

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**O PAPEL DAS IMUNIDADES NA RELAÇÃO
PARASITO/HOSPEDEIRO: O CARRAPATO *Rhipicephalus*
(Boophilus) microplus E BOVINOS RESISTENTES OU
SUSCEPTÍVEIS**

Wanessa Araújo Carvalho
Médica Veterinária

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Julho de 2006

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**O PAPEL DAS IMUNIDADES NA RELAÇÃO
PARASITO/HOSPEDEIRO: O CARRAPATO *RHIPICEPHALUS*
(*BOOPHILUS*) *MICROPLUS* E BOVINOS RESISTENTES OU
SUSCEPTÍVEIS**

Wanessa Araújo Carvalho

Orientador: Dr. Gervásio Henrique Bechara

Dissertação apresentada ao Departamento de Patologia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Medicina Veterinária, área de concentração em Patologia Animal.

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Julho de 2006

FICHA CATALOGRÁFICA

C331c Carvalho, Wanessa Araújo
O papel das imunidades nas relações parasito-hospedeiro: o carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e bovinos resistentes ou susceptíveis. -- Jaboticabal, 2006
xii, 113 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2006
Orientador: Gervásio Henrique Bechara
Banca examinadora: Hélio José Montassier, Oswaldo Augusto
Brasil Esteves Sant'ana
Bibliografia

1. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. 2. Bovinos. 3. Imunidade.
I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:576.8:636.2



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL



TÍTULO: O PAPEL DAS IMUNIDADES NA RELAÇÃO PARASITO/HOSPEDEIRO: O CARRAPATO *RHIPICEPHALUS (BOOPHILUS) MICROPLUS* (CANESTRINI, 1887) (ACARI: IXODIDAE) E BOVINOS RESISTENTES E SUSCEPTÍVEIS

AUTORA: WANESSA ARAÚJO CARVALHO

ORIENTADOR: GERVÁSIO HENRIQUE BECHARA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE em
MEDICINA VETERINÁRIA (PATOLOGIA ANIMAL) pela Comissão Examinadora:

Dr. Gervásio Henrique Bechara

Dr. Hélio José Montassier

Dr. Oswaldo Augusto Brasil Esteves Sant'ana

Dra. Rosângela Zacarias Machado

Dra. Isabel K. F. de Miranda Santos

Data da realização: 21 de junho de 2006

Presidente da Comissão Examinadora

Dr. GERVÁSIO HENRIQUE BECHARA

WANESSA ARAÚJO CARVALHO – nascida em 27 de maio de 1979, em Brasília-DF, é Médica Veterinária graduada pela Universidade de Brasília (UnB) em junho de 2003. Realizou estágio no Laboratório de Bioquímica (purificação de proteínas e cristalização) sob orientação do Dr. Wagner Fontes. Em seguida fez estágio na Embrapa-Cenargen, em Brasília-DF, no Laboratório de Imunogenética, sob orientação da Dra. Isabel K.F. de Miranda Santos por quatro anos. O último estágio de iniciação científica, por outros seis meses, foi feito no projeto Genoma Bovino Brasileiro, sob a orientação do Dr. Alexandre R. Caetano. Iniciou em 01/03/2004 o mestrado no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, campus de Jaboticabal, sob orientação do Dr. Gervásio Henrique Bechara, com bolsa FAPESP. Atualmente possui uma publicação no *Experimental Parasitology* (v.110, p.12-21, 2005) e diversos resumos apresentados em congressos nacionais (n=4) e internacionais (n=4).

**Trabalho realizado no Laboratório de Imunoparasitologia
da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto,
Universidade de São Paulo (FMRP/USP)**

Dedico essa tese a minha família e amigos que sempre estiveram do meu lado, me aconselhando e apoiando, sempre que necessário, bem como ao Dr. João Santana da Silva e Isabel K. de Miranda Santos pelo espaço concedido e apoio durante a realização desse trabalho no Laboratório de Imunoparasitologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMRP/USP).

AGRADECIMENTOS

A Dra. Isabel K. F. de Miranda Santos, Pesquisadora da Embrapa e Pesquisadora Visitante da FMRP/USP, pela co-orientação para desenvolvimento desse projeto.

Ao Laboratório de Imunoparasitologia da FMRP/USP e, principalmente ao Dr. João Santana da Silva, Professor Titular de Imunologia da FMRP/USP e à Dra. Beatriz Ferreira Rosseti, professora da Faculdade de Enfermagem da Universidade de São Paulo, pela colaboração direta e envolvimento com o projeto.

Ao Dr. Fernando Q. Cunha, Professor Titular de Farmacologia da FMRP/USP pela colaboração em relação à dosagem de óxido nítrico.

À Dra. Rosângela Zacarias, Professora Titular de Parasitologia Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, da Universidade Estadual Paulista - FCAV-UNESP, campus de Jaboticabal, pela colaboração na sorologia dos animais para babesiose e anaplasmoses.

Ao Dr. Eduardo Branchi, Professor Titular de Bioquímica da FMRP/USP, pela colaboração intelectual acerca do isolamento e purificação de moléculas.

A todos do laboratório de Imunoparasitologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo (FMRP/USP) pelo incentivo e colaboração com o projeto.

Ao Dr. Gervásio Henrique Bechara, Professor Titular de Patologia Animal da FCAV-UNESP/Jaboticabal, meu orientador, pela disposição e auxílio.

Ao Departamento de Imunologia e Bioquímica da FMRP/USP e ao Departamento de Patologia Veterinária da FCAV-UNESP/ Jaboticabal.

À FAPESP e CNPq pela bolsa concedida e à Vallé pelo apoio financeiro.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Dra. Isabel K.F. de Miranda Santos por ajudar-me a despertar um grande interesse e paixão pela ciência desde a minha iniciação científica através de ensinamentos, apoio e cuidados sempre que necessário.

Às minhas amigas e companheiras Alessandra, Daniela e Elen, que se tornaram uma segunda família longe de casa, ajudando-me a superar as dificuldades tanto no trabalho quanto na minha vida particular.

Aos meus amigos do Laboratório de Imunoparasitologia da FMRP/USP e equipe do projeto Artovac, principalmente o Antônio, Lucinda, Sandra e Gustavo, pelos momentos de descontração, convivência, “surto coletivo” de risadas e apoio durante o desenvolvimento desse projeto.

À minha família, que apesar da distância e saudade, ajudou-me a superar momentos difíceis apoiando e incentivando minhas decisões, especialmente minha mãe, pelo carinho, respeito e confiança em mim depositados.

SUMÁRIO

1. Introdução	1
1.1. O carrapato <i>Rhipicephalus boophilus microplus</i>	1
1.1.1. Origem filogenética do carrapato <i>R. (B.) microplus</i>	1
1.1.2. Ciclo de vida do <i>R. (B.) microplus</i>	1
1.1.3. Influência dos fatores sazonais no ciclo do <i>R. (B.) microplus</i>	3
1.2. Hospedeiro	4
1.2.1. Diferença de resistência entre espécies	4
1.2.2. Diferenças de graus de infestação nas diferentes regiões do corpo de bovinos	4
1.2.3. Influência da raça bovina na resistência ao <i>R. (B.) microplus</i>	5
1.2.4. Bases fisiológicas e moleculares na relação hospedeiro-ectoparasita na interface de contato	7
1.3. Imunobiologia dos carrapatos	9
1.4. Resposta imune contra carrapato	12
1.5. Proteínas de fase aguda: seu papel no controle da resposta imune em bovinos	14
1.6. Proteínas ligantes de imunoglobulina (PLIGS)	18
1.7. Bases para desenvolvimento de uma vacina anti-carrapato <i>R. (B.) microplus</i>	19
2. Objetivos	23
3. Material e Métodos	24
3.1. Resposta humoral anti-saliva, anti-ovo e anti-larva de <i>R. (B.) microplus</i>	24
3.1.1. Infestações de bovinos com <i>R.(B.) microplus</i> para obtenção de soro	24
3.1.2. Obtenção de soros	24
3.1.3. Obtenção de saliva, extratos de ovo e larva de <i>R. (B.) microplus</i>	25
3.1.4. Dados parasitológicos	26
3.1.5. ELISA para quantificar IgG1 e IgG2 totais	27

3.1.6. ELISA para mensurar anticorpos totais e isotipos de anticorpos IgG1 e IgG2 anti-extrato de ovos, anti-extrato de larvas não alimentadas e anti-saliva.....	28
3.1.7. ELISA para mensurar anticorpos IgE anti extrato de ovo, anti-extrato de larva não alimentada e anti-saliva	28
3.1.8. Imunodifusão para alotipar as imunoglobulinas IgG2 produzidas pelos animais resistentes e susceptíveis ao carrapato <i>R.(B.) microplus</i>	29
3.2. Caracterização da resposta inflamatória bovina frente à infestação natural pelo carrapato <i>R. (B.) microplus</i>	30
3.2.1. Dosagem de oxido nítrico	30
3.2.2. Dosagem de Haptoglobulina sérica bovina (Hp)	30
3.2.3 Dosagem de amilóide –A sérica (SAA)	31
3.2.4. Dosagem de glicoproteína ácida alpha-1 bovina (α -1 AGP)	31
3.2.5. Dosagem de transferrina sérica bovina	31
4. Análise estatística	33
5. Resultados	34
5.1. Os níveis de anticorpos totais anti-extrato de ovo, anti-extrato de larva e anti-saliva de carrapato <i>R. (B.) microplus</i> sofrem variações de acordo com os níveis de infestação pelo carrapato	34
5.2. Os níveis de infestação afetam a produção de subclasses de anticorpos em animais resistentes e susceptíveis ao carrapato <i>R. (B.) microplus</i>	38
5.2.1 . Imunoglobulinas e anticorpos da subclasse IgG1	38
5.2.2. Imunoglobulinas e anticorpos da subclasse IgG2	43
5.2.3. Produção de imunoglobulinas e anticorpos no soro extraído do local de fixação do carrapato	49
5.3. A frequência de alótipos de IgG2 dos animais usados nos experimentos varia de acordo com o fenótipo de infestação	52
5.4. Os níveis de anticorpos IgE anti-extrato de ovo, larva e saliva são maiores em animais susceptíveis	54

5.5 Há uma diferença nos níveis de Proteínas de Fase Aguda (APP) produzidos pelos animais resistentes e susceptíveis	58
5.5.1 Amilóide A Sérica (SAA)	58
5.5.2. Haptoglobulina (Hp)	59
5.5.3. Glicoproteína ácida alpha-1 (α -1AGP)	60
5.5.4. Transferrina sérica	61
5.6. Os níveis de óxido nítrico produzidos no soro periférico de animais resistentes e susceptíveis variam de acordo com os níveis de infestação	62
6. Discussão.....	64
7. Conclusões	71
Anexo 1	72
Anexo 2	75
8. Referências	76

ABREVIATURAS

α -1AGP: Glicoproteína Ácida α -1

APP_(s): Proteína de Fase Aguda

DTT: Diethiltretol

EDTA: Acido Etilenodiamino-tetra-acético

EL: Extrato de larva não alimentada de *R. B. microplus*

EO : Extrato de ovo do carrapato *R. B. microplus*

Hp: Haptoglobulina

Ig: Imunoglobulina

PLIG: Proteína Ligante de Imunoglobulina

PBS-T: Tampão Fosfato Tamponado com 0,05% Tween 20

SAA: Amilóide Sérica

TA: Temperatura Ambiente

RESUMO

No hospedeiro bovino o nível de resistência ao carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* varia de acordo com a raça sendo os fenótipos contrastantes herdáveis. O presente trabalho explora esses fenótipos a fim de estabelecer os perfis das respostas imunes, humoral e inflamatória, correlacionados com resistência em raça zebuína (Nelore) e susceptibilidade em raça taurina (HPB). Os animais foram expostos a infestação natural pelo *R.(B.) microplus* e amostras de soros foram coletadas em pontos estratégicos da cinética das infestações. Os níveis de imunoglobulinas totais (IgG1 e IgG2), bem como os de anticorpos IgG1, IgG2 e IgE anti-extrato de ovo, anti-extrato de larva não alimentada e anti-saliva foram determinados. Elementos da resposta inflamatória, como as principais proteínas de fase aguda e óxido nítrico, também foram dosados. Os resultados obtidos mostram que as infestações muito intensas, em hospedeiros suscetíveis, são capazes de modular os níveis séricos de IgG1 e IgG2 total, diminuindo-os significativamente em relação aos níveis observados durante infestações menores. Também modulam negativamente a produção de todos os anticorpos específicos IgG1 e IgG2 avaliados a nível sistêmico. Bovinos suscetíveis ao carrapato produzem níveis mais altos de anticorpos IgE para todos os antígenos. O fenótipo suscetível de infestação se diferencia pela maior frequência do alótipo de IgG γ 2^a, herdado por herança Mendeliana co-dominante. Animais suscetíveis, quando infestados, produzem níveis mais altos da proteína de fase aguda α 1- glicoproteína ácida, de padrão anti-inflamatório, enquanto que animais resistentes produziram relativamente mais proteínas de fase aguda pró-inflamatórias, haptoglobina e amilóide sérica A. Em ambas as raças não houve diferença nos níveis de transferrina e óxido nítrico sistêmico, porém a produção de ambos é influenciada pelos níveis de infestação. O fenótipo suscetível se diferencia, então, pela modulação na produção de anticorpos, que é mais intensa, pela alta produção de IgE, pela maior frequência do alótipo IgG γ 2^a e pelos níveis mais elevados de proteínas de fase aguda de padrão anti-inflamatório.

Palavras-chave: *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*; resposta imune humoral; proteínas de fase aguda; óxido nítrico.

ABSTRACT

In bovine hosts resistance to the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, varies according to the breed, being the phenotypes of infestations inherited. The present work exploits these contrasting phenotypes in order to determine the profile of the humoral, inflammatory and acute phase responses that are correlated with resistance seen in a zebuine breed (Nelore) and susceptibility seen in a taurine breed (Holstein). Bovines were exposed to natural infestations with *R.(B.) microplus* and they presented, as expected, different levels of infestation that also varied in intensity according to the season of the year. Samples of sera were collected at strategic points during the kinetics of different cycles of infestations. The levels of total serum IgG1 and IgG2 immunoglobulins, as well as those of IgG1, IgG2 and IgE anti-egg extracts, anti-unfed larvae extracts and anti-saliva antibodies were measured. Components of the inflammatory response, nitric oxide, as well as acute phase proteins, were also measured. The results show that very intense infestations in tick-susceptible bovines modulate the serum levels of IgG1 and IgG2, which are significantly diminished relative to those observed during less intense infestations. Intense infestations also modulate the production of all specific IgG1 and IgG2 antibodies. Susceptible animals produced more specific IgE, suggesting that this isotype does not participate in resistance against ticks. The susceptible cattle also have a higher frequency of IgG γ 2^a, which are encoded by Mendelian co-dominant alleles. When infested susceptible animals produced higher levels of the anti-inflammatory acute phase protein, α 1-acid glycoprotein, whereas resistant animals produced relatively higher levels of the pro-inflammatory proteins, haptoglobin and serum amyloide A. In both breeds production of transferrin and nitric oxide vary according the levels of infestation, but no correlation between its production and the infestation phenotype was seen. The susceptible phenotype of infestation is characterized by a down-modulation in the levels of immunoglobulins and specific antibodies after intense infestations, by higher levels of IgE antibodies, by a predominant frequency of IgG γ 2^a allotype and by higher levels of anti-inflammatory acute phase proteins.

Key words: *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*; humoral immune response, acute phase proteins, nitric oxide

1. INTRODUÇÃO

1.1. O CARRAPATO *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

1.1.1. *Origem filogenética do carrapato R. (B.) microplus*

Postula-se que os carrapatos desenvolveram-se como parasitas obrigatórios de répteis no final do período paleolítico ou início do mesolítico, em climas quentes e úmidos. Supõe-se que quando os répteis se ramificaram em numerosas formas de vida, preenchendo nichos aquáticos e terrestres, seus carrapatos mais primitivos evoluíram em duas principais famílias, Argasidae e Ixodidae (HOOGSTRAAL e WASSEF, 1985).

A espécie *Rhipicephalus Boophilus microplus* originou-se provavelmente da Ásia, quando mamíferos e pássaros substituíram os répteis como vertebrados dominantes já no período terciário (HOOGSTRAAL e WASSEF, 1985), adaptando-se perfeitamente ao clima das áreas tropicais, onde o calor e a umidade propiciaram condições favoráveis à sobrevivência e manutenção da espécie (POWELL, R.T. e REID, T.J., 1982). O *R. (B.) microplus*, conhecido no Brasil como carrapato dos bovinos, é um ectoparasita hematófago que pertence ao filo Artropoda, classe Aracnida, ordem Acarina, subordem Metastigmata e superfamília Ixodidea. Este se encontra amplamente distribuído nos importantes rebanhos bovinos das Américas Central e do Sul e da África, Ásia e Oceania entre os paralelos 32ºN e 32ºS, sendo um dos principais parasitos que afetam a pecuária destas áreas (JOHNSTON et al, 1982).

1.1.2. *Ciclo de vida do R. (B.) microplus*

O ciclo biológico do carrapato *R. (B.) microplus* divide-se em duas fases: a de vida livre e a de vida parasitária. A primeira inicia-se após a queda da teleógina com o período de pré-postura e se estende até a eclosão dos ovos e a transformação das neolarvas em larvas infestantes (GONZALES, 1974). A fase de vida parasitária inicia-se quando a larva infestante instala-se no hospedeiro transformando-se em metalarva,

seguida da fase de ninfa, na qual já há diferenciação sexual. Logo após, ocorre a transformação para partenógena e, finalmente, teleógena (GONZALES, 1975).

A fase de vida livre sofre interferências climáticas, trazendo alterações nos seus períodos, que são especialmente afetados pela umidade e temperatura. Por outro lado, a fase de vida parasitária é praticamente constante em todas as regiões (GONZALES, 1975).

De forma simplificada, o ciclo do *R. (B.) microplus* para o Brasil-Central é assim descrito por Furlong (1993): na fase de vida livre, são necessários em torno de três dias para a pré-postura; de três a seis semanas para a postura; de 22 a 30 dias para a eclosão das larvas e de dois a três dias para o fortalecimento de suas cutículas, quando se transformam em larvas infestantes. O autor afirma, ainda, que uma fêmea produz de 2000 a 3000 ovos durante a postura, que é única. Na fase parasitária são necessários, em média, de 18 a 26 dias para a fixação, alimentação, troca de cutícula, fase adulta e acasalamento, assim como para a alimentação, ingurgitamento e queda das fêmeas. Os machos permanecem mais tempo sobre o bovino e se acasalam com várias fêmeas (FURLONG, 1993). O ingurgitamento e queda da fêmea do *R. (B.) microplus* são bastante rápidos e, em parte, fêmeas ingurgitadas de 4-6 mm (10-30 mg) podem ingurgitar rápido à noite, chegando a 8-11 mm (150-250 mg) e se destacar do animal nas primeiras horas do dia. Porém, os padrões de ingurgitamento se diferenciam entre as estações, assim como em bovinos estabulados, sugerindo que este sofre uma influência do ambiente externo, principalmente de luz e temperatura (UTECH et al, 1978). A contagem de carrapatos de 4,5 a 8,0 mm de comprimento em um dia demonstrou fornecer uma confiável estimativa do número de carrapatos ingurgitados caindo no dia seguinte, e tem sido adotada para a determinação do nível de infestação por carrapatos nos bovinos (UTECH et al, 1978). Segundo Veríssimo e Oliveira (1994), a contagem de carrapatos na região anterior, entre a cabeça e a escápula, tem 90,9% de correlação com a contagem global, simplificando o método de Wharton e Utech (1970).

1.1.3. Influência dos fatores sazonais no ciclo do *R. (B.) microplus*

Vários autores demonstraram a influência dos fatores sazonais no ciclo de vida dos carrapatos e, conseqüentemente a diferença de infestações nos animais, que variam de acordo com o clima da região em que vivem e com a época do ano (da ROCHA' on-line; MADALENA et al, 1985; OLIVEIRA et al, 1989). Como visto anteriormente, a fase de vida livre é bastante influenciada, principalmente pela temperatura e umidade (GONZALES, 1975).

Foi demonstrado que contagens de carrapatos em bovinos eram semelhantes, em condições experimentais padronizadas, quando feitas na mesma estação do ano, e muito discrepantes quando correlacionadas entre estações diferentes. Observou-se que há influência da estação do ano sobre a carga de carrapatos (MADALENA et al, 1985).

Estudos sobre a biologia, ecologia e controle do *R. (B.) microplus* no município de Pedro Leopoldo -MG, no período de novembro de 1983 a novembro de 1987, detectaram quatro gerações de carrapatos, encontrando larvas nas pastagens e infestação nos animais durante todo o ano. Todos os períodos da fase não parasitária mostraram-se altamente influenciados pelas condições climáticas, sendo mais longos nos meses frios, de março a julho, e, mais curto nos meses mais quentes, de setembro a março (MAGALHÃES, 1989).

Distinguiram-se dois picos principais de infestação pelo *R. (B.) microplus*, examinando-se bovinos em quatro fazendas na região metalúrgica de Minas Gerais, próximas a Belo Horizonte; o primeiro de setembro a dezembro, final do período seco e início das chuvas, e o segundo nos meses de abril, maio e junho, após as chuvas mais intensas e início da seca (MORENO, 1984).

Na Estação Experimental de Pindamonhangaba/SP, Guaragna et al. (1988) encontraram um efeito altamente significativo da estação do ano sobre o número de carrapatos, com as seguintes médias: primavera: 21,73; verão: 73,75; outono: 93,10 e inverno: 9,2. Para este estudo foram utilizadas novilhas leiteiras do tipo Mantiqueira, infestadas naturalmente por *R. (B.) microplus*.

Pode-se concluir que na Região Sudeste há quatro gerações de carrapatos que se desenvolvem por todo ano, tendo seu ciclo de vida mais curto e maiores infestações na “época das águas”, ou seja, nos meses entre setembro e março (da ROCHA, on-line).

1.2. Hospedeiro

1.2.1. Diferença de resistência entre espécies

O hospedeiro preferencial do *R. (B.) microplus* é o bovino, sendo que as maiores infestações ocorrem em *Bos taurus* e as menores em *Bos indicus*. Ovelha, cavalo, veado, cão, cabra, homem e outros também podem ser hospedeiros, mas apenas em épocas de grande infestação nas pastagens (GONZALEZ, 1974).

Estudos do comportamento do *R. (B.) microplus*, em infestações naturais e artificiais, feitas em bovinos, caprinos e eqüinos conduzidos em propriedades localizadas em diferentes municípios do Rio de Janeiro (Brasil), demonstraram que os caprinos e eqüinos podem ser hospedeiros do *R. (B.) microplus*, porém não com a mesma eficiência dos bovinos. Os parâmetros estudados foram: peso das teleóginas, período de pré-postura período de postura, peso da postura, número de ovos, índice de produção de ovos, período de incubação, período e percentagem de eclosão. O período de postura, e também o período de eclosão, foram significativamente maiores nas fêmeas oriundas de eqüinos. O percentual de eclosão não se alterou significativamente. Todos os outros parâmetros foram significativamente maiores nas fêmeas oriundas de bovinos, demonstrando um prolongamento da fase de vida livre e menor produção dos carrapatos oriundos dos eqüinos (BITTENCOURT et. al, 1990).

1.2.2 Diferenças de graus de infestação nas diferentes regiões do corpo dos bovinos

O *R. (B.) microplus* não se distribui de forma homogênea pelo corpo dos animais que parasitam conforme estudos já publicados (da ROCHA, on-line). De fato, através de

contagens de partenógenas e teleógenas em vacas holandesas preto e branco, durante dois anos, Brum et al. (1987) verificaram que 58,8% dos carrapatos localizaram-se nas regiões da virilha, pata traseira e úbere. Os locais menos parasitados foram cabeça, região escapular, costelas e flanco, representando 2,8% do total. No pavilhão auricular, citado como local de preferência do *R. (B.) microplus* por Gonzales (1975), não foi encontrado nenhum parasito.

Comparando-se a resistência de bovinos de seis graus de sangue holandês-guzerá ao carrapato *R. (B.) microplus*, através de contagem no lado esquerdo dos animais, Oliveira e Alencar (1990) incluíram no modelo estatístico os efeitos das regiões corpóreas. Para tanto, dividiram o animal em três regiões corpóreas e chegaram à seguinte conclusão: o maior número de carrapatos foi encontrado na região posterior (todo o quarto traseiro), seguida da região anterior (da cabeça à região por trás da escápula) e finalmente a região mediana (da pós-escapular à pré-crural). Houve também interação entre região corpórea e grupo genético, sugerindo-se que a magnitude das diferenças entre as regiões depende do grupo genético do animal (OLIVEIRA e ALENCAR, 1990).

1.2.3. Influência da raça bovina na resistência ao *R. (B.) microplus*

Alguns fatores como sexo e idade, dentre outros, afetam a resistência dos bovinos aos carrapatos, porém a raça é um dos fatores de maior importância sendo amplamente discutido na literatura (da ROCHA, on-line). Entre os bovinos existem raças resistentes (R; *Bos taurus indicus*) e suscetíveis (S; *Bos taurus taurus*) ao parasita, sendo herdável o fenótipo da infestação (MATTIOLI, 1998; MELTZER, 1996). Os bovinos são hospedeiros naturais do carrapato *R. microplus* e constituem o único modelo no qual é possível examinar, numa mesma espécie, os desfechos distintos de resistência (R) e susceptibilidade (S) das infestações com esse parasita. Ainda existem dúvidas sobre quais seriam os mecanismos responsáveis por esses desfechos distintos, mas a composição da saliva dos carrapatos, descrita acima, indica que a resposta imune é um deles. Ainda em relação a bovinos, a maioria dos estudos sobre

aquisição de resistência avalia o fenômeno em raças taurinas que, embora desenvolvam imunidade, não controlam as infestações com a mesma eficiência das raças zebuínas (MATTIOLI, 1998; MATTIOLI e CASSMA, 1995; MATTIOLI et al., 2000; WAMBURA et al., 1998; MELTZER, 1996; NORVAL, 1992). Poucos estudos examinam, de forma ao mesmo tempo comparativa e abrangente, os perfis dos diferentes mecanismos efetores imunes anti-carrapatos nas diferentes raças de bovinos.

Vários autores demonstraram haver maior resistência dos zebuínos ao carrapato *R. (B.) microplus* quando comparados aos taurinos (GONZALES, 1975; UTECH et al, 1978; MADALENA et al, 1985; OLIVEIRA e ALENCAR, 1989 e 1990; VILLARES, 1941). Segundo GONZALES (1975), os primeiros a relatarem tal fato foram Wharton et al. (1970). Esta diferença foi demonstrada inclusive nos bovinos cruzados, sendo que, quanto maior a contribuição genética zebuína, maior a resistência ao carrapato (UTECH et al, 1978; OLIVEIRA e ALENCAR, 1989 e 1990; LEE, 1979).

Há diferentes explicações para a diferença de resistência entre taurinos e zebuínos ao carrapato. Segundo Gonzales (1975) muitos técnicos tentaram explicar tal característica pelo fato dos zebuínos possuírem mais glândulas sebáceas na pele, produzindo odores que afastaria o carrapato, assim como maior mobilidade geral do animal e elasticidade de sua pele, o que possivelmente faz com que se defenda melhor da infestação.

