

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO  
PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA

**Imunobiologia das Infestações de Bovinos pelo Carrapato *Boophilus microplus*:  
Estudo de Correlatos Histológicos e Moleculares de Resistência e de Susceptibilidade**

Antonio Roberto Rodrigues Abatepaulo

Ribeirão Preto-SP

2007

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

ANTONIO ROBERTO RODRIGUES ABATEPAULO

**Imunobiologia das Infestações de Bovinos pelo Carrapato *Boophilus microplus*:  
Estudo dos Correlatos Histológicos e Moleculares de Resistência e de Susceptibilidade.**

**Tese Apresentada ao curso de Pós- graduação  
em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de  
Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São  
Paulo, para obtenção do grau de Mestre em  
Ciências – Área de concentração: Imunologia  
Básica e Aplicada.**

**Orientação: Dra. Isabel Kinney Ferreira de  
Miranda Santos**

Ribeirão Preto-SP

2007

## FICHA CATALOGRÁFICA

Abatepaulo, Antonio Roberto Rodrigues

**Imunobiologia das Infestações de Bovinos pelo carrapato *Boophilus microplus*: Estudo dos Correlatos Histológicos e Moleculares de Resistência e de Susceptibilidade.** Ribeirão Preto, 2007.132p.: Il; 30cm.

Tese de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Orientadora: de Miranda Santos, Isabel K. Ferreira.

**Trabalho Realizado no Departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, com Auxílio Financeiro da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo e do Conselho Nacional de Pesquisa.**

## **DEDICATÓRIA**

*A minha família e verdadeiros amigos que sempre me mostraram que a verdade vale a pena.*

*Muito obrigado!*

## AGRADECIMENTOS

Nenhuma grande conquista se faz sozinha. Desde os primeiros estudos até hoje se percorreu um grande e tortuoso caminho que só pode ser vencido com a força de pessoas especiais em minha vida.

Claro que em primeiro lugar estão meus pais. Obrigado por toda educação e exemplo de garra. Minha mãe Vera, amo muito você, obrigado por todo sempre pelo seu exemplo. Infelizmente a vida me tirou uma parte especial muito cedo, nossa e quanta falta você faz meu PAI, com letras maiúsculas mesmo, perdi, sem dúvida nenhuma, o mais sonoro dos meus aplausos. É tão estranho, os bons morrem jovens...

Aos meus avós, Leonardo (*in memorian*), Rosalina, Francisco (*in memorian*) e Victória por estarem sempre ao meu lado e mostrar o quanto é importante conservar a essência familiar, o quanto isso contribui para formação de um bom cidadão. Que seus exemplos sejam para sempre seguidos.

Aos meus tios e tias (desculpe não citar nome por nome, mas é que vocês somam mais 30 pessoas) por nunca, em momento algum me negar ajuda. Espero que nossa família permaneça sempre unida, que os natais e anos novos sejam ricos de alegria e esperança em dias melhores por mais que a vida nos deixe sentir o sabor amargo da ausência de pessoas queridas. Um grande beijo no coração de cada um.

Aos meus amigos de colégio e de faculdade. Vocês são muito especiais, amizade verdadeira.

A todos meus amigos da Pós-graduação, em especial ao pessoal do Laboratório do Professor João Santana da Silva, Gustavo Garcia, Sandra, Wanessa, Elen, Carlo, Aninha, Wander, Vanessa, Paulo, Djalma, Luciana, Luciano, Gustavo G., Marcelão, Claudinha, Cristina, Cristiane, Fredy, Thiago, Karen e Fernanda, muito obrigado por toda confiança e amizade.

A secretária da Pós e grande amiga Ana Cristine, muito obrigado por todo respeito e confiança que você sempre depositou em mim.

Ao Prof. Dr. João Santana da Silva, coordenador do Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, o meu agradecimento pelo fornecimento do espaço do laboratório e amizade aqui construída.

Agradeço a todo secretariado da Pós-Graduação da FMRP-USP pela atenção sempre fornecida aos alunos, assim como ao CNPq e FAPESP pelo apoio financeiro.

A minha Orientadora Dra. Isabel K. F. de Miranda Santos, a mulher mais sábia que conheci em toda minha vida. Muito obrigado pela sua paciência e seus ensinamentos, agradeço até mesmo pelos “puxões de orelhas” que com certeza me auxiliaram nessa caminhada.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	<b>i</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>iii</b>
<b>1- INTRODUÇÃO</b> .....	<b>2</b>
1.1 – O Carrapato <i>Boophilus microplus</i> : .....	2
1.1.1 Origem Filogenética, Organização Taxonômica e Ciclo de Vida do <i>Boophilus microplus</i> . .....	2
1.1.2 Constituintes das Glândulas Salivares do Carrapato e sua Importância no Processo de Infestação. ....	4
1.1.3 Participação dos Carrapatos na Transmissão de Doenças, Prejuízos Econômicos e Métodos de Controle:.....	9
1.2 – O Hospedeiro.....	10
1.2.1 – Resposta Imune do Hospedeiro ao Carrapato .....	10
1.2.2- Comportamento de Diferentes Raças Bovinas Durante o Desenvolvimento da Infestação pelo <i>Boophilus microplus</i> .....	11
1.3. Organização Histológica e Celular da Pele, Elaboração da Resposta Imune Local e Justificativa da Escolha de Genes Candidatos a Contribuir para Desenvolvimento do Processo de Resistência ao Carrapato.....	13
<b>2-OBJETIVOS</b> .....	<b>19</b>
2.2. Objetivos Gerais .....	19
2.3. Objetivos Específicos.....	19
<b>3- MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>21</b>
3.1 - Caracterização Histológica e Molecular das Reações de Hipersensibilidade Imediata e Tardia Após Tratamento com Extrato de Larva de <i>B. microplus</i> não Alimentadas em Pele de Bovinos Resistentes e Susceptíveis a Infestação. ....	21
3.2. Quantificação relativa da expressão dos Genes Codificantes da Resposta Imune em Pele de Bovinos Resistentes e Susceptíveis Infestados com Fêmeas Ingurgitadas de <i>B. microplus</i> e Manejados em Pasto Apresentando Diferentes Níveis de Infestação. ....	31
3.3- Análise Genotípica de Bovinos Resistentes e Susceptíveis a Infestação ao <i>B. microplus</i> . Caracterização de Genes Imunes como Marcadores Moleculares de Resistência pela Presença de SNP's ( <i>Single Nucleotide Polimorfisms</i> ). .....	36



<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>43</b>
4.1- Quantificação da Expressão Gênica Relativa em Pele de Bovinos Resistentes e Susceptíveis a Infestação pelo <i>B. microplus</i> após Tratamento com Extrato de Larva de <i>B. microplus</i> não Alimentadas. ....	44
4.1.1 Cinética da Expressão de Quimiocinas em Pele de Bovinos Resistentes e Susceptíveis a Infestação pelo <i>B. microplus</i> Após Tratamento com Antígenos de Extrato de larva de <i>B. microplus</i> não alimentadas.....	45
4.1.2 Cinética da Expressão de Citocinas Pró- e Anti-Inflamatórias em Pele de Bovinos Resistentes e Susceptíveis à Infestação pelo <i>B. microplus</i> Após Tratamento com Antígenos de Extrato de larva de <i>B. microplus</i> Não-Alimentadas.....	55
4.1.3 Cinética da Expressão das Enzimas IDO e iNOS na Pele de Bovinos Resistentes e Susceptíveis à Infestação pelo <i>B. microplus</i> . Após Tratamento com Antígenos de Extrato de larva de <i>B. microplus</i> não- Alimentadas.....	66
4.1.4 Cinética da Expressão de IFN $\alpha$ e Endotelina-1 na Pele de Bovinos Resistentes e Susceptíveis a Infestação pelo <i>B. microplus</i> Após Tratamento com Antígenos de Extrato de larva de <i>B. microplus</i> não- Alimentadas.....	70
4.2. Quantificação Relativa da Expressão de Genes em Pele de Bovinos Susceptíveis e Resistentes Infestados Naturalmente com Fêmeas Ingurgitadas de <i>B. microplus</i> . ....	73
4.2.1. Quantificação relativa da expressão de Genes Codificantes de Quimiocinas em Pele de Bovinos Resistentes e Susceptíveis ao <i>B. microplus</i> infestada com carrapatos adultos .....	73
4.2.2 Quantificação relativa da expressão de Genes Codificantes de Citocinas Pró- e Anti-Inflamatórias na Pele de Bovinos Resistentes e Susceptíveis Expostos a Diferentes Níveis de Infestação Natural por Fêmeas Ingurgitadas de <i>B. microplus</i> . ....	82
4.2.3 Quantificação da Expressão Gênica Relativa de iNOS, IDO e IFN $\gamma$ na Pele de Bovinos Resistentes e Susceptíveis a Infestação pelo <i>B. microplus</i> Submetidos a Diferentes Níveis de Infestação Natural pelo Carrapato.....	92
4.3 Quantificação da Matriz Colagenosa em Pele de Bovinos Resistentes e Susceptíveis Naturalmente Expostos a Infestação pelo <i>B. microplus</i> Mediante Utilização da Coloração de Picrosírus Red.....	97
4.4 - Análise Genotípica dos Animais e Caracterização de Marcadores Moleculares de Resistência Através da Determinação de SNP's ( <i>Single Nucleotide Polimorfisms</i> ). ....	99
4.4.1 – Determinação da Posição e Frequência dos SNP's Mapeados em Genes Imunológicos Anti-inflamatórios e Pró-Inflamatórios em Nelores e Holandeses Preto-Branco. ....	99

4.4.2 – Determinação da Posição e Frequência dos SNP's Mapeados em Genes Imunológicos com Função Quimiotática em Nelores e Holandeses Preto-Branco..... 103

**5 - DISCUSSÃO.....110**

**6- CONCLUSÕES .....121**

**7- REFERÊNCIA .....124**

## ABREVIACÕES

**cDNA** – DNA complementar

**Ct** – Ciclo de Captação de Fluorescência

**DNA** – cido Desoxirribonucleico

**DNase** – desoxirribonuclease

**DTH** – Reação de Hipersensibilidade Tardia

**ET-1** – Endotelina – 1

**FAM** – 6 carboxifluorecna

**HPB** – Holandês Preto e Branco

**IDO** – Indoleamina 2,3 dioxigenase

**IFN** – Interferon alpha

**IFN** – Interferon gamma

**IGF-1** – Fator de Crescimento Semelhante  Insulina-1

**IH** – Reação de Hipersensibilidade Imediata

**iNOS** – Oxido Nitrico Sintase induzida

**IP-10** – Proteína Induzida por Interferon-10 (CXCL10)

**MCP-1** – Proteína Quimiotática de Monócito -1(CCL2)

**MIP-1** – Proteína de Macrófago Inflamatória – 1(CCL3)

**MOPS** – 3-(N-morfolino) cido Propanosulfnico com Sal de Sódio

**PBS** – Solução Salina Tamponada

**PCR** – Reação em Cadeia da Polimerase

**RNA** – cido Ribonucleico

**RNA<sub>m</sub>** – RNA mensageiro

**ROX** – 6- carboxi-x-rodamina

**RT** – Transcrição Reversa

**SLURP-1**- Homólogo Solúvel do Receptor do Ativador de Plasminogênio Tipo Uroquinase (uPA)

**SNP** – Polimorfismo de Único Nucleotídeo

**TAE** – Tris-Acetato-EDTA

**TGF $\beta$**  – Fator Transformador de Crescimento beta

**TNF $\alpha$**  – Fator de Necrose Tumoral alpha

**uPA** – Ativador de Plasminogênio Tipo Uroquinase

**IL-8** – CXCL8

**PAF** – Fator Ativador de Plaquetas

**PGE2** – Prostaglandina E2

**IGBP** – Proteína Ligante de IgG

**FAM** – 6 carboxifluoreína

**HPB** – Holandês Preto e Branco

## RESUMO

Carrapatos são artrópodes hematófagos de grande importância médica e veterinária devido aos prejuízos diretos e indiretos por eles causados ao se fixarem em seus hospedeiros, além de serem importantes vetores de microrganismos patogênicos. Durante seu repasto de sangue, os carrapatos estimulam a resposta imune e inflamatória dos hospedeiros, mas suprimem a imunidade natural e adquirida do hospedeiro por meio de fatores presentes na sua saliva que é inoculada durante a hematofagia. Este estudo analisou os componentes teciduais e moleculares presentes nas reações cutâneas induzidas por extrato de larvas de *B. microplus* não alimentadas ou por diferentes níveis de infestações com carrapatos adultos afixados à pele de bovinos geneticamente resistentes (*Bos taurus indicus*, raça nelore) e susceptíveis (*B. taurus taurus*, raça Holandês Preto e Branco - HPB) ao carrapato. Amostras de pele foram coletadas para análise 1, 72 e 96 horas após o inoculo com extrato de larva. No momento da reação tardia (72 e 96 horas) o infiltrado celular recrutado à pele de animais da raça Nelore apresentava um número significativamente maior de eosinófilos e basófilos do que a pele de animais HPB. Relativo à pele coletada 1 h após o inóculo de extrato ou à pele de bovinos HPB, a expressão de genes codificantes de IGF-1, MCP-1, IP-10, TGF- $\beta$ ,IDO, SLURP-1 foi significativamente maior em animais Nelores. Na pele contendo fêmeas em alimentação, constatou-se que o nível da infestação interfere no nível de expressão gênica em animais HPB que apresentaram diminuição significativa da expressão de MIP-1 $\alpha$ , IGF-1 e IL-8 e aumento relativo de IL-4 e TGF $\beta$  na baixa infestação. A pele de Nelores infestada apresentou de expressão relativa de IDO, IL-10, IP-10, IGF-1, IFN $\gamma$  MCP-1, MIP1 $\alpha$ , IL-8 e iNOS e IL-5 significativamente ( $P < 0,05$ ) maior do que a pele de HPBs infestada. A pesquisa de mutações únicas (SNPs, de single nucleotide polymorphisms) nos genes estudados que apresentaram variação significativa na sua expressão revelou vários SNPs, inclusive alguns específicos para

animais zebuínos (MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ). Os resultados obtidos neste estudo permitem uma melhor compreensão da interação parasita-hospedeiro. Mostram que na pele de uma raça bovina resistente ao carrapato os níveis de expressão de genes codificantes de moléculas quimiotáticas para basófilos e eosinófilos é maior do que em pele de uma raça bovina suscetível a esse parasita, fornecendo as bases dos mecanismos imunológicos que devem ser estimulados por vacinas empregadas para o controle do artrópode. Também mostram que ocorre variabilidade genética nos genes expressos diferencialmente, variações estas que podem constituir marcadores moleculares de resistência para a seleção de bovinos resistentes a carrapatos.

## ABSTRACT

Ticks are hematophagous arthropods of medical and veterinary importance due to the deleterious effects caused by their blood feeding on hosts, and because they are vectors of pathogenic microorganisms. During the feeding process ticks stimulate the host's immune and inflammatory responses. However, they are capable of suppressing innate and acquired immunity through soluble factors present in the saliva inoculated during the blood meal. This study analyzed the cellular and molecular components in the cutaneous reactions of bovine skin injected with an extract of unfed larvae (UFLE) of *B. microplus* or infested with different numbers of adult feeding ticks. Two different breeds with contrasting heritable phenotypes were examined: Nelore (*Bos taurus indicus*), which is highly resistant to ticks, and Holstein (*B. t. taurus*), which is very susceptible. Biopsies of skin were collected 1, 72 and 96 hours after treatment with UFLE. The cellular infiltrate recruited to the skin of Nelores at the time of the delayed reaction (72 and 96 h) contained significantly more basophils and eosinophils than similarly treated skin from Holsteins. When compared to skin collected 1 hour after treatment with UFLE, the expression of genes coding for IGF-1, MCP-1, IP-10, TGF- $\beta$ , IDO, SLURP-1 increased significantly in Nelore bovines. In skin infested with feeding adults the level of infestation modulated the level of expression of immune response genes in Holsteins, which presented a significant decrease in the expression of MIP-1 $\alpha$ , IGF-1 e IL-8. Infested skin from Nelores presented significantly ( $P < 0.05$ ) higher levels of expression of genes coding for IDO, IL-10, IP-10, IGF-1, IFN $\gamma$  MCP-1, MIP1 $\alpha$ , IL-8 e iNOS e IL-5 than infested skin from Holsteins. Holsteins presented with a higher relative expression of IL-4 and TGF $\beta$  during low infestations than Nelores. A search for mutations in the genes that presented significant changes in the level of their expression revealed several single nucleotide polymorphisms (SNPs), including some that specific to the Nelore breed (MCP-1, MIP-1 $\alpha$ ,

TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ). The results obtained in this study show that skin from a resistant breed of bovines is able to express higher levels of messages for cytokines that recruit basophils and eosinophils than that from susceptible breeds. This points out to the mechanisms of immune resistance that should be incorporated into the formulation of anti-tick vaccines. They also show that genetic variability occurs in the genes that are differentially expressed in skin and this variability may contribute towards a collection of molecular markers for breeding tick-resistant cattle.



## **INTRODUÇÃO**

## 1- INTRODUÇÃO

### 1.1 – O Carrapato *Boophilus microplus*:

#### 1.1.1 Origem Filogenética, Organização Taxonômica e Ciclo de Vida do *Boophilus microplus*.

Os carrapatos surgiram como parasitas obrigatórios de répteis em locais de clima quente e úmido. Quando houve a ramificação dos répteis em diversas formas de vidas, ocupando meios aquáticos e terrestres, os carrapatos evoluíram em duas principais famílias, Argasidae e Ixodidae (Hoogstraal e Wassef, 1985).

A espécie estudada nesta dissertação, o *Boophilus microplus*, conhecida como carrapato dos bovinos, é um artrópode hematófago e provavelmente originou-se na Ásia. A distribuição geográfica do parasita ocorre em locais quentes e úmidos, condições que favorecem seu ciclo de vida (Hoogstraal e Wassef, 1985). Com o advento das expedições exploradoras e comerciais, o carrapato disseminou-se para outras regiões tropicais e subtropicais do globo terrestre, concentrando sua ocupação na África, Ásia, Oceania e nas Américas do Sul e Central, causando grandes prejuízos à pecuária local (Nuñez et. al, 1982). Embora não se saiba ao certo sobre sua introdução no Brasil (Labruna, comunicação pessoal), acredita-se que ocorreu pela região sul com animais advindos do Chile durante o século XVIII (Gonzáles,1995). Atualmente, o carrapato *Boophilus microplus* encontra-se amplamente distribuído no território nacional, variando suas concentrações de acordo com as condições climáticas e tipos raciais de bovinos presentes em cada região (Gonzáles,1995).

O carrapato *Boophilus microplus*, de acordo com sua classificação taxonômica, pertence ao Reino *Metazoa*, Filo *Arthropoda*, Sub-Filo *Chelicerata*, Classe *Arachnida*, Sub-classe *Acari*, Super Ordem *Parasitiformes*, Ordem *Ixodida*, Sub-ordem *Metastigmata*, Família

*Ixodidae*, Grupo *Metastricata*, Sub-família *Rhipicephalinae*, Gênero *Boophilus* e Espécie *microplus* (Flechtmann, 1990). Das cinco espécies do gênero *Boophilus*, a mais difundida e única encontrada no Brasil, é a *microplus* (Pereira, 1982).

O *Boophilus microplus* é um hematófago monoxeno, ou seja, a fase de vida parasitária ocorre em somente um hospedeiro. Ocasionalmente observa-se essa espécie parasitando cães, gatos, veados, porcos, onças, ovinos e caprinos (Arhtur, 1965). O ciclo de vida do carrapato ocorre em duas fases:

*a- Fase de Vida Livre:*

Inicia-se após a queda da teleógina (fêmea ingurgitada do hospedeiro) seguido da postura de ovos, eclosão e liberação das larvas, e termina quando larvas infestantes fixam-se no hospedeiro. Durante a fase de vida livre, a capacidade da larva do carrapato sobreviver à longos períodos sem se alimentar está relacionada com a preservação do balanço hídrico (Sigal et al, 1999). Nessa fase o carrapato sofre fortes influências de umidade e temperatura, as quais podem alterar sua duração e capacidade infestante (Gonzáles, 1975). Quando a larva adquire capacidade infestante sobe nas pastagens por geotropismo negativo, localizando o hospedeiro pelo odor, vibrações, sombreamento, estímulo visual e gradiente de concentração de CO<sub>2</sub> (Sonenshine, 1991).

*b- Fase de Vida Parasitária:*

Inicia-se com a fixação das larvas no hospedeiro, com a ingestão principalmente de plasma nos primeiros dias da infestação, terminando com ingestão de sangue no decorrer das fases evolutivas (Bennett, 1974). Durante o período de vida em que se encontra fixado na pele do hospedeiro e de acordo com sua capacidade alimentar, o carrapato sofre várias mudanças morfológicas durante a hematofagia transformando-se sucessivamente em ninfas e adultos, até

adquirir de cópula. A fêmea ingurgita rapidamente e desprende-se do hospedeiro para realizar a ovipostura. O ciclo evolutivo do *B. microplus* dura em média 18 dias (Gonzales 1975).

Na pele do hospedeiro, o carrapato é mais resistente às alterações climáticas quando comparado à fase de vida livre, mas procura áreas na superfície corpórea do hospedeiro com temperaturas entre 31 e 37 °C (Double e Kemp, 1979), regiões que beneficiem seu desenvolvimento, são elas, principalmente, o úbere, virilha e região do períneo. Esses locais são preferenciais não somente pela melhor temperatura, mas também, por representarem áreas de grande vascularização e difícil alcance da lambertura do hospedeiro durante suas tentativas de autolimpeza (Wagland, 1978). O período de vida parasitária pode durar de 18 a 300 dias (Gonzales, 1974).

### **1.1.2 Constituintes das Glândulas Salivares do Carrapato e sua Importância no Processo de Infestação.**

Diferentemente dos mosquitos, que canulam os vasos do hospedeiro para obter sangue, a estratégia do carrapato consiste em fixar-se à pele por meio de cone um de cimento protéico, e em seguida destruir, mecanicamente, por meio de seus palpos, quimicamente por meio de proteases presentes em sua saliva, a matriz extracelular da derme (Sauer et al., 2000). Suga, então, o sangue acumulado na lesão. Durante sua refeição de sangue o carrapato enfrenta a hemostasia do hospedeiro que ocorre em resposta à agressão e que tem o potencial de interromper a hematofagia por meio da formação de coágulo e trombo plaquetário, da vasoconstricção e da resposta inflamatória e imune (Champagne et al., 1996 e Mans, et al., 2004). O complexo farmacológico da saliva do carrapato facilita, contudo, o acesso ao sangue e o escape às defesas do hospedeiro.

O repertório salivar varia de acordo com a espécie de carrapato, sendo complementar ao repertório homeostático do hospedeiro natural (Ribeiro, 1995), daí a especificidade da relação

parasita/hospedeiro (Brossard e Fivaz 1982). De uma maneira geral, a saliva é constituída de elementos anti-hemostáticos, antiinflamatórios e imunomoduladores que podem interferir na homeostasia do hospedeiro e contribuir para fixação, alimentação e desenvolvimento do ácaro (Valenzuela, 2002). Deve-se destacar que o carrapato possui um sistema redundante para atacar as defesas do hospedeiro (Ribeiro, 1995).

A glândula salivar é, portanto, o órgão responsável pela secreção de fluídos e de componentes farmacológicos pelos carrapatos (Tatchel, 1967). Esse órgão é constituídos por 3 tipos morfofuncionais distintos de ácinos na fêmea e quatro tipos no macho. O tipo I, agranular, está envolvido na osmorregulação e os tipos II e III, compostos por células granulosas, na produção de moléculas bioativas e no desenvolvimento de patógenos que utilizam o carrapato como hospedeiro intermediário (Coons e Kaufman, 1988). O ácino tipo IV, presente somente no macho, auxilia no processo de cópula (Feldman-Muhsam et. al, 1970). Durante a alimentação da fêmea, vários genes das glândulas salivares são ativados e culminam com a produção de diversos tipos de proteínas e outros mediadores com ação biológica direta sobre diversos mecanismos homeostáticos do hospedeiro (Oaks, 1991). A presença de estruturas nervosas e catecolaminas na região das glândulas salivares de *B. microplus* pressupõe o envolvimento de neurotransmissores na ativação glandular (Binnington e Stone, 1977). O tamanho dos ácinos glandulares das fêmeas, principalmente os tipos II e III, aumenta cerca de 25 vezes durante o período de alimentação do carrapato, sem alterar, no entanto, a quantidade de células que as constituem (Barker, 1984). Os ácinos do macho também expressam novos genes e aumentam de tamanho durante a alimentação, porém em menor intensidade quando comparados aos das fêmeas (Oaks, 1991). No término da alimentação, as glândulas salivares de carrapatos sofrem degeneração e morte celular por apoptose, evitando assim, a instalação de processos necróticos (Harris e Kaufman, 1981). Estudos citoquímicos de glândulas salivares de fêmeas de *R. sanguineus* revelou alterações

nucleares e nucleolares em células dos ácinos tipos II e III e padrões tintoriais diferentes de RNA citoplasmático típico de morte celular por apoptose (Furquim et. al, no prelo). No carrapato *Ixodes ricinus*, os ácinos tipo I não exibem morfologia de morte celular programada, porém os ácinos tipo II e III degeneram-se completamente por apoptose. Esses achados enfatizam a importância da osmorregulação pelos ácinos tipo I, mesmo após a queda da teleógena de seu hospedeiro (Bowman e Sauer, 2004).

*Substâncias Anti-hemostáticas presentes na saliva dos Carrapatos:*

A lesão tecidual causada pelo hipostômio do carrapato, pelos componentes proteolíticos e alergênicos entre outros mediadores presentes na sua saliva, induz a ativação de moléculas bioativas envolvidas na hemostasia do hospedeiro. Estes mecanismos prejudicam a alimentação do artrópode porque bloqueiam o extravasamento sanguíneo no local da fixação. Para escapar desse tipo de resposta e manter seu processo de hematofagia, o carrapato secreta em sua saliva importantes moléculas bioativas capazes de interferir nos processos hemostáticos do hospedeiro (Valenzuela, 2002). Entre essas moléculas destaca-se a apirase que metaboliza o ADP (Valenzuela, 2002) e o inibidor do Fator de Ativação Plaquetária-PAF (Ribeiro et. al, 1985) que impede a agregação plaquetária. Alguns espécies liberam a ixolaris na saliva, um Inibidor da Via do Fator Tecidual (TFPI), com capacidade de ligar-se no domínio HBE do Fator Xa (mesmo local de ligação da heparina) interferindo na sua ligação com o Fator Tecidual (VIIa) para formação de trombina (Monteiro, 2005).

Os ixodídeos contêm altos níveis de prostaglandinas (PG) na saliva. A  $PGE_2$  é um antagonista potente de vasoconstritores fisiológicos como o  $TXA_2$  (Tromboxano A2) e 5-hidroxitriptamina-serotonina (Ribeiro, 1995). A  $PGE_2$ , através do receptor EP1 presente na glândula salivar do carrapato, promove a liberação de anticoagulantes salivares, e permite uma maior oferta de sangue para o repasto (Qian et al., 1998).

*Substâncias Imunomoduladoras:*

O processo de aquisição de sangue pelo carrapato causa danos diretos à pele do hospedeiro e indiretos pela transmissão de agentes infecciosos (Sonenshine 1991). Tanto a ação espoliadora direta, quanto a transmissão de patógenos, só são possíveis devido à ação imunomoduladora exercida por componentes salivares excretados pelo carrapato. Essas moléculas interferem na resposta imune inata e adaptativa elaborada pelo hospedeiro na tentativa de conter o processo de alimentação e desenvolvimento do artrópode. Avanços nos estudos sobre a imunobiologia dos carrapatos tem resultado na identificação de proteínas capazes de interagir com diversos mecanismos da resposta imune do hospedeiro e que constituem um sistema de escape complexo e redundante (Ribeiro, 1995). A forma pela qual o carrapato contra-ataca a resposta imune de seu hospedeiro nos permite apontar quais os principais componentes da resposta imune que interferem no seu processo de alimentação (Wikel, 1996).

