e obtiveram redução de 62% na postura. Enquanto Toro-ortiz e colaboradores (1997) usando anticorpos monoclonais contra embrião (BrBm1, BrBm3 e BrBm4) e intestino (BrBm2) de fêmeas ingurgitadas de *B. microplus* obtiveram redução na oviposição de 50 e 70%, respectivamente. O anticorpo policlonal desenvolvido contra N-acetilhexosaminidase isolada de larva de *B. microplus* reagiu com diferentes antígenos na hemolinfa e reduziu a oviposição em 26%, quando inoculado em teleóginas (DEL PINO *et al.*, 1998).

Alguns trabalhos relatam reatividade cruzada entre antígenos de diferentes espécies de carrapatos. A resposta imune cruzada entre antígenos de glândula salivar de *Hyalomma anatolicum* e *B. microplus* revelou reação de hipersensibilidade do tipo imediato (PARMAR *et al.*, 1996). Animais vacinados com BM86 e desafiados com larvas de *B. annulatus* mostraram alta proteção (FRAGOSO *et al.*, 1998). A imunização de cobaias com células embrionárias de *A. americanum* acarretou redução no peso de fêmeas ingurgitadas, na postura e aumento da mortalidade dos carrapatos durante reinfestação com *A. americanum* e *D. andersoni*, mostrando a presença de antígenos comuns entre as espécies (WIKEL, 1985).

Antígenos que não são expostos ao sistema imunológico do hospedeiro durante uma infestação natural são denominados antígenos ocultos. Essas moléculas seriam capazes de desencadear uma resposta imune mais intensa por não terem sofrido as chamadas evoluções adaptativas do parasitismo (WILLADSEN & KEMP, 1988).

Atualmente, as vacinas são desenvolvidas a partir de um antígeno oculto denominado BM86, uma glicoproteína imunogênica do tubo digestivo de *B. microplus*, localizada na superfície apical de células endoteliais do estômago e intestino, com maior concentração nas microvilosidades das células digestivas (GOUGH e KEMP, 1993).

O gene BM86 foi clonado e sua proteína recombinante expressa em *Escherichia coli*, sua utilização na vacinação de bovinos conferiu 77% de proteção,

sendo menos eficiente que a proteína nativa, o que sugere ausência de glicosilação na síntese proteica por bactérias (RAND *et al.*, 1989). Também foi expressa em *Pichia pastoris* e sua utilização na imunização de bovinos resultou na redução de 50,5% em peso, 31% em número e 70% na habilidade reprodutiva dos carrapatos que se desenvolveram no hospedeiro (RODRIGUEZ *et al.*, 1994).

Na Austrália, a vacina baseada na proteína BM86 é comercializada com o nome de TickGARD (WILLADSEN *et al.*, 1995) e, em Cuba, GAVAC (DE LA FUENTE *et al.*, 1998). Embora a imunização com BM86 ofereça proteção parcial aos bovinos contra futuras infestações por *B. microplus* (RODRIGUEZ *et al.*, 1995 – a e b), não assegura o grau de proteção desejado para suprimir o uso de acaricidas sugerindo a necessidade de mais de um antígeno protetor (WILLADSEN *et al.*, 1996). Além disso, há a necessidade de revacinação contínua para manutenção dos níveis séricos efetivos de anticorpos, pois estes se mantêm apenas por cerca de oito semanas (WILLADSEN *et al.*, 1995), sendo que a recomendação atual é aplicar doses de reforços a cada dez ou doze semanas (MARTINEZ *et al.*, 2004). No Brasil, foi demonstrado que a imunização de bovinos com BM86 reduziu entre 45% e 60% o índice de infestação natural por *B. microplus* (RODRIGUEZ *et al.*, 1995 – a e b).

Além dos antígenos que compõem as vacinas comercialmente disponíveis, outras proteínas que também conferem algum grau de imunoproteção por interferir no sucesso reprodutivo do carrapato, têm sido descritas. Uma glicoproteína denominada BYC ("Boophilus Yolk pro-Cathepsin") foi detectada em ovos embrionários de *B. microplus*, onde parece atuar sobre a degradação da vitelina, que é a principal proteína de reserva do ovo (LOGULLO *et al.*, 1998).

A BMA7, uma glicoproteína isolada de teleóginas de *B. microplus*, induziu imunidade parcial em bovinos, e a co-vacinação com BM86 aumentou a eficácia da vacina TICKGARD (MCKENNA *et al.*, 1998).

A *Boophilus microplus* 91, glicoproteína purificada a partir de células de intestino e glândulas salivares de fêmeas adultas semi-ingurgitadas de *B. microplus*, apresentou redução de 14 a 52% na oviposição dos carrapatos provenientes de bovinos vacinados em testes com a proteína nativa (RIDING *et al.*, 1994).

Vacinação de ovinos com GP80 e VIT87, glicoproteínas derivadas do complexo vitelina purificadas de ovos e larvas de *B. microplus*, reduziram significativamente o número e o peso de fêmeas ingurgitadas e a oviposição (TELLAM *et al.*, 2002).

Diferentes construções da proteína 64TRP, isolada de glândula salivar de *R. appendiculatus*, ocasionaram proteção cruzada contra *Rhipicephalus sanguineus* e *Ixodes ricinus* estimulando resposta inflamatória local (TRIMNELL *et al.*, 2005).

Os mais novos antígenos candidatos para a vacina anti-carrapato são os inibidores de proteases oriundos do parasito. Vacinação do gado com inibidores de tripsina de *B. microplus* (BMTIs) reduziu o número de carrapatos e o peso dos ovos após o desafio com larvas de *B. microplus* (ANDREOTTI *et al.*, 2002). Vacinação do gado com uma combinação de dois inibidores de serinoproteases (serpins), rRAS-1 e rRAS -2 de *R. appendiculatus* resultou em redução do ingurgitamento de ninfas e aumento da mortalidade de carrapatos adultos (IMAMURA *et al.*, 2006).

Outra tendência é a imunização mediada por DNA. Sensibilização de ovinos usando um plasmídeo codificado com o gene da proteína BM86 mostrou resultados semelhantes à vacinação com a proteína recombinante (DE ROSE *et al.*, 1999). E a vacinação de camundongos com o plasmídeo pBMC2, codificador de BM86, induziu resposta imune celular e humoral contra *B. microplus* (RUIZ *et al.*, 2007).

Embora os antígenos ocultos sejam a base das vacinas comerciais, experimentos com antígenos naturalmente expostos ao sistema imunológico do hospedeiro associados aos antígenos ocultos demonstram o potencial da associação de diferentes alvos em uma mesma vacina (TRIMNELL, 2002).

Tendo em vista que a maioria dos antígenos estudados até o momento são glicoproteínas, a ausência de glicosilação das proteínas heterólogas obtidas em sistema procaríoto é um problema potencial no desenvolvimento de vacinas recombinantes contra *B. microplus*. Porém, essa dificuldade pode ser contornada pela utilização de um sistema de expressão eucarioto (LEAL *et al.*, 2003)

O desenvolvimento de novas opções de controle do carrapato é imprescindível, pois é necessário diminuir urgentemente a dependência de produtos químicos, sendo que a vacinação integrada à seleção de bovinos resistentes constitui a alternativa mais promissora para a pecuária.

1.1.8 RESISTÊNCIA DOS BOVINOS AO CARRAPATO

A) MECANISMOS DE RESISTÊNCIA

O mecanismo da resistência aos carrapatos é um fenômeno complexo e ainda pouco compreendido. Dois tipos de mecanismo foram descritos: 1) resistência inata, já presente no animal quando da primeira infestação e 2) resistência adquirida, que começa a ser evidenciado após a exposição do animal a algumas infestações por carrapatos (RIEK, 1962). Vários estudos baseados no segundo mecanismo mostram que o nível de resistência de animais aumenta após repetidas infestações quando comparado com a primeira infestação (ROBERTS, 1968; WAGLAND, 1978).

Alguns trabalhos relatam que zebuínos e taurinos destituídos de experiência prévia com o carrapato são igualmente susceptíveis à infestação primária por larvas de *B. microplus*, concluindo-se que essa resistência é um fenômeno adquirido (WAGLAND, 1975). Outros trabalhos relatam que a resistência inata parece não depender do contato prévio do bovino com o carrapato, pois bezerros mestiços zebus em sua primeira exposição ao carrapato após o nascimento foram mais resistentes que os de raças européias, indicando presença de imunidade inata (O'KELLY e SPIERS, 1976)

A resistência adquirida dos bovinos ao longo de infestações por carrapatos pode ser medida pelos seguintes indicadores: redução do peso final das teleóginas ingurgitadas, aumento do período de alimentação, decréscimo do número de ovos na postura, redução da viabilidade dos ovos e dificuldade de realizar a muda e ingurgitamento (WIKEL *et al.*, 1994).

Em animais resistentes, a rejeição aos carrapatos é freqüentemente baseada em reações de hipersensibilidade cutânea com produção de exudato edematoso e pruriginoso no local da picada em resposta às secreções salivares de larvas do *Boophilus microplus* (RIEK, 1962; WILLADSEN, 1978).

Já a susceptibilidade ao carrapato parece estar associada à resposta imune Th2 (BROSSARD e WIKEL, 2004). Scholer e Wikel (2001) verificaram que a modulação por carrapatos aumenta citocinas Th2, sugerindo que esse perfil seja mais favorável ao parasitismo e, portanto esteja associado à susceptibilidade.

Histamina procedente de mastócitos, além de ativarem a auto-limpeza do hospedeiro, atuam diretamente no desprendimento das larvas de carrapato Schleger e colaboradores (1976). Verríssimo e colaboradores (2002-a) verificaram que animais resistentes possuíam uma quantidade mais acentuada de mastócitos dérmicos que os animais susceptíveis.

Entre os mecanismos de defesa apresentados por animais considerados resistentes sobressaem-se os de auto-limpeza, ativados pela irritabilidade no local da picada do carrapato. Os hospedeiros direcionam suas defesas para região afetada pelo parasito e tentam se livrar das larvas mediante o ato de lambe-se ou de coçar-se de encontro a superfícies ásperas (ROCHA, 1976; 1984).

Alguns autores acreditam que a resistência poderia, também, ser mediada por fatores não adaptativos, tais como características inerentes à constituição da capa do pelame (VERÍSSIMO *et al.*, 2002-b), à presença de anastomoses arteriovenosas na pele do animal (SCHLEGER, 1981), cor, espessura ou área disponível para infestação da pele (MATTIOLI, 1998; MELTZER, 1996). As colorações da pele e do pêlo podem influenciar no comportamento dos bovinos, fazendo com que os de pelagem mais escura procurem locais protegidos do sol que são também locais de preferência dos carrapatos, facilitando o acesso das larvas aos animais, enquanto os de pelagem mais clara são menos infestados (OLIVEIRA e ALENCAR, 1987).

Andreotti (2002) ainda relata outras variáveis que podem interferir na resistência bovina ao carrapato. Na variável gênero, as fêmeas são mais resistentes que os machos, e com relação ao fator idade, os bezerros de até seis meses são mais resistentes que a mãe, sendo esse dado atribuído aos cuidados maternos, e a resistência vai aumentando com a idade.

Com relação à época do ano, os bovinos apresentam-se mais sensíveis no outono que no inverno (GOMES *et al.*, 1989), estando relacionado com o fotoperíodo mais curto que afeta a resposta inflamatória no local da picada. O estado nutricional também influencia diminuindo a resistência dos bovinos (SUTHERST *et al.*, 1983).

O gado manifesta diferentes níveis de resistência a cada fase de *Boophilus microplus*, particularmente contra a fixação larval, e mais de 50% das larvas que atingem o hospedeiro não conseguem completar o ciclo parasitário (ROBERTS, 1968). Segundo Nuñez e colaboradores (1972), somente 12,4% das larvas infestantes de *Boophilus microplus* que se fixam no hospedeiro conseguem chegar à fase de fêmea ingurgitada.

A) VARIAÇÃO GENÉTICA ENTRE RAÇAS

Os bovinos *Bos indicus* (zebu - indianos) são mais resistentes aos carrapatos do que os *Bos taurus* (taurinos - europeu) (MORAES *et al.*, 1986; MADALENA *et al.*, 1985). De acordo com Thiesen (1979) e Lemos (1986), o gado indiano tem convivido há milhares de anos com o carrapato *B. microplus*, o que levou, provavelmente, à eliminação natural dos animais mais sensíveis permitindo maiores oportunidades reprodutivas para os animais geneticamente resistentes.

As raças zebuínas são mais resistentes que as raças Crioulas latino-americanas, e estas, mais resistentes que as européias. A raça européia com maior resistência aos carrapatos é a Jersey, enquanto as mais susceptíveis são a Holandesa e Hereford (UTECH *et al.*, 1978).

Bovinos europeus apresentam em média 10,5 vezes mais carrapatos que os de cruzamentos com zebuínos (FRANCIS e LITTLE, 1964), sendo que quanto maior a proporção de sangue zebu, menor a população média de carrapatos (TATCHELL, 1987; HONER e GOMES, 1990). A comparação do número de carrapatos encontrados em Zebus com diversas outras raças mostrou maior resistência dos zebuínos, apenas 5% do total de carrapatos eram originários de animais Zebus, 7% de raças nacionais ou criolas e 88% de raças européias (VILLARES, 1941).

Na Austrália, os animais zebus vêm sendo utilizados intensamente em cruzamentos com raças européias, devido a sua maior resistência aos carrapatos. As diferenças de resistência entre os *B. taurus* e os animais provenientes do cruzamento *B. taurus x B.indicus* foram demonstrados por Byford e colaboradores (1976), com os animais oriundos do cruzamento apresentando, em geral, uma resistência de moderada a alta. Resultados semelhantes foram observados por Utech e colaboradores (1978), no Australian Milking Zebu (AMZ).

No Brasil, Veríssimo e colaboradores (2002-c) observaram diferenças significantes na infestação por carrapatos ao compararem as raças Holandesa, Gir e suas mestiças (Fig.3), sendo a Holandesa mais susceptível e a Gir mais resistente. Cardoso (2000) observou resultados semelhantes para o número de carrapatos em mestiços europeu-zebu com composições genéticas variando de 1/4 a 15/16 zebu.

Também no Brasil, Teodoro e colaboradores (1984) estudaram a resistência

de touros mestiços (5/8, 3/4 e 7/8 europeu x zebu) sob infestação artificial com carrapatos e observaram maior proporção de resistência nos animais 5/8, sendo os 7/8 mais susceptíveis. Lemos e colaboradores (1985) estudando a resistência ao carrapato em novilhas variando de 1/4 Holandês x Zebu a Holandês puro por cruzas também observaram maior carga parasitária e, conseqüentemente, menor resistência associada ao aumento do grau de sangue europeu.

A resistência e a susceptibilidade ao carrapato são características de herdabilidade moderadamente elevadas, no entanto, os genes envolvidos do hospedeiro não estão ainda identificados (KASHINO *et al.*, 2005). Utech e Wharton (1982), em um experimento de seleção na raça Australian Illawarra Shorthorn (AIS), obtiveram ganhos genéticos consideráveis para resistência a carrapatos, demonstrando que a seleção pode ser altamente efetiva.

Rendel (1971) sugeriu a combinação, por meio de cruzamentos, das características de resistência ao carrapato do *Bos indicus* com a alta produtividade de leite e fertilidade do *Bos taurus*. Isto tem ocorrido intensamente nos países tropicais, ficando a Austrália com a maior concentração de trabalhos de seleção nestas populações mestiças.



A



B



C

Figura 3 – Perfis dos bovinos da raça Holandesa (A), Gir (B) e sua mestiça Girolando (C).

1.1.9 ASPECTOS BÁSICOS DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA

A) IMUNIDADE INATA E ADQUIRIDA (RESPOSTAS CELULAR E HUMORAL)

A resposta imune em bovinos é semelhante a dos demais mamíferos, compondo-se de diferentes mecanismos pelos quais os indivíduos se defendem contra patógenos, constituindo-se no principal impedimento para a ocorrência de patologias disseminadas, associadas com alto índice de mortalidade.

Embora a resposta imune seja fundamental para a defesa contra patógenos, nos últimos anos têm se acumulado evidências de que, em muitas doenças, os principais aspectos patológicos não estão relacionados com uma ação direta do agente agressor, mas sim com uma resposta imune anormal. Em muitas dessas situações existe uma reação de hipersensibilidade com resposta imune exagerada e não modulada que tem como consequência dano tecidual (MACHADO *et al.*, 2004).

Alguns componentes imunológicos estão naturalmente presentes nos indivíduos, mesmo antes da exposição ao agente patogênico, compondo a primeira linha de defesa do organismo denominada imunidade inata. Estes componentes incluem barreiras físicas e químicas, macrófagos, monócitos, PMN's (células polimorfonucleares), eosinófilos, linfócitos NK ("natural-killer"), cascata de proteínas séricas do sistema complemento, quimiocinas e outras proteínas solúveis do sangue. Nesse tipo de resposta, as células efetoras atuam, geralmente, de forma inespecífica sobre diferentes patógenos (JANEWAY, 2002).

Porém, relatos de que células fagocíticas como macrófagos e células dendríticas expressam receptores Toll-Like (TLRs) em sua superfície (O' NEIL, 2005), torna impróprio denominar "inespecífica" a resposta imune inata. Esses receptores se ligam especificamente a padrões moleculares altamente conservados, denominados *padrões moleculares associado ao patógeno* (PAMP), presentes em grande número de agentes infectantes. Os receptores presentes nas células da imunidade inata que os reconhecem, denominam-se *receptores de reconhecimento padrão* (PRR). Após o reconhecimento, ocorre indução de expressão de citocinas

pró-inflamatórias que regulam as respostas inata e adquirida (DOYLE e O' NEIL, 2006).

Mcguire e colaboradores (2005) identificaram e mapearam 10 TLRs em bovinos, sendo que a elucidação das suas funções contribuirá para caracterização dos mecanismos imunológicos bovinos envolvidos na resistência a doenças.

Outros mecanismos de defesa são induzidos pelo reconhecimento específico de moléculas estranhas (antígenos), geralmente protéicas, aderidas ou não a superfícies celulares, que se ligam a receptores de linfócitos ou em anticorpos livres. Este reconhecimento e conseqüente ativação dos linfócitos propiciam o desenvolvimento da imunidade adquirida, a qual é constituída pelos linfócitos T (LT) e B (LB), anticorpos e citocinas que funcionam de maneira cooperativa. Essa resposta é altamente específica e gera memória imunológica protegendo o indivíduo em exposições subsequentes ao antígeno (JANEWAY, 2002).

A resposta imune adquirida é dividida em imunidade humoral e celular. A primeira constitui-se no principal mecanismo de defesa contra patógenos extracelulares e suas toxinas secretadas, é mediada por anticorpos secretados pelos linfócitos B atuando no reconhecimento específico e eliminação de vários tipos de antígenos, além de ativar o sistema complemento que participa da lise e fagocitose de patógenos. A segunda é mediada principalmente por linfócitos T, que conjuntamente com outras células, como os macrófagos e monócitos, atuam na defesa contra microorganismos intracelulares obrigatórios (JANEWAY, 2002).

Os LT se subdividem em populações funcionalmente distintas, os LT citotóxicos (LTc) e os LT auxiliares (Th - linfócito T "helper"). Os LTc, ou LT CD8⁺ (denominado assim por conterem em sua superfície o marcador celular fenotípico CD8), lisam na periferia células que produzem antígenos estranhos, como aquelas infectadas por vírus, em resposta à estimulação antigênica que ocorre nos órgãos linfóides secundários. Os LTh, ou LT CD4⁺, por sua vez, secretam citocinas, que são proteínas responsáveis por inúmeras funções no sistema imune, tais como indução da hematopoiese, resposta inflamatória, ativação e diferenciação de diferentes tipos celulares, imunorregulação (JANEWAY, 2002).

A população de LTh é dividida em subconjuntos de acordo com o perfil restrito de citocinas produzido. Células Th1 secretam preferencialmente interleucinas (IL)-1, IL-2, IL-8, IL-12, interferon-gama (IFN- γ) e proteína quimioatraente de monócitos (MCP-1); enquanto células Th2 secretam preferencialmente IL-4, IL-5, IL-

6, IL-9, IL-10 e IL-13 (CHER e MOSMANN, 1987; ELSE e FINKELMAN, 1998). Estas citocinas Th1 e Th2 atuam como sinais imunorregulatórios para geração de resposta imune mediada por células e anticorpos, respectivamente (WIKEL, 1996). E estudos recentes têm descrito novas populações de linfócitos, entre elas, os LT regulatórios $CD4^+CD25^+$ (Treg), responsáveis por diversos mecanismos de imunomodulação que incluem a contra-regulação da produção de $IFN-\gamma$ por LTh1, de IL-4 por LTh2, de IL-10 por LTreg1 e da secreção de $TGF-\beta$ por LTh3 (TODA e PICCIRILLO, 2006).

Os padrões distintos de citocinas expressos em células T $CD4^+$ e $CD8^+$ são bem compreendidos em camundongos e humanos. No entanto, existem poucas informações disponíveis sobre expressão de citocinas em bovinos. Tanaka e colaboradores (2007) estudando a expressão gênica de 19 citocinas em subpopulações de linfócitos bovinos, estimulados ou não com ConA, verificaram que o perfil de expressão de RNAm para citocinas é substancialmente diferente entre células TCD4+ e células TCD8+. Linfócitos TCD4+ expressaram RNAm de dezessete citocinas: espontaneamente foram expressos IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-18, IFN-g, TNF- α , TNF- β e $TGF-\beta$; e a estimulação com ConA aumentou a expressão de IL-10, IFN- γ e TNF- β e induziu o início da expressão de IL-3, IL-4, IL-5, IL-13 e GM-CSF. Linfócitos TCD8+ expressaram RNAm de 9 citocinas: exibiram espontaneamente IL-6, IL-18, TNF- α , TNF- β e $TGF-\beta$; e a estimulação com ConA aumentou a expressão de IL-2, IL-7, IFN- γ e GM-CSF. Esses achados indicam que, em bovinos, a maior fonte de citocinas em células T periféricas é a subpopulação LT $CD4^+$, assemelhando-se ao encontrado em humanos e camundongos

B) ÓXIDO NÍTRICO

O óxido nítrico (NO) é um radical livre, gasoso, inorgânico, incolor, e sua mensuração é possível através da detecção dos produtos estáveis de sua decomposição, o nitrato (NO_3^-) e o nitrito (NO_2^-). Essa molécula constitui um dos mais importantes mediadores de processos intra e extracelulares, além de ser o

principal mediador citotóxico de células imunológicas efetoras e importante molécula reguladora do sistema imune (HIBBS JR. *et al.*, 1988; MARLETTA *et al.* 1988).