Veríssimo (1991) explicou que o sistema de alimentação da larva de *R. (B.) microplus* depende de uma reação inflamatória que se inicia no momento da fixação da mesma. Os zebuínos apresentam uma reação inflamatória mais intensa que o gado europeu levando-o a proceder a uma autolimpeza via lambadura mais eficiente, o que contribuiria para um equilíbrio carrapato/hospedeiro, sendo a infestação mínima nestes animais. Segundo a autora, não é interessante para o parasita matar o hospedeiro, uma vez que isso afetaria sua própria sobrevivência, comentando que o *R. (B.) microplus* está bem adaptado ao seu hospedeiro natural, o *Bos indicus*, mas que o *Bos taurus* foi introduzido em área enzoótica de *R. (B.) microplus*, desenvolvendo um problema agudo por causa da sua incapacidade para controlar o número de parasitas. Esta autora

também sugere que animais susceptíveis podem morrer caso não sejam banhados por acaricidas. Moraes et al. (1986) também responsabilizam essa diferença de resistência à maior eficiência no ato de autolimpeza.

Estudos sobre a diferença de resistência das raças bovinas européias, nacionais e zebuínas ao *R. (B.) microplus* demonstraram que o primeiro grupo é mais susceptível que os demais, inclusive havendo diferença entre a susceptibilidade de cada raça dentro dos grupos, assim como diferenças individuais dentro da mesma raça. Os critérios de comparação utilizados foram o número e tamanho dos carrapatos, acima de 4,0 mm, ou seja, contaram-se apenas as teleógenas (VILLARES, 1941).

A resistência não afeta apenas a contagem de carrapatos. As fêmeas ingurgitadas produzidas por bovinos da raça Santa Gertrudis apresentavam dimensões (comprimento, largura e altura) e peso menores que aquelas produzidas em animais da raça Aberdeen Angus (MARADAY e GONZALES, 1984).

Comparando-se a resistência das raças Canchim e Nelore, através de infestação artificial e infestação natural, Oliveira et al. (1989, 1990) demonstraram que a diferença na resistência ocorre em qualquer estação do ano e há efeito significativo na interação entre a raça e a estação. Guaragna et al (1992) também observaram os efeitos de ano, estação e raça, estudando infestações artificiais em touros holandeses e mantiqueiros, de 1 e 2 anos, sendo os primeiros considerados menos resistentes, apesar das duas raças serem consideradas susceptíveis. Neste estudo, não houve diferença significativa para a idade.

1.2.4. Bases fisiológicas e moleculares na relação hospedeiro-ectoparasita na interface de contato

Trager (1939) foi o primeiro a demonstrar que hospedeiros vertebrados seriam capazes de rejeitar ectoparasitas e que a resistência poderia ser transmitida pelo soro de animais infestados. Esse achado levou vários laboratórios do mundo a pesquisar sobre as bases moleculares e imunológicas envolvidas na interface hospedeiro-

ectoparasita. O acúmulo desses conhecimentos tem gerado dados que contribuem para o desenvolvimento de vacinas anti-carrapato baseadas, principalmente, em extratos de glândulas salivares dos ectoparasitas. O interesse especial nos produtos de glândula salivar explica-se pelo fato deste órgão atuar diretamente na interface entre parasita e hospedeiro, sendo então alvo importante de medidas terapêuticas na tentativa de limitar a alimentação do parasita.

Os componentes da saliva e glândulas salivares passaram, então, a ser estudados com o objetivo de elucidar a interação entre parasita e hospedeiro. Continua-se supondo que a capacidade do carrapato em manter-se no hospedeiro está na habilidade em escapar das reações inflamatórias e hemostáticas do hospedeiro. Como todos os sistemas fisiológicos importantes, o sistema imune, inflamatório e de coagulação dos vertebrados são extremamente redundantes. Para conseguir se manter no hospedeiro, alimentando-se de seu sangue, os carrapatos, e outros artrópodes hematófagos desenvolveram sistemas também redundantes que envolvem um grande número de substâncias farmacologicamente ativas e relevantes (RIBEIRO, 1995).

Estudos sobre a saliva de diferentes espécies de artrópodes hematófagos mostram a diversidade de substâncias inoculadas no hospedeiro. Entre as moléculas descritas estão anticoagulantes como os inibidores de trombina (HORN et al, 2000); imunossupressores, como as prostaglandinas (RIBEIRO et al, 1985; INOKUMA et al; 1994; BOWMAN et al; 1995); ligantes de histamina (PAESEN et al, 2000); inibidores da via clássica do sistema complemento, como a calreticulina que se liga a C1q (SANDERS et al, 1999); inibidores da C3 convertase do complemento (VALENZUELA et al, 2000); inibidores de agregação plaquetária, como as apirases (RIBEIRO, 1995; WIKEL, 1996); inibidoras de bradicinina (RIBEIRO e MATHER, 1998) e proteínas ligantes de imunoglobulinas (WANG et al, 1994), encontradas também na hemolinfa. Embora não exista degradação das imunoglobulinas (Igs) encontradas na hemolinfa de artrópodes hematófagos, sugere-se que as proteínas que a elas se ligam estejam envolvidas na excreção, pela saliva, das Igs ingeridas com o sangue do hospedeiro (WANG et al, 1994).

A resposta imune dos hospedeiros aos ectoparasitas envolve vias efetoras como anticorpos, complemento e células (BROWN et al, 1982 e BROWN, 1982 e 1985) e suas vias regulatórias que compreendem citocinas, células apresentadoras de antígenos e linfócitos T (LAMOREAUX et al, 2000). Os componentes efetores agem limitando a hematofagia e, quando ingeridos, causam lesões nos tecidos do parasita. Como consequência, o número de carrapatos alimentando-se de forma eficaz em um hospedeiro resistente é reduzido e as fêmeas têm o peso e a capacidade reprodutiva diminuídos (BROWN e ASKENASE, 1983; BROWN et al, 1984).

As vias efetoras correlacionadas não somente com a resposta imune anti-carrapato, mas com resistência a este são descritas como reações de hipersensibilidade imediata, envolvendo imunoglobulina E, mastócitos e histamina, e de hipersensibilidade tardia, envolvendo basófilos e histamina (BROWN, 1985). A relevância dos basófilos na resistência foi comprovada pelo comprometimento desta quando há ablação experimental dessas células (WIKEL, 1996). Nos animais geneticamente resistentes os componentes da imunidade celular parecem atuar como mecanismo de controle e/ou rejeição ao carrapato (BECHARA *et al*, 2000).

1.3. IMUNOBIOLOGIA DOS CARRAPATOS

Na última década ocorreram grandes avanços no estudo da imunobiologia da interação carrapato-hospedeiro (BROSSARD e WIKEL, 1993). As moléculas e células que compõem a resposta imune, inata e adquirida, desenvolvida contra os carrapatos, dependem das espécies tanto de carrapatos quanto de hospedeiros, sendo a composição genética do hospedeiro, independentemente de sua espécie, determinante para a resposta contra esses parasitas (de CASTRO e NEWSON, 1993). Como complementação das informações acerca da resposta imune do hospedeiro contra o carrapato pesquisas tem se focado nas moléculas secretadas pelo parasita que estão envolvidas na modulação dessa resposta (WIKEL, 1996 e 1999; GILLESPIE *et al*, 2000; SCHOELER *et al*, 2001). Assim sendo, os artrópodes hematófagos devem possuir

mecanismos para controlar a agregação plaquetária, coagulação e resposta imune do hospedeiro a fim de obter uma alimentação eficiente (BROSSARD e WIKEL, 1993).

Esses estudos quanto a imunobiologia do carrapato resultaram na identificação e, em muitos casos, na clonagem e expressão de proteínas presentes na glândula salivar que interagem com elementos da resposta imune produzida pelo hospedeiro (BROSSARD e WIKEL, 1993).

A calreticulina, uma proteína conservada ligante de cálcio secretada pelo *Amblyomma americanum*, foi clonada de sua glândula salivar (JAWORSKI *et al*, 1995). Esta proteína é secretada na saliva de fêmeas de *A. americanum* e *Dermacentor variabilis* após quatro dias de fixação (BROSSARD e WIKEL, 1993). Em carrapatos *R. (B.) microplus*, essa proteína é expressa em todos os tecidos e fases de vida, porém hospedeiros bovinos imunizados com a proteína recombinante não desenvolvem anticorpos contra ela (FERREIRA *et al*, 2002). A calreticulina está envolvida em uma série de eventos biológicos como a modificação da expressão de genes, a anti-hemostase e a atividade de lectinas e complemento (BENEDICT *et al*, 1993; KOVACS *et al*, 1998).

Proteínas ligantes de imunoglobulina estão presentes em extratos de glândula salivar de *A. variegatum*, *Ixodes hexagonuse* e *Rhipicephalus appendiculatus* (WANG e NUTTALL, 1994) e proteínas putativas foram descritas no transcriptoma de glândulas salivares de carrapatos machos de *R. (B.) microplus* (De MIRANDA SANTOS *et al*, 2004). Essa proteína tem peso molecular variando de 21 a 54KDa de acordo com o período de fixação e sexo do carrapato (WANG e NUTTALL, 1994). Seu papel aparente consiste na neutralização de anticorpos do hospedeiro que circulam no parasita (WANG e NUTTALL, 1994; ALLEN e HUMPHREYS, 1979).

A IL-2 é uma citocina que possui atividade biológica importante para o desenvolvimento e expressão da resposta imune (JANEWAY, 2001). A saliva de *I. scapularis* contém uma proteína ligante de IL-2 que é capaz de se ligar nessa citocina em solução (GILLESPIE *et al*, 2001). A proteína ligante de IL-2 é capaz de influenciar a atividade de células T ativadas e citotóxicas, células B, células NK, monócitos e

macrófagos (GILLESPIE et al, 2001) sendo esta parte de uma estratégia eficiente do carrapato para modular a resposta imune do hospedeiro, especialmente a proliferação blástica (BROSSARD e WIKEL, 1996).

A liberação de histamina por células inflamatórias está diretamente ligada à resistência adquirida pelo hospedeiro contra o carrapato (WIKEL, 1982). O extrato de glândula salivar de *R. appendiculatus* contém uma proteína ligante de histamina em ambos os sexos nos estágios iniciais de ingurgitamento (PAESEN et al, 2001) e proteínas putativas também foram descritas no transcriptoma de glândulas salivares de carrapatos de *R. (B.) microplus* (De MIRANDA SANTOS et al, 2004).

O complemento é composto de uma série de proteínas séricas que são ativadas pelas chamadas vias clássica ou alternativa ou de MBL (lectina ligante de manose), sendo importante mediador da resposta inflamatória, quimiotaxia, opsonização e atividade microbicida (FEARON, 1998; MASTELLOS e LAMBRIS, 2002). A via alternativa de ativação do complemento está envolvida na resistência a carrapatos (Wikel, 1979). Uma proteína anticomplemento foi purificada da saliva de *I. scapularis*, clonada e expressa em células de mamíferos. Essa proteína inibe a ligação do C3b e acelera o desacoplamento da molécula Bb da via alternativa, sendo que ambas as proteínas, a recombinante e a nativa, agem da mesma forma (VALENZUELA et al, 2000).

Uma proteína de 36KDa, capaz de inibir a proliferação de células T, foi isolada da saliva do carrapato *D. andersoni* (BERGMAN et al, 2000). O carrapato *A. americanum* possui uma proteína capaz de mimetizar a ação do fator de inibição de migração de macrófagos (MIF) em sua glândula salivar (JAWORSKI et al, 2001). Várias atividades biológicas foram atribuídas a essa proteína incluindo a de oxiredutase, mediador neurohumoral e inibição de lise mediada por células NK (PETROVSKY e BUCALA, 2000; LUE et al, 2002).

A *Salp 16* é um gene cuja expressão é induzida durante a refeição de sangue de *R. appendiculatus* e está relacionada com uma proteína putativa de aproximadamente 16,4KDa presente somente em fêmeas ingurgitadas (DAS et al, 2000). A imunização

com a proteína recombinante não resultou em proteção contra a infestação pelo carrapato (DAS *et al*, 2000). A *Salp 25D* é uma proteína homóloga à glutathione peroxidase e semelhante à proteína ligante de histamina do *R. appendiculatus* (DAS *et al*, 2001). A *Salp 15* é uma proteína presente na saliva de *I. scapularis*, sendo responsável pela inibição da ativação de células T CD4⁺ agindo nas vias cálcio-dependentes que são ativadas a partir do receptor de células T. Ela se liga a essas células inibindo a produção de IL-2 e expressão de CD25 sem, contudo, afetar a atividade de células B que é independente de células T (ANGUITA *et al*, 2002).

Prostaglandinas (PG) já foram descritas na saliva de carrapatos, atuando como vasodilatadoras (RIBEIRO, 1995) e inibidoras da agregação plaquetária (CHAMPAGNE e VALENZUELA, 1996). A PGE₂ está presente na saliva de *R. (B.) microplus* (DICKINSON *et al*, 1976), *I. scapularis* (RIBEIRO *et al*, 1985) e *A. americanum* (RIBEIRO *et al*, 1992). A influência dessas moléculas na resposta imune do hospedeiro ainda é desconhecida, mas sabe-se que a PGE₂ é capaz de aumentar a produção de citocinas do padrão Th2 e diminuir as de padrão Th1 além de inibir a proliferação de linfócitos T (HARRIS *et al*, 2002).

1.4. RESPOSTA IMUNE CONTRA CARRAPATO

A fixação do carrapato na pele do hospedeiro desencadeia uma resposta inflamatória na qual há neutrófilos cuja participação é controlada principalmente pela IL-8 (BROSSARD e WIKEL, 2004). O extrato de glândulas salivares de vários carrapatos (*D. reticulatus*, *A. varegatum*, *R. appendiculatus*, *I. ricinus*) inibe, *in vitro*, a ligação do IL-8 com os seus receptores em granulócitos humanos e, portanto, muito provavelmente em neutrófilos (BROSSARD e WIKEL, 2004; HAJNICKA *et al*, 2001). Dessa forma, a saliva do carrapato pode controlar, em parte, a infiltração e ativação de neutrófilos no local de fixação.

Sabe-se que bovinos desenvolvem imunidade contra os carrapatos após sucessivas infestações e o fenótipo de resistência ou susceptibilidade já foi descrito

para as espécies de carrapato *Hyalomma spp* (SAHIBI et al, 1997), *H. anatolicum anatolicum* e *R. evertsi* (LATIF et al, 1984), *R. appendiculatus* (LATIF et al, 1991) e *R. (B.) microplus* (MORAES et al, 1992; WILLADSEN, WOOD e RIDING, 1979; TATCHELL e BENNETT, 1969; TATCHELL e MOORHOUSE, 1968; GILL, 1986; SARTOR et al, 1997).

A fixação e desenvolvimento do carrapato induzem uma resposta imune complexa nos hospedeiros envolvendo a apresentação de antígenos via APC, células-T, células-B, anticorpos, citocinas, sistema complemento, basófilos, eosinófilos e uma variedade grande de moléculas bioativas (revisada em WIKEL, 1996; BROSSARD e WIKEL, 1997). Os hospedeiros produzem anticorpos contra elementos do carrapato e estes estão relacionados com a resistência ao parasita que é transmitida, mesmo que fracamente, de forma passiva pelas vacas aos seus bezerros, (BROSSARD e GIRARDIN, 1979; ROBERTS e KERR, 1976).

O sistema complemento está envolvido no desenvolvimento da imunidade contra carrapatos. A resistência adquirida contra larvas do carrapato *D. andersoni* em cobaias foi inibida dramaticamente pela depleção de C3 com fatores presentes em veneno de cobra (WIKEL e ALLEN, 1977). O extrato de glândula salivar de *I. ricinus* é capaz de inibir a via alternativa do complemento (LAWRIE et al, 1999) e o *I. scapularis* possui um inibidor de C3 convertase, fatos que demonstram que essa via de resposta é importante na aquisição de resistência pelo hospedeiro, já que a ativação da cascata do complemento, no local da fixação do parasita, gera mediadores inflamatórios, de quimiotaxia e opsoninas que resultam na atração de células, como basófilos e eosinófilos (STEEVES e ALLEN, 1991; ALLEN, 1973; BROSSARD e FIVAZ, 1982).

Durante um período de infestação intensa com carrapatos *R. (B.) microplus* não há correlação direta entre o nível de exposição a antígenos salivares e o nível de anticorpos específicos anti-saliva (KASHINO et al. 2005). O que ocorre, de fato, nesse período é uma diminuição significativa nos níveis de anticorpos dos animais suscetíveis, intensamente infestados, em relação aos níveis verificados durante um período de infestação moderada ou baixa sugerindo que a partir de determinado limiar de

infestação há uma modulação na atividade dos linfócitos B e/ou nos níveis séricos das imunoglobulinas.

1.5. PROTEÍNAS DE FASE AGUDA: SEU PAPEL NO CONTROLE DA RESPOSTA IMUNE EM BOVINOS

A resposta de fase aguda é uma manifestação da imunidade inata sendo responsável pela modulação da reação inflamatória iniciada pelo reconhecimento de moléculas estranhas ao organismo e pelo desencadeamento da resposta imune adquirida (SUFFREDINI et al, 1999). Esta resposta é caracterizada pela febre, leucocitose, mudanças na permeabilidade vascular, aceleração do metabolismo e desencadeamento das respostas não-específicas do hospedeiro (BAUMANN e GAULDIE, 1994). Em seguida a essa fase, o fígado e outros tecidos iniciam o processo de síntese e liberação de uma série de proteínas de fase aguda (APP) controladas principalmente pelas citocinas IL-1, IL-6 e TNF- α (BAUMANN e GAULDIE, 1994). As APPs desempenham um papel importante em mecanismos de defesa inata podendo inibir ou mediar o processo inflamatório e transporte de proteínas, além de participar da reparação de tecidos lesionados (TILG et al, 1997).

As funções das proteínas de fase aguda ainda não estão bem estabelecidas, mas estas parecem estar envolvidas no controle da inflamação e contribuição para as defesas inatas do hospedeiro contra uma grande variedade de patógenos. Os níveis plasmáticos dessas proteínas estão relacionados com a severidade da resposta a uma infecção, podendo ser usado como marcadores bioquímicos de inflamação (SUFFREDINI, 1999). Apesar de desempenhar um papel muito importante em infecções parasitárias, existem poucos relatos sobre a indução da produção de APPs durante as mesmas (GRANINGER et al, 1992; SHAPIRO e BLACK et al, 1992; MARTINEZ-SUBIELA et al, 2002; ECKERSALL et al, 2001). A ação da IL-6, IL-1 e TNF- α levam a ativação de diferentes genes que codificam as APPs dependendo da espécie animal, levando a uma produção e liberação diferencial, principalmente, de amilóide sérica (SAA), glicoproteína ácida Apha-1 (α -1AGP) ou haptoglobulina (Hp),

(BAUMANN e GAULDIE, 1994). Todas as três citocinas citadas induzem uma resposta de fase aguda em bovinos (NAKAJIMA et al, 1993; GODSON et al, 1995; WATANABE et al, 2000), mas as vias precisas podem ser diferentes entre as espécies e há aparentemente muitos correlatos conflitantes.

As mudanças nos níveis de APP ocorrem em resposta a uma inflamação aguda ou crônica e variam bastante entre as diversas espécies animais (ECKERSALL, 2000). A Hp é a APP mais abundante em bovinos com concentrações que variam de indetectáveis a 1400µg/ml no soro durante uma inflamação aguda (HORADAGODA et al, 1999). Em contraste, a SAA possui níveis basais que variam de 8,8 µg/ml, em soros de bovinos normais, a 75µg/ml em condições inflamatórias, sendo sua expressão induzida mais rapidamente que a Hp (HORADAGODA et al, 1994 e 1999). A α -1AGP é uma APP cujos níveis plasmáticos são moderados. Sua concentração no soro é aumentada, de duas a quatro vezes, em resposta a inflamação aguda, passando de 200-400µg/ml em bovinos normais até 1000µg/ml ou mais durante uma infecção (HORADAGODA et al, 1994 e 1999).

As APPs são solúveis e estáveis possuindo meia-vida relativamente longa (BAUMANN e GAULDIE, 1994). Em bovinos, as APPs consideradas mais sensíveis à inflamação são a Hp e a SAA cujas concentrações aumentam em resposta a condições inflamatórias agudas enquanto a α -1AGP é aumentada em condições inflamatórias crônicas (HORADAGODA et al, 1999). Essas proteínas respondem severamente com doses mínimas do agente infeccioso ou inflamatório (HORADAGODA et al, 1999).

A SAA é um potente ativador de funções leucocitárias induzindo sua quimiotaxia, seu aumento de adesão com células endoteliais e seu aumento na eficiência da fagocitose (SUFFREDINI et al, 1999). Essa APP é transportada sob a forma inativa SAA-HDL que, quando no sítio inflamatório, sofre ação enzimática ficando sobre a sua forma ativa livre (HOFFMAN et al, 1982; HUSEBEKK et al, 1987). Esta também pode ser liberada por macrófagos no sítio inflamatório (MEEK et al, 1992; LIANG e SIPE, 1995). O acúmulo de SAA nos tecidos se dá, principalmente, pela digestão enzimática do complexo SAA-HDL ou secreção por macrófagos ativados

e talvez gere um gradiente de concentração capaz de direcionar a migração de leucócitos para o tecido inflamado (SUFFREDINI et al, 1999).

Sabe-se que a SAA recombinante, em concentrações variadas, induz *in vitro* quimiotaxia de monócitos, linfócitos e PMNs (BADOLATO et al, 1994; XU et al, 1995). Em camundongos essa proteína provoca infiltração de monócitos, PMN e linfócitos T, sugerindo que a SAA possui ação pró-inflamatória *in vivo* (BADOLATO et al, 1994; XU et al, 1995).

A SAA ainda é capaz de provocar a quimiotaxia, adesão ao endotélio e matriz extracelular, expressão e atividade de integrinas de monócitos, PMNs e linfócitos (BADOLATO et al, 1994; XU et al, 1995), além de aumentar a atividade antifúngica de PMNs (MUSSO et al, 1996). Monócitos e PMNs expressam um grande número de ligantes para SAA e sua ligação é inibida pela SAA-HDL competitivamente (SUFFREDINI et al, 1999). Logo, uma concentração alta de SAA-HDL produzida na resposta de fase aguda pode ter um efeito anti-inflamatório local.

A Hp, uma APP que se liga a hemoglobina livre, é removida do sangue pelo sistema fagocítico mononuclear, resultando na depleção da Hp sérica (ECKERSALL et al, 2001). Essa APP está intimamente ligada à indisponibilização de hemoglobina (Hb) e, conseqüentemente, do grupamento heme no sangue. Sabe-se que o grupamento heme atua sobre a resposta imune de diversas formas, através de produtos metabólicos que são gerados a partir de sua degradação pela heme-oxigenase 1 (HO-1) (NATH et al, 1998; BALLA et al, 1993). O grupamento prostético heme, presente na Hb, mioglobina e proteínas intracelulares, é degradado em quantidades equivalentes de biliverdina, íons ferro e monóxido de carbono (CO) que agem sobre a resposta imune de diversas formas (NATH et al, 1998; BALLA et al, 1993). O CO liberado possui atividade anti-apoptótica e anti-inflamatória, diminuindo a expressão e liberação de IL-6 e aumentando a de IL-10 em células imunocompetentes (THOM et al, 2000; OTTERBEIN et al, 2000; MORSE et al, 2003; LEE et al, 2002). A biliverdina age bloqueando eventos relacionados com a inflamação, como a adesão leucocitária, mudando a expressão de moléculas de adesão, e conseqüentemente diminuindo a quimiotaxia de células

inflamatórias (TAMATANI et al, 1999; LEE et al, 2002). Assim, podemos concluir que a HO-1 e o grupamento heme, presente na Hb, são importantes durante o início da resposta imune, sendo seus níveis de atividade cruciais para a determinação do padrão de resposta imune (Th1 *versus* Th2), já que em camundongos *knockout* de HO pode-se observar uma predisposição a uma resposta inflamatória exagerada, com predominância do padrão Th1 de resposta (KAPTURCZAK et al, 2004). A Hp possui, então, uma ação pró-inflamatória e está intimamente ligada à indisponibilização de hemoglobina (Hb) e, conseqüentemente, do grupamento heme e seus metabólitos anti-inflamatórios no sangue (NATH et al, 1998; BALLA et al, 1993; ECKERSALL et al, 2001).

Uma das funções descritas para a α -1AGP é a imunossupressão (LOGDBERG et al, 2000) e sua presença em bovinos está correlacionada com a diminuição da blastogênese linfocítica e leucopenia (MOTOI et al, 1992).

O ferro possui papel fundamental no metabolismo da hemoglobina, umas das principais proteínas ingeridas pelo carrapato, e participa de diversos eventos relacionados com a resposta imune (NOVELLI et al, 2004; VAN RESBURG, 2004; BOWLUS, 2003; MULERO et al, 2002). A deficiência de ferro leva a danos na resposta humoral e celular, sendo uma das mais profundas mudanças a redução da quantidade de células T periféricas e atrofia do timo (BOWLUS, 2003). A transferrina é um carreador de ferro sérico que além de modular indiretamente a resposta imune via indisponibilização de ferro, esta também atua diretamente sobre macrófagos induzindo a produção de óxido nítrico (STAFFORD et al, 2002).

Não existem dados na literatura que comprovem o envolvimento dessas APPs na resposta imune desenvolvida pelos hospedeiros contra carrapatos, apesar da sua importância na modulação da resposta imune humoral e celular.

1.6. PROTEÍNAS LIGANTES DE IMUNOGLOBULINA (PLIGs)

Os carrapatos, para se alimentarem, precisam lidar com vários aspectos da homeostasia do seu hospedeiro tais como imunidade específica e inata, inflamação e coagulação e processos que interferem na hematofagia (RIBEIRO, 1995). Entre os recursos empregados pelo carrapato para esse fim, estão as proteínas ligantes de imunoglobulinas (PAESEN et al, 2000; WANG et al, 1994) e um inibidor de linfócitos B (HANNIER et al., 2003; HANNIER et al., 2004). A presença desses inibidores na saliva de carrapatos indica que anticorpos são mecanismos efetores importantes desde que consigam contornar esses mecanismos de escape do parasita. Sabe-se que anticorpos produzidos pelo hospedeiro durante infestações com carrapatos ou após imunizações com antígenos do parasita estão presentes na forma ativa na hemolinfa de *R. (B.) microplus* (VAZ et al, 1996), de *Dermacentor variabilis* (ACKERMAN et al, 1981; JASINKAS et al, 2000), de *Amblyomma americanum* (JASINKAS et al, 2000) e de *Rhipicephalus appendiculatus* (WANG e NUTTALL, 1994) durante, até pelo menos, 48 horas após sua ingestão podendo, portanto, exercer efeitos deletérios importantes sobre os tecidos do parasita.

Vários patógenos possuem proteínas ligantes de IgG (PLIG) (LANGONE, 1982; WIDDERS, 1990; De MIRANDA SANTOS E CAMPOS NETO, 1981, TORPIER et al., 1979) que participam de mecanismos de escape. Os carrapatos também possuem proteínas com esta mesma função (WANG e NUTTALL, 1999), sendo que em *R. (B.) microplus* sabe-se que cerca de 3% dos clones presentes em transcriptomas de glândulas salivares de machos codificam proteínas similares PLIGs de outros carrapatos, ou seja, é abundantemente expresso (BRANDÃO et al., manuscrito em preparação).

Os efeitos biológicos das diferenças alotípicas na capacidade de imunoglobulinas de hospedeiros ligarem-se a PLIGs de patógenos já foram descritos quanto ao desfecho clínico da interação de bovinos com a bactéria *Haemophilus somnus*, e à interação de diferentes alótipos de IgG bovina com proteína G de estreptococos e proteína A de estafilococos (BATISTA-CORCUERA et al., 1999).