Dentre as moléculas imunomoduladoras já descritas na saliva de algumas espécies de carrapatos, citamos o Ligante de IgG (IGBP) que foi caracterizada em extrato de glândula salivar de quatro espécies distintas de carrapatos, *Amblyomma variegatum*, *Ixoides scapulares* (Packila e Guilfoile, 2002), *Rhipicephalus appendiculatus* e *Ixoides hexagonus* (Wang e Nuttall, 1995). Postula-se que a IGBP neutraliza os anticorpos ingeridos pelo carrapato durante o processo de hematofagia, impedindo a ligação destes com tecidos do artrópode.

Há diferenças no nível de produção e no tipo de imunoglobulina produzida em hospedeiros resistentes e susceptíveis à infestação. Acredita-se que esta diferença ocorra devido à inibição de células B pela saliva do artrópode (Kashino et al, 2005).

O *I. scapularis* excreta uma proteína ligante de IL-2 que inibe o processo proliferativo de células do sistema imune (Gillespie et al., 2001). A inflamação gerada pelo carrapato na

pele do hospedeiro induz a migração de polimorfonucleares para o local da lesão. Experimentos *in vitro* demonstraram a inibição da atividade biológica da IL-8, um importante fator quimiotático para neutrófilos, quando em presença de extrato de glândula salivar (Hajnicka et al, 2001). Em trabalho recente foi identificado um ligante das quimiocinas CCL3 (MIP1a) e CCL2 (MCP-1) em biblioteca de cDNA de glândula salivar de *R. sanguineus* denominado evasina-1 (Frauensuh, et al, 2007). Isto comprova a importância das moléculas quimiotáticas na resposta contra o carrapato.

A histamina, um vasodilatador potente liberado por mastócitos residentes de tecido conjuntivo e de mucosas, contribui para instalação do processo inflamatório local. A histamina diminui a salivação e alimentação do artrópode, como descrito por Paine et. al (1983) nos experimentos com *Dermacentor andersoni*. A presença de um ligante de histamina no extrato de glândula salivar de *R. appendiculatus* evidencia a importância desse mediador em impedir o desenvolvimento do carrapato (Paesen et al, 1999). Inibidores de anafilotoxinas são liberados na saliva de *I. scapularis* (Ribeiro, 1987), o que pode amenizar a participação do sistema complemento na resposta imunológica (Fearon, 1998). Por sua vez, a PGE2 estimula um padrão Th2 de resposta imune e diminui a produção de citocinas de padrão Th1 envolvidas na geração do processo de resistência (Harris et. al, 2002).

Os fagócitos, quando presentes no local de fixação do carrapato, são estimulados pela presença do antígeno e induzidos a produzirem radicais tóxicos, assim como citocinas, na tentativa de eliminar o agente agressor. A saliva de *R. sanguineus* possui componentes capazes de inibir a produção de IFN $\gamma$  e NO em camundongos, reduzindo a resposta das células locais aos antígenos do artrópode (Ferreira e Silva, 1999). Outro inibidor da inflamação descrito na saliva de algumas espécies de carrapatos é o inibidor de bradicinina (Bk), substância derivada da clivagem do cininogênio após ativação inicial da cascata de coagulação. A inibição de Bk



reduz o edema, a dor e a inflamação local, efeitos que causam menor irritabilidade no hospedeiro, diminuindo o prurido local e conseqüentemente a remoção física do agente (Ribeiro, 1989).

### **1.1.3 Participação dos Carrapatos na Transmissão de Doenças, Prejuízos Econômicos e Métodos de Controle:**

O hábito hematofágico dos carrapatos os condiciona em vetores de vários agentes infecciosos como protozoários, vírus e bactérias, não somente para o animal, mas também para o homem (Cupp, 1991), perdendo somente para os mosquitos no que se refere à capacidade de vetor de agentes infecciosos (Hoskins e Cupp 1988). A transmissão de patógenos pode ocorrer de forma direta entre os carrapatos e via transovariana, garantindo a infectividade do artrópode por várias gerações (Aeschmann, 1991). No Brasil os dois patógenos principais transmitidos aos bovinos pelo *Boophilus microplus* são a rickettsia *Anaplasma sp.* e o protozoário *Babesia spp.*, responsáveis pelo quadro clínico conhecido como "Tristeza parasitária bovina", causadores de importantes prejuízos ao sistema de produção (Farias, 1995).

O carrapato é uma das três principais causas de prejuízos à produção animal (CGIAR, 2002). O rebanho bovino comercial do Brasil é o maior do mundo e contribui expressivamente para nossa economia. Esta sofre, porém, com os prejuízos causados pelo carrapato, estimados em US\$ 2 bilhões/ano (Grisi et. al, 2002); ao nível global essas perdas ultrapassam US\$ 13 bilhões/ano (Anon, 2002).

Agentes químicos para controle de carrapatos têm levado à contaminação do meio ambiente, à presença de resíduos em carne e leite e ao aparecimento de parasitas resistentes (Kunz e Kemp, 1994). Alternativas sustentáveis para o controle do carrapato, tais como vacinas (Willadsen et. al, 1999) e marcadores genéticos para resistência (Pruett et al 1999 e Willadsen et al 1999), constituem demanda urgente. Existem duas vacinas anti-carrapato no

mercado (Willadsen et.al, 1995 e Rodriguez et. al, 1995). São compostas de um ou dois antígenos ocultos<sup>31</sup>, aqueles não expostos ao hospedeiro durante infestação natural. Embora tenham impacto sobre a infestação, sua eficácia é variável (Massard et. al, 1998) e exige uso combinado de acaricidas com reforços da vacina, dificultando o manejo. Um parasita complexo como o carrapato não será controlado por vacina que não contemple os mecanismos efetores que medeiam, de fato, a resistência. A resposta eficaz anti-carrapato precisa ser elucidada de modo a orientar o desenvolvimento dessa ferramenta de controle.

## **1.2 – O Hospedeiro**

### **1.2.1 – Resposta Imune do Hospedeiro ao Carrapato**

Trager (1939) foi o primeiro a demonstrar que os vertebrados poderiam elaborar uma resposta imune protetora aos ectoparasitas e que esta imunidade poderia ser transmitida pelo soro de animais infestados. Camundongos, que são hospedeiros suscetíveis a todas as espécies de carrapatos, polarizam a produção de citocinas e de anticorpos para o padrão Th2 (Ferreira e Silva, 1999). Por outro lado, cobaias, que são hospedeiros resistentes a carrapatos, apresentam reação cutânea tardia com participação de basófilos, e que, quanto maior o número de células no local da picada menor o desenvolvimento do artrópode (Brown & Askenase, 1984). O mesmo ocorre quando bovinos são submetidos à infestação por *Amblyomma americanum* (Brown & Askenase, 1984). Experimentos mais recentes caracterizam a participação de eosinófilos e basófilos na resposta de cobaias frente à exposição ao *R. sanguineus* (Szabó e Bechara, 1999). A maioria dos estudos sobre aquisição de resistência em bovinos avalia o fenômeno em raças taurinas que, embora desenvolvam imunidade, não controlam as infestações com a mesma eficiência das raças zebuínas (Utech, 1978). Embora haja alguns relatos que sugerem que eosinófilos e/ou basófilos estão associados com resistência, nenhum

dos trabalhos demonstra, de forma comparativa e abrangente, os infiltrados celulares e o padrão de citocinas produzido na pele infestada dessas raças.

### **1.2.2- Comportamento de Diferentes Raças Bovinas Durante o Desenvolvimento da Infestação pelo *Boophilus microplus*.**

O hospedeiro preferencial do *B. microplus* é o bovino. Entre as raças de bovinos, as pertencentes à subespécie *Bos taurus indicus* ou zebuínas são mais resistentes ao carrapato do que as raças da subespécie *B. t. taurus*. (Utech et al, 1978). Em cruzamentos feitos entre raças zebuínas e taurinas observa-se que quanto maior a proporção de sangue zebu, maior é a resistência pelo carrapato (Honer e Gomes, 1990). Embora seja notória a diferença entre os números de carrapatos fixos sobre bovinos de raças zebuínas e taurinas, na primeira infestação, ambas as raças possuem menor capacidade de controlar a infestação, permitindo concluir que o poder de resistência ao *B. microplus* é, em parte, um fenômeno mediado pela resposta imune adaptativa. Fatores como sexo, idade, cor do pêlo, e estação do ano podem interferir na resistência do bovino às infestações, porém a raça é o fator mais importante e determinante na caracterização do fenótipo de resistência, sendo este herdável (Mattioli, 1998; Meltzer, 1996). Em geral, de acordo com a literatura, os *Bos indicus* são mais resistentes aos carrapatos do que os animais *Bos taurus*. Segundo Lemos (1986), o *Bos indicus* tem convivido há milhares de anos em contato com o carrapato, o que permitiu a eliminação natural dos animais mais sensíveis e a permanência dos mais resistentes.

Há outras explicações para a manifestação da resistência ou susceptibilidade das diferentes raças que não a resposta imune adaptativa, dentre elas, a maior quantidade de glândulas sebáceas presentes nos zebus produzindo odores com capacidade de afastar os carrapatos da sua superfície, maior capacidade de mobilidade, maior irritabilidade do animal e

maior elasticidade de sua pele (Gonzales, 1975), que facilita o mecanismos de limpeza por meio de lambadura.

Os bovinos, hospedeiros naturais do carrapato *B. microplus*, sendo constituídos de raças susceptíveis e resistentes à infestação, dispõe um modelo no qual é possível examinar, numa mesma espécie, os desfechos da relação parasito-hospedeiro.

Quando o processo de alimentação do carrapato é iniciado, há uma ativação da resposta imune do hospedeiro no local da picada. Durante o processo inflamatório ocorre a desgranulação de mastócitos e a infiltração de eosinófilos, os quais seriam capazes de dificultar a alimentação do carrapato e causar irritação cutânea no hospedeiro (Pereira, 1982).

A resposta imune elaborada pelo hospedeiro tem a participação de células apresentadoras de antígeno, linfócitos T e B, anticorpos, sistema complemento, basófilos, mastócitos, eosinófilos e neutrófilos, além de inúmeras moléculas bioativas capazes de contribuir para o processo inflamatório (Wikel, 1996). Em animais resistentes o número de granulócitos aumenta significativamente no local da fixação. O grande afluxo de basófilos, seguido da liberação de histamina e outros mediadores da resposta imune, induz à rejeição ao parasito (McLaren et. al., 1983). Isso caracteriza o basófilo como importante célula envolvida no processo de resistência ao artrópode, como demonstrado por Szabó e Bechara (1999) em cobais frente a infestações sucessivas por *R. sanguineus*.

A administração de drogas anti-histamínicas em bovinos acarreta aumento significativo na produção de fêmeas ingurgitadas por animal (Tatchell e Bennett, 1969 e Willadsen et al., 1979) mostrando a importância das células produtoras de histamina nos mecanismos efetores contra os carrapatos.

A transferência de plasma de bovinos altamente resistentes para o gado não exposto ao carrapato confere alguma resistência ao receptor. (Roberts & Kerr, 1976).

O contato entre o hospedeiro e o carrapato por vários dias, possibilita o desenvolvimento da resposta imune do hospedeiro contra o artrópode. Porém, as medidas adotadas pelo ectoparasita frente à resposta imune controlam a expressão da imunidade adquirida do hospedeiro permitindo sua permanência nele (Wikel, 1996).

A resistência ao carrapato está relacionada com o aumento do número de basófilos circulantes em animais resistentes (cobaias) (Szabó et. al, 2003) e no infiltrado local (Szabó e Bechara, 1999). Quando um extrato de larvas não alimentadas é inoculado em hospedeiros infestados e imunes observa-se em hospedeiros resistentes, mas não em hospedeiros suscetíveis, uma reação de hipersensibilidade tardia (DTH) sendo que ambos os hospedeiros apresentam uma reação imediata (IH) (Szabó et. al, 1995). O basófilo participa na fase tardia das reações de hipersensibilidade tipo I e nas reações de hipersensibilidade cutânea basofílica ou reação de Jones-Mote (Falcone, 2001). A reação de Jones-Mote é definida como sendo uma reação induzida pela inoculação de proteínas solúveis heterólogas sem componentes de micobactérias que é composta de uma fase de reação imediata seguida de uma reação tardia que se intensifica à medida que aumenta o intervalo entre a inoculação e a reação (Askenase e Atwood, 1976).

### **1.3. Organização Histológica e Celular da Pele, Elaboração da Resposta Imune Local e Justificativa da Escolha de Genes Candidatos a Contribuir para Desenvolvimento do Processo de Resistência ao Carrapato.**

No ambiente em que vivem os vertebrados há intensa exposição a microrganismos e a agentes físicos e químicos extremamente nocivos. Para sobreviverem nesse ambiente hostil os vertebrados necessitam de um sistema imune desenvolvido e com rápida capacidade de

elaboração de uma resposta organizada nos principais locais de ataque dos patógenos (Kupper, 2004). A pele é o órgão mais exposto aos agressores ambientais e, por isso, representa a primeira barreira defensiva e reguladora contra a invasão. A importância da integridade dos mecanismos imunes da pele é ressaltada pelo aumento da frequência de malignidades e infecções quando indivíduos manifestam desordens imunológicas ou terapias de caráter imunossupressor (Uthayakumar, 1997). A elaboração da resposta imune deve ser finamente regulada no ambiente epidermal uma vez que, desordens nesse quesito, implicam em intensa resposta inflamatória e desenvolvimento de doenças auto-imunes e alérgicas (Wong, 1985).

A pele consiste em duas partes principais: uma camada mais externa constituída de tecido epitelial denominada epiderme e, abaixo desta, uma camada de tecido conjuntivo rico em colágeno (o couro propriamente dito), nervos e vasos sanguíneos denominada derme, seguido de uma camada de tecido adiposo, a hipoderme.

A epiderme é um tecido estratificado composto na sua grande parte (95%) por queratinócitos. Além destes, a epiderme é constituída por melanócitos, responsáveis pela produção dos pigmentos da pele, e pelas células de Langerhans capazes de fagocitar agentes invasores e contribuir para o processo de ativação imunológica.

A hipoderme é formada por um tecido adiposo subcutâneo bastante difuso. O tecido adiposo representa uma importante reserva energética que é mobilizada quando há consumo intenso de glicose por células musculares.

Funcionalmente, a pele é um órgão bastante complexo, sendo a principal responsável, pela proteção física contra agressões externas físicas, químicas e biológicas. É responsável ainda pela regulação hídrica, manutenção da temperatura e sensibilidade tátil.

Como é um órgão do sistema imune, a pele alberga diversos tipos de leucócitos. Há linfócitos, que regulam a resposta imune e desenvolvem respostas específicas; células apresentadoras de antígeno (histiócitos ou células de Langerhans) que recolhem moléculas estranhas (possíveis invasores) e levam aos linfonodos para apresentação aos linfócitos CD4+; mastócitos e eosinófilos, que estão envolvidos nas reações alérgicas e luta contra parasitas. As células residentes da pele, por meio das moléculas mediadoras do sistema imune inato, comportam-se como sentinelas do sistema imune local frente a sinais de perigo (Kupper, 2004). Os queratinócitos e células de Langerhans (células da epiderme), mastócitos, células dendríticas e macrófagos (células da derme) são capazes de liberar quimiocinas, citocinas e agentes anti-microbianos quando ocorre o rompimento da integridade tecidual (Kupper e Groves, 1995). O aumento da expressão de mediadores imunológicos culmina com o recrutamento de células linfóides presentes na circulação para a periferia permitindo a eliminação do agente agressor e o consequente reparo tecidual (Steinhoff, 2001).

Além das células imunológicas capazes de responder às agressões, a pele possui sua microbiota residente. A ocupação da superfície da epiderme por essa microbiota evita a instalação e invasão de agentes agressores por competição de espaço e nutrientes. Os produtos de glândulas sebáceas e sudoríparas também contribuem para manutenção da microbiota normal e, consequentemente, da homeostasia epidermal.

Os mecanismos relacionados com a imunidade de pele são de suma importância para proteção adequada contra agentes estranhos, porém distúrbios na sua elaboração podem originar patologias que, do ponto de vista imunológico, são classificadas em padrões Th1 ou Th2 de acordo com o perfil de citocinas e células envolvidas no seu desenvolvimento.

Conhecendo os mecanismos imunológicos presentes na pele e sabendo que esta é o principal órgão alvo da infestação por carrapatos, é de suma importância estudar a resposta

imune local durante infestações. O conhecimento sobre a resposta local anti- *B. microplus* em bovinos é limitado, mas é seguro afirmar que é complexa. No local da lesão causada pelo carrapato há um infiltrado de neutrófilos, eosinófilos e basófilos (Gill & Walker, 1985), porém as vias pelas quais estão sendo recrutadas e ativadas e como essas vias estão afetando a produção de citocinas permanece obscuro. Para escolher os componentes da resposta do hospedeiro a serem estudados, nos embasamos em componentes das glândulas salivares do carrapato que interferem no desenvolvimento da resposta imune do seu hospedeiro. Além disso, também nos embasamos em conhecimentos gerados sobre a imunidade de pele nas doenças atópicas e outras doenças inflamatórias dermatológicas, pois envolvem componentes imunológicos que podem prejudicar a hematofagia do carrapato. Portanto, baseados nesses critérios, elegemos quantificar o nível de expressão gênica de IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-18, IL-6, iNOS, IL-10, IL-4, IL-5, IFN $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1, IP-10, IL-8, MCP-1, MIP1 $\alpha$ , IGF-1, SLURP-1, Endotelina-1,IDO em pele de bovinos previamente infestados e re-estimulados com antígenos presentes em extratos do carrapato e em pele de bovinos contendo carrapatos adultos afixados.

Para escolher genes candidatos este estudo também considera a ocorrência de polimorfismos genéticos, em bovinos ou em outras espécies, que estão associados com conseqüências funcionais para componentes potencialmente importantes na relação carrapato-hospedeiro. Hospedeiros bovinos expressam fenótipos raça-específica herdáveis quando expostos a extratos de larva de *B. microplus*. *Bos indicus* são significativamente mais resistentes que *Bos taurus*, e animais originários do cruzamento das duas raças exibem níveis de infestação variáveis. Sendo assim, pode-se determinar variações nucleotídicas em genes codificantes de moléculas com função imunológica que resulte em maior capacidade de recrutar células inflamatórias e contribuir com fenótipo de resistência ao carrapato, porque sabemos que em bovinos resistentes o infiltrado inflamatório é quali e quantitativamente maior no local da lesão do que em bovinos suscetíveis.



---

Em resumo, como não se conhece os mecanismos homeostáticos do hospedeiro envolvidos na redução do poder de alimentação das fêmeas e na conseqüente reprodução dos carrapatos, a descrição de alguns dos componentes moleculares no local da lesão causada pelo artrópode contribuirá para elucidar os mecanismos imunológicos locais para uma proteção adequada.

**OBJETIVOS**

## **2-OBJETIVOS**

### **2.2. Objetivos Gerais.**

a) Estudar os mecanismos de resistência e susceptibilidade ao carrapato, descrevendo alguns componentes moleculares da resposta inflamatória local ao carrapato *B. microplus* em bovinos resistentes e suscetíveis.

### **2.3. Objetivos Específicos.**

a) Comparar em pele normal e infestada com fêmeas ingurgitadas de bovinos resistentes e suscetíveis à carrapatos, por meio de RT-PCR em tempo real, o nível de expressão de mensagens para moléculas candidatas a mediar os diferentes fenótipos de infestação.

b) Inocular intradermicamente extrato de larvas em pele de bovinos resistentes e suscetíveis a carrapatos e previamente infestados e quantificar a expressão de mensagens para moléculas candidatas a mediar a resposta imune nos diferentes fenótipos de infestação.

c) Pesquisar a presença de polimorfismos de nucleotídeos pontuais (SNPs) em genes relacionados à elaboração da resposta imune, contribuindo para geração de marcadores moleculares de resistência.

d) Verificar a integridade da matriz colagenosa durante o processo de infestação natural pelo *B. microplus*, e sua possível atuação como uma barreira física frente ao processo de infestação.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### 3- MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 - Caracterização Histológica e Molecular das Reações de Hipersensibilidade Imediata e Tardia Após Tratamento com Extrato de Larva de *B. microplus* não Alimentadas em Pele de Bovinos Resistentes e Susceptíveis a Infestação.

O experimento de quantificação da expressão gênica na pele de bovinos resistentes e susceptíveis à infestação pelo carrapato tratada com extrato de larva de *B. microplus* não alimentada foi desenvolvido para complementar o estudo de quantificação celular global e diferencial realizada no mesmo experimento por Morelli Jr. (2005) (Apêndice A).

**3.1.1 Dos Animais:** Os bovinos foram introduzidos no experimento com 2 anos de idade expostos durante um ano a infestação natural pelo *B. microplus*. Os animais eram não aparentados, machos, da raça Holandês Preto e Branco (*Bos taurus taurus*, Susceptíveis) e Nelores (*Bos taurus indicus*, Resistentes).

**3.1.2 Obtenção do Extrato de Larva:** Larvas de *B. microplus* não alimentadas com dois meses após a eclosão dos ovos foram mortas por imersão em N<sub>2</sub> líquido. Após mortas, foram transferidas para um recipiente contendo salina tamponada (PBS; pH7,4), homogeneizadas em gral e pistilo e em seguida desintegradas em aparelho de ultrason sonificadas em três tempos de 10 segundos com intervalo de 60 segundos. O extrato foi centrifugado a 12.000g x 4°C por 1 hora, e o sobrenadante filtrado em papel Millex GV(Millipore) com porosidade de 0,22µm. A concentração de proteína foi obtida pelo método de Coomassie. Para obtenção do inóculo, o extrato de larva bruto foi diluído em PBS de forma a resultar uma concentração de 0.5µg de proteínas/µl.

**3.1.3 Obtenção das Biópsias de Pele:** Os animais foram inoculados i.d. com 100µL da solução de extrato de larva (tratamento) em uma orelha e 100µL de PBS (controle) contralateral em regiões previamente demarcadas e biópsias dos locais da inoculação em três distintos períodos: 1h, 72hr e 96hr mais tarde. Parte dos fragmentos foi encaminhada para quantificação celular global e diferenciada por meio das colorações de Hematoxilina/Eosina e Giemsa, respectivamente. O restante do material foi embebido em 600µl de RNAlater e congelado a -70°C para futura extração de RNA total.

**3.1.4. Extração de RNA Total:** As amostras embebidas no RNAlater foram individualmente descongeladas e imediatamente transferidas para um recipiente apropriado (Bioespec products, INC) contendo N<sub>2</sub> líquido para recongelamento. Após evaporação do N<sub>2</sub> líquido, a amostra foi pulverizada utilizando o mesmo aparato e em seguida transferida para um cryovial de 4mL, contendo 1,0mL de Trizol® (Invitrogen). Uma vez embebido em trizol, o material era triturado com o auxílio de um homogenizador de tecido Ultra-Turrax T8 (Ika® - Werke, GmbH & Co., GE) com haste previamente autoclavada e livre de RNase. Todas as precauções necessárias para evitar a contaminação com RNase foram tomadas, como por exemplo o tratamento de todo material metálico e a bancada de extração com RNase away (Invitrogen, Molecular Bioproducts, Carlsbad, EUA).

O RNA total do tecido foi extraído com utilização do kit de extração de RNA (Promega SV Total RNA Isolation Kit), seguindo o protocolo do fabricante, com algumas alterações. Brevemente, adicionou-se 200µl de clorofórmio (Sigma) para cada 1 ml da suspensão celular obtida pelo tritramento do tecido e deixou-se a mistura descansando à temperatura ambiente (T.A.) por 15 minutos. Posteriormente a mistura foi centrifugada a 12000g, por 10 minutos (T.A.). A solução transparente do lisado ( $\pm$  500 µl) foi então transferida para um tubo novo, adicionou-se a este 300 µl de etanol 95% e após homogeneização cuidadosa a solução foi

transferida para a coluna de afinidade de RNA. A solução foi posteriormente centrifugada a 12000 g, por 1 minuto (T.A.) e a ela adicionada os tampões específicos do kit, intercalados por centrifugações de 1 minuto a 12000 g. Na sequência as amostras foram eluídas da coluna em 50 µL de água livre de nucleases.

Uma alíquota de 3 µl da suspensão final foi utilizada para mensurar a concentração de RNA/µl das amostras, utilizando-se o aparelho Thermo Spectronic (Biomate). Finalmente separou-se 1 µg da amostra extraída para aplicar em um gel de RNA. O remanescente da amostra foi armazenado a -70°C, até a realização dos ensaios de quantificação da expressão gênica.

### **3.1.5 Integridade do RNA total extraído**

Para verificar a integridade do RNA extraído e possível contaminação do material com DNA genômico, 1 µg da amostra de RNA foi aplicada em gel de agarose 1,5% . Esse gel foi confeccionado seguindo protocolo preconizado por Sambrook *et al.* (1989). Para tal, 2,2 mg de agarose foi adicionado a 100ml de água milli-Q autoclavada duas vezes. A solução resultante foi aquecida até que a agarose se dissolvesse por completo na água e então 24ml de formaldeído 37% e 30 ml de MOPS 5x (21g de MOPS em 1000 ml de água milli-Q autoclavada 2X) foram adicionados. A solução foi então colocada no suporte da cuba de corrida previamente tratada com NaOH 0,5 M por 30 minutos e o pente colocado sobre esta solução. Após solidificação da agarose, retirou-se o pente.

Antes de se aplicar as amostras no gel, volume equivalente a 1 µg da amostra foi colocado em um eppendorf de volume 500 µl, juntamente com 2 µl de MOPS 5x, 3,5 µl de formaldeído e 1,0 µl de brometo de etídio (0,5 µl/ml). A solução foi completada com formamida suficiente para atingir o volume final de 20 µl. Para reação, a solução foi aquecida a 65°C por 15 minutos e resfriada imediatamente em gelo. Finalmente adicionou-se 2 µl de

Azul de Bromofenol (100 mg/ml) e a solução resultante aplicada no gel de agarose submerso em tampão de corrida MOPS. Para corrida no gel a cuba foi ligada a uma fonte de 80V, 115mA, 9W por 30 minutos. O gel foi visualizado em luz UV e fotografado.

### **3.1.6 Obtenção dos Primes e Sondas:**

#### ***3.1.6.1 – Destinados a Reação de PCR em Tempo Real com Sistema TaqMan.***

Para obtenção dos primers correspondentes dos genes IGF-1, IP-10, MCP-1, MIP1 $\alpha$ , IFN $\alpha$ , IDO e IL-5 utilizou-se seqüências gênicas bovinas depositadas na base de dados do National Center for Biotechnology Information GenBank NCBI (GenBank NCBI - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) ou na base de dados do Institute for Genomic Research (Tigr - <http://www.tigr.org>) quando fez-se utilização de ESTs para desenho dos primers. Priorizamos o desenho dos primers para perfeito alinhamento na região da junção de dois éxons dos respectivos genes alvos com intuito de aumentar a especificidade da reação e evitar ampliações de possível contaminação genômica. Quando a base de dados da seqüência genômica bovina não fornecia o local da junção entre dois éxons, o EST bovino era alinhado com a seqüência do respectivo gene alvo humano, depositado na base de dados do NCBI, para determinação da localização da junção e consequente desenho dos primers. A seqüência gênica adquirida foi utilizada para desenho dos primers pelo método Assay by Design (Applied Biosystems) em condições universais de PCR. Os primers e sondas foram submetidas ao BLAST confirmatório no Banco de Dados do Genoma Bovino depositado no NCBI (Tabela 1).



### ***3.1.6.2 – Destinados a Reação de PCR em Tempo Real.***

Para obtenção dos primers correspondentes ao IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-17, IL-10, TGF- $\beta$ 1, IL-16, iNOS, SLURP-1 e Endotelina-1 (ET-1), seguiu-se os mesmos critérios e banco de dados relacionados no item 3.1.6.1, porém os primers foram obtidos com utilização do software Primer Express 2.0 (Applied Biosystem) no próprio laboratório e após obtenção das seqüência, os oligos foram direcionados para síntese (Tabela 1).

