

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA
FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**AQUISIÇÃO COMPARADA DE RESISTÊNCIA EM CÃES
DOMÉSTICOS AO *RHIPICEPHALUS SANGUINEUS*
(ACARI: IXODIDAE), LINHAGENS BRASILEIRA E
ARGENTINA, APÓS INFESTAÇÕES SUCESSIVAS**

Patricia Martinez Évora

Médica Veterinária

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL

2012

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA
FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**AQUISIÇÃO COMPARADA DE RESISTÊNCIA EM CÃES
DOMÉSTICOS AO *RHIPICEPHALUS SANGUINEUS*
(ACARI: IXODIDAE), LINHAGENS BRASILEIRA E
ARGENTINA, APÓS INFESTAÇÕES SUCESSIVAS**

Aluna: **Patricia Martinez Évora**

Orientador: **Prof. Dr. Gervásio Henrique Bechara**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária – Área de concentração em Patologia animal.

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL

Julho de 2012



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE JABOTICABAL

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: AQUISIÇÃO COMPARADA DE RESISTÊNCIA EM CÃES DOMÉSTICOS AO *Rhipicephalus sanguineus* (ACARI: IXODIDAE), LINHAGENS BRASILEIRA E ARGENTINA, APÓS INFESTAÇÕES SUCESSIVAS

AUTORA: PATRICIA MARTINEZ ÉVORA

ORIENTADOR: Prof. Dr. GERVASIO HENRIQUE BECHARA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM MEDICINA VETERINÁRIA, Área: PATOLOGIA ANIMAL, pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. GERVASIO HENRIQUE BECHARA

Departamento de Patologia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Profa. Dra. ROSANGELA ZACARIAS MACHADO

Departamento de Patologia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Prof. Dr. JAIR RODINI ENGRACIA FILHO

Centro universitário Moura Lacerda / Ribeirão Preto/SP

Data da realização: 13 de julho de 2012.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

PATRICIA MARTINEZ ÉVORA – nascida em 01 de novembro de 1983, em Ribeirão Preto, São Paulo. Filha de Paulo Roberto Barbosa Évora e Yolanda Dora Martinez Évora. Médica Veterinária formada pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Campus de Jaboticabal, em dezembro de 2008. Iniciou, em março de 2010, o curso de Mestrado na instituição acima mencionada, no programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de Patologia Animal, concluindo-o em julho de 2012 com a presente dissertação.

“A grandeza de uma nação pode ser julgada pelo modo que seus animais são tratados.”

(Mahatma Gandhi)

Aos meus pais, Paulo Roberto e Yolanda Dora, pelo amor incondicional, carinho, apoio e incentivo à minha formação.

Com eterno amor e gratidão,

DEDICO este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus pelo dom da vida. Sem Ele, nada seria possível.

Às pessoas que colaboraram com a realização desse trabalho, manifesto minha gratidão:

ao Prof. Dr. Gervásio Henrique Bechara, pela orientação, sabedoria, disponibilidade, dedicação, competência e sobretudo pela amizade;

à Profa. Dra. Rosangela Zacarias Machado pelo auxílio e orientação;

ao Ronaldo Del Vecchio pela amizade, apoio, dedicação e ensinamentos;

ao meu pai, Paulo Roberto, pelo auxílio na elaboração desta dissertação;

à minha mãe, Yolanda Dora, por receber de braços abertos, em nossa residência (o “berçário”), os filhotes de cães recém adquiridos para participarem do projeto, e ainda muito novos para adentrar o canil do Departamento de Patologia Veterinária;

ao meu namorado, João Paulo Guimarães da Costa, e amigo, Rafael Akira Sato, por todo o apoio e auxílio na execução deste trabalho, nos finais de semana e durante a semana, respectivamente;

aos colegas pós-graduandos, Gustavo Seron, Márcia Jusi e Vivian Bergamasco pela orientação, disponibilidade e paciência;

às técnicas de laboratório, Francisca Ardisson (Chica) e Maria Inês de Campos (Lia) pela colaboração;

aos estagiários Lucas Bocchini e Tamara Saggiorato pelo auxílio na manutenção do canil e manejo dos filhotes;

aos filhotes de Dachshund: Huguinho, Zezinho, Luisinho, Simba, Nala, Tico, Teka, Olivia Palito, Victória e Fu, pela confiança, carinho e colaboração. Sem vocês este trabalho não seria realizado;

ao primeiro cão que auxiliou nesse projeto, e que hoje faz parte de minha família, Heitor, pela confiança, amizade e amor incondicional;

à FAPESP pela bolsa concedida;

ao CNPq pelo auxílio cedido.

A todos que direta, ou indiretamente colaboraram na realização deste trabalho: meus sinceros agradecimentos!

SUMÁRIO

RESUMO	x
ABSTRACT	xii
1.INTRODUÇÃO	01
2.REVISÃO DA LITERATURA	04
2.1. O carrapato do cão <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	04
2.2. O hospedeiro cão doméstico	07
2.3. Interação carrapato-hospedeiro	08
2.4. Mecanismos de resistência do hospedeiro a carrapato	10
2.5. Mecanismos de evasão do parasita	14
3.OBJETIVOS	16
4.MATERIAL E MÉTODOS	17
4.1. Carrapatos	17
4.1.1. Identificação dos carrapatos adultos	18
4.2. Hospedeiros	18
4.3. Infestações sucessivas	19
4.4. Exame histopatológico e contagem de células	23
4.5. Preparo de antígeno de carrapato adulto	26
4.6. Ensaio Imunoenzimático Indireto - Teste ELISA	26
4.7. Análise estatística	28
4.8. Bem estar animal	28

5.RESULTADOS	29
5.1. Parâmetros biológicos após infestações sucessivas	29
5.1.1. Grupo experimental infestado com <i>R. sanguineus</i> linhagem Jaboticabal	29
5.1.2. Grupo experimental infestado com <i>R. sanguineus</i> linhagem Rafaela	32
5.1.3. Comparação entre os grupos experimentais infestados com <i>R. sanguineus</i> , linhagens Jaboticabal e Rafaela	35
5.2. Histopatologia do sítio de fixação dos carrapatos	38
5.2.1. Alterações gerais	38
5.2.2. Contagens celulares	40
5.2.2.1. Contagens celulares global e diferencial do grupo experimental infestado com <i>R. sanguineus</i> , linhagem Jaboticabal	42
5.2.2.2. Contagens celulares global e diferencial do grupo experimental infestado com <i>R. sanguineus</i> , linhagem Rafaela	44
5.2.2.3. Comparação entre a contagem celular global dos grupos experimentais infestados com <i>R. sanguineus</i> , linhagens Jaboticabal e Rafaela	47
5.3. Ensaio Imunoenzimático Indireto - Teste ELISA.....	49
6.DISSCUSSÃO	54
7.CONCLUSÃO	63
8.REFERÊNCIAS	65

**AQUISIÇÃO COMPARADA DE RESISTÊNCIA EM CÃES DOMÉSTICOS AO
RHIPICEPHALUS SANGUINEUS (ACARI: IXODIDAE), LINHAGENS
BRASILEIRA E ARGENTINA, APÓS INFESTAÇÕES SUCESSIVAS**

RESUMO - Resultados no Brasil demonstraram, ao contrário de laboratórios dos EUA e Japão, que o cão doméstico não desenvolve resistência ao carrapato *Rhipicephalus sanguineus*. Além disso, populações de *R. sanguineus* do Brasil e da Argentina apresentam diferenças biológicas, morfológicas e genéticas marcantes sendo a primeira mais próxima filogeneticamente do *R. turanicus* da África e a segunda do *R. sanguineus* da Europa, o que explicaria, em parte, as diferenças citadas acima. Objetivou-se investigar, de forma comparativa, possível aquisição de resistência em cães domésticos após três infestações sucessivas com *R. sanguineus*, linhagens Brasil e Argentina. Cães domésticos da raça Dachshund, machos e fêmeas, de três meses a um ano de idade, “naive”, foram utilizados como hospedeiros. Os cães (n= 10) foram distribuídos em dois grupos (G1 e G2) com cinco animais cada e infestados três vezes com *R. sanguineus*: G1- linhagem brasileira, e G2- linhagem argentina. Avaliaram-se: parâmetros biológicos dos carrapatos, histopatologia dos sítios de fixação na 1^a e 3^a infestações e titulação de anticorpos séricos dos cães pelo teste ELISA. Resultados dos parâmetros biológicos indicaram melhor desempenho alimentar e reprodutivo das teleóginas após infestações sucessivas, em ambos os grupos. Biópsias do sítio de fixação dos carrapatos revelaram, em ambos os grupos, infiltrado inflamatório com predomínio de células mononucleares 24 horas pós-liberação dos carrapatos e predominantemente neutrofílico em todas as infestações na 48^a, 72^a e 144^a horas pós-liberação. O teste ELISA revelou baixa produção de anticorpos séricos no G2, em infestações sucessivas, e maior produção pós-segunda e terceira infestações no G1. Também demonstrou reação cruzada entre os soros dos cães infestados com *R. sanguineus*, Brasil e o antígeno de *R. sanguineus*, Argentina, e vice-versa. Conclui-se que não há

diferença significativa entre aquisição de resistência pelo cão doméstico aos carrapatos *R. sanguineus*, Brasil e Argentina.

Palavras-Chave: Cão doméstico, Histopatologia, Imunidade, Infestação, *Rhipicephalus sanguineus*, Teste ELISA

**COMPARED ACQUISITION OF RESISTANCE IN DOMESTIC DOGS TO
RHIPICEPHALUS SANGUINEUS (ACARI: IXODIDAE), STRAINS BRAZIL AND
ARGENTINA, AFTER SUCCESSIVE INFESTATIONS**

ABSTRACT - Contrarily to that observed in U.S.A and Japan, previous results from Brazil have shown that domestic dogs do not develop resistance to the dog tick *Rhipicephalus sanguineus*. In addition, populations of *R. sanguineus* from Brazil and Argentina have biological, morphological and genetic differences, being the first phylogenetically closest to *R. turanicus* from Africa and the second to *R. sanguineus* from Europe, what could explain, at least in part, the differences reported above. The aim now was to investigate, in a comparative way, the possible acquisition of resistance in domestic dogs after three successive infestations with *R. sanguineus* ticks, Brazil and Argentina strains. For this, “naive” domestic dogs of the breed Dachshund, males and females, aged three months to one year were used. The hosts (n = 10) were divided into two groups with five animals each, infested thrice with *R. sanguineus*: G1- Brazil strain; G2- Argentina strain. It was evaluated: i. biological parameters of ticks in each infestation; ii. histopathology of their fixation sites in different times (24, 48, 72 and 144 hours) post-tick release in the 1st and 3rd infestations, including inflammatory cell counting; iii. titration of dog sera antibodies by ELISA. Results of the biological parameters indicated better engorged females feeding and reproductive performances after successive infestations in both groups. Biopsies of the ticks’ attachment sites in the 1st and 3rd infestations revealed, in both groups, predominantly mononuclear inflammatory cells infiltrates 24 hours post-tick release and predominantly neutrophilic in all infestations at 48, 72 and 144 hours post-tick release. The ELISA revealed low antibody titers in G2, in successive infestations, and increased titers post second and third infestations, in G1. It also revealed cross-reactivity between the sera of dogs infested with *R. sanguineus*, Brazil and antigen of *R. sanguineus*, Argentina, and vice versa. It can be concluded that there

is no significant difference between the acquisition of resistance in domestic dogs to *R. sanguineus* ticks, Brazil and Argentina strains.

Keywords: Domestic dog, ELISA, Histopathology, Immunity, Infestation, *Rhipicephalus sanguineus*

1. INTRODUÇÃO

Carrapatos são ectoparasitos do filo Artropoda, hematófagos obrigatórios, que parasitam a maioria dos vertebrados terrestres. As espécies de carrapatos de maior importância na medicina humana e veterinária têm como hospedeiros os bovinos, caprinos, cães ou aves, entre outros. A domesticação destes animais pelo ser humano permitiu que os carrapatos aumentassem sua habilidade de sobrevivência, em parte devido à concentração de animais sedentários em estábulos e pastos, propícios para o desenvolvimento do carrapato, assim como promoveu a disseminação de suas diferentes espécies, através do transporte dos animais (HOOGSTRAAL & AESCHLIMANN, 1982).

Estima-se que em média 10% das espécies de carrapatos possuem grande capacidade parasitária, transmitindo patógenos inclusive para o homem (OLIVER, 1989). Dentre as doenças transmitidas por carrapatos, estão incluídas a leishmaniose, febre amarela, babesiose, erliquiose, anaplasiose, leptospirose e doença de Lyme (FRASER & MAYS, 1986).

O impacto dos carrapatos na pecuária é enorme mesmo quando estes não são vetores de doenças. Em condições favoráveis (clima e susceptibilidade do gado da região) os carrapatos podem parasitar de forma intensa, causando a desvalorização da pele e couro dos animais, perdas devido a miíases e possíveis abscessos decorrentes de infecção bacteriana secundária à picada, queda na produção de leite e carne, paralisia, e até a morte dos animais. Dentre as principais doenças transmitidas pelos carrapatos em bovinos estão a babesiose, theileriose e anaplasiose (JONGEJAN & UILENBERG, 2004).

Na tentativa de amenizar as infestações, programas intensos e dispendiosos de tratamentos à base de acaricidas químicos são empregados, porém o uso abusivo dos mesmos leva ao rápido desenvolvimento de resistência dos ácaros a inúmeros grupos de produtos químicos (BIANCHI, BARRE & MESSAD, 2003), além de contaminação ambiental e de produtos de origem animal. Como consequência, há incentivo crescente

na busca por alternativas de controle do carrapato, como por exemplo, o desenvolvimento de vacina (RAJPUT *et al.*, 2006).

Uma opção considerada sustentável é a combinação de produtos químicos com vacina para o controle de carrapatos e doenças transmitidas por eles (GHOSH *et al.*, 2007). Por hora, o objetivo central do desenvolvimento de uma vacina é combater as doenças que são economicamente importantes.

O avanço na biologia dos carrapatos via novas tecnologias de descoberta de genes, podem favorecer o desenvolvimento de vacinas ao abrir novas oportunidades de identificação de candidatos a antígenos (GHOSH *et al.*, 2007). O desenvolvimento de vacinas anti-carrapato representa uma das alternativas associativas mais promissoras ao controle químico dos ectoparasitos, com a vantagem de serem específicas para a espécie alvo, de fácil administração e baixo custo, além de não oferecerem risco ambiental (WIKEL, 1996).

Ademais, o uso de endossimbiontes e o desenvolvimento de acaricidas herbais também são promissores e podem se tornar alvo de interesse em futuras pesquisas relacionadas ao controle de carrapatos (GHOSH *et al.*, 2007).

Resultados do Laboratório de Imunopatologia do Departamento de Patologia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - FCAV, UNESP, Jaboticabal, ao contrário de outros laboratórios dos EUA e Japão, demonstraram, nas últimas duas décadas, que o cão doméstico não desenvolve resistência aparente ao carrapato *Rhipicephalus sanguineus* após infestações repetidas ou infestação desafio pós-imunização com extrato de carrapato (BECHARA *et al.*, 1994; SZABÓ & BECHARA, 1999; SZABÓ *et al.*, 1995; JITTAPALAPONG *et al.*, 2000a; INOKUMA *et al.*, 1997). Recentemente, um estudo comparativo entre populações de *R. sanguineus* do Brasil e da Argentina mostrou diferenças biológicas, morfológicas e genéticas marcantes entre ambas; a linhagem brasileira pareceu mais próxima filogeneticamente do *R. turanicus* da África, enquanto a linhagem argentina relacionou-se mais com o *R. sanguineus* da Europa, o que explica pelo menos em parte as diferenças acima relatadas quanto ao desenvolvimento de resistência em cães a esta espécie de carrapato (SZABÓ *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2005).

A presente investigação teve por objetivo estudar, de forma comparativa, a aquisição de resistência em cães domésticos a carrapatos adultos *R. sanguineus*, linhagens Jaboticabal (Brasil) e Rafaela (Argentina).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. O carrapato do cão *Rhipicephalus sanguineus*

O “carrapato vermelho do cão”, *Rhipicephalus sanguineus*, é um carrapato pertencente à ordem Acarina e família Ixodidae. Durante o ciclo evolutivo, estes parasitos passam por três estádios: larva, ninfa e adulto, parasitando um hospedeiro em cada estágio, sendo então necessárias três hospedagens, pois todas as mudas são realizadas no ambiente. Segundo Freitas *et al.* (1978), uma vez ingurgitadas as fêmeas destacam-se do hospedeiro e procuram abrigo para oviporem entre 2000 a 3000 ovos.

O *R. sanguineus* é amplamente distribuído em todos os continentes e, provavelmente, é o mais prevalente das espécies de ixodídeos de acordo com Pegram *et al.* (1987a,b). Ele possui alto potencial como vetor de doenças, tais como febres maculosa e botonosa e erliquiose no homem e a babesiose e erliquiose em cães domésticos (WALKER *et al.*, 2000).

Introduzido na América do Sul por rotas diversas, provavelmente pelos colonizadores, foi reconhecido em Buenos Aires, Argentina, em 1938 (ROVEDA, 1954), e em Santiago, Chile, em 1974 (TAGLE, 1976). Acredita-se que o carrapato *R. sanguineus sensu stricto* é o único representante do gênero *Rhipicephalus* na América do Sul.

Devido sua importância na Medicina Veterinária como ectoparasito de cães domésticos e sua competência como vetor, o *R. sanguineus* é objeto freqüente de pesquisas no Brasil e em outros países, com resultados algumas vezes discrepantes, dependendo da região considerada. É o principal vetor da *Rickettsia conorii*- agente transmissor da febre botonosa ao homem em países da bacia do Mediterrâneo (ESTRADA-PEÑA & JONGEJAN, 1999). A *Ehrlichia canis*, ou espécie relacionada, isolada de humanos na Venezuela (PEREZ *et al.*, 1996), tem o *R. sanguineus* como seu principal vetor (UNVER *et al.*, 2001).

Existem vários registros de humanos parasitados por *R. sanguineus* em países da região Neotropical, como Argentina, Brasil, Chile, México, Panamá, Peru, Porto Rico,

Venezuela e Uruguai (GUGLIELMONE *et al.*, 2003). Nos EUA há relatos de casos de humanos parasitados por esta espécie em algumas regiões (ESTRADA-PEÑA & JONGEJAN, 1999). Na África, o *R. sanguineus* é predominantemente parasito doméstico de cães, mas pode infestar o homem, e mais raramente, animais de produção criados em sistema de agricultura familiar (WALKER *et al.*, 2000). Em outras regiões, o *R. sanguineus* é restrito quase que exclusivamente aos cães domésticos (PEGRAM *et al.*, 1987b).

A espécie parece mostrar variabilidade em tamanho e peso em diferentes regiões do globo terrestre. A comparação de dados publicados mostra que fêmeas ingurgitadas da Região Norte do Estado de São Paulo (BECHARA *et al.*, 1995; SZABÓ *et al.*, 1995) podem pesar cerca de 50% menos que aquelas dos EUA (JITTAPALAPONG *et al.*, 2000a) e do Japão (INOKUMA *et al.*, 1997).

Outra observação variável entre carrapatos *R. sanguineus* de regiões diferentes, relaciona-se ao desenvolvimento de resistência em cães a esta espécie de carrapato após infestações sucessivas. De fato, Chabaud (1950), Theis & Budwiser (1974) e Szabó *et al.* (1995) demonstraram que cães domésticos não desenvolvem resistência após várias infestações. Ferreira & Bechara (1995), ao testarem a hipótese de que o ancestral do cão doméstico teria perdido esta capacidade protetora, demonstraram que o cachorro-do-mato *Cerdocyon thous* também não desenvolvia resistência ao carrapato *R. sanguineus* após infestações sucessivas, ou mesmo em infestação desafio pós-vacinação com extrato bruto de carrapato da mesma espécie.

Contrariamente, outros autores (INOKUMA *et al.*, 1997; JITTAPALAPONG *et al.*, 2000a) relataram algum grau de resistência ao *R. sanguineus* em cães domésticos pré-sensibilizados.

Levando em conta essas diferenças entre linhagens de *R. sanguineus*, uma avaliação mais acurada de tais variações entre diferentes populações dessa espécie do ectoparasito poderia contribuir para o melhor entendimento de diferenças regionais na epidemiologia de doenças veiculadas, bem como de variações na susceptibilidade a acaricidas.

Neste sentido, Szabó *et al.* (2005) pesquisaram de forma comparativa a biologia, DNA mitocondrial e fertilidade de híbridos de duas linhagens de *R. sanguineus*, uma de Jaboticabal, Brasil e outra de Rafaela, Argentina. Em relação ao ciclo biológico do ectoparasito, estes autores observaram que tanto as formas imaturas (larvas e linfas) como fêmeas adultas da linhagem argentina pesaram mais, além do período do ingurgitamento significativamente mais longo que a linhagem brasileira. Por outro lado, a taxa de recuperação (número de carrapatos ingurgitados e destacados em relação ao liberado) de fêmeas do Brasil foi maior. Os mesmos autores detectaram ainda divergência intraespecífica de DNA mitocondrial entre as duas populações e marcada relação genética entre as populações da Argentina e da França, enquanto a do Brasil pareceu mais relacionada filogeneticamente ao *Rhipicephalus turanicus* do Zimbábue, África. Ademais, fêmeas híbridas de produtos do cruzamento entre carrapatos adultos argentinos x brasileiros, conseguiram ovipor, todavia os ovos eram na maioria inviáveis quando comparados ao número de larvas eclodidas de linhagem pura brasileira ou argentina.

No conjunto, esses resultados demonstram que as diferenças entre essas linhagens de *R. sanguineus* são marcantes, e que, portanto, a situação biossistemática de *R. sanguineus* da América do Sul deveria ser reavaliada. Além disso, explicaria em parte as diferenças na biologia e capacidade vetorial destas espécies observadas em várias partes do mundo.

Paralelamente a este trabalho de Szabó *et al.* (2005), estudo sobre a ultraestrutura externa de fêmeas parcialmente alimentadas das duas populações de *R. sanguineus*, argentina e brasileira, conduzido por Oliveira *et al.* (2005), revelou diversas diferenças morfológicas, dentre as quais: dimensões corpóreas, forma do poro genital e morfologia das estruturas sensoriais. Ressalte-se que todas essas diferenças observadas são fundamentais para a identificação de espécies do gênero complexo *Rhipicephalus*, indicando mais uma vez a necessidade de uma revisão taxonômica destas espécies no Neotrópico.

2.2. O hospedeiro cão doméstico

A família Canidae é um grupo de carnívoros dividido em 38 espécies, incluindo o cão doméstico. O *Canis familiaris*, é o único membro da família Canidae considerado totalmente domesticado (SERPELL, 1996).

A origem do cão doméstico é bastante divergente. Enquanto uns especulam que sejam descendentes de outra variação canídea, as teorias mais aceitáveis são que eles descendem diretamente do lobo cinzento ou dos cruzamentos entre lobos e chacais (TEIXEIRA, 2005). John Hunter (1787) propôs que devido ao fato de cães produzirem descendentes híbridos férteis quando cruzados tanto com lobos como com chacais, que estes três canídeos deveriam ser considerados uma única espécie. Contrariamente, Linnaeus (1758) considerava o cão como sendo uma espécie distinta pelo fato de possuir a cauda voltada para cima, característica não encontrada em nenhum outro canídeo.