A síntese do NO resulta da oxidação de um dos dois nitrogênios guanidino da L-arginina, que é convertida em L-citrulina. Esta reação é catalisada pela enzima NO-sintase (NOS) (MARLETTA,1993; MONCADA *et al.*, 1991). Uma variedade de isoformas de NOS tem sido purificada em diferentes tecidos de mamíferos, sendo agrupadas em duas categorias, a NOS constitutiva (c-NOS), dependente de íons cálcio (Ca^{+2}) e de calmodulina, que está envolvida na sinalização celular, e a NOS induzível (i-NOS), produzida por macrófagos e outras células ativadas por citocinas (MARLETTA,1993; MONCADA *et al.*, 1991).

O NO resultante da ativação da i-NOS possui ação citotóxica e citostática, promovendo a destruição de microrganismos, parasitos e células tumorais. A citotoxicidade do NO resulta da sua ação direta ou da sua reação como outros compostos liberados durante o processo inflamatório. A base bioquímica para a ação direta do NO consiste na sua reação com metais (especialmente o ferro) presentes em enzimas do seu alvo. Assim, são inativadas enzimas cruciais para o ciclo de Krebs, para a cadeia de transporte de elétrons, para a síntese de DNA e para o mecanismo de proliferação celular (JAMES, 1995; MONCADA *et al.*, 1991).

Em processos infecciosos, células ativadas como macrófagos, neutrófilos e células endoteliais secretam simultaneamente NO e intermediários reativos do oxigênio, e a ação citotóxica indireta do NO consiste, principalmente, na sua reação com esses intermediários do oxigênio. Uma ação tóxica cooperativa de NO e ânion superóxido (O_2^-) resulta na formação de peroxinitrito (ONOO^-), um poderoso oxidante de proteínas. O ONOO^- pode, posteriormente, protonarse na presença de íon hidrogênio (H^+), originando um radical altamente reativo e tóxico, o hidroxil ($\text{HO}\cdot$), aumentando a ação tóxica do NO e do O_2^- (BECKMAN e KOPPENOL, 1996).

C) INTERFERON-GAMA

Os interferons foram descritos na década de 50 por Issacs e Lindenmann, como proteínas com atividade viral potente, possuindo também atividades anti-tumoral e imunorreguladora (GALVANI *et al.*, 1999).

O interferon-gama (IFN- γ) é uma proteína homodimérica produzida principalmente por LTh, LTc e NK ativadas (YAO *et al.*, 2007) e age sobre macrófagos, LT, LB, NK, células inflamatórias e células infectadas por vírus (MINAMI *et al.*, 2002). As funções dessa citocina pleiotrópica incluem aumento da expressão de MHC e co-estimuladores em APCs amplificando a apresentação antigênica e a fase de reconhecimento da resposta imune, indução de switch para IgG2, diferenciação de monócitos, ativação do metabolismo oxidativo de macrófagos e neutrófilos - importantes para a fagocitose, potencialização da ação do TNF e da atividade citolítica de NK, além de atuar na conversão de linfócitos Th0 em linfócitos Th1. O efeito do IFN- γ sobre o desenvolvimento de células Th1 é devido, principalmente, à sua capacidade de promover a expressão de receptores funcionais para IL-12, a principal citocina indutora de Th1, em fagócitos mononucleares. (GALVANI *et al.*, 1999; JANEWAY, 2002).

O IFN- γ exerce um papel crítico nas imunidades inata e adquirida participando na resposta do hospedeiro nas infecções bacterianas, principalmente por patógenos intra-celulares e com baixa atividade anti-viral e também promove o acúmulo de polimorfonucleares no local da inflamação (GALVANI *et al.*, 1999). Quando o IFN- γ é secretado por NK em resposta ao reconhecimento de componentes desconhecidos de microorganismos ou em resposta à IL-12, age como um mediador da resposta imune inata. Quando é produzido por células T em resposta ao reconhecimento antigênico atua na resposta imune adaptativa. Sua produção é acentuada por IL-12 e IL-18 (JANEWAY, 2002).

O IFN- γ é o principal ativador de macrófagos acentuando sua ação microbicida mediante a estimulação da síntese dos intermediários reativos de oxigênio e do NO. O IFN- γ medeia esses efeitos, principalmente, ativando a transcrição de genes que codificam as enzimas fagócito-oxidase e sintase indutora do óxido nítrico, necessárias para geração de intermediários reativos do oxigênio e

intermediários reativos do nitrogênio, respectivamente. Essas moléculas reativas são produzidas no interior dos lisossomos e a fusão destes ao fagossoma resulta na destruição dos microorganismos (JANEWAY, 2002).

D) PROLIFERAÇÃO CELULAR

Em resposta a um determinado antígeno e aos fatores de crescimento produzidos pelos linfócitos ativados e por outras células, ocorre a divisão por mitose do linfócito específico para tal antígeno. Isso resulta na expansão clonal, um processo em que ocorre a proliferação linfocitária e o conseqüente aumento do tamanho do clone específico para o antígeno.

A proliferação de LT em resposta ao reconhecimento do antígeno é mediada principalmente por uma via de crescimento autócrino na qual o LT secreta citocinas promotoras do seu próprio crescimento e também expressa receptores de superfície celular para essas citocinas.

O principal fator de crescimento autócrino para a maioria das células T é a IL-2. Tanto a produção quanto a expressão de receptores de IL-2 de alta afinidade requerem o reconhecimento do antígeno por LT específicos. Assim, após o reconhecerem o antígeno, os LT ligam-se a IL-2 secretada por eles mesmos e começam a proliferar-se originando clones específicos, o que resulta na amplificação da resposta imune efetora.

A expansão clonal gera, a partir de uma pequena população de linfócitos “naive” antígeno-específicos, um grande número de linfócitos efetores específicos necessários para eliminar o antígeno. A quantidade de linfócitos reduz rapidamente com a eliminação do antígeno, permanecendo um determinado número de células de memória específicas para o antígeno.

A cada exposição subsequente ao antígeno esses clones específicos voltam a ser ativados iniciando novamente o processo de expansão. A IL-15, citocina similar a IL-2, produzida principalmente por APCs e outras células não-linfóides, estimula a proliferação de LTc de memória (JANEWAY, 2002).

1.1.9 RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO

O sucesso da relação parasito-hospedeiro é um balanço entre as limitações do parasito pelas defesas do hospedeiro e a habilidade do parasito de modular, evadir ou restringir a resposta imune (WIKEL *et al.*, 1994). O triunfo da associação dos hematófagos com seus hospedeiros vertebrados está baseado na habilidade desses parasitos de interferir nas reações anti-hemostática e inflamatórias do hospedeiro (AROCHA-PIÑANGO *et al.*, 1999).

Dados disponíveis na literatura mostram a complexidade das reações inflamatórias e imunológicas envolvidas nas interações entre os carrapatos e seus diversos hospedeiros. Na busca de nichos de sobrevivência das suas populações, algumas espécies de animais se adaptaram em parasitar outras espécies adquirindo seus nutrientes diretamente do meio interno dos seus hospedeiros. Desta forma, eles foram dotados da capacidade de mediar as defesas dos hospedeiros para realizar com sucesso sua busca por alimento (ANDREOTTI, 2002).

O contato entre hospedeiro e parasito por longo período possibilita o desenvolvimento da resposta imune do hospedeiro contra o carrapato, provocando inflamação e ativando elementos do sistema imunológico (SAUER *et al.*, 2000). Porém, as medidas adotadas pelo carrapato contra alvos da resposta imune podem controlar a expressão da imunidade adquirida pelo hospedeiro permitindo o sucesso do parasitismo (WIKEL, 1996). Essa capacidade de imunomodulação não só facilita a alimentação pelo carrapato, mas também torna o hospedeiro menos capaz de responder a patógenos transmitidos pelo parasito (WIKEL e ALARCON-CHAIDEZ, 2001).

A) RESPOSTA IMUNE BOVINA CONTRA O CARRAPATO

As respostas imunes inata e adquirida do hospedeiro são ativadas durante o processo de alimentação dos carrapatos (WIKEL, 1997), variando de acordo com a espécie do carrapato e do hospedeiro, e podem ser de três tipos: a) reação de hipersensibilidade tardia: imunidade celular estimulada por alguns antígenos salivares com baixo peso molecular (haptenos) que se associam às proteínas da pele do hospedeiro e numa exposição subsequente estimulam uma resposta celular; b) hipersensibilidade cutânea: caracterizada por infiltração de basófilos, mediada por células de Langerhans, com produção de imunoglobulina da classe G (IgG); c) hipersensibilidade do tipo I: ativa a produção de IgE induzindo uma severa inflamação na pele com prurido e dor (SOARES, 2001). Esses mecanismos imunológicos podem modificar a pele do hospedeiro e, desta forma, o repasto sanguíneo do artrópode é prejudicado.

Resposta mediada por imunoglobulinas primárias e a resposta imune celular são induzidas durante a primeira exposição no início da alimentação do carrapato. A forma como um animal responde a um imunógeno depende da sua capacidade, definida geneticamente, para processar os antígenos e apresentá-los aos linfócitos T no contexto do MHC (WIKEL *et al.*, 1997).

A resposta do hospedeiro induzida pela presença do carrapato envolve basófilos, mastócitos, eosinófilos, células apresentadoras de antígenos (APC), LT, LB, anticorpos, citocinas, complemento e moléculas biorreativas (WIKEL, 1997).

Durante a infestação de animais, sensíveis ou não, previamente expostos a ixodídeos, ocorre rápida infiltração de neutrófilos, aumentando gradativamente a presença de eosinófilos e basófilos. A ação vasodilatadora de PGs, presentes na saliva do carrapato, associada à histamina, proveniente da degranulação de mastócitos e outros granulócitos, induz à lise dos tecidos e ao afluxo de sangue (BROSSARD e WIKEL, 1997). Essas reações dificultam a alimentação do carrapato fazendo com que as fêmeas adultas pesem menos ao se destacarem do hospedeiro (ROCHA, 1976; 1984) e causam irritação cutânea suficiente para desencadear as reações de autolimpeza (PEREIRA, 1982).

Os linfócitos constituem outro grupo de células importantes na função efetora do sistema imune contra os carrapatos, incluindo produção de anticorpos e imunidade mediada por células (BROSSARD e WIKEL, 2004). Brossard e Wikel (1997) verificaram que hospedeiros infestados por carrapatos apresentam redução da resposta de linfócitos à estimulação *in vitro* por ConA resultando em um fenômeno imunossupressivo. No entanto, infestações repetidas com ninfa de *I. ricinus* em camundongos estimularam a migração de linfócitos dos linfonodos para o local da picada produzindo significantes níveis de TNF e GM-CSF em resposta ao estímulo *in vitro* com ConA ou anticorpo anti-CD3 (GANAPAMO *et al.*, 1997).

Imunohistoquímica de pele de camundongo após 72 horas de infestação com *I. ricinus* revelou a presença de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ nos infiltrados celulares, além da presença de RNA mensageiro para IFN- γ e IL-4, mas não de IL-2 após primeira infestação. Em camundongo re-infestado surgiram resultados positivos para as três citocinas, mas ocorreu um menor número de células identificadas para IL-4 do que para IFN- γ e IL-2, mostrando uma tendência de ocorrência de hipersensibilidade cutânea tardia (MBOW *et al.*, 1994 - a e b).

A análise da concentração de mRNA de citocinas em gado Nelore infestados ou não com *B. microplus* mostrou diminuição da expressão de IL-2 e MCP-1 nos bovinos infestados quando comparado ao grupo não infestado, sugerindo o estabelecimento da resposta imune Th2 com supressão de citocinas pró-inflamatórias características do perfil Th1 (NAKATA *et al.*, 2006).

A presença de anticorpos IgG contra antígenos da glândula salivar do carrapato tem sido identificada em várias espécies. Andreotti e colaboradores (2002) observaram que a produção de anticorpos contra inibidores de tripsina do *B. microplus* (BMTIs) em *B. indicus* reduz o número de carrapatos e o peso dos ovos, sugerindo um possível papel nos processos de fixação das larvas e na alimentação.

O sistema complemento também está envolvido no desenvolvimento da imunidade contra o carrapato (WIKEL *et al.*, 1997), a ativação deste no local da picada atrai basófilos (WARD *et al.*, 1975). Em coelhos, o nível sérico do componente C3 aumenta rapidamente com a reinfestação de *I. ricinus* adulto, e o aumento na ingestão do componente C3 dificulta a digestão de hemoglobina pelo carrapato (PAPATHEODORUS e BROSSARD, 1987).

A comparação de hospedeiros susceptíveis e resistentes mostrou que

reações cutâneas diferem significativamente no local de injúria (ALLEN *et al.*, 1979). Ribeiro (1989) verificou que o grau de infiltração é mais intenso nos animais resistentes, ocorre afluxo de basófilos ocasionando hipersensibilidade-basófilo-cutânea, caracterizada pela degranulação dessas células com a liberação de histamina e outros mediadores da resposta imune (ALLEN *et al.*, 1979). Tal fato inibe a salivação e alimentação do carrapato, e promove sua rejeição (PAINE *et al.*, 1983). A administração de drogas anti-histamínicas em bovinos acarreta significativo aumento na produção de fêmeas ingurgitadas (TATCHELL e BENNETT, 1969).

Segundo Tatchell e Moorhouse (1970), a lesão tecidual causada por *B. microplus* é provocada principalmente pelo afluxo de células de defesa do hospedeiro. Os mesmos autores demonstraram que a lesão no local de fixação de *R. sanguineus* em cães foi provocada pela degranulação de leucócitos.

Outro mecanismo de rejeição foi citado por Ribeiro e Mather (1998), que observaram uma quinase que cliva bradicidina na saliva de *Ixodes scapularis*, este mediador da resposta imune estimula o processo da dor e prurido podendo induzir a rejeição do parasito pelo hospedeiro. Koudstaal e colaboradores (1978) concluíram que a inflamação leva à remoção do carrapato pela irritação local.

Células de Langerhans fagocitam moléculas salivares do carrapato na epiderme e migram para os linfonodos apresentando estas moléculas para linfócitos do hospedeiro (ALLEN *et al.*, 1979). Assim, anticorpos são produzidos e, juntamente, com o sistema complemento contribuem para resistência adquirida (WIKEL, 1997).

Após pesadas infestações, os níveis de IgG1 e IgG2 contra antígenos salivares diminuem em bovinos susceptíveis (Holandês) e permanecem inalterados nos resistentes (Nelore) sugerindo que o carrapato suprime a resposta humoral mediada por IgG em animais susceptíveis. Além disso, os níveis de IgE aumentam nos Holandeses, indicando que IgE não é protetora (KASHINO *et al.*, 2005)

Um estudo comparando o efeito imunossupressor de extrato de glândula salivar (EGS) de duas cepas de *Boophilus microplus* na proliferação *in vitro* de linfócitos estimulados por ConA, demonstrou que o hospedeiro tem influência na composição da saliva do carrapato e nas suas propriedades inibitórias (TURNI *et al.*, 2004).

B) MECANISMOS DE EVASÃO E IMUNOMODULAÇÃO DO CARRAPATO

O carrapato *B. microplus* passa um longo período aderido ao bovino (STEWART e DE VOS, 1984) e induz reações imunes pelo hospedeiro (WILLADSEN e JONGEJAN, 1999). Na tentativa de neutralizar essa imunidade, os carrapatos secretam substâncias anticoagulantes, anti-plaquetárias e vasodiladoras responsáveis pela inibição da hemostasia e manutenção do fluxo de sangue do hospedeiro, além de modularem suas respostas inata e adquirida (WIKEL, 1997). A saliva de artrópodes hematófagos contém moléculas antagonistas a muitas reações de reparação dos hospedeiros que poderiam impedir o fluxo sangüíneo no sítio de alimentação (RIBEIRO, 1995).

As ações imunorregulatórias do carrapato incluem modulação de macrófagos e do perfil de citocinas secretados por LT, supressão da proliferação celular, redução da resposta de anticorpos e inativação de componentes do sistema complemento.

Scholer e Wikel (2001) observaram que carrapatos modulam a resposta mediada por linfócitos T resultando na diminuição de citocinas Th1 e aumento de Th2, podendo conduzir o hospedeiro à imunossupressão.

As larvas do carrapato podem fixar-se sucessivamente em até cinco locais diferentes (KEMP *et al.*, 1971), sendo que larvas que se situam próximo à pele do bovino e não se alimentam morrem rapidamente devido à dessecação. No local da picada, o carrapato aplica o rostro contra a epiderme entrando em contato com a camada de Malpighi, injuriando-a mecanicamente até atingir a camada granulosa. Um exsudato denominado cemento se coagula em volta das peças bucais do parasito garantindo sua fixação, e um processo de desorganização da derme se inicia por meio de edema, infiltração celular e necrose (PEREIRA, 1982). Ocorre inflamação local com participação de neutrófilos e o alimento do parasito é formado por destruição de tecidos e vasos sangüíneos locais (BROSSARD e FIVAZ, 1982). O sucesso no processo de alimentação de ixodídeos envolve uma série de eventos, sendo a susceptibilidade dos hospedeiros um fator importante. Larvas que atacam animais resistentes sofrem um estresse adicional pela necessidade de fixações curtas e freqüentes (KEMP *et al.*, 1976).

Muitos estudos têm demonstrado que moléculas presentes na glândula salivar e saliva do carrapato são responsáveis pela modulação ou evasão à resposta imune

do hospedeiro. Altas concentrações de prostaglandinas (BOWMAN *et al.*, 1996), como PGE2, foram detectadas nas glândulas salivares de *Boophilus microplus* (DICKINSON *et al.*, 1976) e saliva do *A. americanum* (BOWMAN *et al.*, 1997). PGE2 salivar é vasodilatadora (RIBEIRO, 1995) e inibe a agregação plaquetária (CHAMPAGNE e VALENZUELA, 1996). Harris e colaboradores (2002) sugerem que PGE2 realça a produção de citocinas Th2 regulando negativamente o perfil Th1, e inibe a proliferação de LT através da supressão da produção de IL-2. Inokuma e colaboradores (1994) demonstraram que PGE2 presente na saliva de *B. microplus* suprime proliferação *in vitro* de monócitos bovinos.

Proteínas ligantes de IgG estão presentes em EGS de *Amblyomma variegatum*, *Ixodes hexagonus* e *R. appendiculatus* e, possivelmente, auxiliam esses carrapatos a neutralizarem os anticorpos ingeridos junto com o repasto sanguíneo (WANG e NUTTALL, 1995). De Miranda Santos e colaboradores (2004) verificaram que glândulas salivares de *B. microplus* expressam um gene similar.

Proteínas ligantes de histamina, provavelmente, são encontradas em todas as espécies de carrapatos (BROSSARD e WIKEL, 2004). Paesen e colaboradores (1999) isolaram e clonaram essas proteínas na saliva de *R. appendiculatus*.

A proteína Da-p36 presente em saliva e glândula salivar de *D. Andersoni*, é capaz de suprimir a proliferação de LT e se ligar em imunoglobulina. Essa molécula imunossupressora foi encontrada em larvas logo após a fixação, aumentando de quantidade entre o 2º e o 4º dia de alimentação (BERGMAN *et al.*, 2000).

Foi identificada uma proteína presente nas glândulas salivares de *I. scapularis* a qual se liga à IL-2 solúvel secretada por LT ativados *in vitro* (GILLESPIE *et al.*, 2001). Essa capacidade de sequestrar IL-2 é extremamente relevante, uma vez que muitas células do sistema imune, incluindo macrófagos, NK, LB, LT e células dendríticas possuem receptores podendo ser ativadas por essa citocina e gerar uma resposta contra o carrapato (GILLESPIE *et al.*, 2000).

A saliva do *Ixodes dammini* contém um inibidor de ativação da via alternativa do sistema complemento, o qual impede a deposição de C3b e a liberação da anafilatoxina C3a (RIBEIRO, 1987). As interferências no sistema complemento pelo carrapato oferecem duas vantagens ao parasito: evita a formação do edema e a quimiotaxia celular na direção do local de alimentação (WIKEL *et al.*, 1994).

Recentemente, calreticulina de *B. microplus* foi clonada e caracterizada, sendo expressa em todos tecidos e estágios de desenvolvimento do carrapato

(FERREIRA *et al.*, 2002). Calreticulinas são proteínas conservadas ligantes de cálcio com ampla diversidade de funções biológicas. A presença dessas em saliva de *A. americanum* induz produção de anticorpos em humanos expostos ao carrapato (SANDERS *et al.* 1998), mas bovinos infestados com *B. microplus* ou imunizados com calreticulina não desenvolveram anticorpos contra esse antígeno (FERREIRA *et al.* 2002).

Ramanchandra e Wikel (1992) demonstraram que EGS de *D. andersoni* promove diminuição da produção de TNF e IL-1, indicando que carrapatos modulam a produção de citocinas por macrófagos. Esse mesmo antígeno reduziu a proliferação induzida *in vitro* de linfócitos de *B. indicus* e *B. taurus* não infestados (WIKEL, 1982; RAMACHANDRA e WIKEL, 1995). Turni e colaboradores (2007) também observaram que EGS de *B. microplus* inibiu respostas proliferativas *in vitro* de LT bovinos na presença de ConA e fitoemaglutinina (PHA), enquanto estimulou a proliferação de maneira dose-dependente em LB ativados por LPS.

Já Dusbábek (1995) verificou que infestações repetidas com ninfa de *I. ricinus* em camundongos resultaram na inibição de ativadores de linfócitos B (LPS e PWN), anticorpos totais e do número de mastócitos no local da picada.

A supressão da função das APCs e LT bovinos reduz a habilidade de gerar imunidade efetiva contra qualquer tipo de imunógeno, tanto os do carrapato quanto aqueles associados aos patógenos transmitidos por ele (WIKEL, 1996).

Todas essas substâncias detectadas na saliva de carrapato estão envolvidas na modulação e evasão do parasito a fim de prevenir ou reduzir a resposta imune do hospedeiro permitindo, assim, o sucesso do parasitismo (WIKEL *et al.*, 2001). Essas habilidades apresentadas pelo carrapato integradas à sua distribuição cosmopolita mostram que esse ectoparasito está bem adaptado ao seu hospedeiro e bem estabelecido nos mais variados ambientes, causando prejuízos à pecuária.