**Tabela 1 – Características dos Primers Utilizados para Quantificação da Expressão Gênica pela Técnica de PCR em Tempo Real em Pele de Bovinos Submetidos ao Tratamento com Extrato de larva de *B. microplus* não alimentadas.**

Gene	Nº Acesso	Senso (5'-3')	Anti-senso (5'-3')	Sonda (5'-3')	Fluoróforo
IL-5	TC300586	TTCATCGAACTCTGCTGATAGGT	GCACAGTTGGTGATTGTATGCT	ATGGGAACTTGATGATTCC	FAM
IFN $\alpha$	NM174085	GGCGCTGGGTGGCA	CCTCGTGGAGCACAGAGATG	AGTTGCAGAAGGCTCA	FAM
IL-10	NM174088	CCAAGCCTTGTCGGAAATGATC	TCTCAGCCTGTGGCATCAC	TCTTCCAGGTAAAAGCTG	FAM
MCP-1	L32659	AGTCACCAGCAGCAAGTGT	GTCTTGACCCATTTCTGCTT	AAAGAGGCTGTGATTTTCAA	FAM
IP-10	TC300586	CTGAATCCAGAATCTAAGACCATCAAGAA	CCGTGTTTCGAGGAGATCTTTTGTAGT	CCTTTGCTTGTTAATTGC	FAM
IGF-1	AF404761	CAGTTCGTGTGCGGAGACA	CGACTGCTCGAGCCATAACC	CCGTGGGCTTGTTGAAA	FAM
MIP1 $\alpha$	AY 07784	CCTCTGCAGCCAGGTCTTC	GGGCGACATAGGAGAAGCA	CAGCGCCAAATGGT	FAM
IDO	NW001022450	CTTATGATGCCTGGATCTCTATTGCT	GCTAACTTCTCAACTCCACACGTA	CCTGAACTGATCAAGAACA	FAM
$\beta$ actina	Z54144	GGCCGGGACCTGACG	CCGTGGTGGTGAAGCTGTAG	ACTACCTCATGAAGATCC	FAM
IFN $\gamma$	NM173979	AGCACCAAAAAGCATGATCCG	GGCGACAGGTCATTCATCACT	-	SYBR
TNF $\alpha$	AF011926	AGCTGATTCAAATTCGGGTGG	TCTTCCAGCTTCACACCGTTG	-	SYBR
IL-6	NM173923	TTCTGCTTTCCTACCCCG	GCGCTTAATGAGAGCTTCGG	-	SYBR
IL-17	AF412040	TCAATGCTGAAGGCAAGGTG	GAAGGAGTGAGGGCAGTGCT	-	SYBR
IL-10	NM17408	GAAGAGGTGATGCCACAGGC	AGGGCAGAAAGCGATGACAG	-	SYBR
TGF $\beta$ 1	NW929377	CGCCAGGAATTGTTGCTATATTT	TGAAGTCTAGCTCGCACAGCATA	-	SYBR
IL-16	M589876	AGGTCCCCAAACTGCTAATTC	CTGTTCGTTTGTATCAGCCACC	-	SYBR
iNOS	AF011926	CTTAAATCCAGGCAAACGACG	CCAGTTCCTAGCCAAGTCC	-	SYBR
SLURP-1	XM871031	TGACGGTGGAGGCAGAGTT	GAAGCAGCAGAAGATGGGG	-	SYBR
ET1	NM181010	CCCAGCCAGTCTTGTCTCCA	GGTCACTGGGTCTCTTTGCCT	-	SYBR
$\beta$ actina	NM173979	ACCGTGAGAAGATGACCCAGA	TCATAGATGGGCACCGTGTG	-	SYBR

### 3.1.7 Reação de PCR em Tempo Real

#### 3.1.7.1 –Reação de PCR em Tempo Real com Sistema TaqMan.

A expressão dos genes IGF-1, IP-10, MCP-1, MIP1 $\alpha$  IFN $\alpha$ , IDO e IL-5 foi quantificada pela técnica de PCR em Tempo Real, utilizando-se o Sistema TaqMan One Step PCR (Applied biosystems) em um aparelho GeneAmp 7000 (Applied Biosystems – EUA) (Figura 1).

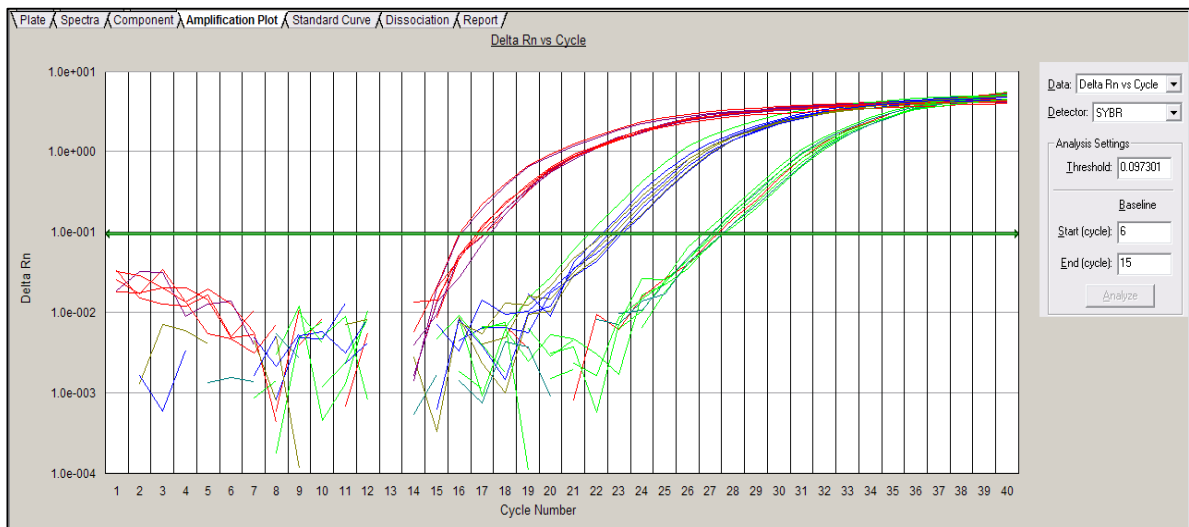
Nas reações de PCR em tempo real foram utilizados 12,5  $\mu$ l do reagente 2X Master Mix (Applied Biosystems) constituído de enzima polimerase Taq Gold; dNTPs com dUTP; e os demais componentes do tampão já devidamente otimizados; 0,625 $\mu$ l do Mix 40X MultiScribe<sup>TM</sup> e Inibidor de RNase, 1,25 $\mu$ l do Mix 20X TaqMan Gene Expression Assay contendo primers senso, anti-senso, a sonda marcada com ROX (quencher – fluorescência de referência) e FAM (reporter – Fluorescência quantificada) e 5,625  $\mu$ l de água Milli-Q autoclavada duas vezes. Por fim adicionou-se 5 $\mu$ l de RNA total a uma concentração de 10ng/ $\mu$ L, alcançado um volume final de reação de 25 $\mu$ l.

As reações foram submetidas ao protocolo de PCR seguindo as orientações do fabricante em um aparelho GeneAmp 7000 (Applied Biosystems – EUA). De forma resumida, 30 min a 48°C (passo 1), 10 min a 95°C (passo 2) e 40 ciclos de 15segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C (passo 3).

Ao final das reações as curvas de amplificação foram analisadas de acordo com o valor de Ct obtido (número de ciclos necessários para atingir o limiar de detecção). As amostras foram amplificadas em duplicatas e o utilizou-se a média dos valores de Cts obtidos para realização dos cálculos. Por fim, fez-se a comparação dos grupos suscetíveis e resistentes em relação ao aumento ou diminuição da expressão de um determinado gene alvo, através da fórmula:

$DCt = 2^{-(mCt \text{ gene alvo na pele infestada} - mCt \text{ gene alvo na pele normal})}$ , tendo a determinação da variação relativa da expressão. Na literatura é freqüente o uso de genes *housekeeping* para normalização dos dados de expressão gênica (Bustin, 2006), utilizando-o como referência na quantificação da expressão. Entretanto, optamos por realizar o cálculo direto da expressão gênica pelo uso do valor obtido com RNAtotal, sem normalização pelo *housekeeping*, devido a influência de vários tipos de infecções na expressão de genes constitutivos (Hamalainen et al 2001 e Tricarico 2002), fato que também ocorreu em nosso modelo.

Os dados gerados foram graficamente expressos (*Sigma plot 2.0*) acompanhados da análise estatística pelo teste *t* (*Sigma Stat*). Os valores com  $P < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes. Para melhor visualização os valores numéricos de DCt foram convertidos em imagem cromatográfica com auxílio dos softwares Treeview 1.6 (Stanford University, 1998).



**Figura 1. Demonstração da Curva de Amplificação pelo Sistema TaMan de Genes Expressos em Pele Bovina.** O Limiar de detecção (linha verde) é passado em um ponto da fase exponencial da reação de modo que possa determinar um valor de Ct para

### 3.1.7.2 –Reação de PCR em Tempo Real .

Nas reações de PCR em Tempo Real com SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix and RT-PCR Applied Biosystems), primeiro realizou-se a produção do DNA complementar (cDNA) a partir do RNA total extraído das biópsias coletadas. A produção de cDNA foi obtida através da reação de transcrição reversa, para tal, foram utilizados os seguintes reagentes: 10µl do Tampão para RT TaqMan 10X, 22µl de MgCl<sub>2</sub> a 25mM, 20µl de dNTP's, 5µl de Hexâmeros Aleatórios, 2µl de Inibidor de RNase 2,5µl da Enzima MultiScribe Transcriptase Reversa. O volume de água Milli-q autoclavada duas vezes variou de acordo com o volume de RNAtotal de cada amostra necessário para uma massa de 1µg de RNAtotal. O volume de água completou o volume final de reação para 100µl. Todos os reagentes e suas concentrações foram utilizados de acordo com as recomendações do fabricante. O cDNA foi sintetizado no termociclador PTC-100 (MJ Research, Watertown, MA) mediante o ciclo de 10 minutos a 25°C, 30 minutos a 48°C, 5 minutos a 95°C seguido de refrigeração à 4°C.

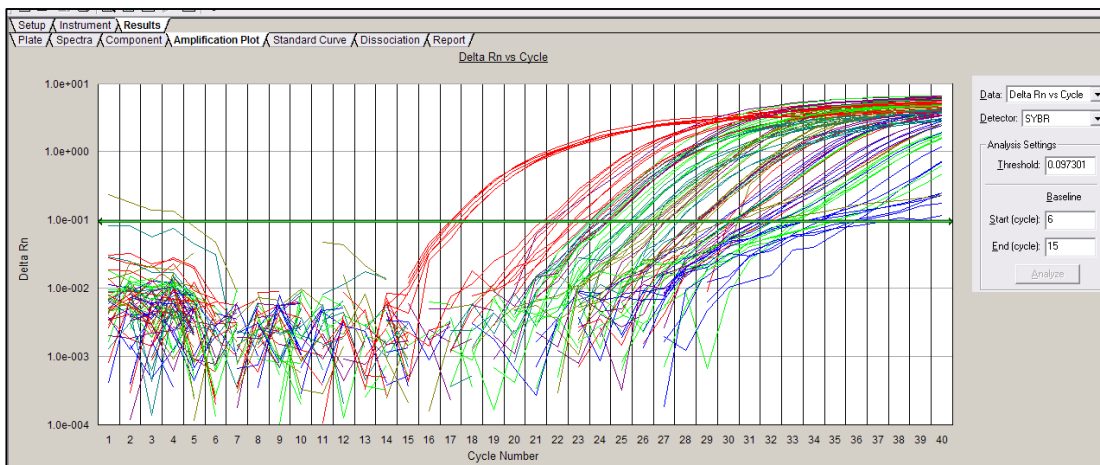
A expressão dos genes analisados foi quantificada pela técnica de PCR em tempo real, utilizando-se o sistema SYBR Green em um aparelho GeneAmp 7000 (Applied Biosystems – EUA). Inicialmente, para maximizar a eficiência e a especificidade de amplificação, as concentrações ideais de cada par de primers das reações de PCR em tempo real foram determinadas.

Nas reações de PCR em tempo real foram utilizados 12,5 µl do reagente 2X SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems contém o fluoróforo SYBR Green 1; AmpliTaq Gold<sup>®</sup> DNA Polimerase, dNTPs com dUTP, Referência Passiva ROX, e componentes do tampão devidamente otimizados), 6,5µl de água Milli-Q autoclavada 2 vezes, 0,5µl do primer *sense* a 10µM e 0,5µl do primer *anti-sense* a 10µM para todos os genes alvo e 5µl do cDNA obtido anteriormente, resultando em um volume final de reação de 25µl.

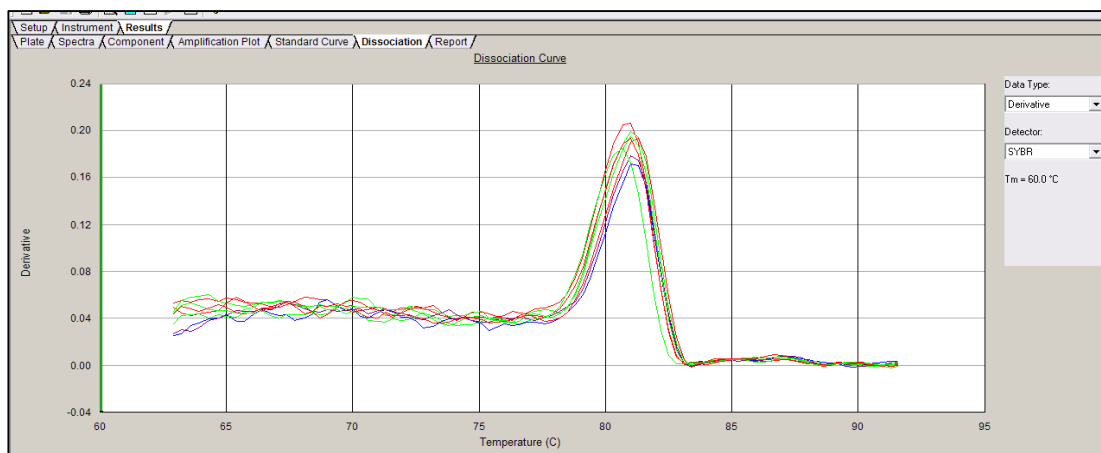
As reações foram submetidas ao protocolo de ciclos, seguindo as orientações do fabricante em um aparelho GeneAmp 7000 (Applied Biosystems – EUA). De forma resumida, 2 min a 50°C, 10 min a 95°C e quarenta ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C. Ao final dos quarenta ciclos, os produtos obtidos foram submetidos ao processo de dissociação com temperatura inicial de 60°C (Figura 2 e 3).

Ao final das reações as curvas de amplificação com um único pico no processo de dissociação foram analisadas de acordo com o valor de Ct obtido (número de ciclos necessários para o limiar de detecção). Por fim, deu-se a comparação dos grupos suscetíveis e resistentes em relação ao aumento ou diminuição da expressão de um determinado gene alvo seguindo os mesmos critérios descritos anteriormente.

Os dados gerados foram graficamente expressos (*Sigma plot 2.0*) acompanhados da análise estatística como descrito anteriormente.



**Figura 2. Demonstração da Curva de Amplificação pelo Sistema Sybr Green de Genes Expressos em Pele Bovina.** O limiar de detecção (linha verde) é passado em um ponto da fase exponencial da reação de modo que possa determinar um valor de Ct no ponto escolhido para todas as amostras presentes



**Figura 3. Análise das Curvas de Dissociação após o Término da Reação do PCR em Tempo Real pelo Sistema Sybr Green.** Após o término da Reação, as amostras foram analisadas individualmente para cada par de primer frente ao processo de dissociação, sendo escolhidas para o cálculo da expressão relativa somente quando apresentava um único pico de dissociação.

### **3.2. Quantificação relativa da expressão dos Genes Codificantes da Resposta Imune em Pele de Bovinos Resistentes e Susceptíveis Infestados com Fêmeas Ingurgitadas de *B. microplus* e Manejados em Pasto Apresentando Diferentes Níveis de Infestação.**

**3.2.1 Dos Animais:** Os bovinos foram introduzidos no experimento com seis meses de idade livres de qualquer tipo de infestação antecedente. Os animais eram não aparentados, machos, da raça Holandês Preto e Branco (*Bos taurus taurus*, Susceptíveis a infestação) e Nelores (*Bos taurus indicus*, Resistentes a infestação), sendo cada grupo constituído por 12 animais, dos quais cinco animais de cada grupo aleatoriamente escolhidos para análise da expressão gênica na pele normal e na pele contendo a fêmea fixada. Todos os animais foram mantidos em regime de manejo semi-intensivo com suplementação proteica e mineral, ficando expostos à infestação natural pelo *B. microplus* presente na pastagem. Os animais foram acompanhados durante 16 meses, e submetidos a três períodos distintos de coleta das biópsias com variações frente ao nível de infestação (baixa, média e alta). Todos os animais foram

vacinados a cada seis meses contra Febre Aftosa e Leptospirose (Bovicel e Lepto-BOV-6, Valleé).

### **3.2.2 Obtenção dos Dados Parasitológicos.**

Foram realizadas contagens de fêmeas ingurgitadas (tamanho superior a 4mm) do lado esquerdo de cada animal de acordo com a técnica descrita por Oliveira e Alencar (1989) e preconizada pelo Ministério da Agricultura e Pecuária e Abastecimento. O controle dos carrapatos em animais susceptíveis foi feito por meio de pulverizações com carrapaticidas tópicos quando a saúde clínica se encontrava comprometida devido à infestação. As contagens só se sucederam a partir de abril de 2004. Para determinar a intensidade da infestação fizemos a contagem de fêmeas ingurgitadas em animais suscetíveis durante os 16 meses de estudo e obtivemos a média das contagens. +/- o desvio padrão. Os valores obtidos acima da Média mais o Desvio Padrão foram considerados como alta infestação e aqueles abaixo da Média menos Desvio Padrão foram considerados baixa infestação.

### **3.2.3 Obtenção das Biópsias de Pele de Bovinos Resistentes e Susceptíveis Expostos a Infestação Natural ao *B. microplus* Destinadas a Quantificação da Expressão Gênica.**

Em cada período de coleta os animais eram conduzidos ao brete e condicionados de forma a permitir a coleta de biópsia de pele sem carrapatos fixos (pele normal - controle) e pele com fêmeas ingurgitadas fixas (pele infestada com fêmeas de *B. microplus* maior que 4mm) com utilização de um punch 8mm na região da virilha do animal para uniformizar os fragmentos quanto à localização no animal e peso de tecido extraído. Após a coleta do material, realizava-se a assepsia local com Bacteriovet e embebição dos fragmentos em solução de 600µL RNAlater™(Qiagen) em cama de gelo para adequado condicionamento do RNA durante o transporte. Depois disso, as amostras permaneciam embebidas em RNA later a uma temperatura de 4°C por 48hr e congelado a -70°C até o momento da extração de RNA.



### **3.2.4 Extração de RNA Total e Verificação da Integridade do Material Extraído: A**

extração do RNA tecidual e a verificação de sua integridade seguiram a mesma metodologia detalhada no item 3.1.4 e 3.1.5 respectivamente.

### **3.2.5 Obtenção de Primes e Sondas a Serem Utilizados na Reação de PCR em Tempo Real.**

Para obtenção dos primers correspondentes aos genes IGF-1, IP-10, MCP-1, MIP1- $\alpha$ , IFN- $\alpha$ , IDO, IL-5, IL-4, IL-10, TGF- $\beta$ 1, IFN $\gamma$ , iNOS,  $\beta$ -Actina, TNF- $\alpha$ , IL-18 e IL8, utilizou-se a mesma metodologia descrita no item 3.1.6.1. (Tabela 2).

**Tabela 2 – Características dos Primers Utilizados para Quantificação da Expressão Gênica pela Técnica de PCR em Tempo Real em Pele de Bovinos Submetidos à Infestação Natural de *B. microplus*.**

Gene	Nº de Acesso	5' Senso 3'	5'Anti-senso 3'	5'Sonda (TaqMan)3'	Fluoróforo
IFN $\gamma$	Z54144	GGGTGGGCTCTCTTCTCA	GTAGAAGGAGACAATTTGGCTCTGA	CACTTTCATCTTTCCAATTCT	FAM
IL-18	NM174091	CAGATAATGCACCCAGACCATATT	GAGTAGACATTTTCTTACTGCACAGA	TCTGGCCGTAACCATC	FAM
TNF $\alpha$	AF011926	CCTCTTCTCAAGCCTCAAGTAACAA	GCTGCCCCGGAGAGTT	CACGTTGTAGCCGACATC	FAM
IL-4	AF395008	TGCCTGTAGCAGACGTCTTTG	AATCCAACCCTGCAGAAGGT	CTGCCCCAAAGAACAC	FAM
IL-5	TC300586	TCTCATCGAACTCTGCTGATAGGT	GCACAGTTGGTGATTTGTATGCT	ATGGGAACTTGATGATTCC	FAM
IFN $\alpha$	NM174085	GGCGCTGGGTGGCA	CCTCGTGGAGCACAGAGATG	AGTTGCAGAAGGCTCA	FAM
TGF $\beta$	M36271	AGTGGACATTAACGGGTTTCAGTTC	CCTCGTGGAGCACAGAGATG	CCGGTTCATGCCGTGAAT	FAM
IL-10	NM174088	CCAAGCCTTGTCGGAAATGATC	TCTCAGCCTGTGGCATCAC	TCTTCCAGGTAAAAGT	FAM
MCP-1	L32659	AGTCACCAGCAGCAAGTGT	GTCCTGGACCCATTTCTGCTT	AAAGAGGCTGTGATTTTCAA	FAM
IP-10	TC300586	CTGAATCCAGAATCTAAGACCATCAAGAA	CCGTGTTTCGAGGAGATCTTTTAGT	CCTTTGCTTGTTAATTGC	FAM
IL-8	AY849380	ACACCTTTCCACCCCAAATTTATCA	ACAATGATTTCTGAATTTTCACAGTGTGG	CTCTCAATAACTCTCAATTCTT	FAM
IGF-1	AF404761	CAGTTCGTGTGCGGAGACA	CGACTGCTCGAGCCATACC	CCGTGGGCTTGTTGAAA	FAM
MIP1 $\alpha$	AY 077840	CCTCTGCAGCCAGGTCTTC	GGGCGACATAGGAGAAGCA	CAGCGCCAAATGGT	FAM
iNOS	AF333248	GGGCAGCGGAGTGACTTT	TTGCAAGAGAGATCCCCTTTGG	CTGGTGAAGCGTGTCTTG	FAM
IDO	NW001022450	CTTATGATGCCTGGATCTCTATTGCT	GCTAACTTCTCAACTCCACACGTA	CCTGAACTGATCAAGAACA	FAM
$\beta$ Actina	NM173979	GGCCGGGACCTGACG	CCGTGGTGGTGAAGCTGTAG	ACTACCTCATGAAGATCC	FAM

### 3.2.6 Reação de PCR em Tempo Real

A quantificação da expressão gênica das amostras de peles bovinas normais e infestadas com carrapato, assim como a análise dos dados obtidos, segue a mesma metodologia detalhada no item 3.1.7.2.

### 3.2.7 – Quantificação da Matriz Colagenosa em Pele de Bovinos Resistentes e Susceptíveis a Infestação Natural pelo *B. microplus*.

Para a quantificação da Matriz Colagenosa escolheu-se, aleatoriamente, amostras de pele normal e infestada com fêmeas ingurgitadas durante todo período de observação experimental. As biópsias de pele normal e infestada foram parafinadas, cortadas em micrótomo (*Leica*) a uma espessura de 5µm seguida da coloração com Picrosírius Red (específica para quantificação de matriz colagenosa). Verificar protocolo no ANEXO A.

As lâminas coradas foram selecionadas ao microscópio de maneira que o tecido permitisse a visualização da zona 1 ou 2 de fixação do carrapato (Szabó, 1999) para quantificação da matriz colagenosa (Verificar ANEXO B). As lâminas selecionadas foram submetidas à quantificação de colágeno pelo programa (*Image Tool 2.0*), e os resultados expressos em gráficos mediante utilização do programa *SigmaPlot 2.0*. A área de ocupação de colágeno na pele foi determinada em objetiva de 20X e expressa em µm<sup>2</sup>. Na análise estatística utilizou-se o teste *t* (*Sigma STAT*), sendo considerados estatisticamente significantes os valores de  $P < 0,05$ .

### **3.3- Análise Genotípica de Bovinos Resistentes e Susceptíveis a Infestação ao *B. microplus*. Caracterização de Genes Imunes como Marcadores Moleculares de Resistência pela Presença de SNP's (*Single Nucleotide Polimorfisms*).**

#### **3.3.1 Dos Animais:**

12 animais da raça Holandês Preto e Branco (*Bos taurus taurus*, Susceptíveis a infestação) e 12 animais Nelores (*Bos taurus indicus*, Resistentes a infestação) da cidade de Potirendaba, noroeste do estado de São Paulo, e quatro Holandês Preto e Branco e quatro Nelores da cidade de Pirassununga, sudeste do estado de São Paulo, foram introduzidos neste experimento para Análise Genotípica. Todos os animais foram mantidos em regime de manejo semiintensivo com suplementação proteica e mineral, vacinados a cada seis meses contra Febre Aftosa e Leptospirose (Bovicel e Lepto-BOV-6, Valleé).

#### **3.3.2 Obtenção do DNA:**

Após obtenção do sangue periférico dos animais com utilização de Tubos de Coleta a Vácuo (Sistema Vacutainer<sup>TM</sup>; Becton Dickinson Company (BD)) contendo K<sub>3</sub> EDTA em concentrações já estabelecidas para coleta de 4 mL de sangue e agulha (CE 0,8x25mm), a extração do DNA foi realizada conforme a metodologia sugerida pelo fabricante (Kit de Isolamento de DNA Genômico, Pure Gene – Gentra Systems). Em resumo, 3mL de sangue total foram transferidos para um Tubo Cônico Tipo Falcon de 15mL contendo 9mL de Solução de Lise Glóbulos Vermelhos incubados por 10 minutos à T.A. . O material foi centrifugado (2000g/10minutos) e seu sobrenadante descartado. O pelete formado foi resuspendido, seguido da adição de 3mL de Solução de Lise Celular e homogenização com pipeta e ponteira descartável. Para precipitação das proteínas, ao sobrenadante contendo o DNA adicionou-se 1mL da Solução de Precipitação de Proteínas seguido de agitação em aparelho vórtex por 20 segundos e centrifugação (2000g/10minutos) para formação do pelete

contendo o precipitado proteico. O sobrenadante foi transferido para um Tubo Cônico Tipo Falcon de 15mL contendo 3mL de Isopropanol 100%, invertido 50 vezes para homogeneização e centrifugado (2000g/3minutos) para obtenção do pelete, ao qual, foi adicionado 3mL de etanol 70% para eliminação das impurezas. Por fim, 250µL da Solução de Hidratação do DNA foi adicionado e incubado a 65C por uma hora, sendo estocada segunda as normas do fabricante.

### 3.3.3 Obtenção dos primers

Para desenho dos primers utilizou-se seqüências gênicas bovinas depositadas na base de dados do National Center for Biotechnology Information GenBank NCBI (GenBank NCBI - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e a base de dados do Institute for Genomic Research (Tigr- <http://www.tigr.org>) quando fez-se utilização de ESTs para desenho dos primers. Priorizamos o desenho dos primers para perfeito alinhamento em éxons para gerar como amplicon o íntron que intercala os éxons onde os primers anelaram. Quando a base de dados da seqüência genômica bovina não fornecia o local de início e término de cada éxon, o EST bovino era alinhado com a seqüência do respectivo gene alvo humano depositado na base de dados do NCBI para determinação dessa localização e conseqüente desenho dos primers. A seqüência gênica adquirida foi utilizada para desenho dos primers através do Primer Express 2.0 (Applied Biosystems). As seqüências dos primers obtidas foram submetidas ao BLAST confirmatório no Banco de Dados do Genoma Bovino depositado no NCBI (Tabela 3).

**Tabela 3** – Características dos Primers Utilizados para Amplificação (PCR convencional) de Genes Candidatos à Pesquisa de SNPs.

