

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

**COMPONENTE CELULAR INFLAMATÓRIO NO LOCAL DA
FIXAÇÃO DE CARRAPATOS ADULTOS *Rhipicephalus*
sanguineus LATREILLE, 1806 EM CÃES IMUNIZADOS
COM O ANTÍGENO BM86**

Bruna Nucci Furlan
Médica Veterinária

**Jaboticabal - São Paulo - Brasil
Novembro de 2011**

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

**COMPONENTE CELULAR INFLAMATÓRIO NO LOCAL DA
FIXAÇÃO DE CARRAPATOS ADULTOS *Rhipicephalus*
sanguineus LATREILLE, 1806 EM CÃES IMUNIZADOS
COM O ANTÍGENO BM86**

Bruna Nucci Furlan

Orientador: Prof. Dr. Gervásio Henrique Bechara

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, câmpus de Jaboticabal, como requisito para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária (Patologia Animal).

**Jaboticabal - São Paulo - Brasil
Novembro de 2011**

F985c Furlan, Bruna Nucci
Componente celular inflamatório no local da fixação de carrapatos adultos *Rhipicephalus sanguineus* LATREILLE, 1806 em cães imunizados com o antígeno Bm86 / Bruna Nucci Furlan. -- Jaboticabal, 2011
x, 64 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2011
Orientador: Gervásio Henrique Bechara
Banca examinadora: Rosimeri de Oliveira Vasconcelos e Pablo Henrique Nunes
Bibliografia

1. Histopatologia. 2. *Rhipicephalus sanguineus*. 3. Bm86 . I.
Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616.995.42:636.7

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE JABOTICABAL

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: COMPONENTE CELULAR INFLAMATÓRIO NO LOCAL DA FIXAÇÃO DE CARRAPATOS ADULTOS *Rhipicephalus sanguineus* LATREILLE, 1806 EM CÃES IMUNIZADOS COM O ANTÍGENO BM86

AUTORA: BRUNA NUCCI FURLAN

ORIENTADOR: Prof. Dr. GERVASIO HENRIQUE BECHARA

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. GILSON PEREIRA DE OLIVEIRA

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. ROSEMERI DE OLIVEIRA VASCONCELOS
Departamento de Patologia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Prof. Dr. PABLO HENRIQUE NUNES
Departamento de Biologia / Instituto de Biociências - UNESP / Rio Claro/SP

Data da realização: 25 de novembro de 2011.

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

BRUNA NUCCI FURLAN - nascida em 19 de setembro de 1984, na cidade de Jaboticabal, São Paulo, é Zootecnista, graduada pela Universidade Estadual Paulista (UNESP), câmpus de Jaboticabal - SP, em 2006 e Médica Veterinária, graduada pelo Centro Universitário Moura Lacerda, câmpus de Ribeirão Preto - SP, em 2008. Iniciou em Agosto de 2009 o mestrado no programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, da Universidade Estadual Paulista, câmpus de Jaboticabal, sob orientação do Prof. Dr. Gervásio Henrique Bechara, com bolsa do CNPq. Atualmente possui resumos apresentados em congressos internacionais e nacionais.

“Se um homem tem um talento e não tem capacidade de usá-lo, ele fracassou. Se ele tem um talento e usa somente a metade deste, ele fracassou parcialmente. Se ele tem um talento e de certa forma aprende a usá-lo em sua totalidade, ele triunfou gloriosamente e obteve uma satisfação e um triunfo que poucos homens conhecerão.”

Thomas Wolfe

Dedicatória:

À minha avó Lídia Borelli Nucci (in memoriam).

AGRADECIMENTOS:

Agradeço à Deus, pela vida, por cuidar sempre de mim, me guiando pelo caminho.

À Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Campus de Jaboticabal, pela oportunidade de realização de mais um curso, sendo desta vez o de pós-graduação, Mestrado em Medicina Veterinária.

Aos meus pais e aos meus irmãos.

Ao Professor Dr. Gervásio Henrique Bechara por toda a sabedoria e ensinamentos em minha formação.

Aos amigos (TODOS).

Obrigado pela ajuda, pelo companheirismo, pela amizade.....por Tudo!

“O tempo passa

E com ele caminhamos todos juntos

Sem parar

Nossos passos pelo chão vão ficar”

SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	vi
ABREVIATURAS.....	viii
RESUMO.....	ix
SUMMARY.....	x
I. INTRODUÇÃO e REVISÃO DA LITERATURA.....	1
1.1. <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	1
1.2. Relação carrapato-hospedeiro. Resposta imune do hospedeiro e mecanismos de evasão do carrapato.....	2
1.3. O componente celular inflamatório no local de fixação de carrapatos.....	8
1.4. Controle de carrapatos.....	9
1.5. Antígeno Bm86.....	10
II. OBJETIVOS.....	12
2.1. Objetivos Gerais.....	12
2.2. Objetivos Específicos.....	12
III. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
3.1. Hospedeiro.....	13
3.2. Carrapato <i>R. sanguineus</i>	13
3.3. Imunização e infestação desafio.....	14
3.4. Histopatologia.....	14
3.5. Contagem de células.....	15
3.6. Análise estatística.....	15
IV. RESULTADOS.....	16
4.1. Histopatologia do local de fixação dos carrapatos.....	16
4.2. Contagem de células Inflamatórias.....	25
V. DISCUSSÃO.....	36

VI. CONCLUSÕES.....	43
VII. REFERÊNCIAS.....	44
VIII. APÊNDICE.....	58

ABREVIATURAS

μg	Microgramas
μm	Micrometros
APCs	Células Apresentadoras de Antígenos (sigla em Inglês)
Bm 86	Antígeno oculto presente no intestino de <i>R. (B.) microplus</i>
IFN- γ	Interferon-gama
IgE	Imunoglobulina E
IL	Interleucina
kDa	Kilodalton = 1000 Daltons
M	Molar
pH	Potencial hidrogeniônico
PF	Pós-fixação
rBm86	Antígeno recombinante de <i>R. (B.) microplus</i>
TGF- β	Fator de transformação de crescimento β (sigla em inglês)
Th	Linfócitos T auxiliares

COMPONENTE CELULAR INFLAMATÓRIO NO LOCAL DA FIXAÇÃO DE CARRAPATOS ADULTOS *RHIPICEPHALUS SANGUINEUS* LATREILLE, 1806 EM CÃES IMUNIZADOS COM O ANTÍGENO BM86

Resumo- A imunização dos hospedeiros contra carrapatos tem sido considerada como uma alternativa promissora. Vacinas contendo o antígeno Bm86 (Gavac[®], TickGard[®]) foram desenvolvidas originalmente para controlar infestações de *Rhipicephalus Boophilus microplus*. Como recentes estudos filogenéticos mostraram que o gênero *Rhipicephalus* inclui todas as cinco espécies de *Boophilus*, o papel protetor do antígeno Bm86 em cães imunizados e desafiados com carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* foi testado previamente neste laboratório. Dando continuidade, o presente estudo teve como objetivo descrever o componente celular inflamatório no local de fixação do carrapato em cães imunizados com o antígeno Bm86 e desafiados com carrapatos adultos *R. sanguineus*. Para tanto, cães SRD (n=8), foram distribuídos em dois grupos (não vacinado e vacinado) e receberam duas doses de 50 µg do antígeno Bm86 (Hebercan[®]) ou placebo, com 21 dias de intervalo. Cada animal foi desafiado com 55 carrapatos adultos 15 dias após a última dose e biopsias da lesão de fixação dos carrapatos foram coletadas as 48, 96, 144 e 192 horas após sua fixação. Os fragmentos foram então processados histologicamente e as secções coradas com hematoxilina-eosina e Giemsa. Nos animais vacinados predominaram neutrófilos, eosinófilos e mastócitos na 48^a hora PF, enquanto que nos não vacinados houve predomínio de eosinófilos, neutrófilos e linfócitos. Com o decorrer da infestação, observou-se um infiltrado celular mais intenso a partir de 96h PF, atingindo as camadas mais profundas da derme, sendo composto principalmente por neutrófilos e linfócitos nos vacinados, e eosinófilos, linfócitos e neutrófilos nos não vacinados. Concluiu-se que o antígeno Bm86 administrado em cães interfere na resposta inflamatória induzida por *R. sanguineus*.

Palavras-Chave: *Rhipicephalus sanguineus*, cão, antígeno Bm86, células inflamatórias

**INFLAMMATORY CELLS AT THE ATTACHMENT SITE OF ADULT TICKS
RHIPICEPHALUS SANGUINEUS LATREILLE, 1806 IN DOGS IMMUNIZED BY THE
BM86 ANTIGEN**

Summary - Immunization of hosts against ticks has long been considered as a promising alternative. Vaccines containing the Bm86 antigen (e.g. Gavac[®], Heber-Biotec, Cuba) have been developed to control *Rhipicephalus Boophilus microplus* infestations. As recent molecular phylogeny studies showed that the *Rhipicephalus* genus includes all five *Boophilus* species, the protector role of Bm86 antigen in immunized dogs challenged with adult *Rhipicephalus sanguineus* was investigated first at this lab. This study aimed to evaluate the inflammatory cells at the attachment site of ticks in dogs immunized by the Bm86 antigen against infestations of adults of *Rhipicephalus sanguineus* ticks. Mongrel dogs (n=8), were divided into two groups (non-vaccinated and vaccinated). It was given twice 50 µg of Bm86 antigen (Gavac[®], Heber-Biotec, Cuba) or placebo, at 21 days interval. Each animal was challenged with 55 adult ticks 15 days after the last dose. Biopsies of tick feeding lesions taken 48, 96, 144 e 192 hours post-attachment (PA) were processed through routine histology and sections 4µm thickness stained with H.E. and Giemsa for general features and cell counts, respectively. There was an inflamed dermis including an inflammatory cell infiltrate constituted overwhelmingly by neutrophils, eosinophils and mast cells in vaccinated dogs at first and eosinophils, neutrophils and lymphocytes in non-vaccinated hosts. After 96h PA, a dense and diffuse cell infiltrate reached into deep dermis, constituted overwhelmingly by neutrophils and lymphocytes in vaccinated dogs and eosinophils, lymphocytes and neutrophils in non-vaccinated dogs. It's been concluded that antigen Bm86 administered to dogs interferes on the *Rhipicephalus sanguineus* induced inflammatory cell influx.

Keywords: *Rhipicephalus sanguineus*, dogs, Bm86 antigen, inflammatory cells

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

Os carrapatos são acarinos pertencentes à ordem Ixodida. Os carrapatos mais importantes de cães no Brasil são o *Rhipicephalus sanguineus* e carrapatos do gênero *Amblyomma* (LABRUNA & PEREIRA, 2001).

Os carrapatos podem causar desconforto pela picada que produz irritação local, podem causar anemia por perda de sangue, inocular toxinas e transmitir vírus, riquetsias, bactérias e protozoários patogênicos. Algumas espécies do gênero *Amblyomma* têm sido incriminadas como vetores da febre maculosa brasileira em seres humanos (LABRUNA & PEREIRA, 2001). O *R. sanguineus* transmite para o cão a *Babesia canis*, *Ehrlichia canis*, *Hepatozoon canis* e *Bartonella vinsonii berkhoffii* (GREENE, 1998). A erliquiose monocítica canina (UNVER et al., 2001) e a bartonelose canina (ROUX et al., 2000) já foram identificadas em seres humanos. Pelo menos um caso de babesiose humana causado por *B. canis* já foi relatado (MARSAUDON et al., 1995). Além disso, o *R. sanguineus* também pode transmitir para o homem a *Rickettsia conorii* (RADULOVIC et al., 1994).

1.1. *Rhipicephalus sanguineus*

O gênero *Rhipicephalus* surgiu mais recentemente, provavelmente durante a era Cenozóica, quando houve uma proliferação de mamíferos e aves. A maioria dos membros deste gênero continua a parasitar roedores nas suas formas imaturas e artiodáctilos quando adultos (CUPP, 1991).

Rhipicephalus sanguineus, comumente conhecido como carrapato-marrom de cão, é um carrapato de três hospedeiros que se alimenta primeiramente em cães e ocasionalmente em outros hospedeiros, incluindo humanos (DANTAS-TORRES et al., 2006). Estes carrapatos são amplamente distribuídos pelo mundo e são vetores de patógenos, como *Babesia canis*, *Ehrlichia canis* e *Rickettsia conorii*. O uso indiscriminado de acaricidas é um problema emergente em todo o mundo e tem levado à seleção de cepas de carrapatos resistentes (DANTAS-TORRES, 2008).

Os principais problemas econômicos decorrentes destas ectoparasitoses estão ligados diretamente à ação espoliativa sobre o hospedeiro, ou indiretamente, pela transmissão de outros patógenos, tais como: vírus, riquetsias, bactérias e protozoários, estando então envolvidos na transmissão de doenças entre animais selvagens e domésticos, pássaros e até o homem (HARWOOD e JAMES, 1979).

1.2. Relação carrapato-hospedeiro. Resposta imune do hospedeiro e mecanismos de evasão do carrapato

Os carrapatos são ectoparasitos hematófagos que acarretam grandes prejuízos à produção animal. Também causam danos à saúde humana e animal pela transmissão de agentes causadores de doenças. O principal método de controle desses parasitos é baseado no controle químico pelo uso de acaricidas. O controle imunológico surge como um método alternativo promissor, todavia para o sucesso desse controle, moléculas fundamentais na fisiologia do carrapato devem ser identificadas (BECHARA, comunicação pessoal).

Alguns carrapatos da família Ixodidae, como por exemplo, *Anocentor nitens*, se alimentam sobre os hospedeiros por períodos de mais de duas semanas, ativando as imunidades inata e adaptativa, como também respostas hemostáticas dos animais parasitados. Contudo, durante o curso da infestação, os carrapatos são hábeis em evadirem-se das defesas naturais dos hospedeiros (PARIZI et al., 2007).

Para realizarem seu comportamento hematófago, caracterizado por longos períodos de alimentação sobre o hospedeiro, os carrapatos tiveram que desenvolver mecanismos para modular muitos dos processos fisiológicos dos seus hospedeiros (DAIX et al., 2007), tais como, a vasoconstrição, a inflamação e a resposta imunológica (TITUS et al., 2006). Apenas uma pequena resposta inflamatória na pele é observada quando os carrapatos estão se alimentando em seus hospedeiros naturais. Esta resposta inflamatória deficiente deve-se a fatores imunomoduladores secretados pelos carrapatos durante sua alimentação no local da lesão (DAIX et al., 2007). Essa modulação do sistema imune possivelmente ocorre em decorrência de alterações na resposta imune mediada por linfócitos T (MEJRI e BROSSARD, 2007).

Para modular as defesas do hospedeiro, os carrapatos secretam substâncias vasodilatadoras e imunossupressoras que favorecem a sua alimentação. Com os efeitos de vasoconstrição, inflamação e da resposta imune prejudicados, os carrapatos conseguem se fixar facilmente, mantendo o sangue fluindo, sem a ocorrência de resposta fisiológica efetiva do hospedeiro para a eliminação do parasito. Consequentemente, patógenos têm sua transmissão facilitada durante o período em que o carrapato está se alimentando. Assim, certos patógenos podem utilizar a lesão na pele do hospedeiro, que está profundamente alterada pelos efeitos da saliva do carrapato, como porta de entrada e causando muitas vezes infecção (TITUS et al., 2006).

São relativamente recentes a identificação molecular e a caracterização de componentes da saliva dos carrapatos, com funções anticomplemento e anticoagulantes. Nos últimos anos, diversas proteínas vêm sendo descritas com essas atividades na saliva dos carrapatos, revelando um papel fundamental dessas moléculas na sobrevivência desses parasitos. Essa constatação tem sido reforçada em estudos que avaliam os fatores da saliva do carrapato (TITUS et al., 2006). O complemento é um dos primeiros elementos do sistema imunológico a ser ativado pelos carrapatos no momento do repasto sanguíneo no hospedeiro. A ativação desse sistema pode resultar em danos para o carrapato mediado pela resposta inflamatória do hospedeiro (TURNI et al., 2007).

Para se alimentarem, os parasitas hematófagos precisam bloquear os mecanismos de homeostasia do hospedeiro, produzindo substâncias antagonistas, que serão secretadas por meio da saliva. A atividade anticoagulante dos componentes da saliva dos carrapatos ainda não foi precisamente caracterizada. As pesquisas com essas substâncias têm revelado uma enorme variedade de funções anticoagulantes, estimulando o uso potencial dessas moléculas para terapêutica ou como ferramentas para estudo da fisiologia dos processos vasculares e hemostáticos (CIPRANDI et al., 2003).

A resposta imune dos hospedeiros aos ectoparasitas envolve vias efetoras como anticorpos, complemento e células (BROWN et al., 1982; BROWN e ASKENASE, 1982

e BROWN 1985) e vias regulatórias, que compreendem citocinas, células apresentadoras de antígenos (APCs) e linfócitos T (LAMOREAUX et al., 2000).

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

Entre os bovinos existem raças resistentes (*Bos taurus indicus*) e suscetíveis (*Bos taurus taurus*) ao parasita, sendo herdável o fenótipo da infestação (MELTZER, 1996; MATTIOLI, 1998). Segundo Gonzales (1975), tentou-se explicar tal característica pelo fato dos zebuínos possuírem mais glândulas sebáceas na pele, produzindo odores que afastariam o carrapato, bem como uma maior mobilidade geral do animal e elasticidade de sua pele, o que possivelmente faz com que se defenda melhor da infestação. Neste sentido, Veríssimo (1991) sugeriu que o sistema de alimentação da larva de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* depende de uma reação inflamatória que se inicia no momento da fixação da mesma. Os zebuínos apresentam uma reação inflamatória mais intensa que o gado europeu, levando-os a proceder uma autolimpeza via lambadura mais eficiente, o que contribuiria para um equilíbrio carrapato/hospedeiro, sendo a infestação mínima nestes animais.

Para conseguir se manter no hospedeiro, alimentando-se de seu sangue, os carrapatos, e outros artrópodes hematófagos desenvolveram sistemas também redundantes que envolvem um grande número de substâncias farmacologicamente ativas e relevantes (RIBEIRO, 1995).

Estudos sobre a saliva de diferentes espécies de artrópodes hematófagos mostram a diversidade de substâncias inoculadas no hospedeiro. Entre as moléculas descritas estão anticoagulantes como os inibidores de trombina (HORN et al., 2000); imunossupressores, como as prostaglandinas (RIBEIRO et al., 1985; INOKUMA et al.;

1994; BOWMAN et al.; 1995); ligantes de histamina (PAESEN et al., 2000); inibidores da via clássica do sistema complemento, como a calreticulina que se liga a C1q (SANDERS et al., 1999); inibidores da C3 convertase do complemento (VALENZUELA et al., 2000); inibidores de agregação plaquetária, como as apirases (RIBEIRO, 1995; WIKEL, 1996a); inibidoras de bradicinina (RIBEIRO e MATHER, 1998) e proteínas ligantes de imunoglobulinas (WANG et al., 1994), encontradas também na hemolinfa.

O conhecimento das moléculas envolvidas na indução de imunossupressão do hospedeiro pode ser extremamente importante na identificação de antígenos vacinais. Uma imunização estratégica seria aquela que induzisse a expressão completa de uma resposta imune eficaz, normalmente suprimida durante a alimentação do ácaro (WIKEL et al., 1994).