Hoje, no entanto, através de estudo combinado sobre comportamento (SCOTT & FULLER, 1965; FOX, 1971, 1975; HALL & SHARP, 1978; ZIMEN 1981), vocalizações (LORENZ, 1975; ZIMEN, 1981), morfologia (WAYNE 1986 a,b,c; HEMMER, 1990) e biologia molecular (WAYNE & O'BRIEN, 1987; WAYNE, NASH & O'BRIEN, 1987) tudo indica que o principal, se não o único ancestral do cão doméstico seja o lobo, *Canis lupus*.

Ao longo do tempo, houve uma seleção de animais dóceis, tolerantes e obedientes aos seres humanos, aos quais era permitido o acasalamento e que, quando adultos, eram de grande utilidade, auxiliando na caça e na guarda. Esse gradual processo, baseado em tentativas e erros, levou eventualmente à criação dos cães domésticos (JOHNS, 2008; ROSSI, 2005).

2.3. Interação carrapato-hospedeiro

Vários estudos são realizados na tentativa de compreender melhor os mecanismos envolvidos na interação carrapato x hospedeiros. O sucesso da associação dos hematófagos com os hospedeiros está baseado na habilidade destes animais de interferir nas reações anti-hemostática e inflamatória do seu hospedeiro vertebrado (AROCHA-PIÑANGO *et al.*, 1999). Segundo Wikel *et al.* (1994) o sucesso é um balanço entre as limitações do parasito pelas defesas do hospedeiro e a habilidade do parasito de modular, evadir ou restringir a resposta imune.

Os primeiros estudos sobre aquisição de resistência a carrapatos foram realizados por Trager (1939) em cobaias submetidas a infestações com larvas de *Dermacentor variabilis* e, desde então, vários trabalhos têm confirmado a aquisição de resistência a carrapatos em cobaias e coelhos por meio de infestações sucessivas ou de vacinação com extratos do ectoparasito (ALLEN, 1973; WIKEL & ALLEN, 1976; ASKENASE *et al.*, 1977; BECHARA *et al.*, 1994; SZABÓ *et al.*, 1995a).

Segundo Tatchell (1969), quando ocorre controle do tipo “feedback”, o hospedeiro desenvolve resistência ao parasito e se torna protegido de infestações maciças enquanto o carrapato mantém sua capacidade de sobreviver e se multiplicar rapidamente, quando em ambiente favorável.

Em animais resistentes, a rejeição aos carrapatos é freqüentemente baseada em reações de hipersensibilidade cutânea (BROWN *et al.*, 1984). A reação de hipersensibilidade do tipo basofílica foi detectada por Szabó & Bechara (1999) em cobaias pré-sensibilizadas pelo carrapato *R. sanguineus* via infestações sucessivas com adultos desse ixodídeo. Destaque-se que cobaias, mas não cães domésticos ou cachorros-do-mato *Cerdocyon thous*, desenvolvem marcada resistência a essa mesma espécie de carrapato já a partir de uma segunda infestação (SZABÓ *et al.*, 1995a; FERREIRA & BECHARA, 1995).

Ainda, frente à injeção intradérmica de extrato de carrapato *R. sanguineus* adulto, o cão doméstico desenvolve apenas reação de hipersensibilidade do tipo imediata (imunidade humoral), enquanto que a cobaia responde com reações dos tipos

imediate bem como tardia (imunidade celular) (SZABÓ *et al.*, 1995b) . Isso faz crer que, pelo menos nessa relação parasito-hospedeiro, ao lado dos basófilos, o braço celular da resposta imune parece desempenhar papel fundamental no mecanismo de resistência ao carrapato.

Resposta semelhante à do cão após infestações sucessivas com *R. sanguineus* foi observada em camundongos e associada com um perfil Th2 de citocinas, mais relacionado a uma resposta imune humoral, mediada por anticorpos (FERREIRA & SILVA, 1998, 1999).

O mecanismo pelo qual a imunidade é expressa varia de acordo com a espécie de hospedeiro e carrapato envolvidos na relação parasito-hospedeiro.

Os efeitos do hospedeiro sobre a rejeição ao parasito relacionam-se a interferências na sua alimentação, prolongamento no tempo de ingurgitamento, redução do peso das fêmeas ingurgitadas e da massa de ovos, diminuição da viabilidade dos ovos e, em alguns casos, até morte do parasito (WAGLAND, 1975). Segundo Wikel & Allen (1982), os achados acima podem ser devidos exclusivamente à nutrição deficiente dos carrapatos.

Algumas espécies ou sub-espécies de hospedeiros, mesmo sem nunca ter tido contato com o carrapato, podem apresentar resistência natural ao ácaro (imunidade inata), geneticamente associada a diversos fatores, tais como: tipo de pelagem, oleosidade da pele, riqueza de vasculatura cutânea e até mesmo odor exalado do animal, entre outros (BROWN, 1988).

Enquanto infestações por carrapatos são freqüentemente caracterizadas no hospedeiro pelo desenvolvimento de resposta imune celular e humoral a uma variedade de antígenos do ectoparasito, este por sua vez, desenvolve meios de se evadir daquela resposta do hospedeiro (WIKEL *et al.*, 1994).

2.4. Mecanismos de resistência do hospedeiro a carrapato

Riek (1962) descreveu dois tipos de mecanismos de resistência, sendo o primeiro denominado resistência inata (resistência já presente no animal quando da primeira infestação), e o segundo denominado resistência adquirida (que consiste na aquisição de resistência após algumas infestações do animal por carrapatos).

De acordo com a literatura, os bovinos *Bos indicus* são mais resistentes que os bovinos *Bos taurus* e em cruzamentos, quanto maior a proporção de sangue zebu, menor será a população média de carrapatos (HONER & GOMES, 1990). Enquanto o gado indiano tem convivido há milhares de anos com o carrapato *Boophilus microplus* (THIESEN, 1979; LEMOS, 1986), o gado europeu, segundo Penna (1990), teve pouco contato com o carrapato, e esta pode ser uma razão para estes animais serem menos resistentes ao parasito. Porém, Penna (1990) também salientou que existem raças com diferentes níveis de resistência e Gomes (1995) observou que a variação individual com relação à resistência aos carrapatos também acontece dentro de uma mesma raça. Frente a esses fatos, Wikel (1996) relatou ser necessário, primeiramente, se estudar o “background” genético de um hospedeiro experimental em estudo sobre resistência imunológica adquirida.

Apesar de a resistência inata resultante das diferenças genéticas entre *Bos indicus* e *Bos taurus* ser a base para se determinar se um animal virá a ser resistente à infestação por carrapatos, a resistência do hospedeiro é predominantemente considerada adquirida, pois o maior nível de resistência visto em *Bos indicus* é aparente apenas quando seguido de susceptibilidade inicial a uma primoinfestação (HEWETSON, 1971; WAGLAND, 1978).

Um componente importante no processo de resistência ao carrapato é o processo de auto-limpeza realizado pelos animais considerados resistentes. Mediadores imunológicos induzidos pelos antígenos inoculados pelos carrapatos na pele do hospedeiro contribuem para que a região comece a apresentar prurido (ALEXANDER, 1986), e na tentativa de livrar-se do parasito, o animal lambe a área parasitada ou coça-se em locais ásperos (ROCHA, 1976).

Amakiri (1976) observou que existe uma correlação direta entre o número de anastomoses artério-venosas na vasculatura dermal, mais rica em *Bos indicus*, favorecendo neles uma resposta inflamatória local mais acentuada. Ademais, características da espécie hospedeira e do parasito (CHABAUD, 1950), raciais e individuais como a densidade do pêlo, quantidade de glândulas sebáceas, número de mastócitos na pele, espessura da pele, número de linfócitos circulantes, comportamento, dentre outras, também determinam a resistência inata.

Com relação ao fator idade, animais jovens de até seis meses de idade são mais resistentes, provavelmente devido aos cuidados da mãe com os mesmos (SUTHERST *et al.*, 1979) enquanto que aos 72 meses, são considerados mais sensíveis (VERÍSSIMO, 1991).

Na variável sexo, os machos geralmente são mais susceptíveis do que as fêmeas (STEAR *et al.*, 1984).

Com relação à época do ano, Gomes *et al.* (1989) demonstraram que os bovinos apresentam-se mais sensíveis no outono, quando o fotoperíodo é mais curto, o que afeta a resposta inflamatória no local da fixação do carrapato. Animais com pelagem mais escura podem ser mais sensíveis aos carrapatos por procurarem mais freqüentemente locais protegidos do sol, locais estes que também são preferidos pelos carrapatos, facilitando o acesso das larvas aos animais (OLIVEIRA & ALENCAR, 1987). Outros fatores determinantes de aquisição, ou não, de resistência do hospedeiro são o estado nutricional do animal e lactação (TATCHELL, 1987).

Trager (1939a,b) observou que cobaias, após serem infestadas uma única vez com larvas de *Dermacentor variabilis*, desenvolviam imunidade sistêmica, observando com isso que as reações cutâneas no sítio de alimentação dos carrapatos nas cobaias resistentes eram caracterizadas por hiperplasia epidérmica, edema e infiltrados inflamatórios granulocíticos. A resistência adquirida pode ser transferida para animais “naive” através de células ou soro isolados de animais infestados (TRAGER, 1939; ALLEN, 1973; BROWN, 1981).

Através da vacinação com extrato de carrapatos adultas ou infestação, Trager (1939a,b) sugeriu que a resistência adquirida era devida à resposta imune mediada.

Essa sugestão foi posteriormente confirmada por Riek (1956) após observar intensa reação de pele pós-inoculação de extrato de carrapato em bovinos previamente sensibilizados.

Ao se alimentar, o carrapato induz a via regulatória e efetora do sistema imune do hospedeiro, envolvendo anticorpos, complemento, citocinas, células apresentadoras de antígenos e linfócitos T (BROSSARD, 1982; WIKEL, 1982; WIKEL, 1994; WILLADSEN, 1980).

Allen (1973) verificou que no sítio de alimentação dos carrapatos, as cobaias desenvolviam reações cutâneas que consistiam principalmente de basófilos e eosinófilos. Infiltrados cutâneos ricos em basófilos são respostas de linfócitos T (DVORAK, 1970) e a reação de hipersensibilidade tardia é mediada pelos linfócitos Th1 (MOSSMAN, 1989). Aparentemente, os basófilos estão relacionados com a limitação da alimentação dos carrapatos (WIKEL, 1996). A administração de soro anti-basofílico resultou em redução da expressão de resistência adquirida (BROWN 1982).

Através do infiltrado basofílico ocorre liberação de mediadores como a histamina, ocasionando o aumento da permeabilidade vascular e, conseqüentemente, edema (RIBEIRO, 1989). A vasodilatação dos capilares locais possivelmente altera o microclima da pele, tornando-o, assim, inadequado para o carrapato (OBEREM, 1984). Segundo Willadsen (1979), o teor de histamina presente na pele é diretamente relacionado com o grau de resistência expressada. Estudo revelou que a administração de drogas anti-histamínicas em bovinos acarreta significativo aumento na produção de fêmeas ingurgitadas por animal (TATCHELL & BENNETT, 1969), pois reduz a expressão de resistência. Em outro estudo conduzido por Wikel (1982) demonstrou-se que o nível de histamina presente no sítio de alimentação de *Dermacentor andersoni* em cobaias resistentes era mais elevado que em animais susceptíveis. A administração de anti-histamínicos anti-h1 e anti-h2 reduziu a expressão de resistência enquanto a administração isolada de agonistas não alterou a resistência a carrapatos, significativamente.

O aumento do fluxo de sangue no sítio de fixação do carrapato, principalmente em animais resistentes, também pode contribuir para maior distribuição de antígenos às

células imunocompetentes e/ou facilitar o tráfego de células no local (WIKEL *et al.*, 1986).

Os mastócitos podem carrear anticorpos de superfície, e talvez ajam como a primeira linha de defesa contra carrapatos, induzindo também a vasodilatação ao liberar fatores vasoativos (BROWN, 1988). Uma equipe de pesquisadores sugeriu que em camundongos, os mastócitos, ao invés dos basófilos, são importantes para a imunidade adquirida a carrapatos, com base na observação que estes não foram detectados no sítio de alimentação dos carrapatos e que os camundongos deficientes em mastócitos não adquiriram resistência (MATSUDA *et al.*, 1985; 1987; 1990). Por outro lado, outra equipe de pesquisadores relatou que a mesma estirpe de camundongos deficientes em mastócitos desenvolveu resistência a outras espécies de carrapatos (DENHOLLANDER, 1985; STEEVES, 1991).

As células de Langerhans também são importantes na resistência adquirida, (ALLEN *et al.*, 1979a; NITHIUTHAI & ALLEN, 1984a; 1984b; 1984c; 1985). diminuindo em quantidade na epiderme durante a infestação primária e aumentam no sítio de alimentação de carrapatos durante a fase inicial da segunda infestação, quando a resistência se expressa (NITHIUTHAI & ALLEN, 1984a). Nas primeiras infestações, as células de Langerhans aparentemente aprisionam antígenos de glândulas salivares dos carrapatos e acredita-se que elas sejam drenadas para os linfonodos onde apresentam os antígenos aos linfócitos pré-sensibilizados (ALLEN *et al.*, 1979b) que por sua vez secretam fatores quimiotáxicos para basófilos, que já se encontram ligados a anticorpos na circulação.

Wikel & Allen (1976) demonstraram experimentalmente que anticorpos também desempenham papel na expressão de resistência de alguns hospedeiros. Ao administrarem ciclofosfamida a cobaias resistentes a carrapatos, observaram que houve bloqueio da expressão de resistência. Segundo Shapiro *et al.* (1986), a resistência de cobaias a *Rhipicephalus appendiculatus* parece ser mediada por anticorpos.

Segundo Wikel (1996), anticorpos contribuem para a expressão da resistência, porém muitos deles provavelmente não reagem com as moléculas envolvidas em

processos que influenciam na biologia do carrapato. O mesmo autor também relatou que se deveria focar a atenção nos imunógenos originados na glândula salivar que estimulam os linfócitos T durante a infestação e que a importância relativa das respostas de Th1 e Th2 durante a aquisição e expressão de resistência deveria ser determinada.

As células Th1 produzem IFN- γ enquanto as células Th2 produzem IL-4, IL-13, IL-5 e IL-10 (MOSMANN & COFFMAN, 1989; MOSMANN & SAD 1996; KOBAYASHI *et al.*, 2001). Citocinas associadas às células Th1 estão envolvidas na reação de hipersensibilidade do tipo tardia, assim como na ativação de macrófagos. Já as citocinas associadas às células Th2 estão envolvidas na elevação do número de mastócitos e eosinófilos, assim como na estimulação da produção de anticorpos. Mais além, produtos de células Th1 e Th2 podem regular negativamente a atividade e/ou produção um do outro (MOSMANN & MOORE, 1991).

2.5. Mecanismos de evasão do parasito

Embora algumas espécies hospedeiras desenvolvam resistência a carrapatos, nem sempre podemos observar tal acontecimento.

A falha no desenvolvimento de imunidade efetivamente protetora poderia ser devida a uma incapacidade imunológica do hospedeiro ou à capacidade de evasão do parasito (RIBEIRO, 1989). A incapacidade imunológica do hospedeiro pode ser devido a expressão antigênica imprópria para a indução da resposta imune efetiva, ou devido a não utilização dos componentes parasitários corretos (MORRISON, 1987). Um mecanismo de evasão importante do parasito parece estar associado às suas glândulas salivares. Suas principais funções incluem a absorção de vapor de água proveniente de ar insaturado por carrapatos em vida livre, excreção do excesso de fluído, concentrando o sangue ingerido, e a secreção de proteínas bioativas e componentes lipídicos durante a sua alimentação (SAUER *et al.*, 2000). Estes componentes atuam no sentido de opor-se aos mecanismos de defesa apresentados pelo hospedeiro em resposta à fixação do

carrapato (BOWMAN *et al.*, 1997). Um exemplo é a saliva de carrapatos *Ixodes ricinus*, a qual exerce atividade antiinflamatória, anti-hemostática, inibidora da atividade da bradicinina, de anafilotoxinas, desativadora de neutrófilos (RIBEIRO *et al.*, 1985; 1990; RIBEIRO & SPIELMAN, 1986) e anticoagulante (LIMO *et al.*, 1991, RIBEIRO *et al.*, 1985). Além disso, proteínas que se ligam à histamina foram encontradas na saliva do carrapato *Rhipicephalus appendiculatus* subvertendo o sistema de defesa do hospedeiro (PAESEN *et al.*, 1999).

Segundo estudo conduzido por Walker & Fletcher (1990), as glândulas salivares dos carrapatos são capazes de responder seletivamente a diferentes condições no sítio de fixação, aumentando assim as chances de sobrevivência do carrapato.

3. OBJETIVOS

Estudar de forma comparativa a aquisição de resistência em cães domésticos a carrapatos adultos *R. sanguineus*, linhagens Jaboticabal, Brasil e Rafaela, Argentina, após infestações sucessivas e controladas por meio de:

1. Determinação de parâmetros biológicos alimentares e reprodutivos de teleóginas;
2. Caracterização histopatológica da lesão de fixação dos carrapatos em diversos momentos pós-liberação na pele dos hospedeiros, incluindo a contagem de células inflamatórias migradas para o foco inflamatório;
3. Determinação do título de anticorpos séricos de cães por meio do teste ELISA.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Carrapatos

Foram utilizados no experimento carrapatos *R. sanguineus* adultos das linhagens brasileira e argentina provenientes de colônias mantidas no Laboratório de Imunopatologia do Departamento de Patologia Veterinária da FCAV-UNESP, Campus de Jaboticabal, SP, Brasil.

A colônia de *R. sanguineus* da linhagem brasileira foi iniciada a partir de fêmeas ingurgitadas coletadas em cães em Jaboticabal - SP, e existe há aproximadamente 10 anos, sendo renovada periodicamente com a inclusão de novos exemplares locais. A colônia de *R. sanguineus* da linhagem argentina foi iniciada para os estudos de Szabó *et al.* (2005) a partir de exemplares gentilmente cedidos pelo Dr. Santiago Nava do Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuária – INTA, Rafaela, Santa-Fé, Argentina, sendo também renovadas periodicamente.

Para a manutenção das colônias, os diversos instares das duas linhagens foram alimentados em coelhos brancos da raça Nova Zelândia sem contato prévio com carrapatos, fornecidos pelo Biotério Central da UNESP, campus de Botucatu, SP, de acordo com técnica descrita por Bechara *et al.* (1995). Tais hospedeiros foram alimentados com ração apropriada e água *ad libitum*.

Para metamorfose dos instares ingurgitados, bem como para sua simples manutenção, os ácaros foram mantidos em estufa para B.O.D. (modelo CD347, FANEM) à temperatura de 27°C, umidade de 80% e fotoperíodo de 12 horas.

4.1.1. Identificação dos carrapatos adultos

As características morfológicas observadas para distinção dos *R. sanguineus* de outras espécies e sexagem estão descritas abaixo (FREITAS *et al.*, 1982). No presente trabalho, foi realizada a sexagem de cada exemplar antes de cada infestação.

a) Fêmeas:

- Dorsalmente, o escudo cobre apenas a porção anterior do idiosoma, a base do capítulo é hexagonal e os peritremas são em forma de vírgula.
- Ventralmente a primeira coxa é bífida, o sulco anal é bem distinto e curvado ao redor do ânus, sendo as placas adanais ausentes.

b) Machos:

- Dorsalmente, o escudo cobre o ácaro, sem ornamentação, possui duas placas adanais internas desenvolvidas e duas externas rudimentares, a base do capítulo é hexagonal e os peritremas são em forma de vírgula.
- Ventralmente a primeira coxa é bífida, as duas placas adanais internas são desenvolvidas e as duas externas rudimentares.

4.2. Hospedeiros

Cães domésticos (*Canis familiaris*), da raça Dachshund, machos e fêmeas, de três meses a um ano de idade, pêlo curto ou longo, sem contato prévio com carrapatos (“naive”), foram adquiridos de criadores particulares e utilizados como hospedeiros nas infestações por adultos de *R. sanguineus* linhagem Jaboticabal, Brasil e linhagem Rafaela, Argentina.

Previamente aos experimentos, os animais foram submetidos a esquema de imunização com vacina V-10 (Duramune® Max 5-CvK/4L), vermifugados (Drontal® Plus) e mantidos em boxes individuais no Canil Experimental do Departamento de

Patologia Veterinária da FCAV-UNESP, Jaboticabal, onde recebiam ração apropriada (Royal Canin®) e água *ad libitum*.

4.3. Infestações sucessivas

Os cães (n= 10) foram distribuídos em dois grupos experimentais, compostos de cinco animais cada, sendo o primeiro grupo (G1), infestado com *R. sanguineus* linhagem de Jaboticabal, São Paulo, Brasil, e o segundo (G2), infestado com *R. sanguineus* linhagem de Rafaela, Santa-Fé, Argentina.

O procedimento empregado foi o mesmo para as duas linhagens de carrapatos com a realização de três infestações sucessivas, a intervalos de 30 dias entre uma e outra, sendo utilizados 10 fêmeas e 10 machos/hospedeiro/infestação de *R. sanguineus* linhagens Jaboticabal (G1) e Rafaela (G2). Os carrapatos foram liberados no interior de câmaras-de-alimentação especialmente desenhadas (BECHARA *et al.*, 1995) conforme ilustrado na **Figura 1** e afixadas com cola sintética Brascoplast™ ao dorso tricotomizado dos animais, conforme ilustrado na **Figura 2**.

As câmaras de alimentação eram confeccionadas com tubos coletores universais estéreis (J. Prolab™) que tiveram sua base cortada e descartada de modo a ficarem com altura de 2,5 cm. Estes recipientes eram colados no centro de peças de borracha (câmara de ar de pneu de bicicleta), cortadas em formato arredondado, com diâmetro aproximado de 10,5 cm e 1-2 mm de espessura. Na base das peças de borracha era colado tecido de algodão de dimensão equivalente ao diâmetro da mesma e aberta janela central com diâmetro equivalente ao recipiente nela colado. As tampas dos recipientes eram furadas com agulhas 0,70 x 25 mm para permitir uma aeração adequada do interior, estando assim prontas as câmaras para serem afixadas nos hospedeiros.

As câmaras foram afixadas com auxílio de cola Brascoplast™ e esparadrapo, lateralmente no dorso dos cães, em região previamente tricotomizada e limpa. No dia

seguinte à fixação das câmaras, os carrapatos (10 fêmeas e 10 machos/hospedeiro/infestação) foram liberados no seu interior. Durante cada infestação foram colocados colares “Elizabetanos” de restrição nos animais para evitar que eles retirassem as câmaras.



Figura 1. Câmaras-de-alimentação de carrapato desenhadas por Bechara *et al.* (1995).



Figura 2. Câmara-de-alimentação afixada ao dorso tricotomizado de cão.

Tais câmaras foram abertas diariamente para monitoração da fixação e alimentação dos carrapatos (**Figura 3**). As fêmeas ingurgitadas, ao se desprenderem do hospedeiro, foram recolhidas, pesadas e acondicionadas em recipientes individuais com aeração adequada e mantidas em estufas para B.O.D. (modelo CD 347, FANEM) à temperatura de 27°C, umidade de 80% e fotoperíodo de 12 horas.