Diante da necessidade de métodos de controle alternativos que não desenvolvam resistência no carrapato, não contaminem os produtos de origem animal e nem poluam o ambiente, a imunização do hospedeiro surge como um dos caminhos mais promissores. E para o desenvolvimento de uma vacina eficiente é necessária, além da identificação de novos antígenos capazes de induzir proteção duradoura, a compreensão do comportamento imunológico bovino associado à resistência. Frente à escassez de estudos referentes à caracterização da resposta imunológica bovina gerada contra *B. microplus*, e tendo em vista a importância

desse achado para a economia pecuária, esse trabalho espera contribuir com informações que sejam úteis na pesquisa de novas vacinas anti-carrapato.

2 OBJETIVOS

GERAL

Avaliar a resposta imunológica em bovinos F2 (Holandês X Gir) selecionados quanto à resistência ao carrapato durante infestação artificial por *B. microplus*.

ESPECÍFICOS

1. Verificar se a estimulação *in vitro* com antígenos de *B. microplus* altera a proliferação de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) obtidas de bovinos resistentes (R) e susceptíveis (S) infestados pelo carrapato.
2. Determinar se o índice de proliferação celular do PBMC de bovinos R e S infestados por *B. microplus* apresenta alterações nos diferentes pontos temporais analisados: 0, 5° e 12° dia pós-infestação (dpi).
3. Avaliar a produção *in vitro* de óxido nítrico (NO) por PBMC de bovinos R e S infestados por *B. microplus* frente a estímulos específicos do carrapato.
4. Detectar os níveis de interferon-gama (IFN- γ) produzidos *in vitro* por PBMC de bovinos R e S infestados por *B. microplus* frente a estímulos específicos do carrapato.

3 METODOLOGIA

3.1 OBTENÇÃO DE BOVINOS F₂ (GIR X HOLANDÊS)

Foram utilizados 12 bovinos de uma população F₂ obtidos de cruzamentos entre indivíduos F₁ (Gir X Holandês). A população parental constituía-se de 28 vacas Gir e 4 touros Holandeses que foram acasalados gerando 150 indivíduos F₁. Dentre esses, foram escolhidos 68 vacas e 4 touros, os quais foram acasalados gerando uma população F₂ de 332 animais. Todos os animais foram infestados artificialmente com *B. microplus* e submetidos à avaliação para determinar o perfil de resistência ou susceptibilidade (Fig.4).

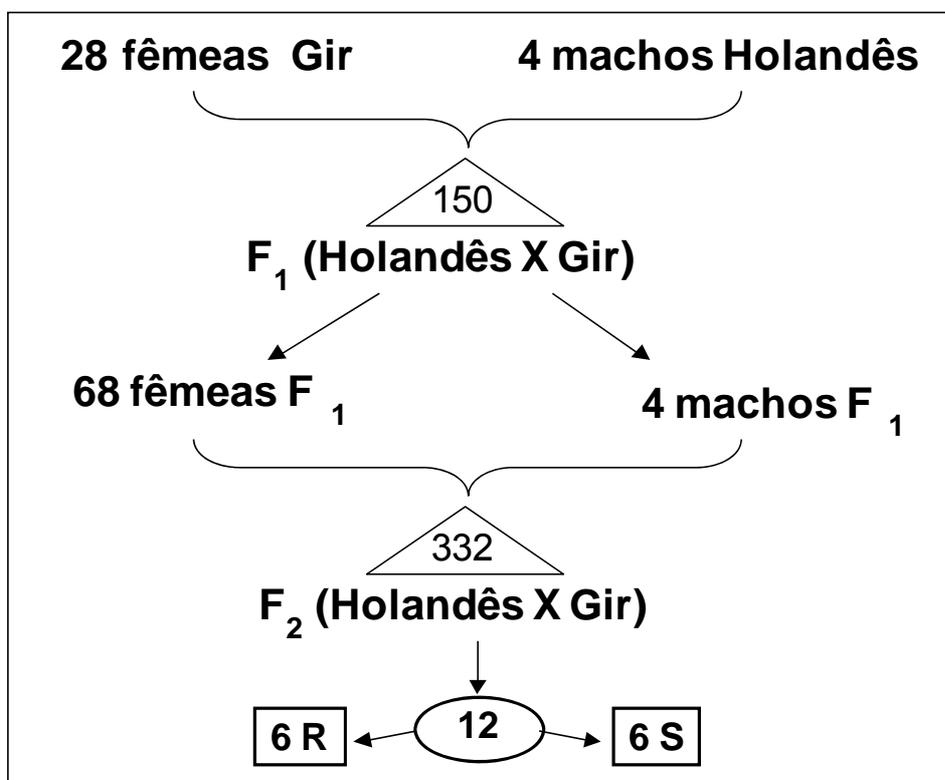


Figura 4 - Esquema dos cruzamentos para obtenção dos animais experimentais. (R) resistentes. (S) susceptíveis.

3.2 INFESTAÇÃO ARTIFICIAL

Cada animal foi infestado com 20.000 larvas de *B. microplus*, as quais foram preparadas no Laboratório de Parasitologia da Embrapa Gado de Leite, incubando-se um grama de ovos por frasco (equivalente a 10.000 larvas). Dois frascos contendo larvas infectantes foram inseridos num colar colocado na região cervical do bovino para permitir que as larvas se deslocassem e atingissem ambos os lados do corpo. O colar foi removido após duas horas, e os animais foram mantidos a pasto por 21 dias, tempo médio que *B. microplus* leva para completar a fase parasitária do seu ciclo sobre o couro do hospedeiro (Fig. 5).

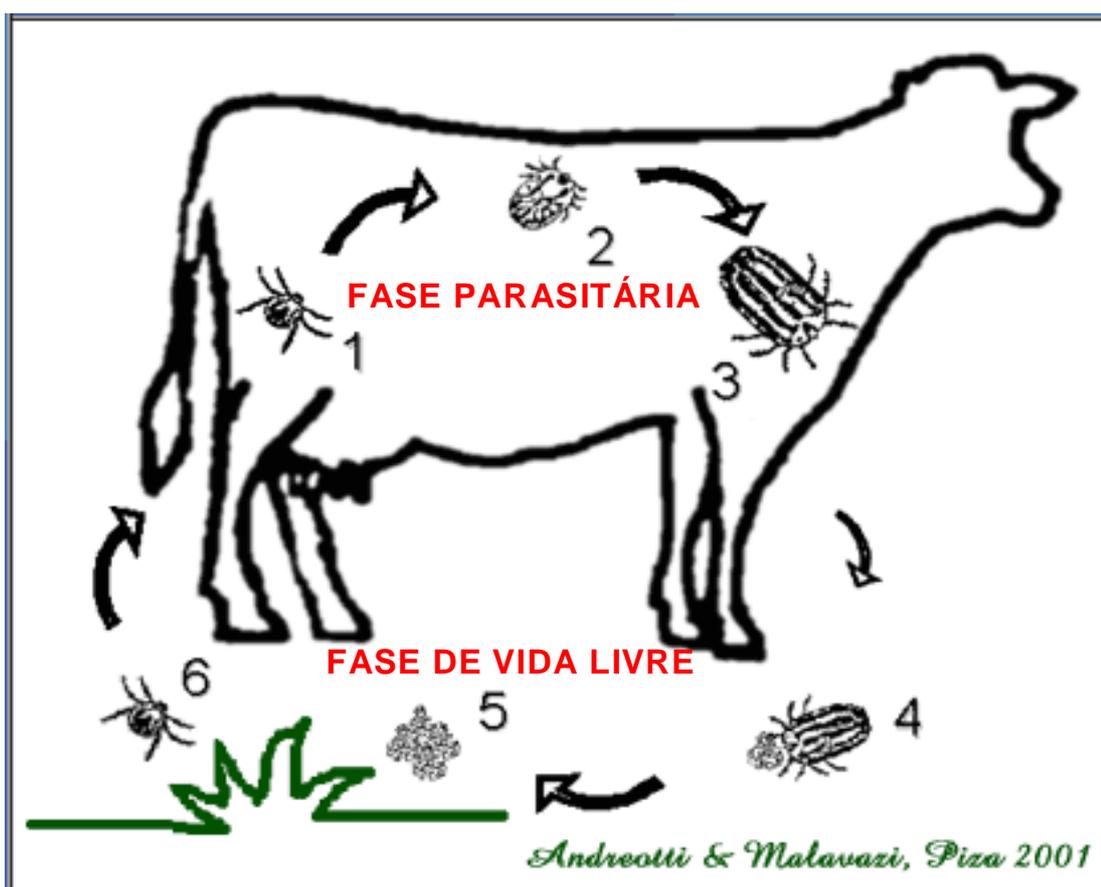


Figura 5 - Ciclo de desenvolvimento da fêmea de *B. microplus*. 1-Ninfa; 2-Fêmea adulta; 3-Teleóquina (fêmea adulta ingurgitada); 4- Teleóquina em oviposição; 5-Ovos; 6-Larva.

3.3 DETERMINAÇÃO DO NÍVEL DE RESISTÊNCIA AO CARRAPATO

Cada animal F₂ foi avaliado fenotipicamente quanto ao nível de resistência ao carrapato a fim de selecionar os bovinos posicionados nos extremos da escala de susceptibilidade / resistência ao *B. microplus*. Para tanto, contabilizou-se o número de fêmeas de carrapatos que completaram seu ciclo parasitário após infestação artificial com número conhecido de larvas. Os bovinos foram analisados em grupos contemporâneos contendo de 20 a 30 animais de ambos os gêneros (machos e fêmeas) com idade entre 10 e 14 meses. As contagens dos parasitos foram realizadas no 21º dia após infestação, correspondente ao dia modal de queda de *B. microplus*, até aproximadamente 9 horas da manhã, quando a maioria dos carrapatos se desprende do hospedeiro (UTECH *et al.*, 1978). Foram contadas fêmeas semi-ingurgitadas de 4,5 a 8,0 mm de diâmetro de um lado do animal, duplicando-se o resultado para obter o número total de parasitos por hospedeiro, e os valores absolutos foram transformados em Ln(contagem+1). Os valores de Ln(contagem+1) foram ajustados para os efeitos de lote, idade, sexo, cor da pelagem, espessura da capa, gerando-se um valor genético (VG) para cada animal.

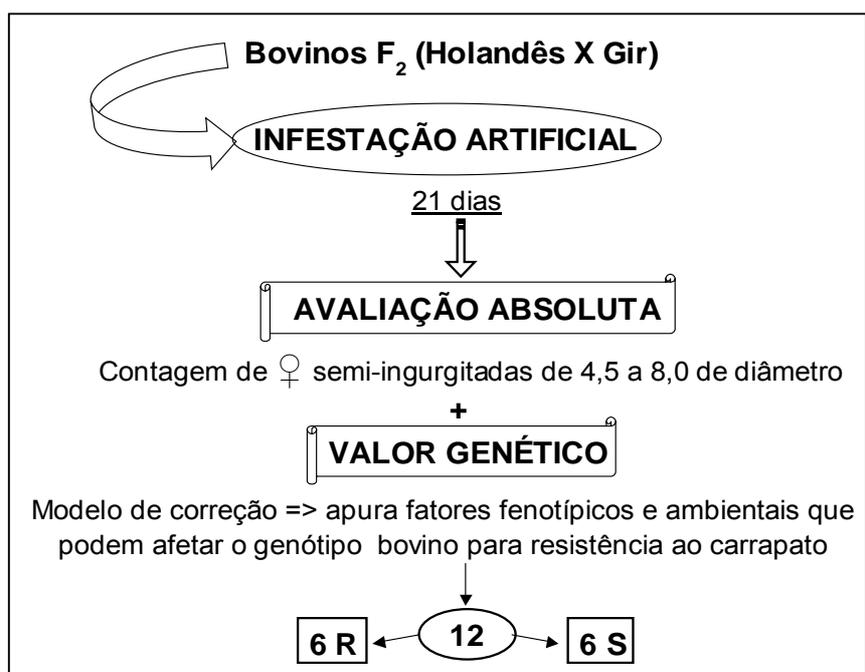


Figura 6 - Esquema dos métodos utilizados para seleção final dos 12 bovinos F₂ utilizados no experimento, os 6 mais resistentes e os 6 mais susceptíveis ao carrapato *B. microplus*.

3.4 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE SANGUE PERIFÉRICO BOVINO

Três amostras de cinco mL de sangue periférico foram coletadas de cada animal nos dias 0, 5 e 12 da infestação com *B. microplus*. A coleta de sangue foi realizada em tubos 'vacutainer' contendo o anticoagulante EDTA, mantidos em gelo e encaminhados ao Laboratório de Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas - UFJF para análise da resposta imunológica bovina ao carrapato.

3.5 OBTENÇÃO DOS ANTÍGENOS DO CARRAPATO

Foram utilizados dois antígenos de *B. microplus* para estimular as culturas de células mononucleares bovinas, extrato de glândula salivar (800 µg/mL) e proteína intestinal (1mg/mL), os quais foram gentilmente fornecidos pelo Professor Joaquim Hernán Patarroyo - Departamento de Veterinária no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

As glândulas salivares foram obtidas de carrapatos por dissecação (TURNI *et al.*, 2002) e mantidas em gelo até serem congeladas a -70°C. Posteriormente, foram ressuspensas em PBS e homogeneizadas em banho de gelo, e o homogeneizado foi centrifugado até 2000 g por 15 minutos a 4 °C. Então, o sobrenadante foi filtrado através de um filtro de 0.22 µm, a concentração protéica determinada e o extrato de glândula salivar foi armazenado à -20 °C (TURNI *et al.*, 2004). O código de identificação desse antígeno nessa dissertação é PS (proteínas salivares).

A proteína intestinal é um peptídeo sintético contendo determinantes antigênicos isolados e purificados a partir de uma glicoproteína de células endoteliais do intestino do carrapato denominada BM86 (PATARROYO *et al.*, 2002). Um miligrama desse antígeno foi reconstituído em 1 mL de meio RPMI e mantido a -20 °C. O código de identificação desse antígeno nessa dissertação é PI (proteína intestinal), sendo PI10 para 10 µg/mL e PI2 para 2 µg/mL.

3.6 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO PROTEÍCA DO EXTRATO DE GLÂNDULAS SALIVARES DO CARRAPATO

A quantidade total de proteínas presentes no extrato de glândula salivar (EGS) do carrapato foi dosada pelo método quantitativo de absorção UV (280/260 nm), no qual as concentrações são calculadas a partir das absorbâncias medidas e ajustadas por constantes de absorção em uma equação predefinida.

A espectrofotometria foi realizada no Laboratório de Bioquímica Celular - Instituto de Ciência Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora. Dois microlitros de EGS foram diluídos em 1 mL de PBS (1:500) e realizou-se a leitura dessa amostra em espectrofotômetro nos filtros de 260 nm e de 280 nm. A calibração foi feita com PBS. O cálculo utilizou a média de três leituras para cada comprimento de onda. Os valores de ambas as leituras foram aplicados a uma fórmula (Fig.7) contendo os devidos fatores de correção e a quantidade de proteínas foi expressa em mg/mL (ALAN e ROBIN, 1987).

$$\frac{1,55 \times \text{leitura da absorbância a } 280 \text{ nm} - 0,77 \times \text{leitura da absorbância a } 260 \text{ nm}}{\text{Concentração protéica (mg / ml)}}$$

Figura 7 - Equação para cálculo da concentração de proteínas pelo método quantitativo de absorção UV (280 / 260 nm).

3.7 SEPARAÇÃO DAS CÉLULAS SANGUÍNEAS DOS BOVINOS

Foram encaminhadas ao Laboratório de Imunologia (ICB/UFJF) três amostras de 5 mL de sangue periférico coletadas de cada bovino nos dias 0, 5 e 12 após infestação com *B. microplus*. As amostras de cada indivíduo foram agrupadas,

diluídas volume a volume em solução salina (PBS) e homogeneizadas delicadamente a temperatura ambiente. O sangue diluído foi depositado em outro tubo contendo 20 mL de Ficoll-Hypaque e centrifugado por 30 minutos a 1700 rpm para separação das células mononucleares. A nuvem de leucócitos formada na interfase foi coletada, transferida para um tubo contendo PBS e essas células foram lavadas por duas vezes (centrifugação a 1.500 rpm por 5 minutos). Após a segunda lavagem, o sedimento celular foi ressuspensão em 1 mL de solução de congelamento (meio RPMI+ 10% de DMSO) e congelado em nitrogênio líquido (Fig.8).

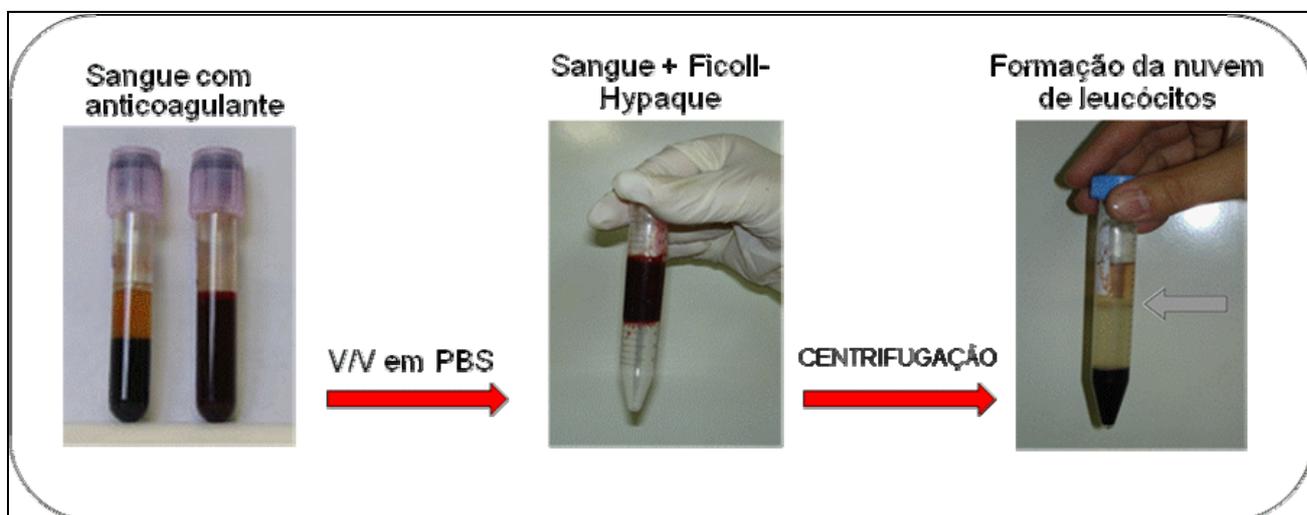


Figura 8 – Ilustração sequencial da técnica de separação de células por diferença de densidade utilizando-se Ficoll-Hypaque. No primeiro quadro se observa o sangue total, impedido de coagular-se pela presença de anticoagulante. No segundo quadro são observadas duas fases correspondentes ao sangue e ao Ficoll-Hypaque. E, no último quadro, apontada pela seta branca, está a nuvem de leucócitos, células que serão usadas para cultura celular.

3.8 CULTURAS DE CÉLULAS BOVINAS

As células mononucleadas do sangue periférico (PBMC) bovino foram descongeladas, lavadas com meio RPMI e contadas pelo método de exclusão por azul de Tripán em câmara de Neubauer para verificação da porcentagem de células viáveis. As amostras que apresentaram viabilidade celular acima de 90% foram submetidas ao ajuste de concentração previsto de 5×10^5 células/mL. As células foram cultivadas em placas de cultura (NUNC) de 96 poços com meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 1% de aminoácidos não essenciais e 0,5% de antibiótico (penicilina / estreptomicina) (Gibco), e mantidas em estufa a 5% de CO_2 e 37°C por 48 horas. As células foram estimuladas *in vitro* ou não com $5\ \mu\text{g/mL}$ de Concanavalina A (ConA) (Sigma) ou com antígenos do carrapato: proteína intestinal, PI10 ($10\ \mu\text{g/mL}$) e PI2 ($2\ \mu\text{g/mL}$), e extrato de glândula salivar (PS) em concentração única ($0,5\ \mu\text{g/mL}$). Após o período de 48 horas, os sobrenadantes foram coletados e congelados a -70°C para posterior quantificação de $\text{IFN-}\gamma$ e NO e as células restantes na placa foram submetidas à técnica do MTT.

Nos ensaios *in vitro*, cada um dos 12 bovinos possuía amostras de PBMC sob as seguintes condições de cultivo: células não estimuladas (na presença apenas de meio de cultura RPMI, caracterizando o controle do experimento) e células estimuladas com até 4 estímulos diferentes (ConA, PI10, PI2 e PS) para cada um dos três pontos temporais analisados (0, 5 e 12 dias pós infestação) (Fig.9).

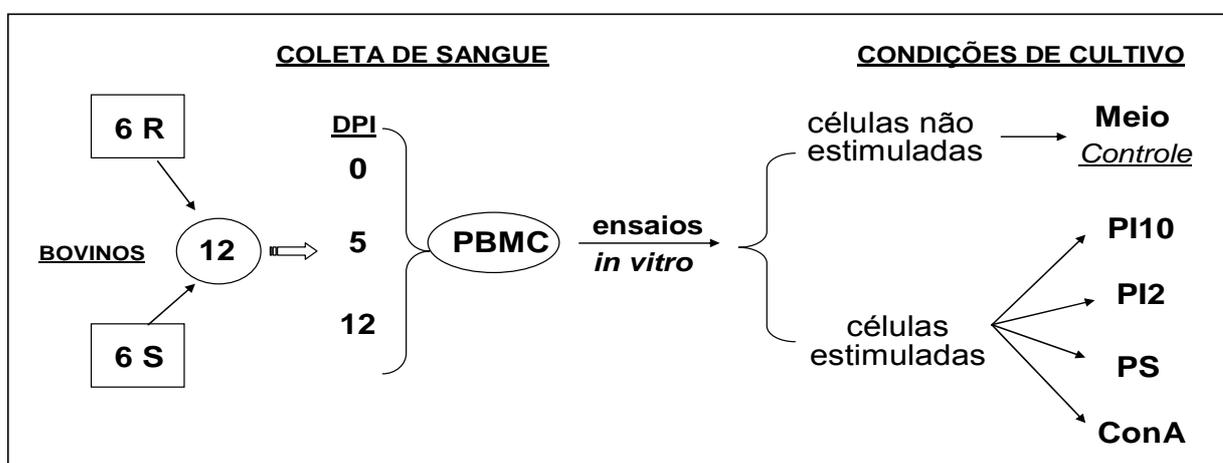


Figura 9 - Esquemas de coleta de sangue e cultura das células bovinas.