A fixação e desenvolvimento do carrapato induzem uma resposta imune complexa nos hospedeiros, envolvendo as APCs, linfócitos T, linfócitos B, anticorpos, citocinas, sistema complemento, basófilos, eosinófilos e uma variedade grande de moléculas bioativas (WIKEL, 1996a; BROSSARD e WIKEL, 1997).

Quando os carrapatos se fixam em animais não sensibilizados (primoinfecção) secretam cemento e outros materiais antigênicos (KAUFMAN, 1989). As células de Langerhans presentes na epiderme fagocitam e processam os materiais antigênicos apresentando-os em seguida aos linfócitos da pele e dos linfonodos drenantes (ALLEN, 1989). Os linfócitos T e B são ativados, com produção de citocinas e anticorpos, respectivamente. Por sua vez, o complexo antígeno-anticorpo ativa o sistema do complemento, que produz anafilatoxinas e é quimiotático para os basófilos. Em animais de laboratório, 40-60% dos leucócitos infiltrando locais de fixação de carrapatos até o 3º dia são neutrófilos (KAUFMAN, 1989). Um a dois dias depois, quando a maioria das larvas já estiver ingurgitada, o influxo de basófilos e eosinófilos aumenta significativamente (MONTEIRO e BECHARA, 2008). Em infestações subsequentes, os granulócitos aumentam até níveis muito elevados, quando comparados com a primeira infestação. Este aumento está relacionado com a presença de basófilos, que liberam mediadores vasoativos, como a histamina, que induz um aumento de permeabilidade vascular, desconforto local, irritação, edema e formação de vesículas na epiderme

(ALLEN, 1973; BROWN et al., 1984; GILL e WALKER, 1985; CASTRO e NEWSON, 1993).

Embora exista resistência na aceitação das vacinas antiectoparasitos, devido ao efeito mais lento que o de drogas convencionais, a aplicação de uma vacina eficaz oferece vantagens para o desenvolvimento sustentável, por ser ambientalmente segura e evitar a multiplicação de parasitas resistentes (CARVALHO, 2006).

CAVASSANI et al. (2005) demonstraram que a saliva de *R. sanguineus* é capaz de inibir a diferenciação e maturação de células dendríticas. Esses fatos podem ter como consequência a diminuição da apresentação de antígenos para células T e, conseqüentemente, a diminuição da ativação de células B e produção de anticorpo.

O estudo da interação de diferentes espécies de hospedeiro com carrapatos *R. sanguineus* é particularmente interessante, já que o hospedeiro natural (cão) e camundongos não desenvolvem resistência, nem mesmo após diversas infestações, enquanto que cobaias desenvolvem uma resistência bastante significativa já num segundo contato com o ácaro (THEIS e BUDWISER, 1974; SZABÓ et al., 1995a; FERREIRA e SILVA, 1998), constituindo-se assim um modelo de eleição de resistência adquirida a várias espécies de carrapatos. Entretanto, apesar do interesse e de pesquisas crescentes, os mecanismos eficazes de imunidade adquirida contra carrapatos são ainda pouco conhecidos. Em alguns casos, a resistência de hospedeiros a carrapatos foi associada à presença de um infiltrado rico em basófilos no local de fixação do carrapato (ALLEN, 1973; SZABÓ e BECHARA, 1999) e aumento do número dessas células na circulação sanguínea (BROWN e ASKENASE, 1982; SZABÓ et al., 2003). Ademais, observa-se em hospedeiros resistentes a carrapatos *R. sanguineus* e *R. (B.) microplus* como cobaias e zebuínos, respectivamente, mas não em hospedeiros suscetíveis como o cão doméstico e taurinos, o desenvolvimento de uma reação de hipersensibilidade tardia, além da imediata em resposta à injeção intradérmica de extrato de carrapato (SZABÓ e BECHARA, 1999, BECHARA et al., 2000). Ressalte-se que hospedeiros susceptíveis apresentam tão somente uma reação de hipersensibilidade do tipo imediata aos mesmos extratos.

Um aspecto interessante, é que a imunidade não é adquirida a todas as espécies de carrapato. Por exemplo, cães repetidamente infestados ou vacinados com extratos de carrapatos *R. sanguineus*, seguida de infestação-desafio, não desenvolvem resistência natural a infestações subseqüentes a essa espécie de carrapato (BECHARA et al., 1994; SZABÓ et al., 1995b). Estes desenvolvem apenas uma forte reação de hipersensibilidade imediata, enquanto que cobaias desenvolvem uma discreta reação imediata e forte reação de hipersensibilidade tardia (SZABÓ et al., 1995a; FERREIRA et al., 2003).

Todavia, cães imunizados com extrato de intestino de *R. sanguineus* mais adjuvante de Freund, desenvolvem uma resistência parcial ao mesmo carrapato (SZABÓ e BECHARA, 1997), sugerindo que a imunoestimulação celular promovida pelo adjuvante pode contribuir para o mecanismo de indução de resistência ao ácaro. Além disso, antígenos ocultos não participam da infestação natural, estando assim menos sujeitos aos mecanismos imunomodulatórios promovidos pelos carrapatos.

Segundo Szabó et al. (1995b) e Ferreira et al. (2003), o desenvolvimento de reação tardia num teste de hipersensibilidade cutânea a antígenos de carrapatos em cobaias (hospedeiros resistentes) sugere o envolvimento do braço celular (Th1) da resposta imune no processo de aquisição de resistência. Por outro lado, resultados de estudos sobre modulação de citocinas por carrapatos têm proposto que estes induzem preferencialmente um padrão de citocinas do tipo Th2 quando infestam animais suscetíveis (GANAPAMO et al., 1995 e 1996; FERREIRA e SILVA, 1998 e 1999). De fato, demonstrou-se que células dos linfonodos de camundongos C3H/HeJ sucessivamente infestados por carrapatos *R. sanguineus* produzem elevadas concentrações de IL-4, IL-10 e TGF- β , em detrimento de IL-2, IFN- γ e IL-12, quando comparadas com a síntese de citocinas em linfonodos de camundongos não infestados. Considerando que esses camundongos não desenvolvem resistência a carrapatos (FERREIRA e SILVA, 1998), é plausível argumentar que essa condição pode comprometer o desenvolvimento de uma resposta protetora anti-carrapatos. A resposta Th2 desenvolvida por camundongos infestados com carrapatos pode ser vantajosa para os ácaros, considerando que citocinas associadas a um padrão Th2 tem

sido atribuídas a resposta antiinflamatória (ABBAS e LICHTMAN, 2005). A inflamação no local de fixação dos carrapatos pode prejudicar o ingurgitamento dos ácaros (RIBEIRO et al., 1985).

O conhecimento gerado com estes estudos permite entender melhor os mecanismos envolvidos na relação parasito-hospedeiro e contribui para o desenvolvimento de medidas de controle a ectoparasitos, bem como, de patógenos por eles transmitidos.

1.3. O componente celular inflamatório no local de fixação de carrapatos

Ao descrever a reação inflamatória na pele de cães e camundongos C3H/HeJ (hospedeiros suscetíveis) re-infestados com carrapatos *R. sanguineus*, observou-se que esta é composta principalmente por neutrófilos e eosinófilos, enquanto que a resposta de cobaias reinfestadas (hospedeiros resistentes) com carrapatos é composta principalmente por células mononucleares, eosinófilos e basófilos (SZABÓ e BECHARA, 1999; FERREIRA et al., 2003).

Basófilos são granulócitos circulantes que aparecem nos tecidos de forma transiente, durante determinadas reações imunológicas. Estas células têm sido freqüentemente associadas a reações cutâneas em animais resistentes a carrapatos (BROSSARD, 1982). Sua participação nesta situação foi descrita inicialmente por ALLEN (1973). A não caracterização de basófilos no local de fixação dos carrapatos se deve muitas vezes à dificuldade em se demonstrar tais células com técnicas de coloração rotineiras (ALLEN et al., 1977).

Cobaias desenvolvem resistência a carrapatos após uma única infestação (STEEVES e ALLEN, 1990). Durante infestações secundárias, cobaias resistentes a carrapatos apresentam um infiltrado cutâneo basofílico proeminente, e muitas das células parecem estar degranulando (McLAREN et al., 1983). Nestas reações, que aparentemente incorporam elementos das reações tipo imediata e retardada, basófilos passam por degranulação anafilática nos locais de fixação de carrapatos.

O papel exato do basófilo na rejeição a carrapatos não é conhecido, mas acredita-se que participem de reações anafiláticas locais, liberando mediadores e

prejudicando a salivação e alimentação do carrapato (KEMP e BOURNE, 1980; PAINE et al., 1983). A participação de basófilos na reação a carrapatos foi também observada em outros vertebrados como bovinos europeus (ALLEN et al., 1977; BROWN et al., 1984).

Basófilos, raramente observados em locais de fixação de *R. (B.) microplus* em bovinos taurinos (SCHLEGER et al., 1976), constituíram apenas uma pequena proporção do infiltrado em locais de fixação de *Hyalomma. anatolicum anatolicum* em coelhos (GILL e WALKER, 1985) e praticamente inexistiram na reação do cão doméstico ao carrapato *R. sanguineus* (SZABÓ et al., 1995b).

1.4. Controle de carrapatos

Os métodos tradicionais de controle de carrapato incluindo, basicamente, o uso de drogas químicas, apresentam como desvantagens o acúmulo de resíduos nos alimentos e no meio ambiente e o desenvolvimento de cepas resistentes a estes compostos (WIKEL, 1988; WILLADSEN e KEMP, 1988; KAY e KEMP, 1994). A utilização de drogas químicas começou no início do século passado com o emprego do arsênico, porém no final da década de 30, começaram a surgir cepas resistentes a esse princípio ativo. Sempre que novos princípios ativos foram lançados no mercado surgiram cepas resistentes dentro de um período médio de uma década, associadas principalmente ao mau emprego dos compostos químicos. Por esse motivo e pelos inconvenientes da contaminação dos alimentos, do homem e do ambiente, a procura de novas formas de controle tem sido intensificada (OLIVEIRA et al., 2009).

O cão é considerado o hospedeiro natural do *R. sanguineus* e não é capaz de desenvolver resistência, mesmo após repetidas infestações (CHABAUD, 1950; GARIN e GRABAREV, 1972; SZABÓ et al., 1995; SZABÓ e BECHARA, 1997).

A imunização dos hospedeiros contra carrapatos tem sido considerada como uma alternativa promissora contra os tratamentos carrapaticidas caros e trabalhosos.

Extrato intestinal de carrapato parece induzir uma imunidade mais eficiente do que o extrato de glândula salivar, talvez por serem os antígenos intestinais mais facilmente alcançados pelas células do hospedeiro, anticorpos e outros mecanismos

efetores durante a alimentação de carrapatos. Além disso, o extrato intestinal de carrapato inclui antígenos ocultos, como o antígeno Bm 86 descrito no carrapato *Boophilus microplus* por Willadsen et al. (1989).

1.5. Antígeno Bm86

A aplicação de vacina anti-carrapatos tem demonstrado ser uma das alternativas mais promissoras no controle de carrapato se comparada com acaricidas químicos, que apresentam uma série de inconvenientes (IMAMURA et al., 2005). O sucesso dessa estratégia depende da clonagem e caracterização das moléculas do carrapato que estão envolvidas em suas funções fisiológicas básicas. Até agora, em pesquisas mostrou-se a presença de um pequeno número de moléculas bem caracterizadas, com a capacidade de estimular uma resposta imune contra carrapatos, entre as quais Bm86 é a mais efetiva (WILLADSEN et al, 2011).

As vacinas existentes contra carrapatos e disponíveis comercialmente como Gavac[®] (de origem cubana) e TickGARD[®] (de origem australiana), têm sido empregadas com sucesso no controle de infestações de carrapatos *R. (B.) microplus* e de patógenos por eles transmitidos na América do Sul (BOUÉ et al., 1999).

Estas vacinas são baseadas em uma proteína recombinante, a Bm86, um antígeno de membrana intestinal do carrapato *R. (B.) microplus*, que permanece inacessível (antígeno oculto) ao sistema imune do bovino durante infestações naturais. Os anticorpos específicos contra este antígeno ou proteína recombinante obtidos dos animais vacinados, junto com outros componentes do plasma como o complemento, são ingeridos pelo carrapato junto com o sangue, possibilitando que os anticorpos específicos formados, se unam ao antígeno (proteína intestinal) provocando um dano intestinal e passagem (*leakage*) do sangue dos bovinos para a hemolinfa do carrapato. O resultado fundamental da vacinação não é, portanto, a morte direta dos carrapatos numa só ingestão, mas o controle progressivo do número de carrapatos em gerações sucessivas mediante a redução da capacidade reprodutiva do *R. (B.) microplus* (KEMP et al., 1989).

Estudos microscópicos do trato digestivo de fêmeas de *B. microplus* alimentadas em bovinos imunizados com a rBm86 e coletadas 30, 40, 50, 60 e 70 dias pós vacinação revelaram destruição de células digestivas, das secretoras (S₁ e S₂) e, em casos mais severos, das células basofílicas, permanecendo apenas a lâmina basal. Ocorreram ainda erosão e ruptura da parede intestinal e extravasamento do conteúdo digestivo para a cavidade celomática (HERNANDEZ et al., 1999). Estas lesões incompatibilizam o processo de oogênese neste carrapato e interrompe seu ciclo vital. O motivo das larvas não serem afetadas pelos anticorpos anti-rBm 86 deve-se ao fato de os componentes celulares do intestino deste instar serem constituídos apenas por células basais (BALASHOV, 1972; AGBEDE & KEMP, 1985). Também é conhecida a existência de enzimas inibidoras da proteólise, presentes, apenas, no estágio larval (WILLADSEN et al., 1989).

Assim, o controle imunológico do *R. (B.) microplus* tem sido alcançado pela vacinação com o antígeno Bm86 (KEMP et al., 1989) ou com o antígeno recombinante obtido de células transformadas de *Escherichia coli* (RAND et al., 1989), *Aspergillus nidulans* ou *A. niger* (TURNBULL et al., 1990), ou *Pichia pastoris* (RODRIGUEZ et al., 1994 e 1995b).

Bm86 é uma molécula de aproximadamente 86 kDa (RAND et al., 1989) e está sendo usada com sucesso em países da América do Sul e Austrália em programas de controle de *R. (B.) microplus*.

Em Cuba, foi demonstrado que em condições de campo a vacina Gavac[®] (Heber Biotec S.A., Havana, Cuba), que contém o antígeno recombinante Bm86 (rBm86), derivado do intestino do carrapato, obtido de células transformadas de *P. pastoris*, pode efetivamente controlar populações de *R. (B.) microplus* em gado leiteiro artificialmente infestado com a cepa cubana Camcord (RODRIGUEZ et al., 1995b).

Com base em recentes estudos filogenéticos que demonstraram que o gênero *Rhipicephalus* inclui todas as cinco espécies de *Boophilus*, Perez-Perez (2009) e Perez-Perez et al. (2010), ao investigar o papel protetor do antígeno Bm86 em cães imunizados e desafiados com carrapatos *Rhipicephalus sanguineus*, demonstraram uma eficácia parcial do recombinante. Em resumo, carrapatos alimentados em animais

vacinados apresentaram redução no peso de ingurgitamento de fêmeas, da massa de ovos e na taxa de eficiência de conversão para ovos. Além disso, animais vacinados após a segunda dose de Bm86 apresentaram um aumento significativo no título de anticorpos séricos. Concluiu-se que o antígeno Bm86 reduziu a viabilidade e potencial biótico do *R. Sanguineus* nos cães imunizados.

Dando continuidade àquele trabalho, o presente estudo teve como objetivo descrever as alterações microscópicas e o componente celular inflamatório no local de fixação e alimentação do carrapato em cães imunizados com o antígeno Bm86 e desafiados com carrapatos adultos *Rhipicephalus sanguineus*.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos Gerais

O presente trabalho teve como objetivo descrever as alterações histopatológicas e avaliar o componente celular inflamatório no sítio de fixação e alimentação de carrapatos adultos *Rhipicephalus sanguineus* em cães imunizados com o antígeno Bm86.

2.2. Objetivos Específicos

- Descrever, de forma comparada, as alterações histopatológicas do local de fixação dos carrapatos adultos, em cães vacinados e não vacinados, nos diferentes tempos (48, 96, 144 e 192 horas pós-fixação);
- Quantificar, de forma comparada, as células inflamatórias presentes no local da lesão provocada pela alimentação dos carrapatos adultos, em cães vacinados e não vacinados e em diferentes tempos (48, 96, 144 e 192 horas pós-fixação), por meio de contagens em área determinada;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Hospedeiro

Foram utilizados oito cães domésticos (*Canis familiaris*), seis machos e duas fêmeas, em média com quatro meses de idade, aproximadamente 10 kg e sem raça definida, provenientes do canil do Departamento de Patologia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, campus de Jaboticabal-SP. Estes cães foram divididos em dois grupos, vacinados e não vacinados, com quatro animais cada e com três machos e uma fêmea por grupo. Durante o período os animais foram alimentados com a dieta comercial (Big Boss™) e água à vontade. Os cães permaneceram em baias separadas até o final do experimento e em atendimento às normas de bem estar animal (Protocolo CEUA nº 02.287/10).

3.2. Carrapato *R. sanguineus*

Foram utilizados carrapatos da espécie *Rhipicephalus sanguineus*, provenientes da colônia de carrapatos do Laboratório de Imunopatologia do Departamento de Patologia Veterinária da FCAV-UNESP de Jaboticabal. Para manter os diferentes estágios dos carrapatos, larvas, ninfas e adultos foram alimentados em coelhos fêmeas, raça Nova Zelândia Branco, pesando em média 2 kg. Os carrapatos eram colocados em câmaras de plástico especiais fixadas no dorso tricotomizado dos coelhos com cola (Brascoplast®) para evitar seu escape. Os coelhos utilizados não apresentavam contato anterior com carrapatos. No laboratório, os carrapatos eram mantidos em condições controladas em incubadora BOD (80% de umidade relativa, temperatura de 28°C, e fotoperíodo de 12 horas).

Carrapatos adultos de quatro semanas de idade foram usados nas infestações desafio nos cães vacinados com o antígeno Bm86 e nos cães controle.

3.3. Imunização e infestação desafio

Os animais vacinados receberam duas doses de 50 µg da formulação contendo o antígeno Bm86 (Hebercan[®], Heber-Biotec, Cuba), fornecida pelo Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología-CIGB, com intervalo de 21 dias; no grupo de animais não vacinados foi administrado preparação com o adjuvante montanide, sem o antígeno Bm86 (Placebo, Heber Biotec, Cuba).

Cada animal foi desafiado 15 dias após a última dose da vacina (ou placebo) com 55 carrapatos adultos (25 fêmeas e 30 machos), os quais foram liberados dentro de câmaras de alimentação, coladas no flanco tricotomizado dos cães um dia antes do desafio. Um colar Elizabetano foi utilizado em cada animal para evitar a remoção das câmaras pelos cães.

Como descrito na introdução, os resultados do potencial biótico do *R. sanguineus* pela análise dos dados reprodutivos e alimentares do carrapato durante e após a infestação desafio, bem como das taxas de anticorpos séricos nos animais teste e controle foram já publicados por Perez-Perez (2009) e Perez-Perez et al. (2010).

3.4. Histopatologia

Biópsias de pele foram coletadas nos locais de alimentação dos carrapatos adultos na 48^a, 96^a, 144^a e 192^a hora pós-fixação dos carrapatos, com um “punch” de 5 mm de diâmetro, logo após infusão local de lidocaína.

