

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

**AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA EM CAPRINOS A NINFAS DO
CARRAPATO *Amblyomma cajennense* (FABRICIUS, 1787) E DA
REATIVIDADE CRUZADA COM *A. hebraeum*
(KOCH, 1844) (ACARI:IXODIDAE).**

Gaby Ermelindo Roberto Monteiro

Orientador: Prof. Dr. Gervásio Henrique Bechara

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária (Patologia Animal).

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

2007

Monteiro, Gaby Ermelindo Roberto
M775a Avaliação da resistência em caprinos a ninfas do carrapato
Amblyomma cajennense (Fabricius, 1787) e da reatividade cruzada
com *A. hebraeum* (Koch, 1844) (Acari:Ixodidae)/ Gaby Ermelindo
Roberto Monteiro. -- Jaboticabal, 2007
xiii, 82 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2007
Orientador: Gervásio Henrique Bechara
Banca examinadora: Romário Cerqueira Leite, Rosângela
Zacarias Machado
Bibliografia

1. *Amblyomma cajennense*. 2. *Amblyomma hebraeum*. 3.
Caprino. 4. Reatividade cruzada. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias

CDU 619:616.995.42:636.3

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

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

GABY ERMELINDO ROBERTO MONTEIRO - nascida em 28 de maio de 1978, na cidade de Maputo, Moçambique, é Médica Veterinária, graduada pela Universidade Eduardo Mondlane (UEM) – Moçambique, em Setembro de 2003. Atua como docente assistente na secção de Anatomia Patológica da Faculdade de Veterinária da Universidade Eduardo Mondlane, desde Fevereiro de 2004. Iniciou em Março de 2005 o mestrado no programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, da Universidade Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal, sob orientação do Prof. Dr. Gervásio Henrique Bechara, com bolsa do CNPq (programa PEC-PG). Atualmente possui resumos apresentados em congressos nacionais (n=2) e internacionais (n=2).

SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	iv
ÍNDICE DE TABELAS.....	v
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
ABREVIATURAS.....	viii
RESUMO.....	ix
SUMMARY.....	xi
I. INTRODUÇÃO.....	1
II. REVISÃO DA LITERATURA.....	4
2.1. Importância econômica e sanitária dos carrapatos.....	4
2.2. Controle de carrapatos.....	4
2.3. <i>Amblyomma cajennense</i>	7
2.4. <i>Amblyomma hebraeum</i>	8
2.5. Mecanismos de resistência a carrapatos.....	10
III. OBJETIVOS.....	23
3.1. Objetivos gerais.....	23
3.2. Objetivos específicos.....	23
IV. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
4.1. Parasita.....	24
4.2. Hospedeiro.....	24
4.2.1. Grupos experimentais.....	25
4.3. Infestações controladas.....	25
4.3.1. Determinação de parâmetros biológicos.....	27
4.3.2. Hemograma.....	27
4.4. Exame histopatológico.....	28
4.4.1. Contagens celulares na área da lesão.....	29
4.5. Realização de ensaio imunoistoquímico.....	29
4.5.1. Colheita de linfonodos regionais.....	29
4.5.2. Procedimento imunoistoquímico.....	30
4.5.3. Anticorpos primários.....	30

4.6. “Western Blotting”	31
4.6.1. Material colhido em Moçambique.....	31
4.6.2. Preparação do extrato total de ninfas de <i>A. Cajennense</i>	31
4.6.3. Técnica de SDS-PAGE.....	32
4.6.4. Técnica de “Western Blotting”	32
4.6.5. Absorção de anticorpos nos soros controle.....	33
4.6.6. Cálculo do peso molecular das proteínas.....	33
4.7. Análise estatística.....	34
V. RESULTADOS.....	35
5.1. Parâmetros biológicos dos carrapatos.....	35
5.2. Resposta do hospedeiro à alimentação dos carrapatos.....	35
5.2.1. Alterações macroscópicas no local de fixação dos carrapatos.....	35
5.2.2. Histopatologia do local de fixação dos carrapatos.....	37
5.2.3. Contagem de células na área da lesão.....	40
5.3. Hemograma.....	42
5.4. Imunoistoquímica de linfonodos regionais.....	43
5.5. “Western blotting”	45
VI. DISCUSSÃO.....	47
VII. CONCLUSÕES.....	61
VIII. REFERÊNCIAS.....	62

ÍNDICE DE TABELAS

- Tabela 1.** Anticorpos primários usados nas reações de imunistoquímica de linfonodos drenantes de locais de fixação de ninfas de *A. cajennense* em caprinos.....30
- Tabela 2.** Parâmetros médios observados em ninfas de *A. cajennense* durante infestações sucessivas e controladas em caprinos e realizadas a intervalos de 30 dias. Resultados expressos em média \pm desvio padrão. Jaboticabal, 2007.....35
- Tabela 3.** Eritrograma de caprinos infestados com ninfas de *A. cajennense* realizado antes das infestações e 30 dias depois de cada infestação. Jaboticabal, 2007.....42
- Tabela 4.** Leucograma de caprinos infestados com ninfas de *A. cajennense* realizado antes das infestações e 30 dias depois de cada infestação. Jaboticabal, 2007.....42
- Tabela 5.** Análise imunistoquímica de células apresentadoras de antígeno, infiltrando linfonodos drenantes de local de fixação de ninfas de *A. cajennense* em caprinos durante a primeira e terceira infestações. Jaboticabal, 2007.....43

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Câmaras para alimentação de carrapatos. Em A, desenho esquemático; observar tampa (a), anel de borracha (e), base do frasco (f). Em B, câmara fixada à pele depilada de caprino e em C, tampa mostrando orifício telado para aeração da câmara (seta)..... 26
- Figura 2.** Pele de caprino infestada com ninfas de *A. cajennense*. Em A, notar hiperemia ativa local, hemorragia (seta branca) e presença de ninfas ingurgitadas (setas pretas), vesículas rompidas expondo conteúdo seroso (v) e vesículas intactas (a). Em B, detalhe de A.....37
- Figura 3.** Histopatologia do local de fixação de ninfas de *A. cajennense* em caprinos: A- pele normal, antes da infestação: notar epiderme (ep) e derme (de) inalteradas (Obj. 40x). B- pele infestada: notar hiperplasia, vacuolização celular e vesículas contendo células inflamatórias (v) na epiderme (Obj. 10x). C- visão geral da lesão com presença de cone de cimento (cc), peças bucais do carrapato (seta) e derme (de) com infiltrado inflamatório (Obj. 10x). D- detalhe de C (Obj. 20x). E- notar cone de cimento (cc) e cavidade alimentar (seta) (Obj. 10x). F- detalhe de E (Obj. 40x). Coloração HE.....38
- Figura 4.** Fotomicrografias de pele de caprino durante infestações com ninfas de *A. cajennense*. Em A, B e C detalhes do infiltrado celular evidenciando eosinófilos (e), mastócitos (m) e basófilos (b). Coloração May Grünwald & Giemsa (Obj. 100x).....39
- Figura 5.** Contagem diferencial de células inflamatórias em área adjacente à lesão de fixação de ninfas de *A. cajennense* em caprinos durante a primeira, segunda e terceira infestações. *Diferenças estatisticamente significantes (Teste de Tukey, 5%). Jaboticabal, 2007.....41
- Figura 6.** Imunoistoquímica de linfonodos drenantes de área de fixação de ninfas de *A. cajennense*. (A) Linfonodo controle da reação (obj. 10x); (B) Células marcadas com anti-CD21: notar marcação no folículo linfático de linfonodo de 3ª infestação (obj. 40x); (D) Células da região para-cortical do linfonodo de 3ª infestação marcadas com o anticorpo anti-CD11b (obj. 40x); (E) Marcação anti-CD11c, região para-cortical de linfonodo de 1ª infestação (obj. 20x). Técnica ABC, contracoloração com hematoxilina.....44
- Figura 7.** Eletroforese de extratos de ninfas de *A. cajennense* (2), realizada em minigel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e corado com “comassie brilliant blue”. Marcador de baixo peso molecular (1), com 185, 98, 52, 31, 19, 17, 11, 6, e 3 kDa, referentes à myosin, phosphorylase B, glutamic dehidrogenase, carbonic anhydrase, myoglobin-Red, myoglobin-Blue, lysozyme, aprotinin e insulin B chain, respectivamente46
- Figura 8.** “Western blotting” do produto da eletroforese (SDS-PAGE) de extratos de ninfas de *A. cajennense*. Polipeptídeos reconhecidas por anticorpos séricos de caprinos antes da infestação (A); depois da 1ª infestação (B) e da 3ª infestação (C) com ninfas de *A. cajennense*. Antes da infestação (D), depois da 1ª infestação (E) e da 3ª infestação (F) com *A. hebraeum*.....46

ABREVIATURAS

ABC	Complexo Avidina-Biotina
BOD	Demanda bioquímica de oxigênio
Th	Linfócitos T auxiliares
Con-A	Concanavalina A
IL	Interleucina
TNF	Fator de necrose tumoral
IFN- γ	Interferon-gama
% REC	Percentual de recuperação das ninfas
PNI	Peso das ninfas ingurgitadas
pING	Período de ingurgitamento
pECD	Período de ecdise
% ECD	Percentual de ecdise
Neu. Segm	Neutrófilos segmentados
Neu. Bast.	Neutrófilos em bastonete
Inf. 1	1 ^a Infestação
Inf. 2	2 ^a Infestação
Inf. 3	3 ^a Infestação
HCB	Hipersensibilidade cutânea basofílica

Avaliação da resistência em caprinos a ninfas do carrapato *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) e da reatividade cruzada com *A. hebraeum* (Koch, 1844) (Acari:Ixodidae).

Resumo

No presente estudo avaliou-se o desenvolvimento de resistência a ninfas do ixodídeo *Amblyomma cajennense*, induzida por infestações controladas, e a possível existência de reatividade cruzada com *Amblyomma hebraeum*. Para tal, caprinos sem contato prévio com carrapatos, com seis meses de idade, machos ou fêmeas, foram infestados três vezes sucessivamente com ninfas de *A. cajennense*. Ademais, outro grupo de caprinos foi infestado nas mesmas condições com ninfas de *A. hebraeum* e colhidos soros para pesquisa de possível reatividade cruzada com *A. cajennense*. Observou-se que caprinos desenvolveram resistência apenas parcial a ninfas de *A. cajennense*, como demonstrado pela alteração significativa dos seguintes parâmetros biológicos das ninfas, em relação à primoinfestação: redu o de 41,7% e 37,1% no peso de ingurgitamento, respectivamente na 2^a e 3^a infesta es; aumento de 20% no período de ecdise e redu o de 25,7% na taxa de ecdise, respectivamente nas 3^a e 2^a infesta es. Não houve altera o no período de ingurgitamento nem na porcentagem de recupera o de ninfas com as infesta es sucessivas. A rea o cutânea induzida pelas ninfas de *A. cajennense* durante as infesta es em caprinos caracterizou-se por infiltrado de células inflamatórias, predominantemente neutrófilos e basófilos, estas últimas envolvidas na imunidade a carrapatos por meio de hipersensibilidade basofílica cutânea. Células apresentadoras de antígeno, nomeadamente macrófagos, linfócitos B e células dendríticas foram detectadas por imunistoquímica em linfonodos drenantes de locais de fixa o dos carrapatos, em maior número nos linfonodos dos animais infestados comparativamente aos de animais não infestados. Polipeptídeos de pesos moleculares comuns (160, 90 e 16 kDa) foram detectados por “western blotting” de extratos de ninfas não alimentadas de *A. cajennense*, quando se empregou soros de caprinos re-infestados com *A. cajennense* assim como com *A. hebraeum*, apontando para uma possível reatividade cruzada entre estas duas espécies de ixodideos.

Palavras chave: *Amblyomma cajennense*, *Amblyomma hebraeum*, ninfas, caprino, resistência, reatividade cruzada

Evaluation of resistance in goats to *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) nymphs and cross-reactivity with *A. hebraeum* (Koch, 1844) (Acari:Ixodidae).

Summary

This study evaluated the acquisition of resistance against *Amblyomma cajennense* nymphs in “naïve” goats, induced by repeated and controlled infestations, and a possible cross-reactivity with *A. hebraeum*. Ten naive goats, of both sexes, aged six months were used throughout the experiment. Animals were infested artificially thrice, 30 days intervals between infestations. In addition, goats were infested at same conditions with the tick *A. hebraeum* as well. Sera from these animals were collected looking for possible cross-reactivity between antigens from these ixodids. It was observed that goats developed partially resistance to *A. cajennense* nymphs from the 1st infestation on as shown by changes in some biological parameters, as follows: increase of 41.7% and 37.1% in engorgement weight, respectively at the 2nd and 3rd infestations, decrease in 25.7% in nymph's ecdise rate and increase of 20% in ecdise period, respectively at the 3rd and 2nd infestations. It was not observed alterations in engorgement period and percentage of yielded nymphs. Biopsies of tick bite lesions induced by *A. cajennense* nymphs during infestations in goats were characterized by inflammatory reaction with cellular influx by neutrophils and basophils predominantly, being the last one involved in the well-known cutaneous basophilia. Antigen presenting cells like macrophages, B-lymphocytes and dendritic cells were detected by immunohistochemical analysis of lymph nodes draining tick infested areas. It should be stressed that these cells were found in higher numbers at lymph nodes from infested goats than from the naïve ones. “Western blotting” analysis of nymphal *A. cajennense* extracts revealed shared polypeptides (160, 90 and 16kDa) when used sera from goats infested with *A. cajennense* either *A. hebraeum*, indicating cross reactivity between these two tick species.

Key words: *Amblyomma cajennense*, *Amblyomma hebraeum*, nymphs, goat, resistance, cross reactivity

I. INTRODUÇÃO

Os caprinos (*Capra aegagrus hircus*) foram os primeiros animais domesticados pelo homem a serem utilizados para produção de alimentos, cerca de dez mil anos atrás. Durante todo este período vem acompanhando a história da humanidade conforme relatos bíblicos, achados arqueológicos, citações mitológicas e algumas expressões folclóricas. Além de fornecer uma grande variedade de produtos como leite, carne, couro, pêlo, lã e esterco, os caprinos são explorados também como animais de tração. Em certas regiões do mundo, o poder de uma pessoa é aquilatado pelo número de caprinos que possui, sendo a cabra muitas vezes utilizada como dote que acompanha a noiva em alguns países da África. Ainda hoje, a cabra, considerada “a vaca do pobre”, tem um papel muito importante como fornecedora de alimento, particularmente em países ou regiões em desenvolvimento. Cerca de 94,2% do rebanho caprino mundial encontra-se nessas regiões, evidenciando sua capacidade de adaptação às condições adversas, justificando assim sua reputação de animal rústico (RIBEIRO, 1997).

Segundo projeções do IBGE de 2003, o rebanho brasileiro de caprinos era de 9.581.653, com a grande maioria, cerca de 93%, criada na região nordeste. A caprinocultura vem se destacando no cenário nacional como uma atividade em franco crescimento, o que pode ser observado no mercado, pelo aumento em cerca de 200% nos produtos de origem caprina nos últimos dez anos. E, apesar da maior parte do rebanho nacional estar concentrada nos estados nordestinos, esta atividade tem atraído investidores em outros estados, principalmente em função do alto valor agregado que os produtos de origem caprina alcançam no mercado. Em resposta ao aumento no interesse despertado pela caprinocultura no setor produtivo, pesquisas com essa espécie também tem crescido, o que reflete no aumento crescente de publicações (RIBEIRO e RIBEIRO, 2005).

As principais ectoparasitoses que afetam os caprinos nacionais são a pediculose, sarna e miíase (SANTA ROSA, 1996). Outros ectoparasitas, inclusive o carrapato, podem infestar acidentalmente os caprinos (GUIMARÃES et al., 2001). No entanto, em outras regiões do mundo, como no continente africano, a infestação de caprinos por

carrapatos é um problema preocupante (WALKER et al, 2003). Particularmente, naquela região, incluindo Moçambique, pátria da autora dessa dissertação, caprinos são freqüentemente infestados pelo carrapato *Amblyomma hebraeum*, o principal vetor da *Ehrlichia (Cowdria) ruminantium*, agente causal de uma doença infecciosa conhecida como “coração d’água” (*heartwater*) (WALKER et al., 2003).

O método convencional de controle de carrapatos emprega acaricidas e baseia-se na eliminação dos ectoparasitas. Esses acaricidas, além de dispendiosos, apresentam uma série de outras desvantagens, porquanto deixam resíduos na carne e no leite e causam poluição ambiental. Ademais, há evidências crescentes de que os carrapatos desenvolvem marcada resistência às moléculas empregadas (BAKER et al., 1977; JONGEJAN et al., 1989; CASTRO e NEWSON, 1993). Preocupação social e científica em relação à dependência aos acaricidas químicos tem enfatizado a necessidade de se encontrar alternativas mais seguras de controle do carrapato, menos nocivas ao ambiente e ao homem. Nesse sentido, o desenvolvimento de estratégias alternativas para esse controle é uma necessidade bem vinda.

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., 1995). Outros antígenos vacinais tem sido pesquisados em outras associações carrapato-hospedeiro, mas pouco se sabe ainda sobre a imunopatologia de infestações por *A. hebraeum*. Estudos de aquisição de resistência a carrapatos *Amblyomma*, em pequenos ruminantes domésticos, são limitados. Foi demonstrado em dois estudos (NORVAL, 1987; NORVAL et al., 1988) que ovelhas não desenvolveram resistência a infestações repetidas por períodos longos com ninfas de *A. hebraeum* e que caprinos também não desenvolveram resistência a infestações sucessivas por ninfas de *A. variegatum*

(JONGEJAN et al., 1989). Pelo contrario, ovelhas manifestaram resistência após quatro infestações com *A. americanum* (BARRIGA et al., 1991).

Neste contexto, o presente trabalho objetivou contribuir com o estudo da aquisição de resistência em caprinos a ninfas de *A. cajennense* e da possível reatividade cruzada com *A. hebraeum*, espécie de carrapato de maior interesse em caprinos na África.

II. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Importância econômica e sanitária dos carrapatos

Os carrapatos são ectoparasitas que infestam animais domésticos, silvestres e o próprio homem, assumindo grande importância do ponto de vista tanto econômico-zootécnico como na saúde pública. Pelo seu hábito hematofágico os carrapatos são vetores potenciais de vários agentes infecciosos como protozoários, vírus, bactérias, e riquétsias para animais e humanos (CUPP, 1991), só perdendo para os mosquitos como transmissores de biopatógenos para o homem (HOSKINS e CUPP, 1988). Dentre as doenças infecciosas transmitidas aos animais e ao homem incluem-se a babesiose, teileriose, anaplasmose, erliquiose, borreliose, febre maculosa e encefalites virais (ESTRADA-PEÑA e JONGEJAN, 1999; JONGEJAN e UILENBERG, 2004).

Além da sua competência como vetores, os carrapatos causam danos diretos por hematofagia, provocando irritabilidade, perda de sangue, lesões locais com o desenvolvimento de infecções secundárias e paralisia por toxinas (JONGEJAN e UILENBERG, 2004).

No que concerne à pecuária, quando o controle de carrapatos não é eficaz, ocorrem grandes danos nos animais de produção, quer pelas doenças a eles transmitidas, assim como pelos elevados custos do tratamento. Além disso, ocorre redução significativa na produção de leite, carne, lã, e depreciação do couro dos animais infestados. Os custos com o controle químico, os resíduos deixados nos produtos de origem animal e os danos ambientais decorrentes do uso desses produtos, acabam por acarretar enormes prejuízos aos criadores.

2.2 Controle de carrapatos

Ainda hoje, o controle de carrapatos é feito quase que exclusivamente com base no uso de acaricidas. Porém, seu uso incorreto, com o emprego de subdoses e manipulação incorreta durante as aplicações têm favorecido o aparecimento de cepas de carrapatos resistentes aos princípios ativos, aumentando o risco da disseminação de patógenos a eles associados (WHARTON, 1976). Por outro lado, o custo de desenvolvimento e investimento na descoberta de novos acaricidas (GEARY e

THOMPSON, 2003) em relação ao retorno econômico esperado do seu uso, antes que a resistência tenha surgido, vem desencorajando pesquisas com novas moléculas, estimulando assim o desenvolvimento de novas formas de controle do carrapato (WHARTON, 1976).

Outro problema relevante para a saúde pública decorrente da utilização de acaricidas é a permanência de resíduos químicos nos produtos animais e efeito de tais substâncias químicas no meio ambiente, agravando a contaminação do mesmo (WILLADSEN et al., 1995).