Evidentemente que alótipos de outras subclasses de IgG bovinas, já descritas para IgG1 e IgG3, podem também afetar a ligação destas imunoglobulinas com as PLIGs de *R. (B.) microplus*. Essa possibilidade é sugerida pelo fato do carrapato possuir três tipos de PLIGs, A, B e C (WANG e NUTTALL, 1999), que podem ter especificidade para subclasses diferentes de IgG.

1.7. BASES PARA DESENVOLVIMENTO DE UMA VACINA ANTI-CARRAPATO *R. (B.) microplus*

Sabe-se que a distribuição de uma população de parasitas em uma população de hospedeiros não é uma distribuição normal e acredita-se que a imunidade inata e a resistência adquirida contribuam para isso. Desta forma, a aplicação de uma vacina eficaz permitiria o aumento da população de hospedeiros resistentes possibilitando a redução da infestação e o controle da população de parasitas (PRUETT, 1999).

A coevolução das espécies de parasitas e hospedeiros ao longo do tempo contribuiu para uma compatibilidade seletiva responsável pela coexistência de ambas. Então é razoável supor que a imunidade do hospedeiro decorrente de uma infestação natural por ectoparasitas não seja suficiente para o controle. Sugeriu-se que o controle de ectoparasitas seria mais eficaz se a imunidade do hospedeiro fosse capaz de neutralizar moléculas envolvidas no desenvolvimento do parasita como os antígenos ocultos (PRUETT, 1999; WILLADSEN e KEMP, 1988). Por não serem expostos ao hospedeiro em uma infestação natural os antígenos ocultos não devem gerar mecanismos de escape do parasita por pressão seletiva.

Atualmente existem duas vacinas existentes no mercado baseadas neste conceito, a TickGARD (Biotech Australia Pty. Ltd., Austrália) e a GAVAC (Heber Biotec S.A., Havana, Cuba). Ambas utilizam um único antígeno, a Bm86, uma glicoproteína de membrana de células intestinais de *R. (B.) microplus*, expresso em *Escherichia coli* e *Pichia pastoris*, respectivamente. O desenvolvimento de imunidade adquirida pelo gado exposto repetidamente ao *R. (B.) microplus* é um fato conhecido, contudo a proteção é

apenas parcial (PRUETT, 1999; DALTON e MULCAHY, 2001). Experimentos utilizando homogenatos de fêmeas adultas semi-ingurgitadas de *R. (B.) microplus* como antígenos mostraram que a resposta imune dos animais vacinados causou danos nas células intestinais do ectoparasita (PRUETT, 1999). Este efeito revelou resposta diferente da imunidade desencadeada por infestação natural. Como consequência, existe, de fato, redução da infestação e da capacidade reprodutiva dos carrapatos. Porém, a eficácia das vacinas baseadas na Bm86 é muito variável e suas principais limitações são os fatos de não induzir imunidade duradoura e não dispensar o uso combinado de acaricidas (DALTON e MULCAHY, 2001). Embora este aspecto seja pouco explorado em publicações, varias comunicações pessoais relatam que as vacinas são de difícil manejo e requerem aplicações repetidas para a manutenção dos níveis de anticorpos necessários e consequente redução da população de carrapatos infestando o hospedeiro. Este talvez seja o principal aspecto negativo do uso de antígenos ocultos pois, não havendo exposição freqüente do hospedeiro ao antígeno, como acontece com antígenos salivares, torna-se difícil a preservação de imunidade eficiente. Todavia, estas vacinas reforçam a idéia de que a imunoprofilaxia adotada com antígenos melhor selecionados possa ser uma maneira eficiente de se fazer o controle da infestação por carrapatos. Acredita-se que uma vacina baseada em um conjunto de antígenos, ocultos e não ocultos, possa produzir uma resposta mais satisfatória para a redução da infestação (TRIMNELL et al, 2002).

Embora exista dificuldade na aceitação pelo mercado devido ao efeito mais lento que o de drogas, a aplicação de uma vacina eficaz oferece vantagens para o desenvolvimento sustentável por serem ambientalmente seguras e evitarem a multiplicação de parasitas resistentes.

Demonstrou-se que anticorpos de bovinos imunes, específicos para tecidos de carrapatos, estão presentes na hemolinfa de fêmeas de *R. (B.) microplus* ingurgitadas, com atividade preservada por até 48 horas após o ciclo de vida parasitária ser concluído (GUDDERRA et al, 2002). A análise da hemolinfa de *D. variabilis*, que é um carrapato de cães, comprovou a presença de imunoglobulina G (IgG) com capacidade

de localização das proteínas alvo em órgãos como glândula salivar e ovário (ACKERMAN et al, 1985). Estudo semelhante feito em *A. americanum* demonstrou a presença de imunoglobulinas IgM sem indícios de degradação e com atividade preservada na hemolinfa desse carrapato (JASINKAS et al, 2000). Em *R. appendiculatus*, um carrapato ixodideo como o *R. (B.) microplus*, a IgG presente na hemolinfa, no extrato de glândula salivar e na saliva mantém 35-42% da atividade biológica até o sexto dia de alimentação do parasita (WANG e NUTTALL, 1994). Em diferentes espécies de mosquitos dos gêneros *Anopheles* e *Aedes* também foi observada a presença de IgG do hospedeiro na hemolinfa até 24 horas após a ingestão do sangue (VAUGHAN e AZAD, 1988). Soro de bovinos infestados com larvas de *R. (B.) microplus* reconhecem antígenos de baixo peso molecular (10 a 20 KDa) presentes em órgãos distintos do carrapato, como glândula salivar e intestino, e em fases distintas do desenvolvimento (larva, ninfa e adulto).

Essas observações comprovam o desenvolvimento de resposta imune pelo hospedeiro capaz de reconhecer estruturas internas do parasita. A presença de anticorpos contra esses componentes parasitários no soro dos hospedeiros possibilitaria resposta imune contra o parasita ao longo da fase de vida parasitaria (VAZ et al, 1996).

A comprovação da atividade dos componentes imunes do hospedeiro é dada por resultados de testes com soro de animais imunizados ou anticorpos purificados. O papel de anticorpos na redução na fecundidade de fêmeas foi comprovado tanto com a injeção destes na hemocele do parasita, como por meio da alimentação de artrópodes em hospedeiros imunizados. A injeção de anticorpo policlonal anti-3-N-acetihexosaminidase, enzima que hidrolisa resíduos de açúcar de glicoconjugados, foi capaz de reduzir em cerca de 26% a ovoposição em fêmeas de *R. (B.) microplus* ingurgitadas (DEL PINO et al, 1998). Já anticorpos monoclonais contra extratos de intestino e embrião de *R. (B.) microplus* provocaram redução de aproximadamente 50% e 70% na ovoposição, respectivamente (TORO-ORTIZ et al, 1997). Fêmeas do mosquito *Aedes*, alimentadas em mamíferos imunizados com homogenato do mosquito,

tiveram redução da fecundidade sem diminuição do número de ovos na ovopostura (SUTHERLAND e EWEN, 1974).

Para que uma vacina seja de fato eficaz, necessita-se de alvos de importância fundamental para viabilidade e capacidade reprodutiva do parasita e que sejam imunogênicos. Também é necessário que mecanismos imunes protetores sejam desencadeados e estejam ativos durante o parasitismo, mesmo na presença da atividade imunomoduladora da saliva, e que o sistema de entrega da vacina seja, além de conveniente, eficaz para manter uma resposta imune de longa duração. Para tanto, é de extrema importância para as especificações de delineamento de uma vacina, além da seleção de antígenos, o conhecimento da natureza dos mecanismos de resposta imune desencadeados pelo parasita em hospedeiros resistentes e susceptíveis. Nesse contexto, o presente estudo terá como principal objetivo elucidar os mecanismos de resposta imune humoral e inflamatória desenvolvidos diferencialmente pelos hospedeiros susceptíveis e resistentes ao *R. (B.) microplus*. Os dados obtidos terão grande relevância para a escolha de antígenos vacinais e adjuvantes que desencadeiem o padrão de resposta imune desenvolvido por bovinos resistentes.

2. OBJETIVOS

Os objetivos gerais desse trabalho são obter os marcadores das respostas imune humoral e inflamatória associados à resistência e susceptibilidade de bovinos frente a infestações com o *R. (B.) microplus*. Os objetivos específicos são:

- 1) Descrever a cinética de produção de anticorpos e imunoglobulinas IgG1, IgG2 e IgE para saliva, extrato de ovo e extrato de larvas não alimentadas de *R. (B.) microplus* ao longo de infestações em bovinos da raça Nelore (fenótipo resistente) e da raça Holandês Preto e Branco – HPB (fenótipo susceptível);
- 2) Determinar os alótipos para IgG2 bovino
- 3) Dosar as principais proteínas de fase aguda produzidas por em bovinos da raça Nelore (fenótipo resistente) e da raça Holandês Preto e Branco – HPB (fenótipo susceptível) submetidos a diferentes níveis de infestação pelo carrapato *R. (B.) microplus*;
- 4) Dosar o óxido nítrico no soro periférico de bovinos resistentes e susceptíveis submetidos a vários níveis de infestação pelo carrapato *R. (B.) microplus*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Resposta humoral anti-saliva, anti-ovo e anti-larva não ingurgitada de *R. (B.) microplus*.

3.1.1. Infestações de bovinos com *R. (B.) microplus*. Os bovinos foram introduzidos no experimento com seis meses de idade e se encontravam livres de infestação pelo carrapato *R. (B.) microplus* por meio do manejo empregado pelos seus produtores. Eram não aparentados, machos, de raça suscetível (S: Holandês Preto e Branco, HPB; N = 12) e resistente (R: Nelore; N = 12). Todos foram mantidos em regime de manejo semi-intensivo com suplementação protéica e mineral, sendo expostos a infestações naturais com o carrapato *R. (B.) microplus* presente no pasto. Sangue desses animais foi coletado e o soro extraído antes da exposição dos mesmos aos ectoparasitas. O controle de carrapatos em animais susceptíveis foi feito por meio de pulverizações ocasionais com carrapaticidas tópicos quando a saúde clínica se encontrava comprometida devido à alta infestação. Em cada grupo racial, três animais foram escolhidos ao acaso e mantidos livres de carrapato por meio de tratamento com abamectina (Agroquim Cia. Ltda., Actrol Internacional, Argentina). Todos os grupos experimentais foram vacinados a cada seis meses contra febre aftosa e leptospirose (Bovicel[®] e Lepto-BOV-6[®], Vallée).

3.1.2. Obtenção de soros. Para o estudo de cinética da resposta imune humoral frente à infestação por carrapatos, os soros desses animais foram coletados estrategicamente durante um ano. A primeira coleta foi feita no momento da chegada dos novilhos à fazenda. As coletas de soro seguintes foram feitas em períodos estratégicos e correlacionadas com os níveis de infestação que eram acompanhados através das contagens de teleóginas (descrito no item 3.1.4. e tabela 1). Os soros foram extraídos de sangue periférico coletado em tubos Vacutainer[®] (tampa

vermelha) sem anticoagulantes, inativados a 56°C por 30 minutos, aliqüotados e guardados a -20°C.

A fim de verificar se a fixação do carrapato estava promovendo uma depuração local de imunoglobulinas e de outros componentes imunes, soros também foram obtidos a partir do sangramento de biópsia de pele normal ou infestada. Para tanto foram realizadas biópsias de pele, com punch de 8mm, contendo, ou não, o parasita fixado. Sangue oriundo do sangramento foi coletado imediatamente após o corte em tubos de vidro sem anticoagulante. O soro foi extraído, inativado a 56°C por 30 minutos, aliqüotado e guardado a -20°C.

3.1.3. Obtenção de saliva, extratos de ovo e larva de *R. (B.) microplus*. Para obtenção da saliva, fêmeas adultas semi-ingurgitadas ou em fase final de ingurgitamento foram estimuladas com dopamina, diluída a 0,2% em PBS a temperatura ambiente, injetada na hemocele ao lado da inserção de uma das patas traseiras. A saliva foi coletada por meio de micropipeta em solução de DTT 25mM e de EDTA 25mM (concentração final) e guardada a -20°C.

Para obtenção dos extratos de ovo e larvas não alimentadas do carrapato, teleóginas foram retiradas diretamente do animal, lavadas em água corrente, secadas e grudadas, através de uma fita adesiva dupla face, em placas de Petri. As placas com as fêmeas foram acondicionadas em estufa a 28°C para promoção da ovipostura. Após cerca de 20 dias, metade dos ovos foi retirada e colocada em uma estufa a 28°C, dentro de frascos ventilados e vedados, e a outra metade foi congelada, macerada e sonicada. Após aproximadamente 15 dias, larvas eclodidas dos ovos foram submetidas ao mesmo processo descrito anteriormente. Ambos os extratos obtidos foram centrifugados a 12.000rpm, durante uma hora, seguida de dosagem protéica por meio da técnica de Bradford (Coomassie Plus[®], Pierce, Rockford, IL) conforme recomendações do fabricante.

3.1.4. Dados parasitológicos. Para correlacionar os dados da resposta humoral com o nível de infestação dos animais, foram feitas contagens do número de fêmeas ingurgitadas (tamanho superior a 4mm) do lado esquerdo de cada animal (tabela 1) de acordo com a técnica descrita por OLIVEIRA e ALENCAR (1990). O controle de carrapatos em animais susceptíveis foi feito por meio de pulverizações ocasionais com carrapaticidas tópicos quando a saúde clínica se encontrava comprometida devido a infestação. Apesar dos bois terem chegado a fazenda no mês de novembro de 2003 e as coletas de soro terem se iniciado no mesmo período, as contagens só se sucederam a partir de abril de 2004, quando deu-se início a esse projeto. Os níveis de infestação anterior às datas de contagem foram baseados supostamente em dados de literatura (FURLONG, 1993) e informações dos profissionais responsáveis pelo manejo do gado experimental.

Tabela 1. Contagem de carrapatos no lado esquerdo do animal em diferentes datas durante o ano de 2004. Os animais de 1 a 12 são da raça susceptível (HPB) ao carrapato *R. (B.) microplus*, sendo os três primeiros pertencentes ao grupo controle mantido livre do parasita através do uso de carrapaticidas tópicos. Os animais de 13 a 24 são da raça resistente (Nelore) cujo grupo controle é representado pelos animais 13, 14 e 15.

Número de identificação dos animais	Datas das Contagens											
	22/04	07/05	22/05	21/06	06/07	22/07	06/08	23/08	06/09	20/09	05/10	22/10
01	04	02	00	20	00	01	00	00	00	00	00	00
02	01	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00
03	02	00	00	09	00	00	00	00	01	00	00	00
04	46	56	30	06	33	80	00	12	05	19	12	03
05	40	40	65	08	19	81	03	23	27	71	78	23
06	187	90	20	11	47	98	07	36	90	43	28	81
07	85	03	53	11	21	41	21	18	22	36	07	25
08	73	193	31	41	29	83	17	35	97	31	44	19
09	38	27	20	13	25	29	16	23	05	67	01	00
10	57	121	50	01	62	65	12	21	40	67	107	10
11	59	43	20	32	63	29	06	38	14	28	77	31
12	43	31	49	45	57	44	11	13	22	31	40	12
13	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00
14	00	00	01	00	00	00	00	01	00	00	00	00
15	00	00	05	00	01	00	00	00	00	00	00	00
16	01	10	00	00	12	06	00	23	04	00	00	00
17	00	00	05	05	07	12	00	13	04	05	06	00
18	01	03	07	03	07	07	00	06	09	03	00	01
19	06	07	03	06	06	00	00	02	03	05	04	00
20	00	03	03	07	03	06	00	06	02	00	00	01
21	03	05	01	05	06	11	00	03	02	05	09	02
22	00	03	01	07	09	02	02	01	12	05	03	06
23	00	03	00	00	01	00	01	28	00	00	00	00
24	03	12	06	06	16	17	10	00	14	00	03	06

3.1.5. ELISA para quantificar as imunoglobulinas IgG1 e IgG2 total. A quantificação de IgG1 e IgG2 total foi feita com auxílio de kits de ELISA da Bethyl® (Montgomery, TX) específicos para a espécie bovina. A metodologia foi empregada conforme recomendação do fabricante. Houve necessidade de se fazer uma padronização da concentração do soro usada na reação (1:48.000, concentração final) e da diluição do anticorpo secundário (1:10.000).

3.1.6. ELISA para mensurar anticorpos totais e isotipos de anticorpos IgG1 e IgG2 anti-extrato de ovos, anti-extrato de larvas não-alimentadas e anti-saliva. Para os ensaios foram empregados antígenos da saliva, de ovo e de larva não alimentada do carrapato *R. (B.) microplus* cuja obtenção já foi descrita no item 3.1.3. As placas de 96 poços (Corning®, Cambridge, MA) foram incubadas por 12 horas, a 4°C, com 50µL de solução do antígeno a 10µg/ml em tampão carbonato (pH 9.6), lavadas duas vezes com PBS-Tween 20 0,05% (PBS-T) e em seguida bloqueadas com 10% de soro fetal bovino em PBS (Gibco®, Rockville, MD) por duas horas a temperatura ambiente (TA). Após o bloqueio, as placas foram lavadas quatro vezes em PBS-T. Os soros obtidos do sangue periférico e do local da biópsia de pele normal e infestada foram testados, em duplicata, diluídos em 1:50, 1:100 e 1:400 em PBS com 10% de SFB e incubados nas placas, 100µL por poço, por 2 horas a TA. Após seis lavagens, as placas foram incubadas com 100µL de IgG1, IgG2 e proteína G conjugadas com peroxidase (Bethyl Labs, Montgomery, TX) diluídos a 1:500, 1:125 e 1:5000, respectivamente, por 1 hora a TA. Após 8 lavagens com PBS-T, as reações antígeno-anticorpo foram reveladas com solução de substrato TMB (Kierkegaard Perry Labs, Gaithersburg, MD) por 15 minutos. Após a revelação, a reação da peroxidase com o substrato foi interrompida com 0,1M de ácido fosfórico e a absorbância do produto lida a 450nm.

3.1.7. Elisa para mensurar anticorpos IgE anti-extrato de ovo, anti-extrato de larva não alimentada e anti-saliva. Os antígenos empregados foram a saliva, o extrato de ovo e o extrato de larva não alimentada do carrapato *R. (B.) microplus*. As placas de 96 poços (Corning®, Cambridge, MA) foram incubadas por 12 horas, a 4°C, com 50µL de solução do antígeno a 10µg/ml em tampão carbonato (pH 9.6). As placas foram lavadas duas vezes com PBS-T e em seguida bloqueadas com 10% de soro fetal bovino em PBS (Gibco®, Rockville, MD) por duas horas a TA. Após o bloqueio, foram lavadas quatro vezes em PBS-T. Os soros obtidos do sangue periférico foram testados em duplicata, diluídos 1:5 em PBS com 10% de SFB e incubados nas placas, 100µL por poço, por 2 horas a TA. Após quatro lavagens, as placas foram incubadas com 100µL do anticorpo monoclonal anti-IgE bovino (E5, cedido pela Dra. Laurel

Gershwin) produzido em camundongo e diluído a 1:320 em PBS com 10% de soro fetal bovino. Após oito lavagens com PBS-T, as placas foram incubadas com anticorpo anti-camundongo (IgG e IgM) produzido em cabra, conjugado com peroxidase (Bethyl Labs, Montgomery, TX) e diluído 1:1000, por 1 hora, a TA. Novamente, as placas foram lavadas oito vezes com PBS-T e as reações antígeno-anticorpo foram reveladas com solução de substrato TMB (Kierkegaard Perry Labs, Gaithersburg, MD) por 15 minutos. Após a revelação, a reação da peroxidase com o substrato foi interrompida com 0,1M de ácido fosfórico e a absorbância do produto lida a 450nm.

3.1.8. Imunodifusão para alotipar as imunoglobulinas IgG2 produzidas pelos animais resistentes e susceptíveis ao carrapato *R. (B.) microplus*. A determinação dos alótipos de IgG2 bovino foi feita por dupla difusão de Ouchterlony conforme protocolo descrito por Butler et al (1983), que consiste basicamente em misturar uma solução de 6% polietilenoglicol e 3% agarose diluído em tampão veronal, colocar em uma placa de Petri (3,5cm x 1cm) e deixar solidificando. Foram feitos poços no gel de tamanho e distâncias precisamente iguais (Figura1). O anti-soro 84by2k foi adicionado ao centro e dois controles, IgG γ 2^a e IgG γ 2^b purificados, nos poços periféricos juntamente com as amostras diluídas a 1:5 em tampão veronal. A leitura das placas foi feita 24, 36 e 48 horas após incubação a temperatura ambiente. O anti-soro e os controles foram gentilmente cedidos pelo Dr. John E. Butler e, conforme descrito por ele, o anti-soro perdeu a capacidade de distinguir entre os alótipos de IgG γ 2^a homozigotos e heterozigotos, mas ainda é capaz de distinguir os alótipos, IgG γ 2^a e IgG γ 2^b.



Figura 1. Fotografia da placa de Petri usada para alotipar as IgG2 dos bovinos usados nos experimentos. Observar as dimensões e distâncias entre os poços, que são precisamente iguais, diminuindo a chance de ocorrência de resultados falsos.

3.2. Caracterização da resposta inflamatória bovina frente à infestação natural pelo carrapato *R. (B.) microplus*

3.2.1 Dosagem de óxido nítrico. O nível de produção de óxido nítrico (NO) foi indiretamente avaliado por meio da mensuração da produção de nitrato (NO₃) no soro dos animais, já que o NO é muito instável e decompõe-se espontaneamente em nitritos e nitratos. Os níveis de NO₃ foram mensurados em amostras de soro obtido de sangue periférico de bovinos submetidos a infestações naturais pelo carrapato *R. (B.) microplus*. A técnica consiste, resumidamente, na incubação de 40 µl das amostras com 40 µl de um coquetel contendo βNaDPH, água e a enzima nitrato redutase, durante 12 horas a 37°C. Após incubação é adicionado o reagente de Griess por 10 minutos a 26°C. Em seguida, determina-se a absorbância (filtro de 540 nm) em leitor de ELISA. Os resultados expressos em ηmoles foram determinados por meio da comparação com a curva-padrão realizada com nitrito de sódio (Vetec química, Rio de Janeiro) em concentrações que variaram de 200 a 0,9 µM. Esta técnica foi realizada no laboratório do Prof. Dr. Fernando Q. Cunha (Departamento de Farmacologia, FMRP/USP).

3.2.2. Dosagem de Haptoglobulina sérica bovina. A dosagem desta foi feita com auxílio do kit Phase™ Range Haptoglobin assay (Tridelta, Kildare) e o ensaio realizado conforme as instruções do fabricante, e que consiste, basicamente, na incubação de 7,5µL, das amostras e dos padrões, com 100µL da mistura de

hemoglobina e seu diluente além de 140µL do cromógeno e seu substrato em uma placa de 96 poços por 5 minutos. A absorbância foi lida a 630nm em um espectrofotômetro para microplacas (Spectramaxplus, Molecular Devices).

3.2.3. Dosagem de Amiloide-A sérica (SAA). Sua dosagem foi feita com auxílio do kit Phase™ Range serum amyloid A assay (Tridelta, Kildare). Esse ensaio segue as instruções do fabricante que consiste, basicamente, na incubação dos padrões e das amostras diluídas a 1:100 juntamente com anticorpos anti-SAA biotinalados diluídos a 1:400, por 1 hora a TA, em uma placa de 96 poços previamente sensibilizada com anticorpos anti-SAA. Logo após as lavagens com o tampão do kit, seguiu-se a incubação com avidina conjugada com peroxidase por 30 minutos, seguida de novas lavagens e revelação com substrato de TMB contido no kit. A reação foi interrompida após 30 minutos com uma solução ácida e a leitura feita a 450nm em um espectrofotômetro microplacas (Spectramaxplus, Molecular Devices). As concentrações de SAA foram calculadas com base na curva padrão presente no ensaio.

3.2.4. Dosagem da glicoproteína ácida Alpha-1 bovina (α -1 AGP). A sua dosagem foi feita com auxílio de um kit que se baseia na técnica de imunodifusão radial (Ecos Institute, Japão). As placas já se encontravam prontas para uso sendo necessário apenas a aplicação das amostras e dos padrões com posterior incubação, a 37°C, por 24 horas. A leitura foi feita com auxílio de uma régua milimetrada presente no kit. Os valores dos diâmetros dos halos dos padrões foram plotados em um gráfico juntamente com a sua concentração correspondente. A equação da reta foi adquirida e as concentrações de α -1 AGP presente em cada soro calculadas com base na equação obtida.

3.2.5. Dosagem de transferrina sérica. A dosagem foi feita com auxílio de kit que se baseia na técnica de Elisa (Bethyl labs, Montgomery, TX). Basicamente as placas são sensibilizadas com anticorpo monoclonal anti-transferrina bovina por uma hora seguida

de três lavagens e bloqueio por 30 minutos. Os soros são incubados na diluição de 1:5 por uma hora. Após lavagens a placa é incubada com o anticorpo secundário anti-transferrina bovina conjugado com peroxidase por uma hora, lavada e revelada. Esses procedimentos seguem as recomendações do fabricante.

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram usados o teste T de Student, a análise de Kruskal-Wallis das categorias de variância, o procedimento de Dunn e one way ANOVA para comparações múltiplas versus grupo controle. O teste do chi quadrado foi empregado para verificar a diferença na proporção dos alótipos de IgG2 entre as duas raças bovinas estudadas. Os testes estatísticos foram feitos no programa Sigma Stat versão 2.03 (SPSS Inc, Chicago, IL).

5. RESULTADOS

Todos os resultados descritos abaixo se referem aos soros dos animais susceptíveis (HPB, n=12) e resistentes (Nelore, n=12) coletados em períodos estratégicos durante um ano, conforme já descrito em materiais e métodos.

Nos experimentos onde saliva foi usada como antígeno foram selecionados cinco animais de cada grupo racial devido à dificuldade para obter esse antígeno. O critério utilizado para seleção consistiu na média de contagem de carrapatos, feita individualmente, durante o período de 22/04/2004 a 20/10/2004. Os bois susceptíveis usados foram os controles (1 e 2) e os mais infestados (4, 6 e 8); os resistentes foram os menos (19, 23) e mais (16, 17, 24) infestados. Para os experimentos de dosagem de proteínas de fase aguda o mesmo procedimento para seleção dos soros foi usado devido à quantidade limitada de reagentes necessários.

5.1. Os níveis de anticorpos totais anti-extrato de ovo, anti-extrato de larva e anti-saliva de carrapato *R. (B.) microplus* sofrem variações de acordo com os níveis de infestação pelo carrapato

Os níveis de anticorpos totais anti-extrato de ovo e anti-extrato de larvas não alimentadas foram avaliados com o objetivo de se verificar se ocorre produção de anticorpos contra esses antígenos, apesar de não haver contato aparente direto com o hospedeiro. Através da comparação entre os valores relativos de densidade óptica, representados nos gráficos, podemos concluir que os animais susceptíveis produzem uma quantidade maior de anticorpos totais anti-extrato de ovo (Figura 2, Tabela 2) e anti-extrato de larva (Figura 3, Tabela 3) após um primeiro contato com o parasita e esses níveis se mantêm relativamente constantes até o final do período experimental.