3.9 AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR POR MTT

A proliferação celular foi avaliada em todas as amostras de PBMC bovino após 48 horas de cultivo através do método colorimétrico direto MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5 difenil tetrazólico brometo). Essa técnica quantifica a atividade mitocondrial medindo-se a formação de cristais de formazan, produto da redução do sal tetrazolium sódico MTT, através da ação de desidrogenases mitocondriais, principalmente a enzima succinato desidrogenase (MOSSMAN, 1983). Por ocorrer nas mitocôndrias, essa reação fornece uma medida de função celular e, no contexto desse trabalho, demonstra alterações na quantidade de células quando essas estão sob efeito de estímulos em comparação ao controle, indicando se os estímulos inibiram ou aumentaram a replicação celular nos pontos temporais estudados.

Para realização do ensaio foram diluídos 5 mg de MTT em 1 mL de PBS, obtendo-se uma solução estoque a 5 mg/mL, que foi mantida no escuro a – 20°C. Posteriormente à coleta dos sobrenadantes foram adicionados 100 µL/poço de meio RPMI suplementado e 10 µL/poço da solução estoque de MTT sobre as células presentes na placa de cultura e incubou-se em estufa a 5% de CO₂ e 37 °C por 4 horas. Após esse período, a reação foi interrompida pela adição de 100 µL/poço de solução álcool-ácida (100 mL de isopropanol + 400 µL de HCl 10 N), incubando-se por mais 10 minutos a temperatura ambiente. A leitura da absorbância foi feita em leitor de microplacas (SPECTRAMAX 190, Molecular Devices–USA) a 570 nm.

Os resultados de porcentagem de proliferação (PC) das células estimuladas em relação ao controle (meio) foram gerados aplicando-se os valores de OD obtidos por espectrofotometria à equação abaixo (Fig.10) (DEL' OLMO *et al.*, 2006).

$$PC (\%) = [OD_{(PBMC + estímulo)} / OD_{(PBMC + meio)}] \times 100$$

(OD: Densidade ótica)

Figura 10 - Equação para cálculo da porcentagem de proliferação celular dada pela relação da densidade óptica das células estimuladas sobre a densidade óptica das células não estimuladas (cultivadas na presença apenas de meio).

3.10 DOSAGEM DE ÓXIDO NÍTRICO PELO MÉTODO DE GRIESS

Os níveis de óxido nítrico (NO) foram determinados nos sobrenadantes de PBMC bovino após 48 horas de cultivo através da Reação de Griess - uma técnica de quantificação por espectrofotometria dos produtos estáveis da decomposição do NO: nitrato (NO_3^-) e nitrito (NO_2^-) (ARCHERS, 1993; DUSSE,1998). O NO é biossintetizado na célula por ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS), a qual transforma o aminoácido L-arginina em N-hidroxi-L-arginina na presença de fosfato dinucleótido adenina nicotinamida (NADPH) e Cálcio (Ca^{2+}). Essa reação produz NO e L-citrulina e necessita de dois cofatores, o oxigênio (O_2) e o NADPH, como demonstrado na figura 10 (MARLETTA, 1993; MONCADA, 1991).

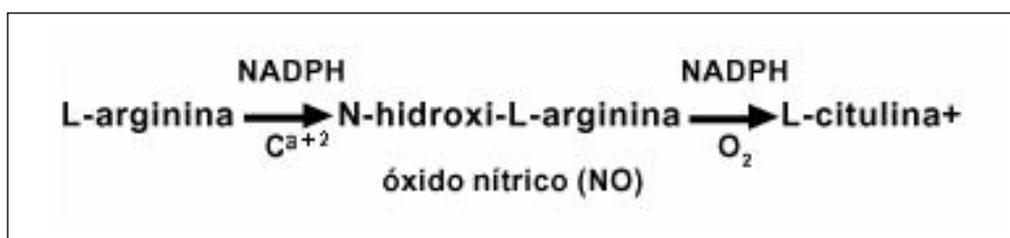


Figura 11 - Equação química da síntese de óxido nítrico (NO)

O NO é bastante instável, quando diluído tem meia vida de menos de 10 segundos, pois sofre uma rápida oxidação. Devido a essa característica, sua produção foi estimada pelo acúmulo de NO_2^- . A reação de Griess é um método colorimétrico indireto usado para medição espectrofotométrica de nitritos. É uma reação de diazotização em 2 passos, na qual o NO_2^- diazotiza com amina aromática primária da sulfanilamida em meio ácido, produzindo o diazo. Esse composto reage com o cloridrato de N-(1-naftil) etilenodiamina (NEED), gerando um corante azóico de coloração rosácea (Fig. 12). A reação é controlada pelo tempo, e o produto deve ser determinado entre 10 minutos e 2 horas após a mistura dos reagentes. A coloração resultante tem intensidade de cor diretamente proporcional à concentração de nitrito na amostra. A presença de nitrato não causa interferência nos resultados (MARLETTA, 1993).

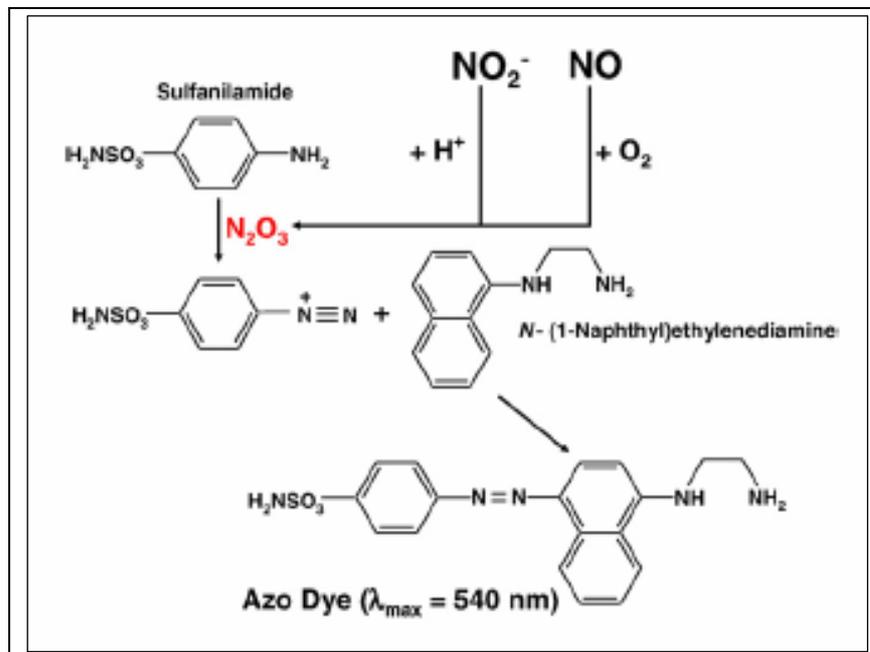


Figura 12 - Equação química representativa do mecanismo de reação que ocorre no método de Griess. O agente nitrosilante trióxido dinitrogênio (N_2O_3), gerado a partir de nitrito acidificado (ou a partir da autoxidação de NO), reage com a sulfanilamida produzindo um íon diazônio. Esse composto intermediário interage com *N*-(1-naftil) etilenodiamina para produzir um cromóforo azóico que absorve fortemente a 540 nm.

Para realização desse ensaio, alíquotas de 100 μ L dos sobrenadantes congelados obtidos das culturas de células foram incubados por 5 minutos em temperatura ambiente com 100 μ L do Reativo de Griess. Este reativo foi obtido misturando-se 50 mL de sulfanilamida a 1% com 50 mL de NEED a 0,1% diluído em ácido fosfórico (H_3PO_4) a 2,5%. A leitura da absorbância foi realizada em leitor de microplacas (SPECTRAMAX 190, Molecular Devices - USA) a 540 nm. As concentrações de NO_2 foram estimadas através de comparação com uma curva padrão, a qual apresentava uma série de diluições lineares com solução padrão de nitrito de sódio ($NaNO_2$).

3.11 DOSAGEM DE INTERFERON-GAMA POR ELISA

Os níveis de interferon-gama foram determinados nos sobrenadantes de PBMC bovino após 48 horas de cultivo através da técnica de ELISA, utilizando-se um kit específico para detecção de IFN- γ bovino (Endogen, Rockford, IL, USA). ELISA (*“Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay”*) é um ensaio colorimétrico imunoenzimático de detecção quantitativa e qualitativa de antígenos e anticorpos. O método do tipo não competitivo, conhecido como sanduíche, é comumente empregado para pesquisa de citocinas. Em uma placa de superfície inerte os anticorpos de captura são adsorvidos e, em seguida, a amostra estudada é adicionada, se as proteínas de interesse (citocinas) estiverem presentes ocorrerá uma ligação específica formando o complexo anticorpo-antígeno. Na seqüência, são adicionados os anticorpos de detecção ligados à peroxidase, ocorrendo uma nova interação antígeno-anticorpo. A cada etapa a placa passa por lavagens com solução tampão contendo proteína inespecífica para que esta ocupe os espaços livres nos poços, e para retirar os elementos que não foram incorporados à placa. Então, adiciona-se a solução cromogênica contendo o substrato (H_2O_2), resultando em desenvolvimento de coloração (Fig.13 e 14). A medida da intensidade da cor verifica a presença e quantifica a substância de interesse.

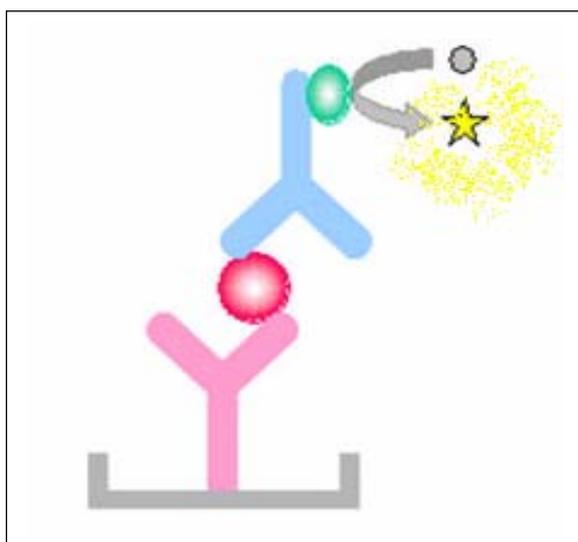


Figura 13 - Esquema do complexo imune formado no ELISA sanduíche.

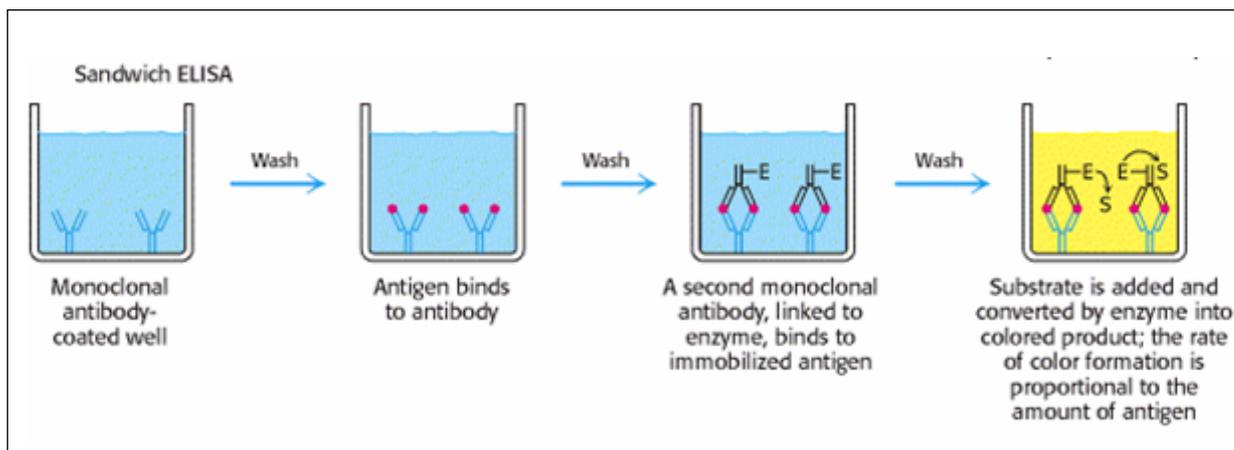


Figura 14 - Seqüência resumida do ELISA formato sanduíche.

Nesse ensaio todos os procedimentos foram realizados a temperatura ambiente. Placas de 96 poços foram sensibilizadas com o anticorpo de captura anti-IFN- γ -bovino diluído em tampão carbonato-bicarbonato segundo as normas do fabricante, e foram incubadas por 18h. Após esse período, a solução de sensibilização foi dispensada e os sítios inespecíficos foram bloqueados com solução de bloqueio (PBS-Tween 20 + 10% SFB), incubando-se por mais 1 hora. A solução de bloqueio foi também dispensada e adicionou-se a curva padrão para IFN- γ , diluída na razão de 1:2, sendo o primeiro ponto de 2.000 pg/mL. Nos poços seguintes foram distribuídas as amostras dos sobrenadantes de cultura e incubou-se por mais 1 hora. Terminada a incubação, as placas foram lavadas três vezes com o tampão de lavagem (PBS-Tween 20) e o anticorpo de detecção anti-IFN- γ -bovino-biotinilado, diluído 1:100 em tampão PBS/BSA, foi adicionado e incubado por mais 1 hora. A lavagem foi repetida e o conjugado enzimático (estreptavidina diluída 1:4000 em PBS/BSA) foi adicionado e incubado por 30 minutos. Após esse tempo, realizou-se mais uma vez a lavagem das placas e a reação foi revelada pela adição do substrato, incubando-se por 20 minutos no escuro. A reação foi interrompida pela adição da solução de bloqueio (ácido sulfúrico 1M) e a leitura feita em leitor de microplacas (SPECTRAMAX 190, Molecular Devices, USA) a 410 nm. As concentrações de IFN- γ foram estimadas através de comparação com curva padrão, a qual apresentava uma série de diluições lineares com IFN- γ recombinante.

3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis numéricas foram avaliadas pelo teste de normalidade de Kolgomorov-Smirnov para distribuição gaussiana dos dados. Para as variáveis que possuíam distribuição normal a avaliação estatística foi realizada por meio de análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni de comparação múltipla. Caso contrário, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis seguida pelo teste de Dunns de comparação multipla. As análises foram feitas no software estatístico (GraphPad Prism 5.0) e os valores foram considerados significativos para $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR

As células dos animais R e S apresentaram porcentagens de proliferação semelhantes nos três pontos da infestação (0, 5 e 12 dpi), tanto na ausência quanto na presença dos estímulos ConA, PI10, PI2 e PS (Fig.15). Dados semelhantes foram observados quando foram comparados os indivíduos do mesmo grupo, a proliferação celular não variou entre os bovinos R (Fig.15-A), assim como não variou entre os bovinos S (Fig.15-B), seja em qualquer ponto temporal na presença ou não dos estímulos.

Embora não tenha sido detectada diferença significativa, a proliferação das células de bovinos R tendeu a aumentar no 5º dpi na presença dos estímulos, seguindo-se uma redução no 12º dpi (Fig.15-A). Já nos bovinos S a estimulação com os antígenos do carrapato pareceu inibir a proliferação das células no dia 0, e não alterou os índices do 5º e 12º dpi (Fig.15-B). Além disso, observou-se que as células dos animais susceptíveis parecem não responder à indução de proliferação por ConA, pois a porcentagem de replicação das células sob o efeito desse estímulo é semelhante à das células não estimuladas (Fig. 15-B).

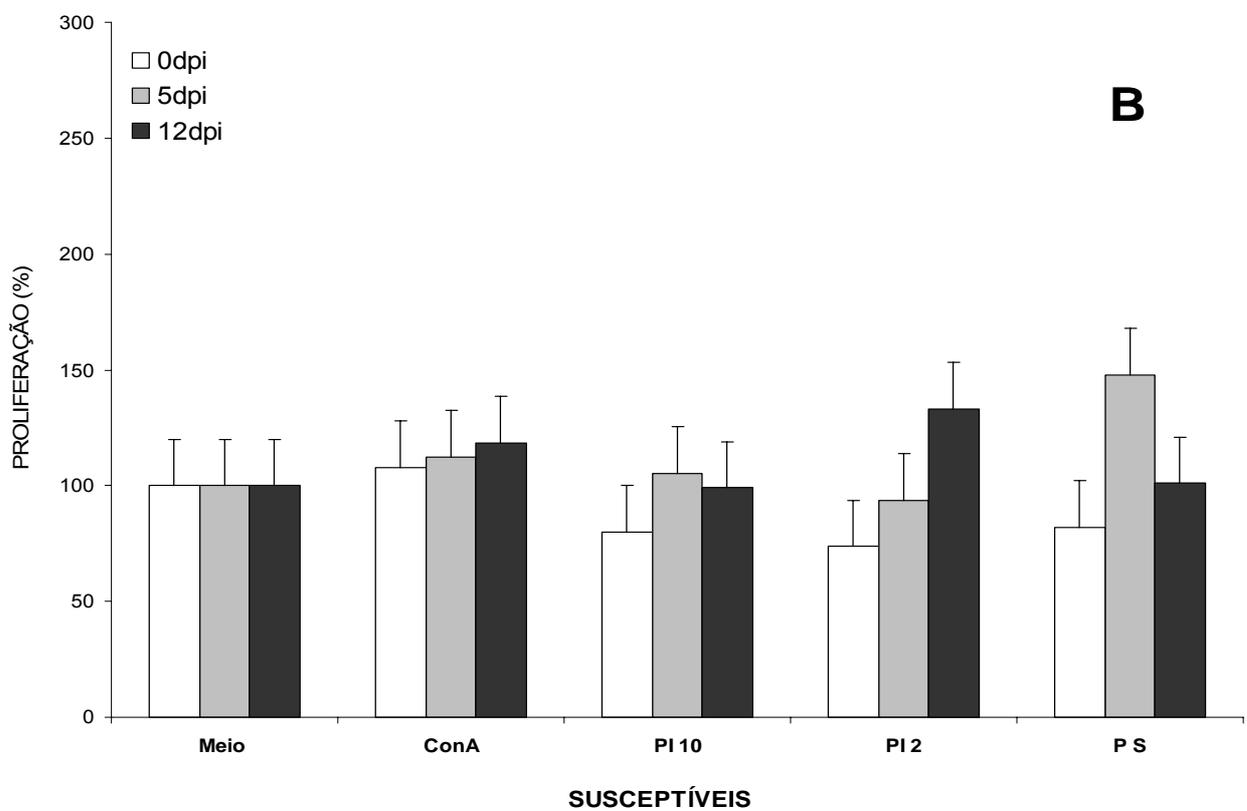
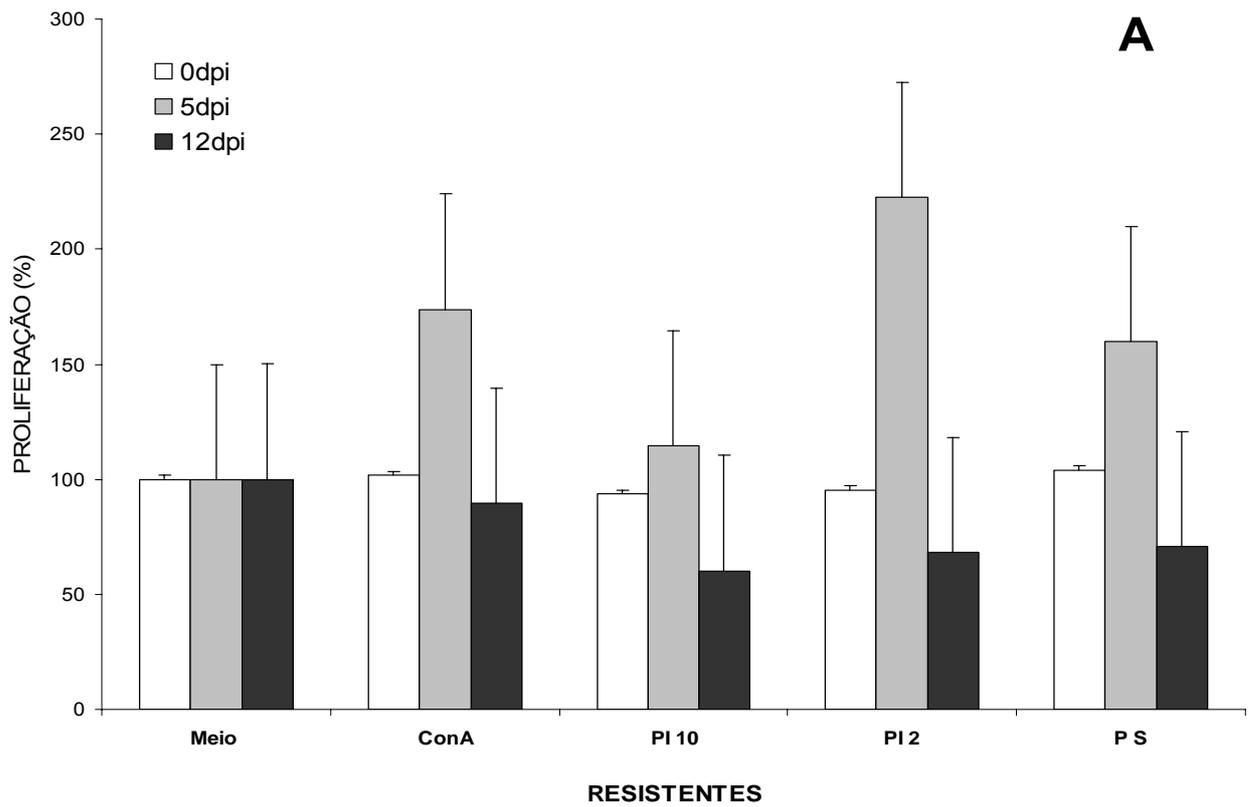


Figura 15 - Proliferação de células obtidas de bovinos resistentes (A) e susceptíveis (B) nos dias 0, 5 e 12 após infestação por *B. microplus* cultivadas por 48 horas na ausência (meio) ou presença dos estímulos ConA (5µg/ml), PI (10 µg/ml e 2 µg/ml) e PS (0,5 µg/ml).

4.2 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO

As células dos animais R e S apresentaram níveis semelhantes de NO nos três pontos da infestação (0, 5 e 12 dpi), tanto na ausência (Fig.16-A) quanto na presença dos estímulos PI10 (Fig.16-B), PI2 (Fig.16-C) e PS (Fig.16-D). Dados similares foram observados quando foram comparados os indivíduos do mesmo grupo, a produção de NO não variou entre os bovinos R (Fig.16-A), assim como não variou entre os bovinos S (Fig.16-B), seja em qualquer ponto temporal na presença ou não dos estímulos.