Na tentativa de sanar esses problemas, o interesse por formas alternativas de controle de carrapatos vem aumentando no mundo inteiro, sendo o controle imunobiológico por meio de vacinas um caminho bastante promissor (WILLADSEN, 1980; WIKEL, 1982). De fato, a imunidade vacinal como forma alternativa de controle de carrapatos nos animais domésticos, especialmente no gado bovino, recebeu particular atenção nos últimos anos. Atualmente, duas vacinas comerciais e suas variantes estão disponíveis no mercado, a Australiana (Tickgard plusTM; Intervet Bendigo, Victoria, Austrália) (WILLADSEN et al., 1989) e a Cubana (GavacTM; Heber Biotec, Havana, Cuba) (RODRIGUEZ et al., 1995), ambas desenvolvidas a partir do antígeno Bm86, uma glicoproteína de superfície de células do epitélio do tubo digestivo de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

Experiências feitas na Austrália, Brasil e Cuba provaram a eficiência dessas vacinas contra essa espécie de carrapato (WILLADSEN et al., 1995; RODRIGUES et al., 1995). Todavia, embora ofereçam proteção apenas parcial aos bovinos contra futuras infestações por *R. (B.) microplus*, a memória imunológica resultante é curta, e não asseguram o grau de proteção desejado, sinalizando para a necessidade da adição em suas composições de mais de um antígeno protetor.

Na tentativa de aumentar a eficácia das vacinas contendo Bm86, novos componentes parasitários têm sido adicionados à sua formulação; é o caso, por exemplo, dos antígenos Bm91 e BMA7 (RIDING et al., 1994; McKENNA et al., 1998), que isoladamente conferem uma imunidade muito fraca. Entretanto, quando os três antígenos são usados em conjunto, a imunidade induzida é mais eficiente em relação

àquela observada com a vacina recombinante comercial (WILLADSEN et al., 1996).

Outro antígeno, o Bm95, também isolado do intestino de *R. (B.) microplus* da cepa Argentina A, que não é controlada pela Gavac, foi capaz de diminuir a infestação por diversas cepas dessa espécie, inclusive pela cepa Argentina A (DE LA FUENTE et al., 2000; GARCIA-GARCIA et al., 2000).

Vacinas sintéticas da Bm86 têm sido também testadas na vacinação de bovinos contra o carrapato *R. (B.) microplus*. É o caso do peptídeo SBM7462, que mostrou resultado positivo na imunoproteção de bovinos, alcançando 81,5% de eficiência (PATARROYO et al., 2002).

Outras moléculas do carrapato candidatas a alvos de resposta imune, como enzimas proteolíticas e inibidores de enzimas proteolíticas, estão sendo estudadas. Neste sentido, Da Silva et al. (1998) isolaram um precursor de proteína aspártica denominada *Boophilus* Yolk Pro-catepsin (BYC) de ovos de *R. (B.) microplus*. A BYC, secretada como proenzima na hemolinfa, é ativada numa proteinase “pepstatin mature sensitiva” dos ovos e tem um papel na degradação da vitelina. A capacidade da BYC de induzir resposta imune protetora, quando testada em bovinos por meio de vacinação e inoculação de anticorpos monoclonais contra BYC em fêmeas completamente ingurgitadas, conferiu proteção parcial de 14 a 16% contra o ectoparasita.

Ademais, Andreotti et al. (2002) caracterizaram um inibidor de tripsina extraído de larvas de *R. (B.) microplus* (BmTIs). Esse antígeno interferiu no desenvolvimento do carrapato em 72,8%, com redução de seu número e do peso dos ovos em 69,7% e 71,3%, respectivamente, em vitelos da raça Nelore.

Outra abordagem promissora na elaboração de vacinas anti-carrapato baseia-se no uso de antígenos de secreções salivares dos carrapatos. Estes antígenos, ao contrário do Bm86, são antígenos “expostos”; isto é, são secretados normalmente no hospedeiro durante a alimentação dos carrapatos (MULENGA et al., 2000). Estima-se que durante um período de 96 horas de alimentação, os carrapatos regurgitam aproximadamente 500µl de saliva no hospedeiro. Portanto, a contribuição da saliva dos carrapatos na regulação do microambiente onde a resposta imune ocorre, não pode ser ignorada (BALASHOV, 1972 citado por FERREIRA e SILVA, 1998).

Com o advento da Biologia Molecular, as principais limitações na produção de vacinas anticarrapato, principalmente aquelas relacionadas com técnicas apropriadas para a produção *in vitro* de vacinas, foram eliminadas. De fato, na atualidade estão sendo realizadas pesquisas focando a identificação e caracterização de proteínas do carrapato responsáveis por funções como a modulação da resposta imune do hospedeiro e hemostasia, assim como a transmissão de patógenos. À medida que moléculas recombinantes dessas proteínas são obtidas, e com a ajuda de bibliotecas cDNAs dessas proteínas, tem sido bem sucedidos os estudos para elucidar a base molecular da interação carrapato-hospedeiro. Resultados desses estudos levarão ao descobrimento de outras facetas no desenvolvimento de vacinas anticarrapato e dessa forma permitindo a seleção de melhores combinações antígeno-adjuvante (MULENGA et al., 2003).

2.3 *Amblyomma cajennense*

O carrapato trioxeno *A. cajennense* é encontrado freqüentemente infestando eqüídeos, hospedeiros preferenciais deste ectoparasita. Entretanto, devido à sua baixa especificidade parasitária por hospedeiros, principalmente nos estágios imaturos, ele pode parasitar outros mamíferos como bovídeos, cervídeos, canídeos domésticos e selvagens, além de aves, roedores e o próprio homem (LOPES et al., 1998; OLIVEIRA et al., 2003). É um carrapato amplamente distribuído no continente americano, encontrando-se desde o sudoeste dos Estados Unidos, Américas Central e do Sul, à exceção do Chile e Uruguai e ao longo da costa atlântica, até ao norte da Argentina (COOLEY e KOHLS, 1944).

Importância crescente vem sendo dada a sua capacidade de transmitir zoonoses. Neste contexto, é conhecida sua capacidade de transmitir o agente da febre maculosa, a *Rickettsia rickettsii* (PEREIRA e LABRUNA, 1998; GUEDES, et al., 2005). No Brasil, essa doença foi diagnosticada pela primeira vez em 1929, no estado de São Paulo (São Paulo, 2002). A partir de então, muitos casos de febre maculosa tem sido freqüentemente notificados nos estados de Minas Gerais, Bahia, Espírito Santo, Rio de Janeiro e São Paulo (São Paulo, 2002).

Linthicum et al. (1991) conduziram experimentos demonstrando que o vírus da encefalomielite eqüina venezuelana (VEE) pode infectar *A. cajennense* em laboratório e que o carrapato é capaz de manter e transmitir o vírus, podendo estar envolvido no ciclo epizootico dessa doença. Em áreas de ocorrência de doença de Lyme-simile no Brasil, o *A. cajennense* é encontrado naturalmente infectado com Espiroquetideos (YOSHINARI et al., 1995, 1997, 1999 citados por GUIMARÃES et al., 2001; BARROS - BATTESTI et al., 2000).

Além da hematofagia intensa, o *A. cajennense* é citado na literatura como responsável pela inoculação de toxinas com efeitos paralisantes e, muitas vezes fatais para alguns dos seus hospedeiros (SERRA-FREIRE, 1983).

Merece destaque a afirmativa de Uilemberg et al. (1984) de que espécies Neotropicais de carrapatos como o *A. cajennense*, *A. maculatum* e *A. dissimile* são vetores potenciais, portanto capazes de transmitir em condições experimentais, dentre outros patógenos a *Ehrlichia ruminantium* aos animais.

2.4 *Amblyomma hebraeum*

O carrapato *Amblyomma hebraeum* é conhecido como o principal vetor da *Ehrlichia ruminantium*, agente causal da erliquiose “coração d’água” na região sul da África. Ocorre numa variedade de regiões climáticas desde o clima mediterrâneo ao temperado, das savanas à estepe. Este carrapato requer calor e umidade e não sobrevive em áreas abertas. É confinado à região sudeste da África, distribuindo-se ao longo da faixa costeira da África do Sul, este da Suazilândia e do Botswana, sul de Moçambique, e a sudeste e este do Zimbabwe.

O *A. hebraeum* é um carrapato trioxeno e tem como hospedeiros para o estágio adulto, bovinos e herbívoros selvagens de grande porte, particularmente girafas, búfalos, elandes (*Taurotragus oryx*) e rinocerontes; por vezes infestam também caprinos. Os espécimes adultos preferem áreas com pouco pêlo como a virilha, embaixo da cauda, regiões perineal, genital e axilar e úbere em bovinos, assim como região interdigital de caprinos e ovinos (WALKER et al., 2003). Caprinos, ovinos e

pequenos ruminantes selvagens são hospedeiros preferenciais dos estágios imaturos (HORAK et al., 1987).

Em sua morfologia, destaca-se o hipostômio longo que pode causar feridas, que são infectadas por bactérias, favorecendo a formação de abscessos, que ocorrem freqüentemente nas patas de caprinos e ovinos (ARNOLD e DIAS, 1978). Em fêmeas lactantes, lesões na glândula mamária resultam na perda de um ou mais quartos dos tetos, diminuindo a produção de leite e conseqüentemente reduzindo a viabilidade das crias. Como agravante, as feridas causadas pelas peças bucais desse ácaro são atrativas a moscas como a *Chrysomya bezziana*, cujas larvas, causam mífases graves (WALKER et al., 2003).

O “coração d’água”, doença transmitida por esse ixodídeo em bovinos, ovinos, caprinos e também em antílopes selvagens susceptíveis, é caracterizada por febre alta, distúrbios respiratórios, sintomatologia nervosa e hidropericárdio. O *A. hebraeum* transmite também as bactérias *Rickettsia africae* e *R. conori*, responsáveis pela febre do carrapato em humanos (BAKER et al., 1977), bem como o protozoário *Theileria mutans*, agente da teileriose benigna nos bovinos (WALKER et al., 2003). Formas severas de dermatofilose causada pela bactéria *Dermatophilus congolensis* são também associadas à presença desse carrapato, apesar de não ser ele o vetor (JONGEJAN e UILENBERG, 1994).

Deve-se ressaltar que a importância econômica do “coração d’água” como doença de ruminantes na África só é sobrepujada pela teileriose e tripanosomíase (BEZUIDENHOUT et al., 1994). Nas áreas endêmicas na África do Sul, a mortalidade causada pela riquetsiose é três vezes maior que a causada por outras doenças transmitidas por carrapatos juntas, tais como a babesiose e anaplasmosse (UILENBERG, 1982). No Zimbábue e Quênia, essa riquetsiose é uma das maiores causas de mortalidade de caprinos na agricultura familiar (CHATIKOBO et al., 2001; KAGINA e KANYARI, 2001). No Caribe, essa doença de notificação compulsória, principalmente nas ilhas de Guadalupe, Antigua e Marie Galante, é transmitida por outra espécie de *Amblyomma*, o *A. variegatum*, um carrapato de origem africana introduzido

na região a partir de 1930 com a importação de animais do Senegal (UILENBERG et al., 1984).

A erliquiose “coração d’água” é um dos maiores obstáculos à implantação do programa de repovoamento pecuário em curso em Moçambique. Mortes causadas por *E. ruminantium* são regularmente reportadas em todo o país, em ruminantes domésticos e búfalos d’água (MOÇAMBIQUE, 1998; 1999; 2000). Estudos epidemiológicos mostram que a taxa de soroprevalência dessa erliquiose pode atingir 67,5%, sendo mais alta no sul em relação ao norte do país (ASSELBERGS et al., 1993; ATANÁSIO, 2000). Esta informação é de particular interesse quando animais susceptíveis são transferidos de áreas livres de erliquiose para áreas endêmicas.

2.5 Mecanismos de resistência ao carrapato

A primeira descrição de aquisição de resistência a carrapatos em animais vertebrados foi observada em bovinos por Johnston e Bancroft (1918). No entanto, a demonstração experimental da aquisição de resistência iniciou-se com Trager em 1939, ao observar que cobaias desenvolviam imunidade após uma infestação com larvas de *Dermacentor variabilis*. Esse autor sugeriu que a aquisição de resistência era mediada imunologicamente ao verificar a transferência de resistência passiva pelo soro, ou a possibilidade de se imunizar animais com extratos de carrapatos e a existência de certo grau de resistência cruzada entre *D. variabilis* e *D. andersoni*.

A partir da constatação de Trager, diversos grupos de investigadores vêm confirmando a aquisição de resistência por cobaias a diferentes espécies de ixodídeos (ALLEN, 1973; WIKEL e ALLEN, 1976; SZABÓ et al., 1995). A transferência de imunidade a carrapato de uma cobaia para outra utilizando células linfóides ou soro de hospedeiros resistentes foi revisada por Brown et al. (1982).

Mais recentemente, a indução artificial de resistência tem sido confirmada com base no uso de extratos de glândulas salivares e de outros tecidos dos carrapatos (WIKEL, 1981). Entretanto, os níveis de resistência induzida artificialmente não atingem aqueles induzidos por infestações naturais de carrapatos (ALLEN, 1991).

A imunologia da interação carrapato-hospedeiro tem sido caracterizada a níveis celular e molecular. Os carrapatos ao se alimentarem induzem um complexo de respostas imuneinflamatórias em seus hospedeiros, ao mesmo tempo em que lançam mão de um verdadeiro arsenal de armas imunomoduladoras (WIKEL, 1982, 1996, WIKEL et al., 1994). Os carrapatos desenvolvem assim mecanismos para se evadir das estratégias de defesa do hospedeiro, principalmente contra componentes na sua saliva (WIKEL, 1996). Dentre esses, componentes com propriedades anticoagulante, antiinflamatória e vasodilatadora, foram encontrados na saliva dos carrapatos (SAUER et al., 1995). Alterações da homeostase do hospedeiro, modulação da inflamação e possivelmente da resposta imune são presumivelmente algumas ferramentas evolutivas que permitem que os carrapatos se mantenham vivos. Há cada vez mais evidências de que os patógenos transmitidos por carrapatos levam vantagem em relação aos efeitos imunomoduladores dos componentes das glândulas salivares (TITUS e RIBEIRO, 1988).

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 sangüínea do hospedeiro próximos de suas partes bucais dilatam-se e têm sua permeabilidade incrementada, resultando em edema. 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 (5-hidroxitriptamina), liberadas de mastócitos dermais degranulados. Ocorre também hemorragia nos locais de fixação dos carrapatos (WIKEL, 1982).

Quando os carrapatos se fixam em animais não sensibilizados (primoinfestação) 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. Um a dois dias depois, quando a maioria das larvas já estiver ingurgitada, o influxo de basófilos e eosinófilos aumenta significativamente (KAUFMAN, 1989). Em infestações subseqüentes, 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. Estes mediadores induzem um aumento de permeabilidade vascular, desconforto local, causam irritação, edema e formação de vesículas na epiderme (MOORHOUSE e TATCHELL, 1966; ALLEN, 1973; BROWN et al., 1984; GIL e WALKER, 1985; GILL, 1986; CASTRO e NEWSON, 1993).

A aquisição de resistência a carrapatos tem sido mais estudada usando como modelo animais de laboratório e associações carrapato-ovino (WILLADSEN, 1980; NEWSON e CHIERA, 1989). O mecanismo pelo qual a imunidade é expressa varia bastante de acordo com o hospedeiro e as espécies de carrapatos envolvidas nessas relações. 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).

Um exemplo de resistência adquirida é aquela desenvolvida por cobaias a várias espécies de carrapatos. Esse hospedeiro impede a alimentação e o desenvolvimento adequados dos parasitos já a partir da segunda infestação (ALLEN, 1973; BROWN, 1988a; SZABÓ et al., 1995). 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 circulantes (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, 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 ao mesmo extrato.

A aquisição de imunidade adquirida varia consoante a espécie de carrapato, o hospedeiro, a raça e mesmo entre indivíduos, provavelmente dependendo da seleção natural de animais expostos ao carrapato em questão durante muitas gerações. Na Austrália, estudos sobre infestações de bovinos com *R. (B.) microplus* mostraram que existem diferenças raciais na aquisição de resistência. De fato, raças zebuínas (*Bos indicus*), ou produtos de cruzamento com estas raças de bovinos, mostram ser mais resistentes a essa espécie de carrapato do que indivíduos de raças européias (*Bos taurus*). A herdabilidade dessas características é alta. O controle biológico de ixodídeos por seleção de gado resistente a esses parasitas para controlar a população de *R. (B.) microplus* de um hospedeiro, tornou-se uma prática aceitável na Austrália (SEIFERT, 1984).

Fatores como menor espessura da pele, número aumentado de mastócitos dérmicos, menor densidade de pelagem e de glândulas sebáceas, maior número de

linfócitos circulantes, são algumas das características individuais ou raciais relacionadas com a resistência inata de hospedeiros a carrapatos (BROWN, 1988a).

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 (SZABÓ et al., 1995; BECHARA et al., 1994). Todavia, cães imunizados com extrato de intestino de *R. sanguineus* mais adjuvante de Freund, desenvolvem resistência ao mesmo carrapato (SZABÓ e BECHARA, 1997), sugerindo que a estimulação da imunidade celular promovida pelo adjuvante pode contribuir para o mecanismo de indução de resistência ao ácaro. Além disso, os antígenos ocultos não participam da infestação natural estando menos sujeitos aos mecanismos imunomodulatórios promovidos pelos carrapatos.

Infestações repetidas em caprinos com ninfas de *Amblyomma variegatum* não induzem imunidade nos hospedeiros (JONGEJAN et al., 1989). O mesmo se observou em ovelhas parasitadas por ninfas de *A. hebraeum* (NORVAL, 1987). Além disso, o peso de ingurgitamento de adultos de *A. hebraeum* não diminuiu depois de repetidas infestações em bovinos e ovinos (NORVAL et al., 1988). Evidência de imunossupressão foi encontrada também quando adultos de *A. variegatum* foram alimentados em ovelhas que tinham sido experimentalmente infestadas com *Dermatophilus congolensis*. Um efeito sistêmico significativo do carrapato na progressão da doença foi encontrado, como demonstrado pela redução das respostas imunes humoral e celular. Os mecanismos envolvidos não são ainda bem conhecidos, mas componentes na saliva dos carrapatos adultos *A. variegatum* são sabidamente mediadores do desenvolvimento de formas severas de dermatofilose em animais infestados por esses carrapatos (LLOYD e WALKER, 1993). No entanto, esse efeito imunossupressor aparente, parece ser específico para dermatofilose, não havendo evidência de que esse carrapato induza efeito similar quando se trata de outras doenças.

O conhecimento das moléculas envolvidas na indução de imunossupressão do hospedeiro pode ser extremamente importante na identificação de antígenos vacinais. A

resposta imune do hospedeiro a carrapatos poderia resultar em dano ou rejeição do ácaro, caso não houvesse algum tipo de imunossupressão. 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).

Basófilo

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 et al., 1982). Sua participação nesta situação foi descrita inicialmente por ALLEN (1973). A demora na caracterização deste tipo celular no local de fixação dos carrapatos se deve à dificuldade em se demonstrar tais células com técnicas de coloração rotineiras (ALLEN et al., 1977).

As funções deste tipo celular não estão ainda bem esclarecidas. Aparentemente, participam na reação inflamatória, principalmente na manutenção de permeabilidade vascular aumentada e também de forma marcante nas reações aos parasitos (HUNTLEY, 1992).

Os grânulos citoplasmáticos dos basófilos contêm glicosaminoglicanos sulfatados que se coram metacromaticamente com corantes básicos em condições apropriadas (SCHWARTZ e AUSTEN, 1984). Assim como mastócitos, basófilos humanos sintetizam e armazenam histamina, e basófilos são a fonte da maioria, se não de toda a histamina do sangue humano normal (PORTER e MITCHELL, 1972).

Basófilos possuem receptores da membrana plasmática, específicos e de alta afinidade para a região Fc de imunoglobulinas homocitotrópicas. Segundo Whellen e Wikel (1993), infestações com carrapatos induzem síntese de anticorpos anticarrapato que são homocitotrópicos. Eles se ligam a receptores Fc na membrana plasmática de basófilos e mastócitos, resultando na formação de complexos que induzem a liberação do conteúdo de seus grânulos. De fato, basófilos degranulam mais prontamente durante reinfestações com carrapatos (BROSSARD, 1982). A reação cutânea de basófilos durante reinfestações com carrapatos apresenta características de hipersensibilidade

dos tipos I e IV, sendo também relacionada a um tipo complexo de reação de hipersensibilidade tardia, denominada reação de hipersensibilidade cutânea basofílica – HCB (GORMAN e HALLIWELL, 1989). Esta reação difere da hipersensibilidade tardia clássica pela histologia da lesão e por propriedades imunológicas e imunoquímicas próprias (RICHERSON et al., 1970). Linfócitos pré-sensibilizados são essenciais para a indução e expressão da HCB, estando estes envolvidos na modulação da aquisição de imunidade a carrapatos (ASKENASE, 1979). Trata-se, portanto de um fenômeno bastante heterogêneo que envolve vários mecanismos.

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, muitos dos quais 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. Como o tratamento de cobaias resistentes a carrapatos *Dermacentor andersoni* e *Amblyomma americanum* com soro anti-basófilo levou à eliminação da resposta basofílica e também da resistência, acredita-se que o basófilo é necessário para a expressão de resistência em cobaias (BROWN et al., 1982). 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 (*Bos taurus*) (ALLEN et al., 1977; BROWN et al., 1984).