Em seguida, as amostras foram fixadas em solução formol a 10% tamponada com fosfatos (pH 7,4) 0,1M, para processamento de acordo com técnica histológica de rotina. Os fragmentos de tecido foram incluídos em parafina e seccionados a 4 µm de espessura e corados com Hematoxilina-Eosina e Giemsa, para descrição das características gerais da lesão de fixação e contagem de células inflamatórias migradas, respectivamente.

3.5. Contagem de Células

A contagem das células foi realizada em objetiva de imersão (100 X) com o auxílio de uma ocular quadriculada (Austria/PK 6.3X) de área conhecida (0,0052 mm²). Os resultados obtidos foram corrigidos e expressos como número de células/mm².

3.6. Análise estatística

A comparação entre os tratamentos dentro de cada tempo foi feita pelo Teste Não-Paramétrico de Kruskal-Wallis, adotando o nível de significância de 5%.

4. RESULTADOS

4.1. Histopatologia do local de fixação dos carrapatos

Observou-se de início discreta destruição tecidual local e presença de algumas células inflamatórias. Com o decorrer da infestação, a extensão da lesão aumentou gradativamente, principalmente nos animais não vacinados (Figura 1).

Em geral, destacou-se a presença de hiperplasia epidermal em todos os tempos avaliados, e na derme, edema inflamatório mais acentuado nos animais não vacinados e caracterizado pela dissociação de fibras colágenas. Também havia a presença de hemorragia moderada em ambos os grupos e infiltrado celular inflamatório típico composto, de forma geral, por polimorfonucleares-PMN neutrófilos, eosinófilos e basófilos, mastócitos e células mononucleares-MN linfócitos, plasmócitos e macrófagos.

Ademais, nos pontos da lesão provocada pela alimentação dos carrapatos, notou-se logo nas 48 horas pós-fixação (PF), descontinuidade ou ruptura da epiderme em ambos os grupos e, em alguns casos, a presença do cone de cimento, massa eosinofílica que garante a fixação do carrapato por longos períodos, com a presença ou não de impressões correspondentes ao hipostômio do ectoparasito (Figura 2a, b). Com 144 horas PF notou-se a presença de crosta no ponto de alimentação do carrapato apenas em cães vacinados (Figura 2c).

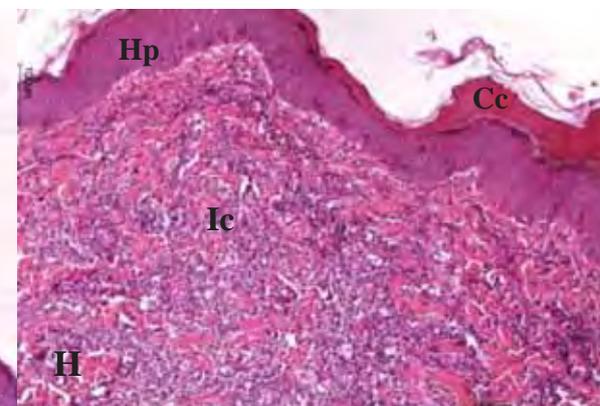
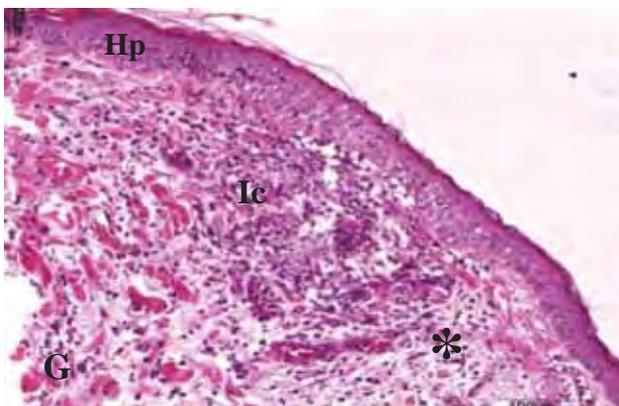
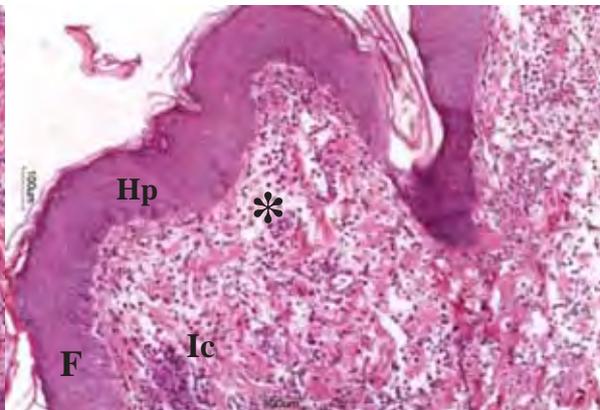
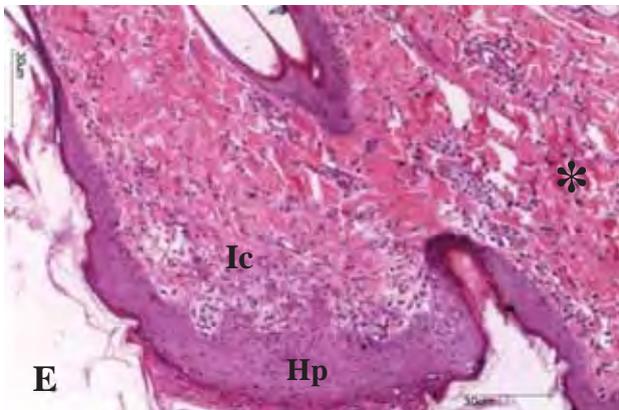
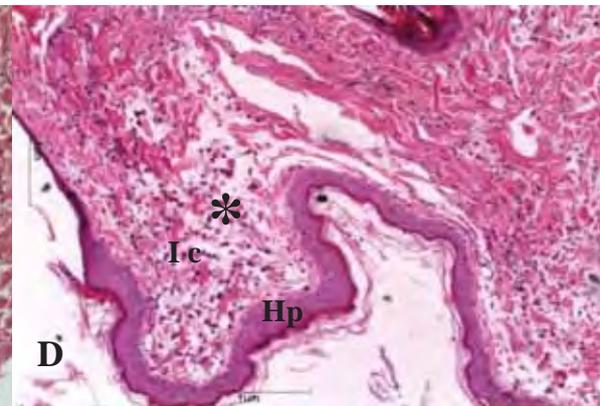
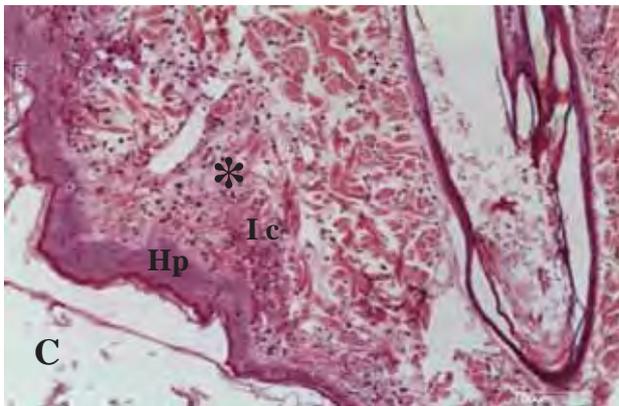
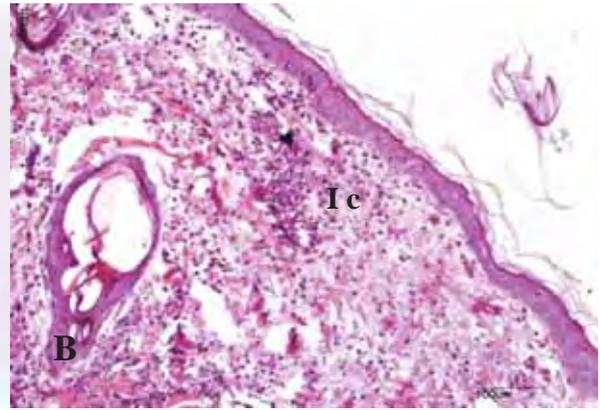
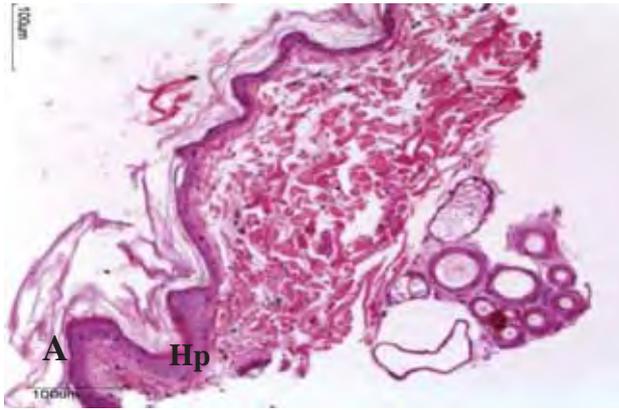
Nos locais de fixação do carrapato houve aumento da espessura da epiderme (hiperplasia) (figura 2a, b, c), edema intercelular e vesículas intraepidérmicas preenchidas com células inflamatórias e debris celulares, visualizadas em todos os intervalos de tempo de ambos os grupos. Observou-se também edema intersticial na derme, caracterizado pela dissociação de fibras colágenas, do início ao final do período de alimentação, como ilustrado na Figura 2d. Esses achados histopatológicos foram encontrados nos animais vacinados, porém de forma mais acentuada nos animais não vacinados. Além disso, as lesões na derme incluíram diferentes níveis de infiltrado celular inflamatório, e, ocasionalmente, hemorragia e necrose. A reação inflamatória

estava presente na derme superficial e estendia-se até a derme profunda, com a distribuição do infiltrado de forma difusa, na maioria dos casos.

Nos animais vacinados destacou-se o predomínio de neutrófilos, eosinófilos e mastócitos no começo da reação inflamatória com 48h PF, enquanto que nos não vacinados houve predomínio de eosinófilos, neutrófilos e linfócitos, respectivamente. Com o decorrer da infestação, mudanças mais significativas foram observadas, como a extensão da lesão, infiltrado celular mais intenso a partir de 96h PF, atingindo as camadas mais profundas da derme. O padrão de células inflamatórias também se modificou, passando a ser composto principalmente por neutrófilos e linfócitos nos animais vacinados, e eosinófilos, linfócitos e neutrófilos nos não vacinados.

Nas figuras 3 a 6 podem ser visualizados, de forma geral, o infiltrado celular inflamatório em cães vacinados e não vacinados, em todos os intervalos de tempo avaliados (48, 96, 144 e 192h PF) e sob diferentes aumentos (objetiva de 40x e 100x).

Figura 1 - Fotomicrografias do local de fixação de *R. sanguineus* na pele de cães vacinados ou não com antígeno Bm86. Aspectos gerais. A- cão vacinado (48h PF). B- cão não vacinado (48h PF). C- cão vacinado (96h PF). D- cão não vacinado (96h PF). E- cão vacinado (144h PF). F- cão não vacinado (144h PF). G- cão vacinado (192h PF). H- cão não vacinado (192h PF). Notar presença de hiperplasia epidermal (Hp), cone de cemento (Cc), infiltrado inflamatório na derme superficial (Ic) e dissociação das fibras colágenas ou edema (*). Objetiva 10X. Hematoxilina e Eosina.



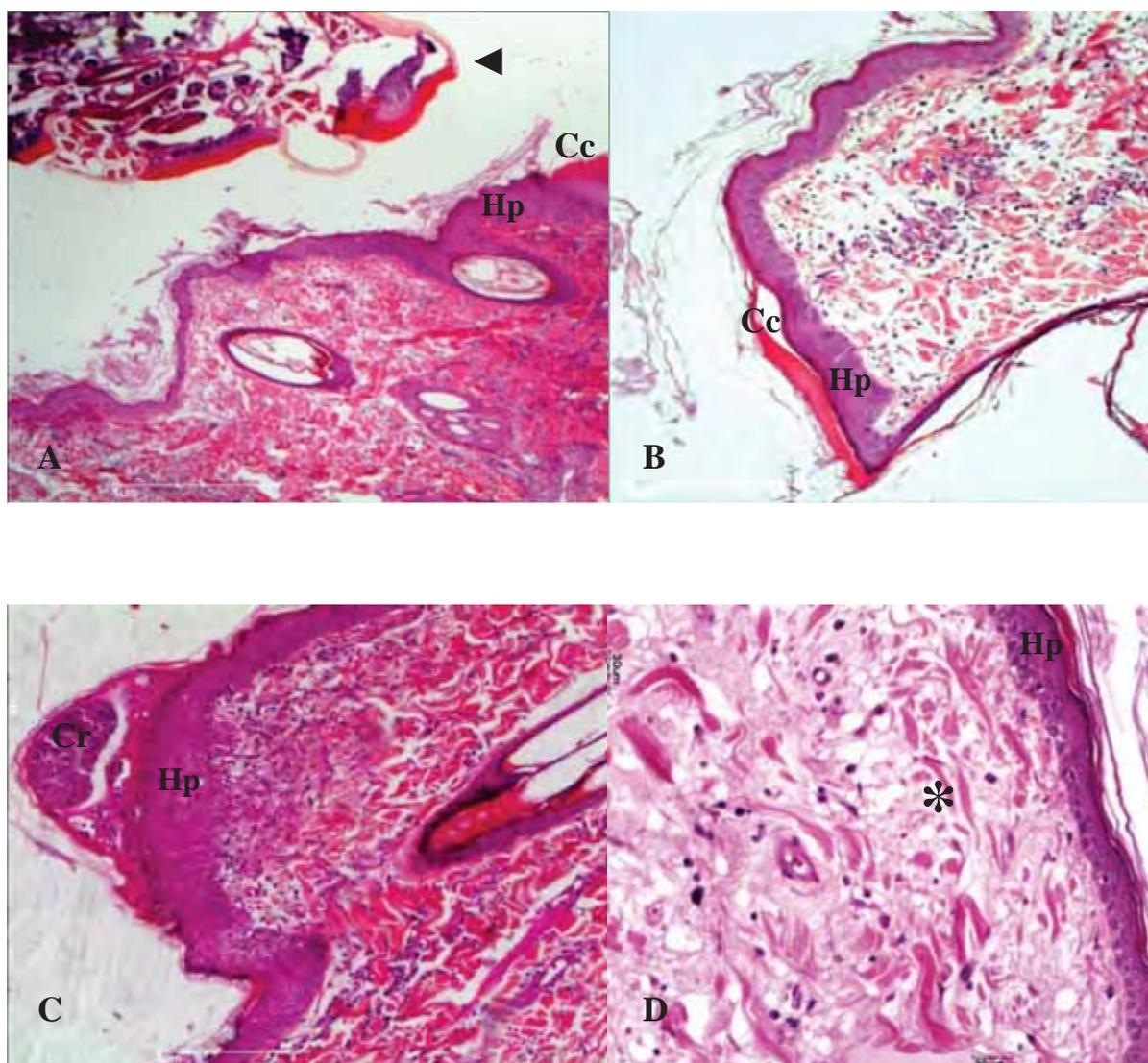


Figura 2 – Fotomicrografias do local de fixação de *R. sanguineus* na pele de cães vacinados ou não com antígeno Bm86. A- cão vacinado (96h PF) (obj. 4x). B- cão não vacinado (96h PF) (obj. 10x). C- cão vacinado (144h PF) (obj. 10x). D- cão vacinado (192h PF) (obj. 20x). Notar a presença de fragmentos do carrapato (seta) em A; hiperplasia da epiderme (Hp) em todos os cortes; cone de cimento (Cc) em A e B; crosta (Cr) em C; dissociação de fibras colágenas da derme ou edema (*). Hematoxilina e Eosina.

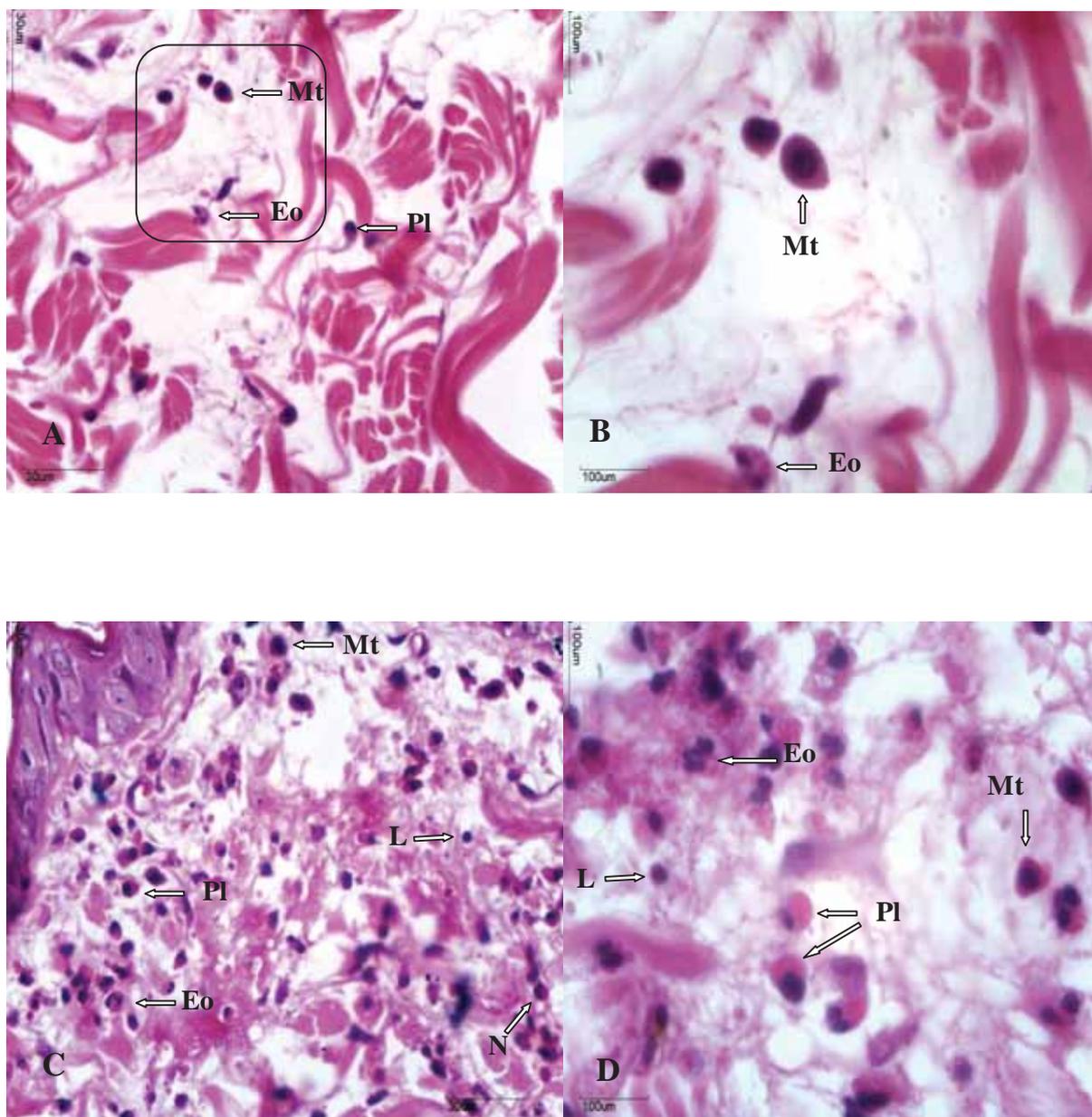


Figura 3 – Infiltrado inflamatório no local de fixação de *R. sanguineus* na pele de cães vacinados ou não com antígeno Bm86. A- cão vacinado (48h PF) (obj. 40x). B- detalhe de A (obj. 100x). C- cão não vacinado (48h PF) (obj. 40x). D- cão não vacinado (obj. 100x). Notar a presença de mastócitos (Mt), neutrófilos (N), eosinófilos (Eo), plasmócitos (Pl), linfócito (L). Hematoxilina e Eosina.