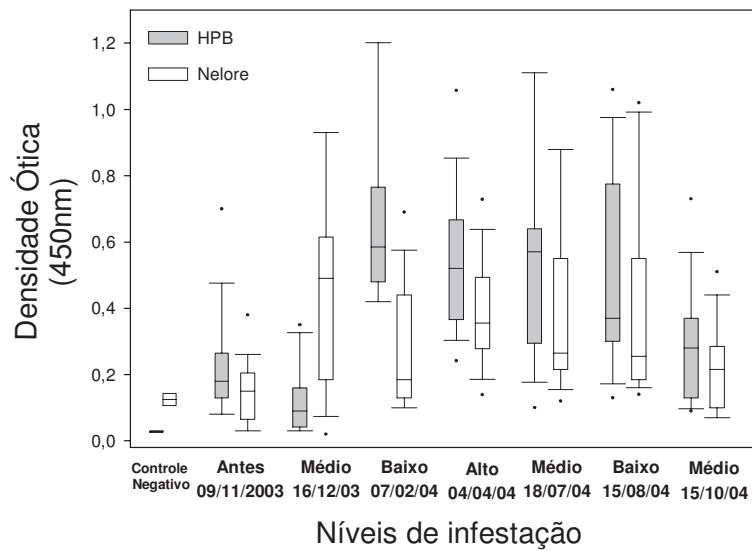


Figura 2. Níveis de anticorpos totais anti-extrato de ovos de carrapato *R. (B.) microplus* presentes no soro periférico de animais fenotipicamente resistentes (Nelore) e suscetíveis (HPB) a infestação pelo carrapato. O controle negativo se refere ao soro retirado de bezerros que nunca tiveram contato com o ectoparasita.

Tabela 2. Níveis de anticorpos IgG anti-extrato de ovo de *R. (B.) microplus* presentes no soro periférico de animais resistentes e susceptíveis submetidos a diferentes níveis de infestação. D ou d: comparação com a infestação anterior na mesma raça; A ou a: comparação entre os soros de animais resistentes e susceptíveis coletados na mesma data e com mesmo nível de exposição ao *R. (B.) microplus*; maiúsculas indicam diferença estatística significativa ($P < 0,05$).

Níveis de infestação	Níveis de Ig total anti-EO ($DO \pm DP$)						
	Nenhum	Médio	Baixo	Alto	Médio	Baixo	Médio
Fenótipo							
Susceptível (HPB)	0,22 $\pm 0,17^a$	0,12 $\pm 0,11^{AD}$	0,7 $\pm 0,34^{Ad}$	0,54 $\pm 0,22^{AD}$	0,59 $\pm 0,48^{ad}$	0,51 $\pm 0,31^{ad}$	0,29 $\pm 0,19^{aD}$
Resistente (Nelore)	0,14 $\pm 0,1^a$	0,47 $\pm 0,37^{AD}$	0,28 $\pm 0,2^{AD}$	0,38 $\pm 0,17^{Ad}$	0,41 $\pm 0,33^{ad}$	0,40 $\pm 0,31^{ad}$	0,22 $\pm 0,13^{aD}$

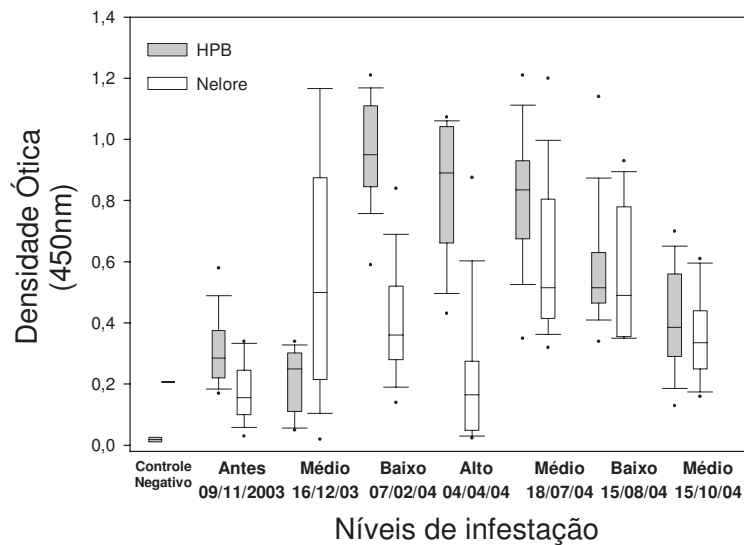


Figura 3. Níveis de anticorpos totais anti-extrato de larva não ingurgitada de *R. (B.) microplus* não alimentadas presentes no soro periférico de animais fenotipicamente resistentes (nelore) e suscetíveis (HPB) a infestação pelo carrapato. O controle negativo se refere ao soro retirado de bezerros que nunca tiveram contato com o ectoparasita.

Tabela 3. Níveis de anticorpos totais anti-extrato de larva não-ingurgitada de *R. (B.) microplus* presentes no soro periférico de animais resistentes e susceptíveis submetidos a diferentes níveis de infestação. D ou d: comparação com a infestação anterior na mesma raça; A ou a: comparação entre os soros de animais resistentes e susceptíveis coletados na mesma data e com mesmo nível de exposição ao *R. (B.) microplus*; maiúsculas indicam diferença estatística significativa ($P < 0,05$).

Níveis de infestação	Níveis de Ig total anti-EL (DO \pm DP)						
	Nenhum	Médio	Baixo	Alto	Médio	Baixo	Médio
Fenótipo							
Susceptível (HPB)	0,31 $\pm 0,12$	0,21 $\pm 0,10^{AD}$	0,95 $\pm 0,17^{AD}$	0,83 $\pm 0,22^{AD}$	0,80 $\pm 0,22^{Ad}$	0,57 $\pm 0,2^{ad}$	0,41 $\pm 0,17^{ad}$
Resistente (Nelore)	0,17 $\pm 0,1^A$	0,55 $\pm 0,42^{AD}$	0,41 $\pm 0,2^{AD}$	0,22 $\pm 0,24^{AD}$	0,61 $\pm 0,26^{Ad}$	0,55 $\pm 0,22^{ad}$	0,35 $\pm 0,14^{ad}$

Os níveis de anticorpos totais anti-saliva (Figura 4, Tabela 4) não possuem diferença entre animais resistentes e susceptíveis. Apesar disso podemos observar uma queda mais brusca desses níveis nos animais susceptíveis no período de alta infestação, evidenciando uma possível modulação da produção desses anticorpos nesse período.

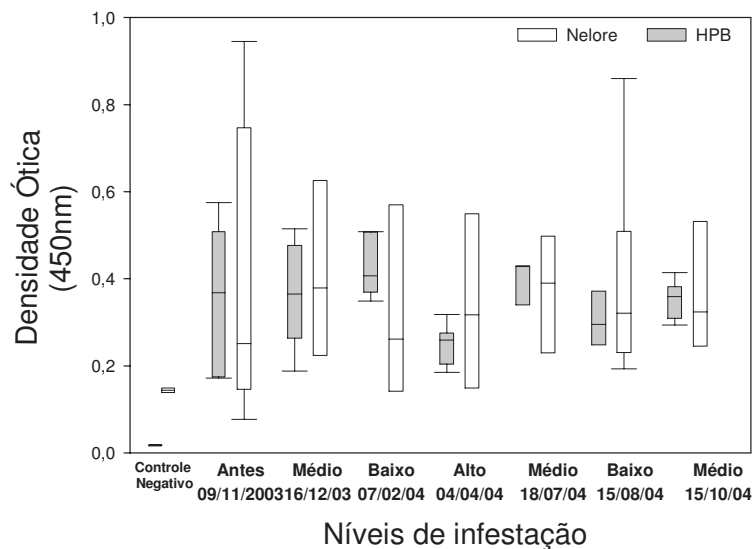


Figura 4. Níveis de anticorpos totais anti-saliva de carrapato *R. (B.) microplus* presentes no soro periférico de animais fenotipicamente resistentes (Nelore) e susceptíveis (HPB) a infestação pelo mesmo. O controle negativo se refere ao soro retirado de bezerros que nunca tiveram contato com o ectoparasita.

Tabela 4. Níveis de anticorpos IgG anti-saliva de *R. (B.) microplus* presentes no soro periférico de animais resistentes e susceptíveis submetidos a diferentes níveis de infestação. D ou d: comparação com a infestação anterior na mesma raça; A ou a: comparação entre os soros de animais resistentes e susceptíveis coletados na mesma data e com mesmo nível de exposição ao *R. (B.) microplus*; maiúsculas indicam diferença estatística significativa ($P < 0,05$).

Níveis de infestação	Níveis de Ig total anti-saliva (DO \pm DP)						
	Nenhum	Médio	Baixo	Alto	Médio	Baixo	Médio
Fenótipo							
Susceptível (HPB)	0,35 $\pm 0,18^a$	0,36 $\pm 0,13^{ad}$	0,42 $\pm 0,07^{ad}$	0,24 $\pm 0,05^{aD}$	0,39 $\pm 0,06^{aD}$	0,31 $\pm 0,07^{ad}$	0,35 $\pm 0,04^{ad}$
Resistente (Nelore)	0,42 $\pm 0,37^a$	0,42 $\pm 0,29^{ad}$	0,35 $\pm 0,03^{ad}$	0,34 $\pm 0,24^{ad}$	0,36 $\pm 0,16^{ad}$	0,40 $\pm 0,26^{ad}$	0,38 $\pm 0,02^{ad}$

5.2. Os níveis de infestação afetam a produção de subclasses de anticorpos em animais resistentes e susceptíveis ao carrapato *R. (B.) microplus*

5.2.1 . Imunoglobulinas e anticorpos da subclasse IgG1

Os resultados a seguir mostram a cinética de produção de imunoglobulina total do isótipo IgG1 e de anticorpos IgG1 antígenos-específicos em bovinos resistentes (Nelore) e susceptíveis (HPB) ao *R. (B.) microplus*, submetidos a diferentes níveis de infestação com o carrapato. A mensuração das imunoglobulinas e anticorpos do isótipo IgG1 presentes nos soros coletados em períodos estratégicos foi feita conforme já descrito em materiais e métodos. A infestação foi estimada através da média das contagens em bovinos susceptíveis nos diferentes períodos. A contagem mais alta se deu no mês de abril e a menor no mês de agosto.

Através dos resultados obtidos, pode-se observar que a cinética da produção de IgG1 total (Figura 5, Tabela 5) mostra uma diferença significativa durante o período de alta infestação ($P < 0,001$), onde os animais resistentes possuem maior quantidade dessa imunoglobulina circulante que os susceptíveis.

Pode-se observar também que as quantidades circulantes dessa imunoglobulina variam de acordo com os níveis de infestação. Em animais resistentes, após o período de alta infestação, estes níveis ficam mais estáveis que em animais susceptíveis, que sofrem uma queda brusca com posterior aumento de produção dessa imunoglobulina.

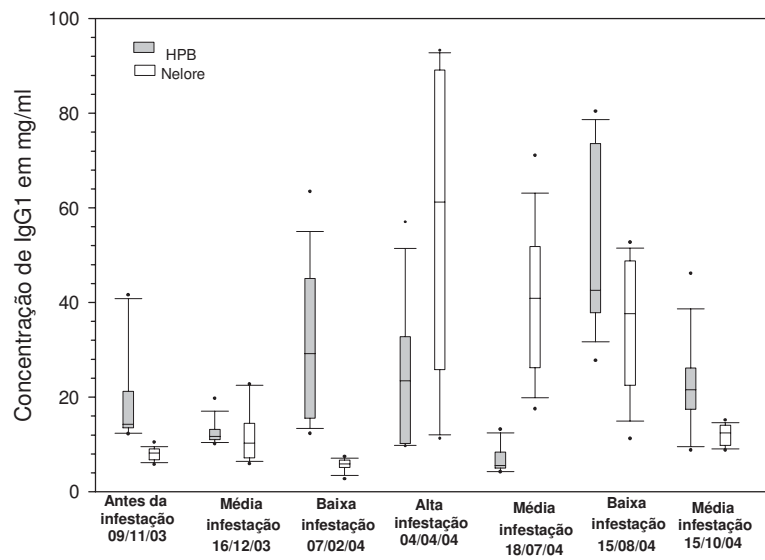


Fig. 5. Concentração de IgG1 em sangue periférico de bovinos com fenótipo resistente (R, nelore) e suscetível (S, HPB) ao carrapato *R. (B.) microplus* submetidos a infestação natural em diferentes datas de coleta.

Tabela 5. Níveis de IgG1 total presentes no soro periférico de animais resistentes e susceptíveis submetidos a diferentes níveis de infestação. D ou d: comparação com a infestação anterior na mesma raça; A ou a: comparação entre os soros de animais resistentes e susceptíveis coletados na mesma data e com mesmo nível de exposição ao *R. (B.) microplus*; maiúsculas indicam diferença estatística significativa ($P < 0,05$).

Níveis de infestação	Níveis de IgG1 em mg/ml \pm Desvio Padrão						
	Nenhum	Médio	Baixo	Alto	Médio	Baixo	Médio
Fenótipo							
Susceptível (HPB)	15,1 $\pm 3,2^A$	12,7 $\pm 2,7^{aD}$	36,0 $\pm 16,4^{AD}$	20,4 $\pm 8,6^{Ad}$	5,8 $\pm 1,7^{AD}$	52,1 $\pm 17,4^{AD}$	21,5 $\pm 5,4^{AD}$
Resistente (Nelore)	8,0 $\pm 1,4^A$	11,8 $\pm 6,0^{aD}$	5,6 $\pm 1,4^{AD}$	61,1 $\pm 13,6^{AD}$	40,2 $\pm 16,4^{Ad}$	37,8 $\pm 12,9^{Ad}$	12,1 $\pm 2,2^{AD}$

Os níveis de anticorpos IgG1 anti-extrato de ovo, larva não alimentada e saliva foram mensurados pela técnica de Elisa com leitura da densidade ótica a 450nm. Os resultados obtidos (Figuras 6 a 8, e Tabelas 6 a 8) revelam que, apesar dos animais resistentes possuírem níveis maiores de imunoglobulinas IgG1 durante o período de alta infestação, estes produzem menor quantidade de anticorpos IgG1 anti-extrato de ovo (Figura 6, Tabela 6) e IgG1 anti- extrato de larva não alimentada (Figura 7, Tabela 7) que os animais susceptíveis no mesmo período.

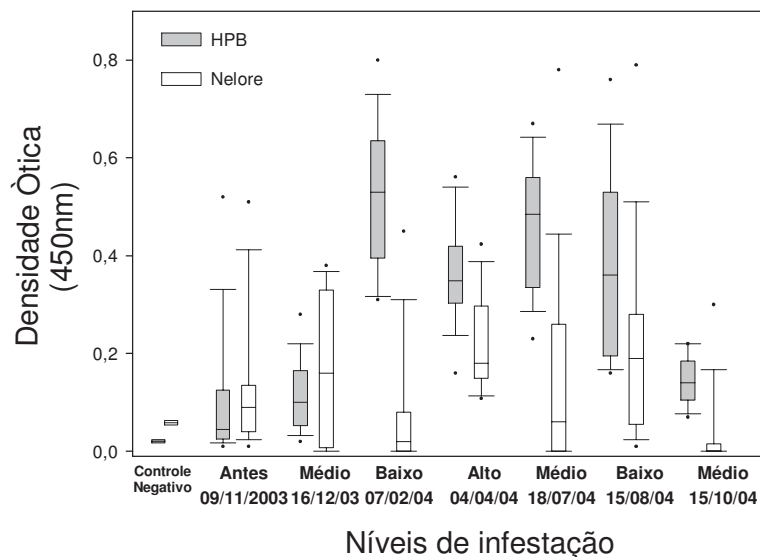


Figura 6. Níveis de anticorpos IgG1 anti-extrato de ovo de carrapato *R. (B.) microplus* presentes no soro periférico de animais fenotipicamente resistentes (nelore) e susceptíveis (HPB) a infestação pelo carrapato. O controle negativo se refere ao soro retirado de bezerros que nunca tiveram contato com o ectoparasita. Observar que os níveis de infestação influenciam na produção desses anticorpos, principalmente em animais da raça HPB.

Tabela 6. Níveis de anticorpos IgG1 anti-extrato de ovo do carrapato *R. (B.) microplus* presentes no soro periférico de animais resistentes e susceptíveis submetidos a diferentes níveis de infestação. D ou d: comparação com a infestação anterior na mesma raça; A ou a: comparação entre os soros de animais resistentes e susceptíveis coletados na mesma data e com mesmo nível de exposição ao *R. (B.) microplus*; maiúsculas indicam diferença estatística significativa ($P < 0,05$).

Níveis de IgG1 anti-EO (DO + DP)							
Níveis de infestação	Nenhum	Médio	Baixo	Alto	Médio	Baixo	
Animais							
Susceptível (HPB)	0,09 ± 0,01 ^a	0,07 ± 0,06 ^{AD}	0,52 ± 0,15 ^{AD}	0,36 ± 0,11 ^{AD}	0,46 ± 0,13 ^{AD}	0,38 ± 0,20 ^{AD}	0,14 ± 0,05 ^{AD}
Resistente (Nelore)	0,12 ± 0,05 ^a	0,05 ± 0,1 ^{AD}	0,07 ± 0,1 ^{Ad}	0,22 ± 0,10 ^{AD}	0,15 ± 0,12 ^{Ad}	0,21 ± 0,21 ^{ad}	0,03 ± 0,09 ^{AD}

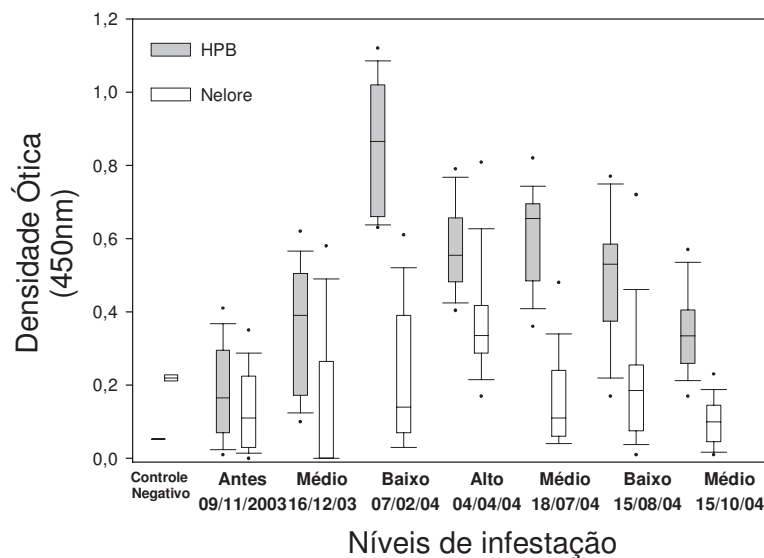


Figura 7. Níveis de anticorpos IgG1 anti-extrato de larva de carrapato *R. (B.) microplus* presentes no soro periférico de animais fenotipicamente resistentes (Nelore) e susceptíveis (HPB) a infestação pelo carrapato. O controle negativo se refere ao soro retirado de bezerros que nunca tiveram contato com o ectoparasita. Observar que os níveis de infestação influenciam na produção desses anticorpos, principalmente em animais da raça HPB.

Tabela 7. Níveis de anticorpos IgG1 anti-extrato de larva não ingurgitada de *R. (B.) microplus* presentes no soro periférico de animais resistentes e susceptíveis submetidos a diferentes níveis de infestação. D ou d: comparação com a infestação anterior na mesma raça; A ou a: comparação entre os soros de animais resistentes e susceptíveis coletados na

mesma data e com mesmo nível de exposição ao *R. (B.) microplus*; maiúsculas indicam diferença estatística significativa ($P < 0,05$).

Níveis de IgG1 anti-EL (DO + DP)							
Níveis de infestação	Nenhum	Médio	Baixo	Alto	Médio	Baixo	Médio
Animais							
Susceptível (HPB)	0,18 $\pm 0,03^a$	0,34 $\pm 0,18^{AD}$	0,84 $\pm 0,18^{AD}$	0,57 $\pm 0,12^{AD}$	0,6 $\pm 0,13^{AD}$	0,48 $\pm 0,18^{AD}$	0,34 $\pm 0,11^{AD}$
Resistente (Nelore)	0,11 $\pm 0,03^a$	0,13 $\pm 0,11^{Ad}$	0,20 $\pm 0,12^{AD}$	0,37 $\pm 0,16^{AD}$	0,14 $\pm 0,09^{Ad}$	0,19 $\pm 0,17^{Ad}$	0,02 $\pm 0,01^{AD}$

Em relação aos níveis de anticorpos IgG1 anti-saliva, não foi verificada nenhuma diferença entre as raças avaliadas, porém os níveis de infestação são capazes de modular a produção dos mesmos (Figura 8, Tabela 8). Este fato pode ser evidenciado em períodos de alta infestação onde os níveis de anticorpos IgG1 anti-saliva são mínimos, sendo seguidos de um aumento significativo no período posterior de menor infestação.

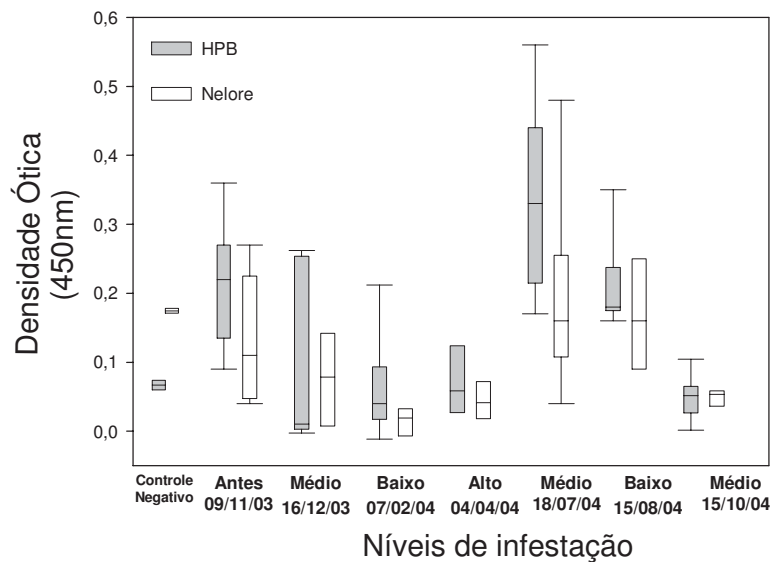


Figura 8. Níveis de anticorpos IgG1 anti-saliva de carrapato *R. (B.) microplus* presentes no soro periférico de animais fenotipicamente resistentes (Nelore) e suscetíveis (HPB) a

infestação pelo carrapato. O controle negativo se refere ao soro retirado de bezerros que nunca tiveram contato com o ectoparasita.

Tabela 8. Níveis de anticorpos IgG1 anti-saliva de *R. (B.) microplus* presentes no soro periférico de animais resistentes e susceptíveis submetidos a diferentes níveis de infestação D ou d: comparação com a infestação anterior na mesma raça; A ou a: comparação entre os soros de animais resistentes e susceptíveis coletados na mesma data e com mesmo nível de exposição ao *R. (B.) microplus*; maiúsculas indicam diferença estatística significativa ($P < 0,05$).

Níveis de infestação	Níveis de IgG1 anti-saliva ($DO \pm DP$)						
	Nenhum	Médio	Baixo	Alto	Médio	Baixo	Médio
Fenótipo							
Susceptível (HPB)	0,212 $\pm 0,102^a$	0,105 $\pm 0,138^{ad}$	0,06 $\pm 0,008^{ad}$	0,07 $\pm 0,007^{ad}$	0,33 $\pm 0,15^{ad}$	0,21 $\pm 0,07^{ad}$	0,048 $\pm 0,03^{ad}$
Resistente (Nelore)	0,136 $\pm 0,101^a$	0,07 $\pm 0,008^{ad}$	0,01 $\pm 0,002^{ad}$	0,04 $\pm 0,03^{ad}$	0,19 $\pm 0,16^{ad}$	0,17 $\pm 0,09^{ad}$	0,047 $\pm 0,01^{ad}$

5.2.2. Imunoglobulinas e anticorpos da subclasse IgG2

Os resultados a seguir mostram a cinética de produção dos isótipos de imunoglobulinas totais e de anticorpos IgG2 em bovinos resistentes (Nelore) e susceptíveis (HPB) ao carrapato *R. (B.) microplus*, submetidos a diferentes níveis de infestação com o mesmo.

Através dos resultados obtidos pode-se observar que a cinética da produção de IgG2 total mostra uma diferença significativa durante o período de alta infestação ($p < 0,001$), no qual animais resistentes possuem níveis maiores dessa imunoglobulina circulante (Figura 9, Tabela 9), apesar do menor número de parasitas sobre eles e, conseqüentemente, menor exposição a antígenos. No período posterior à alta infestação os animais da raça Nelore sofrem uma queda brusca nos níveis circulantes dessa imunoglobulina, sendo esta característica mantida nos próximos períodos em que foram avaliados. Os animais susceptíveis possuem um comportamento contrastante em relação à produção de imunoglobulinas IgG2. Em períodos de alta infestação, apesar do maior número de parasitas sobre os animais, sua produção é

significativamente menor do que em animais resistentes, sofrendo um aumento significativo dos níveis circulantes após esse período. Nos animais suscetíveis também se observa uma queda significativa de imunoglobulina IgG2 total em relação à amostra coletada durante o ciclo anterior.

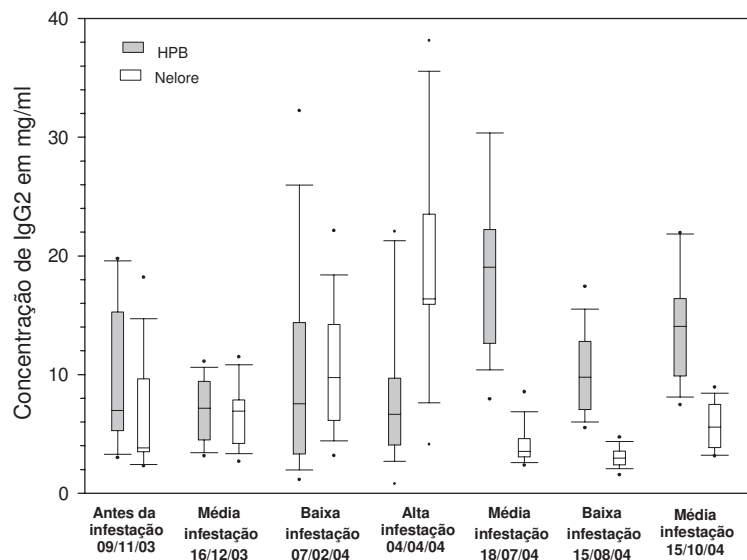


Figura 9. Concentração de imunoglobulina IgG2 em sangue periférico de bovinos com fenótipo resistente (Nelore) e suscetível (HPB) ao carrapato *R. (B.) microplus* submetidos a infestação natural em diferentes datas de coleta.

Tabela 9. Níveis de IgG2 total presente no soro periférico de animais resistentes e susceptíveis submetidos a diferentes níveis de infestação. D ou d: comparação com a infestação anterior na mesma raça; A ou a: comparação entre os soros de animais resistentes e susceptíveis coletados na mesma data e com mesmo nível de exposição ao *R. (B.) microplus*; maiúsculas indicam diferença estatística significativa ($P < 0,05$).

Níveis de infestação	Níveis de IgG2 em mg/ml \pm Desvio Padrão						
	Nenhum	Médio	Baixo	Alto	Médio	Baixo	Médio
Fenótipo							
Susceptível HPB	9,8 $\pm 6,1^A$	7,0 $\pm 3,0^{ad}$	10,5 $\pm 9,3^{ad}$	8,4 $\pm 6,6^{AD}$	19,15 $\pm 8,68^{AD}$	10,19 $\pm 3,6^{AD}$	13,9 $\pm 4,8^{Ad}$
Resistente Nelore	6,8 $\pm 5,0^A$	6,5 $\pm 2,7^{ad}$	10,3 $\pm 5,6^{ad}$	19,23 $\pm 10,23^{Ad}$	4,0 $\pm 1,7^{AD}$	3,0 $\pm 0,8^{Ad}$	5,7 $\pm 2,0^{Ad}$

Quando se avalia a produção de anticorpos IgG2 anti-extrato de ovo (Figura 10, Tabela 10) podemos observar maiores níveis desse isotipo em todas as coletas nos animais da raça HPB ($p < 0,02$). Os animais susceptíveis, portanto, também sofrem maior influência dos níveis de infestação sobre a produção de anticorpos anti-extrato de ovo, demonstrada pela forte oscilação na produção destes, o que não ocorre nos animais da raça Nelore.