Mastócito

Por sua distribuição cutânea, e por possuírem grânulos com componentes similares aos dos basófilos, com características pró-inflamatórias, mastócitos são fortes candidatos a participarem da reatividade tegumentar a estímulos lesivos, aí inclusos os carrapatos. Entretanto, sua participação nesta situação é bastante controversa. Schleger et al. (1976) observaram degranulação maior destas células no local de

fixação de carrapatos *R. (B) microplus* em bovinos previamente infestados em relação àqueles sofrendo uma primoinfestação. Moraes (1988) atribuiu a resistência adquirida ao carrapato *R. (B) microplus*, significativamente maior no gado indiano (*Bos indicus*), a uma densidade maior de mastócitos no tegumento destes animais. Matsuda et al. (1985) observaram que linhagens de camundongos desprovidas de mastócitos eram incapazes de adquirir resistência contra larvas de carrapatos *Haemaphysalis longicornis*. Den Hollander e Allen (1985) observaram que linhagens de camundongos deficientes em mastócitos eram capazes de adquirir resistência a carrapatos *Dermacentor variabilis*, mas em grau menor do que camundongos de linhagens com mastócitos. A degranula o dos mastócitos libera mediadores químicos, sendo o principal a histamina. Esta amina biog nica vasoativa desempenha um papel importante na resistência de hospedeiros a carrapatos. Neste contexto, verificou-se que animais resistentes têm concentra o tecidual de histamina duas vezes maior do que animais susceptíveis (WIKEL, 1982); a inocula o de histamina no local de fixa o de ácaros resulta em desprendimento ou morte dos carrapatos (KEMP e BOURNE, 1980); e que animais tratados com antagonistas de receptores H1 (BROSSARD, 1982) e H1+H2 (WIKEL, 1982) da histamina expressam menor rea o cutânea e resistência reduzida. A histamina liberada no local de fixa o de carrapatos pode também ocasionar prurido e assim estimular comportamento de autolimpeza, fen meno que já foi descrito como forma eficiente de controlar carrapatos (WILLADSEN, 1980).

Eosinófilo

Eosinófilos são caracterizados por sua imensa afinidade por corantes ácidos como a eosina. Rea o es com eosinófilos são características de alergias, parasitos e inflama o cr nica. As fun o es precisas dos eosinófilos não estão bem claras, mas devem variar conforme as circunstâncias (JONES, 1993). Até recentemente, acreditava-se que o eosinófilo tinha por fun o a defesa contra infec o es parasitárias e prote o o do organismo contra mediadores liberados por mastócitos e basófilos. A presença nestas células de determinadas prote inas cati nicas e enzimas conferem a elas efeitos antiparasitários, mas apesar da demonstra o de alguma capacidade regulatória da

inflamação, o efeito da atividade do eosinófilo parece ser pró-inflamatório (McEWEN, 1992). Quatro proteínas distintas que representam aproximadamente 90% das proteínas dos grânulos dos eosinófilos possuem atividade citotóxicas, sendo capazes de eliminar células de mamíferos e de não mamíferos (VENGE, 1990). Provavelmente, o eosinófilo está presente e ativo em praticamente qualquer doença inflamatória, mas isto não se tornou claro até recentemente, pela dificuldade em se identificar eosinófilos em tecidos inflamados, local no qual esta célula perde suas características tintoriais (VENGE, 1990).

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; SZABÒ e BECHARA, 1995). Brown et al. (1982), testando os efeitos de soros anti-eosinófilo e anti-basófilo alternadamente e em conjunto em cobaias pré-sensibilizadas e infestadas, sugeriram uma ação cooperativa destes dois tipos celulares na expressão da resistência aos carrapatos. Os mecanismos pelos quais eosinófilos afetam os carrapatos não são conhecidos. Brown et al. (1982) sugeriram o envolvimento da peroxidase e da proteína básica principal dos grânulos do eosinófilo na expressão da resistência a carrapatos. Esta proteína tem um papel antiparasitário como demonstrado por sua capacidade de inativar e matar protozoários *in vitro* (KIERSZENBAUM et al., 1981).

Célula de Langerhans

Outra célula que vem sendo observada neste processo é a de Langerhans. Estas células são encontradas na epiderme de mamíferos como uma rede de células dendríticas suprabasais. A demonstração de receptores para Fc de imunoglobulinas e para fração C3 do complemento, e da expressão constitutiva de antígenos Ia (MHC II) na superfície das células de Langerhans indicam que elas dividem características comuns com os macrófagos. Células de Langerhans são potentes estimuladoras de respostas antígeno específicas e restritas ao MHC (STINGL et al., 1978). Segundo Moll (1993) as células de Langerhans parecem ter por função a ingestão, processamento e apresentação de antígenos da pele e apresentação a células T no linfonodo de

drenagem. A associação deste tipo celular com antígenos de glândula salivar de carrapatos em animais infestados (ALLEN et al., 1979) e a falha de animais imunes em expressar resistência após depleção destas células por irradiação ultravioleta (NITHUITHAI e ALLEN 1984b) sugerem um papel de processamento e apresentação de antígenos de carrapatos pelas células de Langerhans. O envolvimento destas células foi ainda reafirmado por Nithuithai e Allen (1984a) ao demonstrarem o aumento no seu número no início da reinfestação de cobaias com carrapatos *Dermacentor andersoni*. Wikel et al. (1994) consideraram a participação dos macrófagos e de células “tipo macrófagos”, como as células de Langerhans, de importância fundamental na resistência ao carrapato, por também proverem a reação com sinais regulatórios através da rede de citocinas.

Linfócito

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 na expressão da imunidade. Estas observações experimentais ressaltam uma ação das respostas imune celular e humoral, às vezes de forma cooperativa, mas com eficácia maior da primeira. Assim, a presença de anticorpos anticarrapatos em cobaias e coelhos expressando resistência está bem documentada e baseada em ensaios *in vitro* (FUJISAKI, 1978), testes cutâneos *in vivo* (BOESE, 1974) e transferência passiva de imunidade com soro (TRAGER, 1939, BROWN e ASKENASE, 1981). O anticorpo envolvido na imunidade de coelhos é da classe IgG e em cobaias da classe IgG1 (BROWN e ASKENASE, 1983).

O envolvimento da imunidade celular na expressão de resistência em roedores foi demonstrado pela capacidade de células do linfonodo e do exsudado peritoneal de animais resistentes em conferir imunidade em animais não sensibilizados (BROWN, 1988a). Chama a atenção o fato de roedores receptores de células e soros imunes também desenvolverem reação cutânea basofílica nos pontos de fixação de carrapatos

(BROWN e ASKENASE, 1981). Esta observação segundo Brown (1988a), demonstra uma associação entre reação imune, basófilos e resistência a carrapatos. Deve-se ressaltar que neste caso o soro transferido isoladamente conferiu proteção menor, mas também induziu basofilia menor do que aquela obtida pela transferência de células.

Neutrófilo

Os neutrófilos representam talvez o tipo celular menos proeminente no estudo das reações de hospedeiros a carrapatos. De forma geral, uma participação mais intensa desta célula foi notada em hospedeiros sofrendo primeira infestação, principalmente nos três primeiros dias do parasitismo (BROWN, 1988a e KAUFMAN, 1989) quando 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. Observou-se que neutrófilos estão envolvidos na formação da cavidade de alimentação, espaço criado pela dissolução do tecido dos hospedeiros imediatamente abaixo das peças bucais do carrapato. Entretanto, a participação de neutrófilos pode ser nula uma vez que foram observados inclusive em relações carrapato-hospedeiro caracterizadas por não aquisição de resistência como nas relações *R. sanguineus* x cão doméstico (SZABÓ e BECHARA, 1995) e *R. sanguineus* x camundongo (FERREIRA et al., 2003).

Citocinas

A análise de citocinas é uma ferramenta importante para caracterização da resposta imune a parasitas e outros agentes infecciosos. De acordo com o perfil de citocinas que produzem em animais de laboratório, os linfócitos T auxiliares (Th) são divididos em dois grupos: Th-1 e Th-2. Os primeiros produzem interferon gama (IFN- γ) e interleucina-2 (IL-2) e estão relacionados principalmente com a imunidade celular (hipersensibilidade tardia e ativação de macrófagos), enquanto que os Th-2 produzem IL-4, IL-5, IL-10 e participam mais ativamente da imunidade humoral (MBOW et al., 1994). Alguns estudos experimentais demonstram a participação de citocinas no desenvolvimento de resistência a carrapatos. Neste sentido, pele de camundongos

BALB/C infestados com ninfas de *I. ricinus* foi examinada por hibridação *in situ* para detecção de RNAm de citocinas. Setenta e duas horas depois da infestação inicial, as células mononucleares infiltrando o local de fixação do carrapato eram positivas ao RNAm de IFN- γ , poucas para IL-4, mas nenhuma foi positiva para IL-2. Durante a segunda infestação, a maioria das células infiltrando os locais de fixação (mais de 50%) foram positivas para o RNAm de IFN- γ , enquanto 20 a 50% das células foram positivas ainda para IL-2 ou IL-4. Na terceira infestação, os resultados foram semelhantes aos encontrados durante a segunda infestação, exceto a observação de poucas células positivas para a IL-4. A região paracortical dos linfonodos drenantes do local de fixação também continham células positivas para IL-2 e IFN- γ , enquanto que células positivas para IL-4 foram raramente encontradas. O mesmo perfil de resposta se manteve durante as segunda e terceira infestações, sugerindo uma polarização de resposta Th-1 (MBOW et al., 1994).

Em outro estudo, linfócitos colhidos dos linfonodos axilares e braquiais drenantes de locais de infestação de ninfas de *I. ricinus* em camundongos BALB/c, foram estimulados *in vitro* com o mitógeno Concanavalina A - ConA para células T, e determinados por ELISA os níveis de citocinas IL-4 e IFN- γ no sobrenadante da cultura (GANAPANO et al., 1995). A estimulação *in vitro* de linfócitos colhidos nove dias após o início da primeira infestação com ConA induziu a liberação de altos níveis de IL-4 e baixos níveis de IFN- γ . Durante as reinfestações, uma relação similar ocorreu entre essas duas citocinas, mas os níveis de IFN- γ estavam aumentados. Este estudo sugere que infestações de camundongos BALB/C com carrapatos *I. ricinus* induzem um padrão de resposta Th-2 (GANAPAMO et al., 1995).

O mesmo padrão de citocinas foi observado em outro estudo envolvendo camundongos e o carrapato *R. sanguineus*. Esplenócitos de camundongos C3H/HeJ infestados, quando estimuladas por Con-A mostraram proliferação reduzida e desenvolveram um perfil de citocinas Th-2 representada pela produção aumentada de IL-4, IL-10 e TGF- β em detrimento da síntese de IL-2, IFN- γ e IL-12 (FERREIRA e SILVA, 1999).

As relações entre as respostas Th-1 e Th-2 durante as infestações com carrapatos precisam ser melhor definidas. Ambas as respostas parecem ocorrer, e é provável que as diferentes associações carrapato-hospedeiro afetem o balanço das subpopulações de células Th. Foi sugerido que a expressão da aquisição de resistência envolve células Th-1, as quais mediarão uma reação de hipersensibilidade tardia juntamente com os anticorpos circulantes IgM, IgG. As citocinas do padrão Th-1, IFN- γ e IL-2, são provavelmente importantes na mediação destas respostas. Já as respostas Th-2 são melhor ilustradas pelo desenvolvimento de anticorpos responsáveis pelo componente da hipersensibilidade imediata na aquisição de resistência. A contribuição das células de Langerhans, queratinócitos e células T epidermais na resposta de citocinas e imunidade a carrapatos também necessitam ser melhor analisadas (WIKEL e BERGMAN, 1997).

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais:

- 3.1.1 Contribuir para o estudo da relação parasita-hospedeiro no modelo *A. cajennense*-caprino, avaliando a aquisição de resistência em caprinos a ninfas desse ácaro.
- 3.1.2 Verificar a possível existência de reatividade cruzada entre antígenos de *A. cajennense* e *A. hebraeum*.

3.2 Objetivos específicos:

- 3.2.1 Avaliar o desenvolvimento de resistência ao carrapato *A. cajennense* por meio da análise de parâmetros biológicos de ninfas alimentadas em caprinos, durante reinfestações, comparativamente a uma primoinfecção;
- 3.2.2 Caracterizar macroscópica e microscopicamente a lesão de fixação de ninfas de *A. cajennense* em caprinos, incluindo contagens de células inflamatórias infiltradas nas infestações sucessivas;
- 3.2.3 Imunomarcas células dendríticas, macrófagos e linfócitos B em linfonodos drenantes dos locais de fixação de ninfas de *A. cajennense* em caprinos sensibilizados, por meio de técnica imunoistoquímica;
- 3.2.4 Detectar possíveis alterações hematológicas em caprinos decorrentes do parasitismo em uma primoinfecção e nas reinfestações;
- 3.2.5 Caracterizar polipeptídeos em homogenatos de ninfas de *A. cajennense* reativos a soros de caprinos infestados e verificar a existência de reatividade cruzada com *A. hebraeum*, por meio da técnica de "Western blotting".

IV. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Parasita

Foram usadas no experimento ninfas de *A. cajennense* com 20 a 30 dias de idade, provenientes da colônia de carrapatos estabelecida e mantida no Departamento de Patologia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias UNESP, campus de Jaboticabal (FCAV-UNESP).

A colônia foi iniciada com a colheita de teleógenas, que foram acondicionadas individualmente em recipientes de plástico (50 mm de altura x 25 mm de diâmetro) com tampa perfurada e telada, de modo a permitir a aeração do frasco. Os recipientes de plástico eram mantidos dentro de dessecadores contendo solução saturada de cloreto de potássio (KCl PA Synth) com o objetivo de manter a umidade relativa em cerca de 85% (WIKEL, 1979). Os dessecadores eram mantidos em estufas para BOD (modelo, TECNAL TE-400) à temperatura de 27° C e com fotoperíodo de 12 horas para que as fêmeas pudessem ovipor.

As larvas, ninfas e adultos eram alimentados em coelhos virgens de infestação como descrito por Bechara et al. (1995). De forma resumida, carrapatos não alimentados (larvas, ninfas ou adultos) eram restritos aos hospedeiros por câmaras de alimentação de plástico transparentes fixadas com cola Brascoplast® (Brascola LTDA, Brasil) no dorso depilado de coelhos. Os carrapatos ingurgitados e desprendidos naturalmente eram então recolhidos diariamente, pesados e mantidos para o processo de ecdise em dessecadores na estufa para B.O.D., como descrito acima.

4.2 Hospedeiro

Como hospedeiros foram utilizados 10 caprinos, machos ou fêmeas, com seis meses de idade e isentos de contacto prévio com o carrapato. Os animais eram de raça não definida, provenientes do Capril Onça em Monte Santo, criatório do sul do estado de Minas Gerais. Os animais foram alojados em recinto apropriado no Departamento de Patologia Veterinária da FCAV-UNESP, campus de Jaboticabal, separados individualmente em boxes telados, medindo 2 m de comprimento por 1 m de largura,

durante todo o experimento, e alimentados com concentrado, feno e água *ad-libitum*. Antes do início do experimento todos os caprinos foram vermifugados.

Os coelhos usados como hospedeiros para a manutenção da colônia de carrapatos eram procedentes do Biotério Central da UNESP, campus de Botucatu, e mantidos no Biotério do Departamento de Patologia Veterinária da FCAV-UNESP, campus de Jaboticabal.

4.2.1 Grupos experimentais

Dois grupos experimentais foram considerados no experimento, ambos com cinco caprinos cada. Os caprinos do primeiro grupo (G1) foram infestados três vezes sucessivamente com ninfas de *A. cajennense*, a intervalos de 30 dias entre as infestações. O outro grupo (G2) serviu de controle das infestações, sendo aí incluídos dois caprinos na segunda e três na terceira infestação num sistema de rodízio semelhante ao usado por Allen (1973), de modo que nestas infestações houvesse sempre alguns animais submetendo-se a uma primeira infestação. O objetivo desse rodízio foi evitar um possível efeito sobre os resultados das diferentes amostras de ninfas nas infestações sucessivas, permitindo dessa forma uma análise mais acurada e confiável.

4.3 Infestações controladas

Os caprinos foram infestados três vezes consecutivas com ninfas do carrapato *A. cajennense*, provenientes da colônia deste carrapato estabelecida, como descrito anteriormente, no Departamento de Patologia Veterinária da FCAV-UNESP, campus de Jaboticabal.

Para a infestação dos caprinos foi usado o método de frascos plásticos afixados ao dorso dos animais, e utilizados como câmaras de alimentação para as ninfas, de acordo com Bechara et al. (1989). Essas câmaras, especialmente projetadas para tal, foram construídas a partir de frasco plástico transparente, de 5 cm de diâmetro e 3 cm de altura. O fundo do frasco foi cortado e um anel de borracha colado em sua borda para facilitar a fixação da câmara ao dorso dos animais. Uma peça de tecido de algodão

foi colada por baixo da borracha de forma a evitar o seu contato diretamente com a pele dos animais. Para permitir uma aeração mais adequada das câmaras, um orifício telado era construído em sua tampa. Estas eram então afixadas ao dorso dos animais com auxílio de cola Brascoplast® (Brascola LTDA, Brasil) após tricotomia da área. Para permitir que a cola secasse e aderisse totalmente à pele dos animais, e que seu odor não interferisse na fixação dos carrapatos, as câmaras ficavam 24 horas presas ao dorso dos animais sem suas respectivas tampas. A figura 1 ilustra essas etapas.

No dia seguinte, as ninfas eram liberadas no interior das câmaras. Utilizou-se em cada infestação uma amostra de 115 ninfas por caprino, que eram distribuídas em duas câmaras de alimentação, uma com 100 exemplares, para avaliação de seus parâmetros biológicos, e a outra com 15 para exame histopatológico do local de fixação do ácaro.

Para maior facilidade em sua liberação nos hospedeiros, as ninfas eram acondicionadas em seringas plásticas descartáveis de 3 mL, com a porção inicial cortada na altura da marca 0,2 ml. Após sua contagem em placa de petri contendo água para evitar o escape, e secagem em papel absorvente, os carrapatos eram transferidos para as seringas, contidos com um chumaço de algodão, e em seguida liberados no hospedeiro.

A partir de 24 horas após a liberação dos ácaros, as câmaras de alimentação eram diariamente abertas para acompanhamento do processo de fixação, ingurgitamento e desprendimento das ninfas alimentadas e colheita de fragmentos de pele para biópsia.

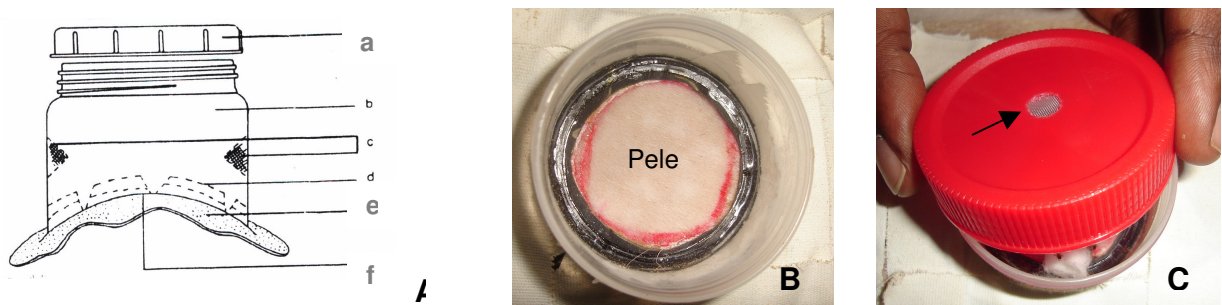


Figura 1. Câmaras para alimentação de carrapatos. Em A, desenho esquemático; observar tampa (a), anel de borracha (e), base do frasco (f). Em B, câmara fixada à pele depilada de caprino e em C, tampa mostrando orifício telado para aeração da câmara (seta).

4.3.1 Determinação de parâmetros biológicos.

À medida que as ninfas ingurgitadas se desprendiam do hospedeiro elas eram colhidas, pesadas em grupo e postas em frascos de plástico (6 cm de altura x 2,5 cm de diâmetro), com tampa perfurada, para sofrerem ecdise.

A avaliação da aquisição de resistência pelos caprinos foi feita por meio da observação dos seguintes parâmetros biológicos das ninfas: percentagem de recuperação (%REC); peso médio de ingurgitamento (PNI); períodos de ingurgitamento (pING) e de ecdise (pECD) e taxa de ecdise (%ECD), segundo metodologia descrita por Bechara et al. (1995). Para o cálculo da %REC, foram consideradas como recuperadas ninfas que ingurgitavam e se desprendiam do hospedeiro. O PNI foi determinado em balança analítica, imediatamente após sua retirada das câmaras de alimentação pós-desprendimento. O pING indicou o tempo decorrido entre a liberação dos carrapatos e o seu desprendimento do hospedeiro. A %ECD foi estimada a partir da porcentagem de ninfas que sofreram ecdise em relação às ninfas ingurgitadas, e o pECD indicou o intervalo de tempo entre o destaque dos ácaros do hospedeiro e o início da ecdise.