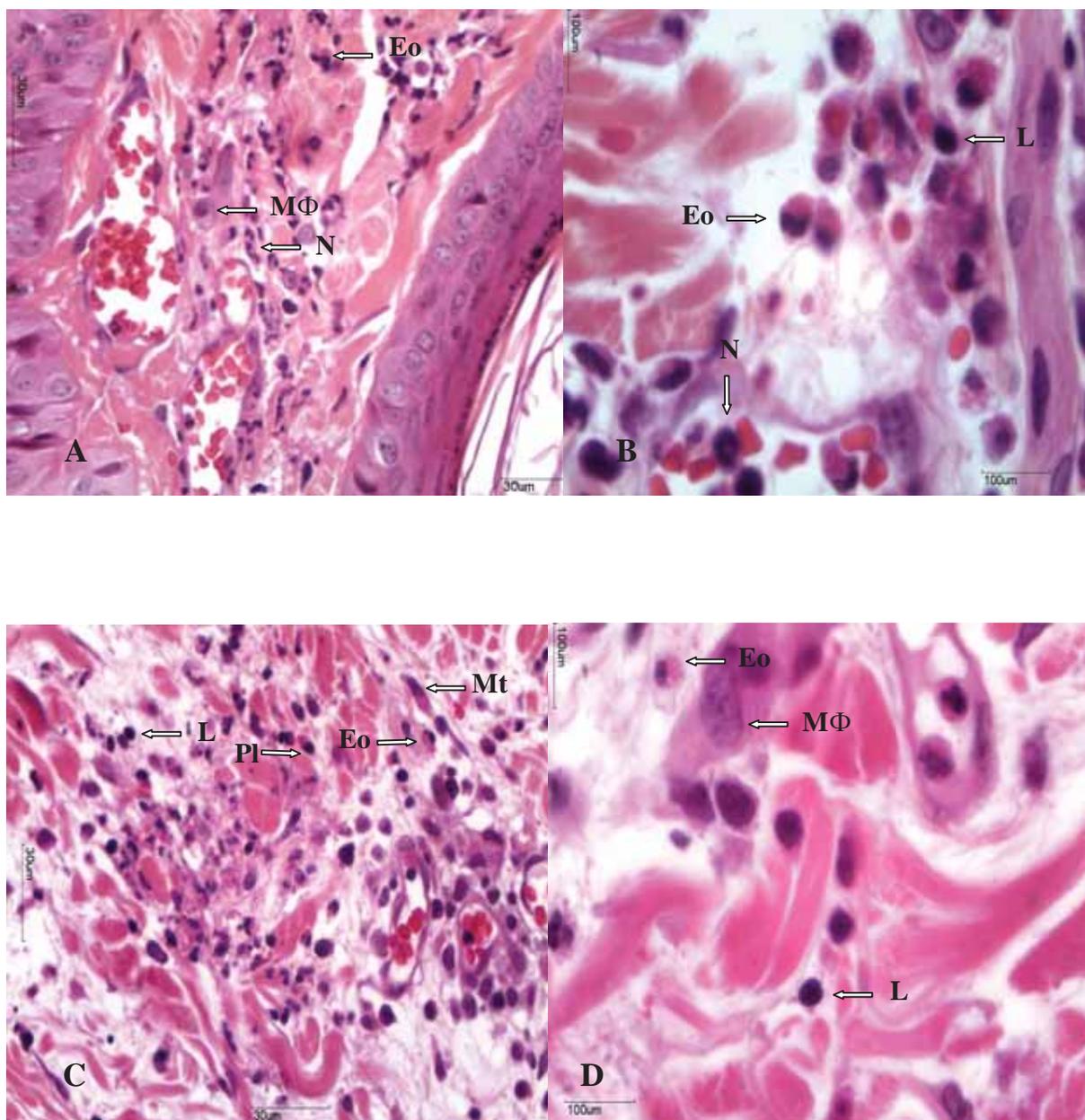


Figura 4 – Infiltrado celular inflamatório no local de fixação de *R. sanguineus* na pele de cães vacinados ou não com antígeno Bm86. Cão vacinado (96h PF) (A= obj. 40x e B= obj. 100x). Cão não vacinado 96h PF (C= obj. 40x e D= obj. 100x). Notar a presença de mastócitos (Mt), neutrófilos (N), eosinófilos (Eo), plasmócitos (Pl), linfócitos (L) e macrófagos (MΦ). Hematoxilina e Eosina.

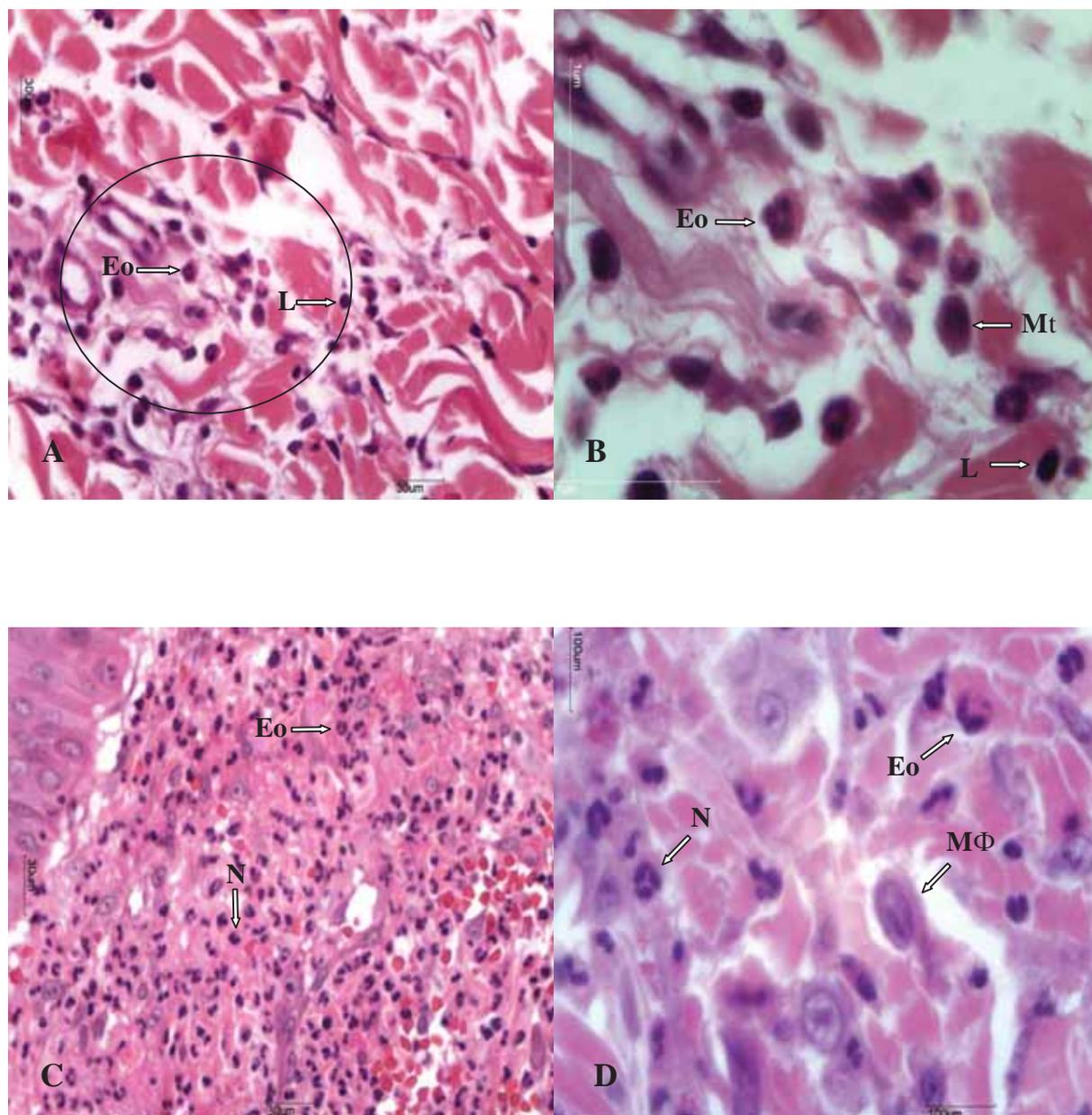


Figura 5 – Infiltrado inflamatório no local de fixação de *R. sanguineus* na pele de cães vacinados ou não com antígeno Bm86. A- cão vacinado (144h PF) (obj. 40x). B- detalhe de A (obj. 100x). Cão não vacinado 144h PF (C= obj. 40x e D= obj. 100x). Notar a presença de macrófagos (MΦ), mastócitos (Mt), neutrófilos (N), eosinófilos (Eo) e linfócitos (L). Hematoxilina e Eosina.

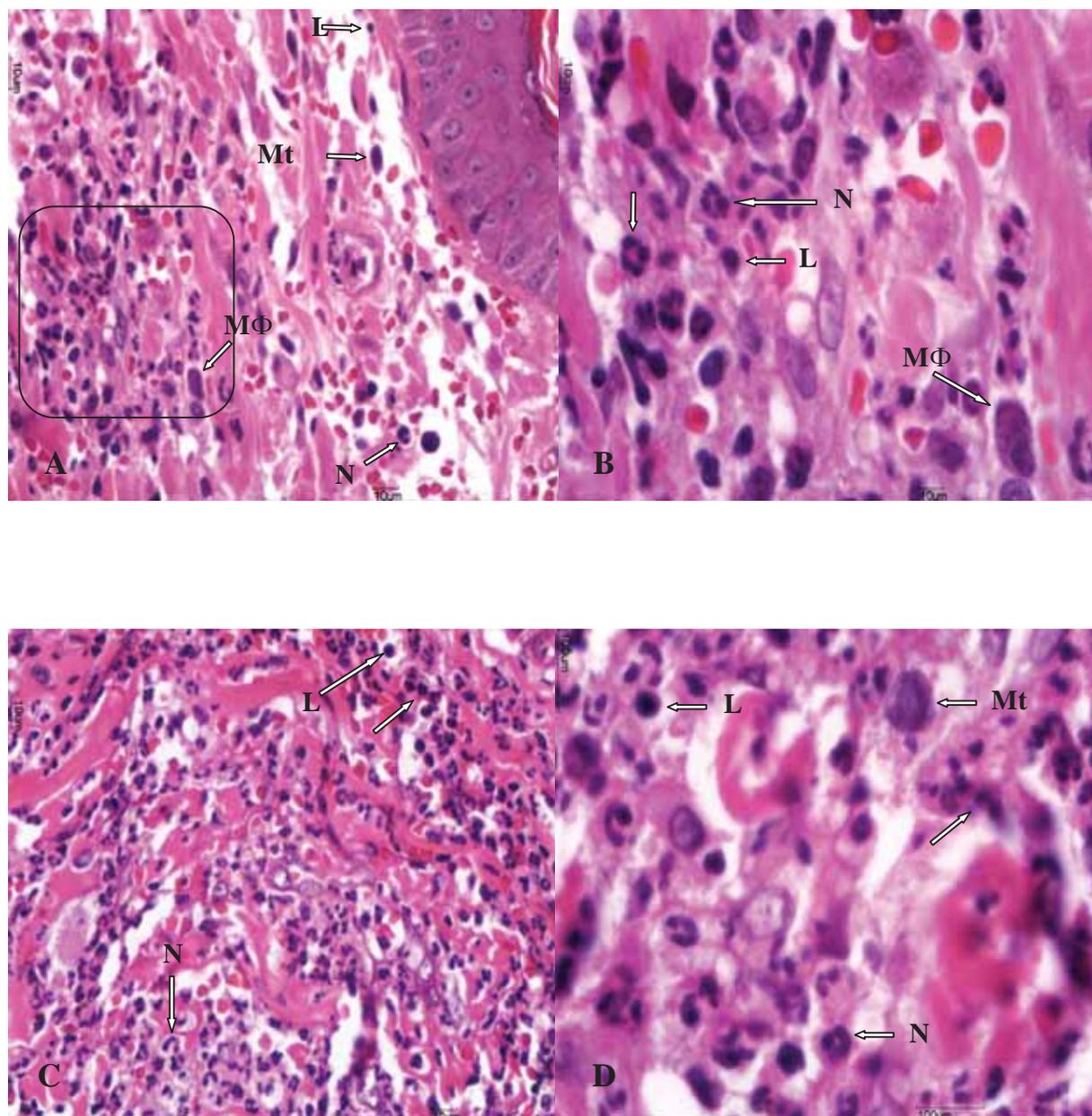


Figura 6 – Infiltrado inflamatório no local de fixação de *R. sanguineus* na pele de cães vacinados ou não com antígeno Bm86. A- cão vacinado (192h PF) (obj. 40x). B- detalhe de A (obj. 100x). Cão não vacinado 192h PF (C= obj. 40x e D= obj. 100x). Notar a presença de mastócitos (Mt), neutrófilos (N), eosinófilos (Eo), linfócitos (L) e macrófagos (MΦ). Hematoxilina e Eosina.

4.2. Contagem de células inflamatórias

Para facilitar a identificação e diferenciação entre as células do infiltrado inflamatório, suas contagens foram realizadas nos diferentes tempos e condições experimentais (vacinado e não vacinado) em cortes de tecido corados pela coloração de Giemsa, como ilustrado nas figuras 7, 8 e 9.

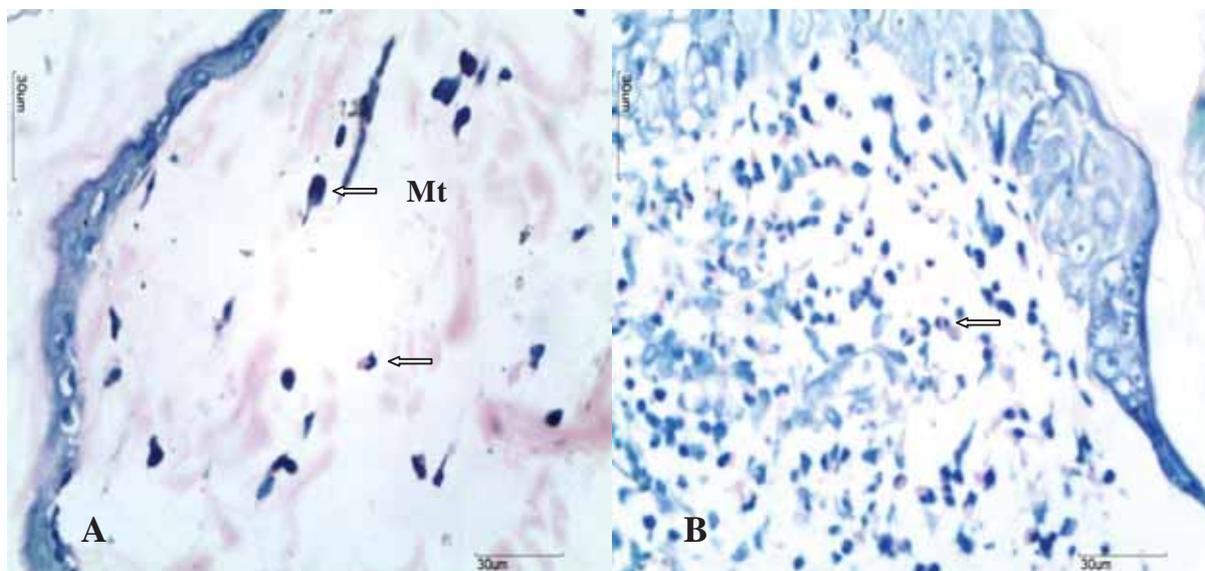


Figura 7 – Infiltrado celular inflamatório na pele de cães vacinados ou não com o antígeno Bm86. Visualizar aspectos das células para contagem celular. Presença de eosinófilos (Eo) e mastócitos (Mt). A- Cão vacinado 48h PF (obj. 40x). B- Cão não vacinado 48h PF (obj. 40x). Giemsa.

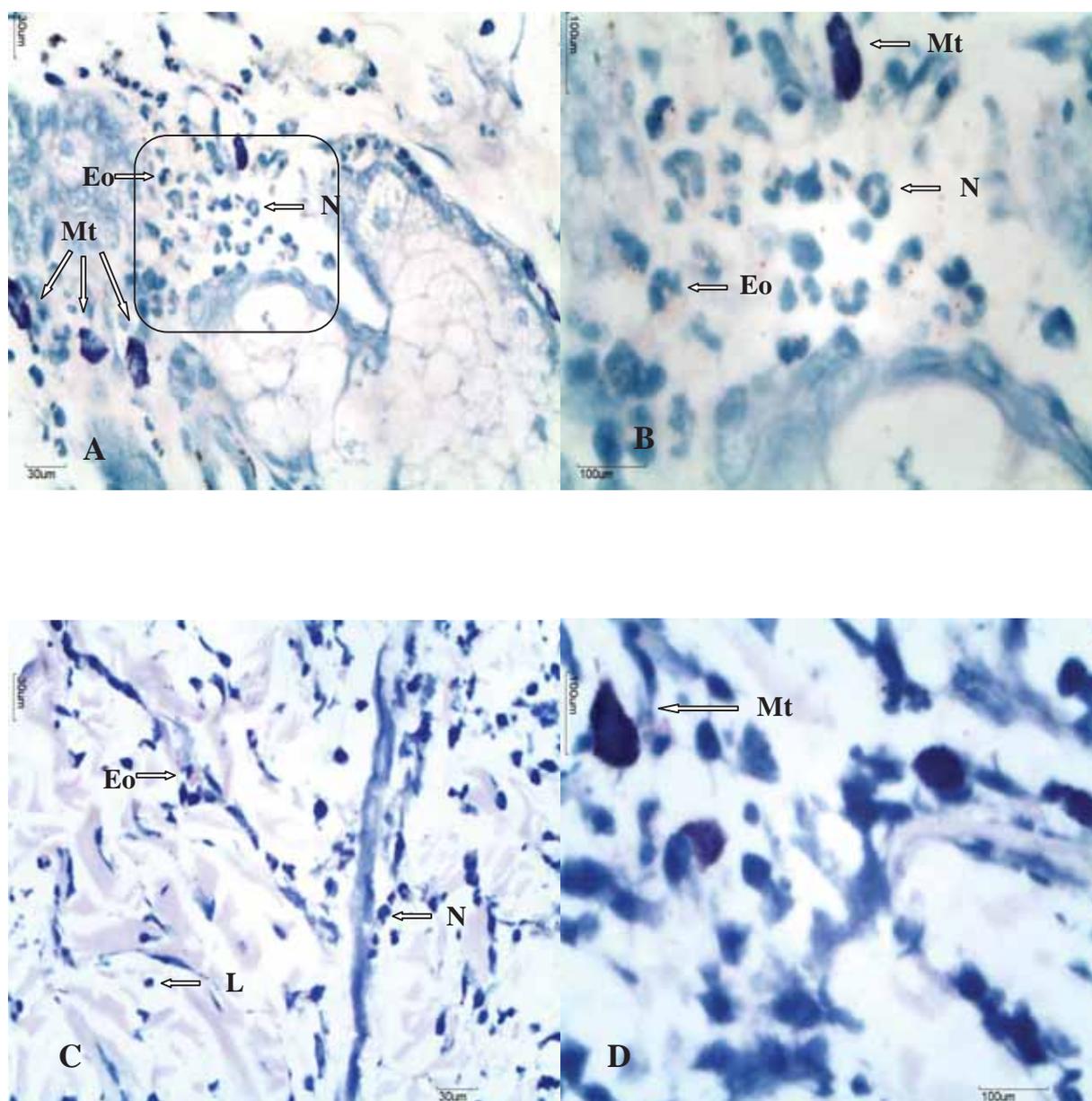


Figura 8 – Infiltrado celular inflamatório na pele de cães vacinados ou não com o antígeno Bm86. Visualizar aspectos das células para contagem celular. Presença de eosinófilos (Eo), linfócitos (L), neutrófilos (N) e mastócitos (Mt). A- cão vacinado 96h PF (obj. 40x). B- Detalhe de A (obj. 100x). C- cão não vacinado 96h PF (obj. 40x) e D- cão não vacinado 96h PA (obj.100x). Giemsa.