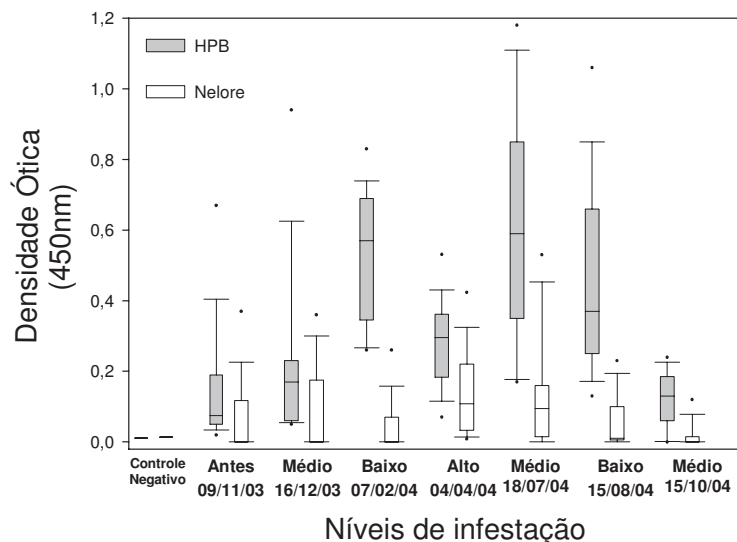


Figura 10. Níveis de anticorpos IgG2 anti-extrato de ovo de carrapato *R. (B.) microplus* presentes no soro periférico de animais fenotipicamente resistentes e suscetíveis a infestação pelo carrapato. O controle negativo se refere ao soro retirado de bezerros que nunca tiveram contato com o ectoparasita.

Tabela 10. Níveis de anticorpos IgG2 anti-extrato de ovo do carrapato *R. (B.) microplus* presente no soro periférico de animais resistentes e susceptíveis submetidos a diferentes níveis de infestação. D ou d: comparação com a infestação anterior na mesma raça; A ou a: comparação entre os soros de animais resistentes e susceptíveis coletados na mesma data e com mesmo nível de exposição ao *R. (B.) microplus*; maiúsculas indicam diferença estatística significativa ($P < 0,05$).

Níveis de infestação	Níveis de IgG2 anti-EO (DO \pm DP)						
	Nenhum	Médio	Baixo	Alto	Médio	Baixo	Médio
Animais							
Susceptível (Lore)	0,15 $\pm 0,18^A$	0,33 $\pm 0,45^{AD}$	0,56 $\pm 0,24^{AD}$	0,28 $\pm 0,12^{AD}$	0,61 $\pm 0,33^{AD}$	0,51 $\pm 0,31^{AD}$	0,10 $\pm 0,08^{AD}$
Resistente (Nelore)	0,09 $\pm 0,2^A$	0,05 $\pm 0,12^{Ad}$	0,09 $\pm 0,2^{AD}$	0,13 $\pm 0,12^{Ad}$	0,17 $\pm 0,16^{Ad}$	0,04 $\pm 0,07^{AD}$	0,02 $\pm 0,01^{AD}$

A produção de anticorpos IgG2 anti-extrato de larva não alimentada é maior durante e após o período de alta infestação, em animais susceptíveis ao carrapato *R. (B.) microplus* (Figura 11, Tabela 11). Em ambas as raças ocorre queda nos níveis de anticorpos IgG2 anti-extrato de larva durante o período de alta infestação com posterior aumento no período seguinte, sendo a discrepância maior em animais susceptíveis, sugerindo uma imunomodulação mais forte nesses animais.

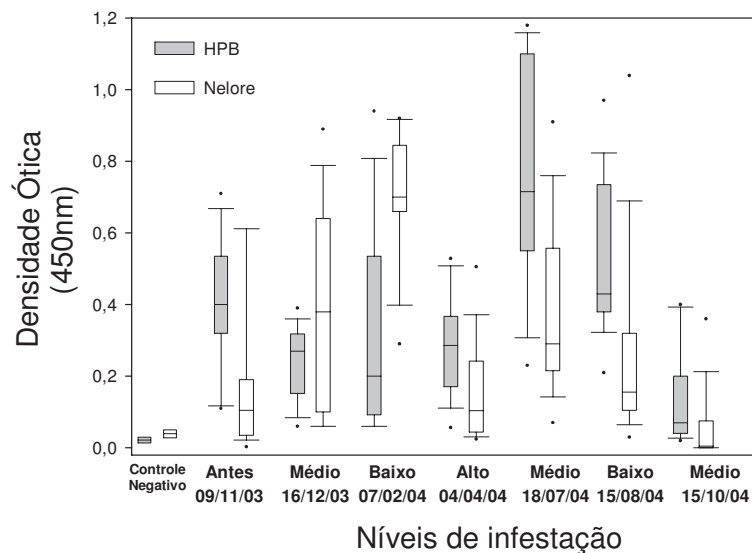


Figura 11. Níveis de anticorpos IgG2 anti-extrato de larva de carrapato *R. (B.) microplus* presentes no soro periférico de animais fenotipicamente resistentes (Nelore) e suscetíveis (HPB) a infestação pelo carrapato. O controle negativo se refere ao soro retirado de bezerros que nunca tiveram contato com o ectoparasita.

Tabela 11. Níveis de anticorpos IgG2 anti-extrato de larva não ingurgitada de *R. (B.) microplus* presentes no soro periférico de animais resistentes e susceptíveis submetidos a diferentes níveis de infestação. D ou d: comparação com a infestação anterior na mesma raça; A ou a: comparação entre os soros de animais resistentes e susceptíveis coletados na mesma data e com mesmo nível de exposição ao *R. (B.) microplus*; maiúsculas indicam diferença estatística significativa ($P < 0,05$).

Níveis de infestação	Níveis de IgG2 anti-EL (DO \pm DP)						
	Nenhum	Médio	Baixo	Alto	Médio	Baixo	Médio
Animais							
Susceptível (HPB)	0,40 $\pm 0,18^A$	0,24 $\pm 0,10^{ad}$	0,32 $\pm 0,30^{Ad}$	0,28 $\pm 0,14^{Ad}$	0,76 $\pm 0,32^{AD}$	0,52 $\pm 0,22^{AD}$	0,14 $\pm 0,14^{AD}$
Resistente (Nelore)	0,21 $\pm 0,4^A$	0,38 $\pm 0,3^{ad}$	0,70 $\pm 0,19^{AD}$	0,15 $\pm 0,14^{AD}$	0,38 $\pm 0,24^{AD}$	0,26 $\pm 0,28^{AD}$	0,05 $\pm 0,1^{AD}$

Em ambas as raças ocorrem influência dos níveis de infestação sobre a produção de anticorpos IgG2 anti-saliva (Figura 12, Tabela 12).

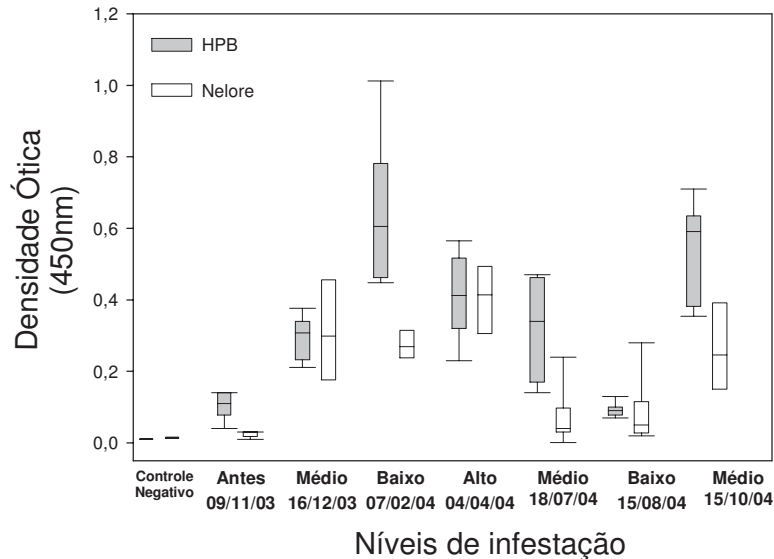


Figura 12. Níveis de anticorpos IgG2 anti-saliva de carrapato *R. (B.) microplus* presentes no soro periférico de animais fenotipicamente resistentes (Nelore) e suscetíveis (HPB) a infestação pelo carrapato. O controle negativo se refere ao soro retirado de bezerras que nunca tiveram contato com o ectoparasita.

Tabela 12. Níveis de anticorpos IgG2 anti-saliva de *R. (B.) microplus* presente no soro periférico de animais resistentes e susceptíveis submetidos a diferentes níveis de infestação. D ou d: comparação com a infestação anterior na mesma raça; A ou a: comparação entre os soros de animais resistentes e susceptíveis coletados na mesma data e com mesmo nível de exposição ao *R. (B.) microplus*; maiúsculas indicam diferença estatística significativa ($P < 0,05$).

Níveis de infestação	Níveis de IgG2 anti-saliva ($DO \pm DP$)						
	Nenhum	Médio	Baixo	Alto	Médio	Baixo	Médio
Fenótipo							
Susceptível (HPB)	0,104 $\pm 0,04^A$	0,29 $\pm 0,06^{aD}$	0,64 $\pm 0,22^{AD}$	0,41 $\pm 0,13^{ad}$	0,31 $\pm 0,15^{Ad}$	0,09 $\pm 0,02^{AD}$	0,53 $\pm 0,15^{aD}$
Resistente (Nelore)	0,02 $\pm 0,008^A$	0,31 $\pm 0,18^{aD}$	0,27 $\pm 0,05^{Ad}$	0,40 $\pm 0,14^{ad}$	0,07 $\pm 0,09^{AD}$	0,08 $\pm 0,1^{Ad}$	0,27 $\pm 0,19^{aD}$

5.2.3. Produção de imunoglobulinas e anticorpos no soro extraído do local de fixação do carrapato

Ao avaliar o soro retirado do local de fixação do parasita e de pele não parasitada, após o primeiro contato com o parasita e após alta infestação, pode-se observar que os animais resistentes possuem um nível de IgG1 menor ($P=0,041$) que os susceptíveis, porém sem diferença entre os diferentes locais de coleta (Figura 13). Podemos observar, também, que há um aumento dos níveis de IgG1 em períodos de alta infestação, sem tampouco haver diferença significativa entre os diferentes locais de coleta das amostras em ambas as raças.

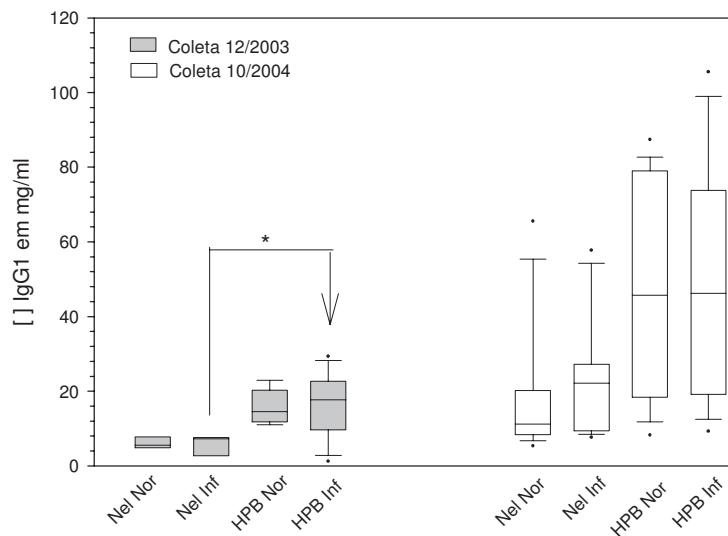


Figura 13. Concentração de IgG1 em soros extraídos de biópsias de bovinos com fenótipo resistente (Nelore) e susceptível (HPB) ao carrapato *R. (B.) microplus* em diferentes datas de coleta. Não há diferença significativa entre as quantidades de IgG1 presentes nas biópsias infestadas e normais. *Diferença estatística significativa ($P= 0,041$) entre os níveis de IgG1 no sangue proveniente de biópsias de animais da raça HPB e Nelore.

A avaliação do soro retirado do local de fixação do parasita e de pele não parasitada, após o primeiro contato com o parasita e após alta infestação, mostra que não há uma diferença estatística significativa entre a produção de IgG2 em ambos os grupos nos períodos avaliados (Figura 14).

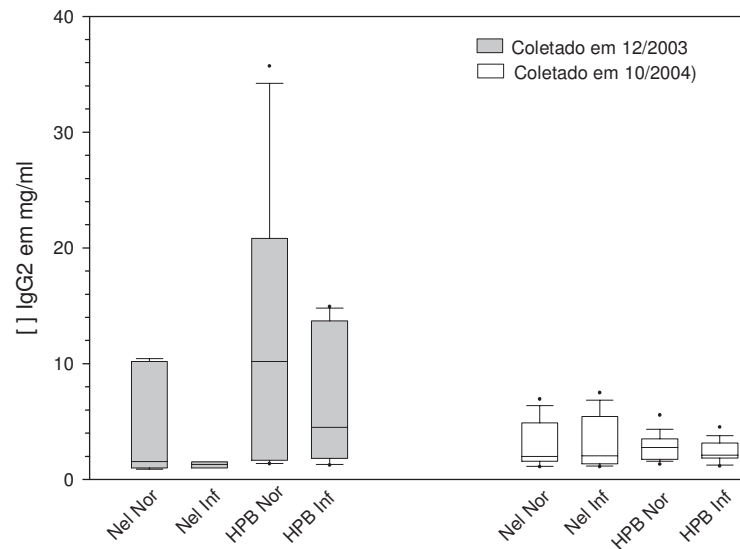


Figura 14. Concentração de IgG2 em soros extraídos de biópsias de bovinos com fenótipo resistente (Nelore) e susceptível (HPB) ao carrapato *B. microplus* coletados em períodos de baixa infestação sem contato prévio (12/2003) e alta infestação (10/2004). Não há diferença significativa nas quantidades de IgG2 presentes nas diferentes biópsias infestadas e normais.

Também foi feita a avaliação dos níveis de anticorpos, contra antígenos do carrapato, no soro retirado do local de fixação do parasita e de pele não parasitada, após alta infestação.

No caso de anticorpos anti-extrato de ovo (Figura 15), anti-extrato de larva não-ingurgitada (Figura 16) e anti-saliva (Figura 17) podemos observar, para os isotipos IgG1, IgG2 e IgE, que há uma diferença estatística significativa entre a produção em ambos os grupos, refletindo os resultados obtidos com o soro periférico. Não há diferença na quantidade de qualquer isotipo de anticorpo presente em pele normal ou com parasita fixado, numa mesma raça, no período avaliado.

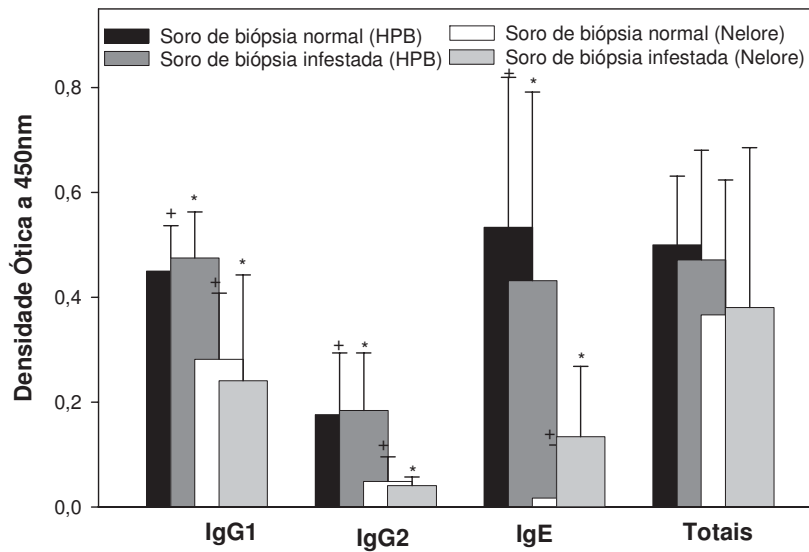


Figura 15. Níveis médios de anticorpos anti-extrato de ovo de carrapato *R. (B.) microplus* presentes no soro coletado de biópsia de pele infestada (com carrapato fixado) ou normal (sem o carrapato fixado) em período posterior a alta infestação. Há diferença estatística significativa entre os níveis de anticorpos proveniente de biópsias normais (+; $P < 0,04$) e infestadas (*; $P < 0,03$) de animais susceptíveis (HPB) e resistentes (Nelore) ao *R. (B.) microplus*.

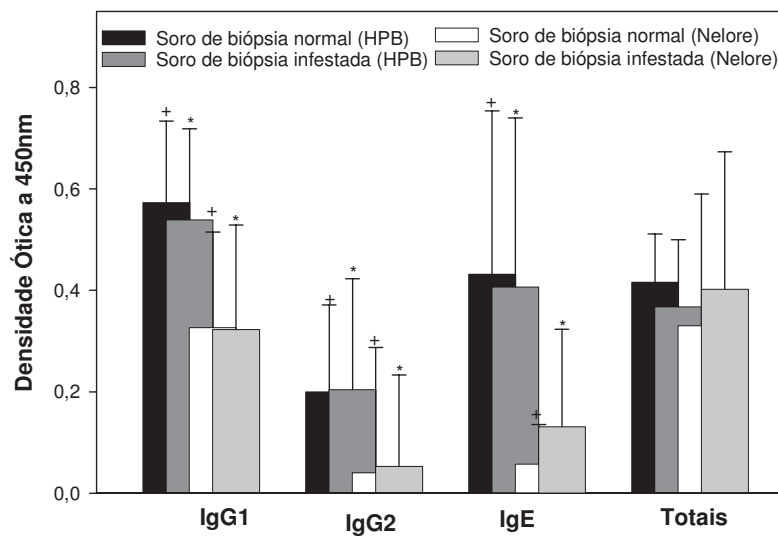


Figura 16. Níveis médios de anticorpos anti-extrato de larva não-ingurgitada de carrapato *R. (B.) microplus* presentes no soro coletado de biópsia de pele infestada (com carrapato fixado) ou normal (sem o carrapato fixado) em período posterior a alta infestação. Há diferença estatística significativa entre os níveis de anticorpos proveniente de biópsias normais (+; $P < 0,05$) e infestadas (*; $P < 0,03$) de animais susceptíveis (HPB) e resistentes (Nelore) ao *R. (B.) microplus*.

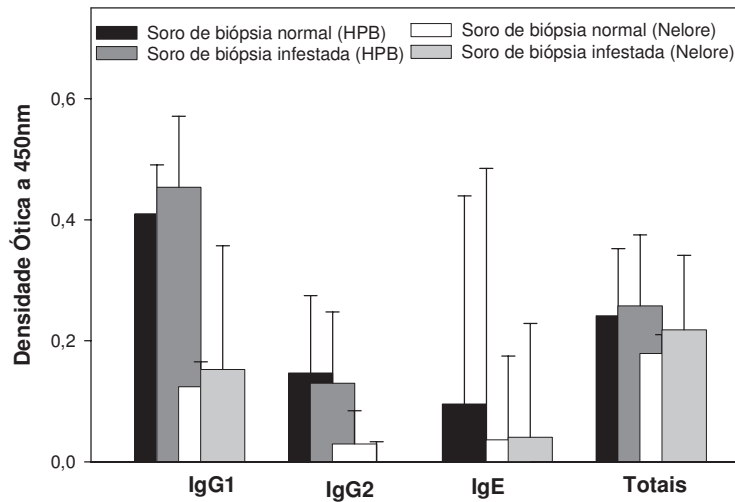


Figura 17. Níveis médios de anticorpos anti-saliva de carrapato *R. (B.) microplus* presentes no soro coletado de biópsia de pele infestada (com carrapato fixado) ou normal (sem o carrapato fixado) em período posterior a alta infestação. Há diferença estatística significativa entre os níveis de anticorpos proveniente de biópsias normais (+; $P < 0,007$) e infestadas (*; $P < 0,001$) de animais susceptíveis (HPB) e resistentes (Nelore) ao *R. (B.) microplus*.

5.3. A frequência de alótipos de IgG2 dos animais usados nos experimentos varia de acordo com o fenótipo de infestação

Os dois principais alótipos de IgG2 em bovinos são a IgG2^a (antigo alelo sorológico A1 e atual $\gamma 2^a$) e a IgG2^b (antigo alelo sorológico A2 e atual $\gamma 2^b$). O alótipo $\gamma 2^b$ é mais eficiente em ativar a cascata de complemento pela via clássica que a $\gamma 2^a$ (BASTIDA-CORCUERA, 1999). Fenotipamos, numa avaliação preliminar, os animais usados no experimento (Tabela 13) empregando dois soros anti-alótipos que distinguem homozigotos para $\gamma 2^b$ ou homozigotos para $\gamma 2^a$ ou heterozigotos $\gamma 2^a\gamma 2^b$.

Tabela 13. Alótipos de IgG2 dos animais usados nos experimentos.

Animais susceptíveis (HPB)	Alótipo de IgG2	Animais resistentes (Nelore)	Alótipo de IgG2
01	$\gamma 2^b$	13	$\gamma 2^b$
02	$\gamma 2^a$ ou $\gamma 2^a \gamma 2^b$	14	$\gamma 2^b$
03	$\gamma 2^b$	15	$\gamma 2^b$
04	$\gamma 2^b$	16	$\gamma 2^b$
05	$\gamma 2^a$ ou $\gamma 2^a \gamma 2^b$	17	$\gamma 2^b$
06	$\gamma 2^a$ ou $\gamma 2^a \gamma 2^b$	18	$\gamma 2^b$
07	$\gamma 2^a$ ou $\gamma 2^a \gamma 2^b$	19	$\gamma 2^b$
08	$\gamma 2^a$ ou $\gamma 2^a \gamma 2^b$	20	$\gamma 2^b$
09	$\gamma 2^a$ ou $\gamma 2^a \gamma 2^b$	21	$\gamma 2^b$
10	$\gamma 2^a$ ou $\gamma 2^a \gamma 2^b$	22	$\gamma 2^a$ ou $\gamma 2^a \gamma 2^b$
11	$\gamma 2^a$ ou $\gamma 2^a \gamma 2^b$	23	$\gamma 2^b$
12	$\gamma 2^a$ ou $\gamma 2^a \gamma 2^b$	24	$\gamma 2^a$ ou $\gamma 2^a \gamma 2^b$

O teste do chi quadrado mostra que a frequência dos genótipos $\gamma 2^b \gamma 2^b$ é significativamente ($P = 0,014$) mais alta entre os bovinos resistentes ao carrapato dos que os genótipos $\gamma 2^a \gamma 2^b$ e $\gamma 2^a \gamma 2^a$, que são mais frequentes entre os bovinos suscetíveis (Figura 18 e Anexo 2).

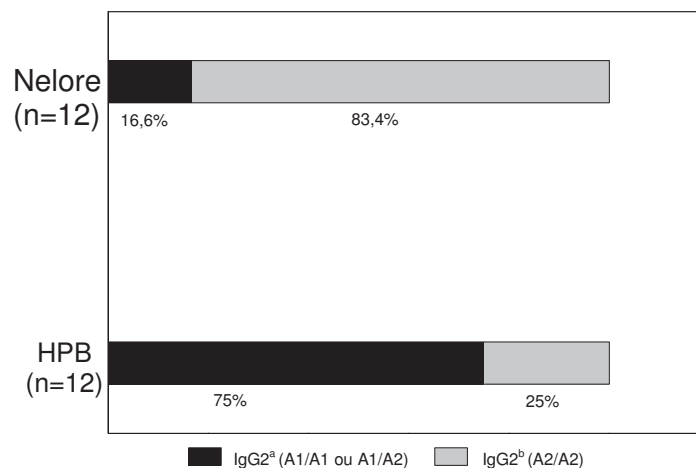


Figura 18. Frequência dos alótipos de IgG2 nos animais resistentes e suscetíveis ao carrapato *R. (B.) microplus*.

5.4. OS NÍVEIS DE ANTICORPOS IGE ANTI-EXTRATO DE OVO, LARVA E SALIVA SÃO MAIORES EM ANIMAIS SUSCEPTÍVEIS

Os níveis de anticorpos IgE anti-extrato de ovo em animais resistentes sofreram um aumento durante o primeiro contato com o carrapato *R. (B.) microplus*, seguido de uma queda contínua nos períodos posteriores. Os animais susceptíveis possuem maiores níveis circulantes desses anticorpos quando comparados aos animais resistentes. Após o período de alta infestação os níveis destes sofrem uma queda brusca sugerindo algum efeito da quantidade de carrapatos fixados sobre a sua produção e/ou depuração (Figura 19, Tabela 14) mas voltam a subir após um certo período.

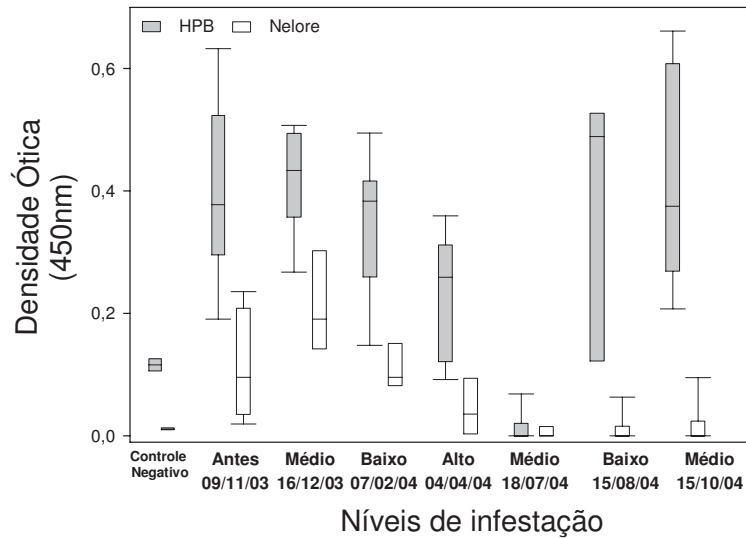


Figura 19. Níveis de anticorpos IgE anti-extrato de ovo de *R. (B.) microplus*. O controle negativo se refere ao soro retirado de bezerros que nunca tiveram contato com o ectoparasita. Observar a diferença na produção entre ambas as raças e conforme os níveis de infestação, principalmente nos animais da raça HPB.

Tabela 14. Níveis de anticorpos IgE anti-extrato de ovo de *R. (B.) microplus* presentes no soro periférico de animais resistentes e susceptíveis submetidos a diferentes níveis de infestação ao carrapato. D ou d: comparação com a infestação anterior na mesma raça; A ou a: comparação entre os soros de animais resistentes e susceptíveis coletados na mesma data e com mesmo nível de exposição ao *R. (B.) microplus*; maiúsculas indicam diferença estatística significativa ($P < 0,05$).