Embora não tenha sido detectada diferença significativa, quando as células obtidas no dia 0 foram cultivadas na ausência de estímulo (Fig. 16-A) os níveis de NO dos animais R foram mais altos que dos animais S. Além disso, a estimulação com antígenos do carrapato PI10 (Fig.16-B), PI2 (Fig.16-C) e PS (Fig.16-D) inibiu a produção de NO por células de animais R no 5º dpi.

Os bovinos R4 e R5 (Fig.17-A) e S1, S4 (Fig.17-B) cujas células apresentaram produção de NO *in vitro* acima da mediana, mantiveram esse padrão nos 3 dias, tanto na ausência quanto na presença de estímulos. Do mesmo modo, os bovinos R2, R3 e R6 (Fig.17-A) e S2, S3, S5 e S6 (Fig.17-B) cujas células apresentaram produção de NO *in vitro* abaixo da mediana mantiveram o nível nos 3 dias, tanto na ausência quanto na presença de estímulos.

Além disso, observou-se que os antígenos PI (Fig.16-B e C) e PS (Fig.16-D) exerceram efeitos semelhantes sobre a produção de NO por PBMC de bovinos resistentes ao longo dos três pontos avaliados na infestação, isto é, tendência de redução dos níveis de NO do dia 0 para o dia 5 seguido por uma leve tendência de aumento no dia 12. O mesmo não ocorreu para as células obtidas de bovinos susceptíveis, as quais apresentaram um padrão díspar para cada estímulo (Fig.16).

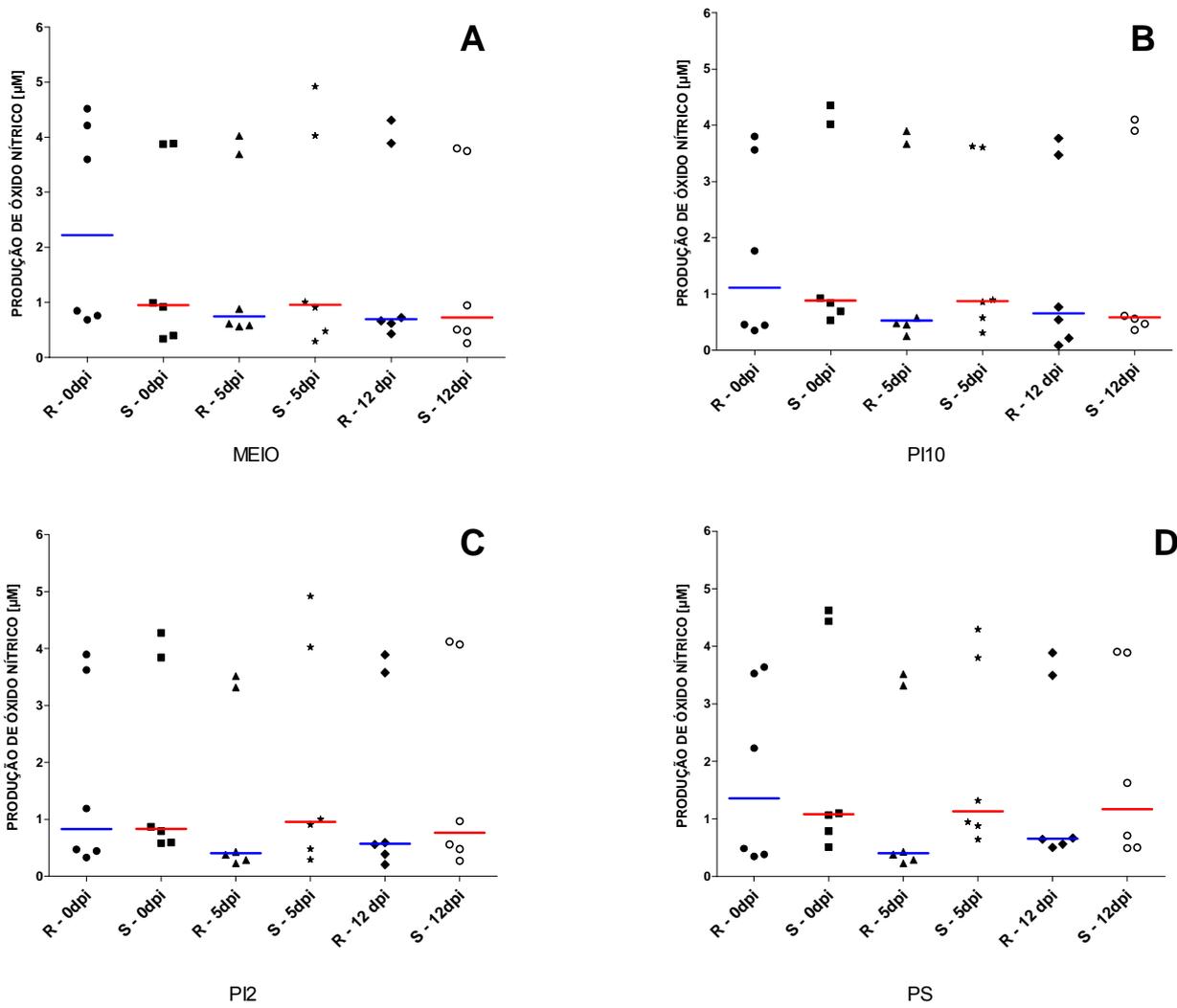


Figura 16 - Produção de NO por células obtidas de bovinos resistentes - R (medianas destacadas na cor azul) e susceptíveis - S (medianas destacadas na cor vermelha) nos dias 0, 5 e 12 após infestação por *B. microplus* cultivadas por 48 horas na ausência (A) ou presença dos estímulos PI10 [10 µg/ml] (B), PI2 [2 µg/ml] (C) e PS [0,5 µg/ml] (D).

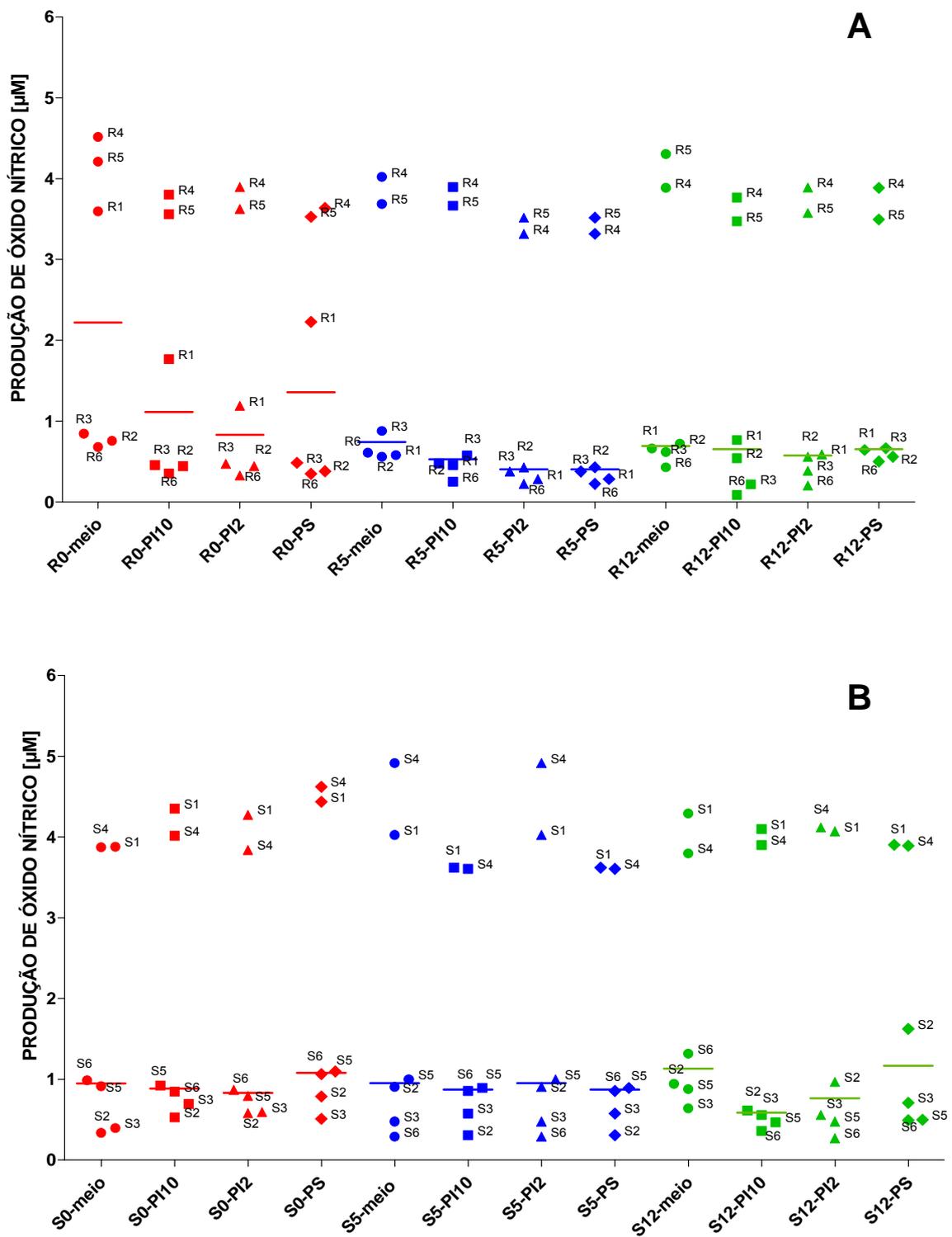


Figura 17 - Produção de NO por células obtidas de bovinos resistentes (A) e susceptíveis (B) nos dias 0 (vermelho), 5 (azul) e 12 (verde) após infestação por *B. microplus* cultivadas por 48 horas na ausência (A) ou presença dos estímulos P110 [10 µg/ml] (B), P12 [2 µg/ml] (C) e PS [0,5 µg/ml] (D).

4.3 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE INTERFERON-GAMA

As células dos bovinos R e S apresentaram níveis semelhantes dessa citocina nos três pontos da infestação (0, 5 e 12 dpi) tanto na ausência (Fig.18-A) quanto na presença dos estímulos PI10 (Fig.18-B), PI2 (Fig.18-C) e PS (Fig.18-D). Resultados semelhantes foram observados quando se analisou os indivíduos do mesmo grupo, a produção de IFN- γ não variou entre os bovinos R assim como não variou entre os bovinos S nos 3 pontos temporais na presença dos estímulos ou não (Fig.18).

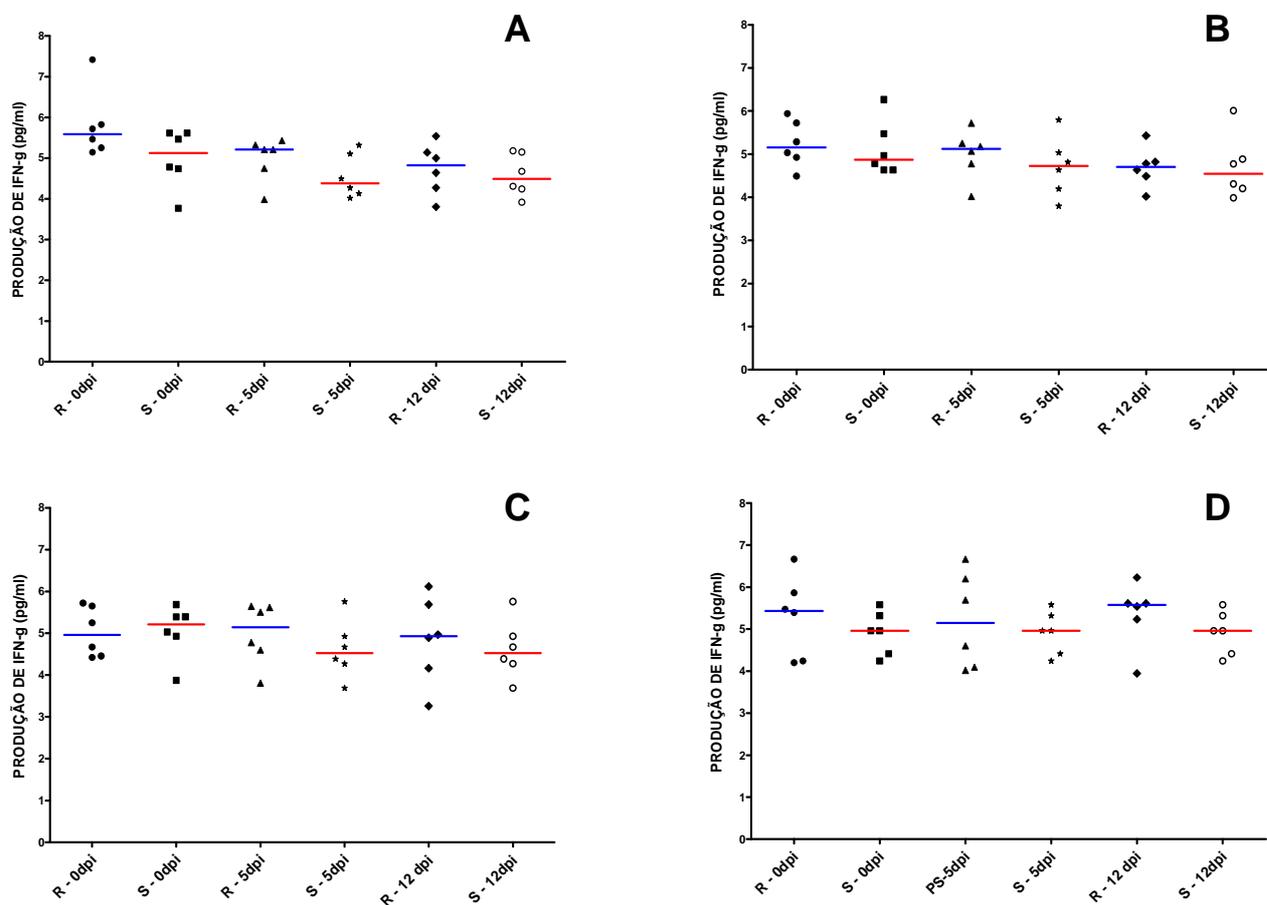


Figura 18 - Produção de IFN- γ por células obtidas de bovinos resistentes - R (medianas destacadas na cor azul) e susceptíveis - S (medianas destacadas na cor vermelha) nos dias 0, 5 e 12 após infestação por *B. microplus* cultivadas por 48 horas na ausência (A) ou presença dos estímulos PI10 [10 μ g/ml] (B), PI2 [2 μ g/ml] (C) e PS [0,5 μ g/ml] (D).

5 DISCUSSÃO

As infestações por ectoparasitos são responsáveis por perdas econômicas significativas na produção animal (MARTINEZ *et al.* 2004), assim, opções alternativas de controle do carrapato tornam-se imprescindíveis a fim de tentar reduzir os prejuízos causados ao gado. Para se atingir a proposta de controle imunológico do carrapato por meio de vacinação do rebanho é necessário, não somente a identificação de proteínas imunogênicas capazes de induzir proteção no bovino, como também o conhecimento dos mecanismos de ação da resposta imune que envolve a relação parasito-hospedeiro (LEAL *et al.*, 2003).

A imunidade adquirida naturalmente por bovinos contra carrapatos ainda é pouco compreendida, não está claro como atuam as respostas humoral e celular, assim como não está bem definida a polarização para o perfil Th1 ou Th2. Respostas protetoras podem ser confundidas com a imunossupressão induzida pelo carrapato e com respostas que, ao mesmo tempo em que são importantes, aparentam ser irrelevantes na rejeição do parasito (PRESTON e JONGEJAN, 1999). Portanto, é importante identificar no contexto imunológico quais são os fatores que conduzem à resistência ou à susceptibilidade do hospedeiro.

O presente trabalho avaliou a resposta imunológica em bovinos F2 ($\frac{1}{2}$ Gir : $\frac{1}{2}$ Holandês) infestados artificialmente por *B. microplus* e selecionados em dois grupos, resistente (R) e susceptível (S), de acordo com a contagem do número de carrapatos por hospedeiro. Os parâmetros imunológicos avaliados foram porcentagem de proliferação celular, níveis da produção de NO e IFN- γ por PBMC bovino frente ao estímulo por antígenos de *B. microplus* após 48 horas de cultivo.

Embora não tenha sido detectada diferença significativa na porcentagem de proliferação celular entre os grupos R e S, os antígenos específicos do carrapato (PI10, PI2 e PS) pareceram inibir a proliferação das células de bovinos S no dia 0. Essa condição experimental representada células coletadas de bovinos não infestados e cultivadas na presença de antígenos de *B. microplus* simula um contato inicial entre hospedeiro e parasito, que resultou em redução da replicação celular bovina. Isso pode ser um indício de que a resposta imune dos animais susceptíveis é mais vulnerável à modulação pelo carrapato, permitindo o sucesso da hematofagia

e, conseqüentemente, o estabelecimento efetivo desse patógeno em seu hospedeiro (WIKEL, 1996; SCHOLER E WIKEL, 2001).

Vários trabalhos mostram que o carrapato é capaz de modular a resposta imune do hospedeiro inibindo a proliferação de linfócitos T, suprimindo a resposta mediada por macrófagos e regulando o perfil de citocinas produzidas por LT através de moléculas supressoras presentes na saliva (TURNI *et al.*, 2002; 2004). Ramachandra e Wikel (1995) constataram que EGS do *Dermacentor andersoni* reduz a proliferação de PBMC de *B. taurus* e *B. indicus in vitro*.

A saliva de artrópodes contém altas concentrações de PG (BOWMAN *et al.*, 1996), como a PGE₂, detectada nas glândulas salivares de *B. microplus* (DICKINSON *et al.*, 1976). Harris e colaboradores (2002) verificaram que PGE₂ inibe a resposta proliferativa de linfócitos T, além de realçar a produção de citocinas Th₂ em detrimento de Th₁. Corroborando esses dados, foi demonstrado que PGE₂ ativa LT virgens para produzirem altos níveis de IL-4, IL-10 e IL-13, e níveis reduzidos de IL-2, IFN- γ , TNF- α e TNF- β (DEMEURE *et al.*, 1997).

Em um estudo recente, Turni e colaboradores (2007) avaliaram o efeito do EGS de *B. microplus* na proliferação de linfócitos bovinos e mostraram que a proliferação induzida *in vitro* de LT foi inibida em 75,4%. Além disso, foi verificado que saliva de *B. microplus* suprimiu a proliferação de monócitos bovinos *in vitro*, sendo esta supressão atribuída à PGE₂ (INOKUMA *et al.*, 1994).

No presente trabalho, observou-se ainda que as células dos animais susceptíveis apresentaram indícios de serem irresponsivas à indução de proliferação por ConA, pois a porcentagem de replicação das células cultivadas exclusivamente com esse mitógeno foi semelhante à das células não estimuladas. A ConA é uma lectina derivada de grãos de leguminosas (*Canavalia ensiformis*), com propriedade de se ligar à glicoproteínas da superfície de linfócitos (DESHPANDE e DAMODARAN, 1990) desencadeando a divisão mitótica da célula (LIS e SHARON, 1973; LIENER, 1981). Uma vez que esse mitógeno ativa LT inespecíficos, esperava-se que a estimulação com ConA induzisse proliferação do PBMC. Esse evento pode não ter ocorrido devido à modulação negativa exercida por antígenos do carrapato.

Brossard e Wikel (1997) relataram que a infestação por carrapatos ocasionou redução da resposta de linfócitos bovinos à ConA e à PHA. Essa imunossupressão pode ser relacionada com a redução de IL-2 ocasionada por proteínas ligantes de IL-2 (GILLESPIE *et al.*, 2001) ou PGE₂ (RIBEIRO *et al.*, 1995; INOKUMA *et al.*, 1994),

presentes na saliva do carrapato.

Apesar do trabalho de Ramachandra e Wikel (1995) demonstrar que EGS causa supressão *in vitro* em células de bovinos resistentes (*B. indicus*) com porcentagens de inibição semelhantes às encontradas para animais susceptíveis (*B. taurus*), nossos resultados demonstraram uma tendência ao aumento na proliferação das células de bovinos R em presença de ConA, PI10, PI2 e PS no 5º dpi. Essa condição experimental, células coletadas de bovinos que já estavam em contato com o carrapato havia 5 dias e cultivadas com antígenos de *B. microplus*, representa exposições sucessivas do hospedeiro ao parasito. Diante disso, pode-se sugerir que bovinos resistentes parecem ser capazes de driblar a modulação do carrapato e prosseguir com a montagem da resposta imune, resultando, provavelmente, em ativação e replicação dos clones de linfócitos antígeno-específicos. Nesse ponto da infestação (5º dpi), a expansão clonal provavelmente acabou de ocorrer, ou seja, os clones antígeno-específicos são recentes e por isso responderam mais intensamente à reexposição aos antígenos de *B. microplus in vitro*.

Esse fato não indica necessariamente formação de memória imunológica, pois a estimulação das células de animais R com antígenos de *B. microplus in vitro* não acarretou aumento de proliferação no 12º dpi, pelo contrário, houve até ligeira redução desta. Como o aumento de proliferação no 5º pode ser interpretado como processo de expansão clonal, parte da população de clones se constitui de células de memória, e se essas tivessem sobrevivido, provavelmente, seriam ativadas pela presença do antígeno injetado *in vitro* aumentando sua replicação. No entanto, se ocorreu geração de células de memórias duradouras, esse estado "hiporesponsivo" pode ser atribuído à modulação por *B. microplus*. Nesse ponto da infestação (12º dpi), o carrapato já se encontrava em estágios de desenvolvimento mais próximos da fase adulta e, portanto, seus componentes imunogênicos teriam uma ação imunossupressora mais potente inibindo até a proliferação celular de bovinos R.

Diversos estudos têm mostrado que o estágio de desenvolvimento do carrapato tem influência no perfil de proteínas da saliva (WANG e NUTTALL, 1994; TIKKI *et al.*, 1999; LAWRIE e NUTTALL (2001). O efeito supressor da saliva de algumas espécies de carrapato sobre células do hospedeiro e produção de citocinas depende da fase de desenvolvimento de fêmeas adultas do carrapato (HAJNICKÁ *et al.*, 2000; RAMACHANDRA e WIKEL, 1995). O conteúdo total de proteínas solúveis da saliva de carrapatos adultos aumenta desproporcionalmente o tamanho da

glândula salivar após o início da hematofagia (WANG *et al.*, 1999a). Wang e colaboradores (1999b) verificaram que a interrupção da alimentação de fêmeas adultas de *R. appendiculatus* casou uma modificação no padrão de expressão protéica retornando ao observado na fase não parasitária.