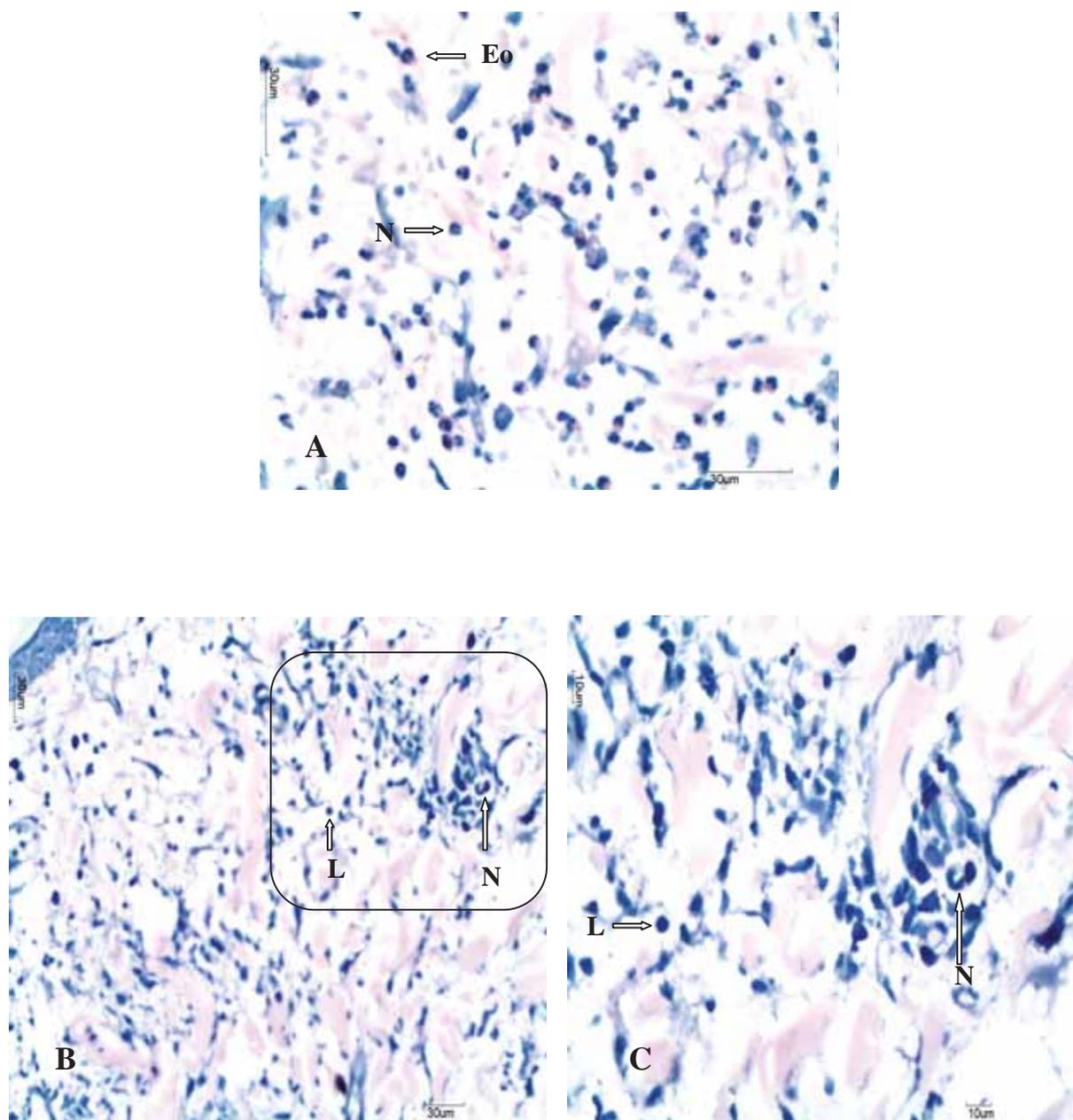


Figura 9 – Infiltrado celular inflamatório na pele de cães não vacinados com o antígeno Bm86. Visualizar aspectos das células para contagem celular. Presença de linfócitos (L), eosinófilos (Eo) e neutrófilos (N). A- cão não vacinado 144h PF (obj. 40x). B- cão não vacinado 192h PF (obj. 20x). C- Detalhe de B (obj. 40x). Giemsa.

Os resultados individuais das contagens de células por mm^2 no infiltrado inflamatório presente no local de fixação das formas adultas de *R. sanguineus* são apresentados no apêndice deste trabalho. Esse infiltrado era constituído basicamente por células PMN neutrófilos, eosinófilos e basófilos, bem como por células MN linfócitos, plasmócitos e macrófagos, além de mastócitos, em diferentes intensidades durante todo o processo inflamatório.

As médias do número de células inflamatórias no local de alimentação do ectoparasito, comparadas estatisticamente em cães vacinados e não vacinados são apresentadas nas tabelas 1 e 2, e cada célula inflamatória foi comparada separadamente nas figuras 10 a 16.

As primeiras 48 horas após a fixação dos carrapatos foram caracterizadas pela predominância de PMN neutrófilos e eosinófilos e mastócitos respectivamente, nos animais vacinados. No mesmo período houve um aumento do número de eosinófilos e neutrófilos, seguidos de linfócitos nos animais não vacinados, em comparação com os animais vacinados.

Avaliando-se os eosinófilos, a diferença entre os tratamentos foi significativa em todos os tempos, com exceção do período de 144h PF, em que não houve diferença estatística. A média de eosinófilos/ mm^2 nos animais vacinados foram 192,31; 0; 32,05 respectivamente para os tempos 48, 96 e 192h PF. Para os animais não vacinados a média de eosinófilos/ mm^2 foi consideravelmente maior (2564,10; 865,38; 352,56 para os mesmos tempos).

Comparando o tratamento 1 (cães vacinados) com o tratamento 2 (cães não vacinados), o número de linfócitos diferiu significativamente ($p < 0,05$) somente no primeiro tempo avaliado, com medianas maiores nos animais não vacinados (521 linfócitos/ mm^2) desde o início da fixação.

O número de células PMN neutrófilos foi significativamente diferente entre os tratamentos em todos os tempos estudados. Nos animais vacinados houve uma prevalência acentuada de neutrófilos, apenas no período de 96h PF com 2019,23 neutrófilos/ mm^2 . Nos demais tempos, a média de neutrófilos foi maior nos animais não vacinados, como mostra a figura 12.

Tabela 1 – Média e desvio padrão (D.P.) da densidade de células inflamatórias/mm² observada em cães vacinados, em diferentes intervalos de tempo pós-fixação (PF) do carrapato *Rhipicephalus sanguineus*.

48 horas PF							
	Eosin	Linf	Neutro	Mast	Macróf	Plasmo	Baso
Média	192,31	128,20	256,41	192,30	0	32,05	0
D.P.	384,61	99,31	232,89	121,62	0	78,51	0
96 horas PF							
	Eosin	Linf	Neutro	Mast	Macróf	Plasmo	Baso
Média	0	576,92	2019,23	0	0	0	0
D.P.	0	403,39	416,91	0	0	0	0
144 horas PF							
	Eosin	Linf	Neutro	Mast	Macróf	Plasmo	Baso
Média	1038,46	0	769,23	192,31	38,46	153,84	0,20
D.P.	701,33	0	384,61	192,31	86,00	160,89	0,45
192 horas PF							
	Eosin	Linf	Neutro	Mast	Macróf	Plasmo	Baso
Média	32,05	96,15	512,82	0	256,41	0	32,05
D.P.	78,51	160,89	432,87	0	262,74	0	78,51

Eosinófilo (Eosin), Linfócito (Linf), Neutrófilo (Neutro), Mastócito (Mast), Macrófago (Macróf), Plasmócito (Plasmo) e Basófilo (Baso).

Tabela 2 – Média e desvio padrão (D.P.) da intensidade de células inflamatórias presentes na pele de cães não vacinados em diferentes intervalos de tempo pós-fixação (PF) do carrapato *Rhipicephalus sanguineus*.

48 horas PF							
	Eosin	Linf	Neutro	Mast	Macróf	Plasmo	Baso
Média	2564,10	512,82	1955,13	128,20	0	64,10	0
D.P.	830,86	157,02	2083,38	99,31	0	157,01	0
96 horas PF							
	Eosin	Linf	Neutro	Mast	Macróf	Plasmo	Baso
Média	865,38	737,18	160,25	96,15	32,05	128,20	32,05
D.P.	640,70	283,07	144,76	105,33	78,51	99,31	78,51
144 horas PF							
	Eosin	Linf	Neutro	Mast	Macróf	Plasmo	Baso
Média	1346,15	0	3012,82	0	96,15	0	0
D.P.	942,11	0	1390,30	0	105,33	0	0
192 horas PF							
	Eosin	Linf	Neutro	Mast	Macróf	Plasmo	Baso
Média	352,56	160,25	4262,82	96,15	0	32,05	0
D.P.	144,76	144,76	2090,47	160,89	0	78,51	0

Eosinófilo (Eosin), Linfócito (Linf), Neutrófilo (Neutro), Mastócito (Mast), Macrófago (Macróf), Plasmócito (Plasmo) e Basófilo (Baso).

A diferença entre os tratamentos, em relação aos mastócitos, não foi estatisticamente significativa nos tempos de 48h, 96h e 192h PF. Porém, no período de 144h PF houve diferença significativa entre os cães vacinados ($p < 0,05$), com 192,31 mastócitos/mm², comparados com ausência de mastócitos nos cães não vacinados, no mesmo tempo.

Os macrófagos apresentaram médias que não diferiram estatisticamente entre os tratamentos 1 e 2 em todos os tempos, com exceção de 192h PF. Neste período o número de macrófagos foi significativamente ($p < 0,05$) maior nos animais vacinados, com 256,41 macrófagos/mm², enquanto que não foram observados macrófagos no outro tratamento, no tempo referido.

A densidade média de plasmócitos apresentou uma diferença significativa em 96h, caracterizado por um maior número nos animais não vacinados (128,20 plasmócitos/mm²) e em 144h PF, com 153,84 plasmócitos/mm² nos animais vacinados. Não houve diferença significativa nos demais tempos, em relação aos dois tratamentos comparados.

Os basófilos não tiveram diferenças significativas entre os cães vacinados e não vacinados, em todos os tempos, e permaneceram ausentes em quase todas as condições experimentais no cão doméstico infestado por carrapato *R. sanguineus*.

Contagem de Eosinófilos

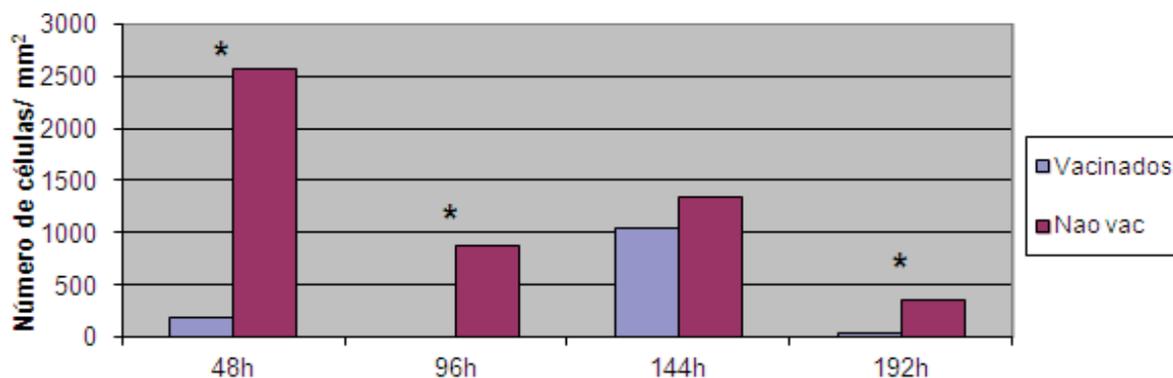


Figura 10 – Contagem de Eosinófilos no local de fixação e alimentação do *R. sanguineus* na pele de cães vacinados e não vacinados em 48, 96, 144 e 192h PF. Notar significância (*) ou não significância entre os tratamentos.

Contagem de Linfócitos

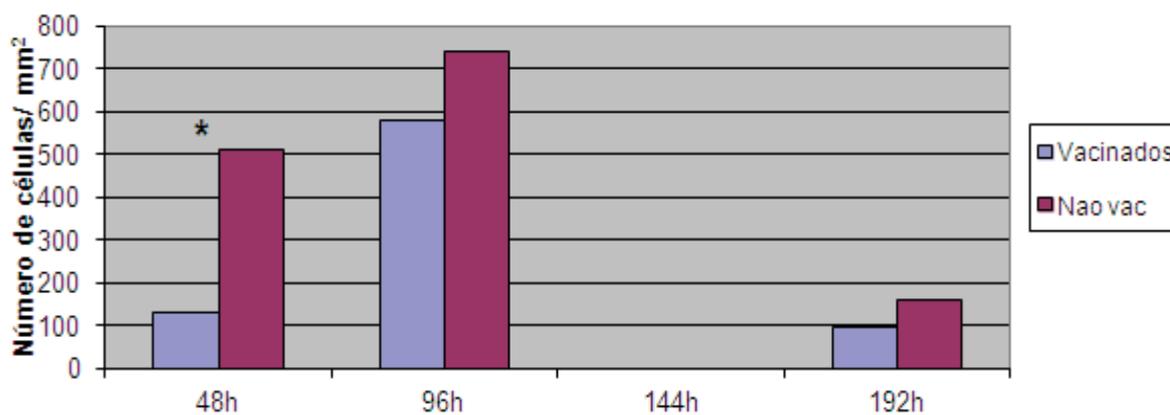


Figura 11 – Contagem de Linfócitos no local de fixação e alimentação do *R. sanguineus* na pele de cães vacinados e não vacinados em 48, 96, 144 e 192h PF. Notar significância (*) ou não significância entre os tratamentos.

Contagem de Neutrófilos

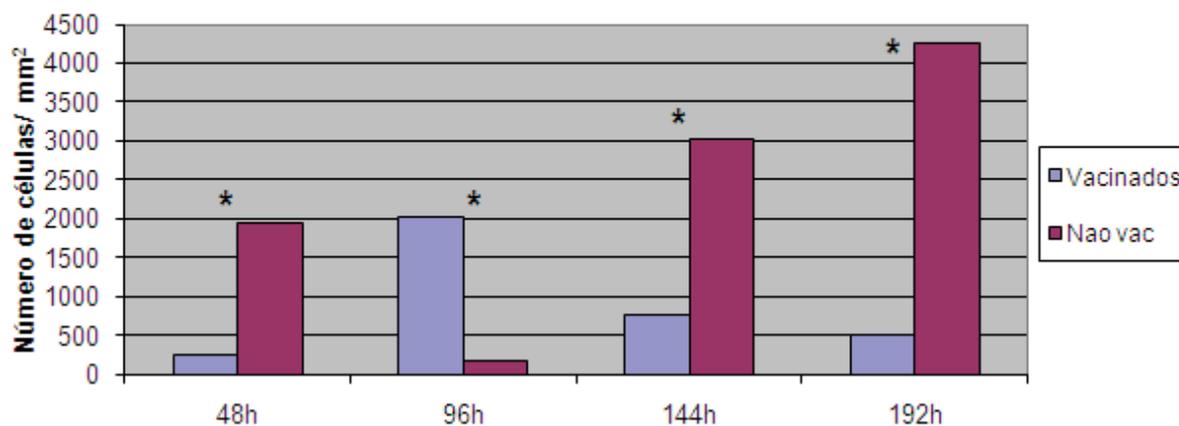


Figura 12 – Contagem de Neutrófilos no local de fixação e alimentação do *R. sanguineus* na pele de cães vacinados e não vacinados em 48, 96, 144 e 192h PF. Notar significância (*) entre os tratamentos.

Contagem de Mastócitos

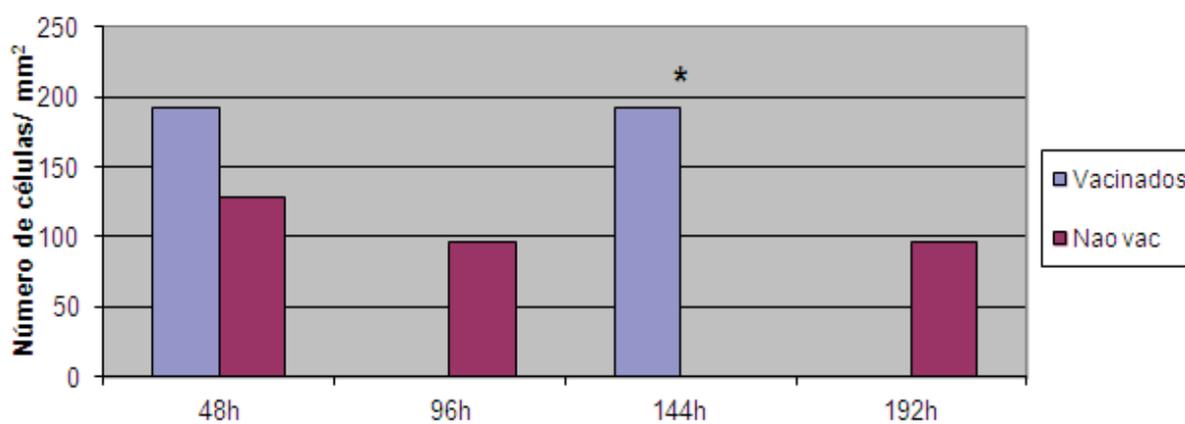


Figura 13 – Contagem de Mastócitos no local de fixação e alimentação do *R. sanguineus* na pele de cães vacinados e não vacinados em 48, 96, 144 e 192h PF. Notar significância (*) e não significância entre os tratamentos.