Níveis de infestação	Níveis de IgE anti-EO (DO \pm DP)						
	Nenhum	Médio	Baixo	Alto	Médio	Baixo	Médio
Fenótipo							
Susceptível (HPB)	0,40 $\pm 0,16^A$	0,41 $\pm 0,09^{Ad}$	0,34 $\pm 0,12^{Ad}$	0,22 $\pm 0,11^{AD}$	0,01 $\pm 0,03^{AD}$	0,3 $\pm 0,2^{AD}$	0,41 $\pm 0,19^{Ad}$
Resistente (Nelore)	0,11 $\pm 0,09^A$	0,22 $\pm 0,13^{AD}$	0,11 $\pm 0,04^{AD}$	0,04 $\pm 0,05^{AD}$	0,007 $\pm 0,01^{AD}$	0,01 $\pm 0,002^{AD}$	0,01 $\pm 0,04^{Ad}$

A produção de anticorpos IgE anti-extrato de larva não ingurgitada segue praticamente o mesmo comportamento que os anti-extrato de ovo, como pode ser

observado a seguir. A diferença se encontra no fato de ambas as raças possuírem níveis circulantes indetectáveis desses anticorpos após sofrerem uma alta infestação. Essa condição é mantida em animais resistentes, ao contrário dos susceptíveis cujos níveis aumentam significativamente (Figura 20, Tabela 15).

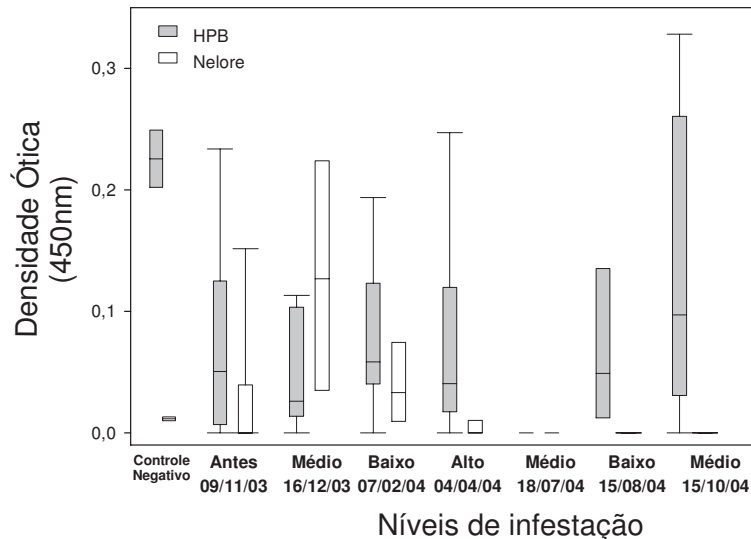


Figura 20. Níveis de anticorpos IgE anti-extrato de larva de *R. (B.) microplus*. O controle negativo se refere ao soro retirado de bezerros que nunca tiveram contato com o ectoparasita. Observar a diferença na produção entre ambas as raças conforme os níveis de infestação.

Tabela 15. Níveis de anticorpos IgE anti-extrato de larva não-ingurgitada de *R. (B.) microplus* presente no soro periférico de animais resistentes e susceptíveis submetidos a diferentes níveis de infestação com carrapato. D ou d: comparação com a infestação anterior na mesma raça; A ou a: comparação entre os soros de animais resistentes e susceptíveis coletados na mesma data e com mesmo nível de exposição ao *R. (B.) microplus*; maiúsculas indicam diferença estatística significativa ($P < 0,05$).

Níveis de infestação	Níveis de IgE anti-EL (DO \pm DP)						
	Nenhum	Médio	Baixo	Alto	Médio	Baixo	Médio
Fenótipo							
Susceptível (HPB)	0,07 $\pm 0,09^A$	0,05 $\pm 0,05^{Ad}$	0,08 $\pm 0,07^{Ad}$	0,07 $\pm 0,09^{Ad}$	0,0 $\pm 0,0^{ad}$	0,07 $\pm 0,08^{AD}$	0,14 $\pm 0,13^{AD}$
Resistente (Nelore)	0,03 $\pm 0,06^A$	0,12 $\pm 0,11^{AD}$	0,04 $\pm 0,04^{AD}$	0,005 $\pm 0,001^{AD}$	0,00 $\pm 0,0^{ad}$	0,00 $\pm 0,000^{Ad}$	0,0 $\pm 0,0^{Ad}$

Os níveis de anticorpos IgE anti-saliva de *R. (B.) microplus* são significativamente maiores em animais susceptíveis. Estes também sofrem uma modulação e/ou depuração após o período de alta infestação. Os animais resistentes produzem anticorpos IgE anti-saliva somente após o primeiro contato com o carrapato; nos períodos seguintes os níveis desses anticorpos são indetectáveis (Figura 21, Tabela 16).

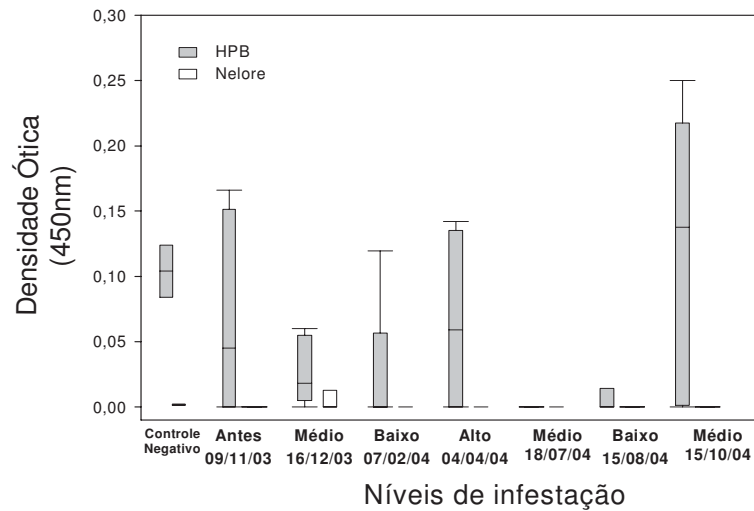


Figura 21. Níveis de anticorpos IgE anti-saliva de *R. (B.) microplus*. O controle negativo se refere ao soro retirado de bezerros que nunca tiveram contato com o ectoparasita. Observar a diferença na produção entre ambas as raças conforme os níveis de infestação.

Tabela 16. Níveis de anticorpos IgE anti-saliva de *R. (B.) microplus* presente no soro periférico de animais resistentes e susceptíveis submetidos a diferentes níveis de infestação com o carrapato. D ou d: comparação com a infestação anterior na mesma raça; A ou a: comparação entre os soros de animais resistentes e susceptíveis coletados na mesma data e com mesmo nível de exposição ao *R. (B.) microplus*; maiúsculas indicam diferença estatística significativa ($P < 0,05$).

Níveis de infestação	Níveis de IgE anti-saliva ($DO \pm DP$)						
	Nenhum	Médio	Baixo	Alto	Médio	Baixo	Médio
Fenótipo							
Susceptível (HPB)	0,07 $\pm 0,07^A$	0,02 $\pm 0,006^{AD}$	0,03 $\pm 0,05^{Ad}$	0,06 $\pm 0,06^{AD}$	0,0 $\pm 0,0^{AD}$	0,06 $\pm 0,001^{AD}$	0,11 $\pm 0,11^{Ad}$
Resistente (Nelore)	0,0 $\pm 0,0^A$	0,006 $\pm 0,01^{AD}$	0,0 $\pm 0,0^{AD}$	0,0 $\pm 0,0^{Ad}$	0,00 $\pm 0,0^{ad}$	0,00 $\pm 0,000^{Ad}$	0,0 $\pm 0,0^{Ad}$

5.5 Níveis de Proteínas de Fase Aguda (APP) produzidos pelos animais resistentes e susceptíveis a infestação com *R. (B.) microplus*

Para verificar se os níveis de infestação com o carrapato *R. (B.) microplus* provocam alteração na produção das principais APPs e, conseqüentemente, na modulação da resposta inflamatória desenvolvida por bovinos resistentes e susceptíveis, foi feita a dosagem sérica destas nas diferentes coletas efetivadas, conforme já descrito em materiais e métodos. Os resultados obtidos para cada uma dessas proteínas estão sob forma de gráfico, mostrados abaixo.

5.5.1 Amilóide A Sérica (SAA)

Os níveis de amilóide A sérica variaram de indetectáveis, em ambas as raças no período de média infestação, a diferenciais entre os animais resistentes e susceptíveis no período após a alta infestação (Figura 22).

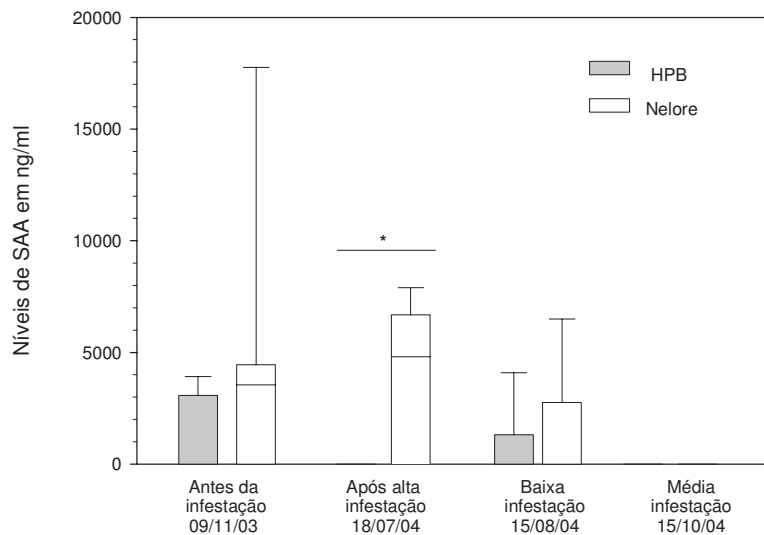


Figura 22. Níveis de amilóide A no soro periférico de animais infestados pelo carrapato *B. microplus*. Não há diferença estatística significativa entre as diferentes coletas dos animais da raça Nelore e HPB. Há diferença estatística significativa (* $p=0,048$) entre ambas as raças somente no período após a alta infestação.

5.5.2. Haptoglobulina (Hp)

Os níveis da Hp variaram no soro dos animais de acordo com os níveis de infestação, não havendo diferença estatística significativa entre as raças susceptível e resistente ao carrapato (Figura 23).

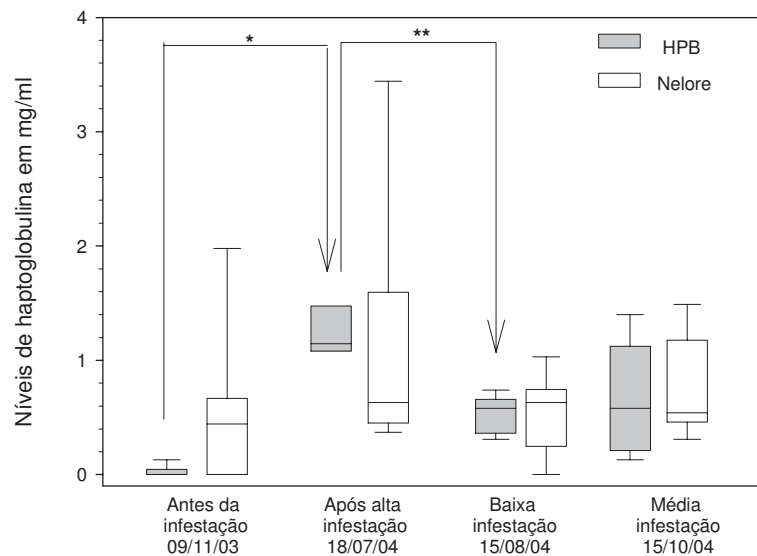


Figura 23. Níveis de haptoglobulina no soro periférico de animais infestados pelo carrapato *B. microplus*. Não há diferença estatística significativa entre as diferentes coletas dos animais da raça Nelore nem tampouco entre ambas as raças nas coletas especificadas. Há diferença estatística significativa entre animais da raça HPB nos tempos especificados (* $p < 0,001$ e ** $p = 0,08$)

5.5.3. Glicoproteína ácida alpha-1 (α -1AGP)

Os animais susceptíveis ao carrapato possuem uma quantidade circulante maior dessa APP sendo estatisticamente diferente nos períodos antes da exposição à infestação pelo carrapato *R. (B.) microplus* e durante o período de alta infestação (Figura 24).

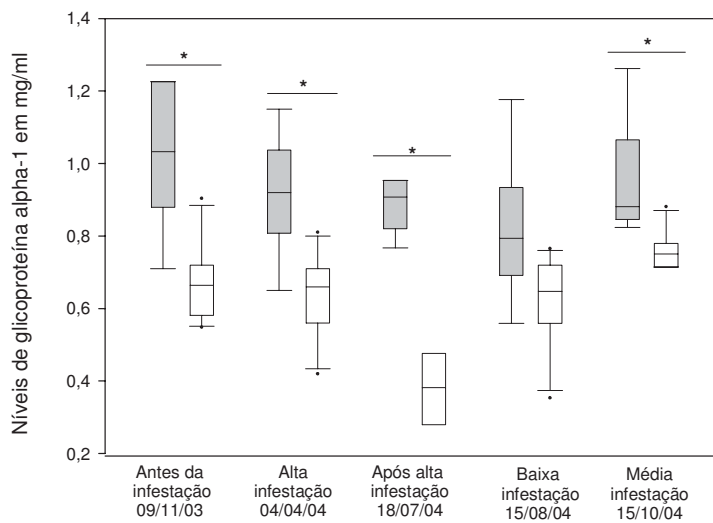


Figura 24. Níveis de glicoproteína alpha-1 no soro periférico de animais infestados pelo carrapato *B. microplus*. Há diferença estatística significativa entre ambas as raças em todos os períodos citados (* $p < 0,05$), exceto no de baixa infestação. Não há diferença estatística significativa entre as diferentes coletas dos animais da raça HPB porém, nos animais da raça nelore, ocorre uma diferença significativa entre os períodos de alta infestação, o anterior e posterior.

5.5.4. Transferrina sérica

Os níveis de transferrina sérica variaram entre os animais de acordo com os níveis de infestação, porém não houve diferença significativa entre os fenótipos resistentes e susceptíveis ao *R. (B.) microplus* (Figura 25).

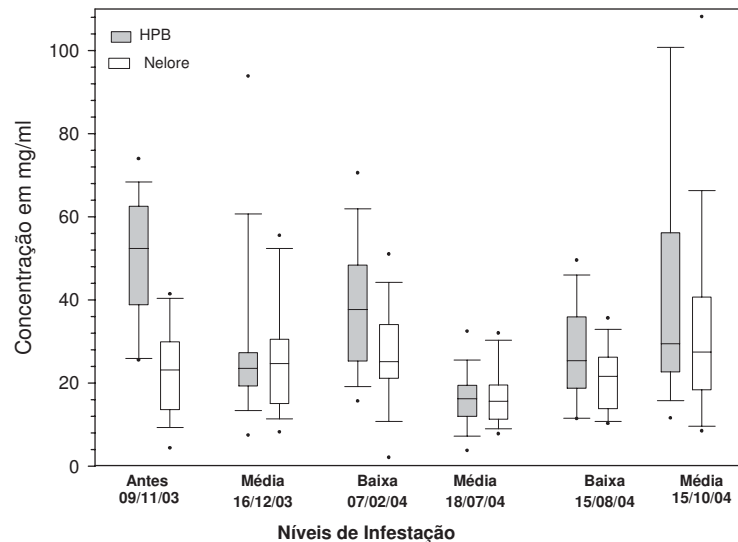


Figura 25. Concentração de transferrina em sangue periférico de bovinos com fenótipo resistente (Nelore) e suscetível (HPB) ao carrapato *B. microplus* submetidos à infestação natural em diferentes datas de coleta.

Tabela 17. Níveis de transferrina em sangue periférico de bovinos com fenótipo resistente (Nelore) e suscetível (HPB) ao carrapato *B. microplus* submetidos à infestação natural em diferentes datas de coleta. D ou d: comparação com a infestação anterior na mesma raça; A ou a: comparação entre os soros de animais resistentes e susceptíveis coletados na mesma data e com mesmo nível de exposição ao *R. (B.) microplus*; maiúsculas indicam diferença estatística significativa ($P < 0,05$).

Níveis de infestação	Níveis de Transferrina em mg/ml \pm Desvio Padrão					
	Nenhum	Médio	Baixo	Médio	Baixo	Médio
Fenótipo						
Susceptível (HPB)	50,23 $\pm 11,43^A$	29,38 $\pm 22,69^{aD}$	38,49 $\pm 16,11^{aD}$	16,27 $\pm 7,33^{aD}$	27,31 $\pm 12,84^{aD}$	43,7 $\pm 33,6^{ad}$
Resistente (Nelore)	22,79 $\pm 11,37^A$	26,68 $\pm 14,73^{ad}$	27,16 $\pm 12,97^{ad}$	16,64 $\pm 7,76^{aD}$	20,93 $\pm 10,21^{ad}$	33,56 $\pm 26,05^{ad}$

5.6. OS NÍVEIS DE ÓXIDO NÍTRICO PRODUZIDOS NO SORO PERIFÉRICO DE ANIMAIS RESISTENTES E SUSCETÍVEIS VARIAM DE ACORDO COM OS NÍVEIS DE INFESTAÇÃO

A dosagem de óxido nítrico no soro periféricos dos animais submetidos aos experimentos anteriores (Figura 26, Tabela 17) foi feita com o intuito de se avaliar mais um parâmetro da resposta imune inflamatória desses animais e elucidar seu papel, juntamente com as APPs, na defesa do hospedeiro contra o carrapato *R. (B.) microplus*. Os resultados obtidos mostraram que não há diferença entre as raças, porém, sua produção está associada aos níveis de infestação dos hospedeiros.

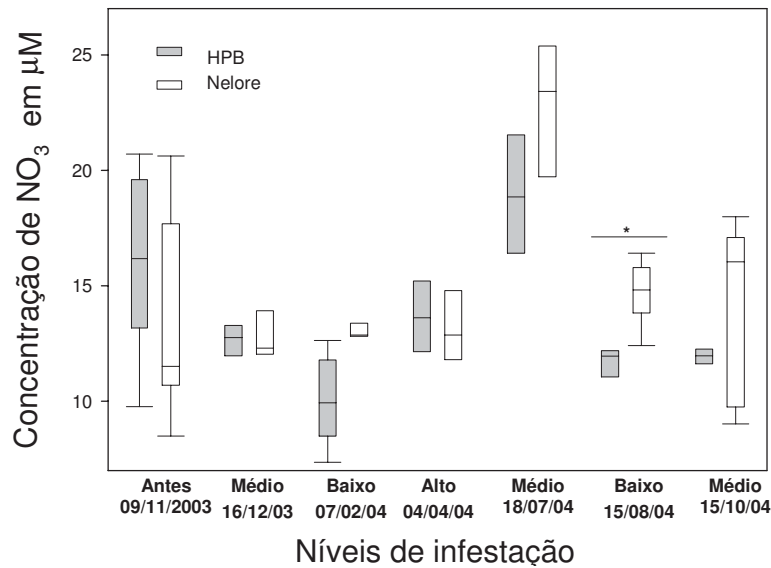


Figura 26. Dosagem de óxido nítrico no soro periférico de animais fenotipicamente resistente (Nelore) e susceptível (HPB) ao carrapato *B. microplus*. (*) Diferença estatística significativa entre HPB e Nelore ($P < 0,05$).

Tabela 17. Níveis de óxido nítrico produzidos frente a infestação pelo carrapato *R. (B.) microplus* presente no soro periférico de animais resistentes e susceptíveis submetidos a diferentes níveis de infestação. D ou d: comparação com a infestação anterior na mesma raça; A ou a: comparação entre os soros de animais resistentes e susceptíveis coletados na mesma data e com mesmo nível de exposição ao *R. (B.) microplus*; maiúsculas indicam diferença estatística significativa ($P < 0,05$).

Níveis de infestação	Níveis de NO ₃ (DO _± DP)						
	Nenhum	Médio	Baixo	Alto	Médio	Baixo	Médio
Fenótipo							
Susceptível (HPB)	16,03 ±4,3 ^a	12,72 ±1,0 ^{ad}	10,06 ±2,0 ^{ad}	13,67 ±1,77 ^{ad}	18,96 ±3,1 ^{ad}	11,6 ±0,7 ^{AD}	11,9 ±0,4 ^{ad}
Resistente (Nelore)	13,75 ±4,85 ^a	12,97 ±1,5 ^{ad}	13,06 ±0,41 ^{ad}	13,29 ±1,9 ^{ad}	22,5 ±4,3 ^{ad}	14,7 ±1,5 ^{AD}	13,9 ±4,1 ^{ad}

6. DISCUSSÃO

Entre os hospedeiros bovinos existem raças geneticamente resistentes e susceptíveis ao carrapato *R. (B.) microplus* (UTECH et al, 1978). Como pode ser observado nos resultados aqui apresentados os animais resistentes e susceptíveis produzem níveis variados de imunoglobulinas, o que torna os anticorpos candidatos ao papel de mediador da expressão dos fenótipos de resistência ou susceptibilidade ao parasita.

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, pode-se observar que antes e durante as infestações com carrapatos os níveis de IgG1 e IgG2 total são maiores em animais da raça HPB, susceptíveis a infestações pelo carrapato *R. (B.) microplus*, do que em animais da raça nelore, resistentes, **exceto** durante o período de alta infestação, quando ocorre uma inversão nos níveis medidos nas duas raças com ambos os isótipos de imunoglobulinas. As diferenças que ocorrem nos níveis totais de classes e subclasses de imunoglobulinas entre diferentes linhagens de camundongos e raças humanas (MADDISON e REIMER, 1976) já estão bem estabelecidas, o mesmo ocorrendo entre as diferentes raças de bovinos (RECHAV, 1987). Esses dados indicam que, após certo limiar de infestação, o número de carrapatos está inversamente relacionado com os níveis de imunoglobulinas, modulando-os negativamente nos bovinos susceptíveis durante períodos de intensa infestação, apesar da maior exposição aos antígenos parasitários. Os dados sugerem que essa modulação decorre de uma depuração maior de imunoglobulinas e/ou é proporcionada às custas de uma inibição na função dos linfócitos B. Como pode ser observado nos períodos de alta infestação sempre há queda dos níveis de anticorpos produzidos, principalmente em animais susceptíveis. Esse fato pode ser explicado pela presença de moléculas imunossupressoras presentes na saliva. CAVASSANI et al (2005) demonstraram que a saliva de *R. sanguineus* é capaz de inibir a diferenciação e maturação de células dendríticas. Resultados recentes mostram que há diminuição da migração e expressão de moléculas co-estimulatórias (CD80 e CD86) em células dendríticas murinas, *in vitro*, na presença de saliva de *R. sanguineus*, bem como a secreção de IL-10, IFN- γ e TGF- β

por células T (OLIVEIRA, manuscrito em preparação). Esses fatos podem ter como conseqüência a diminuição da apresentação de antígenos para células T e, conseqüentemente, a diminuição da ativação de células e B e produção de anticorpos.

Por estarem expostos a infestações naturais pelo carrapato, os animais experimentais poderiam estar infectados com *Babesia* spp, que, teoricamente, podem induzir a ativação policlonal de linfócitos B com produção de anticorpos heterófilos (BROWN et al, 1991 e 1998). Tal possibilidade explicaria os títulos relativamente altos de anticorpos específicos para os antígenos supostamente ocultos, representados nos extratos de ovos e de larvas não alimentadas. Testes de ELISA foram empregados para verificar a presença de anticorpos específicos para antígenos de *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *Anaplasma* spp., os principais patógenos transmitidos pelo carrapato *R. (B.) microplus*. Os Elis as foram feitos no laboratório de Imunoparasitologia da Professora Rosangela Zacarias (Unesp/Jaboticabal) tendo-se verificado que todos os animais se encontravam infectados pelos três parasitas (Anexo1). No entanto, cabe dizer neste momento que nenhum dos animais apresentou sintomas clínicos compatíveis com Tristeza Parasitária dos bovinos, inclusive anemia (cada coleta foi acompanhada de hemograma completo; dados não mostrados).

Sabe-se que bovinos com deficiência de IgG2 tem uma incidência maior de infecções piogênicas (NANSEN, 1972). Sua presença está relacionada com a resistência a infecções bacterianas extracelulares devido a sua ação como opsonina, que é desempenhada de melhor forma que a IgG1, ativando a cascata de complemento. Os dois principais alótipos de IgG2 em bovinos são a IgG γ 2^a e a IgG γ 2^b. Esta última é mais eficiente em ativar a cascata de complemento pela via clássica que a IgG γ 2^a (BASTIDA-CORCUERA, et al., 1999), mecanismo efetor que parece ser deletério ao carrapato tendo em vista os inibidores de complemento encontrados em sua saliva, já mencionado acima. Com relação ao soro recolhido no local de fixação do carrapato, pode-se observar uma ligeira depleção de IgG2 quando comparadas ao soro de pele normal nos animais da raça HPB.

Os efeitos biológicos das diferenças alotípicas na capacidade de imunoglobulinas de hospedeiros ligarem-se a PLIGs de patógenos já foram descritos quanto ao desfecho clínico da interação de bovinos com a bactéria *Haemophilus somnus*, e à interação de diferentes alótipos de IgG bovina com proteína G de estreptococos e proteína A de estafilococos (BATISTA-CORCUERA et al., 1999). Até onde vai nosso conhecimento, esse é o único caso descrito onde um alotipo de IgG confere resistência ou susceptibilidade a um patógeno por causa da menor ou maior capacidade de ligar-se a uma molécula de escape do patógeno.

Evidentemente que alótipos de outras subclasses de IgG bovinas, já descritas para IgG1 e IgG3, podem também afetar a ligação destas imunoglobulinas às PLIGs de *R. (B.) microplus*. Essa possibilidade é sugerida pelo fato do carrapato possuir três tipos de PLIGs, A, B e C (WANG e NUTTALL, 1994), que podem ter especificidade para subclasses diferentes de IgG.

Nossos resultados são compatíveis com uma depuração significativa mediada por PLIGs putativas de *R. (B.) microplus* durante infestações muito intensas com o parasita. Cabe, então, perguntar como a PLIG parasitária afetaria a produção de IgG. Embora a proteólise seja uma possibilidade para o mecanismo de ação das PLIGs, não há nenhuma evidência em suas seqüências protéicas de que qualquer uma das PLIGs de carrapatos conhecidas tenha atividade enzimática proteolítica que pudesse degradar diretamente as IgG plasmáticas.

Outra explicação alternativa é a de que as PLIGs do carrapato podem promover a destruição indireta das IgGs. Os receptores neonatais de Fc de IgG (FcRn), recentemente descritos em bovinos (DOLESCHALL et al, 2005), têm papel importante na manutenção dos níveis séricos de IgG (GHETIE e WARD, 2000). Sabe-se que as imunoglobulinas interiorizadas por células fagocíticas por meio dos FcRn são protegidas de degradação intracelular por enzimas lisossomais e são exocitadas para retornarem novamente ao plasma (WARD et al., 2003). Esse sistema homeostático é saturável e também é afetado pela afinidade com que as IgGs ligam-se aos FcRn

(ZHOU et al., 2003). As PLIGs do carrapato poderiam afetar a interação das IgGs com as FcRn, desviando-os da via de salvamento para a de degradação nos lisossomas.