Gene	Cod. de Acesso	5'Senso 3'	Posição do Primer	5' Anti-senso3'	Posição do Primer
IFN $\gamma$	NCBI Z54144	CGATTTCAACTACTCCGGCC	exon 1	GCAACAGGAAAATCAGCCAAA	intron 3
TNF $\alpha$	AF011926	AGCACCAAAAGCATGATCCG	exon 1	TCTTCCAGCTTCACACCGTTG	exon 4
TGF $\beta$ <sub>1</sub>	NW929377	CGCCAGGAATTGTTGCTATATTT	exon 5	TGAAGTCTAGCTCGCACAGCATA	exon6
IGF-1	AF404761	CCCCAGTCGTTTGAGGGTTA	exon 1	CCAGTGCCGAAACAATGAAA	intron 3
MCP-1	L32659	TCGCTGCAACATGAAGGTCT	exon 1	AAACTGCAGAGGAGAGAGAGGG	exon 3
MIP1 $\alpha$	NW929444	GCTCTCGCCGTTCTCCTCT	exon1	CGGCCTTTTTTGGTCTGGA	exon4
IP-10	NW931725	GCTGTTCTGCATCGAGATCA	exon 2	CACGGACAATTAGGGCTTGAC	exon4

### 3.3.4 A Reação de PCR

O DNA isolado dos animais foi diluído em água Milli-Q de forma que todas as amostras ficassem a uma concentração de 9ng/mL. Para obtenção dos fragmentos desejados utilizou-se o Kit Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen). Inicialmente, para maximizar a qualidade da reação, testou-se a amplificação dos genes alvos em um gradiente de Temperatura de Anelamento dos primers, Concentração dos Primers, Concentração da Enzima Taq Polimerase e a Concentração de Magnésio, alcançando os valores, citados seguidamente, como sendo de condições ótimas de amplificação. Em resumo, 2,5µL de Tampão 10X para Enzima High Fidelity, 1,5µL de MgSO<sub>4</sub>, 0,5µL de dNTP's, 0,1µL da Enzima Taq Polimerase, 16,4µL de água Milli-Q autoclavada 2 vezes, 0,5µL do primer senso e anti-senso a uma concentração de 10µM cada . As reações foram submetidas ao protocolo de ciclos, seguindo as orientações do fabricante em um aparelho PTC-200 (MJ Research, Watertown, MA). De forma resumida, 5 min a 95°C, e 35 ciclos de 2 min à 95°C, 1 min para Temperatura (°C) de Anelamento (variou de acordo com o par primer), 1 minuto a 68°C.

### 3.3.5 Eletroforese em Gel de Agarose

Para confirmação do produto de PCR gerado as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose. Para tal, adicionou-se 1mg de Agarose a 100mL de tampão TAE 1X (4,9g de TriBase, 1,14mL de Ácido Acético Glacial e 0,75g de EDTA para cada 100mL de água destilada), estabelecendo uma concentração de agarose de 1%. Procedeu-se seu aquecimento em forno microondas à potência máxima durante 1 minuto. Após o aquecimento adicionou-se 5µL de Brometo de Etídio (0,5 µl/ml), sendo homogeneizado e invertido em cuba de eletroforese para adição dos pentes e solidificação, seguido da retirada dos pentes e adição da solução TAE 1X (Tampão de Corrida). A cada 5µL do produto de PCR de cada amostra foi adicionado 3µL de Azul de Bromofenol (100 mg/ml) e transferido para o

poço correspondente no gel. Para confirmação do tamanho do amplicon gerado, utilizou-se o padrão de peso molecular Low DNA Mass Ladder (Invitrogen®) adicionando-se 2µL da solução padrão a 3µL de Bromofenol. Para corrida no gel a cuba foi ligada a uma fonte de 90V, 115mA, 9W por 30 minutos. O gel foi visualizado em luz UV e fotografado.

### **3.3.6 Seqüenciamento dos Amplicons Gerados**

As reações de seqüenciamento dos amplicons obtidos após a reação de PCR, assim como a análise da presença dos SNPs no fragmento em questão, foram de responsabilidade do Dr. Alexandre Rodrigues Caetano, cabendo ao nosso grupo realizar as análises estatísticas e gráficas das freqüências alélicas e genotípicas dos SNPs identificados.

### **3.3.7 - Purificação dos Produtos de PCR para o Seqüenciamento**

Para o processo de purificação dos amplicons, 1µl de mix (0,2µl de Exosapit - Amersham GE + 0,8 ml de água) foi adicionado a 5µL (~15-20ng/µL) de cada produto de PCR. A reação foi incubada a 37°C por 45 minutos e em seguida a 80°C por 15 minutos, em um termociclador PTC200 (MJ Research).

### **3.3.8 – Seqüenciamento dos Produtos de PCR**

Para reação de seqüenciamento, 30-40ng de DNA molde foi adicionado ao Mix (2pmol do primer correspondente, 1µL de tampão "Save Money" 5x e 1µL de kit BigDye v 3.1) (Applied Biosystems), em um volume final de reação de 10µl. Uma vez pronto o Mix as reações foram submetidas ao protocolo de ciclos, seguindo as orientações do fabricante em um termociclador PTC200 (MJ Research). De forma resumida, 20 segundos a 95°C, 15 segundos a 58°C e 1 minuto 60°C repetidos por 29 vezes.



### 3.3.9 - Purificação das Reações de Sequenciamento

Para purificação dos produtos de Sequenciamento, 80µl de Isopropanol 65% frio, foi adicionado em cada poço da placa seguido de 10 inversões da placa para mistura das soluções, e incubação por 15 minutos em temperatura ambiente. Após a incubação, a placa foi centrifugada por 40 minutos a 1900g a 20° C, o sobrenadante de cada poço foi descartado seguido da adição de 250ul de etanol 60% frio, e centrifugação por 10 minutos a 1900 g a 20°C. Por fim, procedeu-se a secagem em Speed vac por 30 minutos em temperatura média.

Para injeção, foi colocado 10ul de formamida HiDye (ABI) por poço da placa seguido de incubação de 5 min a 95°C e resfriamento da placa. Para eletroforese utilizou-se o equipamento ABI 3100 (Applied Biosystems) conforme parâmetros do fabricante.

### 3.3.10 Análise dos Dados

As seqüências produzidas foram processadas com os programas Phred (Ewing, 1998), Phrap([www.phrap.org/phredphrap/general.html](http://www.phrap.org/phredphrap/general.html)) e Consed (Gordon, 1998) em um computador com o sistema operacional Linux. Após o alinhamento e visualização das seqüências de cada amplicon em contigs, o programa Polyphred foi utilizado para identificar os SNPs e produzir um arquivo de output contendo o SNP, 30 pb de seqüência flanqueando cada lado do mesmo, e informações sobre o genótipo de cada indivíduo e a probabilidade do genótipo identificado ser real.

Quando o SNP encontrado estava localizado em regiões exônicas, fez-se a utilização do ExpASy Translate Tool (<http://www.expasy.ch/tools/dna.html>) para tradução da seqüência de nucleotídeos e verificação da alteração de aminoácidos na seqüência protéica. A frequência e especificidade alélica e genotípica entre as raças foram determinadas através da análise estatística do Qui-quadrado (*Sigma STAT*) e geração da expressão gráfica dos resultados (*Sigma Plot 2.0*), sendo considerados estatisticamente significantes os valores de  $P < 0,05$ .

## **RESULTADOS**

#### 4. RESULTADOS

A fim de elucidar os mecanismos imunológicos envolvidos na resposta imune de bovinos contra carrapatos quantificamos a expressão de genes candidatos a mediar os fenótipos de infestação nos seguintes tipos de tecidos: 1) pele infestada com carrapatos; 2) pele inoculada intradermicamente com extrato de larvas de carrapatos não alimentados. No caso de pele infestada, comparamos o nível da expressão gênica com aquela observada em pele não infestada do mesmo animal que sofria infestação. No caso do estudo sobre o efeito de antígenos de carrapatos na expressão de genes, comparamos o nível de expressão observada na pele inoculada com extratos de larvas, com aquela observada em pele inoculada com tampão, observamos a cinética de expressão de genes candidatos 1, 72 e 96 horas após a inoculação e também quantificamos o infiltrado celular recrutado pelo antígeno do extrato. Amostras de pele infestada e não infestada foram obtidas de cinco animais resistentes da raça Nelore e de cinco animais suscetíveis da raça Holandês Preto e Branco. No caso, a pele estava infestada com a forma adulta do carrapato que se encontrava no início da fase rápida de alimentação e oriunda de infestação natural. Todos os animais foram mantidos no mesmo pasto e sujeitos, portanto, ao mesmo nível de infestação. No caso de pele inoculada com extrato de larvas, foram estudadas amostras de cinco animais resistentes da raça Nelore e de cinco animais suscetíveis da Raça Holandês Preto e Branco.

#### **4.1- Quantificação da Expressão Gênica Relativa em Pele de Bovinos Resistentes e Susceptíveis a Infestação pelo *B. microplus* após Tratamento com Extrato de Larva de *B. microplus* não Alimentadas.**

Nesse experimento a quantificação da expressão gênica foi avaliada em pele bovina inoculada com extrato de larvas de *B. microplus* não alimentadas. As amostras de pele foram coletadas em bovinos de duas raças que apresentam fenótipos contrastantes para infestações com o carrapato do boi e que já haviam sido expostos às infestações naturais. Animais resistentes foram representados por bovinos zebuínos da raça Nelore e animais suscetíveis foram representados por bovinos taurinos da raça Holandês Preto e Branco. O infiltrado inflamatório elicitado pelo extrato e pelo controle (tampão diluente do antígeno) foi caracterizado previamente por Morelli Filho (2005) (APÊNDICE A). Nesse trabalho ele estabeleceu que o padrão de infiltrado celular na reação tardia ao extrato (72-96 hr) apresenta aumento significativo do número de basófilos e eosinófilos em relação à pele controle nos hospedeiros resistentes, mas não nos bovinos suscetíveis ao carrapato. As características temporais e celulares desse infiltrado remetem à reação de Jones-Mote elicitado por proteínas solúveis em humanos sensibilizados (Askenase, 1976). Esse trabalho não examinou nenhum aspecto sobre as subpopulações e o estado de ativação das células recrutadas pelo extrato ou sobre as quimiocinas e citocinas produzidas no local. Esse último aspecto foi estudado no presente trabalho.

#### **4.1.1 Cinética da Expressão de Quimiocinas em Pele de Bovinos Resistentes e Susceptíveis a Infestação pelo *B. microplus* Após Tratamento com Antígenos de Extrato de larva de *B. microplus* não alimentadas.**

O nível de expressão gênica de quimiocinas foi avaliado com o objetivo de detectar aqueles responsáveis por auxiliar na formação do infiltrado celular previamente caracterizado.

A expressão relativa de IGF-1 (fator de crescimento semelhante à insulina-1), um fator quimiotático seletivo para basófilos e importante fator de crescimento celular, apresentou-se aumentada na pele dos animais da raça Nelore no desenvolvimento da reação tardia tanto de 72hr ( $P=0,06$ ; teste *t*) quanto de 96hr ( $P=0,03$ ; teste *t*) quando comparada aos níveis presentes na reação imediata (1h). Os animais HPBs apresentaram um aumento da expressão relativa de IGF-1 na reação de 72hr em relação aos níveis de expressão na reação imediata, porém a diferença nos níveis de expressão não era significativa (Figura 4 e Tabela 4).

A expressão relativa de IP-10, um fator quimiotático para linfócitos da subpopulação Th1 e também para eosinófilos, apresentou um aumento na pele de ambas as raças quando desafiada com extrato de larva, porém, somente Nelores apresentaram aumento significativo da expressão relativa de IP-10 na reação tardia de 96hr quando comparado com a expressão na reação imediata ( $P=0,04$ ; teste *t*). Diferenças de expressão relativa do IP-10 não foram observadas entre as raças (Figura 5 e Tabela 5). A expressão do gene codificante de IP-10 foi significativamente maior ( $P=0,04$ ; teste *t*) na pele tratada com extrato do que na pele tratada com PBS apenas na pele de Nelores tratada com extratos 96hr após o estímulo (Ct para pele tratada com PBS após 96 hr:  $33,0 \pm 0,95$ ; Ct para pele tratada com extrato após 1 hora:  $30,5 \pm 1,2$ )

Nos animais HPB a expressão relativa de MCP-1, um fator quimiotático para basófilos, eosinófilos e monócitos diminuiu progressivamente no decorrer da formação da reação tardia, embora os níveis de expressão da quimiocina na pele tratada estivessem sempre mais altos do

que aqueles observados em pele normal. A pele tratada de Nelores manteve a expressão relativa de MCP-1 aumentada de forma constante durante os tempos analisados, Após 96hr a expressão relativa de MCP-1 era maior na pele tratada de Nelores quando comparado com a pele de animais HPB coletada no mesmo período, embora a diferença não tenha sido significativa ( $P=0,09$ ; teste *t*, Figura 6 e Tabela 6). A expressão do gene codificante de MCP-1 foi significativamente ( $P=0,04$ ; teste *t*) maior na pele tratada com extrato do que na pele tratada com PBS apenas na pele de Nelores tratada com extratos 1h e 72hr após o estímulo (Ct para pele tratada com PBS após 1 hr:  $28,6 \pm 1,8$ ; Ct para pele tratada com extrato após 1 hora:  $26,7 \pm 1,5$ ; Ct para pele tratada com PBS após 72hr  $28,5 \pm 0,8$ ; Ct para pele tratada com extrato após 72:  $26,9 \pm 0,5$  ).

Semelhante ao ocorrido com a expressão de MCP-1, o MIP-1 $\alpha$  um fator quimiotático para vários tipos leucocitários, dentre eles eosinófilos e basófilos, apresentaram em ambas as raças uma queda da expressão gênica relativa no decorrer da reação tardia, chegando a sofrer inibição da sua expressão em relação à pele normal 96hr após o tratamento com extrato de larvas (Figura 7 e Tabela 7). Contudo, a diminuição da expressão em relação ao primeiro tempo analisado foi significativa ( $P=0,05$ ; teste *t*) apenas para a raça HBP no tempo de 96 hr. A expressão do gene codificante de MIP-1 $\alpha$  foi significativamente ( $P=0,03$ ; teste *t*) maior na pele tratada com extrato do que na pele tratada com PBS, apenas na pele de Nelores tratada com extratos durante 1hora (Ct para pele tratada com PBS após 1 hora:  $39 \pm 0,5$ ; Ct para pele tratada com extrato após 72hr:  $37 \pm 1,7$ ).

A expressão gênica relativa de IL-16, um fator quimiotático para células que expressam CD4, incluindo basófilos e eosinófilos ativados, foi maior em pele de animais HPBs quando comparado à pele de Nelores em todos os tempos examinados, porém não houve diferença significativa entre os dois grupos de animais. Contudo, quando a expressão relativa de IL-16

medida em pele uma hora após o inóculo do extrato foi comparada com a expressão 72 e 96 hr após o inóculo, a expressão aumentou significativamente ( $P=0,03$ ,  $t$  test apenas em Nelores após 72 hr, mas não em animais HPB, aumento este que se manteve até 96hr, embora sem diferença significativa ( $P=0,06$  teste  $t$ ; Figura 8 e Tabela 8).

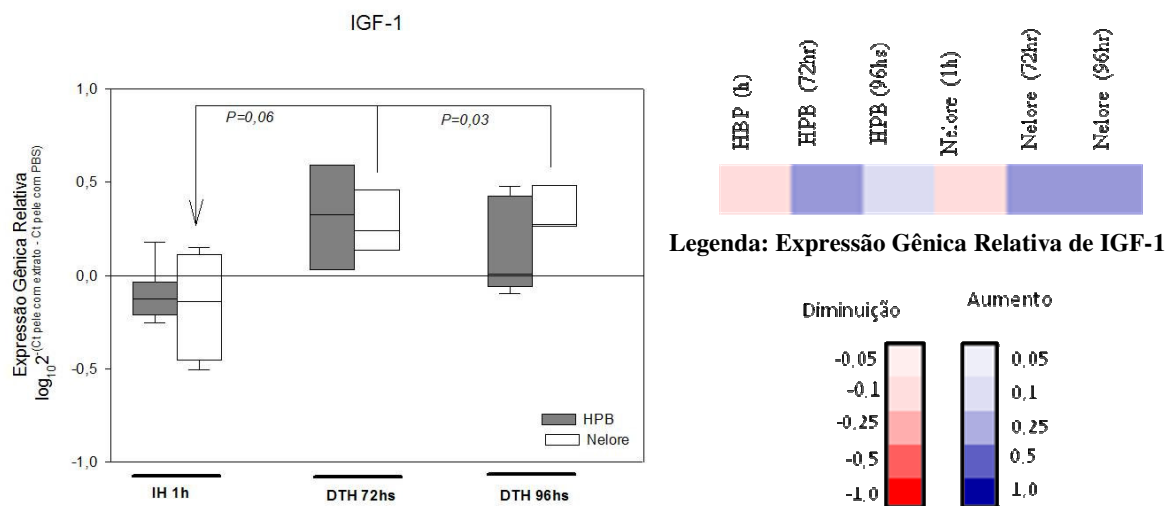
A expressão relativa de SLURP-1, um homólogo solúvel do receptor do ativador de plasminogênio tipo urokinase (uPA), mostrou-se constante nos animais HPBs nos três tempos de análise, sendo levemente maior na pele tratada com extrato durante as reações tardias 72hr e 96hr após o estímulo. Os Nelores sofrem forte queda da expressão relativa de SLURP-1 durante a reação imediata. Na reação tardia de 72hr Nelores exibem um aumento relativo dos níveis de expressão do SLURP-1 quando comparados aos níveis observados na reação imediata ( $P=0,008$ ; teste  $t$ ), seguido de queda da expressão relativa no tempo de 96hr após o estímulo, porém os níveis permanecem maiores do que aqueles observados na reação imediata ( $P=0,09$ ; teste  $t$  Figura 9 e Tabela 9). A expressão do gene codificante de SLURP-1 ( $P=0,06$ ; teste  $t$ ) foi menor na pele tratada com extrato do que na pele tratada com PBS apenas na pele de Nelores 1 hora após o estímulo e maior 72hr após o estímulo ( $P=0,08$  teste  $t$ ; Ct para pele tratada com PBS após 1 h:  $23,8 \pm 1,5$ ; Ct para pele tratada com extrato após 1 hora:  $27,3 \pm 1,7$ ; Ct para pele tratada com PBS após 72 hr:  $27,0 \pm 1,8$ ; Ct para pele tratada com extrato após 72 hr:  $25,6 \pm 1,6$ )

Em resumo, há um aumento significativo da expressão de IGF-1, IP-10, MCP-1 e IL-16 durante a reação tardia elicitada por extrato de larvas em pele de animais Nelore, mas não em pele de animais HPB. Esses dados estão de acordo com os dados histológicos obtidos anteriormente por Morelli Filho (2005) e sugerem que esses fatores quimiotáticos participam do recrutamento de eosinófilos e/ou basófilos na pele de animais resistentes tratada com extrato de larva. Uma vez que os animais da raça Nelore são altamente resistentes ao carrapato, pode-se inferir que os eosinófilos e/ou os basófilos são as células determinantes do

---

fenótipo dessa raça porque apresenta maior capacidade de produzir as quimiocinas que recrutam essa população de células.





**Figura 4 – Níveis da Expressão Gênica Relativa de IGF-1 na Pele de Bovinos Susceptíveis e Resistentes 1h, 72hr e 96hr após inoculação de extrato de larvas de *B. microplus* não alimentadas. Resultados de PCR em Tempo Real representados pelas médias do DCt.**

**Tabela 4 - Efeito do Extrato de larva de *B. microplus* na Expressão Gênica Relativa de IGF-1 na pele de Bovinos Susceptíveis e Resistentes a Infestações com o carrapato *B. microplus*. Média dos DCt ± DP nos tempos de 1h, 72h e 96h após tratamento. \*\*: Diferença Significativa da Expressão Gênica Relativa na reação tardia de 96h em relação à reação imediata de 1h após tratamento com extrato.**

Tempo de Inoculação	Expressão Relativa de IGF-1 (DCt ± DP)		
	1h	72hs	96hs
<b>Fenótipo</b>			
<b>Susceptível (HPB)</b>	<b>-0,102 ± 0,1664</b>	<b>0,3136 ± 0,3734</b>	<b>0,1502 ± 0,2713</b>
<b>Resistente (Nelore)</b>	<b>-0,1677 ± 0,2992</b>	<b>0,2905 ± 0,2178</b>	<b>0,3601 ± 0,1640</b> **

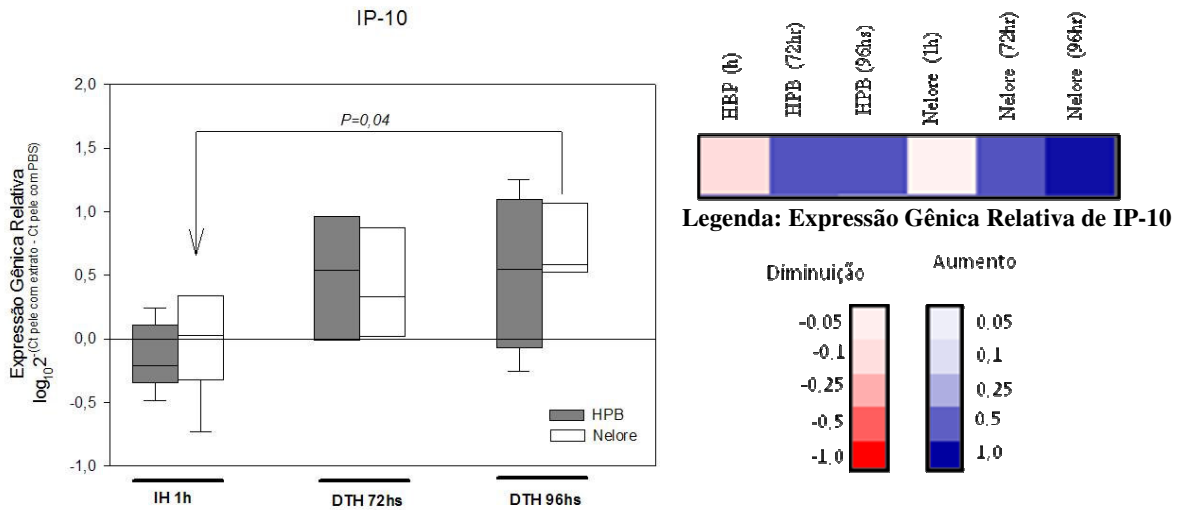
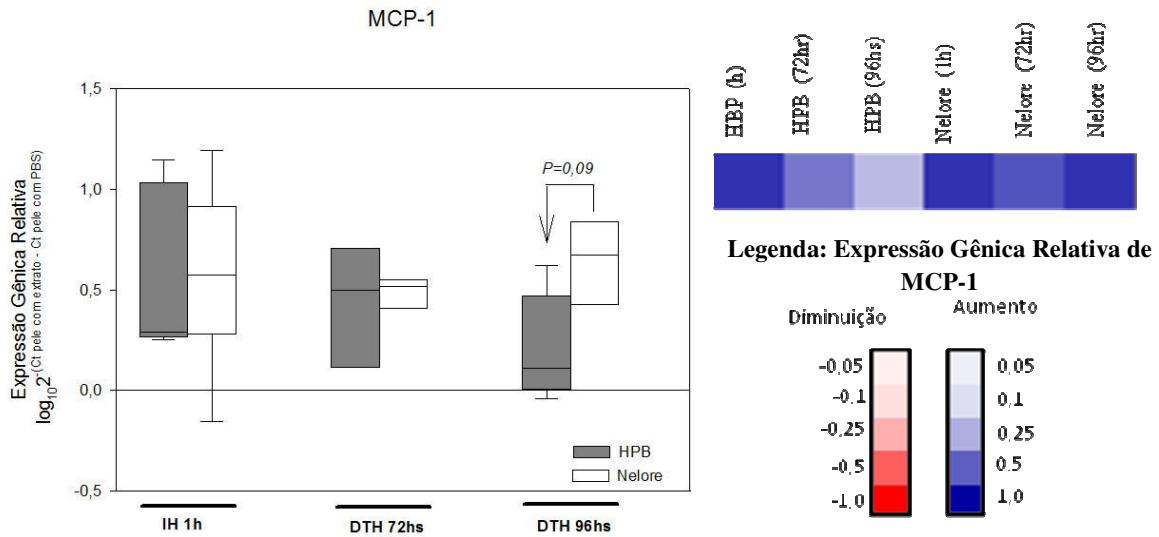


Figura 5 – Níveis da Expressão Gênica Relativa de IP-10 na Pele de Bovinos Susceptíveis e Resistentes 1h, 72hr e 96hr após inoculação de extrato de larvas de *B. microplus* não alimentadas. Resultados de PCR em Tempo Real representados pelas médias do DCt.

Tabela 5 - Efeito do Extrato de larva de *B. microplus* na Expressão Gênica Relativa de IP-10 na pele de Bovinos Susceptíveis e Resistentes a Infestações com o carrapato *B. microplus*. Média dos DCt ± DP nos tempos de 1h, 72hr e 96hr após tratamento. \*\*: Diferença Significativa da Expressão Gênica Relativa na reação tardia de 96hr em relação à reação imediata de 1h após tratamento com extrato (P=0,04).