Contagem de Macrófagos

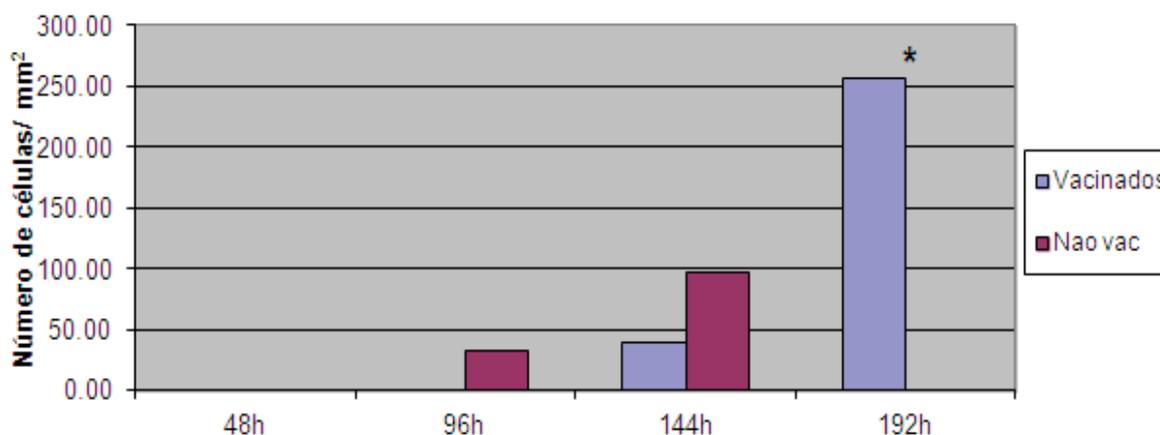


Figura 14 – Contagem de Macrófagos no local de fixação e alimentação do *R. sanguineus* na pele de cães vacinados e não vacinados em 48, 96, 144 e 192h PF. Notar significância (*) e não significância entre os tratamentos.

Contagem de Plasmócitos

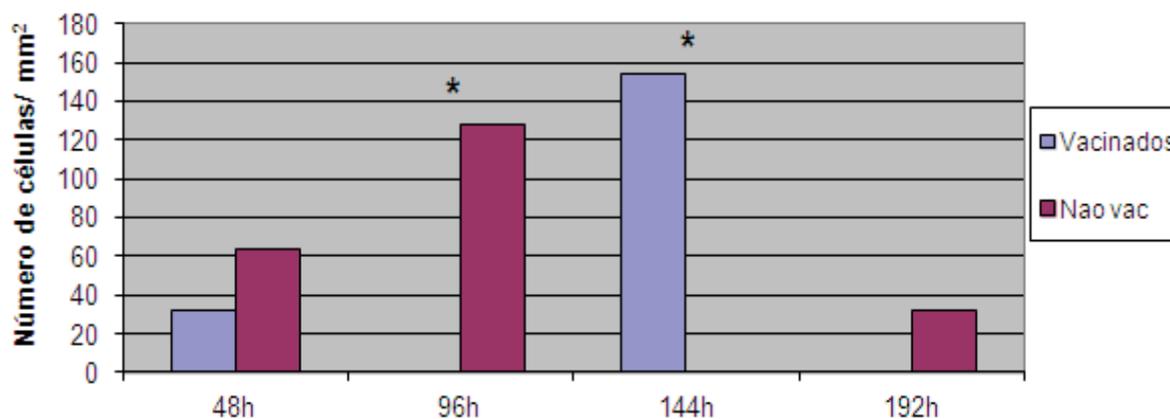


Figura 15 – Contagem de Plasmócitos no local de fixação e alimentação do *R. sanguineus* na pele de cães vacinados e não vacinados em 48, 96, 144 e 192h PF. Notar significância (*) e não significância entre os tratamentos.

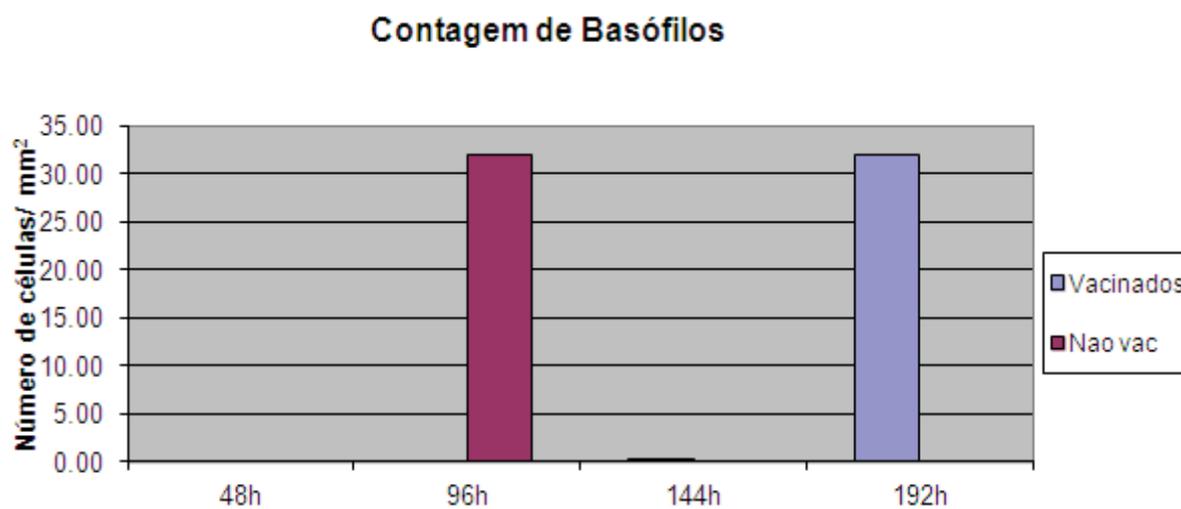


Figura 16 – Contagem de Basófilos no local de fixação e alimentação do *R. sanguineus* na pele de cães vacinados e não vacinados em 48, 96, 144 e 192h PF. Notar não significância entre os tratamentos.

5. DISCUSSÃO

A imunidade adquirida a carrapatos ixodídeos tem sido reconhecida como um método alternativo de controle de carrapatos (JONGEJAN et al., 1989). Neste contexto, a imunopatologia de infestações por carrapatos tem sido amplamente investigada, principalmente em bovinos e em animais de laboratório. Estudos envolvendo carrapatos e hospedeiros naturais são mais escassos. Dentre esses, a relação bovino x *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tem sido a mais explorada, inclusive com o desenvolvimento de duas vacinas comerciais e suas variantes por pesquisadores da Austrália (WILLADSEN et al., 1989) e de Cuba (RODRIGUEZ et al., 1995a).

O grau de resistência adquirida em cada hospedeiro é avaliado por meio de parâmetros biológicos de carrapatos alimentados em infestações sucessivas (WILLADSEN, 1980, SZABÓ et al., 1995). Assim, a imunidade adquirida é expressa e mensurada por redução no número de carrapatos que se fixam no hospedeiro, redução do número de carrapatos que se alimentam completamente em infestações sucessivas, prolongamento do período de ingurgitamento, redução da habilidade de larvas e ninfas sofrer ecdise, redução do peso de ingurgitamento, e redução da fecundidade, resultando em redução significativa na população de carrapatos e morte dos mesmos (WILLADSEN, 1980). O mesmo foi encontrado por Perez-Perez (2009) e Perez-Perez et al. (2010) em estudos prévios no Departamento de Patologia Veterinária da FCAV-UNESP, Jaboticabal, em que se investigou o potencial biótico de carrapatos *R. sanguineus* em cães imunizados com o antígeno Bm86.

Dando continuidade a este trabalho, avaliou-se agora o componente celular inflamatório no local da fixação de carrapatos adultos *Rhipicephalus sanguineus* em cães imunizados ou não com antígeno Bm86.

Os carrapatos desenvolvem mecanismos para se evadir das estratégias de defesa do hospedeiro, principalmente contra componentes na sua saliva (WIKEL, 1996a). Dentre esses, componentes com propriedades anticoagulante, antiinflamatória e vasodilatadora, foram encontrados na saliva dos carrapatos (SAUER et al., 1995).

Por outro lado, durante o seu repasto sanguíneo, os carrapatos estimulam mecanismos reguladores e efetores da resposta imunológica do hospedeiro. Essa resposta envolve anticorpos, complemento, citocinas, células apresentadoras de antígenos, linfócitos T e B (WIKEL e BERGMAN, 1997), em associação com a hipersensibilidade basofílica cutânea em animais resistentes (BROWN et al., 1984). Simultaneamente, graças à destruição de tecidos pelo hipostômio do carrapato, é estimulada uma resposta inflamatória do hospedeiro, caracterizada por aumento de permeabilidade vascular, desconforto local, edema, formação de vesículas na epiderme e infiltração de células inflamatórias (BEAUDOUIN et al., 1997). Logo após a fixação dos carrapatos, vasos da microcirculação sanguínea do hospedeiro próximos de suas partes bucais dilatam-se e têm sua permeabilidade incrementada, resultando em edema.

A reação inflamatória dos cães aos carrapatos foi de moderada intensidade no começo da infestação, caracterizada por discreta exsudação de fluidos (edema) e células inflamatórias em 48h PF e aumentando gradativamente nos demais intervalos de tempos avaliados. Isso acontece devido à ação de substâncias vasoativas presentes na saliva dos carrapatos, como as prostaglandinas, e à ação de aminas biogênicas, como histamina e serotonina, liberadas de mastócitos dermais degranulados (WIKEL, 1982; RIBEIRO et al., 1985). A liberação destes mediadores, com conseqüente vasodilatação dos capilares locais, altera o microambiente da pele, tornando-o inadequado para o carrapato (OBEREM, 1984). Ocorreu também hemorragia nos locais de fixação dos carrapatos, assim como demonstrado por Wikel (1982) e a lesão foi mais intensa nos animais não vacinados. O edema é bastante evidente no local de fixação do carrapato em animais resistentes (TATCHELL, 1969; WIKEL e ALLEN, 1982).

Nas primeiras 48 horas pós-fixação (PF) dos carrapatos já havia a presença de uma massa eosinofílica denominada cone de cimento. Quando os carrapatos se fixam em animais não sensibilizados (primoinfestação) secretam cimento e outros materiais antigênicos (KAUFMAN, 1989).

A epiderme mostrou hiperplasia no ponto de fixação do carrapato e a derme apresentou infiltrado de células inflamatórias. Estas alterações são decorrentes da

ação mecânica causada pelo carrapato, da atuação de sua saliva e da reação do hospedeiro. O trauma mecânico provocado pelo *R. sanguineus* não é tão significativo quando comparado a outras espécies de carrapatos como do gênero *Amblyomma*, já que suas peças bucais penetram fundo na derme, ao contrário do *R. sanguineus*. Porém, estes achados não são indicativos de resistência ao parasita (LIMA e SILVA, 2004)

A identificação e o reconhecimento das células inflamatórias polimorfonucleares e mononucleares são relevantes para a determinação dos mecanismos de resistência do hospedeiro contra o parasita. A diferença na resistência entre cães e cobaias ao *R. sanguineus* é acompanhada pelas diferenças na infiltração celular no sítio de fixação do carrapato (SZABÓ e BECHARA, 1999).

Os PMN neutrófilos e eosinófilos e os mastócitos predominaram respectivamente nesta ordem, nas primeiras 48 horas após a fixação dos carrapatos, nos animais vacinados. No mesmo período houve um aumento considerado do número de eosinófilos e neutrófilos, seguidos de linfócitos nos animais não vacinados, em comparação com os animais vacinados. O número de células PMN neutrófilos foi significativamente diferente entre o grupo de cães vacinados e controle, em todos os tempos estudados. Nos animais vacinados houve uma prevalência acentuada de neutrófilos apenas no período de 96h PF. Nos demais tempos, a média de neutrófilos foi maior nos animais não vacinados, respectivamente para 48, 144 e 192h PF.

De forma geral, uma participação mais intensa desta célula já foi notada por Brown (1988) e Kaufman (1989), em hospedeiros, sofrendo primeira infestação, principalmente nos três primeiros dias do parasitismo. As mesmas chegaram a representar 40 a 60% das células infiltradas. Esta infiltração representa a clássica reação inflamatória aguda e não imune a um estímulo lesivo inespecífico. Neutrófilos são capazes de lesar tecidos por meio de liberação de enzimas líticas de seus grânulos (WEISS, 1989). Assim, estão envolvidos na formação da cavidade de alimentação, espaço criado pela dissolução do tecido dos hospedeiros, imediatamente abaixo das peças bucais do carrapato. Esta observação sugere que os neutrófilos não estão exercendo seu potencial lesivo em cães não vacinados, uma vez que foram observados por Szabó e Bechara (1999) em cães parasitados por carrapatos

Rhipicephalus sanguineus, hospedeiros que não desenvolvem resistência contra estes ectoparasitas. Pode-se supor que esta característica esteja relacionada com os mecanismos de modulação do carrapato contra os mecanismos de defesa do seu hospedeiro.

Estes achados apontam que a natureza do infiltrado celular vesicular esteja relacionada possivelmente ao grau de resistência ou susceptibilidade do hospedeiro à espécie de carrapato em estudo (SZABÓ E BECHARA, 1999).

Face ao exposto, de forma semelhante ao cão, os tamanduás-bandeira reagem ao carrapato *Amblyomma sp.*, segundo Lima e Silva (2004), envolvendo no processo inflamatório, a participação de neutrófilos em sua maioria, sugerindo, também, resposta imune ineficaz neste hospedeiro.

Avaliando-se os eosinófilos, a diferença entre os tratamentos foi significativa ($p < 0,05$) em todos os tempos, com exceção do período de 144h PF. A média de eosinófilos nos animais vacinados foi consideravelmente maior que no grupo controle. Os eosinófilos foram predominantes nos animais não vacinados em 48 e 96h PF, seguidos pelos neutrófilos. Porém uma redução dramática do número de eosinófilos nestes mesmos cães foi observada quando comparado o primeiro e o último tempo avaliado. Segundo Gil e Walker (1985), tal redução ocorreria pela degranulação dos eosinófilos associada à inativação do efeito de mediadores derivados dos mastócitos. Eosinófilos são caracterizados por sua imensa afinidade por corantes ácidos como a eosina. Reações com eosinófilos são características de alergias, parasitos e inflamação crônica. As funções precisas dos eosinófilos não estão bem claras, mas devem variar conforme as circunstâncias (JONES, 1993). Até recentemente, acreditava-se que o eosinófilo tinha por função a defesa contra infecções parasitárias e proteção do organismo contra mediadores liberados por mastócitos e basófilos. A presença nestas células de determinadas proteínas catiônicas e enzimas conferem a elas efeitos antiparasitários, mas apesar da demonstração de alguma capacidade regulatória da inflamação, o efeito da atividade do eosinófilo parece ser pró-inflamatório (McEWEN, 1992). Cobaias, coelhos, hamsters e bovinos sensibilizados apresentam intensa infiltração de eosinófilos no local de fixação do carrapato (ALLEN, 1973; GIL e WALKER, 1985, LATIF et al., 1990; SZABÓ e BECHARA, 1995).

Nos animais vacinados, os valores de eosinófilos/mm² apresentaram uma grande diferença entre 96h PF e 144h PF, com ausência de eosinófilos/mm² no primeiro e 1038,46 eosinófilos/mm² no segundo tempo avaliado. Este resultado sugere que a superfície de corte por ocasião da microtomia pode ter ficado a uma certa distância do cone de cimento, visualmente localizado pelo ponto de fixação do carrapato na pele do cão, onde a resposta inflamatória é evidentemente mais intensa.

Os números de linfócitos diferiram estatisticamente ($p < 0,05$) entre os dois grupos (cães vacinados e cães não vacinados) somente no primeiro tempo avaliado, estando em maior número nos animais não vacinados (521 linfócitos/mm²) desde o início. A participação do linfócito na reação ao carrapato não é surpreendente pelo papel central e variado, desenvolvido por este tipo celular nas reações imunes de forma geral. Entretanto, é desconhecida a participação relativa das diversas subpopulações de linfócitos na gênese de uma resistência eficaz ao ácaro. Algumas observações isoladas, entretanto, apontam para a participação de linfócitos T e B, e de células Th1 e Th2 na expressão da imunidade (SZABÓ, 1995, FERREIRA E SILVA, 1998, 1999; FERREIRA et al., 2003). Ademais, ensaios anteriores demonstraram a participação de linfócitos T e B na resistência ao carrapato incluindo o uso de drogas supressoras (WIKEL e ALLEN, 1976), testes de blastogênese (WIKEL et al., 1978) e testes cutâneos de hipersensibilidade (WIKEL et al., 1978; WALKER e FLETCHER, 1990). Porém, nem toda resposta imune é característica de resistência eficaz. A presença de determinado tipo de célula inflamatória pode, muitas vezes, estar associada à ação moduladora dos carrapatos contra as barreiras imunológicas de seu hospedeiro. Carrapatos podem agir diretamente no sistema imune, levando a ausência de resistência do hospedeiro (WILLADSEN e JONGEJAN, 1999). A função dos linfócitos Th2 está relacionada com reação de hipersensibilidade imediata, e especula-se que a saliva de carrapatos induza a uma resposta envolvendo estas células (SZABÓ et al., 1995a), já que ela está relacionada com resistência ineficaz contra estes parasitos.

Linfócitos e macrófagos são exemplos de células apresentadoras de antígenos, as quais estão diretamente relacionadas com a resposta imune adquirida. Os linfócitos T participam da resposta de hipersensibilidade tardia, caracterizada por acúmulo de macrófagos, os quais isolam e ajudam a destruir imunógenos (WIKEL, 1996b).

Os macrófagos apresentaram-se ausentes, nos cães vacinados, em 48 e 96h PF, e nos cães não vacinados em 48 e 192h PF. Assim, só houve diferença estatística em 192h PF, com 256,41 macrófagos/mm² nos animais vacinados, enquanto que não havia macrófagos no outro tratamento, no tempo referido.

Os mastócitos foram encontrados ocasionalmente no infiltrado inflamatório, mas com variação estatisticamente significativa apenas em 144h PF com 192,31 mastócitos/mm² nos animais vacinados e ausência nos animais não vacinados, no mesmo período de tempo avaliado. Para ambos os tratamentos, o número de mastócitos diminuiu em 96h, sendo a redução mais drástica para os animais vacinados. Esta redução pode estar relacionada com sua degranulação e com a expansão da derme pela infiltração de leucócitos e pelo edema, uma vez que os mastócitos são residentes normais da pele com tendência a aumentar seu número e se degranularem em caso de reações de hipersensibilidade (MONTEIRO e BECHARA, 2008).

A degranulação dos mastócitos libera mediadores químicos, sendo o principal a histamina. Esta amina biogênica vasoativa desempenha um papel importante na resistência de hospedeiros a carrapatos. Neste contexto, verificou-se que animais resistentes têm concentração tecidual de histamina duas vezes maior do que animais susceptíveis (WIKEL, 1982).

A presença de mastócitos e basófilos, ainda que em quantidade moderada, indica que estas células participam da reação inflamatória como em outras doenças parasitárias (ABBAS et al., 2000). De acordo com trabalho realizado por SZABÓ et al. (1995), os mastócitos podem ser vistos em números significativos na pele de cães parasitados por *Rhipicephalus sanguineus*. Essas células possuem IgE ou IgG de superfície, que são liberadas quando expostas aos antígenos do parasita.

Neste estudo, os basófilos permaneceram ausentes em quase todas as condições experimentais no cão doméstico infestado por carrapato *R. sanguineus* e não foram significativos entre os cães vacinados e não vacinados em todos os tempos.

Em bovinos, Schleger et al. (1976) demonstraram que os basófilos eram raramente observados em locais de fixação de *R. (B.) microplus*. Estas células constituíram apenas uma pequena proporção do infiltrado em locais de fixação de *Hyalomma anatolicum anatolicum* em coelhos (GIL e WALKER, 1985) e praticamente

inexistiram na reação do cão doméstico ao carrapato *R. sanguineus* (SZABÓ et al., 1995).