Nossos ensaios *in vitro* foram realizados com PBMC bovino obtido em três pontos da infestação: dia 0 (antes do bovino receber o colar contendo larvas infestantes de *B. microplus*), dias 5 e 12 após a infestação. Ao longo desses pontos, de acordo com o ciclo biológico do *B. microplus*, estavam presentes apenas carrapatos no estágio de larvas e ninfas, pois as fêmeas adultas só são encontradas por volta do 15º dia, quando a ninfa passa por uma muda cuticular dando origem à neógina (fêmea adulta imatura) (ATHANASSOF, 1953). Isso pode ter interferido em nossos resultados, pois é possível que nos pontos em que o sangue foi coletado, o bovino tivesse sido exposto apenas aos antígenos do padrão protéico característicos de larvas, o qual não apresenta o mesmo potencial supressor do padrão exibido por fêmeas adultas de carrapato.

Além de possuir uma composição estágio-específica, a saliva pode ser influenciada pelo hospedeiro. Um estudo comparando o efeito de EGS de duas cepas de *B. microplus* verificou que o bovino interfere na composição da saliva do carrapato e suas propriedades inibitórias. O EGS da cepa Y inibiu a proliferação *in vitro* de LT estimulados por ConA significativamente mais que a cepa N quando essas foram utilizadas na infestação de bovinos diferentes, o mesmo não ocorreu quando as duas cepas foram utilizadas na infestação do mesmo bovino (TURNI *et al.*, 2004).

Carrapatos parecem responder ao ambiente gerado pelo hospedeiro sendo capazes de alterar a expressão protéica em resposta às mudanças nesse ambiente, enquanto algumas proteínas desaparecem, outras são sintetizadas (WANG *et al.*, 1999-a). Esse fato, apoiado na hipótese de que o mecanismo de resistência ao carrapato confere aos bovinos resistentes uma resposta imune mais elaborada capaz de eliminar o parasito, pode sugerir que animais com diferentes graus de resistência geram microambientes imunológicos distintos e, portanto, influenciam de forma diferente a composição da saliva, e esta, por sua vez, induz respostas proliferativas díspares, como ocorreu em nosso trabalho

Nesse trabalho também foi avaliada a produção de NO para verificar se a estimulação com antígenos do carrapato alteraria os níveis dessa molécula nas

células bovinas e se havia diferença na produção de NO entre animais R e S. O sistema imune utiliza a oxidação dessa molécula para promover ação microbicida contra agentes estranhos ao organismo e, portanto, sua presença poderia ser determinante na resposta contra o carrapato. Embora não tenha sido detectada diferença significativa na produção *in vitro* de NO entre os grupos R e S, quando as células obtidas no dia 0 foram cultivadas sem estímulo os níveis de NO dos bovinos R foram mais altos que dos bovinos S. Essa condição experimental representada por células coletadas de bovinos que ainda não haviam sido infestados e cultivadas sem antígenos de *B. microplus* simula total ausência de contato entre hospedeiro e parasito e pode fornecer indícios da produção basal de NO dos bovinos R e S antes da infestação pelo carrapato. Diante disso, os resultados sugerem que os animais resistentes possuem o nível basal de NO mais alto que os animais susceptíveis.

Em adição, no presente estudo, a estimulação com antígenos do carrapato (PI10, PI2 e PS) pareceu inibir a produção de NO por células de bovinos R no 5º dpi, mantendo os níveis reduzidos no 12º dpi. Essa diminuição dos níveis de NO no 5º dia em relação ao dia 0 foi maior sob o efeito da estimulação com proteína salivar (PS), cerca de 70%, que sob efeito da proteína intestinal (PI), cerca de 50%, qualquer que seja sua concentração (2 ou 10µg/ml), sugerindo que antígenos naturais são mais imunogênicos que os sintéticos. Esse padrão estabelecido por bovinos resistentes, ou seja, níveis basais de NO mais altos antes da infestação (dia 0 + meio), supressão da produção dessa molécula devido ao contato com o parasito (dia 0 + estímulos e 5º dpi) e manutenção dos níveis reduzidos em exposições posteriores (12º dpi) pode ter sido delineado por mecanismos imunorregulatórios. E como os níveis de NO em bovinos susceptíveis se mantêm semelhantes nos três pontos estudados, pode-se sugerir que esses animais não realizam essa regulação.

A redução dos níveis de NO no 5º dpi em células de bovinos R pode ser associada à ação de citocinas imunomoduladoras induzidas pelo carrapato na tentativa de regular a resposta imune do hospedeiro para um perfil imunológico que favorecesse o sucesso da hematofagia. Ou, sob uma ótica bimodal – imprescindível na imunologia, pode ser um mecanismo de regulação do próprio bovino na tentativa de prevenir contra-medidas por parte do carrapato. Assim, são mantidos níveis de citocinas e moléculas de defesa satisfatórios para sustentar a resposta imune bovina, porém insuficientes para ativar modulação por parte do parasito.

É possível que essa regulação tenha sido causada pela IL-10, uma citocina

comumente presente em processos de supressão celular, agindo sobre macrófagos, e conseqüentemente, inibindo a produção de NO. Belo (2008), em um estudo paralelo a essa dissertação, analisou a expressão de genes da resposta imune em amostras de pele coletadas dos mesmos bovinos utilizados em nossos experimentos e constatou que bovinos resistentes infestados com *B. microplus* expressaram 3,214 vezes mais o gene IL-10 no 5º dpi e 3,489 vezes mais no 12º dpi quando comparados ao controle. Além disso, estudos têm demonstrado que carrapatos modulam a resposta imune do hospedeiro favorecendo a produção de citocinas com características inibitórias e modulatórias como IL-4 e IL-10 (WIKEL, 1997; WIKEL e ALARCON-CHAIDEZ, 2001 e BROSSARD e WIKEL, 2004). Portanto, nossos resultados sugerem que a redução dos níveis de NO nas células estimuladas dos animais R no 5º e 12º dpi em relação ao dia 0 pode ter sido induzida pela ação supressora de citocinas imunorregulatórias como a IL-10.

A análise de citocinas é essencial para a caracterização da resposta imune aos parasitos, nesse sentido o presente trabalho avaliou a produção de IFN- γ por PBMC bovino. O IFN- γ está associado à potencialização da ação do TNF, conversão de linfócitos Th0 em Th1 e ativação de neutrófilos e macrófagos aumentando seu metabolismo oxidativo (FARRAR e SCHEREIBER, 1993). Conforme aqui apresentado, as células dos bovinos R e S apresentaram níveis semelhantes dessa citocina nos três pontos da infestação na presença ou ausência de estímulos.

Zeidner (1997) observou que camundongos infestados com ninfas de *Ixodes scapularis* apresentaram supressão da produção de IFN- γ atribuída ao aumento de IL-10. Do mesmo modo, Kopecky e colaboradores (1999) verificaram que a inibição da produção *in vitro* de IFN- γ por esplenócitos de camundongos tratados com EGS de *I. ricinius* foi acarretada por aumento dos níveis de IL-10. Os níveis de IL-4 e IFN- γ foram avaliados na pele, linfonodos e baço de camundongos infestados com carrapatos, demonstrando aumento significativo de IL-4 nestes tecidos enquanto os níveis de IFN- γ permaneceram baixos (BROSSARD e WIKEL, 1997). O EGS de *D. andersoni* também suprimiu a produção de IFN- γ por macrófagos (RAMACHANDRA e WIKEL, 1992)

Alguns estudos têm demonstrado que a modulação da resposta do hospedeiro pelo carrapato se dá através do favorecimento da produção de citocinas com características inibitórias e modulatórias como IL-4 e IL-10, em detrimento da

produção de citocinas Th1, como IL-2 e IFN- γ (WIKEL, 1997; WIKEL e ALARCON-CHAIDEZ, 2001 e BROSSARD e WIKEL, 2004). A IL-10 inibe a produção de IL-12 por macrófagos e células dendríticas ativados, e como a IL-12 é um estímulo crítico para a secreção de IFN- γ , inibe, assim, a produção deste. A IL-4 antagoniza os efeitos ativadores do IFN- γ sobre os macrófagos, e assim, inibe reações imunes mediadas por células (JANEWAY, 2002). Portanto, nossos resultados sugerem que a estagnação da produção de IFN- γ por células de bovinos infestados por *B. microplus* pode ter sido induzida também pela ação de citocinas regulatórias como IL-10 e IL-4.

Ao final da análise dos parâmetros imunológicos avaliados nesse trabalho observamos que a regulação da interface carrapato-bovino, resultando a harmonia dessa relação ou o sobrepujo de uma das partes caracterizando perfis de resistência e susceptibilidade, está profundamente alicerçada nas imunomodulações exercidas por parasito e hospedeiro. Parece que a proliferação celular e as produções de NO e IFN- γ por PBMC de bovinos infestados por *B. microplus*, tanto por aqueles considerados resistentes quanto por aqueles considerados susceptíveis, encontram-se afetadas, com proporções diferentes ao longo da infestação, pelo efeito supressor dos antígenos do carrapato. E uma vez que os resultados apresentados não evidenciaram diferenças significativas entre animais R e S, é possível que a resposta imune aqui avaliada não seja importante para o mecanismo de resistência, embora possa ter algum papel na rejeição do parasito.

Além disso, apesar da análise estatística não detectar diferenças significantes nas variáveis avaliadas entre bovinos resistentes e susceptíveis, é importante considerar as tendências de comportamento dos grupos R e S. Essas tendências podem ser representativas de padrões, e não apenas de um único padrão, que seriam delineados pelo grupo se esse contivesse uma amostra maior da população bovina. Já se sabe que existem variações individuais para resistência dentro da mesma raça, e aqui, foi possível verificar que essas diferenças também ocorrem entre animais dentro de um grupo pré-selecionado, o que de alguma forma agrupa indivíduos mais assemelhados, em uma determinada raça. Essa diluição do grau de resistência é ainda maior em raças mestiças, como é o caso dos bovinos utilizados nesse trabalho, resultando em genótipos e fenótipos intermediários. Um maior n amostral poderia representar melhor essa grande variação para resistência ao

carrapato em uma mesma raça e dentro de grupos dessa raça.

De qualquer forma a manipulação de animais experimentais de grande porte e com valor no mercado inviabiliza a possibilidade de um grande N amostral. Vale ressaltar que o sistema de seleção de bovinos R e S utilizado nesse trabalho foi bastante refinado, partiu de um grande número de animais (332) para chegar em uma amostra confiável. Assim, para eleger 12 indivíduos foram necessários cerca de 30 vezes mais bovinos, os quais foram obtidos em dois cruzamentos, passaram por infestação artificial e, ainda, pela avaliação absoluta. Tratando-se de animais de grande porte, as dificuldades experimentais como espaço e custo de manutenção do gado, controle das condições experimentais, entre outras, são ainda maiores. Dessa forma, o n amostral "relativamente" pequeno pode ter interferido na análise estatística, mas marcou sua representatividade através das tendências de comportamento.

Outro fator que pode ter influenciado os resultados desse trabalho refere-se à concentração de EGS utilizada de 0,5 µg/mL. Trabalhos de avaliação do efeito de EGS em células bovinas utilizam concentrações de 8 a 40 µg/mL. Em um estudo com duas cepas de *B. microplus*, Turni e colaboradores (2004) verificaram que para concentrações de EGS até 1 µg/mL, apenas uma cepa foi capaz de inibir a proliferação *in vitro* de linfócitos estimulados por ConA.

Adicionalmente, como os animais avaliados não se encontravam em ambientes controlados, ao contrário, viviam no campo expostos a outros patógenos, existe o risco de coinfeções interferirem nos resultados dessa pesquisa. Apesar disso, os resultados apresentados são relevantes em termos práticos, já que a aplicabilidade desse estudo no controle do carrapato depende do conhecimento do mecanismo de resistência em condições reais.

É válido destacar ainda que algumas medidas ajudariam a eliminar fatores de possível influência nos resultados, tornando, assim, os dados mais seguros e conclusivos. Já que nesse trabalho observou-se a relevância da imunorregulação durante a infestação por carrapatos, a aplicação de um tratamento anti-helmíntico prévio nos bovinos poderia evitar respostas imunes mascaradas por parasitoses intestinais.

Além disso, seria extremamente importante realizar um acompanhamento diário da resposta imune bovina ao carrapato, explorando dados genéticos,

imunológicos e fenotípicos da ectoparasitose, não apenas durante a infestação, mas também após a queda do carrapato para obtenção de informações mais completas.

A exploração de variáveis como concentração dos antígenos utilizados para estimular as culturas de células, diferentes combinações de mitógenos com EGS, estabelecimento de um grupo controle constituído por bovino não infestado, seria de grande importância.

Também seria interessante cruzar dados coletados de um mesmo bovino, tais como histologia do local da picada, expressão gênica de citocinas, análise fenotípica de características influentes na resistência, dosagem de citocinas e de moléculas imunes envolvidas na infestação, contagem diferencial e identificação de células, de modo que os eventos relacionados à resistência não fiquem particulados e os mecanismos imunológicos que atuam na proteção do bovino, e conseqüentemente, na rejeição do carrapato sejam mais bem compreendidos.

6 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos nas condições do presente trabalho foi possível concluir que:

- 1) a resposta imune de bovinos susceptíveis parece ser vulnerável à modulação pelo carrapato, uma vez que antígenos do carrapato tendem a suprimir a proliferação *in vitro* de PBMC provenientes de bovinos S não infestados artificialmente;
- 2) PBMC de bovinos susceptíveis infestados artificialmente ou não por *B. microplus* parecem não responder à indução de proliferação *in vitro* por ConA, pois a porcentagem de replicação das células sob efeito exclusivamente desse mitógeno foi semelhante à das células não estimuladas;
- 3) animais resistentes parecem ser refratários à modulação pelo carrapato conseguindo ativar a expansão clonal de linfócitos antígeno-específicos, pois PBMC obtidas de bovinos R após 5 dias da infestação por *B. microplus* tenderam ao aumento de proliferação *in vitro* na presença de ConA e de antígenos do carrapato;
- 4) antígenos salivares e intestinais de *B. microplus* tendem a reduzir a proliferação *in vitro* de PBMC obtidas de bovinos R após 12 dias da infestação pelo carrapato, sendo que essa imunossupressão pode ser resultado da imunomodulação pelo parasito ou decorrer da incapacidade dos antígenos de induzirem formação de memória imunológica;
- 5) bovinos resistentes parecem possuir níveis basais de NO mais altos que bovinos susceptíveis, pois a produção *in vitro* de NO por PBMC provenientes de bovinos R não infestados tendeu a ser mais alta que dos bovinos S não infestados;

6) antígenos salivares e intestinais de *B. microplus* parecem inibir a produção *in vitro* de NO por PBMC obtidas de bovinos R após 5 dias da infestação, sendo que essa supressão pode ser resultado da produção de citocinas imunorregulatórias induzida no hospedeiro pelo parasito.

7) O IFN- γ parece não atuar no mecanismo de resistência aos carrapatos, já que PBMC obtidas de bovinos resistentes e susceptíveis não apresentaram diferenças quanto a produção de IFN- γ , sendo que essa supressão também pode ser resultado da produção de citocinas imunomoduladoras induzida no hospedeiro pelo parasito.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALAN, J., ROBIN, T. 1987. *Imunochemistry in practice*. 2ª ed. Blackwell Scientific Publications, Oxford, London.
- ALLEN, J. R., KHALIL, H.M., WIKEL, S. K. 1979. Langerhans cells trap tick salivary gland antigens in tick-resistant guinea pigs. **Journal of Immunology**, **122**: 563-565.
- ALVES-BRANCO, F. P. J.; ECHEVARRIA, F.A.M.; SIQUEIRA, A.S. 1983. Garça vaqueira (*Egretta ibis*) e o controle biológico do carrapato (*Boophilus microplus*). **Circular Técnica EMBRAPA**, **1**: 1-4.
- ANDREOTTI, R.; GOMES, A.; MALAVAZI-PIZA, K.C.; SASAK, S.D.; SAMPAIO, C.A.M.; TANAKA, A.S. 2002. BMTI antigens induce a bovine protective immune response against *Boophilus microplus* tick. **International Immunopharmacology**, **2**: 557- 563.
- ANDREOTTI, R.; MALAVAZI-PIZA, K.C.; SASAK, S.D.; TORQUATO, R.J.S.; GOMES, A.; TANAKA, A.S. 2001. Serine proteinase inhibitors from eggs and larvae of tick *Boophilus microplus*: purification and biochemical characterization. **Journal of Protein Chemistry**, **20**: 337-343,
- ARCHERS, S. 1993. Measurement of nitric oxide in biological models. **The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, **7**: 349-60.
- AROCHA-PIÑANGO, C.L.; MARCHI, R.; CARVAJAL, Z.; GUERRERO, B. Invertebrate compounds acting on the hemostatic mechanism.1999.**Blood Coagulation & Fibrinolysis**, **10**: 43-68.
- ATHANASSOF, N. 1953. **Manual do criador de bovinos**. 5 ed. São Paulo. Edições Melhoramentos.
- ARTHUR, D.R. Ticks. 1960. **A monograph of the Ixodoidea. On the genera *Dermacentor*, *Anocentor*, *Cosmiomma*, *Boophilus* and *Margaropus***. London: Cambridge University Press.
- AVELINO, M.; NETO, P. Estudo da incidência e localização de carrapato (*Boophilus microplus*) em bovinos Nelore, Holandês e Curraleira no Distrito Federal. 2004. **Circular Técnica EMBRAPA - CNPGC**, **32**: 10-31.
- BARRIGA, O.O.; SILVA, S.S.; AZEVEDO, J.S.C. 1993. Inhibition and recovery of tick functions in cattle repeatedly infested with *Boophilus microplus*. **Journal of Parasitology**, **79**: 710-15.
- BECKMAN, J.S.; KOPPENOL, W.H. 1996. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. **American Journal of Physiology**, **271**: 1424-1437.

- BELO, V.A. 2008. **Estudo da expressão de genes da resposta imune em bovinos resistentes e susceptíveis ao carrapato (*Boophilus microplus*)**. Dissertação acadêmica, Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), 46 p.
- BENNET, G.F. 1974. Oviposition of *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acarina: Ixodidae). II. Influences of temperature, humidity and light. **Acarologia**, **16**: 250-257.
- BERGMAN, K.D.; PALMER, M.J.; CAIMANO, M.J.; RADOLF, J.D.; WIKE, S.K. 2000. Isolation and molecular cloning of a secreted immunosuppressant protein from *Dermacentor andersoni* salivary gland. **Journal of Parasitology**, **86**: 516-525.
- BOWMAN, A.S.; COONS, L.B.; NEEDHAM, G.R.; SAUER, J.R. 1997. Tick saliva: recent advances and implications for vector competence. **Medical and Veterinary Entomology**, **11**: 227-285.
- BOWMAN, A.S.; DILLWITH, J.W.; MADDEN, R.D.; SAUER, J.R. 1995. Regulation of free arachidonic acid levels in isolated salivary glands from the lone star tick: a role for dopamine. **Archives of Insect and Biochemical Physiology**, **29**: 309-327.
- BOWMAN, A. S., DILLWITH, J.W. e SAUER, J. R. 1996. Tick salivary prostaglandins: presence, origin and significance. **Parasitology Today**, **12**: 388-396.
- BROSSARD, M.; FIVAZ, V. 1982. *Ixodes ricinus* L.: mast cells, basophils and eosinophils in the sequence of cellular events in the skin of infested ou reinfested rabbits. **Parasitology**, **85**: 583-592.
- BROSSARD, M. e WIKEL, S.K. 1997. Immunology of interactions between ticks and hosts. **Medical and Veterinary Entomology**, **11**: 270-276.
- BROSSARD, M. e WIKEL, S.K. 2004. Tick immunology. **Parasitology**, **129**: 161-176.
- BROWN, S.J. 1988. Evidence for regurgitation by *Amblyomma americanum*. **Veterinary Parasitology**, **28**: 335-342.
- BROWN, S.J.; SHAPIRO, S.Z.; ASKENASE, P.W. 1984. Characterization of tick antigens inducing host immune resistance: I. Immunization of guinea pig with *Amblyomma americanum*- derived salivary gland extracts and identification of an important salivary gland protein antigen with guinea pig anti-tick antibodies. **Journal of Immunology**, **133**: 3319-25.
- BRUM, J.G.W. 1988. **Infecção em teleóginas de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) por *Cedecea lapagei* (Grimont et al, 1981): etiopatogenia e sazonalidade**. [tese] Rio de Janeiro: Instituto de Biologia. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
- BYFORD, I; COLDITZ, P.; SIBBICK, R. 1976. A Tick Resistant Dairy Breed. **Queensland Agricultural Journal**, **102**: 11-15.
- CARDOSO, V. 2000. **Avaliação de diferentes métodos de determinação da resistência genética ao carrapato *Boophilus microplus*, em bovinos de corte**. [Dissertação] (Mestrado em Zootecnia). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Jaboticabal. 108p.