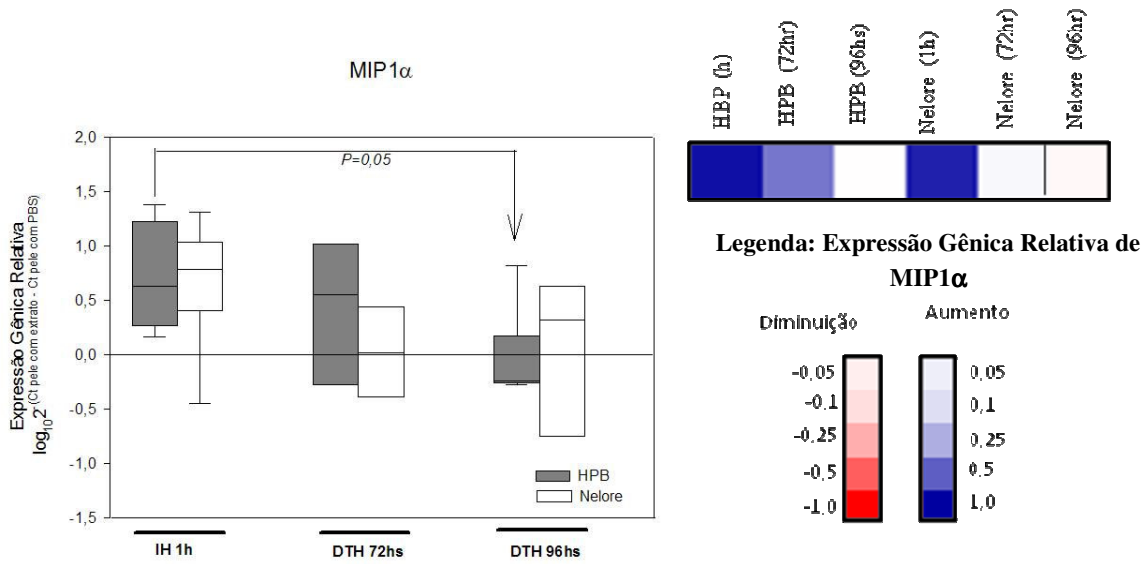
Tempo de Inoculação	Expressão Relativa de IP-10 (DCt ± DP)		
	1h	72hs	96hs
<b>Fenótipo</b>			
<b>Susceptível (HPB)</b>	-0.1379 ± 0.2901	0.4842 ± 0.6512	0.5157 ± 0.6502
<b>Resistente (Nelore)</b>	-0.0430 ± 0.4422	0.4310 ± 0.5751	0.7716 ± 0.3964 **



**Figura 6– Níveis da Expressão Gênica Relativa de MCP-1 na Pele de Bovinos Susceptíveis e Resistentes 1h, 72hr e 96hr após inoculação de extrato de larvas de *B. microplus* não alimentadas. Resultados de PCR em Tempo Real representados pelas médias do DCt.**

**Tabela 6 - Efeito do Extrato de larva de *B. microplus* na Expressão Gênica Relativa de MCP-1 na pele de Bovinos Susceptíveis e Resistentes a Infestações com o carrapato *B. microplus*. Média dos DCt ± DP nos tempos de 1h, 72r e 96r após tratamento**

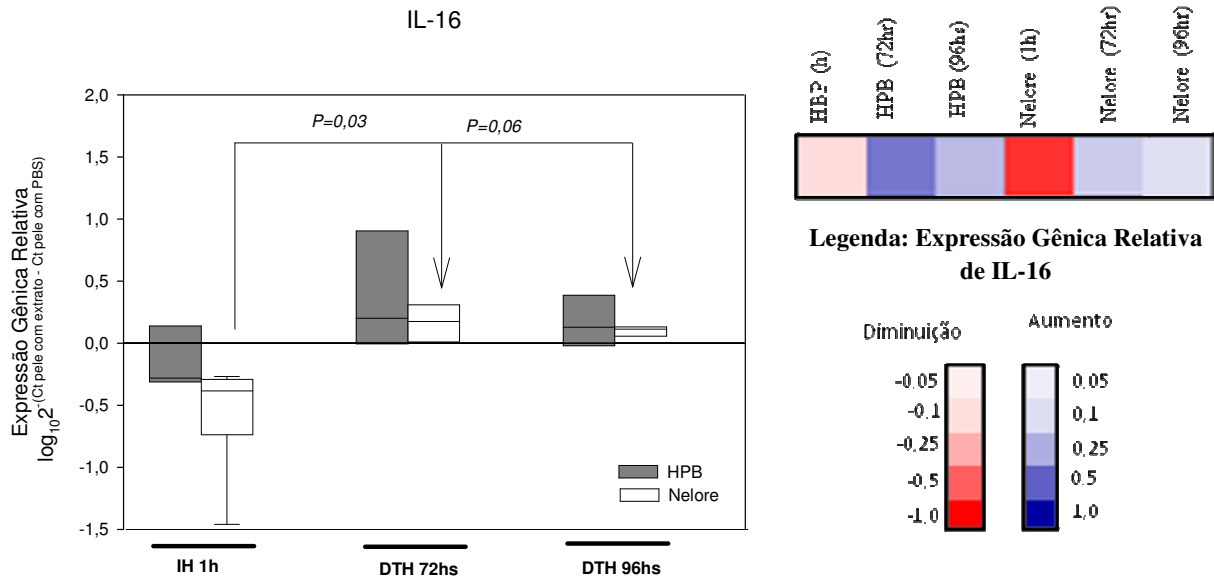
Tempo de Inoculação	Expressão Relativa de MCP-1 (DDC't ± DP)		
	1h	72hs	96hs
<b>Fenótipo</b>			
<b>Susceptível (HPB)</b>	<b>0.5915 ± 0.4419</b>	<b>0.4199 ± 0.4031</b>	<b>0.2252 ± 0.2829</b>
<b>Resistente (Nelore)</b>	<b>0.5717 ± 0.4990</b>	<b>0.4827 ± 0.0993</b>	<b>0.6352 ± 0.2757</b>



**Figura 7 – Níveis da Expressão Gênica Relativa de MIP1- $\alpha$  na Pele de Bovinos Susceptíveis e Resistentes 1h, 72hr e 96hr após inoculação de extrato de larvas de *B. microplus* não alimentadas. Resultados de PCR em Tempo Real representados pelas médias do DcT.**

**Tabela 7 - Efeito do Extrato de larva de *B. microplus* na Expressão Gênica Relativa de MIP1- $\alpha$  na pele de Bovinos Susceptíveis e Resistentes a Infestações com o carrapato *B. microplus*. Média dos DcT  $\pm$  DP nos tempos de 1h, 72hr e 96hr após tratamento.\*: Diferença Significativa da Expressão Gênica Relativa na reação tardia de 96hr em relação à reação imediata de 1h após tratamento com extrato ( $P=0,05$ ).**

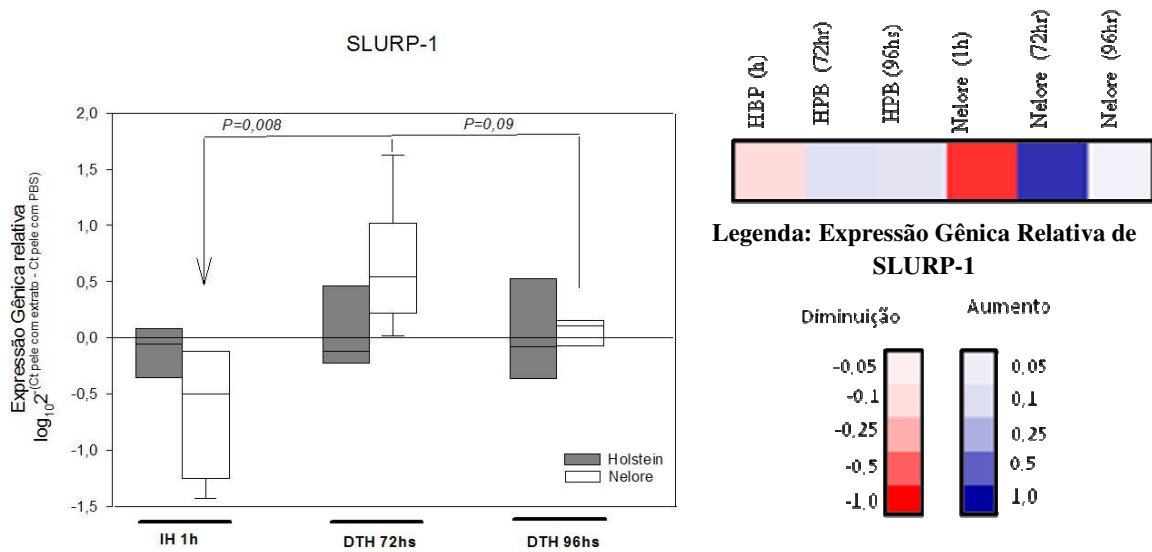
Tempo de Inoculação	Expressão Relativa de MIP-1 $\alpha$ (DcT $\pm$ DP)		
	1h	72hs	96hs
<b>Fenótipo</b>			
<b>Susceptível (HPB)</b>	<b>0,7291</b> $\pm 0,5327^*$	<b>0,3898</b> $\pm 0,8710$	<b>-6,0206e-4</b> $\pm 0,4687$
<b>Resistente (Nelore)</b>	<b>0,6541</b> $\pm 0,6623$	<b>0,0241</b> $\pm 0,5539$	<b>-0,0201</b> $\pm 0,9693$



**Figura 8 – Níveis da Expressão Gênica Relativa de IL-16 na Pele de Bovinos Susceptíveis e Resistentes 1h, 72hr e 96hr após inoculação de extrato de larvas de *B. microplus* não alimentadas.** Resultados de PCR em Tempo Real representados pelas médias do DCt.

**Tabela 8. Efeito do Extrato de larva de *B. microplus* na Expressão Gênica Relativa de IL-16 na pele de Bovinos Susceptíveis e Resistentes a Infestações com o carrapato *B. microplus*.** Média dos DCt ± DP nos tempos de 1h, 72hr e 96hr após tratamento.\*: Diferença Significativa da Expressão Gênica Relativa na reação tardia de 72hr em relação à reação imediata de 1h após tratamento com extrato e (P=0,03).

Tempo de Inoculação	Expressão Relativa de IL-16 (DCt ± DP)		
	1h	72hs	96hs
<b>Fenótipo</b>			
<b>Susceptível (HPB)</b>	-0,1079 ± 0,3364	0,4219 ± 0,6348	0,1821 ± 0,3199
<b>Resistente (Nelore)</b>	-0,5813 ± 0,4983	0,1588 ± 0,2174 *	0,0958 ± 0,0518



**Figura 9– Níveis da Expressão Gênica Relativa de SLURP-1 na Pele de Bovinos Susceptíveis e Resistentes 1h, 72hr e 96hr após inoculação de extrato de larvas de *B. microplus* não alimentadas.** Resultados de PCR em Tempo Real representados pelas médias do DCt.

**Tabela 9. Efeito do Extrato de larva de *B. microplus* na Expressão Gênica Relativa de SLURP-1 na pele de Bovinos Susceptíveis e Resistentes a Infestações com o carrapato *B. microplus*.** Média dos DCt ± DP nos tempos de 1h, 72hr e 96hr após tratamento.\*: Diferença Significativa da Expressão Gênica Relativa na reação tardia de 72hr em relação à reação imediata de 1h após tratamento com extrato ( $P=0,008$ ).

Tempo de Inoculação	Expressão Relativa de SLURP-1 (DCt ± DP)		
	1h	72hr	96hr
<b>Fenótipo</b>			
<b>Susceptível (HPB)</b>	-0.1254 ± 0.2946	0.0933 ± 0.4948	0.0824 ± 0.6023
<b>Resistente (Nelore)</b>	-0.6731 ± 0.6084	0.6584* ± 0.6174	0.0487 ± 0.1602

#### **4.1.2 Cinética da Expressão de Citocinas Pró- e Anti-Inflamatórias em Pele de Bovinos Resistentes e Susceptíveis à Infestação pelo *B. microplus* Após Tratamento com Antígenos de Extrato de larva de *B. microplus* Não-Alimentadas.**

Sabendo que outros hospedeiros que são susceptíveis aos carrapatos desenvolvem um padrão Th2 de resposta (Brossard, 1995; Ferreira e Silva, 1999), a expressão de genes que codificam citocinas pró-e anti-inflamatórias foi investigada com o intuito de definir o padrão de resposta de linfócitos T auxiliares no desenvolvimento dos fenótipos de bovinos infestados com o carrapato.

A expressão relativa do IFN $\gamma$  mostrou-se constante em Nelores nas respostas imediatas e tardias elicitadas com o extrato de larvas. Os animais HPBs manifestaram uma inibição da expressão de IFN $\gamma$  na pele tratada com extrato de larva quando comparado à pele que recebeu PBS nos tempos de 1h e 96hr após o tratamento, mas não houve diferença significativa entre nenhum dos grupos estudados (Figura 10 e Tabela 10).

A expressão relativa de TNF $\alpha$  demonstrou-se sempre elevada nos três tempos de análises, alcançando seu pico de expressão 72hr após inoculação do antígeno em ambas as raças. Após 72 hr os Nelores sofrem um aumento importante da expressão gênica relativa quando comparado à expressão observada uma hora após o inoculo do extrato de larva, mas a diferença não é significativa ( $P=0,08$ ; teste  $t$ ). Na reação tardia que ocorre 96hr após o tratamento, os animais HPBs sofrem uma redução importante, embora não significativa ( $P=0,06$  teste  $t$ ), dos níveis de TNF- $\alpha$  quando comparado aos índices encontrados no tempo de 72hr. Em nenhum dos tempos estudados foi observada uma diferença significativa de expressão de TNF- $\alpha$  entre as raças (Figura 11 e Tabela 11).

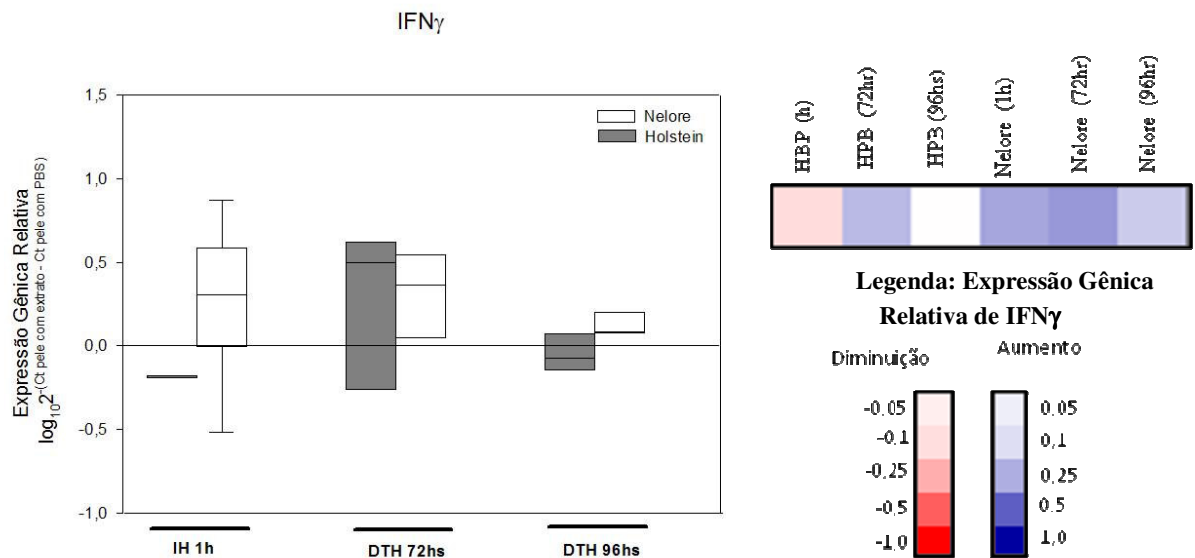
A expressão de IL-6 mostrou-se muito semelhante em ambas as raças, atingindo um pico da expressão relativa durante a reação imediata, e diminuindo após 72hr, porém sem

diferenças significativas entre os tempos e entre os grupos (Figura 12 e Tabela 12). A expressão do gene codificante de IL-6 foi significativamente maior ( $P=0,05$ ; teste *t*) na pele tratada com extrato do que na pele tratada com PBS apenas na pele de Nelores tratada com extratos 1h após o estímulo (Ct para pele tratada com PBS após 1 h:  $26 \pm 1,5$ ; Ct para pele tratada com extrato após 1 hora:  $24,2 \pm 1,0$ ).

Animais resistentes ao carrapato expressam mais IL-17 na reação tardia, mas não houve diferença significativa na expressão entre os dois grupos de animais em nenhum dos tempos examinados (Figura 13 Tabela 13).

Em resumo, os resultados aqui obtidos sugerem que Nelores tendem a expressar maiores níveis de citocinas pró-inflamatórias na pele tratada com extrato de larva, enquanto HPB tem uma tendência a inibi-las durante a formação da resposta tardia.





**Figura 10** – Níveis da Expressão Gênica Relativa de IFN $\gamma$  na Pele de Bovinos Susceptíveis e Resistentes 1h, 72hr e 96hr após inoculação de extrato de larvas de *B. microplus* não alimentadas. Resultados de PCR em Tempo Real representados pelas médias do DCt.

**Tabela 10.** Efeito do Extrato de larva de *B. microplus* na Expressão Gênica Relativa de IFN $\gamma$  na pele de Bovinos Susceptíveis e Resistentes a Infestações com o carrapato *B. microplus*. Média dos DCt  $\pm$  DP nos tempos de 1h, 72hr e 96hr após tratamento.

Tempo de Inoculação	Expressão Relativa de IFN $\gamma$ (DDC't $\pm$ DP)		
	1h	72hr	96hr
<b>Fenótipo</b>			
<b>Susceptível (HPB)</b>	<b>-0.1851</b> <b><math>\pm</math> 0.0109</b>	<b>0.2152</b> <b><math>\pm</math> 0.6363</b>	<b>-0.0381</b> <b><math>\pm</math> 0.1704</b>
<b>Resistente (Nelore)</b>	<b>0.2613</b> <b><math>\pm</math> 0.5083</b>	<b>0.2954</b> <b><math>\pm</math> 0.3821</b>	<b>0.1320</b> <b>0.0944</b>

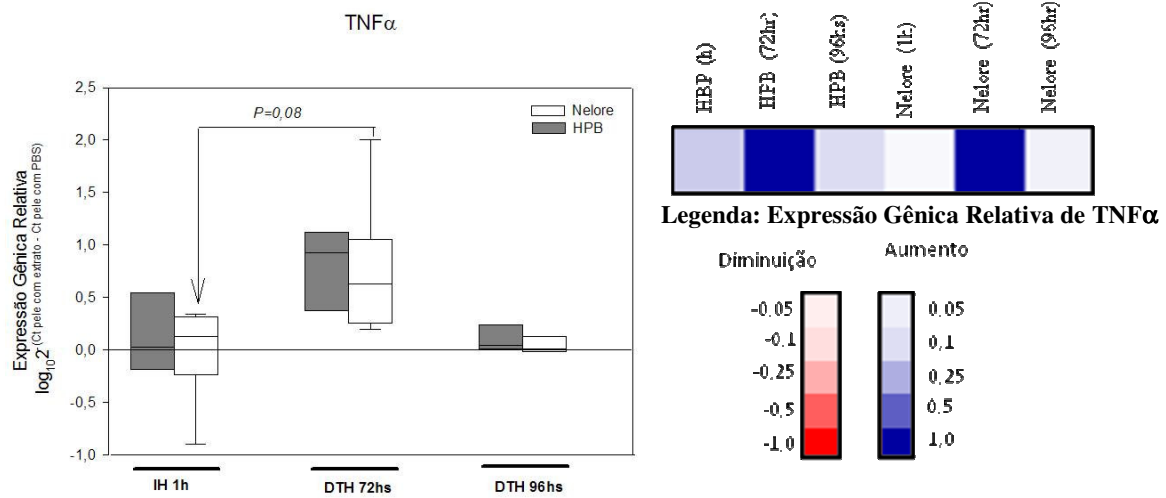
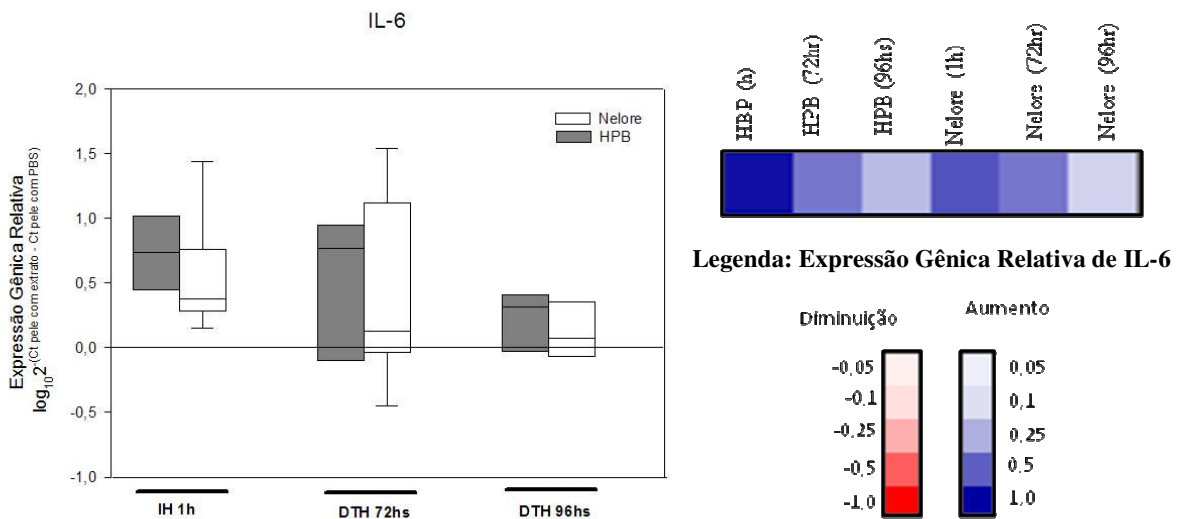


Figura 11 – Níveis da Expressão Gênica Relativa de TNF $\alpha$  na Pele de Bovinos Susceptíveis e Resistentes 1h, 72hr e 96hr após inoculação de extrato de larvas de *B. microplus* não alimentadas. Resultados de PCR em Tempo Real representados pelas médias do DCt.

Tabela 11 - Efeito do Extrato de larva de *B. microplus* na Expressão Gênica Relativa de TNF $\alpha$  na pele de Bovinos Susceptíveis e Resistentes a Infestações com o carrapato *B. microplus*. Média dos DCt  $\pm$  DP nos tempos de 1h, 72hr e 96hr após tratamento.

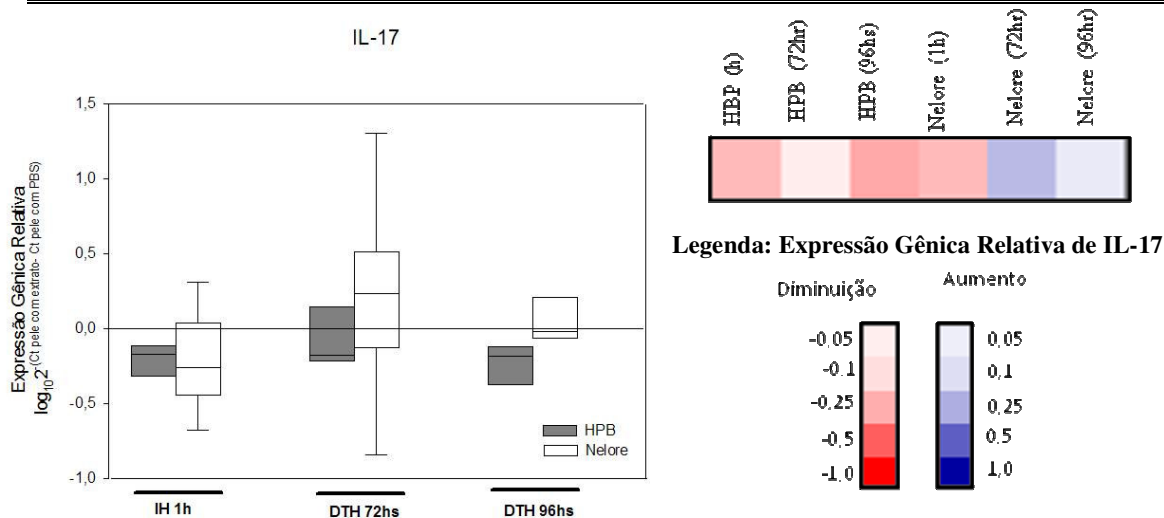
Tempo de Inoculação	Expressão Relativa de TNF $\alpha$ (DCt $\pm$ DP)		
	1h	72hr	96hr
<b>Fenótipo</b>			
<b>Susceptível (HPB)</b>	0,1570 $\pm$ 0,4993	0,7636 $\pm$ 0,5151	0,1204 $\pm$ 0,1989
<b>Resistente (Nelore)</b>	-0,0295 $\pm$ 0,5056	0,7661 $\pm$ 0,7267	0,0452 $\pm$ 0,1030



**Figura 12 – Níveis da Expressão Gênica Relativa de IL-6 na Pele de Bovinos Susceptíveis e Resistentes 1h, 72hr e 96hr após inoculação de extrato de larvas de *B. microplus* não alimentadas.** Resultados de PCR em Tempo Real representados pelas médias do DCt.

**Tabela 12. Efeito do Extrato de larva de *B. microplus* na Expressão Gênica Relativa de IL-6 na pele de Bovinos Susceptíveis e Resistentes a Infestações com o carrapato *B. microplus*.** Média dos DCt ± DP nos tempos de 1h, 72hr e 96hr após tratamento.

Tempo de Inoculação	Expressão Relativa de IL-6 (DDCt ± DP)		
	1h	72hr	96hr
<b>Fenótipo</b>			
<b>Susceptível (HPB)</b>	0,7340 ± 0,3771	0,4621 ± 0,7478	0,1912 ± 0,3566
<b>Resistente (Nelore)</b>	0,5647 ± 0,5074	0,4600 ± 0,7922	0,1350 ± 0,2874



**Figura 13 – Níveis da Expressão Gênica Relativa de IL-17 na Pele de Bovinos Susceptíveis e Resistentes 1h, 72hr e 96hr após inoculação de extrato de larvas de *B. microplus* não alimentadas.** Resultados de PCR em Tempo Real representados pelas médias do DCt.

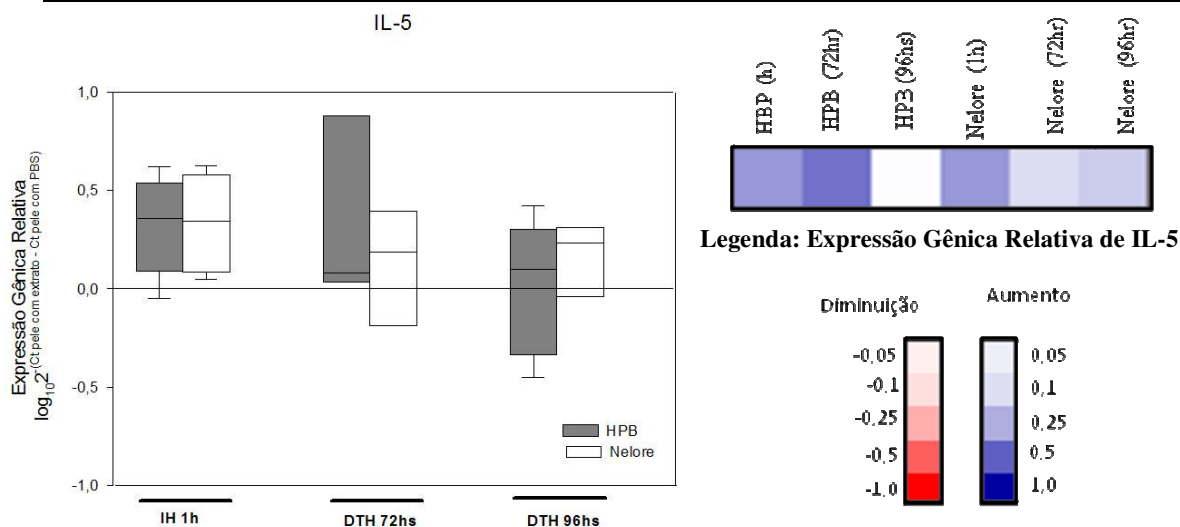
**Tabela 13. Efeito do Extrato de larva de *B. microplus* na Expressão Gênica Relativa de IL-17 na pele de Bovinos Susceptíveis e Resistentes a Infestações com o carrapato *B. microplus*.** Média dos DCt ± DP nos tempos de 1h, 72hr e 96hr após tratamento.

Tempo de Inoculação	Expressão Relativa de IL-17 (DCt ± DP)		
	1h	72hr	96hr
<b>Fenótipo</b>			
<b>Susceptível (HPB)</b>	<b>-0.2147 ± 0.1409</b>	<b>-0.0552 ± 0.2654</b>	<b>-0.2510 ± 0.1946</b>
<b>Resistente (Nelore)</b>	<b>-0.2137 ± 0.3673</b>	<b>0.2085 ± 0.7597</b>	<b>0.0582 ± 0.1958</b>

Embora outros hospedeiros susceptíveis ao carrapato desenvolvam um padrão Th2 de resposta e bovinos resistentes tendam a expressarem mais citocinas do padrão Th1 na pele tratada com extrato (principalmente de IFN $\gamma$  no desenvolvimento da reação tardia como mostrado anteriormente), o padrão celular do infiltrado inflamatório elicitado pelo extrato de larva é constituído de células de padrão Th2, ou seja, basófilos e eosinófilos. Sendo assim, a expressão de genes codificantes de citocinas anti-inflamatórias foi investigada.

Durante a reação imediata a expressão de IL-5 foi maior em pele tratada de animais HPBs e os níveis mantiveram-se elevados até 72 hr após o tratamento com extrato de larva, mas os 96hr a expressão já declinava. A expressão de IL-5 em pele tratada de Nelores mostrou-se maior na pele normal, porém sem variações da expressão gênica relativa nos três períodos de observação. Embora sem diferenças significativas, os níveis de expressão relativa foram sempre menores quando comparados com os níveis presentes nos HPBs no mesmo período (Figura 14 Tabela 14). A expressão do gene codificante de IL-5 foi significativamente maior ( $P=0,03$  teste  $t$ ) na pele tratada com extrato do que na pele tratada com PBS apenas na pele de Nelores tratada com extratos 1h após o estímulo (Ct para pele tratada com PBS após 1 h:  $35,6 \pm 0,5$ ; Ct para pele tratada com extrato após 1 hora:  $34,5 \pm 0,7$ ). A expressão de IL-10 nos tempos analisados seguiu um perfil muito semelhante em ambas as raças. A expressão relativa de IL-10 em uma mesma raça e em um mesmo período sempre se manteve aumentada, não havendo, portanto, pontos de inibição da expressão de IL-10, apenas redução do aumento relativo entre um tempo e outro na mesma espécie (Figura 15 e Tabela 15). A expressão do gene codificante de IL-10 foi significativamente maior ( $P=0,03$  teste  $t$ ) na pele tratada com extrato do que na pele tratada com PBS apenas na pele de Nelores tratada com extratos 72hr após o estímulo (Ct para pele tratada com PBS após 1 h:  $30,8 \pm 1,7$ ; Ct para pele tratada com extrato após 72 hr:  $28,0 \pm 1,4$ ).