4.3.2 Hemograma

O perfil hemático de todos os caprinos infestados foi acompanhado pela realização periódica de hemograma completo. Para tanto, 5 mL de sangue era colhido da veia jugular externa dos animais, imediatamente antes da primeira infestação e das reinfestações. Uma parte do sangue era recolhida em tubos BD Vacutainer™ de 5 mL contendo o ácido etilenodiamino tetra-acético (k3EDTA 15%) como anticoagulante, para exame hematológico, e a outra em tubos sem anticoagulante com a finalidade de obtenção de soros para utilização nas técnicas de imunoistoquímica e "Western blotting". As amostras de sangue para hemograma foram processadas nos Laboratórios de Patologia Clínica do Hospital Veterinário da FCAV-UNESP, campus de Jaboticabal. Foi analisado o hematócrito, porcentagem de hemoglobina, contagem global de hemácias e contagens global e diferencial de leucócitos.

4.4 Exame Histopatológico

A análise histopatológica da lesão no ponto de fixação do carrapato na pele é um instrumento importante para a compreensão da interface parasita-hospedeiro, porquanto as alterações locais, incluindo número e tipos de células inflamatórias migradas nas diversas situações (primoinfestação e reinfestações) e tempos pós-fixação, apontam processos ou mecanismos envolvidos na imunopatologia da resistência ao carrapato.

Para tanto, fragmentos de pele para biópsia foram colhidos nos locais de fixação de ninfas incluindo suas peças bucais para facilitar a localização do ponto exato de penetração de seu hipostômio no tegumento cutâneo. Foram colhidos em cada infestação, quatro fragmentos de pele para biópsia, em diferentes tempos (24, 48, 72 e 120 horas) pós-fixação dos carrapatos. Foram também colhidas biópsias de pele normal de caprino para efeito de comparação histológica com a infestada. A excisão da pele foi feita com ajuda de um saca-bocado (“punch”) com diâmetro de 0,5 cm e sob anestesia local com cloridrato de lidocaína a 2 % (Bravet Ltda). Os fragmentos obtidos foram fixados por 24 horas em formalina tamponada com fosfatos, pH 7,0 e, posteriormente transferidos para álcool 70% sendo processados segundo o procedimento histológico de rotina no Laboratório de Histotecnologia do Departamento de Patologia Veterinária da FCAV-UNESP, campus de Jaboticabal.

Após processamento histológico, os fragmentos foram incluídos em parafina histológica e seccionados em micrótomo rotatório para obtenção de cortes seriados de 4µm de espessura de forma a localizar o ponto exato de fixação do ácaro, identificado pela presença dos remanescentes de suas peças bucais e do cone de cimento.

As lâminas daí resultantes foram submetidas a duas técnicas de coloração: hematoxilina-eosina e May-Grünwald & Giemsa; a primeira para observação de aspectos gerais da reação do hospedeiro ao carrapato e a segunda para melhor evidenciar e distinguir células inflamatórias infiltradas na lesão de fixação das ninfas de *A. cajennense*.

4.4.1 Contagens celulares na área da lesão

A contagem de células inflamatórias foi feita em microscópio de luz em cortes corados com May-Grünwald e Giemsa, empregando-se uma ocular integradora quadriculada Carl Zeiss (West Germany Kpl, 10x) e objetiva de 100x, totalizando um aumento de 1000x. A área delimitada pela ocular integrada, determinada por meio de um micrômetro, foi de 0,0052 mm², e as contagens de células feitas na derme inflamada, em área adjacente ao cone de cimento. O número de células infiltradas foi expresso, após correção, por mm² de área.

4.5 Realização de ensaio Imunoistoquímico

Secções de linfonodos pré-escapulares, drenantes de áreas de fixação das ninfas de *A. cajennense* foram empregadas em ensaios imunoistoquímicos. Os linfonodos foram colhidos de caprinos naïve e de pré-sensibilizados via infestações repetidas e controladas, para pesquisa de células apresentadoras de antígeno, usando marcadores de superfície de células B, células dendríticas e macrófagos. Esses ensaios foram conduzidos no Laboratório de Imunoparasitologia da FMRP-USP, Ribeirão Preto.

4.5.1 Colheita de linfonodos regionais

Para obtenção de linfonodos, três animais do experimento foram eutanaziados e linfonodos regionais escapulares colhidos de um caprino não infestado, de um segundo caprino 15 dias após a primeira infestação e de um terceiro animal 15 dias após a terceira infestação. Logo em seguida, os linfonodos foram embebidos no composto OCT Tissue Teck®, congelados em nitrogênio líquido e conservados a -70°C até o momento de seu processamento. Para confecção das lâminas, foram feitas secções de 5 µm em criostato e distribuídas em número de quatro de cada linfonodo em lâminas recobertas com Poli-L-Lisina, fixadas em acetona gelada por 1 minuto, embrulhadas em papel alumínio e conservadas a -20 °C, no freezer, até o momento de sua utilização na técnica imunoistoquímica.

4.5.2 Procedimento imunoistoquímico

Trinta minutos antes do início da reação, as lâminas foram retiradas do freezer para descongelamento à temperatura ambiente. As amostras foram lavadas entre as incubações com solução tamponada com fosfato (PBS) 0,01M (pH 7,2). A peroxidase endógena foi inativada por incubação dos cortes de 20 minutos em solução de peróxido de hidrogênio a 3% em PBS. Na seqüência, realizou-se o bloqueio de reação inespecífica por incubação durante uma hora em soro normal de cabra na diluição de 1:100 em PBS. Os cortes foram então incubados “overnight” com os anticorpos primários listados na Tabela 1, de acordo com determinações específicas de cada anticorpo. Em seguida, incubou-se com anticorpo secundário biotilado contra IgG e IgM de camundongo por 30 minutos e depois com o complexo ABC (Avidina-biotina) por mais 30 minutos. A revelação da reação foi realizada incubando-se os cortes por tempo determinado por inspeção visual em cromógeno à base de diaminobenzidina (DAB). Por último, os fragmentos foram contracorados com hematoxilina de Harris diluída 1:1 em água destilada, montados em bálsamo do Canadá e recobertos por lamínula de vidro.

4.5.3 Anticorpos primários

Foram utilizados os anticorpos primários discriminados na Tabela 1.

Tabela 1. Anticorpos primários empregados nas reações de imunoistoquímica de linfonodos drenantes de locais de fixação de ninfas de *A. cajennense* em caprinos.

Anticorpo	Catálogo	Especificidade	Característica	Origem	Diluição	Fonte
Anti-bovino CD11b	MCA 1425G	Macrófagos	Monoclonal IgG	Camundongo	1: 30	Serotec
Anti-bovino CD21	MCA 1424G	Célula B	Monoclonal IgG	Camundongo	1: 30	Serotec
Anti-bovino CD11c	BAC 153 ^a	Célula dendrítica	Monoclonal IgM	Camundongo	1: 10	VMRD

4.6 “Western blotting”

A presença de antígenos em homogenato de ninfas de *A. cajennense* capazes de induzir resposta imune humoral em caprinos e a possível existência de reação cruzada desses antígenos com os de *A. hebraeum* foram investigadas, utilizando-se a técnica de “Western blotting”, conduzida no Laboratório de Imunoparasitologia da FCAV-UNESP, campus de Jaboticabal. Foram testados soros de caprinos infestados, obtidos 30 dias após primeira e terceira infestações com ninfas de *A. cajennense* ou com *A. hebraeum*. Como controle, foram utilizados soros de caprinos não infestados.

4.6.1 Material colhido em Moçambique

Tendo em vista que o ixodídeo *A. hebraeum* é exótico no Brasil, as infestações sucessivas e controladas com ninfas de *A. hebraeum* foram conduzidas em 2004 na Faculdade de Veterinária da Universidade Eduardo Mondlane, em Maputo, Moçambique. Para tal, cinco caprinos sem raça definida, provenientes da granja da Faculdade de Veterinária sofreram três infestações sucessivas com ninfas de *A. hebraeum* a intervalos de 30 dias entre as infestações. Amostras de sangue foram colhidas a partir da veia jugular externa, em tubos sem anticoagulante, antes das infestações e 30 dias depois de cada infestação. Soros daí resultantes foram congelados a -20°C e usados no presente estudo, especificamente na técnica de “Western blotting”.

4.6.2 Preparação do extrato total de ninfas de *A. cajennense*

O extrato de ninfas não alimentadas foi preparado de acordo com a técnica utilizada para o preparo de extrato do carrapato adulto não alimentado da espécie *R. sanguineus* (SZABÓ, 1995a). Resumidamente, os carrapatos foram mortos por congelamento em nitrogênio líquido depois de lavagem exaustiva dos mesmos em PBS estéril gelado. Na seqüência, foi acrescentado meio de homogenização e as ninfas trituradas em um grau e pistilo de porcelana mantido em cama de gelo. A suspensão resultante foi ultrasonicada a 20 MHz em 10 ciclos de 30 segundos cada em um aparelho de ultrassom (Branson Sonifier 250). A seguir, a suspensão foi centrifugada a

12000 x g por uma hora a 4° C. Por fim, descartou-se o sedimento e o sobrenadante foi filtrado em Millipore® de 0,22µm de porosidade. O conteúdo protéico do extrato das ninfas, determinado pelo método do ácido bicincônico, utilizando-se o Kit de reagentes BCA (BCA Reagent Kit–Pierce Chemical Company) de acordo com recomendações do fabricante, foi de 10 µg/µl. Por último, o extrato foi alíquotado e conservado a –20°C até o momento de seu uso.

4.6.3 Técnica de SDS-PAGE

A eletroforese do extrato de ninfas de *A. cajennense* (~50 µg de proteína por pocinho) foi realizada em mini-gel de poliacrilamida (PAGE) na presença de 10% de duodecil sulfato de sódio (SDS) segundo técnica preconizada por Laemmli (1970). A concentração do gel de empilhamento foi de 5% e do gel de separação de 12%.

Como padrão de peso molecular utilizou-se o Multimark® *multi-colored standard* (Invitrogen Lc 5725), com pesos moleculares variando de 6 a 185 kDa.

A corrida eletroforética foi realizada à temperatura ambiente com uma diferença de potencial de corrente de 80 V durante duas horas e meia. Após a corrida, um dos geis foi corado com Coomassie brilliant Blue R₂₅₀ em água destilada (0,05%) e deixado em baixa agitação (50 rpm) por até 20 minutos. A remoção do excesso de corante fez-se mediante solução descolorante (30% de metanol e 7% de ácido acético), sob baixa agitação (50 rpm) por cerca de 3 horas. O outro gel foi eletrotransferido para membrana de nitrocelulose, para realização do “Western blotting”.

4.6.4 Técnica de “Western blotting”

A técnica de “Western blotting” foi realizada segundo modelo preconizado por Towbin et al. (1979). A transferência das proteínas do gel para a membrana de nitrocelulose foi feita a 90 V por um período de uma hora, à temperatura ambiente. Após a transferência, a membrana de nitrocelulose foi corada por 5 minutos com solução “Ponceau-S” a 0,1% e, em seguida descorada com água destilada. Na seqüência, a membrana foi cortada em tiras, sendo estas bloqueadas “overnight” com uma solução de TBS-tween, pH 8, contendo 5% de leite desnatado, sob agitação

constante à temperatura ambiente. Em seguida, as tiras foram incubadas com soro dos animais infestados ou não (1:50 em TBS-Tween) durante 2 horas, sob agitação e à temperatura ambiente. Depois de três lavagens a intervalos de 10 minutos com TBS-Tween, as tiras foram incubadas por duas horas com o anticorpo secundário, anti-IgG de caprino conjugada a fosfatase alcalina (Sigma), na diluição de 1:75.000 em TBS-Tween. Finalmente, a revelação da reação foi feita utilizando-se como substrato enzimático o 5-Bromo-4-cloro-3-Indolly phosphate e o azul de nitrotetrazolium (BCIP / NBT Sigma).

4.6.5 Absorção de anticorpos nos soros controle

Para reduzir a reatividade dos soros controle com extratos de ninfas de *A. cajennense* foi realizada a absorção dos anticorpos séricos destes por teste ELISA indireto. Para tal, uma placa ELISA (Nunclon™ surface, cat. No. 167008) foi sensibilizada com o extrato de ninfas “overnight” a 4°C. Em seguida, a placa foi bloqueada com solução tampão carbonato-bicarbonato, pH 9,6 com 5% de leite em pó desnatado, por uma hora a 37°C. Depois de três lavagens com PBS-Tween 20, foram acrescentados aos pocinhos da placa os soros nas diluições 1:50, 1:100, 1:500 e 1:1000 e a placa foi incubada por duas horas em estufa a 37°C. No final, os soros absorvidos foram colhidos da placa ELISA, com cuidado, e utilizados na reação de “Western blotting”.

4.6.6 Cálculo do peso molecular das proteínas

Efetuuou-se o cálculo do peso molecular das proteínas separadas por eletroforese por meio da curva padrão, gerada com base na razão entre a distância migrada pela proteína e a distância percorrida pelo corante e o peso molecular conhecido (padrão de peso molecular). O peso molecular das proteínas de interesse foi extrapolado a partir desta curva.

4.7 Análise estatística

Para avaliação estatística utilizou-se análise de variância de medidas repetidas, em um fator com três níveis (infestações) entre os animais e um fator tempo com quatro variáveis dentro das infestações. As comparações dos pares de valores médios foram feitas usando-se o teste de Tukey, considerando-se um nível de significância de 5%.

V. RESULTADOS

5.1 Parâmetros biológicos dos carrapatos

Os resultados dos parâmetros biológicos das ninfas de *A. cajennense* observados nas três infestações em caprinos são apresentados na Tabela 2.

O período de ingurgitamento (pING) e a porcentagem de recuperação das ninfas (% REC) não apresentaram variação significativa, ao passo que tanto o peso de ingurgitamento (pNI) como a porcentagem de ecdise (% ECD) das ninfas diminuíram significativamente ($p < 0,05$) com as re-infestações e na segunda infestação, respectivamente. Por outro lado, o período de ecdise (pECD) aumentou significativamente ($p < 0,05$) na terceira infestação.

Tabela 2. Parâmetros médios observados em ninfas de *A. cajennense* durante infestações sucessivas e controladas em caprinos e realizadas a intervalos de 30 dias. Resultados expressos em média \pm desvio padrão. Jaboticabal, 2007.

Infestação	n	pNI (mg)	pING (dias)	pECD (dias)	% REC	% ECD
1 ^a	5	12,55 ^a \pm 3,21	10,00 ^a \pm 0,37	15,00 ^a \pm 0,82	59,8 ^a \pm 15,45	96,89 ^a \pm 3,38
2 ^a	5	7,32 ^b \pm 0,95	10,00 ^a \pm 1,69	14,00 ^a \pm 1,42	51,6 ^a \pm 15,39	71,91 ^b \pm 17,38
3 ^a	5	7,89 ^b \pm 1,09	11,00 ^a \pm 2,2	18,00 ^b \pm 2,83	57,9 ^a \pm 5,8	95,55 ^a \pm 4,9

pNI= peso da ninfa ingurgitada; pING= período de ingurgitamento; pECD= período de ecdise; %REC= taxa de recuperação; %ECD= taxa de ecdise.

Letras diferentes em cada coluna representam diferença estatisticamente significativa (Teste de Tukey, 5%).

5.2 Resposta do hospedeiro à alimentação dos carrapatos

5.2.1 Alterações macroscópicas nos locais de fixação dos carrapatos

Nos locais de fixação das ninfas de *A. cajennense*, observou-se nas reinfestações, além de hiperemia nos locais de fixação dos carrapatos, a formação de

vesículas repletas de líquido seroso, que se rompiam com o decorrer dos dias e formavam uma espécie de crosta que muitas vezes envolvia os carrapatos (Figura 2).

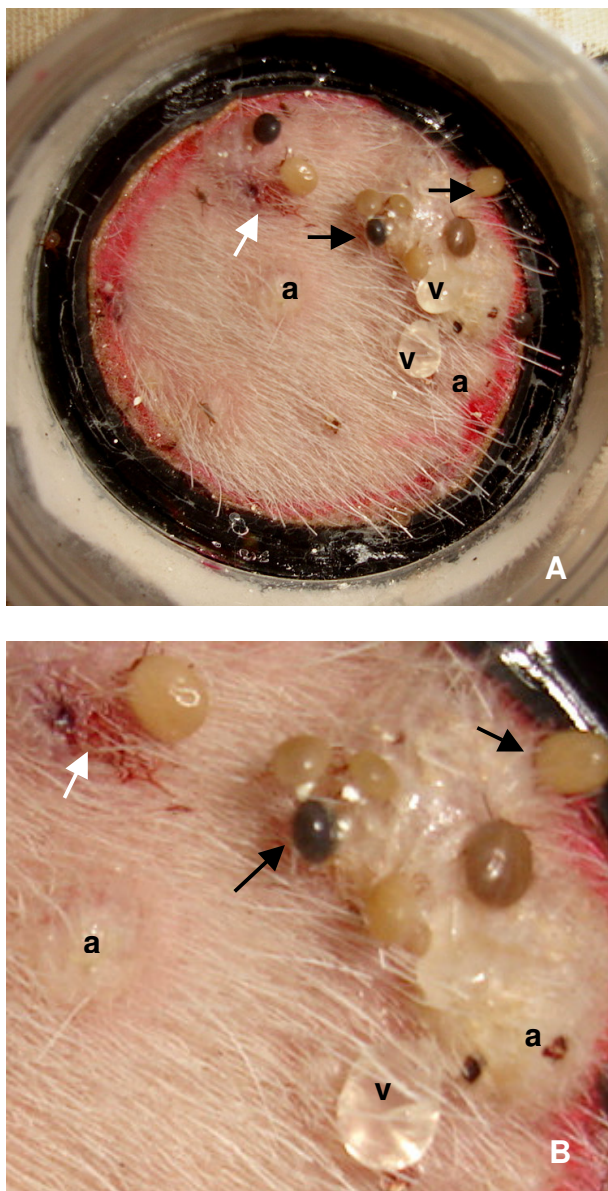


Figura 2. Pele de caprino infestada com ninfas de *A. cajennense*. Em A, notar hiperemia ativa local, hemorragia (seta branca) e presença de ninfas ingurgitadas (setas pretas), vesículas rompidas expondo conteúdo seroso (v) e vesículas intactas (a). Em B, detalhe de A.

5.2.2 Histopatologia do local de fixação dos carrapatos

No ponto de fixação das ninfas notou-se logo na 24^a hora após a primeira infestação, descontinuidade ou fratura da epiderme, e em alguns casos, a presença do hipostômio do carrapato circundado por uma massa eosinofílica, denominada cone de cimento. Observou-se também pouca destruição tecidual local e presença de algumas células inflamatórias. Com o decorrer da infestação, a extensão da lesão foi aumentando gradativamente, agravando-se o quadro com as reinfestações. Próximo a essa área verificou-se ainda hiperplasia da epiderme e formação de vesículas intra-epidérmicas preenchidas por células polimorfonucleares, principalmente neutrófilos.

Na derme, distal ao cone de cimento, observou-se formação de cavidades alimentares, caracterizadas como pequenas áreas necróticas preenchidas por células inflamatórias, mormente neutrófilos, e por restos de células mortas. Morfologicamente, a reação do hospedeiro à fixação de ninfas de *A. cajennense* foi marcada por reação inflamatória exsudativa, caracterizada por alterações circulatórias locais com hiperemia de vasos dérmicos, hemorragias puntiformes, edema inflamatório espelhado pela dissociação de fibras do tecido conjuntivo e de infiltrado celular típico. Este era composto principalmente por polimorfonucleares neutrófilos, basófilos e eosinófilos, mastócitos e células mononucleares como macrófagos e linfócitos, cuja intensidade variou conforme o tipo de situação experimental em estudo. Essas células foram melhor evidenciadas em cortes corados pelo May-Grünwald & Giemsa, o que facilitou sobremaneira a sua contagem. Fibroblastos foram também observados nos cortes histológicos. As Figuras 3 e 4 ilustram algumas destas alterações microscópicas em caprinos submetidos a infestações controladas e sucessivas por ninfas de *A. cajennense*.