- CHAMPAGNE, D.E.; VALENZUELA, J.G. 1996. Pharmacology of haemathophagous arthropod saliva. **The Immunology Host-Ectoparasitic Arthropod Relationships**, 85-106.
- CHER, D.J.; MOSMANN, T.R. 1987. Two types of murine helper T cell clone. II. Delayed-type hypersensitivity is mediated by TH1 clones. **Journal of Immunology**, **138**: 3688 – 94.
- CHERQUI, A.; CRUZ, N.; SIMÕES, N. 2001. Purification and characterization of two serine protease inhibitors from the hemolymph of *Mythimna unipuncta*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, **31**: 761-769.
- COONS, L.B.; ALBERTI G. 1999. In: HARRISON, F.W, Foelic R. editors. **Microscopic anatomy of invertebrates Chelicerat Arthropoda**. Vol. 8B. New York: Wille-Liss: 1999, 267-514.
- CORDOVÉS, C.O. 1997. **Carrapato: controle ou erradicação**. 2a ed. Guaíba/RS: Agropecuária, p. 197.
- DA SILVA VAZ JR, I. 1997. **Caracterização de proteínas de *Boophilus microplus* como imunógeno em vacina contra o carrapato** [tese]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- DAVEY, R.B.; GEORGE, G.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.
- DE CASTRO, J.J. 1997. Sustainable tick and tickborne disease control in livestock improvement in developing countries. **Veterinary Parasitology**, **71**: 77–97.
- DE LA FUENTE, J.; RODRIGUEZ, M.; MONTEIRO, C.; REDONDO, M.; GARCIA-GARCIA, J.C.; MENDEZ, L. 1998. Field studies and cost-effectiveness of vaccination with GAVAC TM, against the cattle tick *Boophilus microplus*. **Vaccine**, **16**: 366-373.
- DEL OLMO, E.; PLAZA, A.; MURO, A.; MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ, A.R.; NOGAL-RUIZ, J.J.; LÓPEZ-PÉREZ, J.L.; FELICIANO, A.S. 2006. Synthesis and evaluation of some lipidic aminoalcohols and diamines as immunomodulators. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, **16**: 6091–6095.
- DEL PINO, F.A.B.; BRANDELLI, A.; GONZALES, J.C.; HENRIQUES, J.A.P.; DEWES, H. 1998. Effect of antibodies against b-Nacetylhexosaminidase on reproductive efficiency of the bovine tick *Boophilus microplus*. **Veterinary Parasitology**, 274-255.
- DEMEURE, C.E.; YANG, L.P.; DESJARDINS, C.; RAYNAULD, P.; DELESPESE, G. 1997. Prostaglandin E2 primes naive T cells for the production of anti-inflammatory cytokines. **European Journal of Immunology**, **27**: 3526-31.
- DE MIRANDA SANTOS, I.K.; VALENZUELA, J.G.; RIBEIRO, J.M.; DE CASTRO, M.; COSTA, J.N.; COSTA, A.M.; DA SILVA, E.R.; NETO, O.B.; ROCHA, C.; DAFFRE, S.; FERREIRA, B.R.; DA SILVA, J.S.; SZABO, M.P.; BECHARA, G.H. 2004. Gene discovery in *Boophilus microplus*, the cattle tick: the transcriptomes of ovaries, salivary glands, and hemocytes. **Annals of the New York Academy of Sciences**, **1026**: 242-246.

- DE ROSE, R.; MCKENNA, R.V.; COBON, G.; TENNENT, J.; ZAKREWSKI, H.; GALE, K. 1999. *Boophilus microplus* 86 antigen induces a protective immune response against *Boophilus microplus* following DNA and protein vaccination in sheep. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, **71**: 151-60.
- DESHPANDE, S.S.; DAMODARAN, S. 1990. Food legumes: chemistry and technology. **Advances in Cereal Science and Technology**, **10**: 147-241.
- DICKINSON, R. G., O'HAGAN, J. E., SHOTZ, M., BINNINGTON, K. C. e HEGARTY, M. P. 1976. Prostaglandin in saliva of the cattle tick *Boophilus microplus*. **Australian Journal of Experimental Biology and Medical Sciences**, **54**: 475-486.
- DOYLE, S.L. e O'NEIL L. A. J. 2006. Toll-like receptors: from the discovery of NFkappaB to new insights into transcriptional regulations in innate immunity. **Biochemical Pharmacology**, **72**: 1102-1113.
- DUSBÁBEK, F.; BORSKÝ, I.; JELÍNEK, F.; UHLÍR, J. 1995. Immunossuppression and feeding success of *Ixodes ricinus* nymphs on BALB/c mice. **Medical and Veterinary Entomology**, **9**: 133-140.
- ELDER, J.K.; KEARNAN, J.F.; WATERS, K.S.; DUNWELL, G.H.; EMMERSON, F.R.; KNOTT, S.G. 1980. A survey concerning cattle tick control in Queensland. 4. Use of resistance cattle and pasture spelling. **Australian Veterinary Journal**, **56**: 219-31.
- ELSE, K.J. e FINKELMAN, F.D. 1998. Intestinal nematode parasites\ cytokines and efector mechanisms. **International Journal of Parasitology**, **28**: 1145-1158.
- ERVIN, R.T.; EPPLIN, F.M.; BYFORD, R.L.; HAIR, J.A. 1987. Estimation and economic implication of lone star tick (Acari, Ixodidae) infestation on weight-gain of cattle, *Bos taurus* and *Bos indicus* x *Bos taurus*. **Journal of Entomology** **80**: 443-445.
- EVANS, D.E; MARTINS J.R.; GUGLIELMONE, A.A. 2000. A review of the ticks (Acari, Ixodida) of Brazil, their hosts and geographic distribution – 1. The state of Rio Grande do Sul, Southern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **95**: p. 453-470.
- FARRAR, M.A., SCHREIBER, R.D., 1993. The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor. **Annual Review of Immunology**, **11**: 571-611.
- FARIAS, N.A. 1995. **Diagnóstico e controle da tristeza parasitária bovina**. Guaíba/RS: Agropecuária.
- FERREIRA, C. A. S., VAZ, I. D. S. Jr., DA SILVA, S. S., HAAG, K. L., VALENZUELA, J. G. e MASUDA, A. 2002. Cloning and partial characterization of a *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) calreticulin. **Experimental Parasitology**, **101**: 25-34.
- FLECHTMANN, C. H. W. 1990. **Ácaros de importância Médico Veterinária**. 2ª ed. São Paulo: Nobel.
- FOGAÇA, A.C; SILVA, P.I.Jr.; MIRANDA, M.T.; BIANCHI, A.G.; MIRANDA, A.; RIBOLLA, P.E. 1999. Antimicrobial activity of a bovine hemoglobin fragment in the tick *Boophilus microplus*. **The Journal of Biological Chemistry**, **247**: 25330-25334.

FRAGOSO, H.; RAD, P.H.; ORTIZ, M.; RODRIGUEZ, M.; REDONDO, M.; HERRERA, L.; DE LA FUENTE, J. 1998. Protection against *Boophilus annulatus* infestations in cattle vaccinated with the *B. microplus* *Boophilus microplus* 86-containing vaccina Gavac. **Vaccine**, **16**: 1990-1992.

FRANCIS, J.; LITTLE, D.A. 1964. Resistance of droughtmaster cattle to tick infestation and babesiosis. **Australian Veterinary Journal**, **40**: 247-53.

FRISCH, J.E. 1994. Identification of a major gene for resistance to cattle ticks. In: Proceedings of the 4th World congress on genetics applied to livestock production. Guelph. Ontario. 1994. 20: 293-295. Proceedings..., 1994.

FRISCH, J.E.; O'NEILL, C.J.; KELLY, M.J. 2000. Using genetics to control cattle parasites. **Internacional Journal of Parasitology**, **30**: 253-264.

FURLONG, J.; DERESZ, F.; MATOS, L.L. de; BALBI, M.V. 1996. The Effect of Cattle Tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) Infestation on Feed Intake And Milk Yield of Holstein x Zebu Crossbred Cows. In: Congresso Panamericano de Veterinária, XV, 1996, Campo Grande. p. 340.

GALVANI, A.L.S.; KREBS, V.L.J.; VAZ, F.A.C. 1999. Biochemical characteristics and properties of the humoral mediators in bacterial infections. **Pediatria (São Paulo)**, **21**: 123-132.

GANAPAMO, F.; RUTTI, B.; BROSSARD, M. 1997. Identification of an *Ixodes ricinus* salivary gland fraction through its ability to simulate CD4 cells present in BALB/c mice lymph nodes draining the the tick fixation site. **Parasitology**, **115**: 91-6.

GARCIA-GARCIA, J.C., MONTERO, C., REDONDO, M., VARGASm,M. CANALES, M., BOUE, O. 2000. Control of ticks resistant to immunization with *Boophilus microplus* 86 in cattle vaccinated with recombinant antigen *Boophilus microplus* 95 isolated from the cattle tick, *Boophilus microplus*. **Vaccine**,**18**: 2275- 2287.

GILLESPIE, R.D., DOLAN, M.C., PIESMAN, J., TITUS, R.G. 2001. Identification of an IL-2 binding protein in the saliva of the Lime disease vector tick, *Ixodes scapularis*, **Journal of Immunology**, **166**: 4319-4327.

GILLESPIE,R.D.; MBOW, M.L.; TITUS, R.G. 2000. The immunomodulatory factors of bloodfeeding arthropod saliva. **Parasite Immunology**, **22**: 319-331.

GOMES, A. 1995. **Dinâmica populacional de *Boophilus microplus* (canestrini, 1987) (Acari: ixodidae) em bovinos nelore (*bos indicus*) e cruzamentos em infestações experimentais** [tese]. Rio de Janeiro: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

GOMES, A.; HONER, M.R.; SCHENK, M.A.; CURVO, J.B.E. 1989. Populations of the cattle tick (*Boophilus microplus*) on purebred Nellore, Ibjajé and Nellore x European crossbreds in the Brazilian Savanna. **Tropical Animal Health and Production**, **21**: 20-24.

GONZALES, J.C. 1995. **O controle do carrapato do boi**. 2ª ed. Porto Alegre: Edição do Autor.

GONZALES, J.C.; SERRA-FREIRE, N.M. 1992. O couro dos bovinos no Rio Grande do Sul: riqueza há muito maltratada. **A Hora Veterinária**, **12(69)**: 14-16.

GORDON, R.J.; ALLEN, J.R. 1991. Factors V e VII anticoagulant activities in the salivary glands of feending *Damacentor andersoni* ticks. **Journal of Parasitology**, **77**: 167-170.
GOUGH, J.M.; KEMP, D.H. 1993. Localization of a low abundance membrane protein (*Boophilus microplus* 86) on the gut cells of the cattle tick *Boophilus microplus* by immunogold labeling. **Journal of Parasitology**, **79**: 900-907.

GUARAGNA, G.P.; CARVALHO, J.P.B.; FIGUEREDO, A.L.; GAMBINI, I.B.; BARBOSA, M.I.A. 1988. Efeito de fatores genéticos e ambientais na infestação natural de carrapatos (*Boophilus microplus*, Canestrini) em bovinos leiteiros. **Boletim de indústria animal**, **45(1)**: 19-32.

GUIMARÃES, J.H., TUCCI, E.C, BARROS-BATTESTI, D.M. 2001. **Ectoparasitos de importância veterinária**. 1 ed. São Paulo. FAPESP.

HAJNICKÁ, V.; KOCÁKOVÁ, P.; SLÁVIKOVÁ, M.; SLOVÁK, M.; GASPERÍK, J.; FUCHSBERGER, N. e NUTTAL, P.A. 2001. Anti-interleikin-8 activity of tick salivary gland extracts. **Parasite Immunology**, **23**: 483-489.

HARRIS, S.G., PADILLA, J., KOUMAS, L., RAY, D. e PHIPPS, R. 2002. Prostaglandins as modulators of immunity. **Trends of Immunology**, **23**: 144-150.

HEWETSON, R.W. 1972. The inheritance of resistance by cattle to cattle tick. **Australian Veterinary Journal**, **48**: 299-303.

HIBBS JR., J.B. *et al.* 1988. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, **157**: 87-94.

HITCHCOCK, L.F. 1955. Studies on the parasitic stages of the cattle tick, *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acarina: Ixodidae). **Australian Journal of Zoology**, **3**: 145-55.

HORN, F., SANTOS, P.C., TERMIGNONI, C. 2000. *Boophilus microplus* anticoagulante protein: an antithrombin inhibitor isolated from the cattle tick saliva. **Archives Biochemistry and Biophysics**, **1**: 68-73.

HORN, S.C., ARTECHE, C.C.P. 1985. Situação parasitária da pecuária no Brasil. **A Hora Veterinária**, **23**: 12-32.

HORN, S. C. 1983. Prováveis prejuízos causados pelos carrapatos. **Boletim de Defesa Sanitária Animal**, Brasília, 29 p.

HONER, M.R., GOMES, A. 1990. O manejo integrado de mosca-dos-chifres, berne e carrapato em gado de corte. **Circular Técnica EMBRAPA-CNPGC**, **22**: 1-60.

IMAMURA, S., NAMANGALA, B., TAJIMA, T., TEMBO, M.E., YASUDA, OHASHI, K., ONUMA, M., 2006. Two serine protease inhibitors (serpins) that induce a bovine protective immune response against *Rhipicephalus appendiculatus* ticks. **Vaccine**, **24**: 2230–2237.

INOKUMA, H.; KEMP, D.H; WILLADSEN, P. 1994. Prostaglandin E₂ production by the cattle tick (*Boophilus microplus*) into feeding sites and its effect on the response of bovine mononuclear cells to mitogen. **Veterinary Parasitology**, **53**, 293-299.

JACKSON, L.A.; OPDEBEECK, J. P. 1989. The effect of antigen concentration and vaccine regimen on the immunity induced by membrane antigens from the midgut of *Boophilus microplus*. **Immunology**, **68**: 272-6.

JAMES, S.L. 1995. Role of nitric oxide in parasitic infections. **Microbiology Reviews**, **59**: 533-547.

JANEWAY, C.A. TAVERS,P.; WALPORT, M. e SHOLMCHIK. 2002. **Imunologia: O Sistema Imune na saúde e na doença**, 2002, Artmed, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

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 of Parasitology**, **16**: 27-34.

JONGEJAN, F; UILENBERG G. 2004.The global importance of ticks.**Parasitology**,**129**:3-14.

JONSSON, N.N.; MAYER, D.G; GREEN, P.G. 2000. Possible risk factors on Queensland dairy farms for acaricides resistance in cattle tick (*Boophilus microplus*). **Veterinary Parasitology**, **88**: 79-92.

KANOST, M.R. 1999. Serine proteinase inhibitors in arthropod immunity. **Developmental & Comparative Immunology**, **23**: 291–301.

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

KAUFMAN, W.R. 1989. Tick-host interaction: a synthesis of current concepts. **Parasitology Today**, **5**: 47–56.

KAUFMAN, W.R. PHILLIPS, J.E. 1973. Ion and water balance in the ixodid tick *Dermacentor andersoni*. I. Routes of ion and water excretion. **Journal of Experimental Biology**, **58**: 523–536.

KEMP, D.H.; AGBEDE, R.I.S.; JOHNSTON, L.A.Y.; GOUGH, J. M. 1986. Immunization of cattle against *Boophilus microplus* using extracts derived from adult female ticks: Feeding and survival of the parasite on vaccinated cattle. **International Journal of Parasitology**, **16**: 115–120.

KEMP, D.H.; KOUDESTAAL, D.; KERR, J.D. 1971. Labelling larvae of the cattle-tick *Boophilus microplus*, with 32p to follow their movements on the host. **Parasitology**, **63**: 323–30.

KEMP, D.H.; KOUDESTAAL, D.; ROBERTS, J.A.; KERR, J.D. 1976. *Boophilus microplus*: the effect of host resistance on larval attachments and growth. **Parasitology**, **73**: 123-36.

KEMP, D.H.; STONE, B.F.; BINNINGTON, K.C. 1982. Tick attachment and feeding: Role of the mouthparts, feeding apparatus, salivary gland secretions, and the host response. In: Obechain & Galun. Physiology of ticks. Oxford: Pergamon Press Ltd; p. 119-167.

KOPECKY, J.; KUTHEJLOVÁ, M.; PECHOVÁ, J. 1999. Salivary gland extract from *Ixodes ricinus* ticks inhibits production of interferon- γ by the upregulation of interleukin-10. **Parasite Immunology**, **21**: 351-356.

KOUDESTAAL, D.; KEMP, D.H.; KERR, J.D. 1978. *Boophilus microplus*: rejection of larvae from British breed cattle. **Parasitology**, **76**: 379-386.

KÓVAR, V., KOPÁČEK, P., GRUBHOFFER, L. 2000. Isolation and characterization of Dorin M. a lectin from plasma of the soft tick *Ornithodoros moubata*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, **30**: 195-205.

LAWRIE, C.H.; NUTTALL, P.A. 2001. Antigenic profile of *Ixodes ricinus*: effect of developmental stage, feeding time and the response of different host species. **Parasite Immunology**, **23**: 549–556.

LEAL, A.T.; FREITAS, D.R.J.; Vaz Jr., I.S. 2003. Perspectivas para o controle do carrapato bovino. **Acta Scientiae Veterinariae**, **31**: 1-11.

LEE, R.P.; OPDEBEECK, J. P. 1991. Isolation of protective antigens from the gut of *Boophilus microplus* using monoclonal antibodies. **Immunology**, **72**: 121–126.

LEITE, R. C. 1988. **B. microplus (canestrini, 1887) susceptibilidade, uso atual e retrospectivo de carrapaticidas em propriedades das regiões fisiográficas da Baixada de Grande Rio e Rio de Janeiro: uma abordagem epidemiológica**. Rio de Janeiro: UFRJ, [Tese] – (Doutorado em Parasitologia Veterinária), 151 p.

LEMOS, A.M.; TEODORO, R.I.; OLIVEIRA, G.P.; MADALENA, F.E. 1985. Comparative performance of six Holstein Friesian X Guzerá grades in Brazil. 3. Burdens of *Boophilus microplus* under field conditions. **Animal Production**, **41**: 187-191.

LEMOS, A.M. 1986. **A Resistência Genética dos Bovinos e o Controle do Carrapato**. Documento EMBRAPA/CNPGL, Coronel Pacheco, v. 6, p. 42.

LIENER, I.E. 1981. The nutritional significance of the plant lectins. In: ORY, R.L. Antinutrients and natural toxicants in foods. Westport: Food & Nutrition Press, p.143-157.

LIS, H., SHARON, N. 1973. The biochemistry of plant lectins (phytohemagglutinins). **Annual Review of Biochemistry**, **42**: 541-574.

LOGULLO, C.; DA SILVA VAZ, J.R. I.; SORGINE, M.H.F.; PAIVA, G.O.; FARIA, F.S.;

ZINGALI, R. 1998. Isolation of aspartic proteinase precursor from the egg of a hard tick, *Boophilus microplus*. **Parasitology**, **116**: 525–532.

MACHADO, P.R.L.; ARAÚJO, M.I.A.S.; CARVALHO, L.; CARVALHO, E.M. 2004. Immune response mechanisms to infections. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, **79**: 647-664.

MADALENA, F. E.; TEODORO, R. L.; LEMOS, A. M.; OLIVEIRA, G. P. 1985. Causes of Variation of Field Burdens of Cattle Ticks (*B. microplus*). **Revista Brasileira Genética**, **8**: 361-375.

MARLETTA, M.A. 1993. Nitric oxide synthase structure and mechanism. **Journal of Biological Chemistry**, **268**: 12231-4,

MARLETTA, M.A *et al.* 1988. Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. **Biochemistry**, **27**: 8706-11.

MARTINEZ, M.L.; SILVA, M.V.G.B.; MACHADO, M.A.; TEODORO, R.L. 2004. A biologia molecular como aliada no combate aos carrapatos. In: SIMPÓSIO NACIONAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MELHORAMENTO ANIMAL., 5., Pirassununga, **Anais do V Simpósio Nacional da Sociedade Brasileira de Melhoramento Animal**. SBMA, 2004.

MATTIOLI, R. C. 1998. Comment on “A possible explanation of apparent breed-related resistance in cattle to bont tick (*Amblyomma hebraeum*) infestations. **Veterinary Parasitology**, **79**: 263-264.

MAYA-MONTEIRO, C. M. ; DAFFRE, S. ; LOGULLO, C. ; LARA, F. ; ALVES, E.W. ; CAPURRO, M.L. 2000. Hsp70, a heme lipoprotein from the hemolymph of the cattle tick, *Boophilus microplus*. **Journal of Biological Chemistry**, **275**: 36584-36589.

MBOW, M.L.; RUTTI, B.; BROSSARD, M. 1994. Infiltration of CD4⁺, CD8⁺ T cells, and expression of ICAM-1, Ia antigens, IL-1-alpha, and TNF-alfa in the skin lesion of BALB/c mice undergoing repeated infestations with nymphal *Ixodes ricinus* L. ticks. **Immunology**, **82**: 596–602. [a]

MBOW, M.L.; RUTTI, B.; BROSSARD, M. 1994. IFN-gama, IL-2 and IL-4 mRNA expression in the skin and draining lymph nodes of BALB/c mice repeatedly infested with nymphal *Ixodes ricinus* ticks. **Cellular Immunology**, **156**: 254–261. [b]

MCGUIRE, K.; JONES, M.; WERLING, D.; WILLIAMS, J.L.; GLASS, E.J.; JANN, O. 2005. Radiation hybrid mapping of all 10 characterized bovine Toll-like receptors. **International Society of Animal Genetics**, **37**: 47-50.

MCKENNA, R.V.; RIDING, G.A.; JARMEY, J.A.; PEARSON, R.D.; WILLADSEN, P. 1998. Vaccination of cattle against *Boophilus microplus* using a mucin-like membrane glycoprotein. **Parasite Immunology**, **20**: 325-336.

MELTZER, M.I. 1996. A possible explanation of the apparent breed-related resistance in cattle to bont tick (*Amblyomma hebraeum*) infestations. **Veterinary Parasitology**, **67**: 275-279.

MINAMI, M.; KITA, M.; YAN, X.Q.; YAMAMOTO, T.; IIDA, T.; SEKIKAWA, K.; IWAKURA, Y.; IMANISHI, J. 2002. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, **22**: 671-676.

MONCADA, S. *et al.* 1991. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacology Reviews**, **43**: 109-42.

MORAES, F.R.; COSTA, A.J.; WOELZ, C.R.; MORAES, J.R.E.; ROCHA, U.F. 1986. Ecologia de carrapatos. XV: suscetibilidade natural comparativa entre taurinos e zebuínos a *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acarina: Ixodidae). **ARS Veterinária**, **2**: 45-52.

MOSSMAN. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity. **Journal of Immunological Methods**, **65**: 55-63.

MULENGA A, SUGIMOTO C, ONUMA M. 2000. Issues in tick vaccine development: identification and characterization of potential candidate vaccine antigens. **Microbes and Infection / Institut Pasteur**, **211**:1353–1361.

NAKAJIMA, M., KODAMA, M., YANASE, H., IWANAGA, T., MULENGA, A., OHASHI, K. 2003. Production and characterization of monoclonal antibodies against midgut of ixodid tick *Haemaphysalis longicornis*. **Veterinary Parasitology**, **115**: 355–63.

NAKATA, L.G.; ZAROS, L.G.; OLIVEIRA, M.C.S.; COUTINHO, L.C.A.; REGITANO, L.C. , 2006. Quantitative analysis of bovine cytokine mRNA levels in response to tick infestation. In: 8th World Congress On Genetics Applied To Livestock Production, C1530, 2006, Belo Horizonte , **Anais...**, p.136.