Os seguintes parâmetros biológicos dos carrapatos foram avaliados durante e após cada uma das infestações: pesos das fêmeas ingurgitadas (PFI) e das massas de ovos (PMO); períodos de fixação e ingurgitamento (Ping) e de pré-postura (PPP); índice de eficiência de conversão da reserva alimentar de fêmeas ingurgitadas em ovos (%IECO); taxa de eclosão das larvas (%ECLO) e porcentagem de recuperação (%Rec) de carrapatos ingurgitados, em que:

Ping = número de dias decorridos desde a liberação dos carrapatos sobre o hospedeiro até o seu ingurgitamento e desprendimento;

PPP = número de dias decorridos desde o desprendimento da fêmea até o início da ovipostura;

$$\text{IECO (\%)} = \frac{\text{PMO}}{\text{PFI}} \times 100$$

%ECLO = obtida pela média da avaliação visual individual, por três pessoas, da massa de larvas que eclodiram, segundo Szabó *et al.* (1995);

$$\text{\%Rec} = \frac{\text{número de fêmeas adultas ingurgitadas}}{\text{número de fêmeas adultas liberadas}} \times 100$$

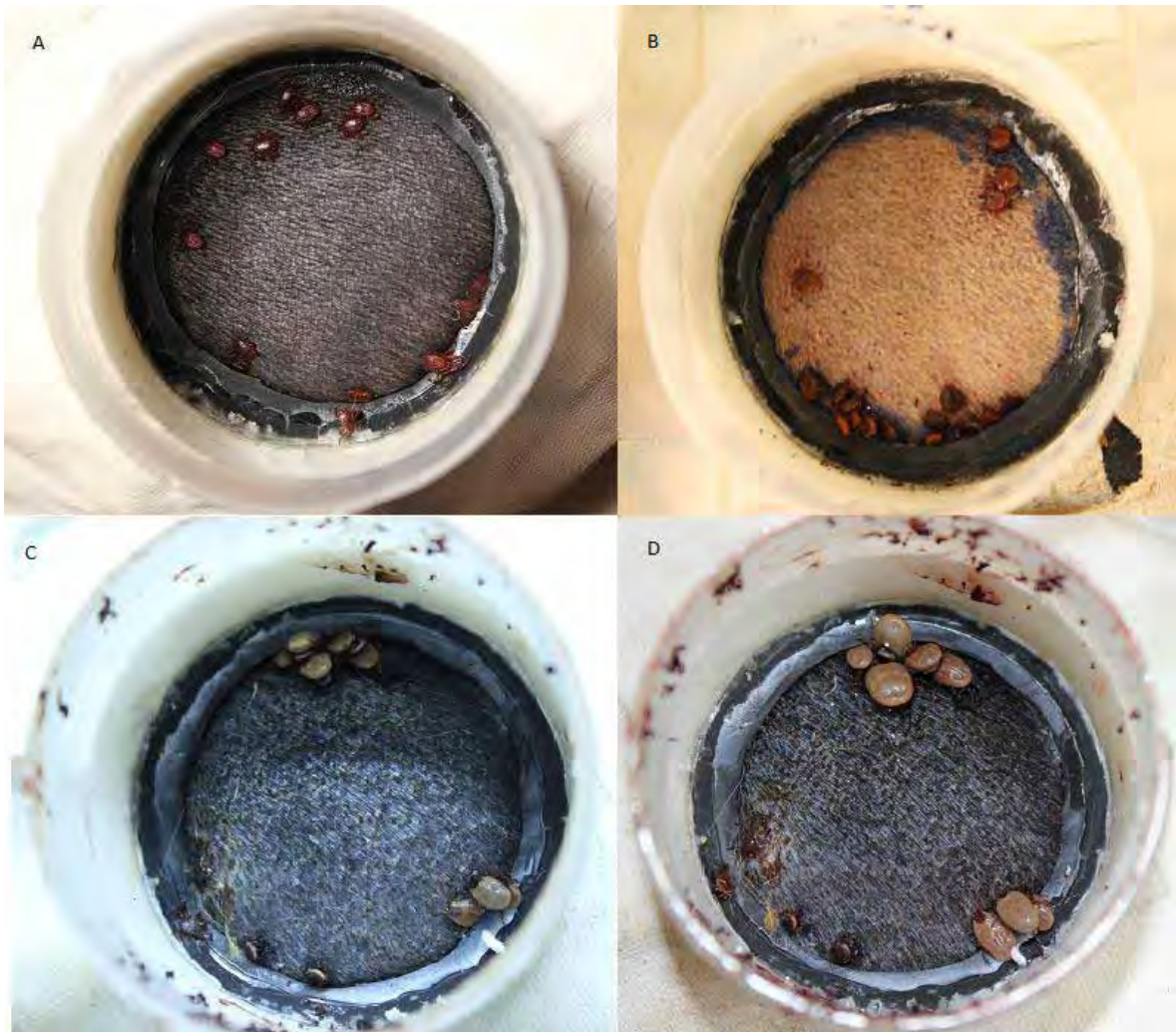


Figura 3. Monitoração dos carrapatos *R.sanguineus*, linhagem Jaboticabal, em diferentes tempos pós-liberação; A- 24h; B- 72h; C- 96h; D- 120h.

4.4. Exame histopatológico e contagem de células

Fragments de pele dos locais de fixação dos carrapatos foram colhidos em diferentes tempos (24, 48, 72 e 144 horas) pós-liberação, na primeira e terceira infestações, com auxílio de um saca-bocado (“punch”) de 4 mm de diâmetro, sob anestesia local com cloridrato de lidocaína a 2 % (Bravet Ltda), conforme demonstrado

na **Figura 4**. Essas biópsias incluíam as peças bucais do ácaro para facilitar a localização do local de penetração de seu hipostômio no tegumento cutâneo dos hospedeiros. Fragmentos de pele normal de cão também foram colhidos para fins de comparação histológica com a pele infestada, totalizando uma biópsia por animal na primeira infestação e uma na terceira infestação nos diferentes tempos, em atendimento às recomendações da CEUA quanto ao bem estar animal.

Os fragmentos obtidos foram fixados por 24 horas em formalina tamponada com fosfatos, pH 7,4 e, posteriormente transferidos para álcool 70% e processados segundo técnicas histológicas de rotina no Laboratório de Histotecnologia do Departamento de Patologia Veterinária da FCAV-UNESP, Campus de Jaboticabal.

Após esse procedimento, os fragmentos foram seccionados em micrótomo rotatório para obtenção de cortes de 4 μm de espessura. Cada amostra foi seccionada integralmente (cortes seriados) para obtenção do ponto exato de fixação do ácaro, identificado pela presença dos remanescentes de suas peças bucais e do cone de cimento. Finalmente, os cortes foram corados pelas técnicas da Hematoxilina-Eosina e May-Grünwald & Giemsa, respectivamente para observação de aspectos gerais da reação inflamatória do hospedeiro e contagem de células inflamatórias infiltradas.



Figura 4. Retirada de fragmento circular de pele canina infestada com *R. sanguineus*, linhagem Jaboticabal, realizada na 72^a hora pós-liberação. A seta aponta o local da biópsia.

A contagem de células foi realizada em três campos de cada corte histológico, na derme superficial, logo abaixo do local de fixação do carrapato, em microscópio de luz com o auxílio de uma quadrícula acoplada à ocular e cuja área correspondia a $0,0625 \text{ mm}^2$ usando-se objetiva 40x. Cada resultado das contagens global e diferencial é, portanto, a média de três determinações e expressa em número de células/ $0,0625 \text{ mm}^2$. Nos gráficos e tabelas, os valores foram corrigidos para número de células/ mm^2 .

4.5. Preparo de antígeno de carrapato adulto

Extratos de carrapatos adultos *R. sanguineus* não alimentados (ECANA), linhagens brasileira e argentina, foram preparados em separado para obtenção dos respectivos antígenos para utilização na titulação de anticorpos por meio do teste ELISA em soros de animais repetidamente infestados, comparativamente a soros controle.

Para tanto, carrapatos foram mortos por congelamento em nitrogênio líquido, seccionados lateralmente para descarte das respectivas quitinas e retiradas de órgãos internos, que foram então triturados em salina tamponada com fosfatos (PBS) estéril, refrigerada, pH 7,2 em um grau e pistilo de porcelana mantidos em cama de gelo picado. As suspensões resultantes, de aproximadamente 10% (p/v), foram então desintegradas a 20 MHz em três ciclos de 10 segundos cada e um de 30 segundos em um aparelho de ultrassom (Branson Sonifer 250). Em seguida, os extratos foram centrifugados a 12.000 g por uma hora a 4°C, os sedimentos descartados e os sobrenadantes resultantes filtrados através de filtros Millex-GV (Millipore) de 0,22 µm de porosidade. A concentração protéica presente nos extratos foi determinada de acordo com o método de BCA Assay (Smith *et al.*, 1985) e os extratos armazenados a -20°C até seu uso. A concentração protéica resultante foi de 173,75 µL/ml e 141,25 µL/ml para as linhagens argentina e brasileira, respectivamente.

4.6. Ensaio Imunoenzimático Indireto – Teste ELISA

Anteriormente à primeira infestação por carrapatos, 1,5 mL de sangue foi colhido de cada animal e uma semana após o término de cada infestação uma nova amostra de mesmo volume foi colhida de quatro animais de cada grupo objetivando a obtenção de soro, o qual foi utilizado na titulação de anticorpos. Foram feitas titulações em blocos para os antígenos e soros, testando-se os antígenos a 5 µg/mL

e 10 µg/mL e diluindo-se os soros a 1:50, 1:100, 1:200 e 1:400. O teste foi realizado conforme metodologia descrita por Perez-Perez *et al.* (2010), com pequenas modificações.

Os soros foram avaliados frente ao antígeno homólogo e heterólogo. Resumidamente, 100 µL dos antígenos totais de *R. sanguineus* linhagem Jaboticabal (G1) ou Rafaela (G2) previamente preparados e diluídos na concentração de 10 µg/mL em 0.1M Tampão Carbonato-Bicarbonato, pH 9,6, foram distribuídos em cada cavidade de microplaca de fundo plano (Poly Sorp, Nunclon™ Surface, Nunc. Denmark) e incubados por 10 horas em câmara úmida a 4°C. O excesso de antígeno foi removido por três lavagens com PBS + 0,1% Tween-20 (PBST) e bloqueado com 200 µL/poço de PBST contendo soro de coelho normal a 5% por 1 hora e 30 minutos a 37°C. Após três lavagens com PBST, a cada cavidade da placa foi adicionado 100 µL de cada soro a ser testado, diluídos em PBST contendo soro de coelho normal a 5% na diluição de 1:50 para a ambas as linhagens, seguindo-se de incubação da placa por 2 horas a 37° C. Em seguida foi feita nova lavagem como descrita anteriormente. Foi então adicionado a cada cavidade da placa 100 µL de conjugado anti IgG de cão na diluição 1:4000 (Sigma, USA, A-0793) seguido de incubação por 1 hora e 30 minutos a 37° C. Nova lavagem foi feita como descrita anteriormente. Adicionou-se 100 µL de substrato para fosfatase alcalina, P-nitrofenilfosfato (Sigma, USA, N-9389), em cada cavidade. O substrato foi diluído a 1 mg/ml em Tampão Dietanolamina pH 9,8. Após a incubação de 30 minutos à temperatura ambiente, as densidades óticas foram lidas em um leitor de Elisa MRX™ de alta performance (DYNEX Technologies, Chantilly-VA, USA) a 405 nm. Finalmente, os valores da densidade ótica (DO) foram calculados para os animais dos grupos G1 e G2.

Os soros da pré-infestação foram utilizados como controle negativo. O ponto de corte foi determinado, em cada grupo, pelo valor da média da densidade ótica dos soros negativos acrescido de 2x o desvio padrão da pré-infestação (INOKUMA *et al.*, 2000).

4.7. Análise estatística

Os dados dos parâmetros biológicos, histopatológicos e do teste ELISA obtidos dentro de cada grupo foram comparados com o auxílio do software estatístico GraphPad Prism 5.01. O teste de Análise de variância (ANOVA), seguido do teste de Tukey, considerando-se $p < 0,05$ foi utilizado para análise dos parâmetros biológicos e histopatológica e o teste ANOVA, seguido pelo teste de Dunnett, considerando-se $p < 0,05$ foi utilizado na análise dos resultados do teste ELISA.

4.8. Bem estar animal

Todos os procedimentos experimentais foram realizados em conformidade com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA) e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FCAV-UNESP, Campus de Jaboticabal (Protocolo 02.326/10, de 09/02/2010).

5. RESULTADOS

5.1. Parâmetros biológicos após infestações sucessivas

5.1.1. Grupo experimental infestado com *R. sanguineus* linhagem Jaboticabal

Os resultados dos parâmetros biológicos obtidos após infestações sucessivas para o grupo experimental infestado com a linhagem brasileira de *R. sanguineus* (G1) são apresentados na **Tabela 1** e ilustrados na **Figura 5**.

As médias referentes à massa de ovos, período de pré-postura, taxa de eclodibilidade e taxa de conversão do peso da fêmea ingurgitada em massa de ovos foram calculadas considerando-se apenas as fêmeas ingurgitadas que não morreram antes de ovipor. Assim, dos parâmetros avaliados, o peso da fêmea ingurgitada, peso da massa de ovos e o período de ingurgitamento apresentaram variações significativas nas infestações sucessivas. O peso da fêmea ingurgitada mostrou variação da primeira e segunda infestações em relação à terceira, passando de 155,6 mg para 293,7 mg da primeira para a terceira, respectivamente. O peso da massa de ovos e o período de ingurgitamento mostraram variação significativa entre as três infestações. Enquanto o peso da massa de ovos passou de 90 mg na primeira infestação, para 56,8 mg na segunda e 121,8 mg na terceira, o período de ingurgitamento variou de 10,07 dias na primeira infestação para 13,25 dias na segunda e 6,97 dias na terceira. A taxa de conversão do peso da fêmea ingurgitada em massa de ovos, apesar de diminuir da primeira para a terceira infestação, não apresentou variação significativa. Os demais parâmetros avaliados também não variaram de forma significativa. As variações observadas demonstraram melhor desempenho alimentar e reprodutivo das fêmeas da primeira para a terceira infestação, apontando para uma ausência de resistência pelos hospedeiros.

Tabela 1. Parâmetros biológicos de fêmeas de *R. sanguineus*, linhagem Jaboticabal, obtidos após infestações sucessivas em cães. Resultados expressos em média \pm desvio padrão, Jaboticabal- SP, 2012.

Parâmetros	1ª Infestação	2ª Infestação	3ª Infestação
PFI (mg)	155,6 \pm 71,20 ^a	137,4 \pm 81,30 ^a	293,7 \pm 72,05 ^b
PMO (mg)	90 \pm 53,76 ^a	56,80 \pm 30,52 ^b	121,8 \pm 51,88 ^c
Ping (dias)	10,07 \pm 3,70 ^a	13,25 \pm 3,45 ^b	6,97 \pm 1,14 ^c
PPP (dias)	5,96 \pm 1,97 ^a	5,64 \pm 1,50 ^a	5,85 \pm 0,85 ^a
% ECLO	68,83 \pm 35,51 ^a	66,40 \pm 33,87 ^a	61,43 \pm 37,61 ^a
IECO (%)	51,76 \pm 20,02 ^a	46,31 \pm 9,83 ^a	42,30 \pm 17,04 ^a
% REC	58 \pm 30,33 ^a	72 \pm 4,47 ^a	72 \pm 19,24 ^a

PFI = peso da fêmea ingurgitada; **PMO** = peso da massa de ovos; **Ping** = período de ingurgitamento; **PPP** = período de pré-postura; **% ECLO** = taxa de eclosão de larvas; **% Rec** = taxa de recuperação; **% IECO** = taxa de conversão do peso da fêmea ingurgitada em massa de ovos. Médias em uma linha seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

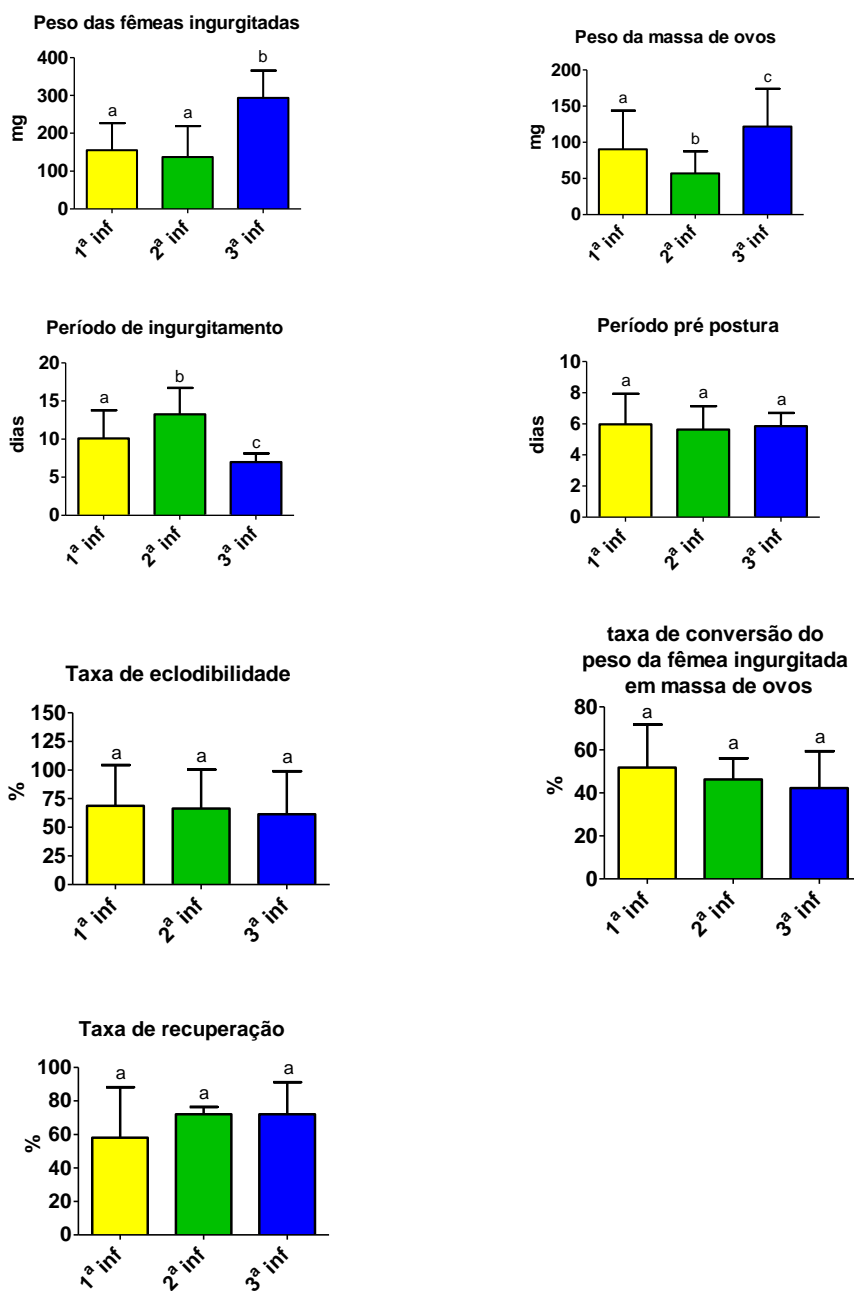


Figura 5. Comparação das médias dos parâmetros biológicos obtidos de fêmeas de *R. sanguineus*, linhagem Jaboticabal, alimentadas em cães após infestações sucessivas. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

5.1.2. Grupo experimental infestado com *R. sanguineus* linhagem Rafaela

Os resultados dos parâmetros biológicos obtidos após infestações sucessivas para o grupo experimental infestado com a linhagem de *R. sanguineus* argentina (G2) são apresentados na **Tabela 2** e ilustrados na **Figura 6**.

Dos parâmetros avaliados, o peso da fêmea ingurgitada, peso da massa de ovos, período de ingurgitamento e período de pré-postura apresentaram variações significativas nas infestações sucessivas. O peso da fêmea ingurgitada e período de ingurgitamento apresentaram variação significativa da primeira e segunda infestações em relação à terceira. O peso da fêmea ingurgitada passou de 151,9 mg para 205,1 mg e o período de ingurgitamento variou de 10,42 dias para 7,96 dias, da primeira para a terceira infestação, respectivamente. O peso da massa de ovos apresentou variação significativa da primeira infestação em relação a segunda e terceira, passando de 30,83 mg para 125,7 mg. Finalmente, o período de pré-postura apresentou variação significativa entre a primeira e terceira infestações, passando de 6,16 dias para 4,45 dias. Os demais parâmetros avaliados mostraram-se iguais significativamente. As variações significativas observadas, assim como na linhagem brasileira, demonstram melhor desempenho alimentar e reprodutivo das fêmeas da primeira para a terceira infestação, apontando para uma ausência de resistência pelos hospedeiros.

É importante destacar que em média 70% do total de fêmeas recuperadas dos hospedeiros durante as três infestações ficaram com coloração escura (**Figura 7**) após alguns dias e morreram antes de iniciarem ou completarem a ovipostura. Ademais, houve elevada mortalidade das larvas eclodidas de ovos dessas carrapatos. Aparentemente, tais fatos apontavam para aquisição de resistência pelos cães a esta linhagem de carrapatos. No entanto, depois de feitas as análises estatísticas dos parâmetros biológicos e descartando-se a ocorrência de desenvolvimento de resistência, pode-se sugerir que as condições de temperatura e umidade utilizadas não

foram ideais para esta linhagem de carrapato. Apesar disso, tais fêmeas foram incluídas na análise estatística de peso e período de ingurgitamento.

As médias referentes à massa de ovos, período de pré-postura, taxa de eclodibilidade e taxa de conversão do peso da fêmea ingurgitada em massa de ovos foram calculadas considerando-se apenas as fêmeas ingurgitadas que não morreram antes de ovipor. De fato, considerando-se todos os resultados, a média da massa de ovos seria de 8,04 mg, 32 mg e 60,52 mg, a taxa de eclodibilidade de 11,30%, 19,13% e 35,63% e a taxa de conversão do peso da fêmea ingurgitada em massa de ovos de 7%, 12,95% e 23,76%, na primeira, segunda e terceira infestações, respectivamente.

Tabela 2. Parâmetros biológicos de fêmeas de *R. sanguineus*, linhagem Rafaela, obtidos após infestações sucessivas em cães. Resultados expressos em média \pm desvio padrão, Jaboticabal-SP, 2012.