A mensuração de anticorpos IgE demonstrou que animais susceptíveis produzem altos níveis de anticorpos desse isótipo contra antígenos presentes na EO, EL e saliva do carrapato *R. (B.) microplus*. Esses resultados estão em concordância com os obtidos por KASHINO et al (2005). Além disso, já se sabe que infestações por carrapatos polarizam a resposta para Th2 em modelo murino (CHRISTIE et al, 1999; FERREIRA e SILVA, 1999) com um aumento gradual nos níveis de IgE (CHRISTIE et al, 1999), sendo que os camundongos são suscetíveis ao carrapato e não desenvolvem nível de resistência similar ao dos bovinos zebuínos. Os níveis de IgE em bovinos resistentes são menores ou quase indetectáveis. Esse achado representa, por outro lado, uma aparente contradição devido ao fato de a histamina, liberada por meio da desgranulação de mastócitos armados com IgE específico, ter uma papel importante na resistência ao carrapato. Glândulas salivares de carrapatos *R. (B.) microplus* expressam abundantemente genes com similaridades a outros que codificam lipocalinas e proteínas ligantes de histamina, um forte indício de que a histamina, de fato, é um mediador importante (BRANDÃO et al., manuscrito em preparação). No entanto, além da IgE, a quimiocina MIP1- α e os componentes de complemento C3a e C5a também atuam desgranulando mastócitos. Esse resultado também sugere que ocorre o desenvolvimento de uma resposta atópica atípica contra o carrapato, já que os animais taurinos podem morrer em decorrência da infestação pelo *R. (B.) microplus* porém, a letalidade reside em fatores fisiológicos, como anemia profunda, por exemplo, e não a uma reação anafilática.

Conforme os resultados obtidos a cerca das proteínas de fase aguda, os níveis de SAA e Hp são os que mais variaram, respondendo às infestações em quantidades oscilantes. A α -1AGP foram encontradas em níveis moderados, muito provavelmente devido à exposição contínua dos hospedeiros ao carrapato. A resposta da α -1AGP é gradativa e mais prolongada do que a SAA. Como essa APP está associada a condições inflamatórias crônicas, sua cinética pode ser uma indicação da

produção prolongada de citocinas pró-inflamatórias (HORADAGODA et al, 1999), que poderão ser avaliadas em estudos futuros. Uma das funções descritas para a α -1AGP é a imunossupressão (LOGDBERG et al, 2000) e sua presença em bovinos está correlacionada com a diminuição da blastogênese linfocítica e leucopenia (MOTOI et al, 1992), que pode ser uma das explicações para a susceptibilidade dos animais da raça HPB, que possuem níveis aumentados dessa APP antes da infestação.

A partir das informações sobre a Hp e sua atuação sobre a resposta imune através da indisponibilização do grupamento heme e seus metabólitos, juntamente com os resultados obtidos, podemos inferir que os seus níveis, que aumentam significativamente durante as infestações nos animais da raça HPB, participam na modulação da resposta inflamatória, ajudando, juntamente com outros mecanismos propostos, na modulação do padrão da resposta imune desses animais para Th2 não protetora.

Os níveis de SAA, que se encontram aumentados em bois resistentes e indetectáveis em bois susceptíveis após o período de alta infestação, sugerem que os primeiros animais desenvolvem uma resposta inflamatória, protetora, mais acentuada.

A saliva do carrapato é capaz de suprimir a produção de IL-1 pelos macrófagos do hospedeiro (RAMACHANDRA e WIKEL, 1995). Isso pode explicar a diminuição relativa nos níveis de APPs em bovinos susceptíveis quando comparados aos resistentes, que apesar de serem pouco infestados possuem um nível plasmático semelhante aos dos animais susceptíveis muito infestados.

A transferrina é um carreador de ferro, que não é encontrado livre no plasma. Essa proteína é classificada como sendo uma proteína de fase aguda negativa, ou seja, sua produção diminui durante uma reação de fase aguda (GRUYS et al., 2005). É interessante observar que antes da exposição às infestações naturais com carrapatos, os níveis dessa proteína são significativamente maiores nos bovinos resistentes ao carrapato quando comparados com os níveis em animais suscetíveis. É possível que um dos mecanismos de resistência dos bovinos resistentes seja o de contar com uma maior disponibilidade de ferro. Esse ferro não necessariamente compensaria as perdas

causadas pela hematofagia, uma vez que nos bovinos resistentes estas são mínimas. Mas os níveis altos de transferrina levariam ao carrapato quantidades de um elemento que em excesso é tóxico para qualquer animal ou microorganismo (SCHAIBLE e KAUFMANN, 2005). O ferro possui papel fundamental no metabolismo da hemoglobina, umas das principais proteínas ingeridas pelo carrapato, e participa de diversos eventos relacionados com a resposta imune (NOVELLI et al, 2004; VAN RESBURG, 2004; BOWLUS, 2003; MULERO et al, 2002). A deficiência de ferro leva a danos na resposta humoral e celular, sendo uma das mais profundas mudanças a redução da quantidade de células T periféricas e atrofia do timo (BOWLUS, 2003). Além de modular indiretamente a resposta imune via indisponibilização de ferro, a transferrina também atua diretamente sobre macrófagos induzindo a produção de óxido nítrico (STAFFORD et al, 2002). Nos resultados obtidos podemos observar que após o período de alta infestação ocorre diminuição nos níveis de transferrina sérica com concomitante aumento de óxido nítrico circulante, sugerindo o consumo dessa APP por receptores específicos presentes em macrófagos com posterior indução da liberação do óxido nítrico. Como não há dados disponíveis para a transferrina durante o período de alta infestação, podemos sugerir apenas que o carrapato *R. (B.) microplus*, de alguma forma, modula a produção dessa APP, que influencia diretamente na atividade de macrófagos e conseqüentemente na resposta imune desenvolvida pelo hospedeiro.

Assim, a biologia das APPs é compatível com nossos resultados no sentido de que a APP com capacidade imunossupressora, α -1AGP, está relativamente aumentada nos animais susceptíveis ao carrapato. Ao mesmo tempo, a SAA, com atividade pró-inflamatória, encontra-se aumentada nos bovinos resistentes, ainda mais se considerarmos o menor número de lesões cutâneas causadas por picadas que desencadeariam a produção da SAA. As infestações com carrapatos provocaram um aumento similar nos níveis de Hp nas duas raças bovinas, também podendo-se dizer que o aumento é relativamente maior nos animais resistentes considerando-se, mais uma vez, o menor número de lesões cutâneas causadas por picadas que desencadeariam a produção da Hp. Como a Hp também tem atividade pró-inflamatória, pode-se dizer que os bovinos resistentes manifestam seu fenótipo de infestação por

meio de reações de fase aguda inflamatórias. Isso pode ter um custo metabólico para o hospedeiro bovino e, de fato, os produtores informam que apesar de raças zebuínas apresentarem um menor número de fêmeas se alimentando nos bovinos, ocorrem perdas produtivas. Um estudo avaliou as perdas de peso em zebuínos expostos ao *R. (B.) microplus* e confirmou essas observação empíricas (Embrapa).

7. CONCLUSÃO

Em conclusão, os resultados obtidos mostram que:

1. Há diferença no perfil de produção sérico de imunoglobulinas e anticorpos produzidos pelos animais resistentes e susceptíveis.
2. Durante os períodos de alta infestação os níveis séricos de anticorpos IgG1 e IgG2 sofrem queda brusca em animais susceptíveis.
3. O alótipo IgG γ 2^b é mais freqüente em animais fenotipicamente resistentes ao carrapato *R.(B.) microplus*, podendo ser utilizado como um importante marcador de resistência.
4. Os níveis séricos de anticorpos IgE se encontram aumentados somente em hospedeiros susceptíveis, sugerindo que esse isótipo talvez não tenha papel na re-ordenação da resposta imune contra a infestação por carrapatos.
5. Os níveis de anticorpos mensurados no local de fixação do carrapato refletem os níveis séricos, sugerindo uma ação sistêmica das moléculas inoculas pelo carrapato.
6. Os níveis de SSA, Hp, α -1AGP, transferrina e óxido nítrico também estão intimamente ligados à susceptibilidade e resistência ao parasita, participando no direcionamento do padrão de resposta imune desenvolvido pelos diferentes fenótipos de infestação.

Anexo 1

Exame sorológico feito por Elisa direto com antígenos específicos para *Anaplasma spp.*, *Babesia bovis* e *Babesia bigemina*. A quantidade de anticorpos circulantes contra estes parasitas foram dosados nos diferentes períodos para correlação com a produção de anticorpos específicos anti produtos de *R. (B.) microplus* e imunoglobulinas.

Sorologia para *Anaplasma spp.*

ANIMAIS	Níveis de Infestação						
	Antes 09/11/2003	Médio 16/12/2003	Baixo 07/02/04	Alto 04/04/2004	Médio 18/07/2004	Baixo 15/08/2004	Médio 15/10/2004
1	+++	+	+	-----	+	+	+
2	+	+	+	-----	++	+	+
3	+++	++	+	-----	+	+++	+
4	+++	+	+++	-----	+	++	+
5	+	+	+++	-----	+	+++	+
6	+	+	+	-----	-	+	+
7	+	++	+	-----	+	+	+
8	+++	+	+	-----	+++	+	+
9	+++	-----	-	-----	+	+	+
10	+++	+++	++	-----	+	+	+
11	+	+++	+++	-----	+	+	+
12	+	+++	+	-----	+	+	+
13	+	-	+	-----	-	+	-
14	+	+	+++	-----	+++	+	-
15	+	+	-----	-----	-	+	+
16	+	-----	-----	-----	+	+	+
17	-	+	+	-----	+	-	+
18	+	+	+	-----	+	+	+
19	+	+	+	-----	+	-	-
20	-	++	+	-----	-----	+	+
21	-	+++	+++	-----	+	+	+
22	+	+++	+	-----	+	+	++
23	-	+	+++	-----	+	+	++
24	+	+	+++	-----	-	+	+

(-) Animais cuja quantidade de anticorpos é inferior ao ponto de corte; (+) Animais cuja quantidade de anticorpos foi inferior ao dobro do ponto de corte; (++) Animais cuja quantidade de anticorpos foi superior ao dobro do ponto de corte; (+++) Animais cuja quantidade de anticorpos foi superior ao triplo do ponto de corte

Sorologia para *Babesia bovis*

ANIMAIS	Níveis de Infestação						
	Antes 09/11/2003	Médio 16/12/2003	Baixo 07/02/04	Alto 04/04/2004	Médio 18/07/2004	Baixo 15/08/2004	Médio 15/10/2004
1	+	+++	++	-----	+	++	+
2	+++	+	++	-----	+	-	+
3	+++	+++	++	-----	+	+	+
4	+++	++	+++	-----	++	+	+
5	+++	++	+++	-----	+++	+	+
6	+++	++	++	-----	+	+	+
7	++	+	++	-----	++	+	+
8	+++	++	+	-----	++	+	+
9	++	-----	+	-----	+	+	+
10	++	+	+	-----	+	++	++
11	+++	++	++	-----	+	+	+
12	+++	+++	+++	-----	+	+	++
13	++	++	+++	-----	++	+	+
14	+	+	++	-----	+	+	+
15	+++	+	-----	-----	+	+	+
16	++	-----	-----	-----	+	+	+
17	+	+++	+	-----	+	+	+
18	++	+	++	-----	+	+	+
19	++	++	++	-----	++	+	+
20	+++	+	++	-----	-----	+	++
21	+++	+++	++	-----	++	+	+
22	+++	+	++	-----	+	+	+
23	+++	++	+++	-----	++	+	+
24	+++	+	+	-----	+	+	+

(-) Animais cuja quantidade de anticorpos é inferior ao ponto de corte; (+) Animais cuja quantidade de anticorpos foi inferior ao dobro do ponto de corte; (++) Animais cuja quantidade de anticorpos foi superior ao dobro do ponto de corte; (+++) Animais cuja quantidade de anticorpos foi superior ao triplo do ponto de corte

Sorologia para *Babesia bigemina*

ANIMAIS	Níveis de Infestação						
	Antes 09/11/2003	Médio 16/12/2003	Baixo 07/02/04	Alto 04/04/2004	Médio 18/07/2004	Baixo 15/08/2004	Médio 15/10/2004
1	+	+	+	-----	+	-	++
2	+	++	++	-----	+	-	+
3	++	++	+	-----	++	+	++
4	++	+	+++	-----	++	+	+
5	++	+	++	-----	++	++	+
6	+	+	+	-----	-	+	-
7	+	++	+	-----	+	++	+
8	+++	++	+	-----	-	+	+
9	+++	-----	+	-----	-	+	-
10	+++	+	+	-----	+	+	+
11	+	+	+	-----	-	+	-
12	+	++	+	-----	-	+	+
13	+++	++	+	-----	+	++	+
14	+++	+++	+++	-----	++	++	++
15	+++	+++	-----	-----	+	+++	+
16	+++	-----	-----	-----	+	++	+
17	+++	+++	+++	-----	+	++	++
18	+++	++	+++	-----	+	+++	++
19	+++	+++	++	-----	+	++	++
20	+	+++	++	-----	-----	++	++
21	+++	+++	++	-----	++	+++	+++
22	++	+++	++	-----	+	+	++
23	++	++	++	-----	++	+++	++
24	+	+++	++	-----	+	+++	++

(-) Animais cuja quantidade de anticorpos é inferior ao ponto de corte; (+) Animais cuja quantidade de anticorpos foi inferior ao dobro do ponto de corte; (++) Animais cuja quantidade de anticorpos foi superior ao dobro do ponto de corte; (+++) Animais cuja quantidade de anticorpos foi superior ao triplo do ponto de corte

REFERENCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Cell and Molecular Immunology**. 309 paginas. Saunders, 2005.

ACKERMAN S, CLARE FB, MCGILL TW, SONENSHINE DE. Passage of host serum components, including antibody, across the digestive tract of *Dermacentor variabilis* (Say). **J Parasitol**. Oct; 67(5):737-40. 1981.

ALLEN, J. R. & HUMPHREYS, S. J. Immunisation of guinea pigs and cattle against ticks. **Nature** 280, 491–493. 1979.

ALLEN, J. R. Tick resistance : basophils in skin reactions of resistant guinea pigs. **International Journal for Parasitology** 3, 195–200. 1973.

ANGUITA, J., RAMAMOORTHY, N., HOVIUS, J.W. R., DAS, S., THOMAS, V., PERSINSKI, R., CONZE, D., ASKENASE, P.W., RINCON, M., KANTOR, F. S. & FIKRIG, E. Salp15, and *Ixodes scapularis* salivary protein, inhibits CD4+ T cell activation. **Immunity** 16, 849–859. 2002.

BADOLATO R, WANG JM, MURPHY WJ. Serum amyloid A is a chemoattractant: Induction of migration, adhesion, and tissue e infiltration of monocytes and polymorphonuclear leukocytes. **J Exp Med** 180:203-209, 1994

BALLA J, JACOB HS, BALLA G, NATH K, EATON JW, VERCELLOTTI GM. Endothelial- cell heme uptake from heme proteins: induction of sensitization and desensitization to oxidant damage. **Proc Nat Acad Sci USA**, 90:9285–9289. 1993.

BASTIDA-CORCUERA, F. D., J. E. BUTLER, S. YAHIRO AND L. B. CORBEIL. Differential complement activation by bovine IgG2 allotypes. **Veterinary Immunology and Immunopathology** 71. pg.115-123. 1999.

BASTIDA-CORCUERA, F., BUTLER, E., HEYERMANN, H., THOMFORD, J.W., CORBEIL, L.B. Tritrichomonas foetus extracellular cysteine proteinase cleavage of bovine IgG2 allotypes. **Journal of Parasitology** 86, 328–332. 2000.

BAUMANN H, GAULDIE J. The acute phase response. **Immunol Today** 15:74–80, 1994.

BECHARA, G.H.; MORELLI JUNIOR, J.; SZABÓ, M.P.J. Skin test and tick immune status in susceptible and resistant cattle in Brazil. **Ann NY Acad Sci** 916: 570-575. 2000.

BENEDICT, C., KUWAHARA, K., TODD, G., RYAN, J., MICHALAK, M., EATON, D. & STERN, D. Calreticulin is a novel antithrombotic agent: blockage of electrically induced coronary thrombosis. **Clinical Research** 41, 275A. 1993.

BERGMAN, D. K., PALMER, M. J., CAIMANO, M. J., RADOLF, J. D. & WIKEL, S. K. Isolation and cloning of a secreted immunosuppressant protein from Dermacentor andersoni salivary gland. **Journal of Parasitology** 86, 516–525. 2000.

BITTENCOURT, A.J.; FONSECA, A.H.; FACCINI, J.L.H.; BUENO, B.H. Comportamento do *R. (B.) microplus* (Canestrini, 1887) (Acari) em infestações artificiais e naturais em diferentes hospedeiros. **Arquivo Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, Rio de Janeiro, v.13, n.2, p.173-182, 1990.

BOWLUS CL. The role of iron in T cell development and autoimmunity. **Autoimmunity Reviews**. Volume 2, Issue 2, March, Pages 73-78, 2003.

BOWMAN AS, SAUER JR, ZHU K, DILLWITH JW. Biosynthesis of salivary prostaglandins in the lone star tick, Amblyomma americanum. **Insect Biochem Mol Biol**. Jun;25(6):735-41. 1995.

BROSSARD M, WIKEL SK. Tick immunobiology. **Parasitology** 129 Suppl:S161-76. 2004

BROSSARD, M. & FIVAZ, V. *Ixodes ricinus* L.: mast cells, basophils and eosinophils in the sequence of cellular events in the skin of infested or reinfested rabbits. **Parasitology** 85, 583–592. 1982.

BROSSARD, M. & GIRARDIN, P. Passive transfer of resistance in rabbits infested with adult *Ixodes ricinus* L: Humoral factors influence feeding and egg laying. **Experientia** 35, 1395–1396. 1979.

BROSSARD, M. & WIKEL, S. K. Immunology of interactions between ticks and hosts. **Medical and Veterinary Entomology** 11, 270–276. 1997.

BROWN, S.J. Characterization of tick antigens inducing host immune resistance. **Vet Parasitol** 28: 321-334. 1988.

BROWN, S.J. Immunology of acquired resistance to ticks. **Parasitol Today** 1: 165-171. 1985.

BROWN, S.J.; ASKENASE, P.W. Immune rejection of ectoparasites (ticks) by T cell and IgG-1 antibody recruitment of basophils and eosinophils. **Feder Proc** 42(6): 1744-1749. 1983.

BROWN, S.J.; GALLI, S.J.; GLEICH, G.J.; ASKENASE, P.W. Ablation of immunity to *Amblyomma americanum* by anti-basophil serum: cooperation between basophils and eosinophils in expression of immunity to ectoparasites (ticks) in guinea pigs. **J Immunol** 129: 790- 796. 1982.

BROWN, S.J.; SHAPIRO, S.Z.; ASKENASE, P.W.. Characterization of tick antigens inducing host immune resistance. **J Immun** 133(6): 3319-3325. 1984.

BROWN, W. C., K. S. LOGAN, G. G. WAGNER, AND C. L. TETZLAFF. Cell mediated immune responses to *Babesia bovis* merozoite antigens in cattle following infection with tick-derived or cultured parasites. **Infect. Immun.** 59:2418–2426. 1991.

BROWN, W. C., V. SHKAP, D. ZHU, T. C. MCGUIRE, W. TUO, T. F. MCELWAIN, AND G. H. PALMER. CD41 T-lymphocyte and immunoglobulin G2 responses in calves immunized with *Anaplasma marginale* outer membranes and protected against homologous challenge. **Infect. Immun.** 66:5406–5413. 1998.

BRUM, J.G.W.; COSTA, .P.R.P.; RIBEIRO, P.B.; GONZALES, J.C.. Flutuação sazonal de *R. (B.) microplus* (Canestrini, 1887) no município de Pelotas, RS. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.39, n.6, p.891-896. 1987.

BRUSCO, A., DE LANGE, G.G., BOCCAZZI, C., CARBONARA, A.O. Molecular characterization of G2m(n+) and Gm(n-) allotypes. **Immunogenetics** 42, 414-417. 1995.

BUTLER, J.E. Immunoglobulin diversity, B-cell and antibody repertoire development in large farm animals. **Rev. Sci. Technol. Off. Int. Epiz.** 17, 43-70. 1998.

CAVASSANI KA, ALIBERTI JC, DIAS AR, SILVA JS, FERREIRA BR. Tick saliva inhibits differentiation, maturation and function of murine bone-marrow-derived dendritic cells. **Immunology.** Feb;114(2):235-45. 2005.

CHAMPAGNE, D. E. & VALENZUELA, J. G. **Pharmacology of haemathophagous arthropod saliva. In The Immunology of Host-Ectoparasitic Arthropod Relationships.** (ed. Wikel, S. K.), pp. 85–106. Wallingford: CAB International. 1996.

CHRISTE, M., RUTTI, B., BROSSARD, M. Influence of the genetic background and parasite load of mice on the immune response developed against nymphs of *Ixodes ricinus*. **Parasitology Research** 85, 557–561. 1999.

CORBEIL, L.B., GOGOLEWSKI, R.P., KACSKOVICS, I., NIELSEN, K.H., CORBEIL, R.R., MORRILL, J.L., GREENWOOD, R., BUTLER, J.E. Bovine IgG2a antibodies to *Haemophilus somnus* and allotype expression. **Can. J. Vet. Res.** 61, 207±213. 1997.

CORBEIL, L.B.; BASTIDA-CORCUERA, F.D., BUTLER, J.E.; YAHIRO, S. Differential complement activation by bovine IgG2 allotypes. **Veterinary Immunology and Immunopathology** 71, 115-123. 1999.

DA ROCHA, C.M.B.M. Aspectos relevantes da biologia do *Boophilus microplus* (Cannestrini, 1887). **Boletim da Universidade Federal de Lavras** (on-line). http://www.editora.ufla.br/Boletim/pdf/bol_32.pdf.

DALTON JP, MULCAHY G. Parasite vaccines--a reality? **Vet Parasitol.** Jul 12;98(1-3):149-67. 2001.

DAS, S., BANERJEE, G., DEPONTE, K., MARCANTONIO, N., KANTOR, F. S. & FIKRIG, E. Salp 25D, an Ixodes scapularis antioxidant, is 1 of 14 immunodominant antigens in engorged tick salivary glands. **Journal of Infectious Diseases** 184, 1056–1064. 2001.

DAS, S., MARCANTONIO, N., DEPONTE, K., TELFORD, S. R. III, ANDERSON, J. F., KANTOR, F. S. & FIKRIG, E. SALP 16, a gene induced in Ixodes scapularis salivary glands during tick feeding. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 62, 99–105. 2000.

DE CASTRO, J. J. & NEWSON, R.M. Host resistance in cattle tick control. **Parasitology Today** 9, 13–17. 1993.

DE LA FUENTE J, RODRIGUEZ M, MONTERO C, REDONDO M, GARCIA-GARCIA JC, MENDEZ L, SERRANO E, VALDES M, ENRIQUEZ A, CANALES M, RAMOS E, BOUE O, MACHADO H, LLEONART R. Vaccination against ticks (*Boophilus* spp.): the experience with the Bm86-based vaccine Gavac. **Genet Anal.** Nov;15(3-5):143-8. 1999.

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., DAVRE, S., FERREIRA, B.R., DA SILVA, J.S., SZABO, M.P., BECHARA, G.H. 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. 2004.

DE MIRANDA-SANTOS, I.K.; CAMPOS-NETO, A. Receptor for immunoglobulin Fc on pathogenic but not on nonpathogenic protozoa of the Trypanosomatidae. **J Exp Med.** Dec 1;154(6):1732-42. 1981.

DE VOS S, ZEINSTRA L, TAOUFIK O, WILLADSEN P, JONGEJAN F. Evidence for the utility of the Bm86 antigen from *Boophilus microplus* in vaccination against other tick species. **Exp Appl Acarol.**25(3):245-61. 2001.

DEL PINO FA, BRANDELLI A, GONZALES JC, HENRIQUES JA, DEWES H. Effect of antibodies against beta-N-acetylhexosaminidase on reproductive efficiency of the bovine tick *Boophilus microplus*. **Vet Parasitol.** Nov 16;79(3):247-55. 1998.

DICKINSON, R. G., O'HAGAN, J. E., SHOTZ, M., BINNINGTON, K. C. & HEGARTY, M. P. Prostaglandin in saliva of the cattle tick *Boophilus microplus*. **Australian Journal of Experimental Biology and Medical Sciences** 54, 475–486. 1976.

DOLESCHALL, M.; ZHAO, Y.; MAYER, B.; HAMMARSTROM, L.; KACSKOVICS, I. Isolation of the gene encoding the bovine neonatal Fc receptor. **Vet Immunol Immunopathol.** Oct 18;108(1-2):145-50. 2005.

ECKERSALL, P.D. Recent advances and future prospects for the use of acute phase proteins as markers of disease in animals. **Rev. Med. Vet.**151, 577–584. 2000.

ECKERSALL, P.D., GOW, J.W., MCCOMB, C., BRADLEY, B., RODGERS, J., MURRAY, M., KENNEDY, P.G.E. Cytokines and acute phase response in post-treatment reactive encephalopathy of *Trypanosoma brucei brucei* infected mice. **Parasitol. Int.** 50, 15–26. 2001.

FEARON, D. T. The complement system and adaptive immunity. **Seminars in Immunology** 10, 355–361. 1998.

FERREIRA, B.R., SILVA, J.S. Successive tick infestations selectively promote a T-helper 2 cytokine profile in mice. **Immunology** 96, 434–439. 1999.

FERREIRA, C. A. S., VAZ, I. D. S. Jr., DA SILVA, S. S., HAAG, K. L., VALENZUELA, J. G. & MASUDA, A. Cloning and partial characterization of a *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) calreticulin. **Experimental Parasitology** 101, 25–34. 2002.

FUJISAKI K., KAMIO T. AND KITAOKA S. Passage of host serum components, including antibodies specific for *Theileria sergenti*, across the digestive tract of argasid and ixodid ticks. **Ann. Trop. Med. Parasitol.** 78: 449–450, 1984.

FURLONG, J. Controle do carrapato dos bovinos na região Sudeste do Brasil. **Caderno Técnico da Esc. Veterinária UFMG**, n.8, p.49-61,1993.

GHETIE, V.; WARD, E.S. Multiple roles for the major histocompatibility complex class I-related receptor FcRn. **Annu Rev Immunol.**18:739-66. 2000.

GILL HS. Kinetics of mast cell, basophil and eosinophil populations at *Hyalomma anatolicum anatolicum* feeding sites on cattle and the acquisition of resistance. **Parasitology.** 93 (Pt 2):305-315, 1986.

GILL, H.S., LUCKINS, A.G. *Hyalomma anatolicum*: the role of humoral factors in the acquisition of host resistance. **Experimental Parasitology** 64, 430–437. 1987.

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

GILLESPIE, R. D., MBOW, M. L. & TITUS, R. G. The immunomodulatory factors of blood feeding arthropod saliva. **Parasite Immunology** 22, 319–331. 2000.

GODSON, D.L., BACA-ESTRADA, M.E., VAN KESSEL, A.G., HUGHES, H.P., MORSY, M.A., VAN DONKERSGOED, J., HARLAND, R.J., SHUSTER, D.E., DALEY, M.J., BABIUK, L.A. Regulation of bovine acute phase responses by recombinant interleukin-1 beta. **Can. J. Vet. Res.** 59, 249–255. 1995.

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

GONZALES, J.C. **O controle dos carrapatos dos bovinos.** Porto Alegre: Sulina, 104p., 1975.

GRANINGER, W., THALHAMMER, F., HOLLENSTEIN, U., ZOTTER, G.M., KREMSNER, P.G. Serum protein concentrations in Plasmodium falciparum malaria. **Acta Trop.** 52, 121–128. 1992.

GROSSE, W.M., KAPPES, S.M., LAEGREID, W.W., KEELE, J.W., CHITKOMCKOWN, C.G., HEATON, M.P. Single nucleotide polymorphism (SNP) discovery and linkage mapping of bovine cytokine genes. *Mammalian Genome* 10, 1062–1069. 1999.