NJAU, B.C.; NYINDO, M. 1987. Detection of immune response in rabbits infested with *Rhipicephalus appendiculatus* and *Rhipicephalus evertsi evertsi*. **Research in Veterinary Science**, **43**: 217-21.

NUÑES, J.L.; COBENAS, M.E.M.; MOLTEDO, H.L. 1982. **Boophilus microplus, la guarrapata comun del ganado vacuno**. 1 ed. Buenos Aires: Hemisferio Sur.

NUÑES, J.L.; PUGLIESE, M.E.; HAYES, R.P. 1972. *Boophilus microplus* Estudio sobre los estadios parasitarios del ciclo biológico. **Revista de Medicina Veterinária**, **53**: 9–34.

O'KELLY, J.C.; SPIERS, W.C. 1976. Resistance to *Boophilus microplus* (Canestrini) in genetically different types of calves in early life. **Journal of Parasitology**, **62**: 312-317.

OLIVEIRA, G.P.; ALENCAR, M.M. 1987. Resistência de bovinos ao carrapato *Boophilus microplus*. I. Infestação artificial. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, **22**: 433-8.

O' NEILL, L. A. J. 2005. Estopim imunológico. **Scientific American Brasil**, 68-75.

OPDEBEECK, J.P.; DALY, K.E. 1990. Immune responses of infested and vaccinated Hereford cattle to antigens of the cattle tick, *Boophilus microplus*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, **25**: 99–108.

- PAESEN, G.C.; ADAMS, P.L.; HARLOS, K.; NUTTALL, P.A.; STUART, D.I. 1999. Tick histamine-binding proteins: isolation, cloning and three-dimensional structure. **Molecular Cell**, **3**: 661–71.
- PAINE, S. H., KEMP, D. H. e ALLEN, J. R. 1983. *In vitro* feeding of *Dermacentor andersoni* (Stiles): effects of histamine and others mediators. **Parasitology**, **86**: 419-428.
- PAPATHEODOROS, V.; BROSSARD, M. 1987. C3 levels in the sera of rabbits infested and reinfested with *Ixodides ricinus* L., and in midguts of fed ticks. **Experimental and Applied Acarology**, **3**: 53–59.
- PARMAR, A., GREWAL, A.S.; DHILLON, P. 1996. Immunological cross-reactivity between salivary gland proteins of *Hyalomma anatolicum anatolicum* and *Boophilus microplus* ticks. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, **51**: 345-352.
- PATARROYO, J. H.; PORTELA, R. W.; 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**, **25**: 163-167.
- PEREIRA, M.C. 1982. *Boophilus microplus*: revisão taxonômica e morfológica. **Rio de Janeiro: Químio Divisão Veterinária**.
- PRESTON, P.M.; JOGEJAN, F. 1999, Protective immune mechanism. to tick-borne diseases of ruminants. **Parasitology Today**, **15**: 255-258.
- PRUETT. J.H. 1999. Immunological control of arthropod ectoparasites: a review. **International Journal of Parasitology**, **29**: 25-32.
- QIAN, Y.; YUAN, J.; ESSENBERG, R.C.; BOWMAN, A.S.; SHOOK, A.L.; DILLWITH, J.W.; SAUER, J.R. 1998. Prostaglandin E2 in the salivary glands of the female tick, *Amblyomma americanum* (L.): calcium mobilization and exocytosis. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, **28**: 221-8.
- RADOSTIS, O.M.; GAY, C.C.; BLOOD, D.C. 2000. **Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, sheeps, pigs, goats and horses**; 9^a ed. Londres: Saunders, 1877p.
- RAMACHANDRA, R. N., WIKEL, S. K. 1992. Modulation of host immune responses by ticks (Acari: Ixodidae): effect of salivary gland extracts on hosts macrophages and lymphocyte cytokine production. **Journal of Medical Entomology**, **29**: 818-826.
- RAMACHANDRA, R. N., WIKEL, S. K. 1995. Effects of *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) salivary gland extracts on *Bos indicus* and *Bos taurus* lymphocytes and macrophages: in vitro cytokine elaboration and lymphocyte blastogenesis. **Journal of Medical Entomology**, **32**: 338-345.
- RAND, K.N.; MOORE, T.; SRISKANTHA, A.; SPRING, K.; TELLAM, R.; WILLADSEN, P.I. 1989. Cloning and expression of a protective antigen from the cattle tick *Boophilus*

microplus. **Proceedings of The National Academy of Sciences of the United States of America**, **86**: 9657–61.

RENDEL, J. 1971. Breeding for Milk Products in the Tropics, In: International Dairy Congress. 1971. **Anais...**, Proceed., v. 2, 452 p.

RIBEIRO, J. M. 1987. Ixodes dammini: salivary anti-complement activity. **Experimental Parasitology**, **64**: 347-53.

RIBEIRO, J. M. 1988. The midgut hemolysin of Ixodes dammini (Acari: Ixodidae). **Journal of Parasitology**, **74**: 532-7.

RIBEIRO, J.M. 1989, Role of saliva in tick/host interactions. **Experimental and Applied Acarology**, **7**: 15–20.

RIBEIRO, J. M. 1995. Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists? **Infectious Agents and Disease**, **4**: 143-152.

RIBEIRO, J.M.; MATHER, T. N. 1998. *Ixodides scapularis*: salivary kininase activity is a metallo-dipeptidyl carboxipeptidase. **Experimental Parasitology**, **89**: 213–21.

RIDING, G.A.; JARMEY, J.; MCKENNA, 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.

RIEK, R. F. 1962. Studies on the reactions of animals to infestation with the tick *Boophilus microplus* (Canestrini). **Australian Journal of Agriculture Research**, **13**: 532-552.

ROBERTS, J.A. 1968. Resistance of cattle to the cattle tick *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). Development of ticks on *Bos Taurus*. **Journal of Parasitology**, **54**: 663-666.

ROCHA, C.M.B.M. 1996. **Importância do Carrapato *Boophilus microplus*, Canestrini, 1887 (Acarina, Ixodidae) no Processo Produtivo do Leite**. Lavras: UFLA, 1996. (Revisão: Boletim Técnico 35). [a]

ROCHA, C.M.B.M. 1996. **Caracterização da percepção dos produtores de leite do município de Divinópolis/MG sobre a importância do carrapato *Boophilus microplus* e fatores determinantes das formas de combate utilizadas**. Belo Horizonte. UFMG - Escola de Veterinária, 1996. 205p. (Dissertação– Mestrado em Epidemiologia Veterinária). [b]

ROCHA, C.M.B.M. **O carrapato dos bovinos**. Lavras: UFLA, 1997. 27p. (Boletim Técnico. Série Extensão, v.6, n.6).

ROCHA, U.F. 1976. Panorama da parasitologia na África e na Austrália. **São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da USP**.

ROCHA, U.F. 1984. Biologia e controle biológico do carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini). **Boletim Técnico UNESP**.

RODRIGUEZ, M.; MASSARD, C.; DA FONSECA, A.; FONSECA, R.N.; MACHADO, H.; LABARTA, V. 1995. Effect of vaccination with recombinant *Boophilus microplus* 86 antigen preparation on natural infestations of *Boophilus microplus* in grazing dairy and beef pure and cross-bred cattle in Brazil. **Vaccine**, **13**:1804-08. [a]

RODRIGUEZ, M.; PENICHET, M.; MOURIS, A.E.; LABARTA, V.; LORENZO, L. L.; RUBIERA, R. 1995. Control of *Boophilus microplus* populations in grazing cattle vaccinated with a recombinant *Boophilus microplus* 86 antigen preparation. **Veterinary Parasitology**, **57**: 339-49. [b]

RODRIGUEZ, M.; RUBIERA, R.; PENICHET, M.; MONTESINOS, R.; CREMATA, J.; FALCON, V. 1994. High level expression of the *B. microplus* *Boophilus microplus* 86 antigen in the yeast *Pichia pastoris* forming highly immunogenic particles for cattle. **Journal Biotechnology**, **33**: 135-46.

RUIZ, L.M.; ORDUZ, S.; LÓPEZ, E.D.; GUZMÁN, F.; PATARROYO, M.E.; ARMENGOL, G. 2007. Immune response in mice and cattle after immunization with a *Boophilus microplus* DNA vaccine containing bm86 gene. **Veterinary Parasitology**, **144**:138-145.

SANDERS, M.L., JAWORSKI, D.C., SANCHEZ, J.L., DEFRAITES, 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 de *Amblyomma americanum* as a biomarker of tick exposure in humans. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **59**:31-40.

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

SCHELEGER, A.V.; LINCOLN, D.R.; BOURNE, A.S. 1981.Arteriovenous anastomosis in the dermal vasculature of the skin of the *Bos Taurus* cattle and their relationship with resistance to tick *Boophilus microplus*. **Australian Journal of Biological Sciences**, **34**: 27-35.

SCHELEGER, A.V.; LINCOLN, D.R.; MCKENNA, R.V.; KEMP, D.H.; ROBERTS, J.A. 1976. *Boophilus microplus* cellular responses to larval attachment and their relationship to host resistance. **Australian Journal of Biological Sciences**, **29**: 499-512.

SCHOELER, G.B.; WIKEL, S.K. 2001. Modulation of hosts immunity by haematophagous arthropods. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, **95**: 755-771.

SEIFERT, G.B. 1970. Ecto and endoparasitic effects on the growth rates of Zebu crossbred and British cattle in the field. **Australian Journal of Agricultural Research**, **22**: 839-850.

SHAPIRO, S.Z.; BUSCHER, G.; DOBBELAERE, D.A.E. 1987. Acquired resistance to *Rhipicephalus appendiculatus* (Acarina: Ixodidae): identification of an antigen eliciting resistance in rabbits. **Journal of Medical Entomology**, **24**: 147-54.

SOARES, C.O. 2001. Imunidade contra artrópodes parasitos. Imunodiagnóstico em medicina veterinária, p. 111-141.

SONENSHIME, D.E. 1993. **Biology of ticks**. Vol 2. Oxford University Press, New York.

STEWART, N.P.; DE VOS, A.J. 1984. Ticks and the diseases they carry. **Queensland Agriculture Journal**, **110**: 295–299.

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.; KERR, J.D.; MAYWALD, G.F.; STEGEMAN, D.A. 1983. The effect of Season and Nutrition on the Resistance of Cattle to the tick *Boophilus microplus*. **Journal of Agricultural Research**, **34**: 329-39.

TANAKA, S.; ASO, H.; MIYAZAWA, K.; NAGAI, Y.; WATANABE, K.; OHWADA, S.; KOBAYASHI, J.; YAMAGUCHI, T. 2007. Differential cytokine gene expression in CD4+ and CD8+ T cell subsets of calves. **Veterinary Immunology and Immunopathology** **118**:84–91.

TATCHELL, R.J., 1967. A modified method for obtaining tick oral secretion. **Journal of Parasitology**, **53**: 106–107.

TATCHELL, R.J. 1987. Interaction between ticks and their hosts. **International Journal of Parasitology**, **17**: 597- 605.

TATCHELL, R.J.; BENNETT, G. F. 1969. *Boophilus microplus*: antihistaminic and tranquillizing drugs and cattle resistance. **Experimental Parasitology**, **26**: 369–77.

TATCHELL, R.J.; MOORHOUSE, D.E. 1970. Neutrophils: Their role in the formation of a tick feeding lesion. **Science**, **169**: 1002-3.

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**, **130**: 141-156.

THIESEN, W. L. 1979. Biologia do Carrapato *Boophilus microplus*. In: Seminario Nacional sobre Parasitose dos Bovinos, I. Campo grande, 1979 , p. 207-215.

THOMPSON, K.C.; ROA, J.E.; ROMERO, T.N. 1978. Anti-tick grasses as the basis for developing practical tropical tick control packages. **Tropical Animal Health and Production**, **10**: 179-82.

TEODORO, R. L.; LEMOS, A. M.; MOREIRA, D. P.; MADALENA, F. E. 1984. Resistência Genética dos Bovinos ao Carrapato (*Boophilus microplus*). VII. Resistência de Touros Mestiços sob Infestação Artificial. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 21, Belo Horizonte, MG, **Anais...** Belo Horizonte, p. 54.

TEODORO, R.L., MARTINEZ, M.L, SILVA, M.V.G.B., MACHADO, M.A, VERNEQUE, R.S. 2004. Resistência bovina ao carrapato *Boophilus microplus*: Experiência brasileira. In: Simpósio Nacional da sociedade Brasileira de Melhoramento Animal, 5, Pirassununga, **Anais do V Simpósio Nacional da Sociedade Brasileira de Melhoramento Animal**. Campo Grande: SBMA, 2004.

TIKKI, N.; RHALEM, A.; SADAK, A.; SAHIBI, H. 1999. Female tick *Hyalomma marginatum marginatum* salivary glands: preliminary study on protein changes during feeding process and antigens recognized by repeatedly infested cattle. **Parasite**, **6**: 303-309.

TODA, A.; PICCIRILLO, C.A. 2006. Development and function of naturally occurring CD4+CD25+regulatory T cells. **Journal of Leukocyte Biology**, **80**: 458-470.

TORO-ORTIZ, R.D.; DA SILVA VAZ, J.R.I.; GONZALES, J.C.; MASUDA, A. 1997. Monoclonal antibodies against *Boophilus microplus* and their effects on tick reproductive efficiency. **Veterinary Parasitology**, **69**: 297-306.

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

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

TURNI, C.; LEE, R.P.; JACKSON, L.A. 2004. A comparison of the immunosuppressive effects of salivary gland extracts from two laboratory strains of *Boophilus microplus*. **International Journal of Parasitology**, **34**: 833-838.

TURNI, C.; LEE, R.P.; JACKSON, L.A. 2002. Effect of salivary gland extracts from the tick, *Boophilus microplus*, on leucocytes from Brahman and Hereford cattle. **Parasite Immunology**, **24**: 355-361.

TURNI, C.; LEE, R.P.; JACKSON, L.A. 2007. The Effects of Salivary Gland Extracts from *Boophilus microplus* Ticks on Mitogen-stimulated Bovine Lymphocytes. **Veterinary Research Communications**, **31**: 545-552.

UTECH, K. B. W.; SEIFERT, G. W.; WHARTON, R. H. 1978. Breeding Australian Illawarra Shorthorn Cattle for Resistance to *Boophilus microplus*. I. Factors Affecting Resistance. **Australian Journal of Agricultural Research**, **29**: 411-422.

UTECH, K. B. W.; WHARTON, R. H. 1982. Breeding for resistance to *Boophilus microplus* in Australian Illawarra Shorthorn and Brahman x Australian Illawarra Shorthorn Cattle. **Australian Veterinary Journal**, **58**: 41-46.

VERÍSSIMO, C.J. 1996. Fatores a serem considerados em um programa de controle estratégico (Experiência de São Paulo). 1º Simpósio sobre controles de carrapatos, 1-16.

VERÍSSIMO, C.J.; NICOLAU, C.V.J.; CARDOSO, V.L.; PINHEIRO, M.G. 2002. Características de la capa e infestacion de garrapatas em bovinos Gyr (Cébu) e mestizos (Holstein X Gyr). **Archivos de Zootecnia**, **51**: 389-392. (b)

VERÍSSIMO, C.J.; MUKAI, L.S.; BECHARA, G.H.; SKABÓ, M.P.J.; ARCARO, J.R.P.; OTZUK, I.P. 2002. Infestação por carrapato *Boophilus microplus* (ACARI: IXODIDAE) em vacas da raça Gir, Holandesa e Mestiça sob pastejo. In: Reunião Anual do Instituto Biológico, São Paulo, 69: 87-89, 2002, **Anais...**, São Paulo. (c)

- VERÍSSIMO, C.J.; OTZUK, I.P.; DEODATO, A.P.; LARA, M.A.C.; BECHARA, G.H. 2002. Número de mastócitos dérmicos na pele de bovinos europeus zebuínos e mestiços e infestação pelo carrapato *Boophilus microplus*. XII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária. Rio de Janeiro, 2002. Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, **Anais...**, Rio de Janeiro, 2002. CD ROOM. (a)
- VILLARES, J. B. 1941. Climatologia Zootécnica. III. Contribuição ao Estudo da Resistência e Susceptibilidade Genética dos Bovinos ao *Boophilus microplus*. **Boletim Industry Animal**, **4**: 60-86.
- WAGLAND, B. M. 1975. Host resistance to cattle tick (*Boophilus microplus*) in Brahman (*Bos Indicus*) cattle. I Responses of previously unexposed cattle to four infestations with 20.000 larvae. **Australian Journal of Agricultural Research**, **26**: 1073–80.
- WAGLAND, B.M. 1978. Host resistance to cattle tick (*Boophilus microplus*) in Brahman (*Bos indicus*) cattle. III. Growth on previously unexposed animal. **Australian Journal of Agricultural Research**, **29**: 401–9.
- WANG, H.; HENBEST, P. J.; NUTTAL, P.A. 1999. Successful interrupted feeding of adult *Rhipicephalus appendiculatus* (Ixodidae) is accompanied by re-programming of salivary gland protein expression. **Parasitology**, **119**: 143-149. [b]
- WANG, H.; NUTTAL, P.A. 1994. Excretion of host immunoglobulin in tick saliva and detection of IgG-binding proteins in tick haemolymph and salivary glands **Parasitology**, **109**: 525-530.
- WANG, H.; NUTTAL, P.A. 1995. Immunoglobulin-G binding proteins in the ixodid ticks, *R. appendiculatus*, *Amblyoma variegatum* and *Ixodes hexagonus*. **Parasitology**, **111**: 161-165.
- WANG, H.; KAUFMAN, W.R.; NUTTALL, P.A. 1999. Molecular individuality: polymorphism of salivary gland proteins in three species of ixodid tick Successful interrupted feeding of adult *Rhipicephalus appendiculatus* (Ixodidae) is accompanied by re-programming of salivary gland protein expression. **Experimental and Applied Acarology**, **29**: 33-42. [a]
- WARD, P.A.; DVORAK, H.F.; COHEN, S.; YOSHIDA, T.; DATA, R.; SELVAGGIO, S.S. 1975. Chemotaxis of basophils by lymphocyte dependent and lymphocyte independent mechanisms. **Journal of Immunology**, **114**: 1523–1527.
- WIKEL, S.K. 1981. The induction of host resistance to tick infestation with a salivary gland antigen. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **30**: 284–288.
- WIKEL, S. K. 1982. Histamine content of tick attachment sites and the effects of H1 and H2 histamine antagonists on the expression of resistance. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, **76**: 179-185.
- WIKEL, S,K. 1985. Resistance to ixodid tick infestation induced by administration of tick-tissue culture cells. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, **79**: 513–518.
- WIKEL, S.K. 1996. Host immunity to ticks. **Annual Review of Entomology**, **41**:1-22.

- WIKEL, S.K. 1997. Tick host immunology: significance advances and challenging opportunities. **Parasitology Today**, **13**: 383-389.
- WIKEL, S.K.; ALARCON-CHAIDEZ, J.F. 2001. Progress toward molecular characterization of ectoparasite modulation of host immunity. **Veterinary Parasitology**, **101**: 275-287.
- WIKEL, S.K.; ALLEN, J.R. 1977. Acquired resistance to ticks: III. Cobra venom factor and the resistance response. **Immunology**, **32**: 457-65.
- WIKEL, S.K.; BERGMAN, D. 1997. Tick-host immunology: Significant advances and challenging opportunities. **Parasitology Today**, **13**: 383-389.
- WIKEL, S.K.; RAMACHANDRA, R.N.; BERGMAN, K.D. 1994. Tici-induced modulation of the host immune response. **Immunology**, **24**: 59-66.
- WILLADSEN, P. 1978. Immunity to ticks. **Advances in Parasitology**, **18**: 293-313.
- WILLADSEN, P. 1987. Immunological approaches to the control of ticks. **Internacional Journal of Parasitology**, **17**: 671-77.
- WILLADSEN, P. 1997. Novel vaccines for ectoparasites. **Veterinary Parasitology**, **71**:209-222.
- WILLADSEN, P.; BIRD, P.E.; COBON, G.S.; HUNGERFORD, J. 1995. Commercialization of a recombinant vaccine against *Boophilus microplus*. **Parasitology**, **110**: 43-50.
- WILLADSEN, P.; COBON, G.; MCKENNA, R.V. 1996. Comparative vaccination of cattle against *Boophilus microplus* with recombinant antigen *Boophilus microplus* 86 or in combination with recombinant BM91. **Parasite Immunology**, **18**: 241-6.
- WILLADSEN, P.; JONGEJAN, F. 1999. Immunology of the Tick-Host Interaction and the Control of Ticks and Tick-borne Diseases. **Parasitology Today**, **15**: 258-62.
- WILLADSEN, P.; KEMP, D. H. 1988. Vaccination with "concealed" antigen for tick control. **Parasitology Today**, **4**: 196-198.
- WILLADSEN, P.; MCKENNA, R.V. 1983. Binding of antigens to tissues: the example of *Boophilus microplus* and bovine skin. **International Journal of Parasitology**, **13**: 593-598.
- WILLADSEN, P.; RIDING, G.A. 1980. On the biological role of a proteolytic-enzyme inhibitor from the ectoparasitic tick *Boophilus microplus*. **Biochemical Journal**, **143**: 1346-51.
- WILLADSEN, P.; RIDING, G.A.; MCKENNA, R.V.; KEMP, D.H.; TELLAM, R.L.; NIELSEN, J.N. 1989. Immunologic control of a parasitic arthropod. Identification of a protective antigen from *Boophilus microplus*. **Journal of Immunology**, **143**: 1346-51.
- WONG, J.Y.M.; OPDEBEECK, J.P. 1989. Protective efficacy of antigens solubilized from gut membranes of the cattle tick, *Boophilus microplus*. **Immunology**, **66**: 149-155.

YAO, Q.; QIAN, P.; CAO, Y.; HE, Y.; SI, Y.; XU, Z.; CHEN, H. 2007. Synergistic inhibition of pseudorabies virus replication by porcine alpha/beta interferon and gamma interferon in vitro. **European Cytokine Network**, **18**: 71-77.

ZEIDNER, N.; MBOWN, M.L.; DOLAN, M., MASSUNG, R., BACA, E. e PIESMAN, J. 1997. Effects of *Ixodes scapularis* and *Borrelia burgdorferi* on the modulation of the host immune response: induction of a Th2 cytokine response in Lyme disease susceptible (C3H/HeJ) but not in disease-resistant (BALB/c) mice. **Infection and Immunity**, **65**: 3100-3106.