O papel das células inflamatórias na determinação de resistência a parasitos é complexo e sujeito a muitas indagações. No caso dos carrapatos, basófilos são os mais freqüentemente associados à resistência do hospedeiro (ALLEN, 1973; WIKEL, 1996a).

Pouco se conhece sobre o mecanismo da interrupção no repasto sangüíneo do carrapato, prejudicando a produção de ovos e a viabilidade destes. As substâncias biologicamente ativas liberadas por basófilos, eosinófilos e outros tipos celulares são apenas fatores que podem contribuir no fenômeno da resistência (SOARES et al., 1999).

Diferente da imunidade adquirida a carrapato, a imunidade induzida principalmente por antígenos ocultos não apresenta reações de hipersensibilidade, atuando sobre o estágio adulto do ectoparasito. Os carrapatos sobreviventes são pequenos e apresentam sinais de lesões internas, com cor avermelhada e, ao exame histológico, observam-se severas lesões no trato digestivo (AGBEDE e KEMP, 1985; HERNANDEZ et al., 1999), acompanhadas de redução no peso e postura das fêmeas ingurgitadas (MASSARD et al., 1995; HERNANDEZ et al., 1997, PEREZ PEREZ et al., 2010). Assim, esta imunidade expressa seus efeitos principalmente nos sistemas digestivos e reprodutivos do carrapato.

O principal mecanismo de atuação dos anticorpos contra os antígenos recombinantes rBm86 se dá pelo bloqueio da atividade endocítica das células digestivas do carrapato, associada por conseguinte às lesões (HERNANDEZ et al., 1999).

Os carrapatos são capazes de modular os macrófagos do hospedeiro e a resposta de citocinas de células T, suprimir proliferação de linfócitos T, diminuir a resposta de anticorpos e inibir as atividades dos componentes do sistema complemento. O bloqueio dessas atividades é diretamente sobre elementos da resposta imune envolvidos na aquisição e expressão da resistência adquirida pelo hospedeiro contra as infestações e, conseqüentemente, influenciando também na transmissão de patógenos ao hospedeiro (WIKEL E BERGMAN, 1997).

Os linfócitos são os elementos-chave nas funções efetoras e de regulação do sistema imune, incluindo produção de anticorpos, hipersensibilidade tardia e linfócitos T citotóxicos (GREEN et al., 1983). Infestações repetidas com ninfa de *Ixodes ricinus* em camundongo BALB/c estimularam a migração dos linfócitos dos linfonodos para o local da picada produzindo significantes níveis de fator de necrose tumoral (TNF- μ) e fator estimulador de macrófago (GM-CSF) quando estimulado in vitro com concanavalina A ou com anticorpo anti-CD3 (GANAPAMO et al., 1997).

O GM-CSF induz a maturação das células de Langerhans (células apresentadoras de antígenos ou APCs) na epiderme e induz alta expressão de moléculas do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) classe II (HEUFLER et al., 1988). A migração dessas células da pele para os linfonodos regionais e sua acumulação nesses órgãos secundários é controlada pelo TNF- μ (CUMBERBATCH e KIMBER, 1995).

A supressão da função das APCs e linfócitos T reduz a habilidade de gerar e expressar imunidade efetiva para qualquer tipo de imunógeno, incluindo aqueles associados aos patógenos transmitidos pelo carrapato (WIKEL, 1996).

Os carrapatos devem permanecer em um hospedeiro por vários dias ou semanas até que eles completem a sua alimentação. Para modular as respostas do hospedeiro, potencialmente prejudiciais, os carrapatos inoculam saliva contendo componentes com propriedade anti-hemostática, antiinflamatória e imunossupressora (RIBEIRO, 1987; FRANCISCHETTI et al., 2002). De fato, a saliva de diferentes espécies de carrapatos inibe a função dos neutrófilos, dificulta a ação do sistema complemento, células natural killer (NK) e a atividade de macrófagos, diminui a produção de citocinas, como a interleucina (IL)-12 e interferon- γ (IFN- γ), e diminui a proliferação de células-T (RIBEIRO et al., 1990; FERREIRA e SILVA, 1998). Determinar o mecanismo deste efeito inibitório pode ter implicações importantes sobre a incapacidade do hospedeiro em expressar respostas imunes eficazes a carrapatos e transmissão de patógenos.

Segundo Cavassani et al. (2005), a saliva de *R. sanguineus* é capaz de inibir a diferenciação e maturação de células dendríticas (CD). Este fato pode ter como

conseqüência a diminuição da apresentação de antígenos para células T e, conseqüentemente, a diminuição da ativação de células B e produção de anticorpo.

A identificação de fatores que podem afetar a diferenciação e maturação de CD é crucial, uma vez que estas células, ao invés de macrófagos e monócitos, são responsáveis pela iniciação da imunidade mediada por células-T. Dado que a saliva do carrapato pode dispersar-se, ou mesmo ser transportada e atingir órgãos distantes (KAUFMAN, 1989; SAUER et al., 1995), a perturbação induzida pela saliva no processo de diferenciação das CD poderia resultar em número reduzido dessas células nos tecidos periféricos durante a infestação de carrapatos. A diminuição do número de CD na pele pode ser prejudicial ao desenvolvimento de uma resposta imune anti-carrapato pelo hospedeiro. Além disso, a saliva significativamente bloqueia a maturação terminal de CD, reduz a produção de IL-12 e prejudica a produção de citocinas.

Tendo em conta que os carrapatos inoculam saliva continuamente em seus hospedeiros (KAUFMAN, 1989; SAUER et al., 1995) e que a saliva reduz o número de moléculas co-estimulatórias da CD, é possível que, quando essas células migrem para os linfonodos possam não ativar as células-T de forma eficiente, prejudicando a resposta imune do hospedeiro, como observado in vivo (FERREIRA et al., 2003) e como demonstrado com Herpes simplex vírus, citomegalovírus e *Plasmodium falciparum* (SALIO et al., 1999 e ANDREWS et al., 2001). Segundo CAVASSANI et al. (2005), a saliva do carrapato inibi a produção de IL-12 e esta modulação demonstrou em ratos infestados com carrapatos, uma resposta imune com o desenvolvimento de um padrão de citocinas Th2 (FERREIRA e SILVA, 1999). Estes resultados destacam uma recente propriedade imunomoduladora da saliva do carrapato. Assim, não só a saliva exerce seus efeitos imunossupressores, inibindo a proliferação de células T (RAMACHANDRA e WIKEL, 1992; FERREIRA E SILVA, 1998), mas também prejudicando a função das APCs. Portanto, a resposta imunológica ineficaz gerada na presença de saliva é causada pela inibição da diferenciação e maturação de CD, evitando a polarização das células-T naives. A elucidação dos efeitos da saliva nas CD pode levar à descoberta de novos agentes imunossupressores de amplo interesse terapêutico.

6. CONCLUSÕES

6.1 O antígeno Bm86 elicitava em animais imunizados uma resposta inflamatória caracterizada por hiperplasia da epiderme e alterações circulatórias e infiltração de células inflamatórias na derme, diferentes quanto à prevalência, quando comparadas aos animais controle.

6.2 Nos animais vacinados predominaram neutrófilos, eosinófilos e mastócitos na 48ª hora PF, enquanto que nos não vacinados houve um predomínio de eosinófilos, neutrófilos e linfócitos.

6.3 A partir de 96h PF observou-se um infiltrado celular mais intenso atingindo as camadas mais profundas da derme, e composto principalmente por neutrófilos e linfócitos nos vacinados, e eosinófilos, linfócitos e neutrófilos nos não vacinados.

6.4 Basófilos, diferentemente do que ocorre em imunidade adquirida pós infestações sucessivas, não parecem desempenhar papel crucial no mecanismo de resistência ao carrapato *R. sanguineus* induzido em cães pelo antígeno Bm86.

7. REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Cellular and molecular immunology**. 5th ed., Saunders, 309pp., 2005.

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. **Cellular and molecular immunology**. 4th ed., Saunders, 553pp. 2000.

AGBEDE, R. I. S.; KEMP, D. H.. Digestion in the cattle-tick *Boophilus microplus*: light microscope study of the gut cells in nymphs and females. **International Journal of Parasitology**. v.15, n.2, p.147-157, 1985.

ALLEN, J. R. Immunology of interactions between ticks and laboratory animals. **Experimental and Applied Acarology**, Northwood, v.7, p.5-13, 1989.

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

ALLEN, J. R.; DOUBE, B. M.; KEMP, D. H. Histology of bovine skin reaction to *Ixodes holocyclus*, Neuman. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v.41, p.26-35, 1977.

ANDREWS, D. M.; ANDONIOU, C. E.; GRANUCCI, F.; RICCIARDI-CASTAGNOLI P.; DEGLI-ESPOSTI, M. A.. Infection of dendritic cells by murine cytomegalovirus induces functional paralysis. **Nature Immunology**, v.2, p.1077–1084, 2001.

BALASHOV, Y. S.. Bloodsucking ticks (Ixodoidea) vector of diseases of man and animals. **Miscellaneous Publications Entomological Society America**. v.8, n.5, p.276-296, 1972.

BEAUDOUIN, E.; KANNY, G.; GUERIN, B.; GUERIN, L.; PLENAT, F.; MONERETVAUTRIN, D. A. Usual manifestation of hypersensitivity after a tick bite: report of two cases. **Annals of Allergy, Asthma, & Immunology**, v.79, p.43-46, 1997.

BECHARA, G. H.; MORELLI JUNIOR, J.; SZABÓ, M. P. J. Skin test and tick immune status in susceptible and resistant cattle in Brazil. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.916, p.570-575, 2000.

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. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.52, p.79-90, 1994.

BOUÉ, O.; REDONDO, M.; MONTERO, C.; RODRÍGUEZ, M.; de LA FUENTE, J. Reproductive and safety assessment of vaccination with Gavac against the cattle tick (*Boophilus microplus*). **Theriogenology**, v.51, n.8, p.1547-1554, 1999.

BOWMAN, A. S.; SAUER, J. R.; ZHU, K.; DILLWITH, J. W.. Biosynthesis of salivary prostaglandins in the lone star tick, *Amblyomma americanum*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.25, n.6, p.735-41, 1995.

BROSSARD, M.; WIKEL, S. K. Immunology of interactions between ticks and hosts. **Medical and Veterinary Entomology**, v.11, p.270-276, 1997.

BROSSARD, M. Rabbits infested with adult *Ixodes ricinus* L.: effects of mepyramine on acquired resistance. **Experientia**, v.38, p.702-704, 1982.

BROWN, S.J. Highlights of contemporary research on host immune responses to ticks. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.28, p.321-334, 1988.

BROWN, S. J. Immunology of acquired resistance to ticks. **Parasitology Today**, v.1, p.165-171, 1985.

BROWN, S. J.; ASKENASE, P. W. Blood eosinophils and basophils response in guinea pigs parasitized by *Amblyomma americanum* ticks. **American Journal of Medicine and Hygiene**, v.31, n.3, p.593-598, 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.147-165. 1984.

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. **The Journal of Immunology**, v.129, p.790-796, 1982.

CARVALHO, W. A.. **O papel das imunidades nas relações parasito-hospedeiro: o carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e bovinos resistentes ou susceptíveis**. Jaboticabal, 2006. Dissertação (mestrado) apresentada a Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, campus de Jaboticabal. 2006. xii, 113f. :il.; 28cm.

CASTRO, J. J., NEWSON, R. M. Host resistance in cattle tick control. **Parasitology Today**, Cambridge, v.9, p.13-17, 1993.

CAVASSANI, K. A.; ALIBERTI, J. C.; DIAS, A. R.; SILVA, J. S.; FERREIRA, B. R.. Tick saliva inhibits differentiation, maturation and function of murine bone-marrow-derived dendritic cells. **Immunology**, v.114, n.2, p.235-245, 2005.

CHAHAUD, A. G. L'infestation par des ixodints provoque-t-elle une immunité chez l-h&e (2 rae note). **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v.25,p.474-479, 1950.

CIPRANDI, A.; HORN, F.; TERMIGNONI, C.. Saliva de animais hematófagos: fonte de novos anticoagulantes. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.25, p.250-262, 2003.

CUMBERBATCH, M.; KIMBER, I.. Tumour necrosis factor- α is required for accumulation of dendritic cells in draining lymph nodes for optimal contact sensitization. **Immunology**, v.84, p.31–35, 1985.

CUPP, E. W. Biology of ticks. The Veterinary clinics of North America. **Small Animal Practice**, v.21, n.1, p.1-25, 1991.

DAIX, V.; SCHROEDER, H.; PRAET, N.; GEORGIN, J. P.; CHIAPPINO, I.; GILLET, L.; DE FAYS, K.; DECREM, Y.; LÉBOULLE, G.; GODFROID, E.; BOLLEN, A.; PASTORET, P. P.; GERN, L.; SHARP, P. M.; VANDERPLASSCHEN, A.. *Ixodes* ticks belonging to the *Ixodes ricinus* complex encode a family of anticomplement proteins. **Insect Molecular Biology**, v.16, p.155-166, 2007.

DANTAS-TORRES, F.; FIGUEREDO, L. A.; BRANDAO-FILHO, S. P.. *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae), the brown dog tick, parasitizing humans in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.39., n.1, p. 64-67, 2006.

DANTAS-TORRES, F. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): from taxonomy to control. **Veterinary Parasitology**, v.152, p.173–185, 2008.

FERREIRA, B. R.; SILVA, J. S. Saliva of *Rhipicephalus sanguineus* tick impairs T cell proliferation and IFN- γ -induced macrophage microbicidal activity. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.64, p.279-293, 1998.

FERREIRA, B. R.; SILVA, J. S. Successive tick infestations selectively promote a T helper2 cytokine profile in mice. **Immunology**, v.96, p.434-440, 1999.

FERREIRA, B. R.; SZABÓ, M. J. P.; CAVASSANI, K. A.; BECHARA, G. H.; SILVA, J. S. Antigenes from *Rhipicephalus sanguineus* ticks elicit potent cell-mediated immune responses in resistant but not in susceptible animals. **Veterinary Parasitology**, v.115, p.35-48, 2003.

FRANCISCHETTI, I. M. B.; VALENZUELA J. G.; ANDERSEN J. F.; MATHER T. N.; RIBEIRO J. M. C.. Ixolaris, a novel recombinant tissue factor pathway inhibitor (TFPI) from the salivary gland of the tick, *Ixodes scapularis*: identification of factor X and factor Xa as scaffolds for the inhibition of factor VIIa/tissue factor complex. **Blood**, v.99, p.3602–3612, 2002.

GANAPAMO, F.; RUTTI, B.; BROSSARD, M. *In vitro* production of interleukin-4 and interferon-[gamma] by lymph node cells from BALB/c mice infested with nymphal *Ixodes ricinus* ticks. **Immunology**, v.85, f.1, p.120-124, 1995.

GANAPAMO, F.; RUTTI, B.; BROSSARD, M. Immunesuppression and cytokine production in mice infested with *Ixodes ricinus* ticks: a possible role of laminin and interleukin-10 on the *in vitro* responsiveness of lymphocytes to mitogens. **Immunology**, v.87, f.2, p.259-263, 1996.

GANAPAMO, F.; RUTTI, B.; BROSSARD, M.. Identification of an *Ixodes ricinus* salivary gland fraction through its ability to simulate CD4 cells present in BALB/c mice lymph nodes draining the the tick fixation site. **Parasitology**, v.115, p.91–96, 1997.

GARIN, N. S.; GRABAREV, P. A. Protective reactions in rabbits and guinea-pigs upon repeated feeding on them of ixodid ticks *Rhipicephalus sanguineus* (Latr, 1806).] **Med. Parazitol. Parazit. Bolezni**, 41: 274-279. 1972. (in Russian, with English summary).

GILL, H. S.; WALKER, A. R. Differential cellular responses at *Hyalomma anatolicum anatolicum* feeding sites on susceptible and tick resistant rabbits. **Parasitology**, v.91, p.591-607, 1985.

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

GREEN, D. R.; FLOOD, P. M.; GERSHON, R. K.. Immunoregulatory T-cell pathways. **Annual Review of Immunology**, v.1, p.439-463, 1983.

GREENE, C. E. **Infectious disease of the dog and cat**. 2 ed. Philadelphia: WB Saunders, 1998.

HARWOOD, R. F.; JAMES, M. T. **Entomology in human and animal health**. 7th ed. Macmillan Publishing Co., New York, p. 548, 1979.

HERNANDEZ, C. A.; MASSARD, C. L.; SOARES, C. O.; FONSECA, A. H.. Alterações histológicas do trato digestivo de *Boophilus microplus* pela ação de anticorpos Anti-rBm 86. **Revista Brasileira de Parasitologia**, v. 19, n. 5, p. 33-37, 1997.

HERNANDEZ, C.; MASSARD, C. L.; SOARES, C. O.; FONSECA, A. H.. Alterações histológicas do trato digestivo de *Boophilus microplus* pela ação de anticorpos anti-rBm86. **Revista Brasileira de Patologia Veterinária**. v.6, n.1, p. 26-30, 1999.

HEUFLER, C.; KOCH, F.; SCULER, G.. Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin 1 mediate the maturation of murine epidermal Langerhans cells into potent immunostimulatory dendritic cells. **Journal of Experimental Medicine**, v.167, p.700–705, 1988.

HORN, F.; SANTOS, P. C.; TERMIGNONI, C. *Boophilus microplus* anticoagulant protein: antithrombin inhibitor isolated from the tick saliva. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.384, p.68-73, 2000.

IMAMURA, S.; da SILVA VAZ JUNIOR, I.; SUGINO M.; OHASHI, K.; ONUMA, M. A serine protease inhibitor (serpin) from *Haemaphysalis longicornis* as an anti-tick vaccine. **Vaccine**, v.23, n.10, p.1301-1311, 2005.

INOKUMA, H.; KEMP, D. H.; WILLADSEN, P. Comparison of prostaglandin E2 (PGE2) in salivary gland of *Boophilus microplus*, *Haemaphysalis longicornis* and *Ixodes holocyclus*, and quantification of PGE2 in saliva, hemolymph, ovary and gut of *B. microplus*. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v.56, p.1217-1218, 1994.

JONES, L. D. The eosinophil. **Journal of Comparative Pathology**, v.108, p.317-335, 1993.

JONGEJAN, F.; PEGRAM, R. G.; ZIVKOVIC, D.; HENSEN, E.J.; MWASE, E.T.; THIELEMANS, M.J.; COSSE, A.; NIEWOLD, T.A.; EL SAID, A.; UILENBERG, G. Monitoring of naturally acquired and artificially induced immunity to *Amblyomma variegatum* and *Rhipicephalus appendiculatus* ticks under field conditions. **Experimental and Applied Acarology**, Northwood, v.7, p.181-199, 1989.

KAUFMAN, W.R. Tick-host interaction: a synthesis of current concepts. **Parasitology Today**, v.5, n.2, p.47-56, 1989.

KAY, B. H.; KEMP, D. H. Vaccines against arthropods. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 50, p. 87-96, 1994.

KEMP, D. H.; BOURNE, A. *Boophilus microplus*: the effect of histamine on the attachment of cattle tick larvae-studies "in vivo" and "in vitro". **Parasitology**, v.80, p.487-496, 1980.

KEMP, D. H.; PEARSON, R. D.; GOUGH, J. M.; WILLADSEN, P. Vaccination against *Boophilus microplus*: localization of antigens on tick gut cells and their interaction with the host immune system. **Experimental and Applied Acarology**, v.7, p.43-58, 1989.