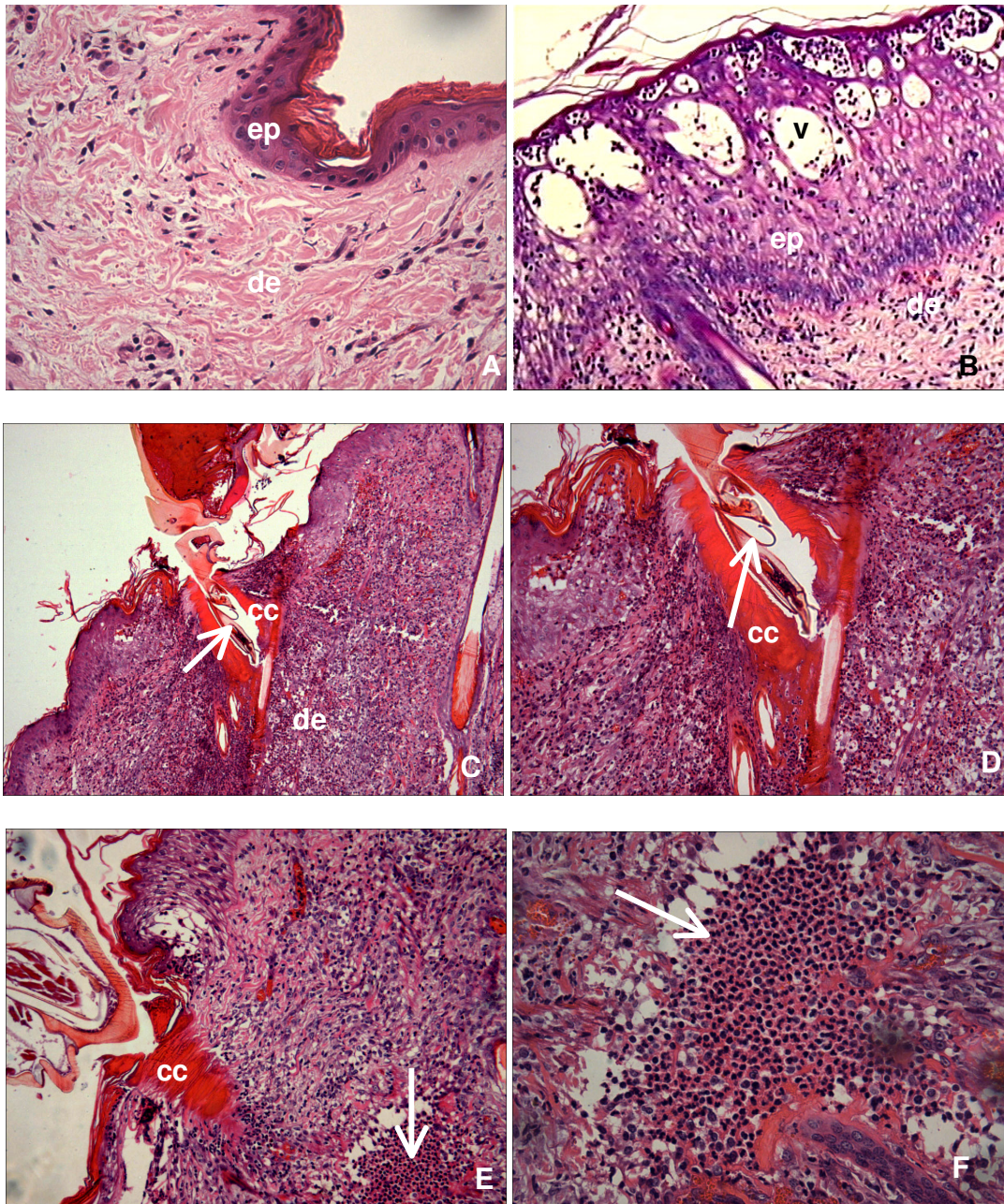


Figura 3. Histopatologia do local de fixação de ninfas de *A. cajennense* em caprinos: A- pele normal, antes da infestação: notar epiderme (ep) e derme (de) inalteradas (Obj. 40x). B- pele infestada: notar hiperplasia, vacuolização celular e vesículas contendo células inflamatórias (v) na epiderme (Obj. 10x). C- visão geral da lesão com presença de cone de cimento (cc), peças bucais do carrapato (seta) e derme (de) com infiltrado inflamatório (Obj. 10x). D- detalhe de C (Obj. 20x). E- notar cone de cimento (cc) e cavidade alimentar (seta) (Obj. 10x). F- detalhe de E (Obj. 40x). Coloração HE.

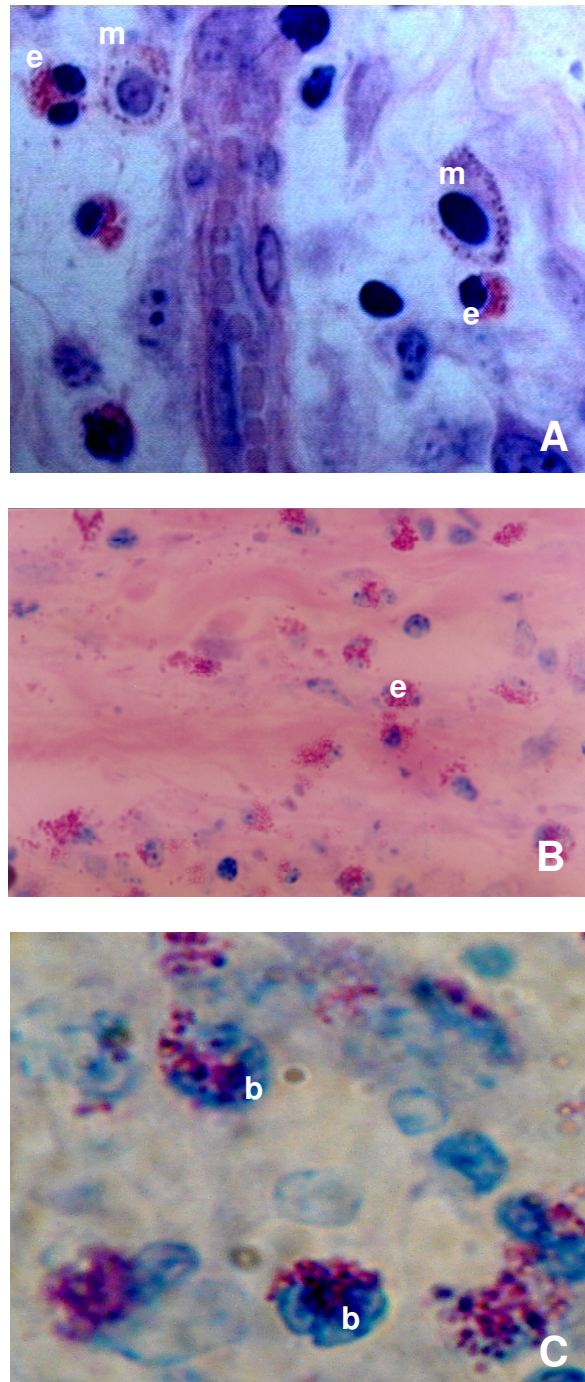


Figura 4. Fotomicrografias de pele de caprino durante infestações com ninfas de *A. cajennense*. Em A, B e C detalhes do infiltrado celular evidenciando eosinófilos (e), mastócitos (m) e basófilos (b). Coloração May Grünwald & Giemsa (Obj. 100x).

5.2.3 Contagens celulares na área da lesão

Os resultados das contagens de células por mm^2 no infiltrado inflamatório presente no local de fixação de ninfas de *A. cajennense* são apresentados na Figura 5. Esse infiltrado era constituído basicamente por neutrófilos, basófilos, células mononucleares (linfócitos e macrófagos), eosinófilos e mastócitos, em ordem decrescente de sua participação no processo.

A primeira infestação foi caracterizada por predominância de células polimorfonucleares neutrófilos até a 72^a hora. Na 120^a hora, o número de basófilos aumentou consideravelmente se sobrepondo ao número de neutrófilos. Eosinófilos, células mononucleares e mastócitos não apresentaram alterações significativas ao longo da infestação.

Na segunda infestação, a contagem de neutrófilos permaneceu elevada, entretanto o número de basófilos superou o de neutrófilos na 48^a e 72^a hora, inclusive com um aumento significativo ($P < 0,05$) quando comparado com o de basófilos na primeira infestação. O número de células mononucleares aumentou gradualmente a partir da 72^a hora, com um aumento significativo na 120^a hora ($P < 0,05$) quando comparada com a primeira infestação. Por seu turno, as contagens de eosinófilos e de mastócitos não apresentaram alterações significativas.

Na terceira infestação o número de basófilos continuou relativamente elevado, com pico na 48^a hora quando sua contagem passou a superar o número de neutrófilos.

As células mononucleares formaram o terceiro tipo celular mais numeroso no infiltrado inflamatório, com pouca variação entre as infestações. No entanto, houve um aumento significativo ($P < 0,05$) do número destas células na 120^a hora durante a segunda infestação.

O número de eosinófilos reduziu consideravelmente na 72^a e 120^a hora após as reinfestações, apesar desta redução não ter sido estatisticamente significativa.

Os mastócitos foram encontrados ocasionalmente no infiltrado inflamatório, às vezes degranulados, mas sem variações estatisticamente significativas quando comparada a primeira infestação com as reinfestações.

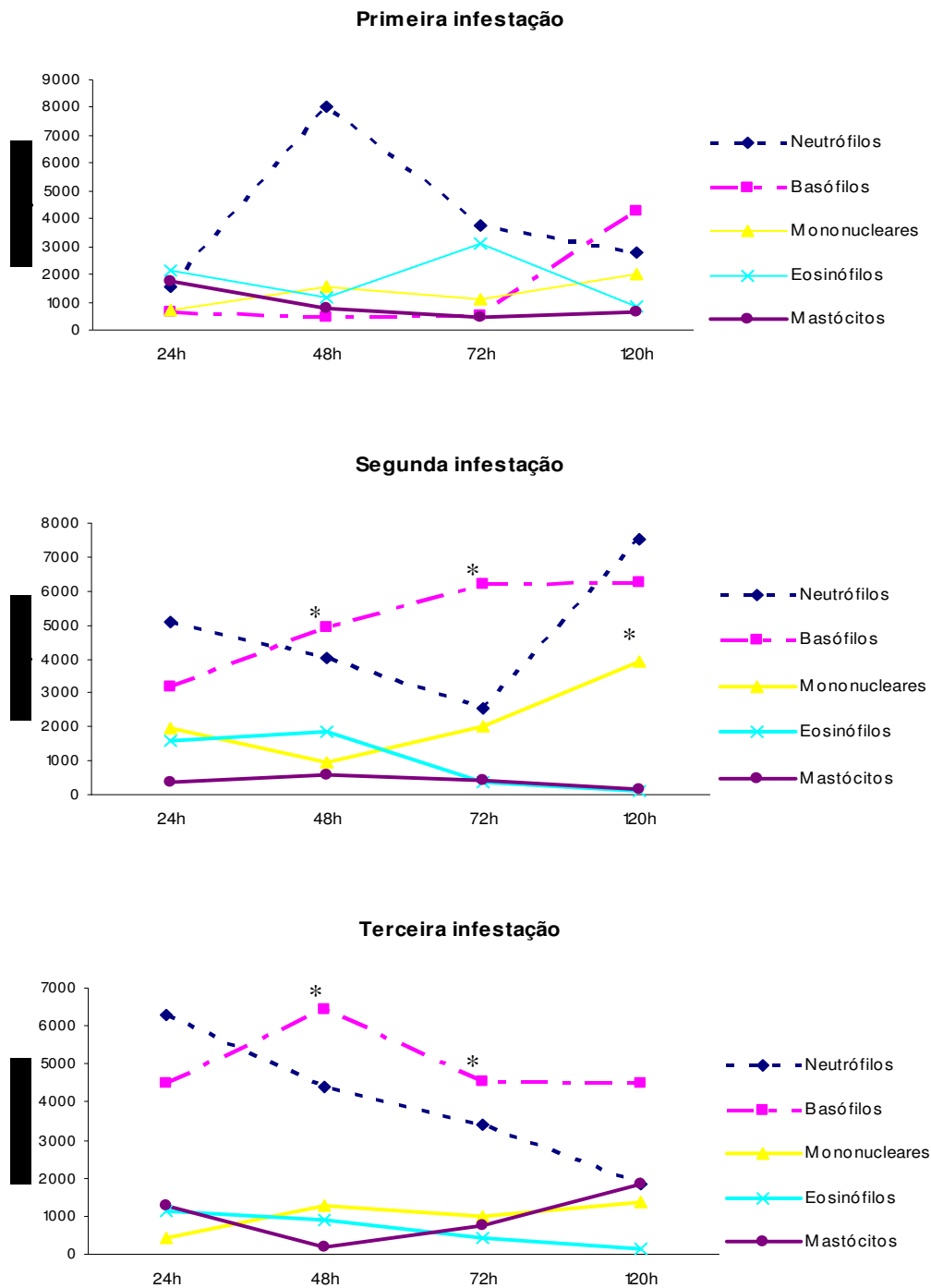


Figura 5. Contagem diferencial de células inflamatórias em área adjacente à lesão de fixação de ninfas de *A. cajennense* em caprinos durante a primeira, segunda e terceira infestações. *Diferenças estatisticamente significativas (Teste de Tukey, 5%). Jaboticabal, 2007.

5.3. Hemograma

Os parâmetros hematológicos observados nos caprinos antes e 30 dias depois de cada infestação são apresentados nas Tabelas 3 e 4. Observou-se que, de uma forma geral, os parâmetros hematológicos dos caprinos analisados, antes e depois de cada infestação, permaneceram dentro ou próximos dos limites de normalidade estabelecidos para essa espécie nesta idade.

Tabela 3. Eritrograma de caprinos infestados com ninfas de *A. cajennense*, realizado antes das infestações e 30 dias depois de cada infestação. Jaboticabal, 2007.

	Dia 0	Infestação 1	Infestação 2	Infestação 3
Hematócrito (%)	20,8±1,46	25,6±0,6	32,0±4,23	28,6±1,5
Hemoglobina (g/dL)	8,5±0,64	9,41±0,2	11,1±1,32	9,2±0,7
Hemáceas / µl	8806+-670,4	14540+-5192	16340+-1861,8	15120+-2318,8

Tabela 4. Leucograma de caprinos infestados com ninfas de *A. cajennense*, realizado antes das infestações e 30 dias depois de cada infestação. Jaboticabal, 2007.

	Dia 0	Infestação 1	Infestação 2	Infestação 3
Leucócitos/µL	11.500±1576,5	11.040±954,3	11.220±3545,3	10.830±2285,9
Basófilos (%)	1,0±0,31	0,4±0,24	0,2±0,2	0±0
Eosinófilos (%)	2,2±0,86	1,0±0,55	1,6±0,9	0,6±0,2
Neu. Segm. (%)	1,0±0,32	1,0±0	1,6±0,7	0,4±0,4
Neu. Basto. (%)	40,2±2,8	35,6±2,9	53,8±7,5	50,0±6,4
Linfócitos (%)	54,4±3,7	59,8±3,2	42,2±7,7	46,2±6,19
Monócitos (%)	1,2±0,2	2,2±0,2	0,6±0,2	3,0±0,54

5.4. Imunoistoquímica de linfonodos regionais

Os anticorpos monoclonais: CD11b, CD11c e CD21, utilizados para evidenciar, respectivamente, superfície de macrófagos, células dendríticas e células B em linfonodos drenantes da lesão de fixação de ninfas de *A. cajennense* em caprinos naives e pré-sensibilizados, marcaram positiva e específica esses tipos celulares (Figura 6).

Desse modo, observou-se marcação de células pelos anticorpos monoclonais CD11b e CD11c nas regiões paracortical e medular de linfonodos pré-escapulares de caprinos pré-sensibilizados. Por outro lado, o anticorpo CD21 marcou mais intensamente células na região de folículos linfáticos. Os resultados das contagens de células marcadas são apresentados na Tabela 5.

Nos linfonodos dos animais não infestados, observou-se marcação de poucas células, se comparados com aqueles de animais sensibilizados. Comparando-se linfonodos de animais primoinfestados com os de terceira infestação notou-se marcação ligeiramente mais intensa nos de terceira infestação. No entanto, não se observou diferença significativa no número de células marcadas.

Tabela 5. Análise imunoistoquímica de células apresentadoras de antígeno infiltrando linfonodos drenantes de local de fixação de ninfas de *A. cajennense* em caprinos durante a primeira e terceira infestações. Jaboticabal, 2007.

Anticorpos monoclonais	Linfonodo controle	Linfonodos de animais infestados	
		1 ^a infestação	3 ^a infestação
CD11b	+	+++	+++
CD11c	+	++	++
CD21	++	+++	++++

+ (até 25 células), ++ (26 a 50 células), +++ (51 a 75 células) e ++++ (mais de 75 células) por campo microscópico (Obj. 400x).

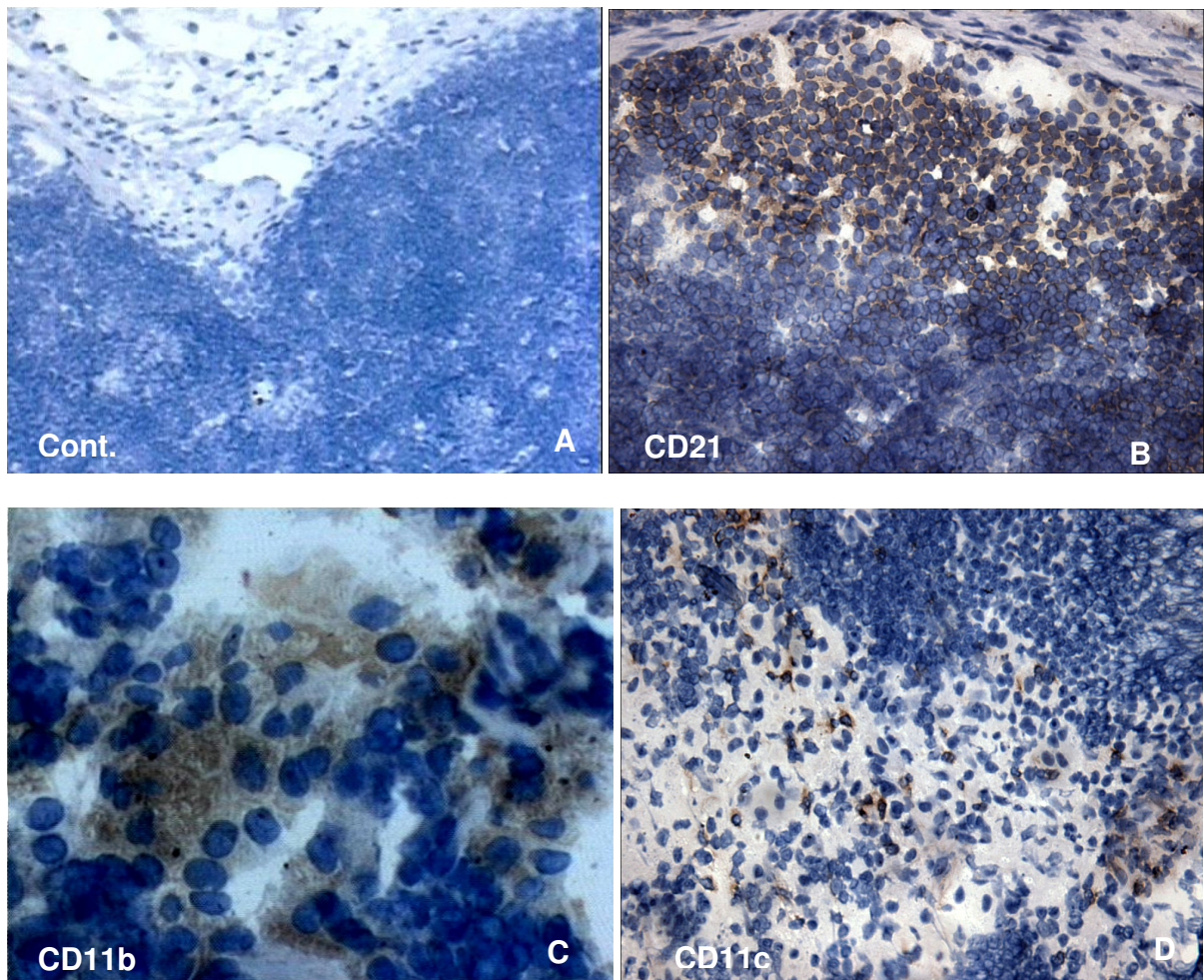


Figura 6. Imunoistoquímica de linfonodos drenantes de área de fixação de ninfas de *A. cajennense*. (A) Linfonodo controle da reação (obj. 10x); (B) Células marcadas com anti-CD21: notar marcação no folículo linfático de linfonodo de 3^a infestação (obj. 40x); (D) Células da região para-cortical do linfonodo de 3^a infestação marcadas com o anticorpo anti-CD11b (obj. 40x); (E) Marcação anti-CD11c, região para-cortical de linfonodo de 1^a infestação (obj. 20x). Técnica ABC, contracoloração com hematoxilina.

5.5 “Western blotting”

Os resultados da eletroforese (SDS-PAGE) de extratos de ninfas de *A. cajennense* estão apresentados na figura 7. Foram observadas cerca de 10 bandas protéicas variando entre 7 e 92 kDa, com as de 7, 58 e 92 kDa fortemente marcadas. Polipeptídeos identificados pelo “Western blotting” de extratos de ninfas de *A. cajennense* são ilustrados na figura 8. No caso de caprinos infestados com *A. cajennense*, seis polipeptídeos foram reconhecidos pelos anticorpos séricos de animais de primeira infestação, com pesos moleculares de 41, 45, 49, 63, 90 e 160 kDa. Anticorpos séricos dos animais de terceira infestação reconheceram nove polipeptídeos, seis dos quais foram os mesmos reconhecidos pelos anticorpos de primeira infestação, com a presença de mais três polipeptídeos fracamente marcados, com 16, 21 e 22 kDa. No caso de caprinos infestados com *A. hebraeum* os anticorpos séricos de primeira infestação reconheceram quatro polipeptídeos de extratos de ninfas de *A. cajennense* com 46, 49, 90 e 160 kDa. Na terceira infestação, além dos quatro polipeptídeos da primeira infestação, foram reconhecidos mais três com 16, 40, e 70 kDa. Anticorpos séricos dos animais não infestados reconheceram polipeptídeos com pesos moleculares de 45, 49, 63, 90 e 160 kDa, portanto, os mesmos reconhecidos pelos de primeira infestação. Quando se usou os soros resultantes da absorção feita por ELISA, foram testadas concentrações séricas de 1:50, 1:100, 1:500 e 1:1000 e, em todas as situações, observou-se o mesmo padrão de reconhecimento de polipeptídeos dos extratos de ninfas de *A. cajennense*, reativos a soros de animais não infestados.