Parâmetros	1ª Infestação	2ª Infestação	3ª Infestação
PFI (mg)	151,9 \pm 59,77 ^a	142,8 \pm 80,02 ^a	205,1 \pm 61,77 ^b
PMO (mg)	30,83 \pm 21,54 ^a	121,6 \pm 40,96 ^b	125,7 \pm 57,78 ^b
Ping (dias)	10,42 \pm 2,39 ^a	11,60 \pm 2,34 ^a	7,96 \pm 1,57 ^b
PPP (dias)	6,67 \pm 1,50 ^a	5 \pm 1 ^{ab}	4,77 \pm 1,23 ^b
% ECLO	43,33 \pm 34,45 ^a	72,70 \pm 40,68 ^a	74 \pm 32,52 ^a
IECO (%)	28,02 \pm 20,15 ^a	51,79 \pm 11,43 ^a	47,52 \pm 22,73 ^a
% REC	48 \pm 31,94 ^a	40 \pm 25,50 ^a	56 \pm 27,02 ^a

PFI = peso da fêmea ingurgitada; **PMO** = peso da massa de ovos; **Ping** = período de ingurgitamento; **PPP** = período de pré-postura; **% ECLO** = taxa de eclosão de larvas; **% Rec** = taxa de recuperação; **% IECO** = taxa de conversão do peso da fêmea ingurgitada em massa de ovos. Médias em uma linha seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

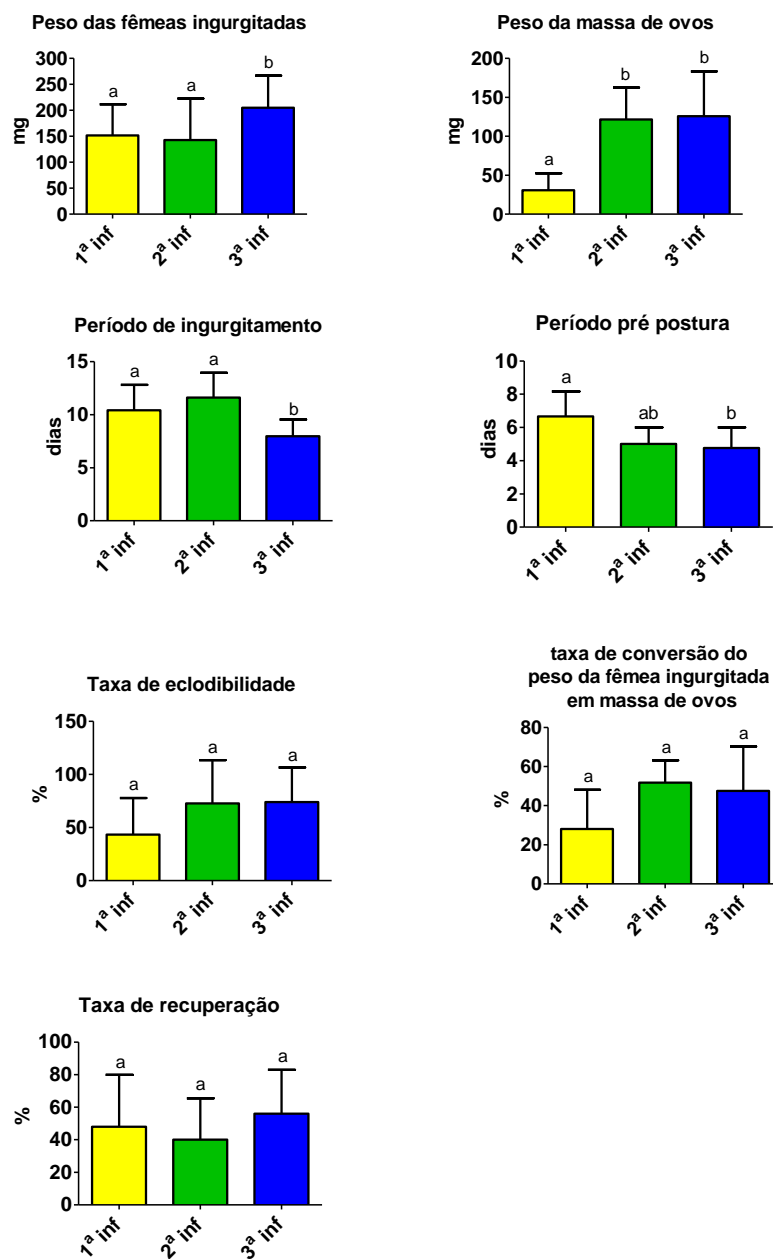


Figura 6. Comparação das médias dos parâmetros biológicos obtidos de fêmeas de *R. sanguineus* linhagem Rafaela alimentadas em cães após infestações sucessivas. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).



Figura 7. Fêmea de *Rhipicephalus sanguineus*, linhagem Rafaela. Coloração escurecida após ser recuperada de cão doméstico e morte antes de iniciar a oviposição.

5.1.3. Comparação entre os grupos experimentais infestados com *R. sanguineus*, linhagens Jaboticabal ou Rafaela

Os resultados da comparação das médias dos parâmetros biológicos obtidos após infestações sucessivas entre os grupos experimentais infestados com as linhagens de *R. sanguineus*, Jaboticabal (G1) ou Rafaela (G2) estão ilustrados na **Figuras 8 e 9.**

Dos parâmetros avaliados, apenas a taxa de recuperação na segunda infestação apresentou diferença significativa na comparação das médias. Os demais parâmetros apresentaram-se iguais significativamente.

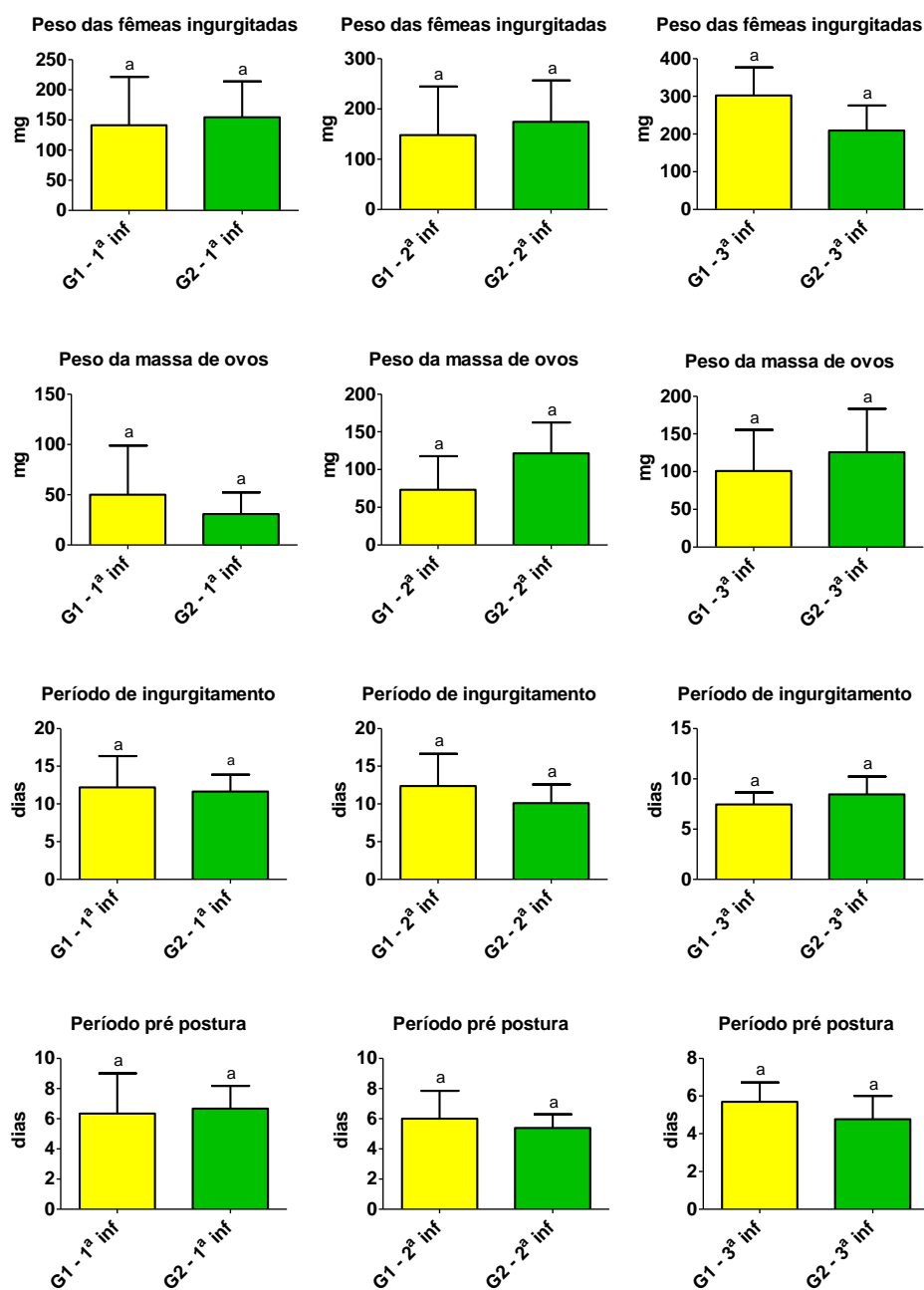


Figura 8. Comparação das médias dos parâmetros biológicos das infestações sucessivas entre *R. sanguineus*, linhagens Jaboticabal (G1) e Rafaela (G2), alimentados em cães. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente ($<0,05$).

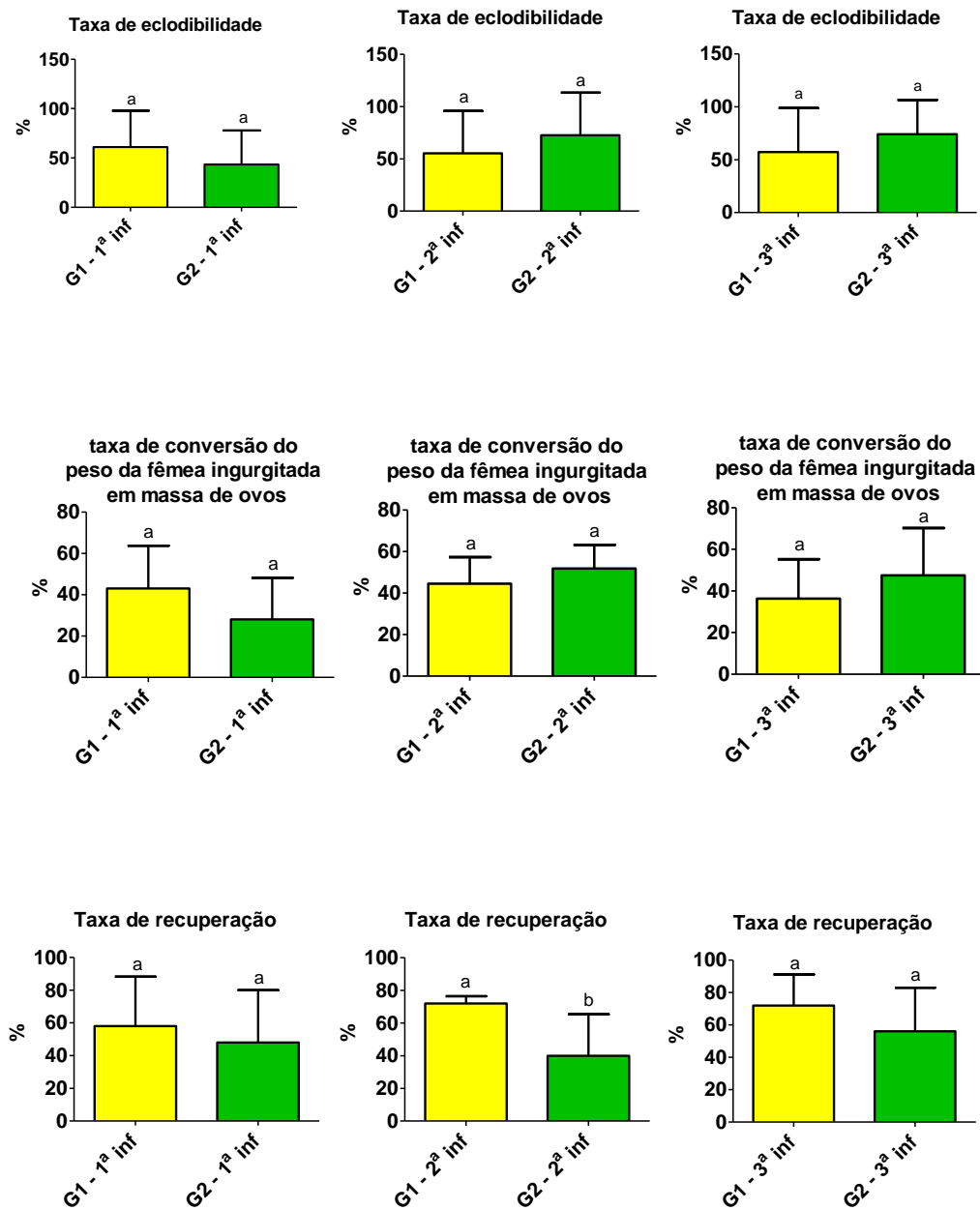


Figura 9. Comparação das médias dos parâmetros biológicos das infestações sucessivas entre *R. sanguineus*, linhagens Jaboticabal (G1) e Rafaela (G2), alimentados em cães. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente (<0,05).

5.2. Histopatologia do sítio de fixação dos carrapatos

5.2.1. Alterações Gerais

As secções de pele dos cães parasitados pelos *R. sanguineus* linhagens Jaboticabal e Rafaela evidenciaram todas as camadas do tegumento do hospedeiro (epiderme, derme e hipoderme) e a análise microscópica dessas secções demonstrou que ocorreram alterações em tais camadas.

Essas alterações estão relacionadas com o processo inflamatório que ocorre no local onde o carrapato se fixa. Durante o processo ocorre infiltração de células inflamatórias de vários tipos nesse local além da dissociação de fibras do conjuntivo (edema), hemorragia e hiperemia de vasos dérmicos. Em alguns cortes pode-se notar a presença de cavidade alimentar local contendo debris celulares e outros componentes orgânicos do hospedeiro e do próprio ectoparasito como a saliva, semelhante às vezes a uma pústula.

Espessamento da epiderme (**Figura 10**) foi observado em determinados cortes, em decorrência de hiperplasia e/ou vacuolização intracitoplasmática das células locais.

O infiltrado inflamatório presente no tegumento dos cães era principalmente composto por neutrófilos e mononucleares, embora tenha sido observada também a presença de mastócitos e eosinófilos (**Figura 11**).

Em alguns cortes notou-se a presença do cone de cimento (**Figura 12**), massa acidofílica em forma de sino, com a base instalada na superfície da epiderme e que tem como função promover melhor adesão do carrapato à pele do hospedeiro. No centro destes cones pôde-se por vezes visualizar peças bucais do parasito.

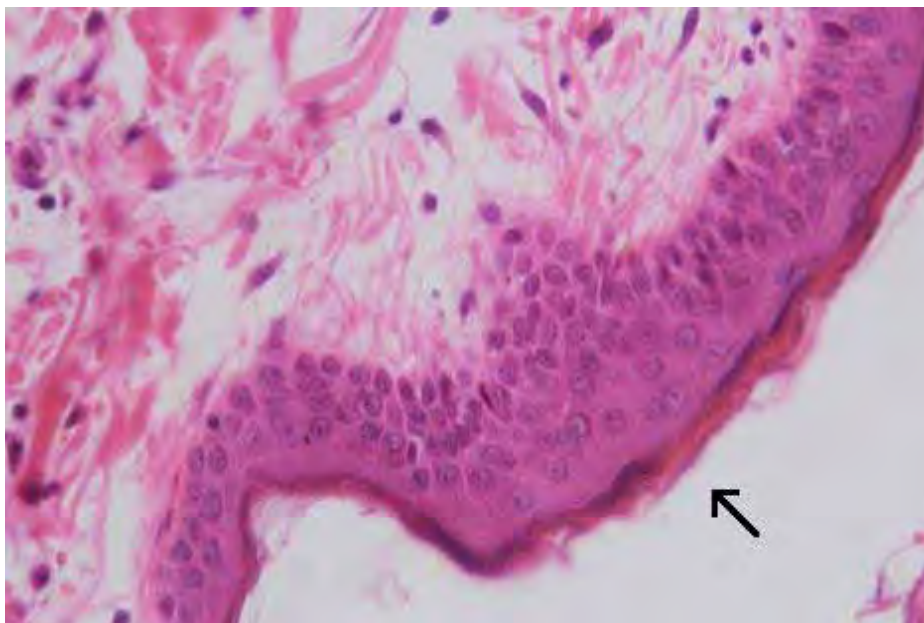


Figura 10. Espessamento da epiderme (seta) de cão infestado com *R. sanguineus*. Hematoxilina-eosina (objetiva 40x).

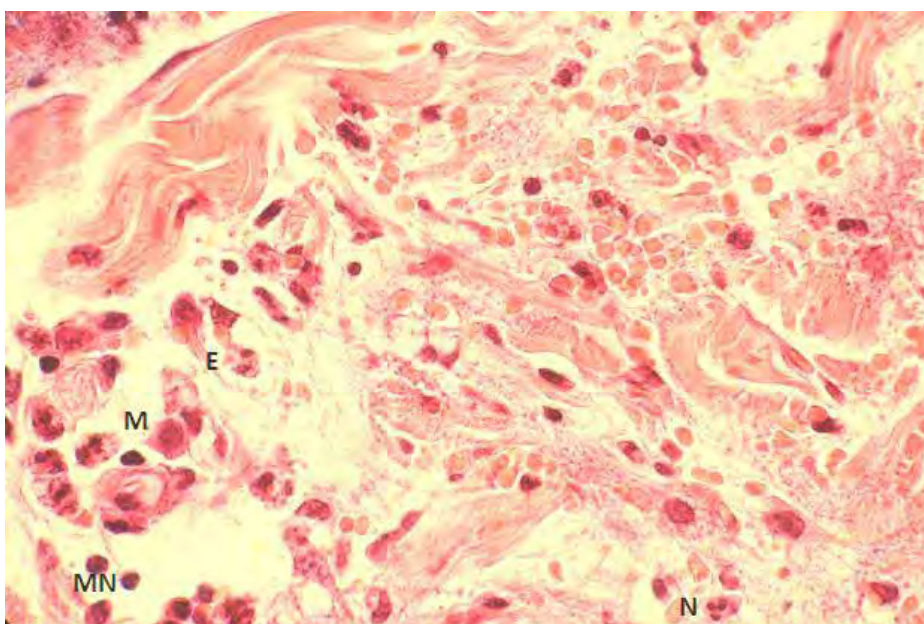


Figura 11. Infiltrado inflamatório em derme de cão reinfestado com *R. sanguineus*, linhagem Jaboticabal, 72h pós fixação do ácaro; E – eosinófilo, M – mastócito, MN – célula mononuclear, N – neutrófilo. Hematoxilina-eosina (objetiva 100x).

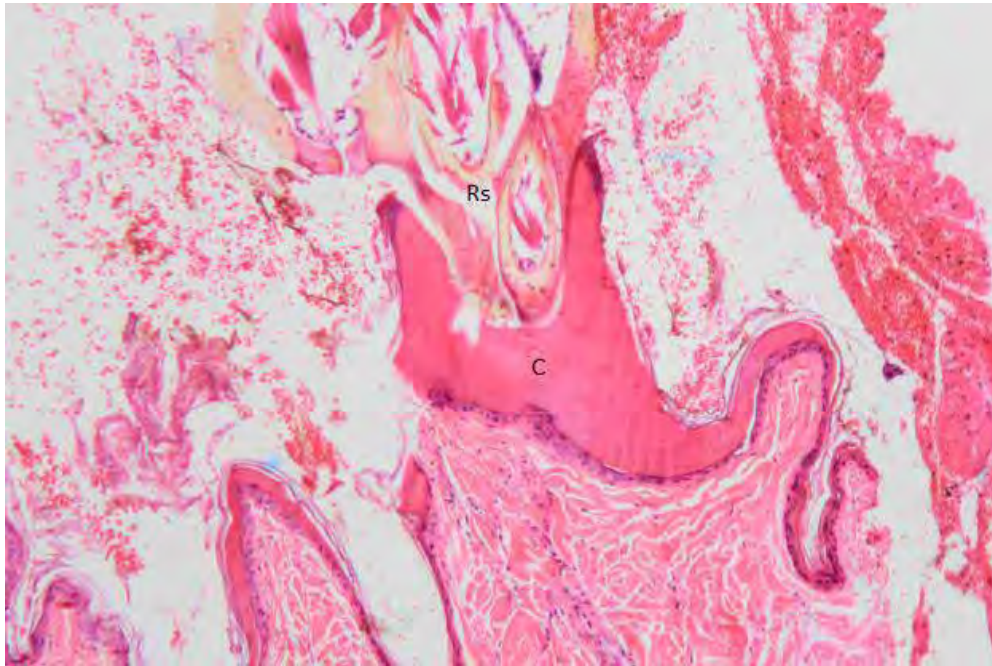


Figura 12. Cone de cimento presente na epiderme de cão infestado com *R. sanguineus*; C- cone de cimento, Rs – fragmentos do hipostômio de carrapato *R. sanguineus*. Hematoxilina- eosina (objetiva 10x).

5.2.2. Contagens celulares

A reação inflamatória presente em cada corte histológico foi classificada como leve, moderada ou severa, conforme ilustrado na **Figura 13**.

A pele normal, não parasitada, dos cães apresentou pequena quantidade de células, sendo as poucas presentes do tipo mononuclear e mastócitos.

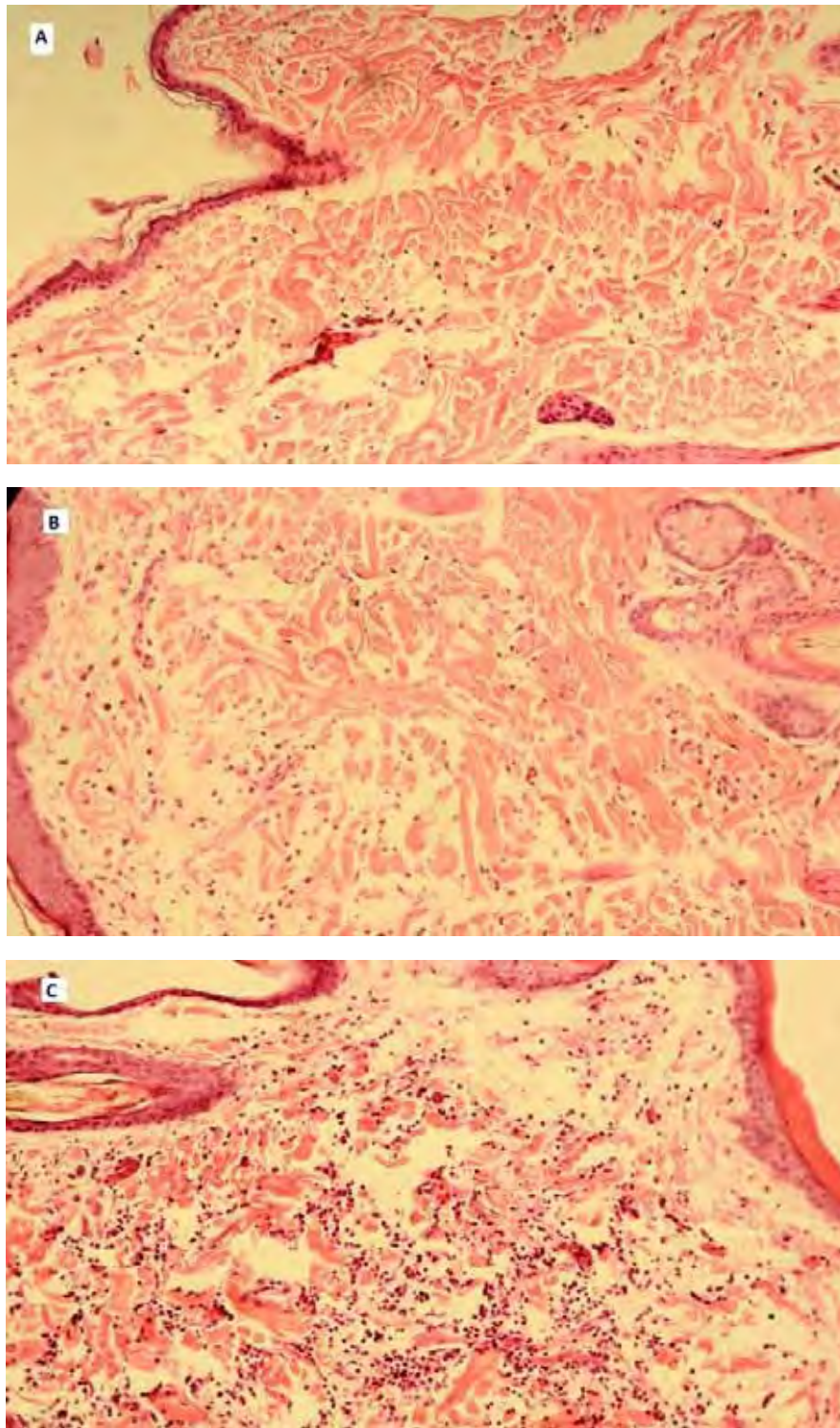


Figura 13. Pele de cão: A – reação inflamatória leve; B – reação inflamatória moderada; C – reação inflamatória severa. Hematoxilina-eosina (objetiva 10x).