LABRUNA, M. B.; PEREIRA, M. C. Carrapato em cães no Brasil. **Clínica Veterinária**, v.30, p.24-32, 2001.

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

LATIF, A. A.; MAINA, J. N.; DHADIALLA, T. S.; NOKOE, S. Histological reaction to bite of *Amblyomma variegatum* and *Rhipicephalus appendiculatus* (Acari:Ixodidae) fed simultaneous on naïve or sensitized rabbits. **Journal of Medical Entomology**, Lanham, v.27, n.3, p.316-323, 1990.

LIMA e SILVA, M. F.; SZABÓ, M. P.; BECHARA, G. H. Microscopic features of tick-bite lesions in anteaters and armadillos: Emas National Park and the Pantanal region of Brazil. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v.1026, p.235-241, 2004.

MARSAUDON, E.; CAMENEM, J.; TESTOU, D.; BOURREE, P.; SAMSON, P.; LUNEAU, F. Une babesiose humaine a *Babesia canis*, responsable d'une anurie de 40 jours. **Annales de Médecine Interne**, v.146, n.6, p.451-452, 1995.

MASSARD, C. L.; FONSECA, A. H.; BITTENCOURT, V. R. E. P.; OLIVEIRA, J. B.; SILVA, K. M. M.. Avaliação da eficácia da vacina recombinante rBm86 - Gavac contra o carrapato *Boophilus microplus* no Brasil. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 17, n. 4, p. 167-178, 1995.

MATTIOLI, R. C. Comment on "A possible explanation of the apparent breed-related resistance in cattle to bont tick (*Amblyomma hebraeum*) infestations" by M.I. Meltzer, *Veterinary Parasitology*. v.67, p.275-279, 1996. **Veterinary Parasitology**, v.16, n.79(3), p.263-266, 1998.

McEWEN, B. J. Eosinophils: a review. **Veterinary Research Communication**, v.16, p.11-44, 1992.

McLAREN, D. J.; WORMS, M.J.; ASKENASE, P. W. Cutaneous basophil associated resistance to ectoparasites (ticks). Electron microscopy of *Rhipicephalus appendiculatus* larval feeding sites in actively sensitized guinea-pigs and recipients of immune serum. **Journal of Pathology**, v.139, p.291-308, 1983.

MEJRI, N.; BROSSARD, M. Splenic dendritic cells pulsed with *Ixodes ricinus* tick saliva prime naïve CD4⁺t to induce Th2 cell differentiation *in vitro* and *in vivo*. **International immunology**, v.19, p.535-543, 2007.

MELTZER, M. I. A possible explanation of the apparent breed-related resistance in cattle to bont tick (*Amblyomma hebraeum*) infestations. **Veterinary Parasitology**, v.31, n.67(3-4), p.275-279, 1996.

MONTEIRO, G. E. R. **Avaliação da resistência em caprinos a ninfas do carrapato *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) e da reatividade cruzada com *A. hebraeum* (Koch, 1844) (Acari:Ixodidae)**. Jaboticabal, 2007. Dissertação (mestrado) apresentada a Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, campus de Jaboticabal. 2007 . xiii, 82 f. : il. ; 28 cm.

MONTEIRO, G. E.; BECHARA, G.H. Cutaneous basophilia in the resistance of goats to *Amblyomma cajennense* nymphs after repeated infestations. **Animal Biodiversity and Emerging Diseases: Annals of the New York Academy of Sciences**, 1149: 221–225. 2008.

OBEREM, P.T. The immunological basis of host resistance to ticks – a review. **Journal of the South Africa Veterinary Association**, Pretoria, v.55, n.4, p.215-217, 1984.

OLIVEIRA, P. R.; BECHARA, G. H.; MARIN-MORALES, M. A.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Action of the chemical agent fipronil on the reproductive process of semi-engorged females of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae).

Ultrastructural evaluation of ovary cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, p. 1255–1264, 2009.

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

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.

PARIZI, L. F.; MASUDA, A.; da SILVA VAZ JR., I. Modulação da resposta imune do hospedeiro pelos carrapatos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.35, n.3, p.285-294, 2007.

PÉREZ PÉREZ, D. **Efecto de la inmunización con la proteína Bm86 sobre los estadios de la garrapata *Rhipicephalus sanguineus***. 2009. 66f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”, Havana, Cuba, 2009.

PÉREZ PÉREZ, D.; BECHARA, G. H.; MACHADO, R. Z.; ANDRADE, G. M.; DEL VECCHIO, R. E.; PEDROSO, M. S.; HERNÁNDEZ, M. V.; FARNÓS, O. Efficacy of the Bm86 antigen against immature instars and adults of the dog tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v.167, p.321–326, 2010.

RADULOVIC, S.; FENG, H. M.; CROCQUET VALDES, P.; MOROVIC, M.; DZELALIJA B.; WALKER, D. H. Antigen-capture enzyme immunoassay: a comparison with other methods for the detection of spotted fever group rickettsiae in ticks. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.50, n.3, p.359-364, 1994.

RAMACHANDRA, R.; WIKEL, S. K.. Modulation of host-immune responses by ticks (Acari: Ixodidae): Effect of salivary gland extracts on host macrophages and lymphocyte cytokine production. **Journal of Medical Entomology**, v.29, p.818–826, 1992.

RAND, N.; MOORE, T.; SRISKANTHA, A.; SPRING, K.; TELLAM, R.; WILLADSEN, P.; COBON, G. Cloning and expression of a protective antigen from the cattle tick *Boophilus microplus*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.86, p. 9657-9661, 1989.

RIBEIRO, J. M. C.. Role of saliva blood-feeding by arthropods. **Annual Review of Entomology**, v.32, p.463–478, 1987.

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

RIBEIRO, J. M. C.; MAKOUL, G. T.; LEVINE, J.; ROBINSON, D. R.; SPIELMAN, A. Antihemostatic, antiinflammatory, and immunosuppressive properties of the saliva of a tick, *Ixodes dammini*. **Journal of Experimental Medicine**, v.161, p.332–344, 1985.

RIBEIRO, J. M. C.; MATHER, T. N. *Ixodes scapularis*: salivary kininase activity is a metallodipeptidyl carboxypeptidase. **Experimental Parasitology**, v. 89, p.213-221, 1998.

RIBEIRO, J. M. C.; WEIS, J. J.; TELFORD, S. R.. Saliva of the tick *Ixodes dammini* inhibits neutrophil function. **Experimental Parasitology**, v.70, p.382–388, 1990.

RODRIGUEZ, M.; RUBIERA, R.; PENICHET, M. High level expression of the *B. microplus* Bm86 antigen in the yeast *Pichia pastoris* forming highly immunogenic particles for cattle. **Journal of Biotechnology**, v.33, p.135-146, 1994.

RODRIGUEZ, M.; MASSARD, C. L. DA FONSECA; RAMOS, N. F.; MACHADO, H.; LABARTA, V.; DE LA FUENTE, J. Effect of vaccination with a recombinant Bm86 antigen presentation on infestations of *Boophilus microplus* in grazing dairy and beef pure and crossbred cattle in Brazil. **Vaccine**, v.13, n.18, p.1804-1808, 1995a.

RODRIGUEZ, M., PENICHER, M. L., MOURIS, A. E. Control of *Boophilus microplus* populations in grazing cattle vaccinated with a recombinant Bm86 antigen preparation. **Veterinary Parasitology**, v.57, p.339-349, 1995b.

ROUX, V.; EYKYN, S. J.; WYLLIE, S.; RAOULT, D. *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* as an agent of afebrile blood culture-negative endocarditis in a human. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, n.4, p.1698-1700, 2000.

SALIO, M.; CELLA, M.; SUTER, M.; LANZAVECCHIA A.. Inhibition of dendritic cell maturation by herpes simplex virus. **European Journal of Immunology**, v.29, p.3245–3253, 1999.

SANDERS, M. L.; GLASS, G. E.; NADELMAN, R. B.; WORMSER, G. P.; SCOTT, A. L.; RAHA, S.; RITCHIE, B. C.; JAWORSKI, D. C.; SCHWARTZ, B. S. Antibody levels to recombinant tick calreticulin increase in humans after exposure to *Ixodes scapularis* and are correlated with tick engorgement indices. **American Journal of Epidemiology**, v.149, p.777- 784, 1999.

SAUER, J. R.; McSWAIN, J. L.; BOWMAN, A. S.; ESSENBERG, R. Tick salivary gland physiology. **Annual Review of Entomology**, v.40, p.245-267, 1995.

SCHLEGER, A. V.; LINCOLN, D. T.; MCKENNA, R. V.; KEMP, D. H.; ROBERTS, J. A. *Boophilus microplus*: cellular response to larval attachment and their relationship to host resistance. **Australian Journal of Biological Science**, v.29, p.499-512, 1976.

SOARES, C. O.; MASSARD, C. L.; HERNANDEZ, C. A.; FONSECA, A. H.. **Resposta imune contra artrópodes parasitas**. In: *Imunodiagnóstico de Medicina Veterinária*. Embrapa-CNPQC. Campo Grande: Embrapa Gado de corte, p.37-67, 1999.

STEEVES, E. B. T.; ALLEN, J. R. Basophils in skin reactions of mast cell-deficient mice infested with *Dermacentor variabilis*. **International Journal for Parasitology**, v.20, n.5, p.655-667, 1990.

SZABÓ, M.P.J. Aspectos imunopatológicos da resistência a carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) em cães e cobaias. Dissertação (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1995.

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

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 infected, vaccinated or tick-bite naive dogs, guinea pigs and hamsters. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science** , v.32, n.1, p.37-42, 1995.

SZABÓ M. P. J.; BECHARA G. H.. Immunisation of dogs and guinea pigs against *Rhipicephalus sanguineus* ticks using gut extract. **Veterinary Parasitology**, v.68, p. 283-294, 1997.

SZABÓ, M. P. J.; BECHARA, G. H. Sequential histopathology at the *Rhipicephalus sanguineus* tick feeding site on dogs and guinea pigs. **Experimental and Applied Acarology**, v.23, f.11, p.915-928, 1999.

SZABÓ, M. P. J.; MORELLI JUNIOR, J.; BECHARA, G. H. Cutaneous hypersensitivity induced in dogs and guinea pigs by extracts of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Acari:Ixodidae). **Experimental and Applied Acarology**, v.19, p.723-730, 1995a.

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 repeated infestations with adult ticks *Rhipicephalus sanguineus* (Acari:Ixodidae). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.32, p.43-50, 1995b.

TATCHELL, R.J. Host-parasite interactions and the feeding of blood-sucking arthropods. **Parasitology**, Cambridge, v.59, p.93-104, 1969.

THEIS, J. H.; BUDWISER, P. D. *Rhipicephalus sanguineus*: sequential histopathology at the host-arthropod interface. **Experimental Parasitology**, v.36, f.1, p.77-105, 1974.

TITUS, R. G; BISHOP, J. V.; MEJIA, J. S. The immunomodulatory factors of arthropod saliva and the potential for these factors to serve as vaccine targets to prevent pathogen transmission. **Parasite Immunology**, v.28, p.131-141, 2006.

TURNBULL, I. F.; SMITH, D. R. J.; 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.

TURNI, C.; LEE, R. P.; JACKSON, L. A. The effects of salivary gland extracts from *Boophilus microplus* ticks on mitogen-stimulated bovine lymphocytes. **Veterinary Research Communications**, v.31, p.545-552, 2007.

UNVER, A.; PEREZ, M.; ORELLANA, N.; HUANG, H.; RIKIHISA, Y. Molecular and antigenic comparison of *Ehrlichia canis* isolates from dogs, ticks, and a human in Venezuela. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, n.8, p.2788-2793, 2001.

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

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

WALKER, A.R.; FLETCHER, J.D. Skin test to detect resistance of cattle to *Rhipicephalus appendiculatus* fed on ticks. **Medical and Veterinary Entomology**, v.4, p.321-325, 1990.

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

WEISS, S.J. Tissue destruction by neutrophils. **New England Journal of Medicine**, v.320, n.6, p.365-76, 1989.

WIKEL, S.K. Histamine content of tick attachment sites and the effects of H1 and H2 histamine antagonists on the expressions of resistance. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v.76, n.2, p.172-85, 1982.

WIKEL, S. K. Host immunity to ticks. **Annual Review of Entomology**, v.41, p.1-22, 1996a.

WIKEL, S.K. Immunology of the skin. In: ----- (Ed.) **The immunology of host ectoparasites arthropod relationships**. Wallingford: Cab International, p.1-29. 1996b.

WIKEL, S. K. Immunological control of hematophagous arthropod vectors: utilization of novel antigens. **Veterinary Parasitology**, v .29, p. 235-264, 1988.

WIKEL, S.K.; ALLEN, J.R. Acquired resistance to ticks. II. Effects of cyclophosphamide on resistance. **Immunology**, v.30, p.479-484, 1976.

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.169-196. 1982.

WIKEL, S. K.; BERGMAN, D. Tick-host immunology: significant advantages and challenging opportunities. **Parasitology Today**, Cambridge, v.13, n.10, p.383-389, 1997.

WIKEL, S.K.; GRAHAM, J.E.; ALLEN, J.R. Acquired resistance to ticks. IV. Skin reactivity and in vitro lymphocyte responsiveness to salivary gland antigen. **Immunology**, v.34, p.257-263, 1978.

WIKEL, S. K; RAMACHANDRA, R. N.; BERGMAN, D. K. Tick-induced modulation of the host immune response. **International Journal for Parasitology**, v.24, p.59-66, 1994.

WILLADSEN, P. Immunity to ticks. **Qdv. Parasitol.**, v.18, p.293-313., 1980.

WILLADSEN, P.; JONGEJAN, F. Immunology of the tick-host interaction and the control of ticks and tick-borne diseases. **Parasitology Today**, v.15, p.258-262, 1999.

WILLADSEN, P.; KEMP, D. H. Vaccination with 'concealed' antigens for tick control. **Parasitology Today**, v. 4, p. 196-198, 1988.

WILLADSEN, P.; RIDING, G. A.; MCKENNA, R. V.; KEMP, D. H.; TELLAM, R. L. NIELSEN, J. N.; LAHNSTEIN, J.; COBON, G. S.; GOUGH, J. M. Immunologic control of a parasitic arthropod. Identification of a protective antigen from *Boophilus microplus*. **Journal of Immunology**, v.143, p.1346-1351, 1989.

8. APÊNDICE

Contagem do número de células inflamatórias presentes em cães vacinados com antígeno Bm86 (tratamento 1) e cães não vacinados (tratamento 2) em diferentes intervalos de tempo (48, 96, 144, 192 horas) após a fixação do carrapato *Rhipicephalus sanguineus*, com 6 repetições. Valores corrigidos para nº células/mm². Eosinófilo (Eosin), Linfócito (Linf), Neutrófilo (Neutro), Mastócito (Mast), Macrófago (Macróf), Plasmócito (Plasmo) e Basófilo (Baso).

Obs	Trat	Tempo	Repet	Eosin	Linf	Neutro	Mast	Macróf	Plasmo	Baso
1	1	48	1	0.00	0.00	576.92	192.31	0.000	0.00	0.00
2	1	48	2	192.31	192.31	384.62	192.31	0.000	0.00	0.00
3	1	48	3	0.00	0.00	384.62	0.000	0.000	0.00	0.00
4	1	48	4	0.00	192.31	192.31	192.31	0.000	192.31	0.00
5	1	48	5	961.54	192.31	0.00	192.31	0.000	0.00	0.00
6	1	48	6	0.00	192.31	0.00	384.61	0.000	0.00	0.00
7	2	48	1	1538.46	384.62	4230.77	0.000	0.000	384.61	0.00
8	2	48	2	2692.31	576.92	5000.00	0.000	0.000	0.00	0.00
9	2	48	3	1730.77	384.62	384.62	192.31	0.000	0.00	0.00
10	2	48	4	3269.23	384.62	576.92	192.31	0.000	0.00	0.00
11	2	48	5	2500.00	576.92	961.54	192.31	0.000	0.00	0.00
12	2	48	6	3653.85	769.23	576.92	192.31	0.000	0.00	0.00
13	1	96	1	0.00	384.62	1923.08	0.00	0.000	0.00	0.00
14	1	96	2	0.00	576.92	2307.69	0.00	0.000	0.00	0.00
15	1	96	3	0.00	384.62	1923.08	0.00	0.000	0.00	0.00
16	1	96	4	0.00	576.92	1730.77	0.00	0.000	0.00	0.00
17	1	96	5	0.00	1346.15	1538.46	0.00	0.000	0.00	0.00
18	1	96	6	0.00	192.31	2692.31	0.00	0.000	0.00	0.00
19	2	96	1	1153.85	961.54	384.62	0.00	0.000	192.31	0.00
20	2	96	2	1346.15	1153.85	192.31	0.00	192.308	192.31	0.00
21	2	96	3	576.92	576.92	192.31	192.31	0.000	192.31	0.00
22	2	96	4	1730.77	384.62	0.00	192.31	0.000	0.00	0.00

Obs	Trat	Tempo	Repet	Eosin	Linf	Neutro	Mast	Macróf	Plasmo	Baso
23	2	96	5	192.31	769.23	192.31	192.31	0.000	0.00	0.00
24	2	96	6	192.31	576.92	0.00	0.00	0.000	192.31	192.31
25	1	144	1	961.54	0.00	1346.15	0.00	0.000	192.31	0.00
26	1	144	2	0.00	0.00	576.92	384.615	0.000	192.31	0.00
27	1	144	3	1923.08	0.00	961.54	384.615	0.000	384.61	0.00
28	1	144	4	1346.15	0.00	576.92	0.000	0.000	0.00	1.00
29	1	144	6	961.54	0.00	384.62	192.31	192.308	0.00	0.00
30	2	144	1	576.92	0.00	3846.15	0.00	192.308	0.00	0.00
31	2	144	2	384.62	0.00	5384.62	0.00	192.31	0.00	0.00
32	2	144	3	961.54	0.00	2692.31	0.00	0.00	0.00	0.00
33	2	144	4	1153.85	0.00	2500.00	0.00	0.00	0.00	0.00
34	2	144	5	2692.31	0.00	1538.46	0.00	192.31	0.00	0.00
35	2	144	6	2307.69	0.00	2115.38	0.00	0.00	0.00	0.00
36	1	192	1	0.00	384.62	384.62	0.00	192.31	0.00	0.00
37	1	192	2	0.00	192.31	192.31	0.00	192.31	0.00	0.00
38	1	192	3	0.00	0.00	1346.15	0.00	192.31	0.00	0.00
39	1	192	4	0.00	0.00	384.62	0.00	192.31	0.00	0.00
40	1	192	5	192.31	0.00	576.92	0.00	0.00	0.00	0.00
41	1	192	6	0.00	0.00	192.31	0.00	769.23	0.00	192.31
42	2	192	1	192.31	192.31	7307.69	0.00	0.00	0.00	0.00
43	2	192	2	384.62	384.62	4038.46	0.00	0.00	0.00	0.00
44	2	192	3	384.62	192.31	6346.15	0.00	0.00	0.00	0.00
45	2	192	4	384.62	192.31	2884.62	192.31	0.00	0.00	0.00
46	2	192	5	192.31	0.00	2307.69	384.61	0.00	192.31	0.00
47	2	192	6	576.92	0.00	2692.31	0.00	0.00	0.00	0.00