GUARAGNA, G.P., CARVALHO, J.B.P., GAMBINI, L.B. E BARBOSA, M.I.A Efeito dos fatores genéticos e ambientes na infestação natural de carrapatos (*R. (B.) microplus*, Canestrini) em bovinos leiteiros. **Boletim de Indústria Animal**, São Paulo, v.49, n.2, p.73-82, jul./dez. 1992.

GUARAGNA, G.P.; CARVALHO, J.B.P.; FIGUEIREDO, A.L., GAMBINI, L.B.; BARBOSA, M.I. DE A. Efeito dos fatores genéticos e ambientes na infestação natural de carrapatos (*B. microplus*, Canestrini) em bovinos leiteiros. **Boletim de Indústria Animal**, São Paulo, v.45, n.1, p.19-32, jan./jun. 1988.

GUDDERRA NP, SONENSHINE DE, APPERSON CS, ROE RM. Hemolymph proteins in ticks. **J Insect Physiol.** Mar;48(3):269-278. 2002.

HAJNICKA´, V., KOCA´ KOVA´ , P., SLA´ VIKOVA´ , M., SLOVA´K, M., GASPERI´K, J., FUCHSBERGER, N. & NUTTALL, P. A. Anti-interleukin-8 activity of tick salivary gland extracts. **Parasite Immunology** 23, 483–489. 2001.

HANNIER, S., LIVERSIDGE, J., STERNBERG, J.M., BOWMAN, A.S. Characterization of the B-cell inhibitory protein factor in *Ixodes ricinus* tick saliva: a potential role in enhanced *Borrelia burgdoferi* transmission. **Immunology** 113, 401–408. 2004.

HARRIS, S. G., PADILLA, J., KOUMAS, L., RAY, D. & PHIPPS, R. P. Prostaglandins as modulators of immunity. **Trends in Immunology** 23, 144–150. 2002.

HEATON, M.P., GROSSE, W.M., KAPPES, S.M., KEELE, J.W., CHITKO-MCKOWN, C.G., CARDIV, L.V., BRAUN, A., LITTLE, D.P., LAEGREID, W.W. Estimation of DNA sequence diversity in bovine cytokine genes. **Mammalian Genome** 12, 32–37. 2001.

HEYERMANN, H., BUTLER, J.E. The heterogeneity of bovine IgG2-IV. Structural differences between IgG2a molecules of the A1 and A2 allotypes. **Mol. Immunol.** 24, 1327-1334. 1987.

HOFFMAN JS, BENDITT EP. Secretion of serum amyloid protein and assembly of serum amyloid protein-rich high density lipoprotein in primary mouse hepatocyte culture. **J Biol Chem** 257:10518- 10522, 1982.

HOOGSTRAAL H, WASSEF HY. Dermacentor (Indocentor) atrosignatus (Acari: Ixodoidea: Ixodidae): hosts and distribution in the Malay Peninsula, Indonesia, Borneo, and southern Philippines. **J Med Entomol.** Nov 27;22(6):644-7. 1985.

HORADAGODA, A., ECKERSALL, P.D., HODGSON, J.C., GIBBS, H.A., MOON, G.M. Immediate responses in serum TNF α and acute phase protein concentrations to infections with *P. haemolytica* A1 in calves. **Res.Vet. Sci.** 57, 129–132. 1994.

HORADAGODA, N.U., KNOX, K.M.G., GIBBS, H.A., REID, S.W.J., HORADAGODA, A., EDWARDS, S.E.R., ECKERSALL, P.D. Acute phase proteins in cattle: discrimination between acute and chronic inflammation. **Vet. Rec.** 144, 437–441. 1999.

HORN, F; SANTOS, P.C.; TERMIGNONI, C. Boophilus microplus anticoagulant protein: antithrombin inhibitor isolated from the tick saliva. **Arch Biochem Biophysics** 384:68-73. 2000.

HUSEBEKK A, SKOGEN B, HUSBY G. Characterization of amyloid proteins AA and SAA as apolipoproteins of high density lipoprotein (HDL). Displacement of SAA from the HDL-SAA complex by apo AI and apo AII. **Scand J Immunol** 25:375-381, 1987.

INOKUMA, H.; KEMP, D.H.; WILLADSEN, P. Comparison of prostaglandin E2 (PGE2) in salivary gland of *Boophilus microplus*, *Haemaphysalis longicornis* and *Ixodes holocyclus*, and quantification of PGE2 in saliva, hemolymph, ovary and gut of *B. microplus*. **J Vet Med Sci** 56: 1217-1218. 1994.

JANEWAY, C. A. Jr., TRAVERS, P., WALPORT, M. & SHLOMCHIK, M. J. **Immunobiology**, 5th Edn. Garland Publishing, New York. 2001.

JASINKAS, A.; JAWORSKI, D.C.; BARBOUR, A.G. *Amblyomma americanum*: specific uptake of immunoglobulins into tick hemolymph during feeding. **Exp Parasitol** 96(4): 213-221. 2000.

JAWORSKI, D. C., JASINSKAS, A., METZ, C. N., BUCALA, R. & BARBOUR, A. G. Identification and characterization of a homologue of the pro-inflammatory cytokine macrophage migration inhibitory factor in the tick, *Amblyomma americanum*. **Insect Molecular Biology** 10, 323–331. 2001.

JAWORSKI, D. C., SIMMEN, F. A., LAMOREAUX, W., COONS, L. B., MULLER, M. T. & NEEDHAM, G. R. A secreted calreticulin protein in ixodid tick (*Amblyomma americanum*) saliva. **Journal of Insect Physiology** 41, 369–375. 1995.

JOHNSTON L.A.Y., KEMP D.H. & PEARSON R.D. Immunization of cattle against *Boophilus microplus* using extracts derived from adult female ticks: Effects of induced immunity on tick populations. **International Journal for Parasitology**. 16: 27-34. 1986.

KAPTURCZAK MH, WASSERFALL C, BRUSKO T, CAMPBELL-THOMPSON M, ELLIS TM, ATKINSON MA, AGARWAL A. Heme oxygenase-1 modulates early inflammatory responses: evidence from the heme oxygenase-1-deficient mouse. **Am J Pathol**. Sep;165(3):1045-53. 2004.

KASHINO SS, RESENDE J, SACCO AM, ROCHA C, PROENCA L, CARVALHO WA, FIRMINO AA, QUEIROZ R, BENAVIDES M, GERSHWIN LJ, DE MIRANDA SANTOS IK. *Boophilus microplus*: the pattern of bovine immunoglobulin isotype responses to high and low tick infestations. **Exp Parasitol**. May;110(1):12-21. 2005.

KAUFMAN, W.R. Tick–host interactions: a synthesis of current concepts. **Parasitology Today** 52, 47–56. 1989.

KOVACS, H., CAMPBELL, I. D., STRONG, P., JOHNSON, S., WARD, F. J., REID, K. B.M. & EGGLETON, P. Evidence that C1q binds specifically to CH2-like immunoglobulin motifs present in the autoantigen calreticulin and interferes with complement activation. **Biochemistry** 37, 17865–17874. 1998.

LAEGREID, W.W., HEATON, M.P., KEEN, J.E., GROSSE, W.M., CHITKOMCKOWN, C.G., SMITH, T.P.L., KEELE, J.W., BENNETT, G.L., BESSER, T.E. Association of bovine neonatal Fc receptor α -chain (FCGRT) haplotypes with serum IgG concentration in newborn calves. **Mammalian Genome** 13, 704–710. 2002.

LAMOREAUX, W.J., NEEDHAM, G.R.; COONS, L.B.. Evidence that dilatation of isolated salivary glands ducts from the tick *Dermatocenter varibialis* (Say) is mediated by nitric oxid. **J. Insect Physiology** 46:959-964. 2000.

LANGONE, J.J. Applications of immobilized protein A in immunochemical techniques. **J Immunol Methods**. Dec 30;55(3):277-96. 1982.

LATIF, A. A. Resistance to *Hyalomma anatolicum anatolicum* Koch (1844) and *Rhipicephalus evertsi* Neumann (1897) (Ixodoidea:Ixodidae) by cattle in Sudan. **Insect Science Applications** 5, 509–511. 1984.

LATIF, A. A., PUNYUA, D. K., CAPSTICK, P. B. & NEWSON, R.M. Tick infestations on Zebu cattle in Western Kenya: host resistance to *Rhipicephalus appendiculatus* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology** 28, 127–132. 1991.

LAWRIE, C. H., RANDOLPH, S. E. & NUTTALL, P. A. Ixodes ticks: serum species sensitivity of anticomplement activity. **Experimental Parasitology** 93, 207–214. 1999.

LEE, TS; CHAU LY. Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effect of interleukin-10 in mice. **Nat Med**, 8:240–246. 2002.

LEE,B. Resistant cattle for tick control. **Rural Research**, Melbourne, v.105, n.12, p.4-7, 1979.

LIANG, JS; SIPE, JD. Recombinant human serum amyloid A (apoSAAp) binds cholesterol and modulates cholesterol flux. **J Lipid Res** 36:37-46, 1995.

LOGDBERG, L., WESTER, L. Immunocalins: a lipocalin subfamily that modulates immune and inflammatory responses. **Biochim. Biophys. Acta**. 1482, 284–297. 2000.

LUE, H., KLEEMAN, R., CALANDRA, T., ROGER, T. & BERNHAGEN, J. Macrophage migration inhibitory factor (MIF): mechanisms of action and role in disease. **Microbes and Infection** 4, 449–460. 2002.

MADALENA, F.E.; TEODORO, R.H.; LEMOS, A.M.; OLIVEIRA, G.P. Causes of variation of field burdens of cattle ticks (*B. microplus*). **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v.VIII, n.2, p.361-75.1985.

MAGALHÃES, F.E.P. Aspectos biológicos e de controle do *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) no município de Pedro Leopoldo-MG-Brasil. Belo Horizonte: Instituto de ciências Biológicas da UFMG.117p. (**Tese de doutorado**). 1989.

MARADAY, J.A.O.; GONZALES, J.C. Efeitos das raças Santa Gertrudis e Aberdeen Angus em infestações de *B. microplus* (Canestrini, 1887): Dimensões e peso das fêmeas ingurgitadas. **Arquivos da Faculdade de Veterinária**. UFRGS, Porto Alegre, v. 12, n.12, p.127-38. 1984.

MARTINEZ-SUBIELA, S., TECLES, F., ECKERSALL, P.D., CERON, J.J. Serum concentrations of acute phase proteins in dogs with leishmaniasis. **Vet. Rec.** 150, 241–244. 2002.

MASSARD, C.L., FONSECA, A.H., BITTENCOURT, V.R.E.P. Avaliação da eficácia da vacina recombinante Bm86- GAVAC contra o carrapato *B. microplus* no Brasil. **R. Bras. Med. Vet.**; 17 (4):167-173. 1995.

MASTELLOS, D. & LAMBRIS, J. D. Complement: more than a 'guard' against invading pathogens? **Trends in Immunology** 23, 485–491. 2002.

MCGUIRE, T.C., MUSOKE, A.J., KURTTI, T. Functional properties of bovine IgG1 and IgG2: interaction with complement, macrophages, neutrophils and skin. **Immunology** 38, 249-256. 1979.

MEEK RL, ERIKSEN N, BENDITT EP. Murine serum amyloid A3 is a high density apolipoprotein and is secreted by macrophages. **Proc Natl Acad Sci USA** 89:7949-7952. 1992

MORAES FR, MORAES JRE, COSTA AJ, ROCHA UF, ARDISSON FA. A comparative study of lesions caused by parasitic stages of *Boophilus microplus* (canestrini) in the skins of naturally infested taurine and zebuine hosts. The correlation of tick resistance with mast cell counts in the host skin. **Braz J Vet Res Anim Sci** 29: 378-383, 1992.

MORAES, F.R., COSTA, A.J., WOELZ, C.R. Ecologia de carrapato. XV: Suscetibilidade natural comparativa entre taurinos e zebuinos a *B. microplus* (Canestrini) (Acari: Ixodidae). **Ars Veterinária**, Jaboticabal, v.2, n.1, p.45-53. 1986.

MORENO, E.C. Incidência de ixodídeos em bovinos de leite e prevalência em animais domésticos da Região metalúrgica de Minas Gerais. Belo Horizonte. Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, 105p. (**Dissertação de mestrado**). 1984.

MORSE D, PISCHKE SE, ZHOU Z, DAVIS RJ, FLAVELL RA, LOOP T, OTTERBEIN SL, OTTERBEIN LE, CHOI AMK. Suppression of inflammatory cytokine production by carbon monoxide involves the JNK pathway and AP-1. **J Biol Chem**, 278:36993–36998. 2003.

MOTOI, Y., ITOH, H., TAMURA, K., MIYAMOTO, T., OOHA, T., NAGASAWA, S., Correlation of serum concentration of α 1-acid glycoprotein with lymphocyte blastogenesis and development of experimentally induced or naturally acquired hepatic abscesses in cattle. **Am. J. Vet. Res.** 53, 574–579. 1992.

MULERO V, WEI XQ, LIEW FY, BROCK JH. Regulation of phagosomal iron release from murine macrophages by nitric oxide. **Biochem J.** Jul 1;365(Pt 1):127-32, 2002.

MUSSO T, BRESCIANI S, PONZI AN, WANG J, TURANO A, BADOLATO R. Serum amyloid A enhances PMN-mediated anti-Candida activity and stimulates the production of anion superoxide. **J Leukocyte Biol** 194:194. 1996.

NAKAJIMA, Y., MOMOTANI, E., MURAKAMI, T., ISHIKAWA, Y., MORIMATSU, M., SAITO, M., SUZUKI, H., YASUKAWA, K. Induction of acute phase protein by recombinant human interleukin-6 (IL-6) in calves. **Vet. Immunol. Immunopathol.** 35, 385–391. 1993.

NANSEN, P. Selective immunoglobulin deficiency in cattle and susceptibility to infection. **Acta Path. Microbiol. Scand. Sect. B** 80, 49±54. 1972.

NATH KA, GRANDE JP, CROATT AJ, LIKELY S, HEBBEL RP, ENRIGHT H. Intracellular targets in heme protein-induced renal injury. **Kidney Int**, 53:100–111. 1998.

NOVELLI F, REGIS G, BOSTICARDO M, CONTI L, DE ANGELIS S, BOSELLI D, TOMAINO B, BERNABEI P, GIOVARELLI M. Iron regulates T-lymphocyte sensitivity to the IFN-gamma/STAT1 signaling pathway in vitro and in vivo. **Blood**. Apr 15;105(8):3214-21, 2005.

OLIVEIRA, G.P., ALENCAR, M.M., FREITAS, A.R. Resistência de bovinos ao carrapato *B. microplus* II. Infestação natural. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.24, n.10, p.1267-1271.1989.

OLIVEIRA, G.P.; ALENCAR, M.M. Resistência de bovinos de seis graus de sangue Holandês-Guzerá ao carrapato (*Boophilus microplus*) e ao berne (*D. hominis*). **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia**, Belo Horizonte, v.42, n.2, p.127-35. 1990.

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

OTTERBEIN LE, BACH FH, ALAM J, SOARES M, TAO LU H, WYSK M, DAVIS RJ, FLAVELL RA, CHOI AM. Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. **Nat Med**, 6:422–428. 2000.

PAESEN, G.C.; ADAMS, P.L.; NUTTAJ, P.A.; STUART, D.L. Tick histamine-binding proteins: lipocalins with a second binding cavity. **BBA** 1482: 92-101. 2000.

PETROVSKY, N. & BUCALA, R. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) a critical neurohumoral mediator. **Annals of the New York Academy of Sciences** 917, 665–671. 2000.

PINCHUK, L.M., BOYD, B.L., KRUGER, E.F., RODITI, I., FURGER, A. Bovine dendritic cells generated from monocytes and bone marrow progenitors regulate immunoglobulin production in peripheral blood B cells. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases** 26, 233–249. 2003.

POWELL, R.T.; REID, T.J. Project tick control. **Queensland Agricultural journal, Brisbane**, v.108, n.6, p.279-300. 1982.

PRUETT, J.H. Immunological control of arthropod ectoparasites -a review. **Int J Parasitol** 29: 25-32. 1999.

RAMACHANDRA RN, WIKEL SK.. Effects of *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) salivary gland extracts on *Bos indicus* and *B. taurus* lymphocytes and macrophages: in vitro cytokine elaboration and lymphocyte blastogenesis. **J Med Entomol.** May;32(3):338-45. 1995.

RECHAV, Y. Resistance of Brahman and Hereford cattle to African ticks with reference to serum gammaglobulin levels and blood composition. **Experimental and Applied Acarology** 3, 219–232. 1987.

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

RIBEIRO, J.M. C., EVANS, P.M., MCSWAIN, J. L. & SAUER, J. *Amblyomma americanum*: characterization of salivary prostaglandins E2 and F2 by RP-HPLC/bioassay and gas chromatography-mass spectrometry. **Experimental Parasitology** 74, 112–116. 1992.

- RIBEIRO, J.M. C., MAKOUL, G. T., LEVINE, J., ROBINSON, D. R. & SPIELMAN, A. Antihemostatic, antiinflammatory, and immunosuppressive properties of the saliva of a tick, *Ixodes dammini*. **Journal of Experimental Medicine** 161, 332–344. 1985.
- RIBEIRO, J.M.C.. How ticks make a living. **Parasitology Today** 11, 91–93. 1995.
- ROBERTS, J. A. & KERR, J. D. *Boophilus microplus*: passive transfer of resistance in cattle. **Journal of Parasitology** 62, 485–488. 1976.
- SAHIBI, H. F., RHALEM, A., TIKKI, N., BEN KOUKA, F. & BARRIGA, O. Hyalomma ticks: bovine resistance under field conditions as related to host age and breed. **Parasite** 4, 159–165. 1997.
- SAHIBI, H., RHALEM, A., TIKKI, N. Comparison of effects of low and high tick infestations on acquired cattle tick resistance: *Hyalomma marginatum marginatum*. **Parasite** 5, 69–74. 1998.
- SANDERS, M.L.; GLASS, G.E.; NADELMAN, R.B.; WORMSER, G.P.; SCOTT, A.L.; RAHA, S.; RITCHIE, B.C.; JAWORSKI, D.C.; SCHWARTZ, B.S. Antibody levels to recombinant tick calreticulin increase in humans after exposure to *Ixodes scapularis* and are correlated with tick engorgement indices. **Am J Epidemiol** 149: 777- 784. 1999.
- SARTOR IF, FACCINI JLH, SEQUEIRA JL. Estudo histológico da pele de bovinos resistentes e suscetíveis ao carrapato *Boophilus microplus* no local de fixação de larva. **Vet. e Zoot.** 9: 27-47, 1997.
- SCHOELER, G. B. & WIKEL, S. K. Modulation of host immunity by haematophagous arthropods. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology** 95, 755–771. 2001.
- SHAPIRO, S.Z., BLACK, S.J. Identification of an acute-phase reactant in murine infections with *Trypanosoma brucei*. **Infect. Immun.** 60, 3291–3924. 1992.

SONENSHINE, D. E. **Biology of Ticks**, vol. 1, Oxford University Press, New York, 1991.

STAFFORD JL, BELOSEVIC M. Transferrin and the innate immune response of fish: identification of a novel mechanism of macrophage activation. **Dev Comp Immunol.** Jun-Jul;27(6-7):539-54, 2003.

STAFFORD JL, WILSON EC, BELOSEVIC M. Recombinant transferrin induces nitric oxide response in goldfish and murine macrophages. **Biochem J.** Jul 1;365(Pt 1):127-32, 2002.

STEEVES, E. B. & ALLEN, J. R. Tick resistance in mast cell-deficient mice: histological studies. **International Journal for Parasitology** 21, 265–268. 1991.

SUFFREDINI AF, FANTUZZI G, BADOLATO R, OPPENHEIM JJ, O'GRADY NP.. New insights into the biology of the acute phase response. **J Clin Immunol.** Jul;19(4):203-14. 1999.

SUTHERLAND GB, EWEN AB. Fecundity decrease in mosquitoes ingesting blood from specifically sensitized mammals. **J Insect Physiol.** Apr; 20(4):655-60. 1974.

SZABÓ, M.P.J., AOKI, V.L., SANCHES, F.P.S., AQUINO, L.P.T.C.T., GARCIA, M.V., MACHADO, R.Z., BECHARA, GH., Antibody and blood leukocyte response in *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) tick-infested dogs and guinea pigs. **Veterinary Parasitology** 115, 49–59. 2003.

TAMATANI T, KITAJIMA M, MAKINO N, ISHIMURA Y, SUEMATSU M. Induction of heme oxygenase-1 suppresses venular leukocyte adhesion elicited by oxidative stress: role of bilirubin generated by the enzyme. **Circ Res**, 85:663–671. 1999.

TATCHELL RJ, BENNETT GF. *Boophilus microplus*: antihistaminic and tranquillizing drugs and cattle resistance. **Exp Parasitol.** 26:369-377, 1969.

TATCHELL RJ, MOORHOUSE DE. The feeding processes of the cattle tick

Boophilus microplus (Canestrini). II. The sequence of host-tissue changes. **Parasitology**. 58:441-459, 1968.

THOM SR, FISHER D, XU YA, NOTARFRANCESCO K, ISCHIROPOULOS H. Adaptive responses and apoptosis in endothelial cells exposed to carbon monoxide. **Proc Natl Acad Sci USA**, 97:1305–1310. 2000.

TILG H, DINARELLO CA, MIER JW. IL-6 and APPs: Anti-inflammatory and immunosuppressive mediators. **Immunol Today** 18:428-432. 1997.

TORO-ORTIZ RD, VAZ JUNIOR IS, GONZALES JC, MASUDA A. Monoclonal antibodies against *Boophilus microplus* and their effects on tick reproductive efficiency. **Vet Parasitol**. May;69(3-4):297-306. 1997.

TORPIER, G.; CAPRON, A.; OUAISSI, M.A. Receptor for IgG(Fc) and human beta2-microglobulin on *S. mansoni* schistosomula. **Nature**. Mar 29;278(5703):447-9. 1979.

TRAGER, W.. Acquired immunity to ticks. **Journal of Parasitology** 25, 57–81. 1939.

TRIMNELL AR, HAILS RS, NUTTALL PA. Dual action ectoparasite vaccine targeting 'exposed' and 'concealed' antigens. **Vaccine**. Oct 4;20(29-30):3560-8. 2002.

TURNI C, LEE RP, JACKSON LA. Effect of salivary gland extracts from the tick, *Boophilus microplus*, on leucocytes from Brahman and Hereford cattle. **Parasite Immunol**. Jul;24(7):355-61. 2002.

UTECH, K.B.W., WHARTON, R..H., KERR, D.J. Resistance to *B. microplus* (Canestrini) in different breeds of cattle. **Australian Journal Agricultural Research**., East Melbourne, v.29, n.4, p.885-95. 1978.

VALENZUELA, J. G., CHARLAB, R., MATHER, T. N. & RIBEIRO, J.M. C. Purification, cloning, and expression of a novel salivary anticomplement protein from the tick, *Ixodes scapularis*. **Journal of Biological Chemistry** 275, 18717–18723. 2000.

VAN RENSBURG SJ, VAN ZYL J, HON D, DANIELS W, HENDRICKS J, POTOCHNIK F, ERASMUS R. Biochemical model for inflammation of the brain: the effect of iron and transferrin on monocytes and lipid peroxidation. **Metab Brain Dis.** Jun;19(1-2):97-112, 2004.

VAUGHAN JA, AZAD AF. Passage of host immunoglobulin G from blood meal into hemolymph of selected mosquito species (Diptera: Culicidae). **J Med Entomol.** Nov;25(6):472-4. 1988.

VAZ JR., I.S.; MARTINEZ, R.H.; OLIVEIRA, A.; HECK, A.; LOOGULLO, C.; GONZALES, J.C.; DEWES, H.; MASUDA, A. Functional bovine immunoglobulins in *Boophilus microplus* hemolymph. *Vet Parasitol*62: 155-60. 1996.

VERÍSSIMO, C.J. Resistência e suscetibilidade de bovinos leiteiros mestiços ao carrapato *Boophilus microplus*. Jaboticabal: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UEP, 170p. (**Dissertação-Mestrado** em Produção Animal). 1991.

VERÍSSIMO, C.J; OLIVEIRA, A. D. Método simplificado de contagem para avaliar a resistência de bovinos ao carrapato *Boophilus microplus*. **Boletim de Indústria Animal**, São Paulo,v.51, n.2, p.169-73. 1994.

VILLARES, J.B. Climatologia Zootécnica. III. Contribuição ao estudo da resistência e susceptibilidade genética dos bovinos ao *B. microplus*. **Boletim de Indústria Animal**, São Paulo,v.4, n.1, p.60-79, jan/jun.1941.

WANG, H.; NUTTALL, P .A. Excretion of host immunoglobulin in tick saliva and detection of IgG-binding proteins in tick haemolymph and salivary glands. **Parasitology** 109: 525-530. 1994.

WARD, E.S.; ZHOU, J.; GHETIE, V.; OBER, R.J. Evidence to support the cellular mechanism involved in serum IgG homeostasis in humans. **Int Immunol.** Feb;15(2):187-95. 2003.

WATANABE, A., YAGI, Y., SHIONO, H., YOKOMIZO, Y. Effect of intramammary infusion of tumour necrosis factor- α on milk protein composition and induction of acute-phase protein in the lactating cow. **J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health** 47, 653–662. 2000.

WATSON, D.L. Immunologically specific resistance to infection with particular reference to staphylococcal mastitis. **Adv. Exp. Med. Biol.** 137, 579-590. 1981.

WHARTHORN, R.H.; UTECH, K.B.W. The relation between engorgement and dropping of *B. microplus* (Canestrini) (Ixodidae) to the assessment of tick numbers on cattle. **Journal Australian Entomology Society.**, v.9, p.171-182. 1970.

WHELEN, A.C., RICHARDSON, L.K., WIKEL, S.K. Dot-ELISA assessment of guinea pig antibody responses to repeated *Dermacentor andersoni* infestations. **Journal of Parasitology** 72, 155–162. 1986.

WIDDERS, P.R.; AYDINTUG, M.K.; LEID, R.W. Antibody enhances killing of *Tritrichomonas foetus* by the alternative bovine complement pathway. **Infect Immun.** Apr;58(4):944-8. 1990.

WIKEL, S. K. & ALLEN, J. R. Acquired resistance to ticks. III. Cobra venom factor and the resistance response. **Immunology** 32, 457–465. 1977.

WIKEL, S. K. Acquired resistance to ticks. Expression of resistance by C4-deficient guinea pigs. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 28, 586–590. 1979.

WIKEL, S. K. 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. 1982.

WIKEL, S. K. Tick modulation of host immunity: An important factor in pathogen transmission. **International Journal for Parasitology** 29, 851–859. 1999.

- WIKEL, S.K.. Host immunity to ticks. **Annu. Rev. Entomol.** 41: 1-22. 1996.
- WILLADSEN P, KEMP DH. Vaccination with 'concealed' antigens for tick control. **Parasitol Today.** Jul;4(7):196-8. 1988.
- WILLADSEN, P., WOOD, G.M., RIDING, G.A. The relation between skin histamine concentration, histamine sensitivity and the resistance of cattle to the tick, *Boophilus microplus*. **Zeitschrift fur Parasitenkunde** 59, 87–93. 1979.
- XU L, BADOLATO R, MURPHY WJ. A novel biologic function of serum amyloid A. Induction of T lymphocyte migration and adhesion. **J Immunol** 155:1184-1190. 1995.
- ZHOU, J.; JOHNSON, J.E.; GHETIE, V.; OBER, R.J.; WARD, E.S. Generation of mutated variants of the human form of the MHC class I-related receptor, FcRn, with increased affinity for mouse immunoglobulin G. **J Mol Biol.** Sep 26;332(4):901-13. 2003.