5.2.2.1. Contagens celulares global e diferencial do grupo experimental infestado com *R. sanguineus*, linhagem Jaboticabal

Durante a primeira infestação, o grupo infestado com *R. sanguineus*, linhagem Jaboticabal (G1), apresentou leve reação inflamatória na 24^a e 48^a horas pós-liberação. Já na 72^a hora, a reação inflamatória passou a ser severa, e na 144^a hora se mostrou moderada.

Na terceira infestação, apresentou moderada reação inflamatória na 24^a e 48^a horas pós-liberação sendo que na 72^a hora ela se elevou, e na 144^a hora passou a leve.

Em todos os tempos analisados, exceto 24 horas pós-liberação cujo predomínio celular era mononuclear, o infiltrado inflamatório era predominantemente neutrofílico, seguido por células mononucleares e mastócitos (**Figura 14**). Observou-se a presença de eosinófilos durante a terceira infestação.

As médias das contagens celular global entre a primeira e terceira infestações com *R. sanguineus* linhagem Jaboticabal não apresentou variação significativa ($p < 0,05$), sugerindo que os cães não adquirem resistência à respectiva linhagem de carrapatos (**Tabela 3 e Figura 15**).

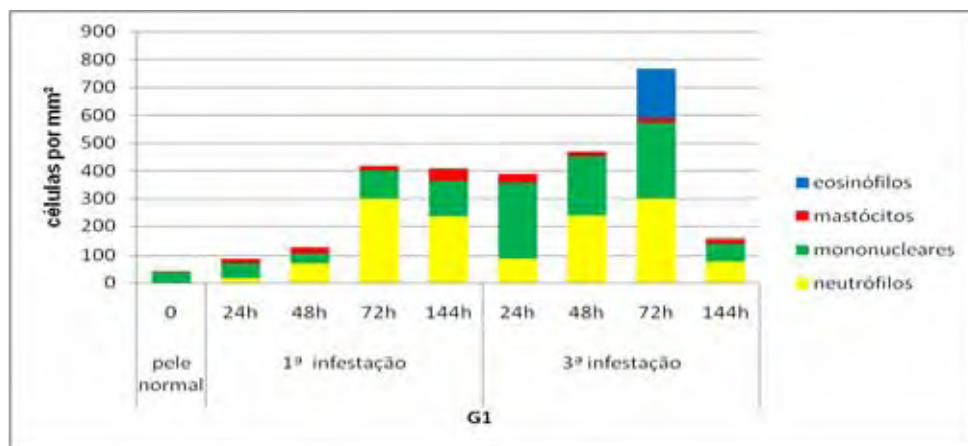


Figura 14. Contagens global e diferencial das células da área de fixação do carrapato *R. sanguineus*, linhagem Jaboticabal, 24h, 48h, 72h e 144h pós liberação dos carrapatos, durante a primeira e terceira infestações.

Tabela 3. Contagens global e diferencial das células de cães no ponto de fixação do *R. sanguineus*, linhagem Jaboticabal em diferentes tempos pós-liberação. Resultados expressos em média \pm desvio padrão, Jaboticabal-SP, 2012.

Grupo 1	Neutrófilos	Mononucleares	Mastócitos	Eosinófilos	Total de células/mm ²
Pele normal	0 \pm 0	37,33 \pm 18,47	5,33 \pm 9,24	0 \pm 0	42,67 \pm 9,24
1^a infestação					
24h	16 \pm 0	53,33 \pm 78,93	16 \pm 16	0 \pm 0	85,33 \pm 78,93
48h	69,33 \pm 18,47	37,33 \pm 33,31	21,33 \pm 9,24	0 \pm 0	128 \pm 55,42
72h	298,67 \pm 178,41	101,33 \pm 9,24	16 \pm 16	0 \pm 0	416 \pm 194,65
144h	234,67 \pm 80,53	128 \pm 16	42,67 \pm 9,24	0 \pm 0	405,33 \pm 82,10
3^a infestação					
24h	85,33 \pm 66,61	272 \pm 152,63	32 \pm 16	0 \pm 0	389,33 \pm 224,76
48h	240 \pm 80	213,33 \pm 129,33	16 \pm 16	0 \pm 0	469,33 \pm 113,51
72h	298,67 \pm 176,24	272 \pm 32	16 \pm 16	181,33 \pm 161,06	768 \pm 16
144h	74,67 \pm 46,19	64 \pm 32	16 \pm 16	0 \pm 0	154,67 \pm 80,53

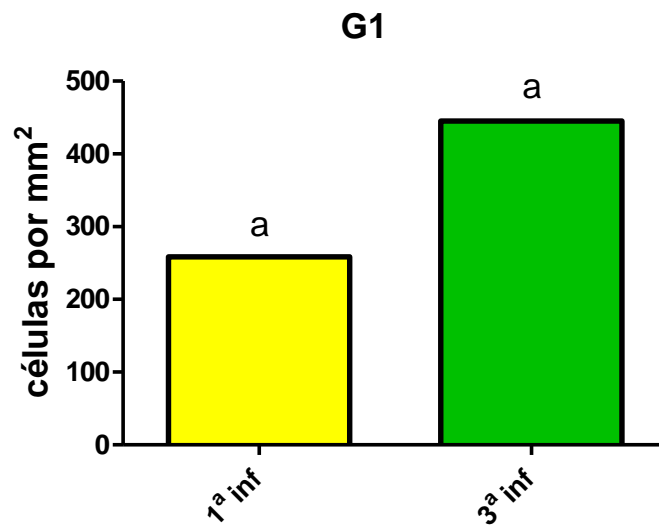


Figura 15. Contagem global das células da área de fixação do carrapato *R. sanguineus*, linhagem Jaboticabal, em cães durante a primeira e terceira infestações. Resultados expressos em média. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

5.2.2.2. Contagens celulares global e diferencial do grupo experimental infestado com *R. sanguineus*, linhagem Rafaela

Em acordo com o G1, durante a primeira infestação o grupo infestado com *R. sanguineus*, linhagem Rafaela, apresentou leve reação inflamatória na 24^a hora pós-liberação. Na 48^a hora, diferente ao que foi apresentado pelo G1, ocorreu severa reação, e nos tempos seguintes, houve leve reação inflamatória.

Durante a terceira infestação houve leve reação inflamatória na 24^a hora pós-liberação, seguido por severa reação na 48^a e 72^a horas. Na 144^a hora a reação inflamatória se apresentou leve.

Em todos os tempos analisados, exceto 24 horas pós-liberação, cujo predomínio era de células mononucleares, o infiltrado inflamatório era composto principalmente por neutrófilos, seguido por células mononucleares e mastócitos (**Figura 16**). Observou-se a presença de eosinófilos durante a terceira infestação.

A contagem celular global e diferencial entre a primeira e terceira infestações com *R. sanguineus* linhagem e Rafaela não apresentou diferença significativa, sugerindo que os cães não adquirem resistência à respectiva linhagem de carrapatos (**Tabela 4 e Figura 17**).

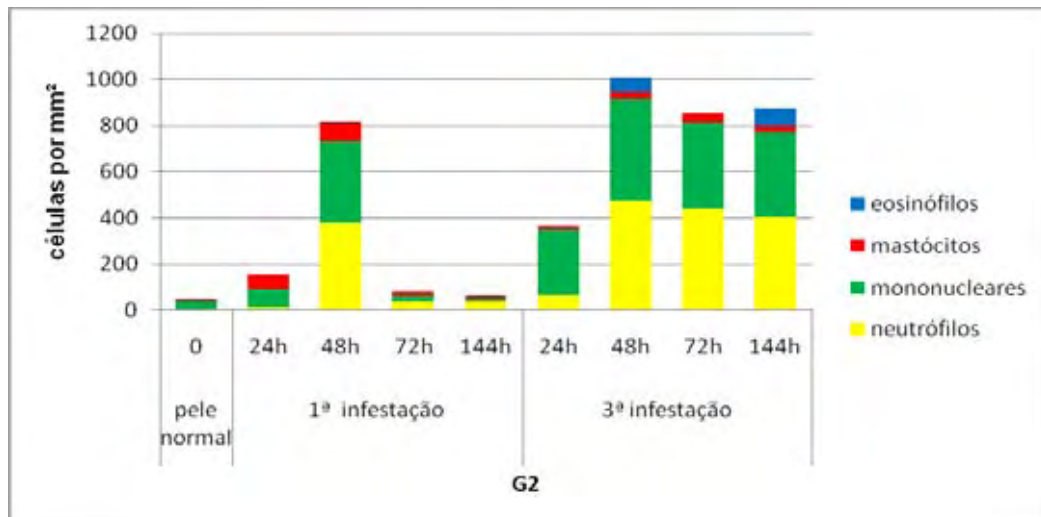


Figura 16. Contagens global e diferencial das células da área de fixação do carrapato *R. sanguineus*, linhagem Rafaela, 24hr, 48h, 72h e 144h pós liberação dos carrapatos, durante a primeira e terceira infestações.

Tabela 4. Contagens global e diferencial das células de cães no ponto de fixação do *R. sanguineus*, linhagem Rafaela em diferentes tempos pós-liberação. Resultados expressos em média \pm desvio padrão, Jaboticabal-SP, 2012.

Grupo 2	Neutrófilos	Mononucleares	Mastócitos	Eosinófilos	Total de células/mm ²
Pele normal	5,33 \pm 9,24	32 \pm 27,71	10,67 \pm 9,24	0 \pm 0	50 \pm 41,39
1ª infestação					
24h	16 \pm 27,71	74,67 \pm 64,67	64 \pm 42,33	0 \pm 0	154,67 \pm 133,23
48h	378,67 \pm 24,44	357,33 \pm 148,67	80 \pm 48	0 \pm 0	816 \pm 127
72h	37,33 \pm 9,24	26,67 \pm 9,24	16 \pm 16	0 \pm 0	80 \pm 16
144h	37,33 \pm 9,24	16 \pm 0	10,67 \pm 9,24	0 \pm 0	64 \pm 16
3ª infestação					
24h	69,34 \pm 120,09	282,67 \pm 392,68	10,67 \pm 9,24	0 \pm 0	362,67 \pm 503,51
48h	474,67 \pm 129,33	442,67 \pm 113,51	26,27 \pm 24,44	64 \pm 110,85	1008 \pm 138,56
72h	442,67 \pm 217,23	368 \pm 173,07	42,67 \pm 24,44	0 \pm 0	853,33 \pm 370,89
144h	405,33 \pm 328,81	368 \pm 305,26	26,67 \pm 33,31	74,67 \pm 129,33	874,67 \pm 553,41

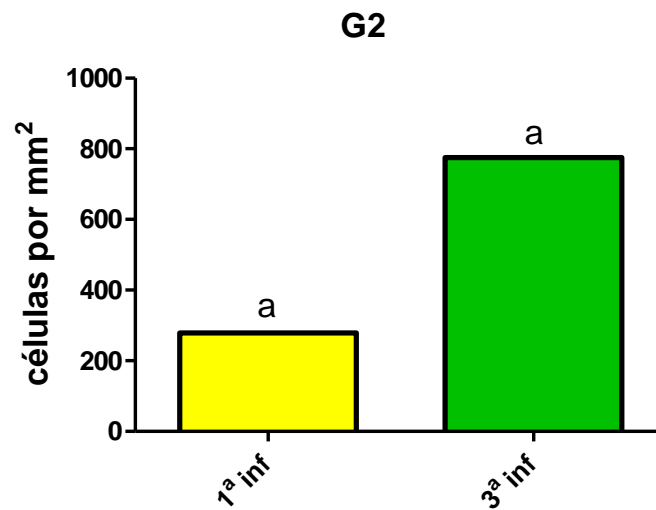


Figura 17. Contagem global das células da área de fixação do carrapato *R. sanguineus*, linhagem Rafaela, em cães durante a primeira e terceira infestações. Resultados expressos em média. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

5.2.2.3. Comparação entre a contagem celular global dos grupos experimentais infestados com *R. sanguineus*, linhagens Jaboticabal e Rafaela

A análise comparativa entre a contagem celular global das infestações com *R. sanguineus* linhagens Jaboticabal e Rafaela na primeira e terceira infestações não apresentou diferença significativa (**Figura. 18**).

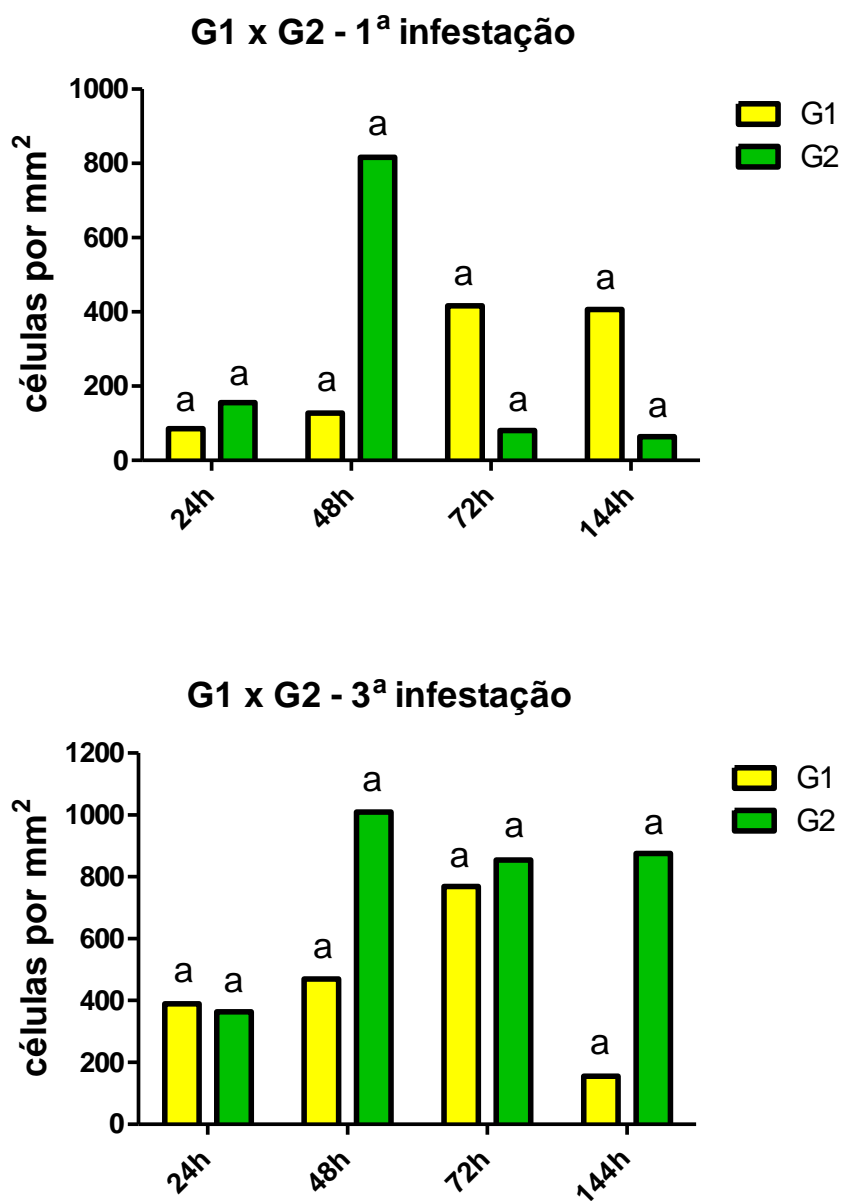


Figura 18. Comparação entre a contagem celular global da primeira e terceira infestações dos cães infestados com *R. sanguineus*, linhagem Jaboticabal (G1), e Rafaela (G2) em diferentes tempos pós-liberação. Resultados expressos em média. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

5.3. Ensaio Imunoenzimático Indireto - Teste ELISA

O teste ELISA demonstrou que o grupo de animais infestado com a linhagem Jaboticabal (G1) apresentou maior densidade ótica principalmente pós-segunda e terceira infestações em relação à pré-infestação, porém não houve diferenças estatisticamente significantes (**Figura 19**). Já o grupo de animais infestado com a linhagem Rafaela (G2) apresentou variação significativa entre a média das densidades óticas pós-segunda infestação em relação à média da pré-infestação (**Figura 20**). As médias da titulação de anticorpos de ambas as linhagens de cães repetidamente infestados estão apresentadas na **Tabela 5**. Em análise individual, enquanto no grupo G1 um animal apresentou anticorpos contra antígeno de carrapatos após a primeira infestação (**Figura 21**), no grupo G2 em dois animais foi possível detectar anticorpos anti-carrapato (**Figura 22**).

Na análise de reação cruzada entre os antígenos demonstrou-se que os soros dos animais infestados com *R. sanguineus* linhagem Jaboticabal apresentaram anticorpos contra antígeno de *R. sanguineus* linhagem Rafaela, e vice-versa (**Tabela 6 e Figuras 23 e 24**).

Tabela 5. Título de anticorpos anti-*Rhipicephalus sanguineus*, linhagens Jaboticabal (G1) e Rafaela (G2), de cães domésticos repetidamente infestados. Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão das densidades óticas obtidas, Jaboticabal –SP, 2012.

	Controle	Pós 1 ^a infestação	Pós 2 ^a infestação	Pós 3 ^a infestação
G1	0,240 \pm 0,058	0,361 \pm 0,132	0,811 \pm 0,450	0,736 \pm 0,381
G2	0,243 \pm 0,020	0,294 \pm 0,028	0,484 \pm 0,175	0,395 \pm 0,073

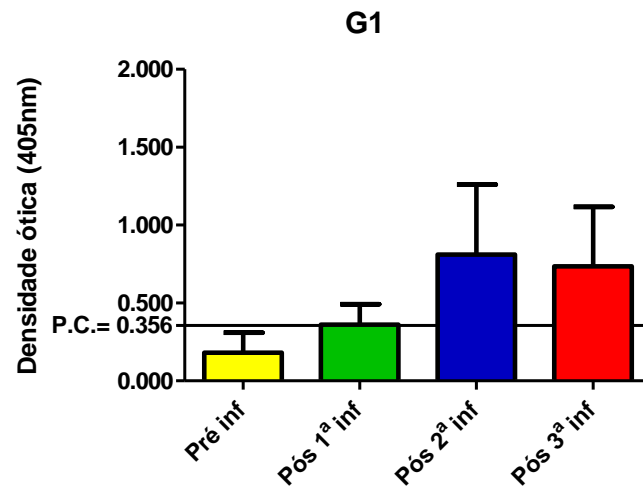


Figura 19. Comparação das médias dos títulos de anticorpos anti-*Rhipicephalus sanguineus* adultos, linhagem Jaboticabal, em cães domésticos repetidamente infestados. P.C.= Ponto de corte. Médias não diferem estatisticamente com a pré-infestação ($p < 0,05$).

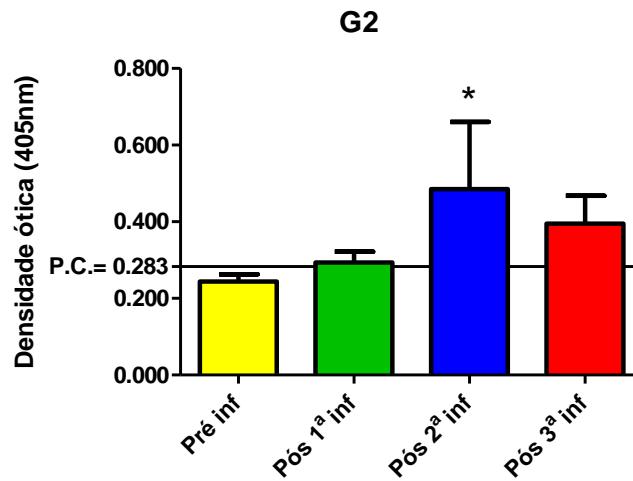


Figura 20. Comparação das médias dos títulos de anticorpos anti-*Rhipicephalus sanguineus* adultos, linhagem Rafaela, em cães domésticos repetidamente infestados. P.C.= Ponto de corte. Média com * difere estatisticamente da pré-infestação ($p < 0,05$).

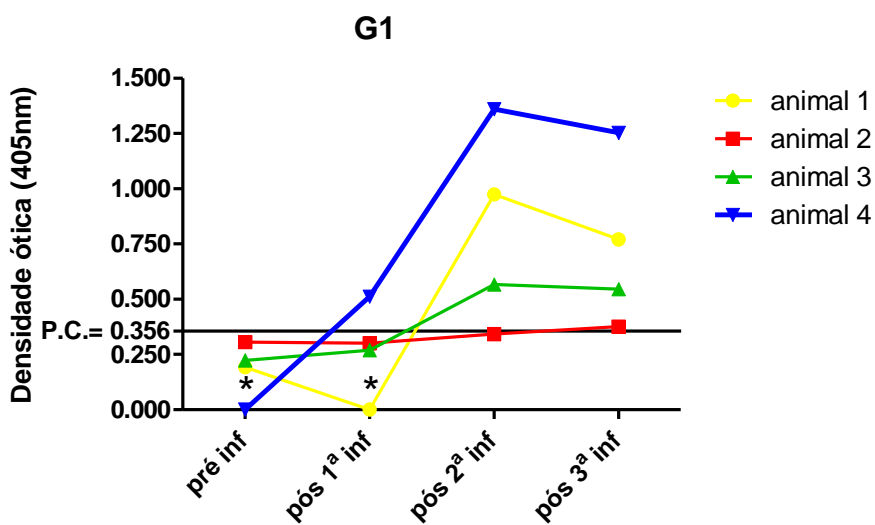


Figura 21. Título de anticorpos individual anti-*Rhipicephalus sanguineus* adultos, linhagem Jaboticabal, de cães domésticos repetidamente infestados. P.C.= Ponto de corte, *: Soro inviabilizado.

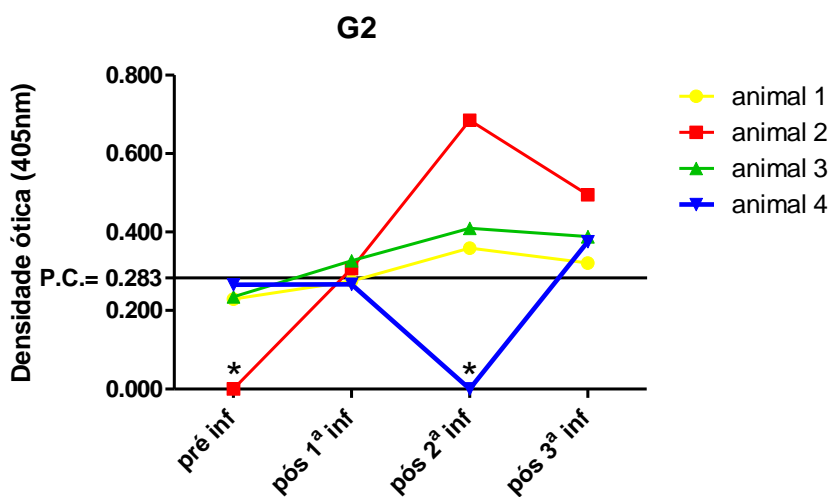


Figura 22. Título de anticorpos individual anti-*Rhipicephalus sanguineus* adultos, linhagem Rafaela, de cães domésticos repetidamente infestados. P.C.= Ponto de corte, *: Soro inviabilizado.