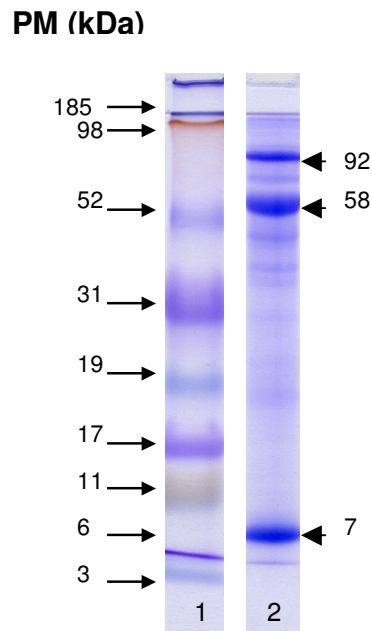


Figura 7. Eletroforese de extratos de ninfas de *A. cajennense* (2), realizada em minigel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e corado com "comassie brilliant blue". Marcador de baixo peso molecular (PM) (1), com 185, 98, 52, 31, 19, 17, 11, 6, e 3 kDa, referentes a myosin, phosphorylase B, glutamic dehidrogenase, carbonic anhydrase, myoglobin-Red, myoglobin-Blue, lysozyme, aprotinin e insulin B chain, respectivamente.

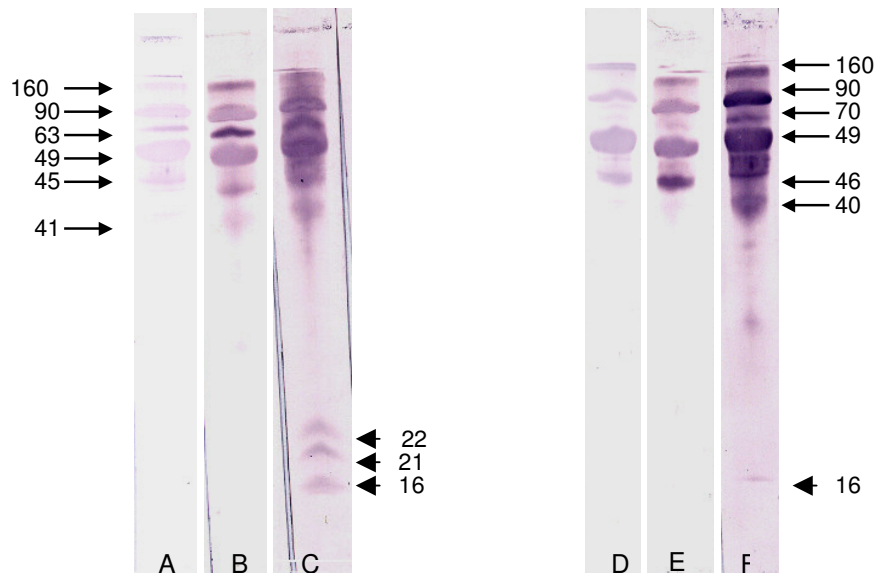


Figura 8. "Western blotting" do produto da eletroforese (SDS-PAGE) de extratos de ninfas de *A. cajennense*. Polipeptídeos reconhecidas por anticorpos séricos de caprinos antes da infestação (A); depois da 1ª infestação (B) e da 3ª infestação (C) com ninfas de *A. cajennense*. Antes da infestação (D), depois da 1ª infestação (E) e da 3ª infestação (F) com *A. hebraeum*.

VI. DISCUSSÃO

O carrapato *A. cajennense*, um ixodídeo trioxeno, é amplamente distribuído no continente americano, onde parasita preferencialmente cavalos. Entretanto, devido à sua baixa especificidade por hospedeiros, principalmente nos estágios imaturos, pode parasitar outras espécies domésticas e silvestres, inclusive o homem. Estudos prévios realizados no Laboratório de Imunopatologia do Departamento de Patologia Veterinária da FCAV-UNESP, Jaboticabal, demonstraram que cães não desenvolvem imunidade aparente a larvas ou ninfas de *A. cajennense* (MUKAI, 2003; MUKAI et al., 2002a, 2002b) e que asininos desenvolvem uma resistência superior à de eqüinos, que por sua vez adquirem resistência apenas parcial a larvas e ninfas deste ácaro (CASTAGNOLLI et al., 2003).

Aproveitando a sua baixa especificidade parasitária, caprinos foram três vezes infestados com ninfas de *A. cajennense* com o intuito de avaliar a resistência desses pequenos ruminantes ao estágio imaturo do ácaro e a possível existência de reatividade cruzada com antígenos de *A. hebraeum*, espécie encontrada exclusivamente no sul da África, incluindo Moçambique, pátria da autora desta dissertação. Lá, este ixodídeo parasita entre outros hospedeiros, os caprinos, transmitindo aos animais a *Ehrlichia ruminantium*, biopatógeno do "coração d'água", uma rickettsiose. Pelo fato de ser um carrapato exótico no Brasil, propôs-se no presente estudo trabalhar com *A. cajennense*, ixodídeo presente neste país. Assim, no caso de existência de reatividade cruzada, as técnicas utilizadas nos experimentos com *A. cajennense* poderiam ser aplicadas na interação caprino x *A. hebraeum*, inclusive com possibilidade de extrapolação de resultados aqui obtidos para aquela espécie de carrapato.

Em primeiro lugar, determinaram-se os parâmetros biológicos do carrapato quando alimentado em hospedeiros não sensibilizados, submetidos a uma primoinfestação. Nesta situa o, esperava-se que o desenvolvimento dos carrapatos fosse pleno, pela ausência de resistência do hospedeiro. De fato, a infesta o de animais não sensibilizados permite estabelecer um padrão de comportamento na rela o hospedeiro x carrapato, enquanto que a análise daqueles parâmetros biológicos em infesta es sucessivas permitiria avaliar o grau de resistência adquirida em cada

hospedeiro. De fato, a redução do peso de ingurgitamento de carrapatos, das taxas de recuperação e ecdise, assim como o prolongamento dos períodos de ingurgitamento e ecdise observados em relação às infestações controle, entre outros parâmetros, são largamente empregados como indicativos de aquisição de resistência a infestações por carrapatos (WILLADSEN, 1980; SZABÓ et al., 1995).

Além dos parâmetros biológicos das ninfas alimentadas, foram também avaliados aspectos relacionados com as reações sistêmica, regional e local de caprinos ao parasitismo nas condições acima referidas. Assim, alterações no hemograma de animais infestados forneceram uma visão de reatividade sistêmica do hospedeiro, enquanto os exames macroscópico e histopatológico da lesão de fixação do carrapato revelaram alterações locais. Por outro lado, a análise imunoistoquímica de linfonodos drenantes de locais de fixação dos carrapatos, para a pesquisa de células dendríticas, macrófagos e linfócitos B, realizada com o intuito de observar a dinâmica destas células durante infestações por *A. cajennense*, forneceu uma visão regional do processo. Finalmente, foi empregada a técnica de “Western blotting” para investigar possível reatividade cruzada entre antígenos de *A. cajennense* e *A. hebraeum*. Os resultados desta análise são relevantes com a possibilidade de se extrapolar resultados obtidos com *A. cajennense* para *A. hebraeum*.

O peso médio das ninfas alimentadas foi de 12,55, 7,32 e 7,89 mg na primeira, segunda e terceira infestações, respectivamente, o que representa redução significativa de, respectivamente 41,7 % e 37,2 % nesse parâmetro na segunda e terceira infestações em relação à primoinfestação. Isso sugere que infestações sucessivas reduzem a habilidade de ninfas se alimentarem adequadamente. A comparação destes dados com os da literatura deve levar em consideração o fato dos hospedeiros objeto das pesquisas nem sempre pertencerem à mesma espécie. Na maioria das vezes são utilizados coelhos (SANAVRIA e PRATA, 1996; FREITAS et al., 2006), cavalos (CASTAGNOLLI et al., 2003) e cães domésticos (MUKAI, 2003; MUKAI et al., 2002a). De fato, os valores aqui observados diferem daqueles de Mukai (2003) e Mukai et al. (2002a) em três infestações sucessivas, só que em cães, com ninfas de *A. cajennense*. Esses autores não observaram alterações significativas no peso de ingurgitamento das

ninfas em decorrência das reinfestações. Naquele estudo, observou-se pesos médios de 11,5, 9,9 e 11,6 mg na primeira, segunda e terceira infestações, respectivamente. Por outro lado, valores observados neste trabalho concordam com aqueles de Castagnolli et al. (2003) que verificaram pesos de 17,2, 16,1 e 13,4 mg em potros e por Freitas et al. (2006) em coelhos, com pesos de 0,021, 0,013 e 0,009 mg em três infestações sucessivas com ninfas de *A. cajennense*. De facto, os pesos observados em potros foram superiores aos observados em caprinos, em cães e em coelhos, sugerindo que o peso de ingurgitamento varia consoante o hospedeiro. E, naturalmente, é maior naquele preferencial do carrapato, o que denota uma melhor adaptação ao hospedeiro, pela exposição natural destes animais ao carrapato durante muitas gerações.

O período de ecdise esteve em torno de 14 dias, valor este próximo do observado por Mukai (2003) e Mukai et al. (2002a) para ninfas alimentadas em cães, e por Sanavria e Prata (1996) em colônia de *A. cajennense* mantida em coelhos. No entanto, observou-se um aumento significativo em torno de 20% na 3ª infestação. Diferentemente do peso de ingurgitamento, que reduziu logo na segunda infestação, o período de ecdise aumentou somente na 3ª infestação, o que demonstrou uma influência mais tardia das infestações repetidas sobre o período de ecdise de ninfas de *A. cajennense*.

Por seu lado, a porcentagem média de ecdise das ninfas foi de 96,98 %, 71,91% e 95,55% na primeira, segunda e terceira infestações, respectivamente, o que representa redução em 25,7% desse parâmetro na segunda infestação em relação à primoinfestação. Ressalte-se que este valor recuperou-se completamente na 3ª infestação, talvez devido à influência de fatores imunossupressores, já que em altas doses esses fatores presentes na saliva de carrapatos podem causar imunossupressão em infestações por esses ácaros (WIKEL, 1999).

O período de ingurgitamento assim como a porcentagem de recuperação das ninfas não apresentaram alterações significativas com as reinfestações. O período de ingurgitamento das ninfas foi de 10 dias na primeira e segunda infestações e de 11 dias na terceira. Estes resultados estão em concordância com os observados por Castagnolli

et al. (2003) em relação à ausência de alterações significativas no período de ingurgitamento, que foi de apenas cinco dias. Já Olivieri e Serra Freire (1984), em estudo do ciclo biológico do estágio ninfal de *A. cajennense*, observaram período de ingurgitamento de ninfas de *A. cajennense* entre quatro e oito dias.

A porcentagem de recuperação de ninfas foi de 59,8%, 51,6% e 57,9% na primeira, segunda e terceira infestações, respectivamente. Estes resultados são semelhantes aos observados em coelhos por Prata et al. (1995), mas bem inferiores aos verificados em potros por Castagnolli et al. (2003) e em cães domésticos por Mukai et al. (2002a), e que foi em torno de 90% e 80%, respectivamente. A baixa recuperação de ninfas em nosso caso pode estar relacionada a fatores como mortalidade *in situ* e/ou possível escape durante a abertura das câmaras de alimentação para o seu recolhimento quando ingurgitadas e desprendidas.

Os resultados da análise dos parâmetros biológicos mostraram que houve diferenças significativas entre as infestações em alguns parâmetros e não em outros, o que pressupõe que os caprinos desenvolveram resistência pelo menos parcial a ninfas de *A. cajennense*. Experimento piloto por nós realizado com infestação de caprinos por carrapatos adultos *A. cajennense* demonstrou não serem esses pequenos ruminantes hospedeiros apropriados para fixação e alimentação desse instar do ácaro. De fato, apenas 10% dos carrapatos liberados se fixaram e mesmo assim não chegaram a ingurgitar. No entanto, os resultados agora obtidos mostram que os caprinos são bons hospedeiros para ninfas de *A. cajennense*.

Na histopatologia do local de fixação dos carrapatos, observou-se logo na 24^a hora pouca destruição tecidual local e presença de algumas células inflamatórias durante a primeira infestação. Com o decorrer da infestação a extensão da lesão foi aumentando gradativamente, agravando-se o quadro com as reinfestações. Morfologicamente, a reação do hospedeiro à fixação de ninfas de *A. cajennense* foi marcada por reação inflamatória exsudativa, caracterizada por alterações circulatórias locais com hiperemia de vasos dérmicos, hemorragias puntiformes e edema inflamatório como demonstrado pela dissociação de fibras do tecido conjuntivo, além de infiltrado celular típico. Este era composto principalmente por polimorfonucleares

neutrófilos, basófilos e eosinófilos, mastócitos e células mononucleares como macrófagos e linfócitos, cuja intensidade variou conforme o tipo de situação experimental em estudo.

No local de fixação de *A. cajennense* observou-se uma descontinuidade da epiderme, sugerindo uma destruição tecidual provocada pelo hipostômio do carrapato. Em alguns casos, observou-se a presença do hipostômio do carrapato, circundado por uma massa eosinofílica, o cone de cimento, que tem por função promover uma melhor adesão do carrapato à pele do hospedeiro, permitindo que o carrapato se mantenha fixo por longos períodos e impede que moléculas do sistema imune do hospedeiro entrem em contacto com o hipostômio do carrapato (BINNINGTON e KEMP, 1980). Próximo a essa área verificou-se hiperplasia da epiderme, que parece ter ocorrido devido ao edema e vacuolização intracitoplasmática das suas células. Notou-se ainda a formação de vesículas intra-epidérmicas preenchidas por células polimorfonucleares, principalmente neutrófilos. Macroscopicamente, as vesículas eram similares às observadas em bovinos resistentes ao *R. (B.) microplus* (RIEK, 1962), *Ixodes holocyclus* (ALLEN et al., 1977) e *A. americanum* (BROWN et al., 1984). No entanto, microscopicamente, as vesículas observadas naqueles estudos eram preenchidas por basófilos, diferentemente do observado no presente estudo, em que elas eram povoadas por neutrófilos, como observado em vesículas formadas em locais de fixação de *Hyalomma anatolicum anatolicum* em coelhos (GIL e WALKER, 1985) e em bovinos (GIL, 1986). 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.

Na derme, distal ao cone de cimento, observou-se formação de cavidades alimentares, caracterizadas como pequenas áreas necróticas preenchidas por células inflamatórias, mormente neutrófilos, e de restos de células mortas. Adjacente ao cone de cimento, o infiltrado inflamatório era constituído basicamente de neutrófilos, basófilos, células mononucleares, eosinófilos e mastócitos, em ordem decrescente de participação no infiltrado. A primeira infestação foi caracterizada por predominância de células polimorfonucleares neutrófilos até a 72^a hora. A participação destas células

havia sido observada em animais de laboratório sofrendo primeira infestação, principalmente até o terceiro dia, chegando a representar 40 a 60% das células infiltradas (KAUFMAN, 1989). Provavelmente, esta reação represente a clássica reação inflamatória aguda e não imune a um estímulo lesivo inespecífico. Embora os neutrófilos estejam também envolvidos na formação de cavidade de alimentação, sua participação na expressão de imunidade a carrapatos pode ser desprezível, uma vez que a predominância dessas células infiltrando locais de fixação de carrapatos foi observada inclusive em animais não resistentes ao *R. sanguineus* como o cão doméstico (SZABO et al., 1995) e o camundongo (FERREIRA et al., 2003).

Nas reinfestações, o número de neutrófilos permaneceu elevado. Por outro lado, o número de basófilos aumentou significativamente a partir da 120^a hora pós-fixação já na 1^a infestação e manteve-se elevado até o final das observações. Todavia, um infiltrado copioso dessas células foi verificado logo na 24^a hora de fixação de ninfas na segunda e terceira infestações, aumentando progressivamente com o decorrer das mesmas. Tendência similar foi observada em locais de fixação de *A. americanum* (BROWN et al., 1984) e *H. a. anatolicum* (GIL, 1986) em bovinos e de *R. sanguineus* em cobaias (SZABÓ et al., 1995). Em contraste, basófilos foram raramente observados em locais de fixação de *R. (B.) microplus* em bovinos (SCHLEGER et al., 1976), constituíram apenas uma pequena proporção do infiltrado em locais de fixação de *H. a. anatolicum* em coelhos (GIL e WALKER, 1985) e praticamente inexisteram na reação do cão doméstico ao carrapato *R. sanguineus* (SZABÓ et al., 1995). Essas variações entre diferentes associações carrapato-hospedeiro apontam, portanto para a presença de um quadro de basofilia cutânea em hospedeiros associado ao desenvolvimento de resistência a determinadas espécies de carrapato. Estas células parecem ser fundamentais nesse mecanismo como comprovado por Brown et al. (1982) ao abolirem a resistência de cobaias ao carrapato quando tratadas com soro antibasófilo. O mecanismo de ação destas células na indução da resistência ao carrapato ainda não está bem definido, mas acredita-se que participem de reações anafiláticas locais, liberando mediadores químicos, como a histamina, prejudicando a salivação e alimentação do carrapato (PAINE et al., 1983).

As células mononucleares foram o terceiro tipo celular em número formando parte substancial do infiltrado inflamatório. Provavelmente, o elevado número dessas células seja devido ao fato de terem sido incluídos como tal linfócitos, macrófagos e fibroblastos, dada a dificuldade muitas vezes de distinção entre esses tipos celulares pelas técnicas de coloração usadas. Embora seu número tenha variado pouco entre as infestações, houve um aumento significativo do seu número na 120^a hora após a segunda infestação. Na terceira infestação, esse número retornou aos níveis verificados na 1^a infestação. Estes resultados diferem dos observados por Gil (1986) em locais de fixação de *H. a. anatolicum* em bovinos, em que observou-se um aumento significativo destas células na 3^a infestação comparada com a primeira, quadro este sugestivo de desenvolvimento de resposta imune do hospedeiro.

Na escala de participação no infiltrado apareceram os eosinófilos; o número destas células reduziu-se consideravelmente na 72^a e 120^a hora após as reinfestações confirmando resultados de Gil e Walker (1985). Estes autores também observaram uma redução dramática do número de eosinófilos a partir da 72^a hora após terceira infestação em locais de fixação de *H. a. anatolicum* em coelhos. Segundo eles, tal redução seria devido à degranulação dos eosinófilos associada à inativação do efeito de mediadores derivados dos mastócitos.

No conjunto, estes achados estão de acordo com os resultados de Brown et al. (1984), e indicam um papel primário dos basófilos na resistência imune de caprinos a ninfas de *A. cajennense*, contrariamente ao que se observou com *R. (B.) microplus* onde eosinófilos foram descritos como células primárias (SCHLEGER et al., 1981).

Como se pode observar, a resposta imune ao *R. (B.) microplus*, um carrapato monoxeno que se fixa mais superficialmente à epiderme em comparação com espécimes do gênero *Amblyomma*, carrapatos trioxenos que inserem seu hipostômio profundamente na derme, envolve a indução de respostas imunes diferentes com eosinofilia ou basofilia cutâneas, respectivamente (BROWN et al, 1984). Os mecanismos pelos quais eosinófilos afetam os carrapatos não são bem conhecidos, todavia Brown et al. (1982) sugeriram o envolvimento da proteína básica dos grânulos dessas células na expressão de resistência a carrapatos. Estas proteínas têm um papel

antiparasitário como mostrado por sua habilidade de eliminar protozoários *in vitro* (Brown et al., 1984).

Os mastócitos foram encontrados ocasionalmente no infiltrado inflamatório, mas sem variações estatisticamente significantes quando comparadas a primeira infestação com as reinfestações. No entanto, o número de mastócitos foi elevado logo na 24^a hora após a primeira infestação e manteve-se assim no decorrer da infestação. Pelo contrário, na segunda infestação este valor baixou drasticamente e na terceira elevou-se novamente. A redução observada na 2^a infestação 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.

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 (ALLEN, 1973; WIKEL, 1996). Estas células foram associadas a uma forma de imunidade celular conhecida como hipersensibilidade basofílica cutânea (Wikel, 1996). Eosinófilos são também consideradas células importantes na resistência a parasitos, mais concretamente, aqueles migrando nos tecidos. Os grânulos de basófilos e mastócitos são ricos em histamina (ASKENASE, 1977) e a degranulação dessas células resulta na liberação de histamina e serotonina (5-hydroxytryptamina) que se acredita participem da mediação da resistência a carrapatos (WIKEL, 1982).