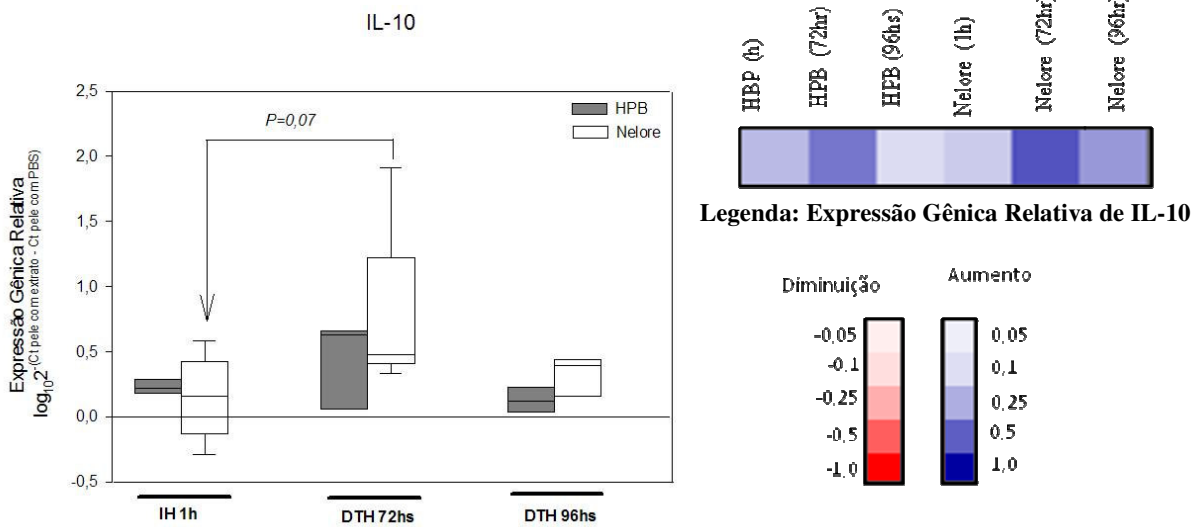
A expressão relativa de TGF- $\beta$  demonstrou-se sempre elevada na pele tratada com extrato de larva em ambas as raças, com exceção da reação imediata observada em Nelores, que apresentaram uma redução da sua expressão quando comparada à pele normal, alcançando seu pico de expressão no tempo de 72hr após inoculação do antígeno. Embora os HPBs tenham apresentado maior expressão desta citocina após 72hr de contato com os antígenos, não houve diferenças significativas em relação a outros tempos de análise dentro da mesma raça e tampouco em relação ao mesmo tempo na raça Nelore. Esta, apesar de apresentar uma menor expressão de TGF- $\beta$  exibiu um aumento significativo da expressão relativa no tempo de 72hr quando comparada à reação imediata no mesmo grupo ( $P=0,03$  teste  $t$ , Figura 16 Tabela 16).



**Figura 14–** Níveis da Expressão Gênica Relativa de IL-5 na Pele de Bovinos Susceptíveis e Resistentes 1h, 72hr e 96hr após inoculação de extrato de larvas de *B. microplus* não alimentadas. Resultados de PCR em Tempo Real representados pelas médias do DCt.

**Tabela 14.** Efeito do Extrato de larva de *B. microplus* na Expressão Gênica Relativa de IL-5 na pele de Bovinos Susceptíveis e Resistentes a Infestações com o carrapato *B. microplus*. Média dos DCt  $\pm$  DP nos tempos de 1h, 72hr e 96hr após tratamento.

Tempo de Inoculação	Expressão Relativa de IL-5 (DDCt $\pm$ DP)		
	1h	72hr	96hr
<b>Fenótipo</b>			
<b>Susceptível (HPB)</b>	0,3140 $\pm$ 0,2743	0,4129 $\pm$ 0,6313	6,6227e-3 $\pm$ 0,3685
<b>Resistente (Nelore)</b>	0,3350 $\pm$ 0,2624	0,1129 $\pm$ 0,3933	0,1465 $\pm$ 0,2461

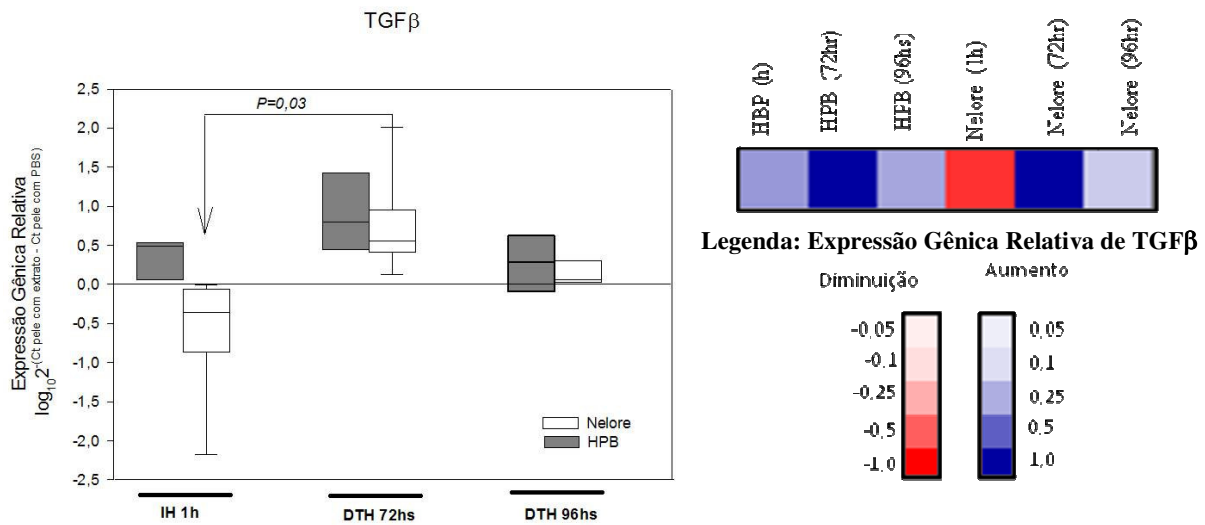


**Figura 15 – Níveis da Expressão Gênica Relativa de IL-10 na Pele de Bovinos Susceptíveis e Resistentes 1h, 72hr e 96hr após inoculação de extrato de larvas de *B. microplus* não alimentadas.** Resultados de PCR em Tempo Real representados pelas médias do DCt.

**Tabela 15. Efeito do Extrato de larva de *B. microplus* na Expressão Gênica Relativa de IL-10 na pele de Bovinos Susceptíveis e Resistentes a Infestações com o carrapato *B. microplus*.** Média dos DCt ± DP nos tempos de 1h, 72hr e 96hr após tratamento.

Tempo de Inoculação	Expressão Relativa de IL-10 (DDCt ± DP)		
	1h	72hr	96hr
<b>Fenótipo</b>			
<b>Susceptível (HPB)</b>	<b>0,2318 ± 0,0745</b>	<b>0,3893 ± 0,4549</b>	<b>0,1283 ± 0,1119</b>
<b>Resistente (Nelore)</b>	<b>0,1496 ± 0,3482</b>	<b>0,8278 ± 0,6566</b>	<b>0,3106 ± 0,1998</b>





**Figura 16 – Níveis da Expressão Gênica Relativa de TGF-β na Pele de Bovinos Susceptíveis e Resistentes 1h, 72hr e 96hr após inoculação de extrato de larvas de *B. microplus* não alimentadas.** Resultados de PCR em Tempo Real representados pelas médias do DCt.

**Tabela 16. Efeito do Extrato de larva de *B. microplus* na Expressão Gênica Relativa de TGFβ na pele de Bovinos Susceptíveis e Resistentes a Infestações com o carrapato *B. microplus*.** Média dos DCt ± DP nos tempos de 1h, 72hr e 96hr após tratamento.\*: Diferença Significativa da Expressão Gênica Relativa na reação tardia de 72hr em relação à reação imediata de 1h após tratamento com extrato relação (*P=0,03*).

Tempo de Inoculação	Expressão Relativa de TGFβ (DDCt ± DP)		
	1h	72hr	96hr
<b>Fenótipo</b>			
<b>Susceptível (HPB)</b>	<b>0,3196 ± 0,3442</b>	<b>0,9186 ± 0,6610</b>	<b>0,2623 ± 0,4221</b>
<b>Resistente (Nelore)</b>	<b>-0,6126 ± 0,8934</b>	<b>0,7604 ± 0,7267 *</b>	<b>0,1535 ± 0,1988</b>

#### **4.1.3 Cinética da Expressão das Enzimas IDO e iNOS na Pele de Bovinos Resistentes e Susceptíveis à Infestação pelo *B. microplus*. Após Tratamento com Antígenos de Extrato de larva de *B. microplus* não- Alimentadas.**

O nível de expressão de IDO (Indoleamina 2,3 deoxigenase) foi avaliado devido ao fato da enzima estar diretamente relacionada à degradação do triptofano (aminoácido essencial para proliferação celular). O triptofano quando metabolizado pela IDO gera quinureninas que estimulam a apoptose de células Th1, mas não Th2 (Terness e al., 2002). O eosinófilo, célula abundante no infiltrado celular da pele de Nelores tratada com extrato de larva, é a principal fonte do IDO, cuja a expressão é induzida pelo IFN- $\gamma$  (Odemuyiwa, et al. 2004).

O iNOS (óxido nítrico sintase induzida) está envolvido na produção de NO, metabólito que devido à sua ação oxidante é potencialmente tóxico para os carrapatos. Com efeito, macrófagos de camundongos, que são hospedeiros susceptíveis a infestações com carrapatos, têm a produção de NO inibida quando são tratados com saliva de carrapatos (Ferreira et al, 1999). Sendo assim, verificamos sua participação na resposta local frente a antígenos do *B. microplus*.

A expressão relativa do IDO mostrou-se praticamente constante em todos os tempos estudados nos animais HPBs, exibindo um nível de expressão sempre maior na pele tratada com extrato de larva. A expressão relativa de IDO em Nelores aumentou no decorrer da reação tardia de 72hr e 96hr ( $P=0,09$ ; teste *t*) e foi sempre maior quando comparada aos níveis de expressão exibidos por HPBs nos mesmos tempos de estudo (Figura 17 e Tabela 17).

A expressão de iNOS nos HPBs foi sempre inibida na pele tratada com extrato de larva nos três tempos estudados. Os Nelores exibiram uma expressão de iNOS maior na pele tratada com extrato de larva 1h e 72hr após o desafio, sendo que com 72hr ocorre uma diferença importante nos níveis de expressão relativa quando comparados aos níveis exibidos por HPBs

---

no mesmo tempo ( $P=0,09$  teste  $t$ ; Figura 18 e Tabela 18). A expressão do gene codificante de iNOS foi inibida ( $P=0,07$  ; teste  $t$ ) na pele tratada com extrato em comparação com a pele tratada com PBS apenas na pele de HPB 72hr após o estímulo (Ct para pele tratada com PBS após 1 h:  $26,8 \pm 1,5$ ; Ct para pele tratada com extrato após 72 hr:  $29,5 \pm 1,4$ ).

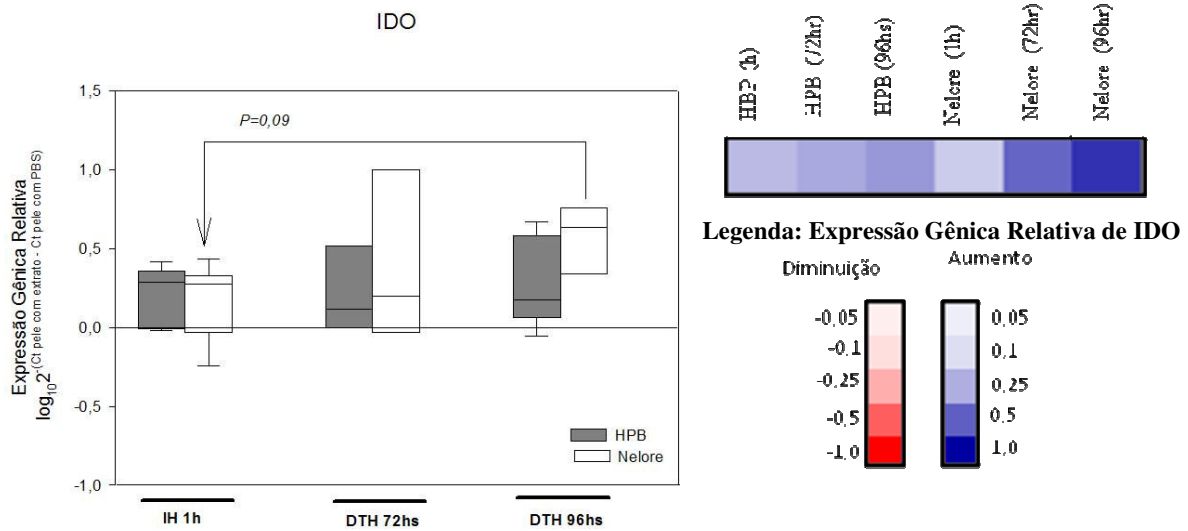


Figura 17 – Níveis da Expressão Gênica Relativa de IDO na Pele de Bovinos Susceptíveis e Resistentes 1h, 72hr e 96hr após inoculação de extrato de larvas de *B. microplus* não alimentadas. Resultados de PCR em Tempo Real representados pelas médias do DcT.

Tabela 17. Efeito do Extrato de larva de *B. microplus* na Expressão Gênica Relativa de IDO na pele de Bovinos Susceptíveis e Resistentes a Infestações com o carrapato *B. microplus*. Média dos DcT ± DP nos tempos de 1h, 72hr e 96hr após tratamento.

Tempo de Inoculação	Expressão Relativa de IDO(DcT ± DP)		
	1h	72hr	96hs
<b>Fenótipo</b>			
<b>Susceptível (HPB)</b>	0,2023 ± 0,2023	0,2413 ± 0,3603	0,2893 ± 0,3080
<b>Resistente (Nelore)</b>	0,1586 ± 0,2659	0,4520 ± 0,7207	0,5579 ± 0,2848

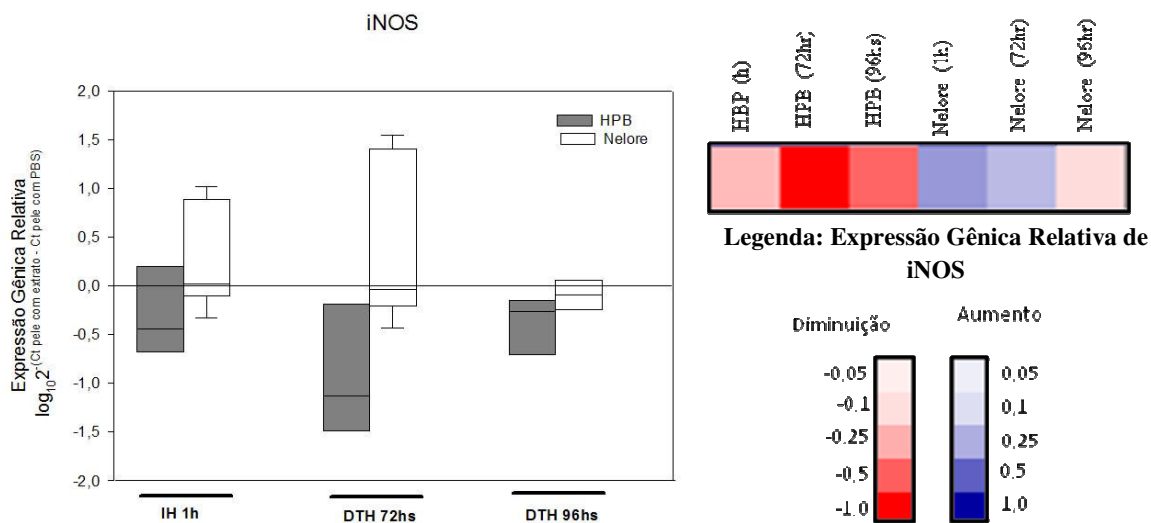


Figura 18 – Níveis da Expressão Gênica Relativa de iNOS na Pele de Bovinos Susceptíveis e Resistentes 1h, 72hr e 96hr após inoculação de extrato de larvas de *B. microplus* não alimentadas. Resultados de PCR em Tempo Real representados pelas médias do DCt.

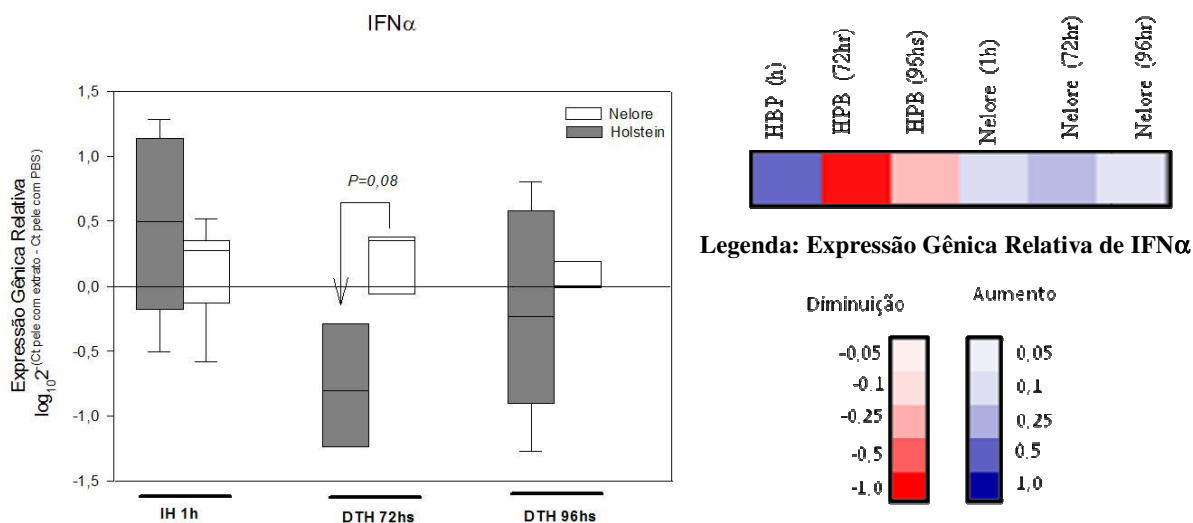
Tabela 18. Efeito do Extrato de larva de *B. microplus* na Expressão Gênica Relativa de iNOS na pele de Bovinos Susceptíveis e Resistentes a Infestações com o carrapato *B. microplus*. Média dos DCt ± DP nos tempos de 1h, 72hr e 96hr após tratamento.

Tempo de Inoculação	Expressão Relativa de iNOS (DCt ± DP)		
	1h	72hr	96hr
<b>Fenótipo</b>			
<b>Susceptível (HPB)</b>	-0,2619 ± 0,6067	-0,8680 ± 0,8924	-0,4305 ± 0,4319
<b>Resistente (Nelore)</b>	0,3058 ± 0,5890	0,4624 ± 0,9181	-0,0943 ± 0,1987

#### **4.1.4 Cinética da Expressão de IFN $\alpha$ e Endotelina-1 na Pele de Bovinos Resistentes e Susceptíveis a Infestação pelo *B. microplus* Após Tratamento com Antígenos de Extrato de larva de *B. microplus* não- Alimentadas.**

A expressão relativa de IFN- $\alpha$  na pele de Nelores mostrou-se constante nos três tempos de análise, sendo a expressão na pele tratada com extrato sempre maior quando comparada à pele que recebeu PBS. Os HPBs demonstraram forte oscilação na expressão relativa de IFN- $\alpha$  no decorrer dos tempos estudados, sendo fortemente expresso durante a reação imediata e inibida na formação da reação tardia de 72hr e 96hr após estímulo (Figura 19 e Tabela 19). Nelores apresentaram níveis relativos de expressão maiores 72hr após o tratamento da pele com extrato de larva quando comparados aos níveis exibidos por HPBs ( $P=0,08$  ; teste *t*).

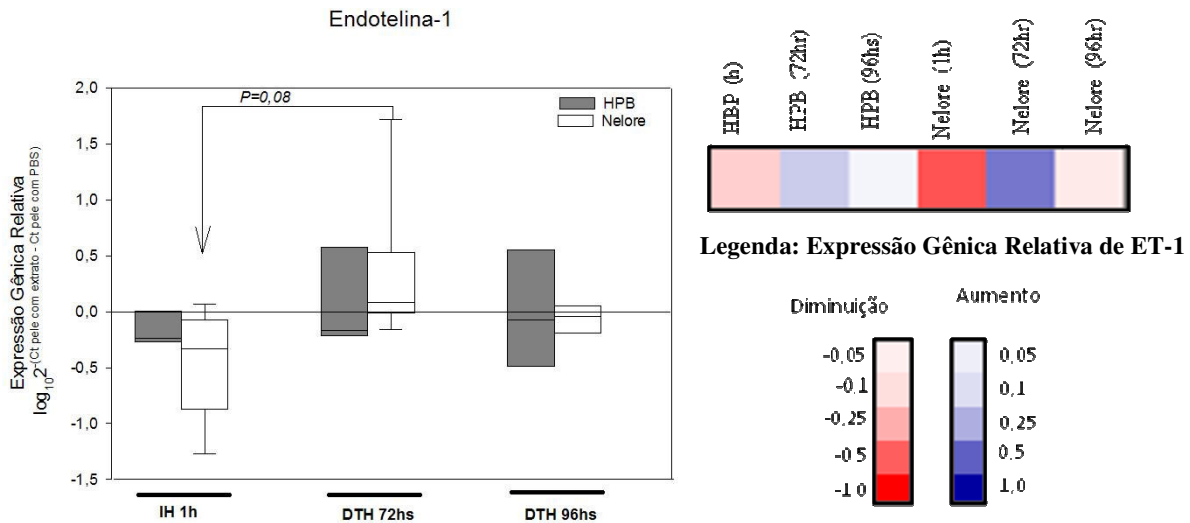
A ET-1 é um peptídeo sintetizado por vários tipos celulares em presença de estímulo inflamatório (Remuzzi et al., 2002) e caracteriza-se por sua ação vasoconstritora, mitogênica e antiapoptótica (Bagnato et al., 2004). A expressão relativa da ET-1 em HPBs foi praticamente inalterada nos três tempos de análises. Os Nelores exibiram um aumento da expressão relativa de ET-1 em 72hr pós estímulo, quando comparada à reação imediata do mesmo grupo ( $P=0,07$ ; teste *t*), seguido de queda da expressão relativa no tempo de 96hr após o estímulo (Figura 20, Tabela 20).



**Figura 19 – Níveis da Expressão Gênica Relativa de IFN $\alpha$  na Pele de Bovinos Susceptíveis e Resistentes 1h, 72hr e 96hr após inoculação de extrato de larvas de *B. microplus* não alimentadas. Resultados de PCR em Tempo Real representados pelas médias do DCt.**

**Tabela 19. Efeito do Extrato de larva de *B. microplus* na Expressão Gênica Relativa de IFN $\alpha$  na pele de Bovinos Susceptíveis e Resistentes a Infestações com o carrapato *B. microplus*. Média dos DCt  $\pm$  DP nos tempos de 1h, 72hr e 96hr após tratamento.**

Tempo de Inoculação	Expressão Relativa de IFN $\alpha$ (DDCt $\pm$ DP)		
	1h	72hr	96hr
<b>Fenótipo</b>			
<b>Susceptível (HPB)</b>	<b>0.4591 <math>\pm</math> 0.7548</b>	<b>-0.7681 <math>\pm</math> 0.6320</b>	<b>-0.1939 <math>\pm</math> 0.8641</b>
<b>Resistente (Nelore)</b>	<b>0.1054 <math>\pm</math> 0.4206</b>	<b>0.1816 <math>\pm</math> 0.3312</b>	<b>0.0793 <math>\pm</math> 0.1521</b>



**Figura 20– Níveis da Expressão Gênica Relativa de ET-1 na Pele de Bovinos Susceptíveis e Resistentes 1h, 72hr e 96hr após inoculação de extrato de larvas de *B. microplus* não alimentadas.** Resultados de PCR em Tempo Real representados pelas médias do DCt.

**Tabela 20. Efeito do Extrato de larva de *B. microplus* na Expressão Gênica Relativa de ET-1 na pele de Bovinos Susceptíveis e Resistentes a Infestações com o carrapato *B. microplus*.** Média dos DCt ± DP nos tempos de 1h, 72hr e 96hr após tratamento.

Tempo de Inoculação	Expressão Relativa de Endotelina 1 (DCt ± DP)		
	1h	72hr	96hr
<b>Fenótipo</b>			
<b>Susceptível (HPB)</b>	-0,1435 ± 0,1970	0,1410 ± 0,5906	0,0324 ± 0,6621
<b>Resistente (Nelore)</b>	-0,4795 ± 0,5318	0,3603 ± 0,7667	-0,0682 ± 0,1599



## **4.2. Quantificação Relativa da Expressão de Genes em Pele de Bovinos Susceptíveis e Resistentes Infestados Naturalmente com Fêmeas Ingurgitadas de *B. microplus*.**

Uma vez determinada a expressão relativa de genes em pele bovina submetida ao tratamento com extrato de larva de *B. microplus*, passou-se a quantificar a expressão relativa de genes em pele de bovinos susceptíveis e resistentes contendo carrapatos adultos afixados que foram adquiridos durante uma infestação natural. Esse estudo visava identificar os componentes da resposta imune induzidos não somente por antígenos solúveis do carrapato, mas aqueles induzidos pelo trauma causado pela picada do parasita. A fim de verificar se a intensidade da infestação modulava a expressão de genes, a pele estudada foi obtida de animais sofrendo infestações de diferentes intensidades.

### **4.2.1. Quantificação relativa da expressão de Genes Codificantes de Quimiocinas em Pele de Bovinos Resistentes e Susceptíveis ao *B. microplus* infestada com carrapatos adultos**

O nível de expressão de genes codificantes de quimiocinas foi avaliado com o objetivo de elucidar os possíveis mecanismos utilizados pelos hospedeiros bovinos no recrutamento de células que participam na elaboração dos diferentes tipos de resposta imune de bovinos expostos a diferentes níveis de infestação por carrapatos adultos de *B. microplus*.

A expressão relativa de MCP-1 mostrou-se diminuída em ambas as raças no período de baixa infestação. Na média infestação, Nelores ( $P=0,007$ ; teste *t*) e HPBs ( $P=0,005$ ; teste *t*) demonstraram um aumento significativo da expressão relativa quando comparado aos índices de expressão gênica do período anterior, porém sem diferenças entre as duas raças. Durante o período de alta infestação a expressão de MCP-1 diminuiu significativamente ( $P=0,03$  teste *t*) nos animais HPBs quando comparada à expressão observada no período de média infestação e Nelores expressaram significativamente ( $P=0,05$ ; teste *t*) mais MCP-1 que animais HPBs

(Figura 21 e Tabela 21). A expressão do gene codificante de MCP-1 foi significativamente maior na pele infestada do que na pele normal de Nelores ( $P=0,003$ ; teste  $t$ ; Ct para pele normal:  $25,7 \pm 0,7$ ; Ct para pele infestada:  $22,7 \pm 1,5$ ) e HPB ( $P=0,0006$ ; teste  $t$ ; Ct para pele normal:  $26,1 \pm 0,6$ ; Ct para pele infestada:  $23,7 \pm 0,6$ ) no período de média infestação e somente em Nelores quando em alta infestação ( $P=0,002$ ; teste  $t$ ; Ct para pele normal:  $22,5 \pm 0,6$ ; Ct para pele infestada:  $26,7 \pm 0,6$ ). Tomados em conjunto esses dados sugerem que infestações intensas com carrapatos adultos inibem a expressão de MCP-1 e que a capacidade maior ou menor de expressar MCP-1 talvez não seja geneticamente determinada.