Tabela 6. Título de anticorpos anti-*Rhipicephalus sanguineus* de cães domésticos repetidamente infestados com *R. sanguineus* linhagem Jaboticabal (G1) contra antígeno de *R. sanguineus* linhagem Rafaela (G2), e dos soros dos cães domésticos repetidamente infestados com *R. sanguineus* linhagem Rafaela (G2) contra antígeno de *R. sanguineus* linhagem Jaboticabal. Resultados expressos em média \pm desvio padrão das densidades óticas obtidas. Ag= Antígeno. Jaboticabal –SP, 2012.

	Pós 1 ^a infestação	Pós 2 ^a infestação	Pós 3 ^a infestação
G1 - Ag G2	0,468 \pm 0,209	0,863 \pm 0,467	0,880 \pm 0,288
G2 – Ag G1	0,248 \pm 0,020	0,450 \pm 0,234	0,384 \pm 0,101

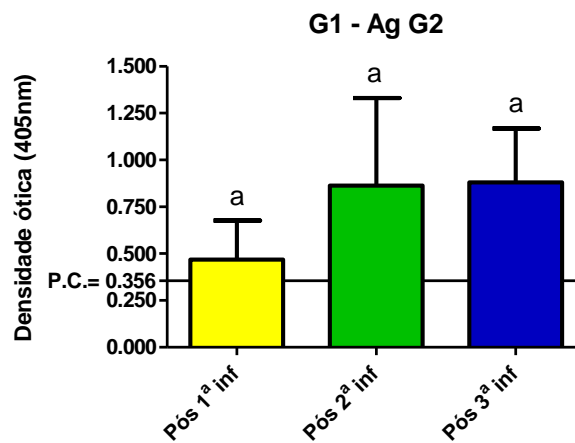


Figura 23. Título de anticorpos anti-*Rhipicephalus sanguineus* adultos de cães domésticos repetidamente infestados com *R. sanguineus* linhagem Jaboticabal, contra antígeno de *R. sanguineus* adultos, linhagem Rafaela. Resultados expressos em média. P.C.= Ponto de corte. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

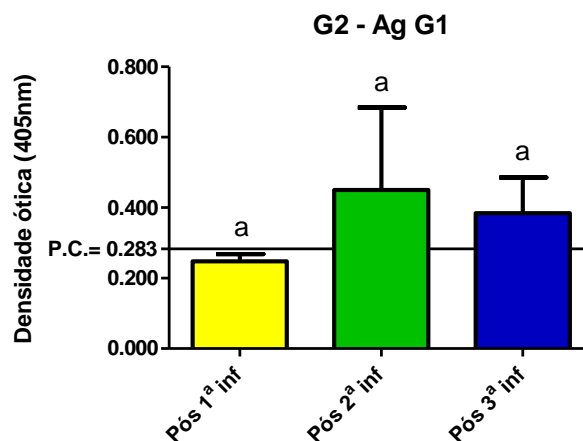


Figura 24. Título de anticorpos anti-*Rhipicephalus sanguineus* adultos de cães domésticos repetidamente infestados com *R. sanguineus*, linhagem Rafaela, contra antígeno de *R. sanguineus* adultos, linhagem Jaboticabal. Resultados expressos em média. P.C.= Ponto de corte. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

6. DISCUSSÃO

O presente trabalho estudou de forma comparativa a aquisição de resistência pelo cão doméstico a duas linhagens do carrapato *R. sanguineus*, uma originária de Jaboticabal, Brasil, e a outra de Rafaela, Argentina. Estas duas linhagens foram utilizadas dando continuidade a uma linha de pesquisa comparativa, que mostrou a existência de diferenças biológicas, morfológicas e de DNA mitocondrial entre elas, sugerindo a necessidade de reavaliação da situação biossistemática de carrapatos *R. sanguineus* da América do Sul (OLIVEIRA *et al.*, 2005; SZABÓ *et al.*, 2005).

Trabalhos anteriores do laboratório demonstraram que cães domésticos, ao contrário de cobaias e hamsters, não adquirem resistência ao *R. sanguineus* após sucessivas infestações (SZABÓ *et al.*, 1995a), ou após imunização com extrato de carrapatos adultos não alimentados (BECHARA *et al.*, 1994). Ademais, Ferreira & Bechara (1995) observaram que o cachorro-do-mato, hospedeiro filogeneticamente próximo ao cão doméstico, também não adquire resistência ao ectoparasito.

A resistência adquirida pelo hospedeiro é expressa pela rejeição ao carrapato através de interferência na sua alimentação com redução no peso das fêmeas ingurgitadas e da massa de ovos, prolongamento no tempo de ingurgitamento, diminuição da viabilidade dos ovos e, em alguns casos, até morte do parasito (WAGLAND, 1975). Porém, segundo Heller-Haupt *et al.* (1981), o parâmetro mais seguro para se avaliar a aquisição ou não de resistência por um hospedeiro é o peso da carrapata ingurgitada. De fato, Brown & Askenase (1981) observaram que em cobaias previamente infestadas, carrapatos ingurgitados das espécies *Amblyomma americanum* e *R. sanguineus* atingiam pesos inferiores aos atingidos pelos alimentados em cobaias “naive”. Este fato também foi observado por Szabó (1991) e Szabó *et al.* (1995a), que constataram que em cobaias e hamsters, mas não em cães, carrapatos ingurgitados apresentavam variação significativa da média de seus pesos, entre as infestações.

No presente trabalho, a análise comparativa dos parâmetros biológicos dos carrapatos nas diferentes infestações demonstrou que, apesar de haver variação significativa entre os pesos médios da fêmea ingurgitada e massa de ovos e do período de ingurgitamento em ambas as linhagens, e do período de pré-postura no grupo infestado com a linhagem argentina, as variações favoreceram os carrapatos, demonstrando que os cães não parecem adquirir resistência às linhagens estudadas. Resultados diferentes foram obtidos em estudo conduzido por Ferreira (1994) e Ferreira & Bechara (1995), que observaram a não ocorrência de variação significativa entre as médias correspondentes ao período de ingurgitamento e de pré-postura de *R. sanguineus* linhagem brasileira em cães domésticos. No presente estudo, as variações significativas obtidas no grupo infestado com a linhagem brasileira podem ter sido decorrentes da utilização de diferentes lotes de carrapatos, com variação na idade e tamanho dos ácaros. Ressalte-se que na segunda infestação foram utilizados exemplares mais velhos e menores, enquanto na terceira foram utilizados exemplares mais novos e visivelmente maiores. Deve-se destacar ainda que, em ambas as linhagens, os períodos de ingurgitamento e de pré-postura foram determinados com base em observações diárias, sendo inviáveis níveis de distinção menores que um dia.

Os exemplares de *R. sanguineus*, linhagem Rafaela, foram inicialmente liberados em câmaras-de-alimentação fixadas em coelhos “naive” para ampliação da colônia. No entanto, observou-se que os adultos de tal linhagem não se alimentavam adequadamente no hospedeiro escolhido. Por isso, um cão SRD, macho, com 10 meses de idade, foi utilizado como hospedeiro, e assim, a colônia pode ser ampliada. Por outro lado, os demais instares do parasito se alimentaram normalmente em coelhos “naive”.

Deve-se ressaltar que, no decorrer do estudo, em média 70% do total de fêmeas ingurgitadas da linhagem argentina adquiriu coloração escura após alguns dias de destacadas do hospedeiro, e morreram antes de iniciarem ou completarem a oviposição. Este fato possivelmente explica o ocorrido entre a primeira e segunda infestações, em que a média do peso das fêmeas ingurgitadas foi superior na primeira

infestação, porém a média do peso da massa de ovos foi inferior em relação à segunda infestação; teoricamente o peso da carrapata ingurgitada possui relação direta com o peso da massa de ovos que ela ovipõe (CONNAT *et al.*, 1986). Ou seja, na primeira infestação, a maioria das carrapatos morreu antes de ovipor, ou assim que iniciou a oviposição, diminuindo significativamente a média do peso dos ovos e obtendo-se resultado inferior ao que foi observado na segunda infestação, que apesar de também ter apresentado alta mortalidade das carrapatos, estas conseguiram ovipor mais ou por um período de tempo maior antes de morrerem. Ademais, houve elevada mortalidade das larvas eclodidas de ovos dessas carrapatos, isto é, as larvas eclodiam normalmente, porém passados alguns dias, morriam. Tais fatos sugeriram, a princípio, aquisição de resistência pelos cães. No entanto, depois de feitas as análises estatísticas dos parâmetros biológicos e descartada a ocorrência de desenvolvimento de resistência, pode-se sugerir que as condições de temperatura e umidade utilizadas não foram ideais para manutenção dessa linhagem de carrapato. De fato, Szabó *et al.* (2005) também observaram baixa taxa de recuperação das carrapatos de linhagem argentina, o que os levaram a testar a hipótese de manutenção dos ácaros, dois meses antes do início das infestações, à temperatura constante de 20°C, umidade relativa de 80% ± 5% e fotoperíodo de 14 hr de luz:10 hr de escuro, obtendo assim melhores taxas de recuperação das carrapatos nas infestações.

O método utilizado para estimar a taxa de eclodibilidade das larvas, em ambas as linhagens, foi a observação visual e registro da porcentagem de larvas eclodidas, por três indivíduos separadamente, sendo o resultado final a média obtida dos três registros. Apesar de aparentemente subjetivo, os valores registrados por cada observador para eclodibilidade larval foram próximos uns dos outros. Poucos trabalhos da literatura utilizam a taxa de eclodibilidade como parâmetro de avaliação do desempenho do carrapato sobre o hospedeiro (FERREIRA, 1994), no entanto, algumas citações relativas às relações parasita-hospedeiro resistente demonstram redução na porcentagem de larvas eclodidas (BOWESSIDJAOU *et al.*, 1977). De fato, Szabó (1991) e Szabó *et al.* (1995a) constataram redução significativa da taxa de

eclodibilidade das larvas providas de *R. sanguineus* alimentadas em cobaias previamente infestadas, quando comparadas às carrapatos alimentadas em cobaias “naive”.

A análise histopatológica do local de fixação dos carrapatos nos cães foi realizada, por meio de microscopia de luz, para avaliação dos aspectos gerais da lesão e contagem global e diferencial das células inflamatórias infiltrantes, e assim fornecer indícios dos mecanismos de reação envolvidos na aquisição ou não de imunidade ao ácaro. As alterações gerais observadas representaram aspectos inespecíficos presentes em uma reação inflamatória, tais como espessamento da epiderme (hiperplasia), infiltração celular inflamatória, edema de derme e neovascularização, dentre outros. Estas alterações podem ser justificadas, em parte, pela ruptura da epiderme decorrente da fixação do carrapato, assim como pela inoculação de enzimas líticas, como esterases, presentes na saliva do ectoparasito (KEMP *et al.*, 1982). Os tipos celulares identificados e contados por meio de uma quadrícula montada na ocular foram os polimorfonucleares neutrófilos e eosinófilos, os mastócitos, e os macrófagos, fibroblastos e linfócitos, estes últimos englobados em um único grupo e computados apenas como mononucleares devido à dificuldade de identificação exata desses tipos celulares através das técnicas adotadas (SZABÓ, 1995).

Nas contagens globais de células, na primeira infestação, o grupo infestado com *R. sanguineus*, linhagem Jaboticabal (G1), apresentou leve reação inflamatória nas primeiras 48 horas pós-liberação dos carrapatos e reação moderada nos demais tempos estudados. Na terceira infestação os animais apresentaram moderada reação nas primeiras 48 horas, severa na 72^a hora e leve na 144^a hora pós-liberação. Esta diminuição da reação inflamatória no último tempo avaliado pode estar relacionada à resolução do processo. Outro fator que pode estar relacionado ao resultado apresentado é que a contagem celular foi realizada apenas na derme superficial, logo abaixo do ponto de fixação do carrapato, onde a presença de infiltrado celular é mais elevada devido à maior concentração de saliva do ectoparasito e de mediadores químicos da inflamação presentes no local. Com o tempo, a infiltração celular se

estendeu para a derme profunda, região não considerada nas contagens celulares do presente trabalho. Um terceiro possível fator que pode ter influenciado no resultado obtido é o fato que os carrapatos tentam se fixar várias vezes, em diferentes locais, até se fixarem definitivamente e ingurgitarem. Logo, mesmo os carrapatos estando aparentemente afixados pelo mesmo período de tempo, o período de repasto sanguíneo não é exato, podendo interferir na quantidade de células infiltrantes presentes na amostra coletada (SZABÓ, 1995; SZABÓ & BECHARA, 1999).

Os cães infestados com *R. sanguineus*, linhagem Rafaela (G2), apresentaram, na primeira infestação, reação inflamatória leve nas primeiras 24 horas pós-liberação dos carrapatos, severa na 48^a hora e leve nos demais tempos estudados, possivelmente pelas mesmas razões apresentadas para o G1. Na terceira infestação, por sua vez, os hospedeiros apresentaram moderada reação inflamatória nas primeiras 24 horas e mais severa nos demais tempos estudados.

Em ambas as linhagens, durante a terceira infestação houve infiltração celular mais acentuada nos diferentes tempos, em comparação com a primeira infestação, possivelmente devido a uma resposta de memória que modulou a reação inflamatória (SZABÓ & BECHARA, 1999).

Nas contagens diferenciais na primeira infestação, em ambas as linhagens, as poucas células presentes nas primeiras 24 horas pós-liberação eram, em sua maioria, provavelmente células mononucleares próprias (residentes) do tecido celular subcutâneo, portanto ainda não migradas em resposta ao estímulo inflamatório. Em outras palavras, possivelmente o número reduzido de células inflamatórias se deva a uma migração celular ainda pouco significativa para o local da lesão nesse tempo. No entanto, a partir da 48^a hora pós-liberação dos carrapatos foi observado um predomínio de neutrófilos. Estes fatos também foram observados por Szabó (1995) e Szabó & Bechara (1999), que constataram predominância surpreendente de neutrófilos no tecido lesionado até 96 horas pós-fixação do ectoparasito, independentemente da infestação, se primeira ou terceira. A migração crescente de neutrófilos para o local lesionado

observada no presente estudo e no conduzido por aqueles autores pode ser considerada atípica, porquanto se espera em uma reação inflamatória comum, inespecífica, uma migração inicial e marcante de neutrófilos, com posterior predomínio de células mononucleares (McKAY & SEDGWICK, 1985).

Na terceira infestação, observou-se presença inicial marcante de neutrófilos em ambas as linhagens, já nas primeiras 24 horas pós-liberação, apesar de inferior à quantidade de mononucleares, com migração crescente dos neutrófilos nos demais tempos avaliados; fato semelhante foi observado em estudo conduzido por Szabó & Bechara (1999). Neutrófilos têm a capacidade de liberar enzimas líticas que produzem espécies reativas de oxigênio que são lesivas para os tecidos (WEISS, 1989). Assim, Szabó & Bechara (1999) sugeriram que, em cães, os neutrófilos que migram para o sítio de fixação dos carrapatos estão inativos ou sem exercer seu potencial lesivo, o que possivelmente explica o que foi observado neste estudo, em que o cão desenvolveu apenas lesão branda no local acometido, caracterizada por edema moderado.

Deve-ser ressaltar que, preocupada em atender às recomendações da CEUA local, a quantidade de amostras coletadas foi pequena, sendo realizada apenas uma biópsia por grupo, por tempo avaliado, o que possivelmente justifica o elevado desvio padrão observado nas contagens global e diferencial das células infiltrantes. Assim como as variações nos tipos celulares presentes nos diferentes cortes histológicos, pois cada tempo avaliado representou um animal diferente (sendo a mesma seqüência de animais utilizada na primeira e terceira infestações). A variação individual de cada animal também pode ter influenciado os diferentes graus de reação inflamatória observados nos diferentes tempos avaliados, na primeira e terceira infestações, em ambos os grupos.

Para realização do teste Elisa, inicialmente, os extratos de *R. sanguineus* adultos não alimentados (ECANA), linhagens brasileira e argentina, foram preparados, em separado, seguindo protocolo de trituração dos carrapatos inteiros. No entanto, por

meio da técnica do BCA, constatou-se uma baixa concentração protéica em ambas as amostras. Assim, novo protocolo foi testado, desintegrando-se apenas os órgãos internos do ácaro, descartando-se assim a cutícula quitinosa. Nova determinação foi realizada, encontrando-se também baixas concentrações protéicas em ambas as linhagens, porém maiores em relação ao primeiro protocolo testado. Assim, e apesar disso, escolheu-se este protocolo para ser utilizado neste trabalho. Destaque-se que em média, dez casais de cada linhagem foram utilizados por ser inviável a utilização de mais exemplares devido à pouca disponibilidade de cada colônia ao final das infestações. Talvez isso explique em parte o porquê dos baixos teores protéicos nas amostras preparadas.

Concentrações ótimas dos antígenos e diluições dos soros foram estabelecidas testando-se os antígenos às concentrações de 5 µg/ml e 10 µg/ml e os soros nas diluições 1:50, 1:100, 1:200 e 1:400. Para realização do bloqueio dos antígenos e diluição dos soros dos cães foram testados leite em pó desnatado a 5% e soro de coelho normal a 5%. A microplaca de fundo plano com IgG anti-cão conjugada a fosfatase alcalina foi lida após 30, 40 e 50 minutos de incubação para avaliação do tempo ideal para se realizar a leitura da placa após adição do substrato. Após análise dos resultados obtidos, o teste ELISA foi padronizado ajustando-se o antígeno para a concentração de 10 µg/ml em ambas as linhagens de carrapatos, diluindo os soros a 1:50 em ambas as linhagens, utilizando-se o soro de coelho normal a 5% no bloqueio dos antígenos e diluição dos soros dos cães e incubando-se a placa com IgG anti-cão conjugada a fosfatase alcalina por 30 minutos.

Os soros pré-infestação dos cães foram utilizados como controle negativo e o ponto de corte para determinação de sorologia positiva contra *R. sanguineus* foi determinado através da média das densidades óticas dos soros pré-infestação + acrescido de 2 vezes o valor do desvio padrão. Após a segunda e terceira infestações todos os animais, de ambas as linhagens, desenvolveram anticorpos contra *R. sanguineus* adultos, sendo que no grupo infestado com linhagem Rafaela, houve diferença significativa entre a média obtida pós-segunda infestação, em relação à

obtida na pré-infestação. Ainda assim, as médias da titulação de anticorpos pós infestações repetidas no G2 foram baixas, abaixo de 0,500 nm. Ressalte-se que em estudos conduzidos por Szabó *et al.* (2003), e Jittapalapong *et al.* (2000) também observou-se baixos valores de densidade ótica contra antígeno de saliva e saliva e intestino, respectivamente, de *R. sanguineus*, avaliados pelo teste ELISA, sugerindo que, ao menos em infestações naturais, cães domésticos respondem com baixos títulos de anticorpos séricos anti-carrapato. A baixa resposta por anticorpos pode estar relacionada com a imunossupressão humoral causada por componentes da saliva do carrapato, conforme descrito por Inokuma *et al.* (1993), em bovinos infestados com *B. microplus*, e que pode, portanto, representar um mecanismo de evasão do ectoparasito (SZABÓ *et al.*, 2003). No entanto, dois Dachshunds do G1, os únicos representantes de pêlo longo, descendentes de pais importados do Japão, apresentaram maiores títulos de anticorpos anti-*R. sanguineus* após a segunda e terceira infestações. Semelhantemente, Szabó *et al.* (2003) também relataram, no estudo mencionado acima, que um animal apresentou elevada densidade ótica no teste ELISA. Finalmente, sugeriram a dissociação entre os níveis de anticorpos IgG e capacidade de desenvolver resistência a carrapatos. De fato, observações anteriores envolvendo ovelhas infestadas com *Amblyomma americanum* demonstraram relação inversa entre a expressão da resistência do hospedeiro e formação de anticorpos (BARRIGA *et al.*, 1991), fato observado no presente estudo em que a produção de anticorpos não conferiu resistência aos cães domésticos. Já Perez-Perez *et al.* (2010) observaram aumento significativo na titulação de anticorpos em cães duplamente imunizados com Bm86 e desafiados com 3 instares de *R. sanguineus*, demonstrando resposta imunológica específica eficiente.

A análise das reações cruzadas dos soros dos animais do G1 com antígeno do *R. sanguineus*, linhagem Rafaela, e vice-versa demonstrou produção de anticorpos em ambas as reações. Os mesmos animais que no G1 apresentaram altas titulações de anticorpos anti-*R. sanguineus*, linhagem Jaboticabal, após a segunda e terceira

infestações apresentaram resultados semelhantes quando testados com o antígeno do carrapato da linhagem Rafaela.

Assim, apesar das diferenças morfológicas, biológicas e genéticas anteriormente descritas entre as linhagens argentina e brasileira de *R. sanguineus*, elas parecem se comportar de maneira semelhante frente a infestações sucessivas em cães domésticos.

7. Conclusões

Os resultados apresentados e discutidos no presente trabalho permitem sugerir que:

1. O cão doméstico não desenvolve imunidade ao carrapato *R. sanguineus*, linhagens Jaboticabal e Rafaela, fato demonstrado pelo melhor desempenho alimentar e reprodutivo das teleóginas após infestações sucessivas;
2. O exame histopatológico das biópsias de pele de cão no sítio de fixação dos carrapatos de ambas linhagens revelou alterações gerais típicas e inespecíficas de uma reação inflamatória, variável com o tempo de fixação do ectoparasito, sendo o infiltrado celular inflamatório composto por neutrófilos, predominantemente;
3. O teste ELISA revelou baixa produção de anticorpos séricos pelo cão doméstico contra *R. sanguineus* linhagem Rafaela, em infestações sucessivas, e maior produção pós-segunda e terceira infestações pelos cães infestados com *R. sanguineus* linhagem Jaboticabal, porém sem conferir resistência.
4. O teste ELISA demonstrou ocorrência de reação cruzada entre os soros dos animais infestados com *R. sanguineus*, linhagem Jaboticabal, com antígeno de *R. sanguineus*, linhagem Rafaela, e vice-versa, porém sem conferir resistência.
5. Portanto, apesar das diferenças morfológicas, biológicas e genéticas anteriormente descritas entre as linhagens argentina e brasileira de *R.*

sanguineus, elas parecem se comportar de maneira semelhante frente a infestações sucessivas em cães domésticos.

8. Referências:

AGBEDE, R.I.S; KEMP, D.H. Immunization of cattle against *Boophilus microplus* using extracts derived from adult female ticks: histopathology of ticks feeding on vaccinated cattle. **Intern. J. Parasitol.**, v.16, n.1, p.35-41, 1986.

ALEXANDER JO'D. The physiology of itch. **Parasitol. Today.** v 2, p.345-51, 1986.

ALLEN, J. R. Tick resistance: basophils in skin reactions of resistant guinea pigs. **Int. J. Parasitol.**, v.3, p.195-200, 1973.

ALLEN, J.R.; KHALIL, H.M.; WIKEL, S.K. Langerhans cells trap tick salivary gland antigens in tick-resistant guinea pigs. **J. Immunol.**, v.122, p.563-65, 1979a.