O hemograma de caprinos infestados pelo carrapato *A. cajennense* foi realizado para se avaliar o grau de envolvimento sistêmico na reação imune-inflamatória contra este ectoparasita. É importante mencionar antes de discussão mais específica que por sua distribuição sistêmica, o sangue circulante canaliza a reação de um indivíduo a múltiplos estímulos internos e externos. Por este motivo, o hemograma de um animal pode variar de forma considerável, e a observação de alta dispersão dos parâmetros analisados em torno da média não se constitui em uma surpresa. Além disso, o conjunto das condições experimentais e não a atividade dos carrapatos na câmara de alimentação pode ter influenciado os valores hemáticos em

muitos casos, diluindo os efeitos deste ectoparasita. Isso explica pelo menos em parte porque os resultados do hemograma dos caprinos infestados não diferiram significativamente dos não infestados, assim como não se observou diferenças significativas entre os dados observados ao longo das três infestações experimentais.

A ausência de variação no eritrograma indica que o número de carrapatos utilizados nas infestações foi insuficiente para espoliar significativamente os caprinos, mas nada se poderia afirmar sobre infestações mais intensas. Em relação ao leucograma, como as infestações artificiais foram de estímulo reduzido, possivelmente não o tenham alterando significativamente. Isto, entretanto, não seria uma observação óbvia em caprinos submetidos a 2^a e 3^a infestações, pois reações imunes são caracterizadas por respostas exacerbadas frente a estímulos antigênicos diminutos, como ocorre nas diversas reações de hipersensibilidade, notadamente a imediata (ABBAS, 2000). Fatores imunomoduladores liberados pelos carrapatos, assim como fatores relacionados com a reação do hospedeiro de forma a manter sua homeostase, podem estar na origem da não alteração do leucograma dos caprinos.

Os resultados do presente trabalho representam a primeira observação sobre a interferência da infestação por carrapatos *A. cajennense* sobre eritrograma e leucograma de caprinos. Mesmo em outras relações carrapato-hospedeiro estes dados são restritos. Gordon e Allen (1979) observaram aumento do número de basófilos circulantes em cobaias infestadas com o carrapato *D. Andersoni*, exacerbado numa segunda infestação. Cobaias infestadas pelo carrapato *A. americanum* (BROWN e ASKENASE, 1982) apresentaram eosinofilia e basofilia já na 1^a infestação e foram potenciadas na reinfestação. Eosinofilia foi também constatada em bovinos da raça Hereford infestados sucessivamente durante dois meses com o carrapato *R. (B.) microplus* (O'KELLY, 1971). Szabó et al. (2000) observaram que uma 1^a ou 3^a infestação de cães por carrapatos *R. sanguineus* com 25 ou 100 casais de adultos não induz alterações significativas no quadro sangüíneo. Os mesmos autores porém constataram que cobaias infestadas com seis casais de adultos da mesma espécie de carrapatos apresentaram basofilia significativa já na 1^a infestação. Gil e Walker (1985) observaram um aumento dos níveis de basófilos e eosinófilos no

sangue periférico de coelhos infestados com *H. a. anatolicum* no 7^o dia após uma primoinfecção, com níveis comparativamente altos observados no 28^o dia após a segunda e terceira infestações. Castagnolli (2002) observou que no hemograma de potros infestados artificialmente com carrapatos *A. cajennense* não houve alterações significativas entre os dados obtidos ao longo das três infestações. Porém, apesar de não significativa detectou-se uma tendência para o aumento do número de eosinófilos da 1^a para a 2^a e 3^a infestações. Os resultados apresentados acima são de difícil comparação pela diversidade de carrapatos e hospedeiros utilizados. Além disso, as condições experimentais como o número de carrapatos, o estágio, frequência de infestações e estado de sensibilização dos hospedeiros diferiram muito de experimento para experimento.

As respostas imunes adquiridas são iniciadas nos órgãos linfóides periféricos, isto é, linfonodos, baço e sistemas imunes cutâneo e mucoso (ABBAS, 2000). Análise imunoistoquímica de linfonodos pré-escapulares, drenantes de locais de fixação de carrapatos foi realizada para a pesquisa de células dendríticas, macrófagos e células B, usando respectivamente CD11c, CD11b e CD21 como marcadores de superfície. Nos linfonodos controle observou-se que o número de células marcadas foi reduzido quando comparado com linfonodos de animais infestados. No entanto, não houve diferenças significativas quando comparado o número de células marcadas nos linfonodos de caprinos de 1^a com os de 3^a infestação. Dentre as células apresentadoras de antígenos, as dendríticas se destacam na apresentação de antígenos em infestação por carrapatos. As células de Langerhans são as primeiras expostas aos imunógenos do carrapato na pele, donde migram para os linfonodos drenantes. Na região paracortical dos linfonodos, estas células transformam-se em células dendríticas onde funcionam como células apresentadoras de antígenos para os linfócitos T. Estas células são as únicas apresentadoras de antígenos capazes de estimular células T naivas. Allen (1979) demonstrou por imunofluorescência a presença de células dendríticas retendo antígenos na camada suprabasal da epiderme de cobaias logo após a 2^a infestação com *D. andersoni* e na derme no 3^o dia, e na região medular de linfonodo um dia após a fixação do carrapato. Durante a

2ª infestação, estas células também foram vistas na região cortical do linfonodo. No presente trabalho, estas células foram observadas na região paracortical e medular de linfonodos colhidos 15 dias após o início da infestação, reforçando o conceito de que estas células participam na apresentação de antígenos em infestações por carrapatos.

Células B e macrófagos também foram observados em maior número nos linfonodos infestados em relação aos linfonodos controle, sugerindo uma maior atividade destas células. Os macrófagos também participam no processamento e apresentação de moléculas imunogênicas da saliva dos carrapatos na derme e linfonodos drenantes, no contexto das moléculas do complexo maior de histocompatibilidade de classe II (MHC II). Os linfócitos Th1 e Th2 fornecem sinais imunoreguladores para gerar respostas mediadas por células e por anticorpos. Linfócitos Th1 são células efetoras da hipersensibilidade tardia, incluindo a hipersensibilidade basofílica cutânea induzida por alimentação de carrapatos. Imunógenos, células apresentadoras de antígenos, linfócitos T e citocinas contribuem para a ativação de linfócitos B, que produzem anticorpos circulantes e homocitotrópicos reativos a carrapatos. Estes anticorpos ligam-se a receptores Fc na superfície de basófilos e mastócitos. A secreção contínua de antígenos salivares de carrapatos resulta na formação de complexos antígeno-anticorpo homocitotrópicos, causando liberação do conteúdo dos grânulos dos basófilos e mastócitos que são essenciais na rejeição de carrapatos. A histamina liberada no local de fixação de carrapatos causa prurido, estimulando assim comportamento de autolimpeza, fenômeno que já foi descrito como forma eficiente dos hospedeiros controlar a infestação por carrapatos (WILLADSEN, 1980).

O emprego de técnicas imunoquímicas, como o *immunoblotting* de proteínas, constitui uma ferramenta poderosa na análise de moléculas imunogênicas. Na tentativa de identificar antígenos de *A. cajennense* reativos a anticorpos séricos de caprinos infestados com ninfas de *A. cajennense* e a reatividade cruzada com *A. hebraeum* foi realizado o "Western Blotting". A eletroforese dos homogenatos de ninfas de *A. cajennense*, em minigel de poliacrilamida (SDS/PAGE), evidenciou cerca

de 10 polipeptídeos com pesos moleculares aparentes variando entre 7 e 92 kDa com as bandas de 7, 58 e 92 kDa fortemente marcadas. Estes resultados estão em concordância com os observados por Ferreira et al. (1996) e Mukai (2003) na eletroforese de homogenatos, respectivamente de larvas de *R. sanguineus* e ninfas de *A. cajennense*. Estes autores detectaram 12 polipeptídeos de pesos moleculares de 36 a 200 kDa e 13 bandas de 25 a 200 kDa, respectivamente.

No “Western blotting” com extratos de ninfas de *A. cajennense* foram reconhecidos seis polipeptídeos com pesos moleculares de 41, 45, 49, 63, 90 e 160 kDa pelos anticorpos séricos de caprinos submetidos a uma primeira infestação. Anticorpos séricos de terceira infestação reconheceram nove polipeptídeos, seis dos quais coincidiram com os observados na primeira infestação, evidenciando a presença de mais três polipeptídeos fracamente marcados, com 16, 21 e 22 kDa. Um aspecto curioso foi o reconhecimento de bandas protéicas similares às observadas no soro de primeira infestação, quando se usou soro dos animais antes da infestação. Por outro lado, anticorpos séricos de caprinos infestados com ninfas de *A. hebraeum* reconheceram quatro polipeptídeos de extratos de ninfas de *A. cajennense*, de 46, 49, 90 e 160 kDa de peso molecular na primoinfestação. Na terceira infestação o soro foi reativo a sete polipeptídeos, quatro dos quais evidenciados na primeira infestação e outros três com 16, 40 e 70 kDa.

Nos casos em que se usou soros de animais não infestados era de se esperar um resultado negativo, partindo do princípio de que os animais ainda não tinham tido contato com antígenos do carrapato. No entanto, foram evidenciados alguns polipeptídeos com 46, 49, 70, 90 e 160 kDa. Este achado sugere a possibilidade de que os animais usados no experimento tivessem tido contato prévio com o carrapato *A. cajennense*. Para confirmar esta possibilidade, realizou-se um teste ELISA indireto, para absorver possíveis anticorpos séricos anti-antígenos de *A. cajennense*. Observou-se que mesmo após a absorção, foram evidenciados polipeptídeos reativos a soros de animais não infestados. Uma possibilidade para explicar este resultado seria de que os polipeptídeos evidenciados sejam decorrentes de reatividade cruzada com outros ectoparasitas que não *A. cajennense*, mas que partilham alguns epítomos com as

proteínas do extrato de ninfas, ou a possibilidade de reatividade cruzada com o anticorpo secundário. De acordo com Den Hollander e Allen (1985), anticorpos produzidos contra ácaros e outros artrópodes (LAHARTHE, 1985) podem reagir inespecificamente com antígenos de carrapatos. Estudos prévios, realizados com soros de ovinos não infestados, evidenciaram bandas reativas a extratos de glândulas salivares de carrapatos *A. americanum*, sugerindo reação cruzada com outros antígenos diferentes de antígenos de carrapatos (BARRIGA et al., 1991; OGDEN et al., 2002).

Os polipeptídeos de 16, 21 e 22 kDa observados apenas quando se usou soros de caprinos de terceira infestação, apesar de aparecerem fracamente marcados, parecem ser os únicos realmente relacionados com a indução de resistência a ninfas de *A. cajennense*. Talvez, estes antígenos sejam reconhecidos e processados pelo sistema imune de caprinos resistentes, uma vez que não foram observados quando se usou soros de primeira infestação ou de animais não infestados. Provavelmente, o desenvolvimento de resistência nesta relação parasito-hospedeiro se manifeste a partir da segunda infestação como se observou em relação à alteração dos parâmetros biológicos e ao aumento do número de basófilos infiltrados nos locais de fixação das ninfas de *A. cajennense*. No entanto, estudos mais detalhados são necessários para comprovar esta hipótese. Estes resultados estão em concordância com resultados obtidos por Brown et al. (1984), que ao testarem por “Western blotting” soros de hospedeiros resistentes usando extratos *A. Americanum*, identificaram uma proteína de aproximadamente 20 kDa. Estudo posterior realizado por Brown e Askenase (1986) mostrou que a mesma proteína de 20 kDa foi capaz de imunizar eficientemente cobaias contra *A. Americanum*, sendo considerada esta proteína responsável pela indução de imunidade anti-*A. Americanum* em cobaias.

O fato de os polipeptídeos de 16, 21 e 22 kDa apresentarem bandas fracamente marcadas pode estar relacionado com a fraca resposta obtida na infestação, diferentemente quando a resposta é induzida por imunização. De fato, observa-se reatividade mais intensa com anticorpos séricos de animais vacinados com extratos antigênicos de carrapatos do que com anticorpos séricos de animais sensibilizados por

infestação, provavelmente pela quantidade de antígenos usada e pelo uso de adjuvantes, como observado por Ferreira et al. (1996), Szabó et al. (1995) e Mukai et al. (2002b).

Os resultados obtidos neste estudo mostram também a existência de reatividade cruzada entre *A. cajennense* e *A. hebraeum*, como demonstrado pelo reconhecimento de polipeptídeos de extratos de *A. cajennense* por soros de caprinos infestados com *A. hebraeum*. Em alguns casos tais polipeptídeos eram muito próximos, e em outros com o mesmo peso molecular, como os de 16, 90 e 160 kDa. Merece destaque o polipeptídeo de 16 kDa que foi reconhecido somente na terceira infestação, tanto pelos anticorpos séricos de caprinos infestados com *A. cajennense* como pelo dos infestados com *A. hebraeum*. Estes achados estão em concordância com os observados por Hlatshwayo et al. (2004), que demonstraram por imunistoquímica de secções de espécimes adultos, a existência de antígenos compartilhados entre as duas espécies de carrapatos.

A existência de reatividade cruzada entre diferentes estágios, e até mesmo entre diferentes espécies de carrapatos, é altamente desejável e de grande importância para o desenvolvimento de vacinas anticarrapato que protejam contra os vários instares e que possuam um amplo espectro de ação.

VII CONCLUSÕES

1. Caprinos desenvolvem resistência, pelo menos parcial, a ninfas de *A. cajennense*, como demonstrado pela alteração de alguns parâmetros biológicos em infestações sucessivas;
2. As infestações experimentais nas condições realizadas não parecem alterar o perfil hematológico dos caprinos parasitados;
3. O exame histopatológico do local de fixação de ninfas de *A. cajennense* em caprino pré-sensibilizado revela hiperplasia da epiderme e reação inflamatória cutânea com predomínio de basófilos, indicativo de hipersensibilidade cutânea basofílica;
4. A imunistoquímica de linfonodos drenantes de áreas de lesões produzidas por ninfas de *A. cajennense* evidencia marcação de macrófagos, células dendríticas e células B em maior número em linfonodos de animais pré-sensibilizados em relação aos de animais controle;
5. O “Western blotting” de extratos de ninfas de *A. cajennense* revela polipeptídeos comuns a anticorpos séricos de caprinos infestados com *A. cajennense* ou com *A. hebraeum*, apontando assim para a existência de reatividade cruzada entre antígenos dessas duas espécies de carrapatos.

VI. REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. **Cellular and Molecular Immunology**. 4th ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 2000. p.79-100.

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

ALLEN, J. R. Immunologically mediated control of ixodid ticks: an overview. **Modern Acarology**, v.1, p.83-87, 1991.

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

ALLEN, J. R.; KHALIL, H. M.; WIKEL, S. K. Langerhans cells trap tick salivary gland antigens in tick-resistant guinea-pigs. **Journal of Immunology**, Baltimore, v.122, p.563-565, 1979.

ANDREOTTI, R.; GOMES, A.; MALAVAZI-PIZA, K. C; SASAKI, S. D; SAMPAIO, C. A. M.; TANAKA, A. S. BmTT antigens induce a bovine protective immune response against *Boophilus microplus* tick. **International Immunopharmacology**, v.2, p.557-563, 2002.

ARNOLD, R. M.; DIAS, J. A. T. S. La garrapata y los hemoparasitos del ganado ovino y caprino, distribución estacional en Mozambique. **Revista Mundial de Zootecnia**, v.45, p.70-77, 1978.

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

ASKENASE, P. W. Basophil arrival and function in tissues hypersensitivity reaction. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.64, p.79-89, 1979.

ASSELBERG, M.; JONGEJAN, F.; LANGA, A.; NEVES, L.; AFONSO, S. Antibodies to *Cowdria ruminantium* in Mozambican goats and cattle detected by immunofluorescence using endothelial cell culture antigen. **Tropical and Animal Health Production**, v.25, p.144-150, 1993.

ATANÁSIO A. **Helminths, protozoa, heart water, and the effect of gastrointestinal nematodes on productivity of goats of the family sector in Mozambique**. 2000. 95f. Thesis (PhD)-Medical University of South Africa, Pretoria, 2000.

BAKER, J. A. F.; THOMPSON, G. E.; MILES, J. O. Resistance to toxaphene by the Bont tick, *Amblyomma hebraeum* (Koch). **Journal of the South African Veterinary Association**, v.48, n.1, p.59-65, 1977.

BARRIGA, O. O.; ANDUJAR, F.; ANDRZEJEWSKI, W. J. Manifestation of immunity in sheep repeatedly infested with *Amblyomma americanum* ticks. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v.77, p.703-709, 1991.

BARROS-BATTESTI, D. M.; YOSHINARI, N. H.; BONOLDI, V. L. N.; GOMES, A.C. Parasitism by *Ixodes didelphidis* and *I. loricatus* (Acari:Ixodidae) on small wild mammals from an Atlantic forest in the state of São Paulo, Brazil. **Journal of Medical Entomology**, Lanham, v.37, n.6, p.820-827, 2000.

BEAUDOUIN, E.; KANNY, G.; GUERIN, B.; GUERIN, L.; PLENAT, F.; MONERET-VAUTRIN, 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**, New York, v.916, p.570-575, 2000.

BECHARA, G. H.; HELLER-HAUPT, A.; VARMA, M. G. R.; LANGI, A. O.; TRINDER, P. K. E. Development of immunity to *Rhipicephalus appendiculatus* in hamsters (*Mesocricetus auratus*). **Immunology**, Oxford, v.4. n.4, p.176, 1989.

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.

BECHARA, G. H.; SZABÓ, M. P. J.; FERREIRA, B. R.; GARCIA, M. V. *Rhipicephalus sanguineus* in Brazil: feeding and reproductive aspects under laboratory conditions. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v.4, n.2, p.61-66, 1995.

BEZUIDENHOUT, J. D.; PROZESKY, L.; DU PLESSIS, J. L.; VAN AMSTEL, S. R. Heartwater. In: COETZER, J. A. W.; THOMSON, G. R.; TUSTIN, R. C. **Infectious diseases of livestock with special reference to Southern Africa**. Oxford University Press, 1994. p.351-370.

BINNINGTON, K. C.; KEMP, D. H. Role of tick salivary glands in feeding and disease transmission. **Advances in Parasitology**, v.18, p.315-339, 1980.

BOESE, J. L. Rabbit immunity to the tick *Haemaphysalis leporispalustris* (Acari, Ixodidae). I. The development of resistance. **Journal of Medical Entomology**, Lanham, v.11, p.503-512, 1974.

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. Western blot analysis of *Amblyomma americanum*-derived stage specific and shared antigens using serum of guinea pigs expressing resistance. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.28, p.163-171, 1988.

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

BROWN, S. J.; ASKENASE, P. W. Cutaneous basophil responses and immune resistance of guinea pigs to ticks: passive transfer with peritoneal exudate cells or serum. **Journal of Immunology**, Baltimore, v.27, p.2164-7, 1981.

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**, Northbrook, v.31, n.3, p.593-598, 1982.

BROWN, S. K.; ASKENASE, P. W. Immune rejection of ectoparasites (ticks) by T cell and IgG1 antibody recruitment of basophils and eosinophils. **Federation Proceedings**, v.42, p.1744-1749, 1983.

BROWN, S. K.; ASKENASE, P. W. *Amblyomma americanum*. Physicochemical isolation of a protein derived from the tick salivary gland that is capable of inducing immune resistance in guinea-pigs. **Experimental Parasitology**, v.62, p.40-50, 1986.

BROWN, S. J.; GRAZIANO, F. M.; ASKENASE, P. W. Immune serum transfer of cutaneous basophil-associated resistance to ticks: Mediation by 7S IgG1 antibodies. **Journal of Immunology**, Baltimore, v.129, p.2407-2412, 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**, Amsterdam, v.16, p.147-165. 1984.

CASTAGNOLLI, K. C. **Carrapato *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) em eqüídeos: resistência e aspectos imunopatológicos da reação dos hospedeiros.** 2002. 80f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2002.

CASTAGNOLLI, K. C.; FIGUEIREDO, L. B.; SANTANA, D. A.; DE CASTRO, M. B.; ROMANO, M.A.; SZABÓ, M. P. J. Acquired resistance of horses to *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) ticks. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.117, p.271-283, 2003.

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

CHATIKOBO P.; KUSINA, N. T; HAMUKIKUWANDA, H.; NYONI, O. A survey of herd size, disease and health management systems of cattle in Sanyati Communal Area of Zimbabwe. **Zimbabwe Veterinary Journal**, v.32, n.1, p.14-22. 2001.

COOLEY, R. A.; KOHLS, G. M. The genus *Amblyomma* (Ixodidae) in the United States. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v.30, p.77-111, 1944.

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

DA SILVA VAZ, I.; LOGULLO, C.; SORGINE, M.; VELLOSO, F .F.; ROSA, D. E.; LIMA, M. F.; GONZALES, J. C.; MATSUDA, A. Immunization of bovines with an aspartic proteinase precursor isolated from *Boophilus microplus* eggs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v.66, p.331-341, 1998.