A expressão relativa do gene codificante de IP-10 mostrou-se semelhante entre HPBs e Nelores no período de baixa infestação, com Nelores exibindo leve redução nos níveis de expressão na pele infestada quando comparada à pele normal. Durante o período de média infestação, Nelores demonstraram um aumento da expressão relativa quando comparado com os índices de expressão gênica do período anterior, enquanto HPB manifestaram uma inibição da expressão de IP-10 na pele infestada quando comparado à pele normal. No período de alta infestação, Nelores e HPB exibiram uma expressão relativa de IP-10 muito semelhante (Figura 22 e Tabela 22).

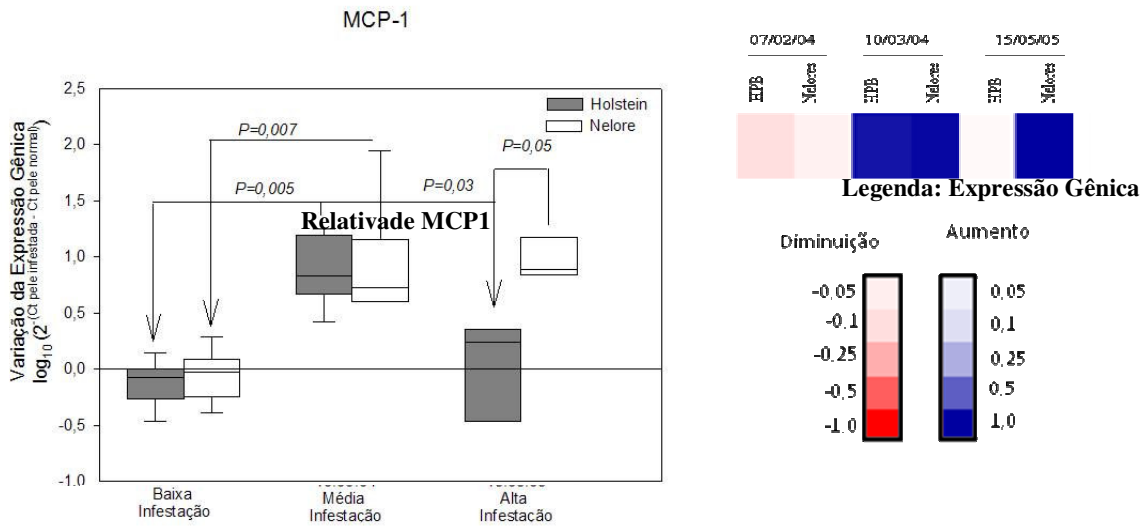
A expressão gênica relativa de IGF-1 mostrou-se semelhante entre HPBs e Nelores no período de baixa infestação, ambos exibindo níveis menores na pele infestada quando comparada à pele normal. Durante infestações médias a expressão de IGF-1 foi significativamente ( $P=0,01$ ; teste  $t$ ) maior em pele de Nelores quando comparada à expressão desse gene durante infestações baixas. Os níveis de expressão de IGF-1 neste período também foram significativamente ( $P=0,05$ ; teste  $t$ ) maiores em Nelores quando comparados aos níveis expressos em pele de animais HPBs. No período de alta infestação, ambas as raças exibiram uma diminuição da expressão de IGF-1 quando comparados aos valores obtidos no período de média infestação, porém os níveis manifestados por Nelores permaneceram maiores quando

comparados aos animais HPBs, os quais sofrem inibição da expressão de IGF-1 na pele infestada pelo artrópode (Figura 23 e Tabela 23). A expressão do gene codificante de IGF-1 foi significativamente maior ( $P=0,01$ ; teste  $t$ ) na pele infestada do que na pele normal na pele de Nelores quando em média infestação (Ct para pele normal:  $30,2 \pm 0,2$ ; Ct para pele infestada:  $28,7 \pm 0,9$ ).

A expressão gênica relativa de MIP1 $\alpha$  mostrou-se semelhante entre HPBs e Nelores no período de baixa infestação sendo que os níveis encontrados em HPBs eram ligeiramente maiores. No período seguinte, de média infestação, Nelores e holandeses apresentaram um aumento significativo (respectivamente  $P=0,003$  e  $P=0,03$ ; teste  $t$ ) da expressão relativa desse gene em relação aos índices de expressão observados no período anterior. Os níveis de expressão de MIP-1 $\alpha$  neste período foram maiores em Nelores quando comparados à expressão relativa exibida por HPBs, embora sem diferenças significativas. No período de alta infestação, ambas as raças exibiram uma diminuição da expressão de MIP1 $\alpha$  quando comparados aos valores obtidos no período de infestação média, tendo ocorrido uma diminuição significativa ( $P=0,003$ ; teste  $t$ ) da expressão relativa na pele dos HPBs, além da inibição da expressão gênica na pele infestada em relação àquela da pele normal. Os Nelores permaneceram com níveis significativamente ( $P=0,02$ ; teste  $t$ ) maiores quando comparados aos HPBs no mesmo período, como demonstrado na figura 24 e tabela 24. A expressão do gene codificante de MIP1 $\alpha$  foi significativamente maior na pele infestada do que na pele normal de Nelores ( $P=0,02$ ; teste  $t$ ; Ct para pele normal:  $36,2 \pm 1,7$ ; Ct para pele infestada:  $32,7 \pm 2,3$ ) e HPB ( $P=0,03$ ; teste  $t$ ; Ct para pele normal:  $32,7 \pm 1,;$  Ct para pele infestada:  $34,5 \pm 1,0$ ) no período de média infestação.

Durante o período de baixa infestação a expressão relativa do gene codificante de IL-8 foi maior em pele de animais HPBs quando comparada à sua expressão em pele de Nelores,

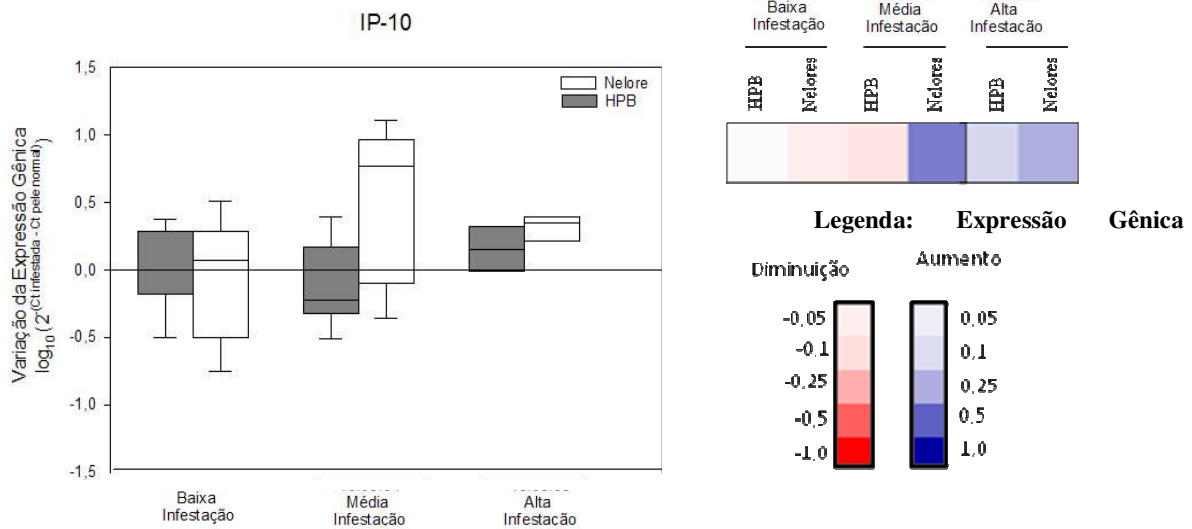
embora sem haver diferenças significativas entre os grupos. Durante o período de média infestação animais Nelores e HPB apresentaram um aumento significativo (respectivamente  $P=0,006$  e  $P=0,03$ ; teste  $t$ ) da expressão relativa da quimiocina quando comparado aos níveis de expressão no período anterior. No período de alta infestação HPBs sofrem uma diminuição significativa ( $P=0,04$ ; teste  $t$ ) da expressão relativa de IL-8 em relação ao período de média infestação (figura 25 e tabela 25). A expressão do gene codificante de MIP1 $\alpha$  foi significativamente maior na pele infestada do que na pele normal de Nelores ( $P=0,00008$ ; teste  $t$ , Ct para pele normal:  $29,7 \pm 0,7$ ; Ct para pele infestada:  $24,2 \pm 1,5$ ) e HPB ( $P=0,000003$  teste  $t$ ; Ct para pele normal:  $31,2 \pm 0,5$ ; Ct para pele infestada:  $25,2 \pm 1,0$ ) no período de média infestação e somente em Nelores quando em alta infestação ( $P=0,001$  teste  $t$ ; Ct para pele normal:  $26,9 \pm 0,8$ ; Ct para pele infestada:  $21,8 \pm 0,8$ ).



**Figura 21– Níveis de Expressão Relativa do Gene Codificante de MCP-1 na Pele de Bovinos Resistentes (Nelore) e Susceptíveis (HPB) Infestados com Fêmeas Ingurgitadas de *B. microplus* e Manejados em Pasto Apresentando Diferentes Níveis de Infestação..** Resultados de PCR em Tempo Real representados pelas médias do ΔCt.

**Tabela 21. Expressão Relativa do Gene Codificante de MCP-1 em Pele de Bovinos Resistentes e Susceptíveis Infestados com Fêmeas Ingurgitadas de *B. microplus* Manejados em Pasto Apresentando Diferentes Níveis de Infestação.** Média dos ΔCt nos diferentes níveis de infestação seguido do Desvio Padrão. **H=** Diferença significativa da expressão relativa de MCP-1 em HPBs quando comparado aos índices de expressão gênica do período anterior para mesma raça ( $P=0,005$ ) **H\*=** Diferença Significativa da Expressão Relativa de MCP-1 em HPBs no período de alta infestação quando comparado aos índices de expressão do período anterior para mesma raça ( $P=0,03$ ). **N=** Diferença Significativa da Expressão Relativa de MCP-1 em Nelores quando comparado aos índices de expressão do período anterior para mesma raça ( $P=0,007$ ). **R=** Diferença significativa entre a Expressão Relativa de MCP-1 em HPB e Nelores ( $P=0,05$ ).

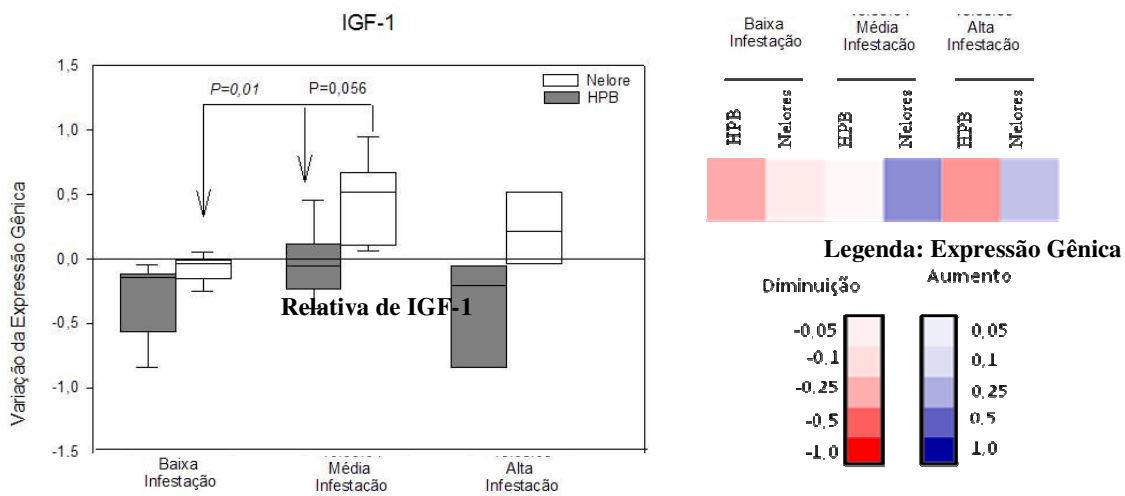
Níveis de infestação	Expressão Gênica MCP-1 (ΔCt) ± Desvio Padrão		
	Baixo	Médio	Alto
<b>Fenótipo</b>			
<b>Susceptível (HPB)</b>	-0.1240 ± 0,2231	0.8850 ± 0,3361 H	-0.0201 ± 0,5871 H'
<b>Resistente (Nelore)</b>	-0.0569 ± 0,2520	0.9513 ± 0,5659 N	0.9934 ± 0,2366 R



**Figura 22– Níveis de Expressão Relativa do Gene Codificante de IP-10 na Pele de Bovinos Resistentes (Nelore) e Susceptíveis (HPB) Infestados com Fêmeas Ingurgitadas de *B. microplus* e Manejados em Pasto Apresentando Diferentes Níveis de Infestação.. Resultados de PCR em Tempo Real representados pelas médias do DCt**

**Tabela 22. Expressão Relativa do Gene Codificante de IP-10 em Pele de Bovinos Resistentes e Susceptíveis Infestados com Fêmeas Ingurgitadas de *B. micropluse* Manejados em Pasto Apresentando Diferentes Níveis de Infestação. Média dos DCt nos diferentes níveis de infestação seguido do Desvio Padrão.**

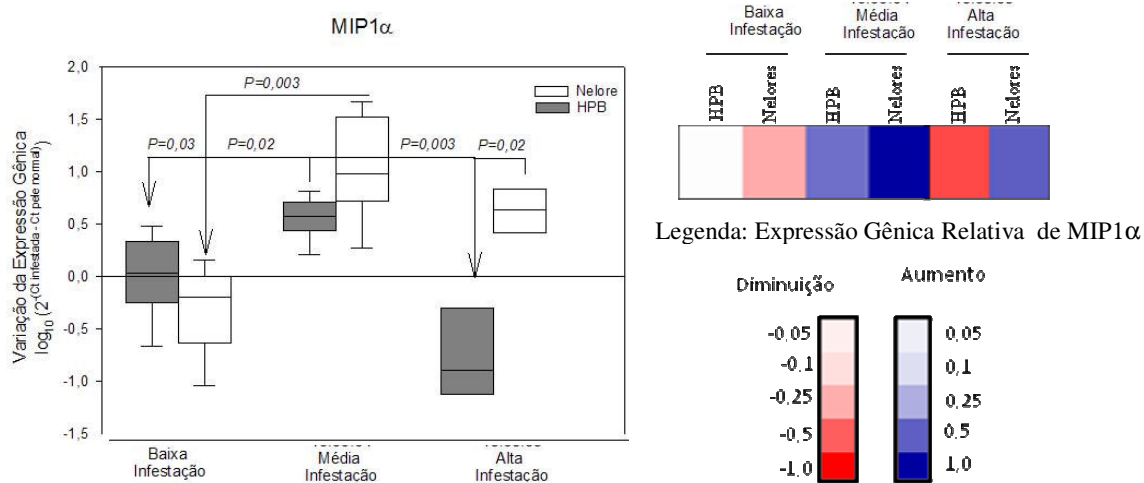
Níveis de infestação	Expressão Gênica IP-10 (DDC't) ± Desvio Padrão		
	Baixo	Médio	Alto
<b>Fenótipo</b>			
<b>Susceptível (HPB)</b>	<b>0.0108</b> ± 0.3351	<b>-0.1024</b> ± 0.3490	<b>0.1555</b> ± 0.2183
<b>Resistente (Nelore)</b>	<b>-0.0768</b> ± 0.5049	<b>0.4847</b> ± 0.6382	<b>0.3060</b> ± 0.1253



**Figura 23– Níveis de Expressão Relativa do Gene Codificante de IGF-1 na Pele de Bovinos Resistentes (Nelore) e Suscetíveis (HPB) Infestados com Fêmeas Ingurgitadas de *B. microplus* e Manejados em Pasto Apresentando Diferentes Níveis de Infestação..** Resultados de PCR em Tempo Real representados pelas médias do DCt

**Tabela 23. Expressão Relativa do Gene Codificante de IGF-1 em Pele de Bovinos Resistentes e Suscetíveis Infestados com Fêmeas Ingurgitadas de *B. microplus* Manejados em Pasto Apresentando Diferentes Níveis de Infestação.** Média dos DCt nos diferentes níveis de infestação seguido do Desvio Padrão. **N=** Diferença Significativa da Expressão Relativa de IGF-1 em Nelores quando comparado aos índices de expressão do período anterior para mesma raça ( $P=0,01$ ). **R=** Diferença significativa entre a Expressão Relativa de IGF-1 em HPB e Nelores ( $P=0,05$ )

Níveis de infestação	Expressão Gênica IGF-1 (DDCt) $\pm$ Desvio Padrão		
	Baixo	Médio	Alto
<b>Fenótipo</b>			
<b>Susceptível (HPB)</b>	<b>-0.3284</b> $\pm$ 0.3295	<b>-0.0361</b> $\pm$ 0.3110	<b>-0.4214</b> $\pm$ 0.5575
<b>Resistente (Nelore)</b>	<b>-0.0795</b> $\pm$ 0.1133	<b>0.4425</b> $\pm$ 0.3631 <b>R: N</b>	<b>0.2358</b> $\pm$ 0.3694

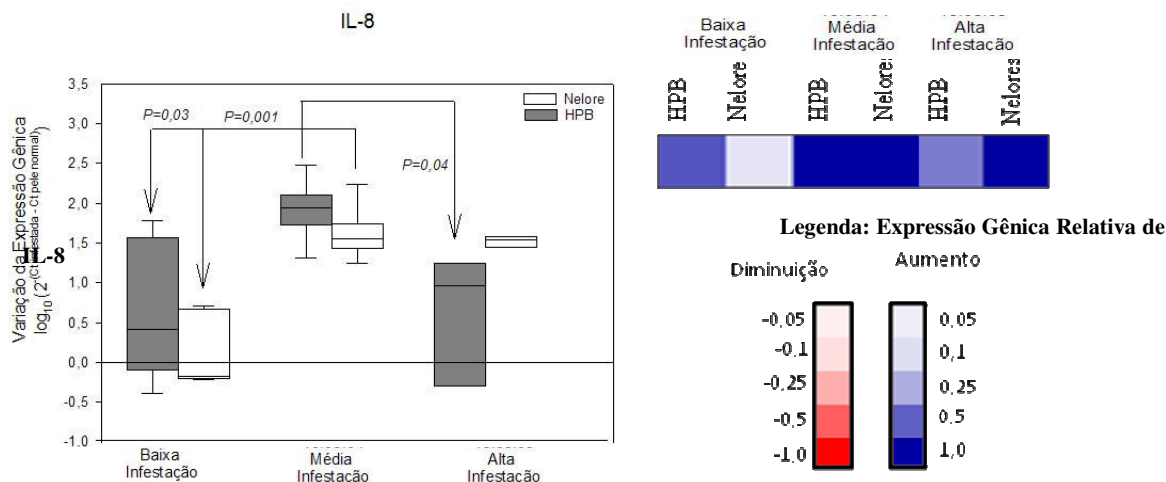


**Figura 24– Níveis de Expressão Relativa do Gene Codificante de MIP1 $\alpha$  na Pele de Bovinos Resistentes (Nelore) e Susceptíveis (HPB) Infestados com Fêmeas Ingurgitadas de *B. microplus* e Manejados em Pasto Apresentando Diferentes Níveis de Infestação.** Resultados de PCR em Tempo Real representados pelas médias do DCt.

**Tabela 24. Expressão Relativa do Gene Codificante de MIP1 $\alpha$  em Pele de Bovinos Resistentes e Susceptíveis Infestados com Fêmeas Ingurgitadas de *B. microplus* Manejados em Pasto Apresentando Diferentes Níveis de Infestação.** Média dos DCt nos diferentes níveis de infestação seguido do Desvio Padrão. **H=** Diferença significativa da expressão relativa de MIP-1 $\alpha$  em HPBs quando comparado aos índices de expressão gênica do período anterior para mesma raça ( $P=0,03$ ). **H\*=** Diferença Significativa da Expressão Relativa de MIP-1 $\alpha$  em HPBs no período de alta infestação quando comparado aos índices de expressão do período anterior para mesma raça ( $P=0,003$ ), **N=** Diferença Significativa da Expressão Relativa de MIP-1 $\alpha$  em Nelores quando comparado aos índices de expressão do período anterior para mesma raça ( $P=0,003$ ), **R=** Diferença significativa entre a Expressão Relativa de MIP-1 $\alpha$  em HPB e Nelores ( $P=0,02$ ).

Níveis de infestação	Expressão Gênica MIP1 $\alpha$ (DDCt) $\pm$ Desvio Padrão		
	Baixo	Médio	Alto
<b>Fenótipo</b>			
<b>Susceptível (HPB)</b>	5.7196e-3 $\pm$ 0.4368	0.5569 $\pm$ 0.2248 H	-0.7325 $\pm$ 0.5657 H'
<b>Resistente (Nelore)</b>	-0.3275 $\pm$ 0.4656	1.0536 $\pm$ 0.5498 N	0.6271 $\pm$ 0.2785 R





**Figura 25– Expressão Relativa do Gene Codificante de IL-8 em Pele de Bovinos Resistentes e Susceptíveis Infestados com Fêmeas Ingurgitadas de *B. microplus* e Manejados em Pasto Apresentando Diferentes Níveis de Infestação.** Resultados de PCR em Tempo Real representados pelas médias do DCt.

**Tabela 25. Expressão Relativa do Gene Codificante de IL-8 em Pele de Bovinos Resistentes e Susceptíveis Infestados com Fêmeas Ingurgitadas de *B. microplus* Manejados em Pasto Apresentando Diferentes Níveis de Infestação.** Média dos DCt nos diferentes níveis de infestação seguido do Desvio Padrão. **H=** Diferença significativa da expressão relativa de IL-8 em HPBs quando comparado aos índices de expressão gênica do período anterior para mesma raça ( $P=0,03$ ). **H\*=** Diferença Significativa da Expressão Relativa de IL-8 em HPBs no período de alta infestação quando comparado aos índices de expressão do período anterior para mesma raça ( $P=0,04$ ). **N=** Diferença Significativa da Expressão Relativa de IL-8 em Nelores quando comparado aos índices de expressão do período anterior para mesma raça ( $P=0,001$ ).

Níveis de infestação	Expressão Gênica IL-8 (DDCt) ± Desvio Padrão		
	Baixo	Médio	Alto
<b>Fenótipo</b>			
<b>Susceptível (HPB)</b>	0.6602 ± 0.9453	1.9158 H ± 0.4170	0.5268H' ± 1.0981
<b>Resistente (Nelore)</b>	0.1550 ± 0.4845	1.6226 N ± 0.3703	1.5152 ± 0.0920

#### **4.2.2 Quantificação relativa da expressão de Genes Codificantes de Citocinas Pró- e Anti-Inflamatórias na Pele de Bovinos Resistentes e Susceptíveis Expostos a Diferentes Níveis de Infestação Natural por Fêmeas Ingurgitadas de *B. microplus*.**

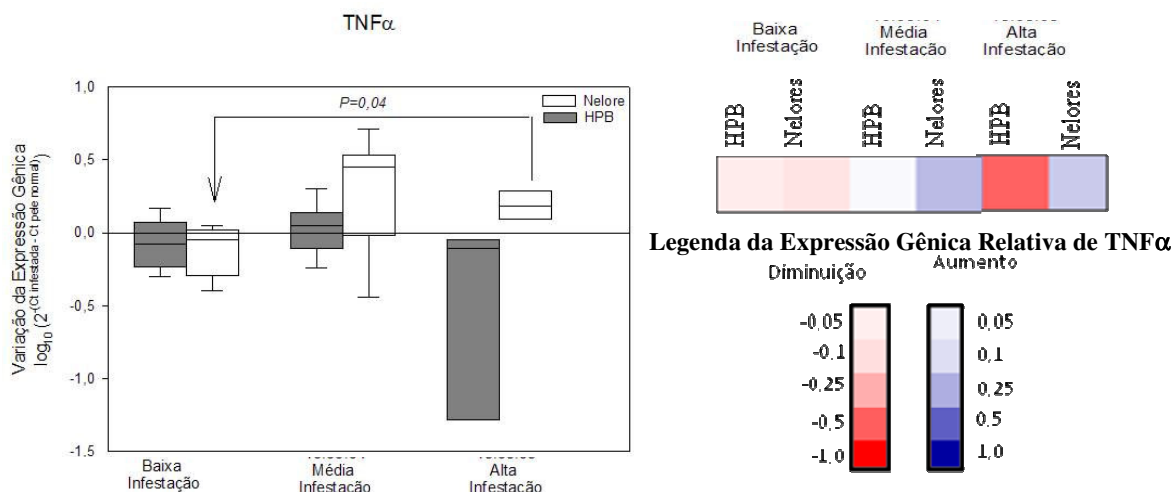
O nível de expressão de genes codificantes de citocinas pró-inflamatórias foi avaliado com o objetivo de elucidar a participação das citocinas pró-inflamatórias na elaboração de uma resposta imune eficiente de bovinos expostos a diferentes níveis de infestação por fêmeas ingurgitadas de *B. microplus*.

A expressão do gene de TNF $\alpha$  mostrou-se diminuída em ambas as raças no período de baixa infestação, quando comparada com as respectivas peles normais, porém sem diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Entretanto, nos períodos subsequentes de infestação, a pele de Nelores apresentou um aumento da expressão relativa quando comparada aos níveis de expressão gênica do período anterior, exibindo níveis sempre maiores em comparação aos HPBs. Na alta infestação, Nelores apresentaram uma maior expressão relativa de TNF $\alpha$  significativamente maior ( $P=0,04$ ; teste *t*) quando comparada aos níveis de TNF $\alpha$  exibidos por Nelores na baixa infestação (Figura 26 e Tabela 26).

A expressão relativa de IL-18 foi muito semelhante em ambas as raças para cada nível de infestação observado. Somente no período de alta infestação verificou-se uma sutil diferença da expressão relativa entre as raças, onde HPBs sofrem inibição da expressão de IL-18 na pele infestada. Nesse mesmo período, Nelores apresentam um aumento da expressão

relativa de TNF $\alpha$  quando comparado ao nível exibido na baixa infestação ( $P=0,06$  teste  $t$ ; Figura 27 e Tabela 27).

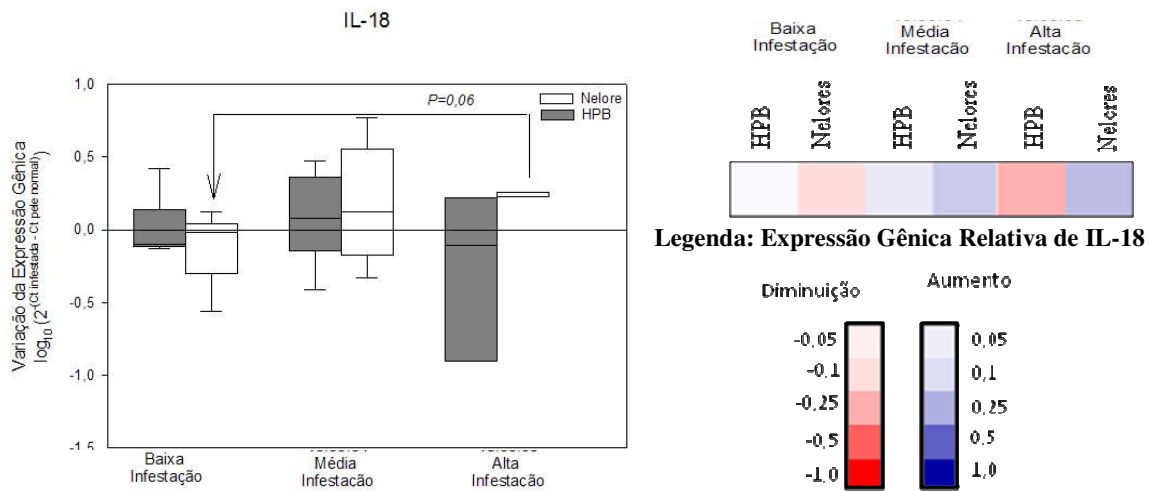
A expressão relativa de IFN $\gamma$  no período de média infestação foi maior em Nelores quando comparado aos níveis obtidos por HPB ( $P=0,04$ ; teste  $t$ ), os quais sofreram inibição da expressão de IFN $\gamma$  na pele infestada em ambos os períodos (Figura 28 e Tabela 28).