ALLEN, J.R.; HUMPHEYS, S.J. Immunisation of guinea pigs and cattle against ticks. **Nature**, v. 280, p.491-3, 1979b.

AMAKIRI, S.F. Arteriovenous anastomoses in the skin of tropical cattle. **Acta Anat.**, Basel, v.96, p.285-300, 1976.

AROCHA-PIÑANGO, C,L.; MARCHI, R.; CARVAJAL, Z.; GUERRERO, B. Invertebrate compounds acting on the hemostatic mechanism. **Blood Coag Fibrinolysis**, v.10, p.43–68, 1999;.

ASKENASE, P. W. Role of basophils, mast cells and vasoamines in hypersensitivity reaction with a delayed time course. **Progress in Allergy**, v.23, p.199-320, 1977.

BARRIGA, O.O., ANDUJAR, F., ANDRZEJEWSKI, W.J., Manifestations of immunity in sheep repeatedly infested with *Amblyomma americanum* ticks. **J. Parasitol.** v.77 (5), p.703–09, 1991.

BECHARA, G. H.; SZABÓ, M. P. J.; MUKAI, L.S.; ROSA, P. C. S. Immunization of dogs, hamsters and guinea pigs against *Rhipicephalus sanguineus* using crude unfed adult tick extracts. **Vet. Parasitol.**, v.52, p.79-90, 1994.

BECHARA, G.H.; SZABÓ, M.P.J.; FERREIRA, B.R.; GARCIA, M.V.; *Rhipicephalus sanguineus* in Brazil: feeding and reproductive aspects under laboratorial conditions. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.** v.4, n.2, p.61–66, 1995.

- BIANCHI, M.W.; BARRE, N.; MESSAD, S. Factors related to infestation level and resistance to acaricides in *Boophilus microplus* tick populations in New Caledonia. **Veterinary Parasitology**, v.112, p.75–89, 2003.
- BOWESSIDJAOU, J., BROSSARD, M., AESCHLIMANN, A. Effects and duration of resistance acquired by rabbits on feeding and egg laying in *Ixodides ricinus*. **Experientia**, Basel, v.33, p.528-30, 1977.
- BOWMAN, A.S.; COONS, L.B.; NEEDHAM, G.R.; SAUER, J.R. Tick saliva: recent advances and implications for vector competence. **Medical and Veterinary Entomology**, v.11, p.227–85, 1997.
- BROSSARD, M. Rabbits infested with adult *Ixodes ricinus* L.: effects of mepyramine on acquired resistance. **Experientia**, v.38. p.702-4, 1982.
- BROWN, S.J.; ASKENASE, P.W. Cutaneous basophil responses and immune resistance of guinea pigs to ticks: passive transfer with peritoneal exudate cells or serum. **J Immunol.**, v.127, n.5, p.2163–2167, 1981.
- 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.**, v.129, p.790-96, 1982.
- BROWN, S.J.; BARKER, R.W.; ASKENASE, P.W. Bovine resistance to *Amblyomma americanum* ticks: An acquired immune response characterized by cutaneous basophil infiltrates. **Veterinary Parasitology**, v.16, p.147-65, 1984.
- BROWN, S.J. Immunology of acquired resistance to ticks. **Parasitol. Today**, v.1, n.6, p.166-71, 1985.
- BROWN, S.J. Western blot analysis of *Amblyomma americanum*-derived stage specific and shared antigens using serum from guinea-pigs expressing resistance. **Vet. Parasitol.**, Amsterdam, v.28, p.163-71, 1988.
- CHABAUD, A.G. L' infestation par des ixodines provoque-t-elle une immunité chez l-hôte (2me note). **Ann. Parasit. Hum. Comp.** v.25, p.474–479, 1950.

- CONNAT, J.L. *et al.* Some aspects of the control of the gonotrophic cycle in the tick *Ornithodoros moubata* (Ixodidae, Argasidae). In SAUER, J.R., HAIR, J.A. (Ed) **Morphology, Physiology and Behavioral Biology of the ticks**. Oklahoma: John Wiley & Sons- Ellis Horwood Limited, p.194-232, 1986.
- CUPP, E.W. Biology of ticks. **Vet Clin. N. America: Small An. Practice**, v.21, p.1-25, 1991.
- DENHOLLANDER, N.; ALLEN, J.R. Dermacentor variabilis: resistance to ticks acquired by mast cell-deficient and other strains of mice. **Exp Parasitol.**, v.59, n.2, p.169–179, 1985.
- DVORAK, H.F.; DVORAK, A.M.; SIMPSON, B.A.; RICHARDSON, H.B.; LESKOWITZ, S.; KARNOVSKY, M.J. Cutaneous basophil hypersensitivity. 11. A light and electron microscopic description. **J Exp. Med.**, v.132, p.558-82, 1970.
- ESTRADA-PEÑA, A.; JONGEJAN, F. Ticks feeding on humans: a review of records on human-biting Ixodoidea with special reference to pathogen transmission. **Exp. Appl. Acarol.**, v.23, p.685–715, 1999.
- ESTRADA-PEÑA, A.; QUÍEZ, J.; SÁNCHEZ ACEDO, C. Species composition, distribution, and ecological preferences of the ticks of grazing sheep in north-central Spain. **Med. Vet. Entomol.**, v.18, p.123-133, 2004.
- FERREIRA, B.R. **Estudo comparativo do desenvolvimento da resistência a carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille) em cachorro-do-mato *Cerdocyon thous* (Linnaeus) e no cão doméstico**. São Paulo: Universidade Estadual Paulista,. Dissertação (Mestrado em Patologia Animal). 113p., 1994,
- FERREIRA, B.R.; BECHARA, G.H. Immunity to ticks *Rhipicephalus sanguineus* (Acarina:Ixodidae) in crab-eating-fox *Cerdocyon thous* (Linnaeus) and mongrel dogs. **Braz. J. vet. Res. Anim. Sci.**, v.32, p.232-237, 1995.
- FERREIRA, B. R.; SILVA, J. S. Saliva of *Rhipicephalus sanguineus* tick impairs T cell proliferation and IFN- γ -induced macrophage microbial activity. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.64, p.279-293, 1998.
- FERREIRA, B.R.; SILVA, J.S. Successive tick infestation selectively promote a T-helper 2 cytokine profile in mice. **Immunology**, v.96, p.434-439, 1999.

- FOX, M.V. **The Behaviour of Wolves, Dogs and Related Canids**. Jonathan Cape, London, Harper and Row, New York, N.Y., 1971
- FOX, M.V. **Evolution of social behavior in canids**. M.V. Fox (Ed.), *The Wild Canids*, van Nostrand Reinhold, New York, p. 429–460, 1975.
- FRASER, C.M.; MAYS, A. (Ed.) **The Merck veterinary manual**, 6. Ed. Belo Horizonte: Precisa Ed. Gráfica, p.35-41, 1982.
- FREITAS, M.G.; COSTA, H.M.A.; COSTA, J.A.; IIDE, P. 1978. **Entomologia médica veterinária**. 3.ed. Belo Horizonte: Raebo e Brasil, p.35-52, 1978.
- FREITAS, M.G. *et al.* **Entomologia e Acarologia Médica Veterinária**. 6.ed. Belo Horizonte: Precisa Ed. Gráfica. p.35-41, 1982.
- GARCIA-GARCIA, J. C., GONZALEZ, I. L., GONZALEZ, D. M., VALDES, M., MENDEZ, L., LAMBERTI, J, D'AGOSTINO, B., CITRONI, D., FRAGOSO, H., ORTIZ, M., RODRIGUEZ, M., DE LA FUENTE, J. Séquense variantions in the *Boophilus microplus* Bm86 locus and implications for immunoprotection in cattle vaccinated with this antigen. **Exp. Appl. Acarol.**, v. 23, n. 11, p.883-895, 1999.
- GARCIA-GARCIA, J. C., MONTERO, C., REDONDO, M. VARGAS, M., CANALES, M., BOUE, O., RODRIGUEZ, M. JOGLAR, M., MACHADO, H., GONZALEZ, I. L., VALDES, M., MENDEZ, L., DE LA FUENTE, J. Control of ticks resistant to immunization with Bm86 in cattle vaccinated with the recombinant antigen Bm95 isolated from the cattle tick, *Boophilus microplus*. **Vaccine**, v. 18, n. 21, p.2275-2287, 2000.
- GHOSH, S; AZHAHIANAMBI, P; YADAV, M.P. Upcoming and future strategies of tick control: a review. **J Vector Borne Dis.**, v.44, n.2, p.79-89, 2007.
- GOMES, A.; HONER, M.R.; SCHENK, M.A.; CURVO, J.B.E. Populations of the cattle tick (*Boophilus microplus*) on purebred Nelore, Ibajé and Nelore x European crossbreds in the Brazilian Savanna. **Trop Anim Health Prod**, v.21, p.20-24, 1989.
- GOMES A. **Dinâmica populacional de *Boophilus microplus* (canestrini, 1987) (Acari: ixodidae) em bovinos nelore (*bos indicus*) e cruzamentos em infestações experimentais**, Rio de Janeiro: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Tese, 1995.

- GUGLIELMONE, A.A.; ESTRADA-PEÑA, A.; KEIRANS, J.E.; ROBBINS, R.G. **Ticks (Acari: Ixodidae) of the Neotropical zoogeographic region**. In: Special Publication of the International Consortium on Ticks and Tick-Borne Diseases-ICTTD-2. Atlanta, Hauten, The Netherlands, 173 pp., 2003.
- HALL, R.L; SHARP, H.S. **Wolf And Man: Evolution in Parallel**. Academic Press (New York), 210p, 1978.
- HELLER-HAUPT, A., VARMA, M.G.R., LANGI, A.O. Acquired resistance to ixodid ticks in laboratory animals. **Trans Royal Soc. Of Med. And Hyg.**, v.75, n.1, p.147-48, 1981.
- HEMMER, H., **Domestication: the decline of environmental appreciation**. Cambridge Univ. Press., NY, 1990.
- HEWETSON, R. W. Resistance by cattle to the cattle tick *Boophilus microplus*. III. The development of resistance to experimental infestations by purebred Sahiwal and Australian Illawarra shorthorn cattle. **Aust. J. Agric. Res.**, v.22, p.331-342, 1971.
- HONER, M.R.; GOMES, A. O manejo integrado de mosca-dos-chifres, berne e carrapato em gado de corte. **Circular Técnica EMBRAPA-CNPGC**, v.22, p.1-60, 1990.
- HOOGSTRAAL, H.; AESCHLIMANN, A. Tick-host specificity. **Bull. Soc. En-tomol. Suisse**, v.55, p.5-32, 1982.
- HUNTER, J; CLANBRASSIL, H.; MEARS, W.M. Observations Tending to Show That the Wolf, Jackal, and Dog Are All of the Same Species. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, v. 77, p.253-266, 1787.
- INOKUMA, H., KERLIN, R.L., KEMP, D.H., WILLADSEN, P. Effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on the bovine immune system. **Vet. Parasitol.**,v.47, n.1-2, p.107-118, 1993.
- INOKUMA, H.; TAMURA, K.; ONISHI, T. Dogs develop resistance to *Rhipicephalus sanguineus*. **Vet. Parasitol.** v. 68, p.295–297, 1997.
- INOKUMA, H.; OHNO, K.; ONISHI, T. Is the detection of anti- *Rhipicephalus sanguineus* (Rs24p) antibodies a valuable epidemiological tool of tick infestation in dogs? **Vet. Res.** v.31 p.365–369, 2000.

JITTAPALAPONG, S.; STICH, R.W.; GORDON, J.C.; WITTUM, T.E.; BARRIGA, O.O. Performance of female *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) fed on dogs exposed to multiple infestations or immunization with tick salivary gland or midgut tissues. **J. Med. Entomol.**, v. 37, p.601–611, 2000a.

JITTAPALAPONG, S.; STICH, R.W.; GORDON, J.C.; BREMER, C.A.; BARRIGA, O.O. Humoral immune response of dogs immunized with salivary gland, midgut, or repeated infestations with *Rhipicephalus sanguineus*. **Ann N Y Acad Sci.**, v.916, p.283-8, 2000.

JOHNS, C. **Dogs: history, myth, art**. Ed. The British Museum Press, p.9-21, 2008.

JONGEJAN, F.; UILENBERG, G. The global importance of ticks. **Parasitology** , v.129 (Suppl.), p3-14. 2004.

KEMP, D.H., STONE, B.F., BINNINGTON, K.C. Tick attachment and feeding. Role of the mouthparts, feeding apparatus, salivary gland secretions and the host response. In: OBENCHAIN, F.D., GALUN, R., eds **Physiology of the ticks**, Oxford, Pergamon, p.119-68, 1982.

KEMP, D.H.; AGBEDE, R.I.S.; JHONSTON, L.A.Y; COUGH, J.M. . Immunization of cattle against *Boophilus microplus* using extracts derived from adult female ticks: Feeding and survival of the parasite on vaccinated cattle. **Intern. J. Parasitol.**, v.16, p.115-120, 1986.

KOBAYASHI, K.; KANEDA, K.; KASAMA, T. Immunopathogenesis of delayed-type hypersensitivity, *Microsc. Res. Tech.*, v.May 15; 53, n.4, p.241-5, 2001.

LEMOS, A.M. A resistência genética dos bovinos e o controle do carrapato. **Documento EMBRAPA/CNPGL**, Coronel Pacheco, v.6, 42pp, 1986.

LIMO, M.K.; VOIGT, W.P.; TUMBO-OERI, A.G.; NJOGU, R.M.; OLE-MOIYOI, O.K. Purification and characterization of an anticoagulant from the salivary glands of the ixodid tick *Rhipicephalus appendiculatus*. **Exp Parasitol**, v.72, n.4, p.418-29, 1991.

LINNAEUS, C. *Systema naturae per regna tria naturae: secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis*. 10^a ed. [S.l.]: Holmiae (Laurentii Salvii), vol. 1, p.38-39, 1758.

- LORENZ, K., Foreword. In MW Fox (Ed), **The Wild Canids: Their Systematics, Behavioral Ecology and Evolution**. New York: Van Nos-trand Reinhold, 1975.
- MATSUDA, H.; FUKUI, K.; KISO, Y.; KITAMURA, Y. Inability of genetically mast cell-deficient W/Wv mice to acquire resistance against larval Haemaphysalis longicornis ticks. **J Parasitol.**, v.71, n.4, p.43–448, 1985;
- MATSUDA, H.; NAKANO, T.; KISO, Y.; KITAMURA Y. Normalization of anti-tick response of mast cell-deficient W/Wv mice by intracutaneous injection of cultured mast cells. **J Parasitol.**, v.73, n.1, p.155–160, 1987.
- MATSUDA, H. *et al.* Necessity of IgE antibodies and mast cells for manifestation of resistance against larval Haemaphysalis longicornis ticks in mice. **J Immunol.**, v.144, n.1, p.259–262, 1990.
- McKAY, A.R., SEDGWICK, A.D. The transition from acute to chronic inflammation. **British Journal of Dermatology**, v.113, suppl.28, p.34-48, 1985.
- MORA HERNÁNDEZ, C. A. **Avaliação a campo do imunógeno recombinante rBm 86 no controle do carrapato *Boophilus microplus***. Rio de Janeiro : UFRRJ, Tese (Doutorado em Parasitologia Veterinária) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 100p., 1996.
- MORRISON, W.I. Host effector mechanisms against parasites. **Vet. Parasitol.**, Amsterdam, v.25, p.163-76, 1987.
- MOSMANN, T.R.; COFFMAN, R.L. TH 1 and TH2 cells: differential patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. **Annu. Rev. Immunol.**, v.7, p.145-73, 1989.
- MOSMANN, T.R.; MOORE, K.W. The role of IL-10 in crossregulation of T(H)1 and T(H)2 responses. **Parasitol. Today.**, v. Mar; 7, n.3, p.49-53, 1991.
- MOSMANN, T.R.; SAD, S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. **Immunol. Today.**, v.Mar; 17, n.3, p.138-46, 1996.
- NITHIUTHAI, S.; ALLEN, J.R. Significant changes in epidermal Langerhans cells of guinea-pigs infested with ticks (*Dermacentor andersoni*). **Immunology**, v.51, p.133- 41, 1984a.
- NITHIUTHAI, S.; ALLEN, J.R. Effects of ultraviolet irradiation on epidermal Langerhans cells in guinea-pigs. **Immunology**, v.51, p.143-51, 1984b.

- NITHIUTHAI, S.; ALLEN, J.R. Effects of ultraviolet irradiation on the acquisition and expression of tick resistance in guinea-pigs. **Immunology** v.51, p.153-59, 1984c.
- NITHIUTHAI, S.; ALLEN, J.R. Langerhans cells present tick antigens to lymph node cells from tick sensitized guinea-pigs. **Immunology** v.55, p.157-63, 1985.
- OBEREM, P.T. The immunological basis of host resistance to ticks – a review. **J. of the S. Afr. Vet. Assoc.**, Pretoria, v.55, n.4, p.215-17, 1984.
- OLIVEIRA, G.P.; ALENCAR, M.M. Resistência de bovinos ao carrapato *Boophilus microplus*. I. Infestação artificial. **Pesq Agropec Bras**, v.22, p.433-8, 1987.
- OLIVEIRA, P.R.; BECHARA, G.H.; DENARDI, S.E.; SAITO, K.C.; NUNES, E.T.; SZABÓ, M.P.J.; CAMARGO MATHIAS, M.I. Comparison of the external morphology of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) ticks from Brazil and Argentina. **Vet. Parasitol.**, v.129, p.139-147, 2005
- OLIVER, J.R.; Biology and systematics of ticks (Acari: Ixodida). **Annu. Rev. Ecol. Syst.**, v.20, p.397–430, 1989.
- OPDEBEEK, J. P. Vaccine against blood-sucking arthropods. **Veterinary Parasitology.**, v.54, p.205-222, 1994.
- PAESEN, G.C.; ADAMS, P.L.; HARLOS, K.; NUTTALL, P.A.; STUART, D.I. Tick histamine-binding proteins: isolation, cloning and three-dimensional structure. **Molecular Cell**, v.3, p.661–71, 1999.
- PAINE, S.H.; KEMP, D.H.; ALLEN, J.R. In vitro feeding of *Dermacentor andersoni* (Stiles): Effect of histamine and other mediators. **Parasitology**, v.86, p.419-428, 1983.
- PATARROYO, J.H.; PORTELA, R.W.; CASTRO, R.O.; COUTO PIMENTEL, J.; GUZMAN, F.; PATARROYO, M.E.; VARGAS, M.I.; PRATES, A.A.; MENDES, M.A. Immunization of cattle with synthetic peptides derived from the *Boophilus microplus* gut protein (Bm86). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 88, n. 3-4, p. 163-172, 2002.

- PEGRAM, R.G.; CLIFFORD, C.M.; WALKER, J.B.; KEIRANS, J.E. Clarification of the *Rhipicephalus sanguineus* group (Acari, Ixodoidea, Ixodidae). Part I: *R. sulcatus* (Neuman, 1908) and *R. turanicus* (Pomerantsev, 1936). **Syst. Parasitol.**, v.10, p.3–26, 1987a.
- PEGRAM, R.G.; CLIFFORD, C.M.; WALKER, J.B.; KEIRANS, J.E. Clarification of the *Rhipicephalus sanguineus* group (Acari, Ixodoidea, Ixodidae). Part II: *R. sanguineus* (Latreille, 1806) and related species. **Syst. Parasitol.**, v.10, p.27–44, 1987b
- PENNA, V.M. *Boophilus microplus*: A resistência genética do hospedeiro como forma de controle. **Cad. Esc. Téc. Vet. UFMG**, v.4, 65p., 1990.
- PEREZ, M.; RIKISHA, Y.; WEN, B. *Ehrlichia canis*-like agent isolated from a man in Venezuela: antigenic and genetic characterization. **J. Clin. Microbiol.**, v.34, p.2133–2139, 1996.
- PEREZ-PEREZ, D.; BECHARA, G.H.; MACHADO, R.Z.; ANDRADE, G.M.; DEL VECCHIO, R.E.M.; PEDROSO, M.S.; HERNÁNDEZ, M.V.; FARNO´ S, O. Efficacy of the Bm86 antigen against immature instars and adults of the dog tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). **Vet Parasitol.**, v.167, p.321-26, 2010.
- RAJPUT, Z.I.; HU, SH; CHEN, W.J; ARIJO, A.G.; XIAO, C.W. Importance of ticks and their chemical and immunological control in livestock. **J Zhejiang Univ Sci B**. v.Nov;7, n.11, p.912-21, 2006.
- RAND, K.N.; MOORE, T.; SRISKANTHA, A.; SPRING, K.; TELLAM, R.; WILLADSEN, P.; COBON, G.S. Cloning and expression of a protective antigen from the cattle tick *Boophilus microplus*. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v.Dec; 86, n.24, p.9657–9661, 1989.
- RECHAV, Y. Naturally acquired resistance to ticks – a global view. **Insect. Sci. Applic.**, v.13, n.4, p.405–504, 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*. **J. Exp. Med.**, v.161, p.332-344, 1985.
- RIBEIRO, J.M.; SPIELMAN, A. *Ixodes dammini*: salivary anaphylatoxin inactivating activity. **Exp Parasitol.**, v.Oct; 62, n.2, p.292-7, 1986.

- RIBEIRO, J.M.C. Role of saliva in tick-host interactions. **Exp. & Appl. Acarol.**, Amsterdam, v.7, p.15-20, 1989.
- RIBEIRO, J.M.; WEIS, J.J.; TELFORD S.R. 3RD. Saliva of the tick *Ixodes dammini* inhibits neutrophil function. **Exp. Parasitol.**, v.May; 70, n.4, p.382-8, 1990.
- RIBEIRO, J.M.C. How ticks make a living. **Parasitol. Today**, v.11, p 91-3, 1995.
- RICHARDSON, M.A.; SMITH, D.R.J.; KEMP, D.H.; TELLAM, R.L. Native and baculovirus-expressed forms of the immunoprotective protein BM86 from *Boophilus microplus* are anchored to the cell membrane by glycosyl-phosphatidyl inositol linkage. **Insect Molecular Biology**, v.1, p. 139–47, 1993.
- RIEK, R.F. Factors influencing the susceptibility of cattle to tick infestation. **Aust. Vet. J.**, v.32, p.204-09, 1956.
- RIEK, R.F. Studies on the reactions of animals to infestation with the tick *Boophilus microplus* (canestrini). **Austr. J. Agric. Res.**, v.13, p.532-52, 1962
- ROCHA, U.F. **Panoramas da Parasitologia na África e na Austrália**. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da USP, 150p, 1976.
- RODRIGUEZ, M.; RUBIERA, R.; PENICHER, M.; MONTESINOS, R.; CREMATA, J.; FALCON, V.; SANCHEZ, G.; BRINGAS, R.; CORDOVES, C.; VALDES, M.; LEONART, R.; HERRERA, L.; DE LA FUENTE, J. High level expression of the *Boophilus microplus* Bm86 antigen in the yeast *Pichia pastoris* forming highly immunogenic particles for cattle. **J. Biotechnol.**, v.33, p.135–146, 1994.
- ROSSI, A. Do lobo ao cão. **Revista Cães e Cia**, n.318, 2005.
- ROVEDA, R.J. Ixodoidea. Contribución biológica. **Rev. Med. Vet.**, Buenos Aires, v.36, p.105–119, 1954.
- SAUER, J.R.; ESSENBERG, R.C.; BOWMAN, A.S. Salivary glands in ixodide ticks: control and mechanism of secretion. **J Insect Physiol.**, v.46, p.1069-78, 2000.
- SCOTT, J.P.; FULLER, J.L. **Genetics and the social behavior of the dog**. Chicago: University of Chicago Press, 1965.
- SERPELL, J. **The Domestic Dog: Its Evolution, Behaviour and Interactions with People**. Press syndicate of the University of Cambridge, United Kingdom, 1996.