DE LA FUENTE, J.; RODRIGUEZ, M.; GARCIA-GARCIA, J.C. Immunological control of ticks through vaccination with *Boophilus microplus* gut antigens. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v.916, p.617-21, 2000.

DEN HOLLANDER, N.; ALLEN, J. R. *Dermacentor variabilis*: acquired resistance to ticks in BALB/c mice. **Experimental Parasitology**. v.51, p.118-129, 1985.

ESTRADA-PEÑA, A.; JONGEJAN, F. Tick feeding on humans: a review of records on human-biting Ixodoidea with special reference to pathogen transmission. **Experimental and Applied Acarology**, Northwood, v.64, p.685-71, 1999.

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

FERREIRA, B.R.; SILVA, J.S. Successive tick infestation selectively promote a T-helper 2 cytokine profile in mice. **Immunology**, Oxford, v.96, p.434-439, 1999.

FERREIRA, B. R.; MACHADO, R. Z.; BECHARA, G.H. Western blot analysis of tick antigens from a *Rhipicephalus sanguineus* unfed larval extract and identification of antigenic sites in tick sections using immunohistochemistry. A comparative study between resistant and susceptible host species. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.62, p.161-174, 1996.

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

FREITAS, C. M. V; CARVALHO, F. F; LAGE, A. P; LEITE, R. C. Parâmetros biológicos de larvas, ninfas e teleógenas de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari:Ixodidae) provenientes de infestações artificiais e sucessivas em *Oryctolagus cuniculus* (Linnaeus, 1758) (Lagomorpha:Ochotonidae). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 14.; SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE RICKETTSIOSES, 2., 2006, Ribeirão Preto. **Programas e Resumos...** Ribeirão Preto: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2006. p.185.

FUJISAKI, K. Development of acquired resistance and precipitating antibody in rabbits experimentally infested with females of *Haemaphysalis longicornis* (Ixodoidea:Ixodidae). **National Institute of Animal Health Quarterly**, v.18, p.27-38, 1978.

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**, Oxford, v.85, p.120-124, 1995.

GARCIA-GARCIA, J. C; MONTERO, C.; REDONDO, M.; VARGAS. M.; CANALES, M.; BOUE, O.; RODRIGUEZ, M.; JOGLAR, M.; MACHADO, H.; GONZALEZ, I. L.; VALDES, M.; MENDEZ, L; DE LA FUENTE, J. Control of ticks resistant to immunization with Bm86 in cattle vaccinated with the recombinant antigen Bm95 isolated from the cattle tick, *Boophilus microplus*. **Vaccine**, v.28, n.21, p.2275-87, 2000.

GEARY, T.G; THOMPSON, D.P. Development of antiparasite drugs in the 21st century. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.115, p.167-184, 2003.

GILL, H. S. Kinetics of mast cell, basophil and eosinophil populations at *Hyalomma anatolicum anatolicum* feeding sites on cattle and the acquisition of resistance. **Parasitology**, Cambridge, v.93, p.305-315, 1986.

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

GORMAN, N. T.; HALLIWELL, R. E. W. Mechanisms of immunological injury in hypersensitivity reactions. In: HALLIWELL, R. E. W.; GORMAN, N. T. **Veterinary Clinical Immunology**. London, W. B. Saunders, 1989. cap. 11, p. 212-231.

GUEDES, E.; LEITE, R. C.; PRATA, M. C.; PACHECO, R. C.; WALKER, D. H.; LABRUNA, M. B. Detection of *Rickettsia rickettsii* in the tick *Amblyomma cajennense* in a new Brazilian spotted fever-endemic areas in the state of Minas Gerais. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.100, n.8, p.841-845, 2005.

GUIMARÃES, J. H.; TUCCI, E. C.; BARROS BATTESTI, D. M. **Ectoparasitos de importância veterinária**. São Paulo: Plêiade, 2001. p.81-82.

HLATSHWAYO, M.; SZABÓ, M. P. J.; BECHARA, G. H.; MBATI, P. A. Cross reactivity between antigens from *Amblyomma cajennense* and *A. hebraeum* (Acari:Ixodidae). **Journal of the South African Veterinary Association**, v.75, n.1, p.40-42, 2004.

HORAK, I. G.; MACIVOR, K. M.; PETNEY, T. N.; De VOS, V. Some avian and mammalian hosts of *Amblyomma hebraeum* & *Amblyomma marmoreum*. (Acari:Ixodidae). **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, Pretoria, v.54, p.397-403, 1987.

HOSPKINS, J. D.; CUPP E. W. Ticks of veterinary importance. Part I. The ixodidae family: identification, behaviour, and associated diseases. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v.10, n.5, p.564-580, 1988.

HUNTLEY, J. F. Mast cells and basophils: a review of their heterogeneity and function. **Journal of Comparative Pathology**, v.107, p.349-372, 1992.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção da pecuária municipal**. Disponível em: <[http:// www.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br)>. Acesso em: 5. fev. 2007.

JOHNSTON, T. H.; BANCROFT, M. J. A tick resistant condition in cattle. **Proceedings of the Royal Society of Medicine**, Queensland, v.30, p.219-317, 1918.

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.

JONGEJAN, F.; UILENBERG, G. Ticks and control methods. **Revue Scientifique et Technique, Office Internationales des Epizooties**, v.13, n.4, p.1201-1226, 1994.

JONGEJAN, F., UILENBERG, G. The global importance of tick. **Parasitology**, Cambridge, v.129, p.3-14, 2004.

KAGINA, J.; KANYARI P. W. N. The role of parasitic diseases as causes of mortality in small ruminants in high-potential farming area in central Kenya. **Journal of the South African Veterinary Association**, v.72, p.147-149, 2001.

KAUFMAN W. R. Tick-host interaction: A synthesis of current concepts. **Parasitology Today**, Cambridge, v.5, n.2, p.47-55, 1989.

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**, Cambridge, v.80, p.487-496, 1980.

KIERSZENBAUM, F.; ACKERMAN, S. J. e GLEICH, G. J. Destruction of bloodstream forms of *Trypanosoma cruzi* by eosinophil granule major basic protein. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.30, p.775-779, 1981.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. **Nature**, Cambridge, v.227, p.680-685, 1970.

LAHARTHE, N. V. Cross reaction of tick salivary antigens in *Boophilus microplus*-cattle system. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.17, p.259-263, 1995.

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.

LINTHICUM, K. J.; LOGAN, T .M.; BAILEY, C. L.; GORDON, S. W.; PETERS, C. J.; MONATH T. P.; OSORIO, J.; FRANCY, D. B.; MCLEAN, R. G.; LEDUC, J. W. Venezuelan equine encephalomyelitis virus infection and transmission by the tick

Amblyomma cajennense (Arachnida:Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, Lanham, v.28, n.3, p.405-409, 1991.

LLOYD, C. M.; WALKER, A. R. The systemic effect of adult and immature *Amblyomma variegatum* tick on pathogenesis of dermatophilosis. **Revue D'élevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux**, v.46, p.313-316, 1993.

LOPES, C. M.; LEITE, R. C.; LABRUNA, M. B.; de OLIVEIRA, P. R.; BORGES, L. M.; RODRIGUES, Z. B.; de CARVALHO, H. A.; de FREITAS, C. M.; VIEIRA JUNIOR, C. R. Host specificity of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari:Ixodidae) with comments on the drop-off rhythm. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.93, n.3. p.347-351, 1998.

MATSUDA, H.; FUKUI, K.; KISO, Y.;KITAMURA, Y. Inability of genetically mast cell deficient WW^v mice to acquire resistance against larval *Haemaphysalis longicornis* tick . **Journal of Parasitology**, Lawrence, v.71, n.4, p.443-448, 1985.

MBOW, M. L.; RUTTI, B. M.; BROSSARD, M. Infiltration of CD4+, CD8+ T cells, and expression of ICAM 1, Ia antigens, IL-1 α and IFN- α in the skin lesion of BALB/c mice undergoing repeated infestations with nymphal *Ixodes ricinus* L ticks. **Immunology**, Oxford, v.82, p.596-602, 1994.

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

MCKENNA, R. V.; RIDING, G. A.; JARME, J. M.; PEARSON, R. D.; WILLADSEN, P. Vaccination of cattle against the tick *Boophilus microplus* using a mucin-like membrane glycoprotein. **Parasite Immunology**, Oxford, v.20, p.325-336, 1998.

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.

MOÇAMBIQUE. Ministério da Agricultura e Pescas. **Relatório anual da DINAP**. Maputo, 1998. p.22-26.

MOÇAMBIQUE. Ministério da Agricultura e Pescas. **Relatório anual da DINAP**. Maputo, 1999. p.23-27.

MOÇAMBIQUE. Ministério da Agricultura e Pescas. **Relatório anual da DINAP**. Maputo, 2000. p.19-22.

MOLL, H. Epidermal Langerhans cells are critical for immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. **Immunology Today**, v.14, n.8, p.383-386, 1993.

MOORHOUSE, D. E.; TATCHELL, R. J. The feeding process of the cattle tick *Boophilus microplus* (Canestrini): a study in host-parasite relation. **Parasitology**, Cambridge, v.56, p.623-632, 1966.

MORAES, F. R. **Avaliação comparativa e recíproca da relação parasita-hospedeiro em taurinos e zebuínos naturalmente infestados por *Boophilus microplus* (Canestrini): aspectos morfológicos e patológicos**. 1988, 87f. Tese (Livre-Docência) Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1988.

MUKAI, L. S. **Estudo sobre o desenvolvimento de resistência em cães a estágios imaturos de *Amblyomma cajennense* (Acari:Ixodidae)**. 2003. 95f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.

MUKAI, L. S., NETTO, A. C., SZABÓ, M. P. J., BECHARA, G. H. Development of resistance in dogs to nymphs of *Amblyomma cajennense* ticks (Acari:Ixodidae). **Annals of New York Academy of Science**, New York, v.969, p.180-183, 2002a.

MUKAI, L. S., NETTO, A. C., SZABÓ, M. P. J., BECHARA, G. H. Hypersensitivity induced in dogs by nymphal extract of *Amblyomma cajennense* ticks (Acari:Ixodidae). **Annals of New York Academy of Science**, New York, v.969, p.184-186, 2002b.

MULENGA, A.; MACALUSO, K. R.; SIMSER, J. A.; AZAD, A. F. Dynamics of *Rickettsia*-tick interactions: identification and characterization of differentially expressed mRNAs in uninfected and infected *Dermacentor variabilis*. **Insect Molecular Biology**, v.12, n.2, p.185, 2003.

MULENGA, A.; SUGIMOTO, C.; ONUMA, M. Issues in tick vaccine development: identification and characterization of potential candidates vaccine antigens. **Microbes and infection**, v.2, p.1353-1361, 2000.

NEWSON, R. M.; CHIERA, J. W. Development of resistance in calves to nymphs of *Rhipicephalus appendiculatus* (Acarina:Ixodidae) during test feeds. **Experimental and Applied Acarology**, Northwood, v.6, p.19-27, 1989.

NITHIUTHAI, S; ALLEN, J. R. Significant changes in epidermal Langerhans cells of guinea-pigs infested with ticks (*Dermacentor andersoni*). **Immunology**, Oxford, v.51, p.133-141, 1984a.

NITHIUTHAI, S; ALLEN, J. R. Effect of ultraviolet irradiation on the acquisition and expression of tick resistance in guinea-pigs. **Immunology**, Oxford, v.51, p.153-159, 1984b.

NORVAL, R. I. Repeated feeding of *Amblyomma hebraeum* (Acari:Ixodidae) immatures on laboratory hosts. Host effect on tick yield, engorged weight and engorgement period. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v.64, p.910-017, 1987.

NORVAL, R. A. I.; FLOYD, R. B.; KERR, J. D. Ability of adults of *Amblyomma hebraeum* (Acarina:Ixodidae) to feed repeatedly on sheep and cattle. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.29, p.351- 355, 1988.

OGDEN, N. H.; CASEY, A. N. J.; LAWRIE, H.; FRENCH, N. P.; WOLDEHIWET, Z.; CARTER, S. D. IgG responses to salivary gland extract of *Ixodes ricinus* ticks vary inversely with resistance in naturally exposed sheep. **Medical and Veterinary Entomology**, v.16, p.186-192, 2002.

O`KELLY, C. O. J.; SEEBECK, R. M.; SPRINGELL, P. H. Alteration in host metabolism by the specific and anorectic effect of the cattle tick (*Boophilus microplus*). II. (Changes in blood composition). **Australian Journal of Biological Science**, East Melbourne, v.24, p.373-380, 1971.

OLIVEIRA, P. R.; BORGES, L. M. F.; LEITE, R. C.; FREITAS, C. M. V. Seasonal dynamics of the Cayenne tick, *Amblyomma cajennense* on horses in Brasil. **Medical and Veterinary Entomology**, v.17, p.412-416, 2003.

OLIVIERI, J. A.; SERRA FREIRE, N. M. Estádio ninfal do ciclo biológico de *Amblyomma cajennense*. **Arquivos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, Rio de Janeiro, v.7, n.2, p.149-156, 1984.

PAINE, S. H.; KEMP, D. H.; ALLEN, J. R. In vitro feeding of *Dermacentor andersoni* (Stiles): Effect of histamine and other mediators. **Parasitology**, Cambridge, v.86, p.419-428, 1983.

PATARROYO, J. H., PORTELA, R. W., DE CASTRO, R. O., PIMENTEL, J. C., GUZMAN, F.; PATARROYO, M. E., VARGAS, M. I., PRATES, A. A., MENDES, M. A. Immunization of cattle with synthetic peptides derived from the *Boophilus microplus* gut protein (Bm86). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v.25, n.88 (3-4): p.163-167, 2002.

PEREIRA, M. C.; LABRUNA, M. B. Febre maculosa. **Clinica Veterinária**, v.12, p.19-23, 1998.

PORTER, J. F.; MITCHELL, R. G. L. Distribution of histamine in human blood. **Physiological Reviews**., v.52, p.361, 1972

PRATA, M. C. A.; ALONZO, L. S.; SANAVRIA, A. Parâmetros biológicos do estágio ninfal de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari:Ixodidae) em coelhos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v.4, n.2, p.60, 1995. suplemento 1. Resumo.

RIBEIRO, S. D. A. **Caprinocultura**: Criação racional de caprinos. São Paulo: Nobel, 1997. p.19-22.

RIBEIRO, S. D. A.; RIBEIRO, A. C. Situação atual e perspectivas da caprinocultura de corte para o Brasil. In: ALMEIDA, I. A. M. A., RESENDE, K. T. **SIMPÓSIO PAULISTA DE CAPRINOCULTURA**, Jaboticabal. *Anais*. Jaboticabal: Gráfica Multipress, 2005. p.9-27.

RICHERSON, H. B.; DVORAK, H. F.; LESKOWITZ, S. Cutaneous basophil hypersensitivity. I. A new look at the Jones-Mote reaction, general characteristics. **Journal of Experimental Medicine**, v.132, p.546-557, 1970.

RIEK, R. F. Studies on the reaction of animals to infestation with tick. VI. Resistance of cattle to infestation with the tick *Boophilus microplus*. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.13, p.532-50, 1962.

RIDING, G. A.; JARMEY, J.; MCKENNA, R. V.; PEARSON, R.; COBON, G. S.; WILLADSEN, P. A protective "concealed" antigen from *Boophilus microplus*. Purification, localization, and possible function. **Journal of Immunology**, Baltimore, v.153, n.11, p.5158-5166, 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, 1995.

SANAVRIA, A.; PRATA, M. C. A. Metodologia para colonização do *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari:Ixodidae) em laboratório. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v.5, n.2, p.87-90, 1996.

SANTA ROSA, J. **Enfermidades em caprinos, diagnostico, patogenia, terapêutica e controle**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1996. p.133-146.

SÃO PAULO, Centro de vigilância epidemiológica. Prof. Alexandre Vranjac. **Febre Maculosa Brasileira**, São Paulo, 2002. p.1-7 (informe técnico).

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.; KEMP, D. H. A putative role for eosinophils in tick rejection. **Experientia**, v.37, p.49-50, 1981.

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**, East Melbourne, v.29, p.499-512, 1976.

SCHWARTZ, L. B.; AUSTEN, K. F. Structure and function of the chemical mediators of mast cells. **Progress in Allergy**, v.34, p.271-321, 1984.

SEIFERT G. W. Selection of beef cattle in Northern Australia for resistance to cattle tick *Boophilus microplus*: research and application. **Preventive Veterinary Medicine**, v.2, p.553-559, 1984.

SERRA-FREIRE, N. M. Tick paralysis in Brasil. **Tropical Animal Health and Production**, v.15, p.124-126, 1983.

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.

STINGL, G.; KATZ, S. I.; CLEMENT, L.; GREEN, I.; SHEVACH, E. M. Immunologic function of Ia-bearing epidermal Langerhans cells. **Journal of Immunology**, Baltimore, v.121, n.5, p.2005-2013, 1978.

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**, Amsterdam, v.115, p.49-59, 2003.

SZABÓ, M. P. J.; ARANTES, G. J.; BECHARA, G. H. Immunological characterization of adult tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) antigens by western blot analysis using sera from infested or vaccinated dogs and guinea pigs. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v.4, n.2, p.79-83, 1995a.

SZABÓ, M. P. J.; BECHARA, G. H. Immunization of dogs and guinea pigs against *Rhipicephalus sanguineus* ticks using gut extracts. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, 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**, Northwood, v.23, p.915-928, 1999.

SZABÓ, M. P. J.; BECHARA, G. H. Insight into the histopathology caused by the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Acarina:Ixodidae) in the skin of previously infested, vaccinated or tick-bite naïve 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.; BERTIPAGLIA, E. C. A.; BECHARA, G. H. Cross reactivity between instars of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) tick. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v.916, p.605-609, 2000.

SZABÓ, M. P. J.; MUKAI, L. S.; ROSA, P. C. S.; BECHARA, G. H. Differences in the acquired resistance of dogs, guinea-pigs and hamsters to repeated infestations with ticks *Rhipicephalus sanguineus* (Acari:Ixodidae). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.32, p.43-50, 1995.

TITUS, R. G.; RIBEIRO, M. C. Salivary gland lysates from the land fly *Lutzomyia longipalpis* enhance leishmania infectivity. **Science**, v.239, p.1306-1308, 1988.

TRAGER, W. Acquired immunity to ticks. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v.25, p.57-81, 1939.

UILENBERG, G.; BARRE N.; CAMUS, E.; BURRIDGE M. J.; GARRIS, G. I. Heartwater in Caribbean. **Preventive Veterinary Medicine**, v.2, p.255-267, 1984.

VENGE, P. The human eosinophil in inflammation. **Agents and Actions**, v.29, n.1, p.122-125, 1990.

WALKER, A. R.; BOUATTOUR, A.; CAMICAS, J. -L.; ESTRADA-PENÃ, A.; HORAK, I. G.; LATIF, A. A.; PEGRAM, R. G.; PRESTON, P.M. **Ticks of domestic animals in Africa: a guide to identification of species**. Bioscience reports, Edinburgh, 2003, p.51-54.

WHARTON, R.H. Tick-borne livestock diseases and their vectors. 5. Acaricide resistance and alternative methods of tick control. **World Animal Review**, Rome, v.70, p.8-15, 1976.

WHELEN, A. C.; WIKEL, S. K. Acquired resistance of guinea pigs to *Dermacentor andersoni* mediated by humoral factors. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v.79, p.980-91, 1993.

WIKEL, S. K. Acquired resistance to ticks: expression of resistance by C4-deficient guinea pigs. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Northbrook, v.28, n.3, p.586-90, 1979.

WIKEL, S. K. The induction of host resistance to tick infestation with a salivary gland antigen. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Northbrook, v.30, p.284-288, 1981.

WIKEL, S. K. Histamine content of tick attachment sites of H1 and H2 histamine antagonists on the expression of resistance. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v.76, p.179-185, 1982.

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

WIKEL, S. K. Tick modulation of host immunity: an important factor in pathogen transmission. **International Journal for Parasitology**, v.29, p.851-59, 1999.

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.; ALLEN, J. R. Acquired resistance to ticks. II. Effect of cyclophosphamide on resistance. **Immunology**, Oxford, v.30, p.479-484, 1976.

WIKEL, S. K.; RAMACHANDRA, R. N.; BERGMAN, D. K. Tick-induced modulation of the host immune response. **International Journal for Parasitology**, v.24, n.1, p.59-66, 1994.

WILLADSEN, P. Immunity to tick. **Advances in Parasitology**, v.18, p.293-313, 1980.

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

WILLADSEN, P.; BIRD, P.; COBON, G. S.; HENGERFORD, J. Commercialization of a recombinant vaccine against *Boophilus microplus*. **Parasitology**, Cambridge, v.110, p.43-50, 1995. Supplement.

WILLADSEN, P; SMITH, D.; COBON, G.; MCKENNA, R. V. Comparative vaccination of cattle against *Boophilus microplus* with recombinant antigen Bm86 alone or in combination with recombinant Bm91. **Parasite Immunology**, Oxford, v.18, n.5, p.241-246, 1996.