- SHAPIRO, S.Z.; VOIGT, W.P.; FUJISAKI, K. Tick antigens recognized by serum from guinea pig resistant to infestation with the tick *Rhipicephalus appendiculatus*. **J. Parasitol.**, v.72, p.454-63, 1986.
- SHARP, P.J.; MCINERNEY, B.V.; SMITH, D.R.; TURNBULL, I.F.; KEMP, D.H.; RAND, K.N.; COBON, G.S. Chromatography and generation of specific antisera to synthetic peptides from a protective *Boophilus microplus* antigen. **J. Chromatogr.**, v.512, p.189–202, 1990.
- SMITH, P.K.; KROHN, R.I.; HERMANSON, G.I.; MALLIA, A.K.; GARTNER, F.H.; PROVENZANO, M.D.; FUJIMOTO, E.K.; GOEKE, H.M.; OLSON, B.J.; KLENK, D.C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical biochemistry.**, v.150, p.76-85, 1985.
- STEAR, M.J.; NEWMAN, M.J.; NICHOLAS, F.W.; BROWN, S.C.; HOLROYD, R.G. Tick resistance and the major histocompatibility system. **Aust J Exp Biol Med Sci.**, v.62, p.47–52, 1984.
- STEEVES, E.B.; ALLEN, J.R. Tick resistance in mast cell-deficient mice: histological studies. **Int J Parasitol.**, v.21, n.2, p.265–268, 1991.
- STONE, B.F.; BINNINGTON, K.C.; GAUCI, M.; AYLWARD, J.H. Tick/host interactions for *Ixodes holocyclus*: role, effects, biosynthesis and nature of its toxic and allergenic oral secretions. **Exp. Appl. Acarol.**, v.7, p.59-69, 1989.
- SUTHERST, R.W.; WHARTON, R.H.; COOK, I.M.; SUTHERLAND, I.D.; BOURNE, A.S. Long-term population studies on the cattle tick (*Boophilus microplus*) on untreated cattle selected for different levels of tick resistance. **Aust J Agric Res**, v.30, p.353–68, 1979.
- SZABÓ, M.P.J. **Aspectos da imunopatologia comparada em cães, hamsters e cobaias a carrapatos *R. sanguineus* (Latreille, 1806)**. São Paulo: Universidade de São Paulo, Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental), 118p., 1991.
- SZABÓ, M.P.J.; BECHARA, G.H. An insight into the histopathology caused by the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Acarina: Ixodidae) in the skin of previously infested, vaccinated or tick-bite naive dogs, guinea pigs and hamsters. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v.32, n.1, p.37–42, 1995.

- SZABÓ, M.P.J.; MUKAI, L.S.; ROSA, P.C.S.; BECHARA, G.H. Differences in the acquired resistance of dogs, hamsters and guinea pigs to infestations with adult ticks *Rhipicephalus sanguineus* (Acarina: Ixodidae). **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v.32, n.1, p.43-50, 1995a.
- SZABÓ, M.P.J.; MORELLI JUNIOR, J.; BECHARA, G.H. Cutaneous hypersensitivity induced by dogs and guinea-pigs by extracts of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Acari:Ixodidae). **Exp. Appl. Acarol.**, v.19, p.723-730, 1995b
- SZABÓ, M.P.J. **Aspectos imunopatológicos da resistência a carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) em cães e cobaias.** São Paulo: Universidade Estadual Paulista. Tese Doutorado (Área de concentração Patologia Experimental Comparada), 163p., 1995c.
- SZABÓ, M. P. J.; BECHARA, G. H. Sequential histopathology at the *Rhipicephalus sanguineus* tick feeding site on dogs and guinea pigs. **Exp. Appl. Acarol.**, v.23, p.915 - 928, 1999.
- SZABÓ, M.P.J.; MANGOLD, A.J.; JOÃO, C.F.; BECHARA, G.H.; GUGLIELMONE, A.A. Biological and DNA evidence of the *Rhipicephalus sanguineus* tick group (Acari:Ixodidae) in south America. **Vet. Parasitol.**, v.130, p.131-140, 2005.
- TAGLE, I. Presencia accidental de *Rhipicephalus sanguineus* en un perro de Santiago de Chile. **Agric. Técn.**, v.36, p.137, 1976.
- TATCHELL, R.J.; BENNETT, G.F. Boophilus microplus: antihistaminic and tranquillizing drugs and cattle resistance. **Experimental Parasitology**, New York, v. 26, p. 369-377, 1969
- TATCHELL, R.J. Host-parasite interactions and the feeding of blood-sucking arthropods. **Parasitology.**, v.59, p.93-104, 1969
- TATCHELL, R.J. Interactions between ticks and their hosts. **Int. J. Parasitol.**, Oxford, v.17, p.587-606, 1987.
- TEIXEIRA, E.S. **Princípios básicos para a criação de cães.** p.13-15. Ed. Nobel, Brasil, 2005.
- THEIS, J.H.; BUDWISER, P.D. *Rhipicephalus sanguineus*: sequential histopathology at the host–arthropod interface. **Exp. Parasitol.** v.36, p.77–105 1974.
- THIESEN, W.L. Biologia do carrapato *Boophilus microplus*. In: **Seminário Nacional sobre Parasitose dos Bovinos, I.** Campo Grande, p 207-215, 1979.
- TRAGER, W. Acquired immunity to ticks. **J. Parasitol.**, Lawrence, v.25, p.57-81, 1939a.

- TRAGER, W. Further observations on acquired immunity to the tick *Dermacentor variabilis* (Say). **J. Parasitol.**, Lawrence, v.25, p.137-39, 1939b
- TURNBULL, I.F.; SMITH, D.R.; SHARP, P.J.; COBON, G.S., HYNES, M.J. Expression and secretion in *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus niger* of a cell surface glycoprotein from the cattle tick, *Boophilus microplus*, by using the fungal amdS promoter system. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, p.2847–2852, 1990.
- UNVER, A.; PEREZ, M.; ORELLANA, N.; HUANG, H.; RIKISHA, Y. Molecular and antigenic comparison of *Ehrlichia canis* isolates from dogs, ticks, and a human in Venezuela. **J. Clin. Microbiol.** v. 39, p.2788–2793, 2001.
- VERÍSSIMO, C.J. **Resistência e susceptibilidade de bovinos leiteiros mestiços ao carrapato *Boophilus microplus***, São Paulo: Universidade Estadual Paulista – Jaboticabal, Tese, 1991
- WAGLAND, B. M. Host resistance to cattle tick (*Boophilus microplus*) in Brahman (*Bos indicus*) cattle I. Responses of previously unexposed cattle to four infestations with 20000 larvae. **Aust. J. Agric. Res.**, East Melbourne, v.26, p.1073-80, 1975.
- WAGLAND, B. M. Host resistance to cattle tick (*Boophilus microplus*) in Brahman (*Bos indicus*) cattle. II. The dynamics of resistance in previously unexposed and exposed cattle. **Aust. J. Agric. Res.**, v.29, p.395-400, 1978.
- WALKER, A.R., FLETCHER, J.D. Skin test to detect resistance of cattle to *Rhipicephalus appendiculatus* fed on ticks. **Med. Vet. Entomol.**, Oxford, v.4, p.321-25, 1990.
- WALKER, J.B.; KEIRANS, J.E.; HORAK, I.G. **The Genus *Rhipicephalus* (Acari, Ixodidae): A Guide to the Brown Ticks of the World**. Cambridge University Press, Cambridge, 643 p., 2000.
- WAYNE, R.K., Cranial morphology of domestic and wild canids: The influence of development on morphological change. **Evolution**, v.40, p.243-261, 1986a.
- WAYNE, R.K., Developmental constraints on limb growth in domestic and some wild canids. **J. Zool.**, v.210, p.381-399, 1986b.
- WAYNE, R.K., Limb morphology of domestic and wild canids: The influence of development on morphologic change. **J. Morphol**, v.187, p.301-319, 1986c.

- WAYNE, R. K. & O'BRIEN, S. J. Allozyme divergence within the Canidae. **Systematic Zoology**, v.36, p.339-355, 1987.
- WAYNE, R.K., NASH, W.G., and O'BRIEN, S.J. Chromosomal evolution of the Canidae. I. Species with high diploid numbers. **Cytogenet. Cell Genet.**, v.44, p.123-133, 1987.
- WEISS, S.J. Tissue destruction by neutrophils. **New England Journal of Medicine**, v.320, n.6, p.365-76, 1989
- WIKEL, S.K.; ALLEN, J.R. Acquired resistance to ticks. I. Passive transfer of resistance. **Immunology**, v.30, p.311-6, 1976.
- WIKEL, S.K.; ALLEN, J.R. Acquired resistance to ticks. II. Effects of cyclophosphamide on resistance. **Immunology**, Oxford, v.30, p.479-84, 1976.
- WIKEL, S.K. Immune responses to arthropods and their products. **Annu. Rev. Entomol.**, v.27, p.21-48, 1982.
- WIKEL, S.K.; ALLEN, J.R. **Immunological basis of host resistance to ticks**. In: Obenchain, F.D.; Galun, R. (ed.) Physiology of ticks. Oxford: Pergamon Press, p.169-96, 1982.
- WIKEL, S.K.; WHELEN, A.C. Ixodid-host immune interaction identification and characterization of relevant antigens and tick-induced host immunosuppression. **Vet. Parasitol.**, Amsterdam, v.20, p.149-74, 1986.
- WIKEL, S. K.; RAMACHANDRA, R.N.; BERGMAN, D. K. Tick-induced modulation of the host immune response. **Int. J. Parasitol.**, v.24, p.59-66, 1994.
- WIKEL, S.K. **Immunology of the tick-host interface**. In: The immunology of Host-ectoparasitic arthropod relationships, S.K. Wikel (ed.), p. 204–231. Cab International, UK, 1996.
- WIKEL S.K. Host Immunity to ticks. **Annu Rev. Entomol.**, v.41, p.1-22, 1996.
- 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*. **Z. Parasitenkd.**, Berlin, v.59, p.87-93, 1979.
- WILLADSEN P. Immunity to ticks. **Adv. Parasitol.**, v.18, p.293-313, 1980.

WILLADSEN, P.; RIDING, G. A.; MCKENNA, R. V.; KEMP, D. H.; TELLAM, R.L.; NIELSEN, J. N., *et al*, Immunologic control of a parasitic arthropod. Identification of a protective antigen from *Boophilus microplus*. **J. Immunol.**, v.143, n.4, p.1346-1351, 1989.

WILLADSEN, P; MCKENNA, R.V., Vaccination with “concealed” antigens: myth or reality. **Parasite Immunology**, v.13, p. 605–609, 1991.

ZIMEN, E., **The wolf. His place in the natural world**. Souvenir Press, London, 373 pp., 1981.

APÊNDICES

Tabela 1. Dados coletados referentes aos parâmetros biológicos do *Rhipicephalus sanguineus*, linhagem Jaboticabal, durante a primeira, segunda e terceira infestações, Jaboticabal – SP, 2012.

Infestação	Animal	Fêmea ingurgitada	PFI (mg)	PMO (mg)	Ping (dias)	PPP (dias)	% Eclo	% IECO	% Rec
1 ^a inf	1b	1	217	6	6	6	0	2,76	20
		2	224	139	7	6	32,5	62,05	
	2b	1	185	119	7	6	99	64,32	70
		2	238	147	7	6	98,5	61,76	
		3	161	106	7	6	98,5	65,84	
		4	140	93	7	5	97,5	66,43	
		5	203	135	8	5	98,5	66,50	
		6	116	73	8	7	96,5	62,93	
		7	55	-	12	-	-	-	
	3b	1	167	106	9	4	95	63,47	40
		2	216	121	9	7	70	56,02	
		3	191	136	10	4	50	71,20	
		4	130	77	10	4	98	59,23	
	4b	1	206	134	7	7	99,5	65,05	100
		2	183	113	7	6	30	61,75	
		3	265	182	7	5	97	68,68	
		4	232	154	8	5	95	66,38	
		5	255	34	8	14	4	13,33	
		6	46	9	8	8	40	19,56	
		7	130	-	10	-	-	-	
		8	225	137	9	5	50	60,89	
		9	227	141	10	4	30	62,11	
		10	63	-	13	-	-	-	
	5b	1	37	3	14	7	0	8,11	60
		2	80	38	14	6	98	47,5	
		3	99	46	17	6	98	46,46	
		4	55	22	17	6	60	40	
		5	81	27	17	6	55	33,33	
6		84	42	19	4	99	50		
2 ^a inf	1b	1	100	52	14	5	75	52	70

		2	97	48	14	5	97	49,48	
		3	113	54	14	5	96	47,79	
		4	97	42	14	5	90	43,30	
		5	106	49	14	6	92	46,23	
		6	103	55	14	5	99	53,40	
		7	77	38	16	4	45	49,35	
<hr/>									
	2b	1	85	41	14	5	97	48,23	70
		2	96	48	14	5	30	50	
		3	110	59	14	5	55	53,64	
		4	92	46	14	5	90	50	
		5	69	30	14	6	80	43,48	
		6	118	64	16	5	50	54,24	
		7	81	-	17	-	-	-	
<hr/>									
	3b	1	126	34	14	9	10	26,98	70
		2	138	23	15	5	45	16,67	
		3	142	78	16	5	85	54,93	
		4	83	36	16	4	90	43,37	
		5	79	37	17	6	10	46,83	
		6	80	31	18	5	80	38,75	
		7	34	-	18	-	-	-	
<hr/>									
	4b	1	117	-	13	-	-	-	70
		2	130	-	13	-	-	-	
		3	105	27	13	11	10	25,71	
		4	110	-	13	-	-	-	
		5	87	-	13	-	-	-	
		6	138	70	17	5	30	50,72	
		7	148	74	17	7	5	50	
<hr/>									
	5b	1	242	129	7	6	100	53,30	80
		2	150	-	7	-	-	-	
		3	369	-	7	-	-	-	
		4	242	138	7	6	99	57,02	
		5	334	-	7	-	-	-	
		6	224	117	7	6	100	52,23	
		7	377	-	7	-	-	-	
		8	147	-	12	-	-	-	
<hr/>									
3^a inf	1b	1	306	160	6	6	98,5	52,29	70
		2	282	168	6	6	3,5	59,57	
		3	214	117	6	6	55	54,67	
		4	135	61	6	7	88	45,18	
		5	275	155	6	6	45	56,36	

	6	294	161	6	6	90,5	54,76	
	7	287	122	7	5	60	42,51	
2b	1	188	-	6	-	-	-	60
	2	361	208	6	5	85	57,62	
	3	292	-	6	-	-	-	
	4	351	108	6	7	60,5	30,77	
	5	319	-	7	-	-	-	
	6	341	200	8	5	100	58,65	
3b	1	320	104	6	7	80	32,5	80
	2	304	177	6	6	85	58,22	
	3	262	143	6	6	93,5	54,58	
	4	217	116	6	6	95	53,46	
	5	342	184	6	6	0	53,80	
	6	310	167	6	6	0	53,87	
	7	349	146	6	6	98	41,83	
	8	247	137	7	5	99	55,46	
	9	225	123	7	5	45	54,67	
4b	1	417	100	7	6	90	23,98	100
	2	348	71	7	7	0	20,40	
	3	352	-	7	-	-	-	
	4	334	-	7	-	-	-	
	5	366	109	7	6	88	29,78	
	6	385	-	8	-	-	-	
	7	315	26	8	7	50	8,25	
	8	276	53	8	5	50	19,20	
	9	233	136	8	4	99	58,37	
	10	318	11	9	4	-	3,46	
5b	1	206	-	8	-	-	-	50
	2	396	119	8	7	0	30,05	
	3	399	-	8	-	-	-	
	4	139	28	10	6	0	20,14	
	5	161	-	10	-	-	-	

PFI = peso da fêmea ingurgitada; **PMO** = peso da massa de ovos; **Ping** = período de ingurgitamento; **PPP** = período de pré-postura; **% ECLO** = taxa de eclosão de larvas; **% Rec** = taxa de recuperação; **% IECO** = taxa de conversão do peso da fêmea ingurgitada em massa de ovos.

Tabela 2. Dados coletados referentes aos parâmetros biológicos do *Rhipcephalus sanguineus*, linhagem Rafaela, durante a primeira, segunda e terceira infestações, Jaboticabal – SP, 2012.

Infestação	Animal	Fêmea ingurgitada	PFI (mg)	PMO (mg)	Ping (dias)	PPP (dias)	% Eclo	% IECO	% Rec	
1ª inf	1a	1	164	-	9	-	-	-	10	
		2a	1	51	-	8	-	-	40	
			2	102	-	8	-	-	-	
			3	241	-	8	-	-	-	
			4	205	-	9	-	-	-	
		3a	1	106	-	7	-	-	-	90
			2	152	-	8	-	-	-	
			3	106	43	9	5	0	40,57	
			4	227	17	9	5	50	7,49	
			5	197	-	12	-	-	-	
			6	159	-	12	-	-	-	
			7	201	-	12	-	-	-	
			8	224	3	14	9	40	1,34	
			9	179	-	14	-	-	-	
	4a		1	230	-	8	-	-	-	70
			2	176	-	8	-	-	-	
			3	62	-	8	-	-	-	
			4	116	-	11	-	-	-	
			5	140	-	11	-	-	-	
			6	236	-	12	-	-	-	
			7	77	-	12	-	-	-	
5a		1	120	64	13	7	70	53,33	30	
		2	95	36	14	7	10	37,89		
		3	80	22	14	7	90	27,5		
2ª inf	1a	1	79	-	12	-	-	-	20	
		2	58	-	13	-	-	-		
	2a		1	83	-	13	-	-	-	50
			2	87	-	13	-	-	-	
			3	111	-	13	-	-	-	
			4	115	-	14	-	-	-	
			5	54	-	14	-	-	-	
	3a		1	110	-	12	-	-	-	30
			2	87	-	13	-	-	-	

		3	31	-	14	-	-	-	
	4a	1	116	-	12	-	-	-	20
		2	76	-	13	-	-	-	
	5a	1	294	167	7	4	90	56,80	80
		2	202	65	8	6	88,5	32,18	
		3	257	155	8	5	0	60,31	
		4	179	104	8	4	93	58,10	
		5	244	-	8	-	-	-	
		6	249	-	12	-	-	-	
		7	196	-	12	-	-	-	
		8	227	117	13	6	92	51,54	
3^a inf	1a	1	238	-	7	-	-	-	80
		2	214	-	7	-	-	-	
		3	179	-	7	-	-	-	
		4	133	-	7	-	-	-	
		5	267	-	7	-	-	-	
		6	154	-	7	-	-	-	
		7	159	-	7	-	-	-	
		8	181	-	8	-	-	-	
	2a	1	246	149	7	5	93	60,57	40
		2	191	93	7	5	99	48,69	
		3	257	157	9	4	98	61,09	
		4	226	-	12				
	3a	1	92	-	7	-			30
		2	276	12	7	6	45	4,35	
		3	203	-	7	-			
	4a	1	255	156	7	5	97	61,18	90
		2	169	-	7	-	-	-	
		3	248	146	7	6	92,5	58,87	
		4	234	140	7	4	93	59,83	
		5	271	165	8	4	70	60,88	
		6	342	214	8	3	50,5	62,57	
		7	217	-	8	-	-	-	
		8	258	159	9	3	100	61,63	
		9	196	110	9	4	30	56,12	
	5a	1	145	-	8	-	-	-	40
		2	217	118	8	6	94	54,38	
		3	99	15	12	7	0	15,15	

4 77 - 12 - - -

PFI = peso da fêmea ingurgitada; **PMO** = peso da massa de ovos; **Ping** = período de ingurgitamento; **PPP** = período de pré-postura; % **ECLO** = taxa de eclosão de larvas; % **Rec** = taxa de recuperação; % **IECO** = taxa de conversão do peso da fêmea ingurgitada em massa de ovos

Tabela 3: Contagem total das células da área de fixação do carrapato *R. sanguineus*, linhagem Jaboticabal, em cães durante a primeira e terceira infestações, Jaboticabal – SP, 2012.

Grupo 1	tempo	neutrófilos	mononucleares	mastócitos	eosinófilos	Total céls/mm ²
pele normal	0	0	37	5	0	42
1ª infestação	24h	16	53	16	0	85
	48h	69	37	21	0	127
	72h	299	101	16	0	416
	144h	235	128	43	0	406
	3ª infestação	24h	85	272	32	0
3ª infestação	48h	240	213	16	0	469
	72h	299	272	16	181	768
	144h	75	64	16	0	155

Tabela 4: Contagem total das células da área de fixação do carrapato *R. sanguineus*, linhagem Rafaela, em cães durante a primeira e terceira infestações, Jaboticabal – SP, 2012.

Grupo 2	tempo	neutrófilos	mononucleares	mastócitos	eosinófilos	Total cél/mm ²
pele normal	0	5	32	11	0	48
1 ^a infestação	24h	16	75	64	0	155
	48h	379	357	80	0	816
	72h	37	27	16	0	80
	144h	37	16	11	0	64
	3 ^a infestação	24h	69	283	11	0
3 ^a infestação	48h	475	443	27	64	1009
	72h	443	368	43	0	854
	144h	405	368	27	75	875

Tabela 5: Detecção individual de anticorpos anti-*Rhipicephalus sanguineus*, linhagens Jaboticabal (G1) e Rafaela (G2), de cães domésticos repetidamente infestados. Resultados expressos em densidade ótica, Jaboticabal – SP, 2012.

Animal	Pré-inf	Pós 1 ^a inf	Pós 2 ^a inf	Pós 3 ^a inf
G1				
1	0,192		0,974	0,771
2	0,305	0,301	0,342	0,376
3	0,223	0,269	0,567	0,545
4		0,512	1,360	1,253
G2				
1	0,229	0,275	0,359	0,321
2		0,307	0,685	0,495
3	0,235	0,327	0,410	0,388
4	0,266	0,267		0,376

- **Soluções necessárias para realização do teste ELISA:**

1. Solução PBS-Tween 20 pH 7,4 – 0,01M

Na₂HPO₄ (0,2M)40,5 ml (28,39g anidro)

Na₂H₂PO₄ (0,2M).....4,4 ml (27,60g)

NaCl (1,4M)..... 100 ml (81,82g para 1 L)

- Completar com água destilada para 1000 ml;
- Colocar 0,5 ml Tween 20;
- Verificar o pH e completar o volume;

2. Tampão Carbonato – Bicarbonato de sódio pH 9,6

Na₂CO₃.....0,3975 g

NaHCO₃.....0,7325 g

NaN₃ a 10%.....0,5 ml

H₂O destilada q.s.p.....250 ml

- Acertar o pH com ácido cítrico 1N

3. Tampão Dietanolamina (pH 9,8)

Dietanolamina.....	20 ml
MgCl ₂ anidro (ou MgCl ₂ x 6H ₂ O – 0,04g).....	0,02 g
H ₂ O deionizada ou destilada.....	200 ml

- Acertar o pH com HCl 5N e colocar 0,2 ml de azida sódica 10%

- **Formalina Tamponada pH 7,4:**

Formaldeído 40%.....	500 mL
Na ₂ HPO ₄	32,5 g
NaH ₂ PO ₄	20 g
H ₂ O destilada.....	4.500 mL