**Figura 26– Expressão Relativa do Gene Codificante de TNF $\alpha$  em Pele de Bovinos Resistentes e Susceptíveis Infestados com Fêmeas Ingurgitadas de *B. microplus* e Manejados em Pasto Apresentando Diferentes Níveis de Infestação.** Resultados de PCR em Tempo Real representados pelas médias do DCt.

**Tabela 26. Expressão Relativa do Gene Codificante de TNF $\alpha$  em Pele de Bovinos Resistentes e Susceptíveis Infestados com Fêmeas Ingurgitadas de *B. microplus* e Manejados em Pasto Apresentando Diferentes Níveis de Infestação.** Média dos DCt nos diferentes níveis de infestação seguido do Desvio Padrão. N= Diferença Significativa da Expressão Relativa de TNF $\alpha$  em Nelores quando comparado aos índices de expressão do período anterior para mesma raça ( $P=0,04$ ).

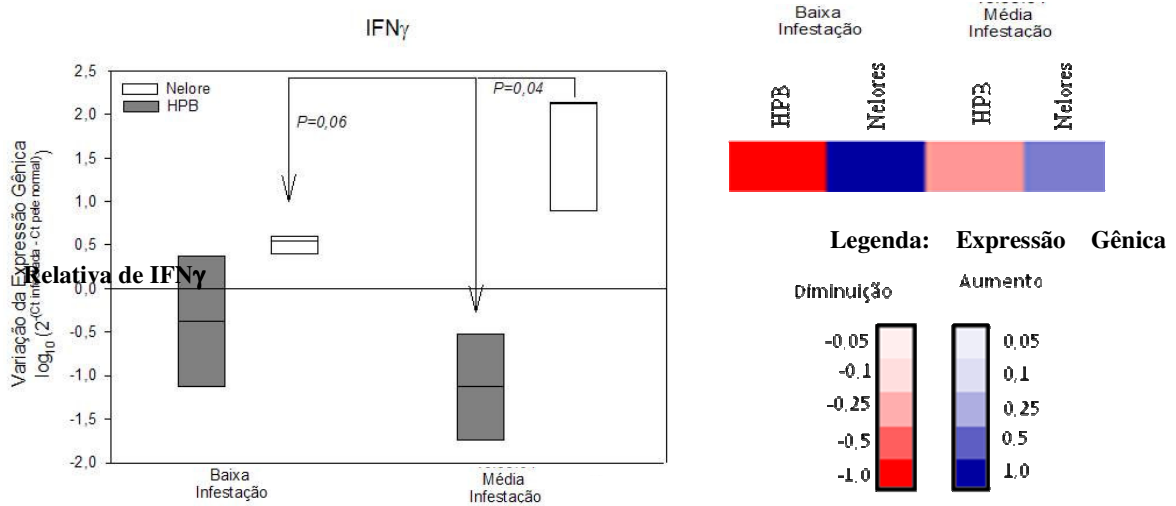
Níveis de infestação	Expressão Gênica TNF $\alpha$ (DCt) $\pm$ Desvio Padrão		
	Baixo	Médio	Alto
<b>Fenótipo</b>			
<b>Susceptível (HPB)</b>	<b>-0.0750</b> $\pm$ <b>0.1904</b>	<b>0.0241</b> $\pm$ <b>0.1981</b>	<b>-0.6021</b> $\pm$ <b>0.9262</b>
<b>Resistente (Nelore)</b>	<b>-0.1291</b> $\pm$ <b>0.1941</b>	<b>0.2619</b> $\pm$ <b>0.4428</b>	<b>0.1856N</b> $\pm$ <b>0.1280</b>



**Figura 27–** Expressão Relativa do Gene Codificante de IL-18 em Pele de Bovinos Resistentes e Susceptíveis Infestados com Fêmeas Ingurgitadas de *B. microplus* e Manejados em Pasto Apresentando Diferentes Níveis de Infestação. Resultados de PCR em Tempo Real representados pelas médias do DCt.

**Tabela 27.** Expressão Relativa do Gene Codificante de IL-18 em Pele de Bovinos Resistentes e Susceptíveis Infestados com Fêmeas Ingurgitadas de *B. microplus* e Manejados em Pasto Apresentando Diferentes Níveis de Infestação. Média dos DCt nos diferentes níveis de infestação seguido do Desvio Padrão. N= Diferença Significativa da Expressão Relativa de IL-18 em Nelores quando comparado aos índices de expressão do período anterior para mesma raça ( $P=0,05$ )

Níveis de infestação	Expressão Gênica IL-18 (DDCt) ± Desvio Padrão		
	Baixo	Médio	Alto
<b>Fenótipo</b>			
<b>Susceptível (HPB)</b>	0,0241 ± 0,2334	0,0813 ± 0,3423	-0,3161 ± 0,7744
<b>Resistente (Nelore)</b>	-0,1312 ± 0,2699	0,1836 ± 0,4448	0,2408 ± 0,0261



**Figura 28– Expressão Relativa do Gene Codificante de IFN $\gamma$  em Pele de Bovinos Resistentes e Susceptíveis Infestados com Fêmeas Ingurgitadas de *B. microplus* e Manejados em Pasto Apresentando Diferentes Níveis de Infestaco.** Resultados de PCR em Tempo Real representados pelas médias do DCt.

**Tabela 28. Expressão Relativa do Gene Codificante de IFN $\gamma$  em Pele de Bovinos Resistentes e Susceptíveis Infestados com Fêmeas Ingurgitadas de *B. microplus* e Manejados em Pasto Apresentando Diferentes Níveis de Infestaco.** Média dos DCt nos diferentes níveis de infestaco seguido do Desvio Padrão. **R=** Diferença significativa entre a Expressão Relativa de IFN $\gamma$  em HPB e Nelores ( $P=0,04$ ).

Níveis de infestaco	Expressão Gênica IFN $\gamma$ (DCt) $\pm$ Desvio Padrão	
	Médio	Baixo
<b>Fenótipo</b>		
<b>Susceptível (HPB)</b>	-1.1319 $\pm$ 0.8663	-0.3743 $\pm$ 1.0586
<b>Resistente (Nelore)</b>	1.5814 <b>R</b> $\pm$ 0.9433	0.4988 $\pm$ 0.1590

O nível de expressão de genes codificantes de citocinas anti-inflamatórias foi avaliado com o objetivo de elucidar sua participação na elaboração de uma resposta imune eficiente de bovinos expostos a diferentes níveis de infestação por fêmeas ingurgitadas de *B. microplus*.

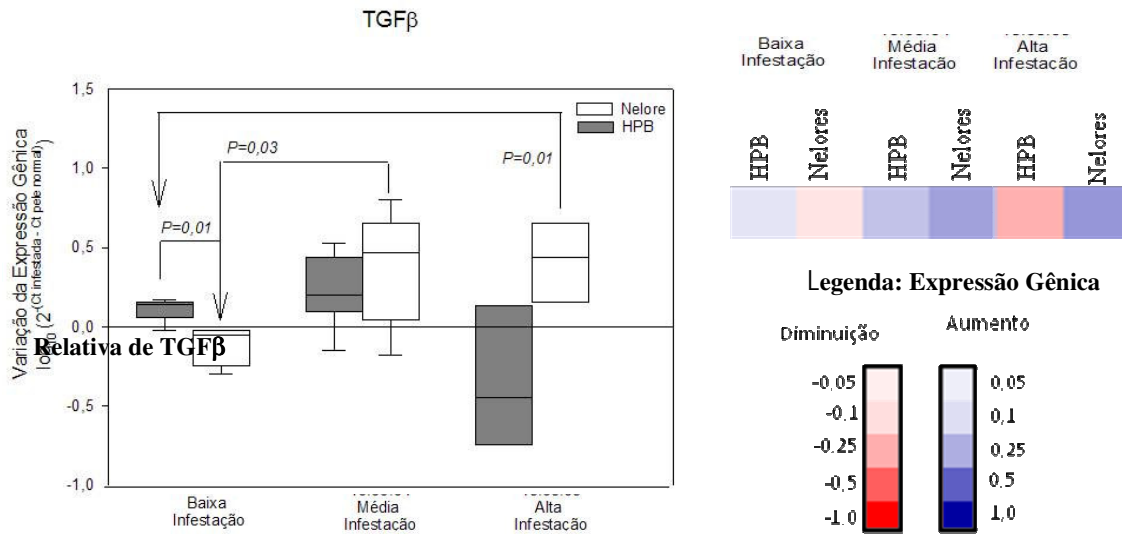
A expressão relativa de TGF- $\beta$  mostrou-se elevada em HPBs quando comparada aos níveis de expressão exibidos por Nelores na baixa infestação ( $P=0,01$ ; teste  $t$ ), os quais manifestaram uma redução da expressão gênica de TGF- $\beta$  na pele infestada por *B. microplus* quando comparado à sua pele normal. No período de média infestação, Nelores obtiveram uma recuperação significativa do nível de expressão relativa de TGF- $\beta$  em comparação ao período anterior ( $P=0,03$ ; teste  $t$ ). Quando expostos a alta infestação, a expressão relativa de TGF- $\beta$  sofreu um aumento em Nelores quando comparada aos níveis de expressão exibidos por HPBs, os quais manifestaram uma redução da expressão de TGF- $\beta$  na pele infestada por *B. microplus* em relação à sua pele normal (Figura 29 e Tabela 29). A expressão do gene codificante de TGF- $\beta$  foi significativamente maior na pele infestada do que na pele normal de Nelores ( $P=0,04$  teste  $t$ ; Ct para pele normal:  $29,5 \pm 0,7$ ; Ct para pele infestada:  $28,3 \pm 0,8$ ).

A expressão relativa de IL-4 mostrou-se elevada em HPBs ( $n=2$ ) quando comparada ao nível de expressão exibidos por Nelores ( $n=2$ ) no período de baixa infestação ( $P=0,02$ ; teste  $t$ ), o nível de expressão de IL-4 na pele infestada de Nelores foi menor quando comparado a pele normal. No período de média infestação seguinte, Nelores obtiveram uma recuperação significativa do nível de expressão relativa de IL-4 em comparação ao período anterior

( $P=0,03$ ; teste  $t$ ), com níveis semelhantes aos detectados nos HPB. No período de alta infestação, Nelores e HPBs apresentaram níveis semelhantes da expressão relativa de IL-4 (Figura 30 e Tabela 30). Na média infestação a expressão do gene codificante de IL-4 foi significativamente maior na pele infestada do que na pele normal de Nelores ( $P=0,007$  teste  $t$ ; Ct para pele normal:  $35,6 \pm 1,0$ ; Ct para pele infestada:  $32,7 \pm 1,6$ ) e HPB ( $P=0,02$ ; teste  $t$ , Ct para pele normal:  $36,1 \pm 1,7$ ; Ct para pele infestada:  $33,2 \pm 1,6$ ).

A expressão gênica relativa de IL-5 mostrou-se diminuída em HPBs nos três períodos de análise. No período de média infestação, Nelores demonstraram um aumento significativo da expressão relativa de IL-5 quando comparado ao período anterior ( $P=0,01$ ; teste  $t$ ), assim como um maior nível de expressão quando comparado aos exibidos por HPBs no mesmo período ( $P=0,02$ ; teste  $t$ ). No período de alta infestação, Nelores mantiveram uma maior expressão gênica relativa quando comparada com HPBs, porém sem diferenças significativas (Figura 31 e Tabela 31). Na média infestação a expressão do gene codificante de IL-5 foi significativamente maior na pele infestada do que na pele normal de Nelores ( $P=0,009$ ; teste  $t$ , Ct para pele normal:  $34,8 \pm 0,7$ ; Ct para pele infestada:  $32,5 \pm 1,3$ ).

A expressão gênica de IL-10 mostrou-se diminuída em ambas as raças no período de baixa infestação quando comparada às respectivas peles normais, porém sem diferenças significativas entre os grupos. No período de média e alta infestação Nelores apresentaram um aumento significativo (respectivamente  $P=0,04$  e  $P=0,006$ ; teste  $t$ ) no nível da expressão relativa quando comparado ao período de baixa infestação (Figura 32 e Tabela 32).

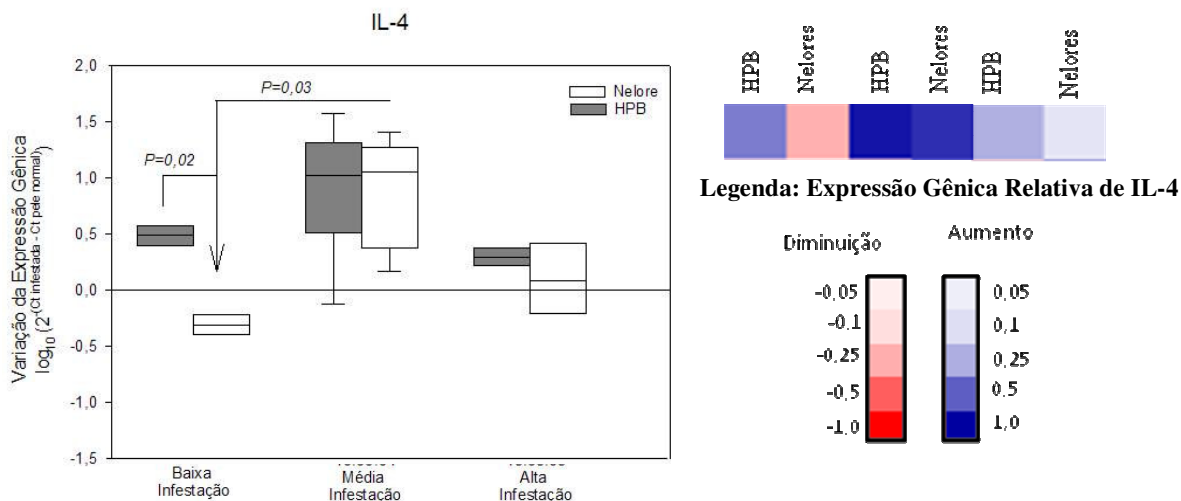


**Figura 29– Expressão Relativa do Gene Codificante de TGF-β em Pele de Bovinos Resistentes e Susceptíveis Infestados com Fêmeas Ingurgitadas de *B. microplus* e Manejados em Pasto Apresentando Diferentes Níveis de Infestação.** Resultados de PCR em Tempo Real representados pelas médias do DCt.

**Tabela 29. Expressão Relativa do Gene Codificante de TGF-β em Pele de Bovinos Resistentes e Susceptíveis Infestados com Fêmeas Ingurgitadas de *B. microplus* Manejados em Pasto Apresentando Diferentes Níveis de Infestação.** Média dos DCt nos diferentes níveis de infestação seguido do Desvio Padrão. **R=** Diferença significativa entre a Expressão Relativa de TGF-β em HPB e Nelores ( $P=0,01$ ). **N=** Diferença Significativa da Expressão Relativa de TGF-β em Nelores quando comparado aos índices de expressão do período anterior para mesma raça ( $P=0,03$ ). **N\*=** Diferença significativa da Expressão Gênica Relativa de TGF-β em Nelores na alta infestação quando comparado aos níveis de expressão gênica na baixa infestação para mesma raça ( $P=0,01$ ).

Níveis de infestação	Expressão Gênica TGFβ (DCt) ± Desvio Padrão		
	Baixo	Médio	Alto
<b>Fenótipo</b>			
<b>Susceptível (HPB)</b>	0.1033 ± 0.0752R	0.2327 ± 0.2599	-0.3211 ± 0.5978
<b>Resistente (Nelore)</b>	-0.1219 ± 0.1324	0.3612 N ± 0.3909	0.4064 N* ± 0.3322

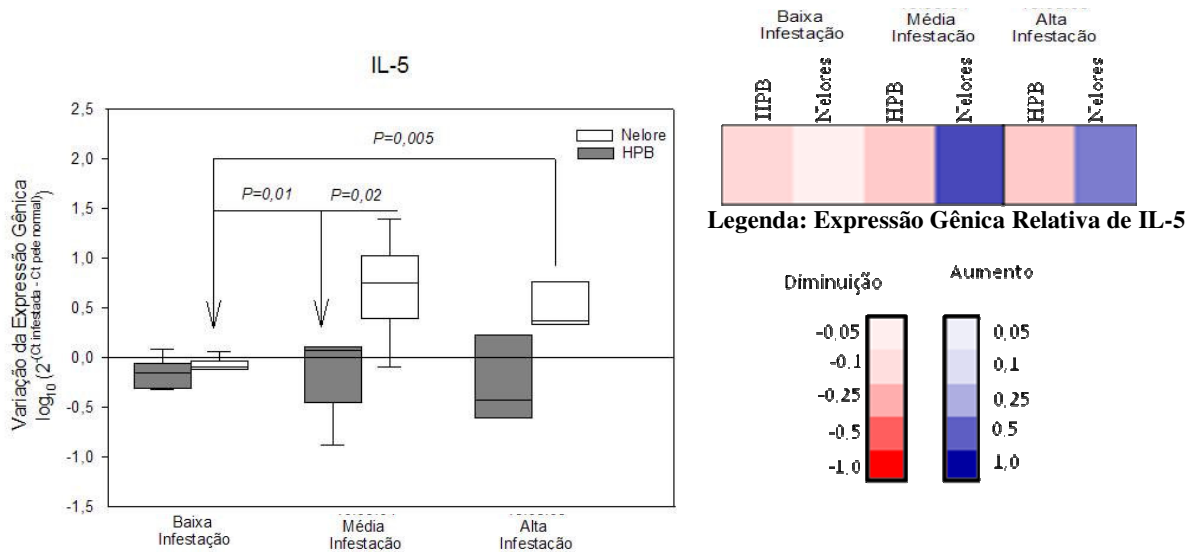




**Figura 30– Expressão Relativa do Gene Codificante de IL-4 em Pele de Bovinos Resistentes e Susceptíveis Infestados com Fêmeas Ingurgitadas de *B. microplus* e Manejados em Pasto Apresentando Diferentes Níveis de Infestação.** Resultados de PCR em Tempo Real representados pelas médias do DCt.

**Tabela 30. Expressão Relativa do Gene Codificante de IL-4 em Pele de Bovinos Resistentes e Susceptíveis Infestados com Fêmeas Ingurgitadas de *B. microplus* e Manejados em Pasto Apresentando Diferentes Níveis de Infestação.** Média dos DCt nos diferentes níveis de infestação seguido do Desvio Padrão. **R=** Diferença significativa entre a Expressão Relativa de IL-4 em HPB e Nelores ( $P=0,02$ ) **N=** Diferença Significativa da Expressão Relativa de IL-4 em Nelores quando comparado aos índices de expressão do período anterior para mesma raça ( $P=0,03$ ).

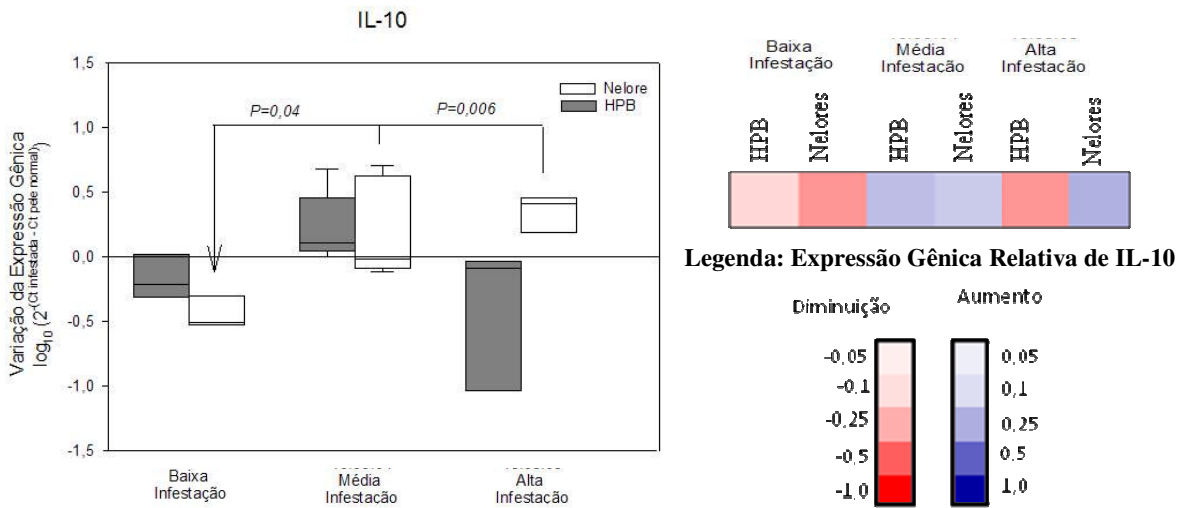
Níveis de infestação	Expressão Gênica IL-4(DDCt) ± Desvio Padrão		
	Baixo	Médio	Alto
<b>Fenótipo</b>			
<b>Susceptível (HPB)</b>	0.4914 ± 0.1245 R	0.8850 ± 0.6406	0.2960 ± 0.1057
<b>Resistente (Nelore)</b>	-0.3063 ± 0.1245	0.8640 ± 0.5325 N	0.1054 ± 0.4141



**Figura 31– Expressão Relativa do Gene Codificante de IL-5 em Pele de Bovinos Resistentes e Susceptíveis Infestados com Fêmeas Ingurgitadas de *B. microplus* e Manejados em Pasto Apresentando Diferentes Níveis de Infestação.** Resultados de PCR em Tempo Real representados pelas médias do DCt.

**Tabela 31. Expressão Relativa do Gene Codificante de IL-5 em Pele de Bovinos Resistentes e Susceptíveis Infestados com Fêmeas Ingurgitadas de *B. micropluse* Manejados em Pasto Apresentando Diferentes Níveis de Infestação.** Média dos DCt nos diferentes níveis de infestação seguido do Desvio Padrão. **R=** Diferença significativa entre a Expressão Relativa de IL-5 em HPB e Nelores ( $P=0,02$ ) **N=** Diferença Significativa da Expressão Relativa de IL-5 em Nelores quando comparado aos índices de expressão do período anterior para mesma raça ( $P=0,01$ ). **N\*=** Diferença significativa da Expressão Gênica Relativa de IL-5 em Nelores na alta infestação quando comparado aos níveis de expressão gênica na baixa infestação para mesma raça ( $P=0,005$ ).

Níveis de infestação	Expressão Gênica IL-5(DDCt) ± Desvio Padrão		
	Baixo	Médio	Alto
<b>Fenótipo</b>			
<b>Susceptível (HPB)</b>	<b>-0,1571</b> ± 0,1639	<b>-0,1806</b> ± 0,4263	<b>-0,2107</b> ± 0,5860
<b>Resistente (Nelore)</b>	<b>-0,0659</b> ± 0,0731	<b>0,7044 R: N</b> ± 0,5428	<b>0,5268N*</b> ± 0,3143



**Figura 32–** Expressão Relativa do Gene Codificante de IL-10 em Pele de Bovinos Resistentes e Susceptíveis Infestados com Fêmeas Ingurgitadas de *B. microplus* e Manejados em Pasto Apresentando Diferentes Níveis de Infestação. Resultados de PCR em Tempo Real representados pelas médias do DCt.

**Tabela 32.** Expressão Relativa do Gene Codificante de IL-10 em Pele de Bovinos Resistentes e Susceptíveis Infestados com Fêmeas Ingurgitadas de *B. microplus* Manejados em Pasto Apresentando Diferentes Níveis de Infestação. Média dos DCt nos diferentes níveis de infestação seguido do Desvio Padrão. N= Diferença Significativa da Expressão Relativa de IL-10 em Nelores quando comparado aos índices de expressão do período anterior para mesma raça ( $P=0,04$ ). N \* = Diferença significativa da Expressão Gênica Relativa de IL-10 em Nelores na alta infestação quando comparado aos níveis de expressão gênica em Baixa Infestação ( $P=0,006$ )

Níveis de infestação	Expressão Gênica IL-10 (DCt) ± Desvio Padrão		
	Baixo	Médio	Alto
<b>Fenótipo</b>			
<b>Susceptível (HPB)</b>	-0.1510 ± 0.2230	0.2438 ± 0.2819	-0.4867 ± 0.7526
<b>Resistente (Nelore)</b>	-0.4245 ± 0.1647	0.2231 N ± 0.3979	0.3311N' ± 0.1850

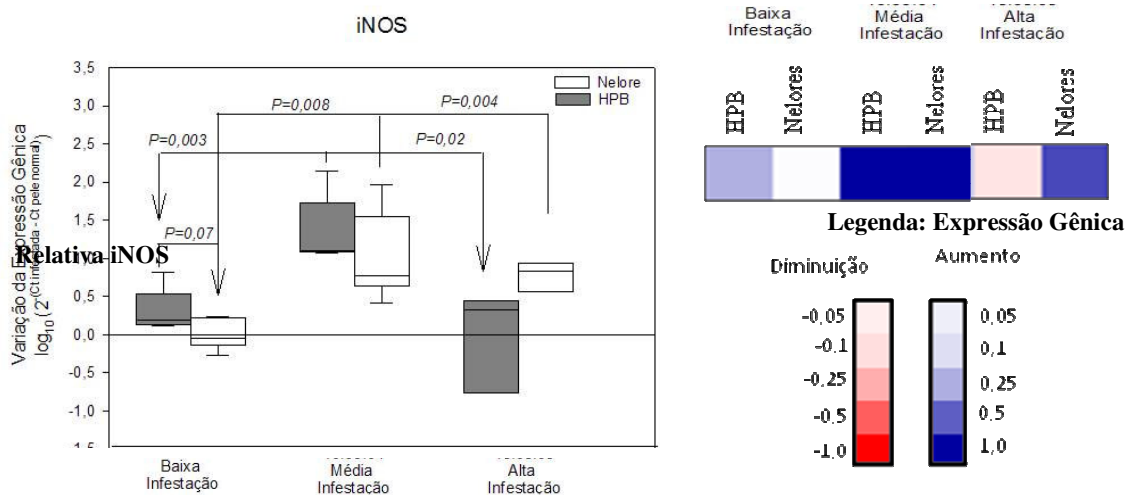
#### **4.2.3 Quantificação da Expressão Gênica Relativa de iNOS, IDO e IFN $\alpha$ na Pele de Bovinos Resistentes e Susceptíveis a Infestação pelo *B. microplus* Submetidos a Diferentes Níveis de Infestação Natural pelo Carrapato.**

A expressão relativa do gene codificante para iNOS mostrou-se maior em HPBs quando comparado aos níveis de expressão em Nelores no período de baixa infestação, embora sem diferenças significativas entre os grupos. No período de média infestação, HPBs ( $P=0,002$ ; teste  $t$ ) e Nelores ( $P=0,007$ ; teste  $t$ ) demonstraram um aumento significativo da expressão relativa de iNOS quando comparado aos níveis do período anterior. Na alta infestação Nelores apresentaram níveis de expressão relativa de iNOS significativamente maior ( $P= 0,004$ ; teste  $t$ ) do que na baixa infestação e HPBs apresentaram uma diminuição significativa ( $P=0,02$ ; teste  $t$ ) da expressão quando comparado à média infestação ( $P=0,02$  teste  $t$ ; Figura 33 e Tabela 33). Na média infestação a expressão do gene codificante de iNOS foi significativamente maior na pele infestada do que na pele normal de Nelores ( $P=0,001$  teste  $t$ ; Ct para pele normal:  $30,4 \pm 1,2$ ; Ct para pele infestada:  $27,0 \pm 1,1$ ) e HPB ( $P=0,0003$  teste  $t$ ; Ct para pele normal:  $31,2 \pm 0,7$ ; Ct para pele infestada:  $26,2 \pm 1,0$ ).

A expressão relativa do gene codificante da enzima IDO mostrou-se semelhante nos Nelores em todos os períodos de coleta, obtendo sempre maior expressão na pele infestada. Os HPB embora mantendo níveis da expressão relativa constante nos três períodos analisados,

sempre apresentaram inibição da expressão na pele infestada do animal quando comparado à pele normal; sendo mais evidente durante o período de alta infestação. O período de média infestação representou o momento de maior diferença estatística da expressão relativa entre os grupos ( $P=0,07$  teste  $t$ ; Figura 34 e Tabela 34).

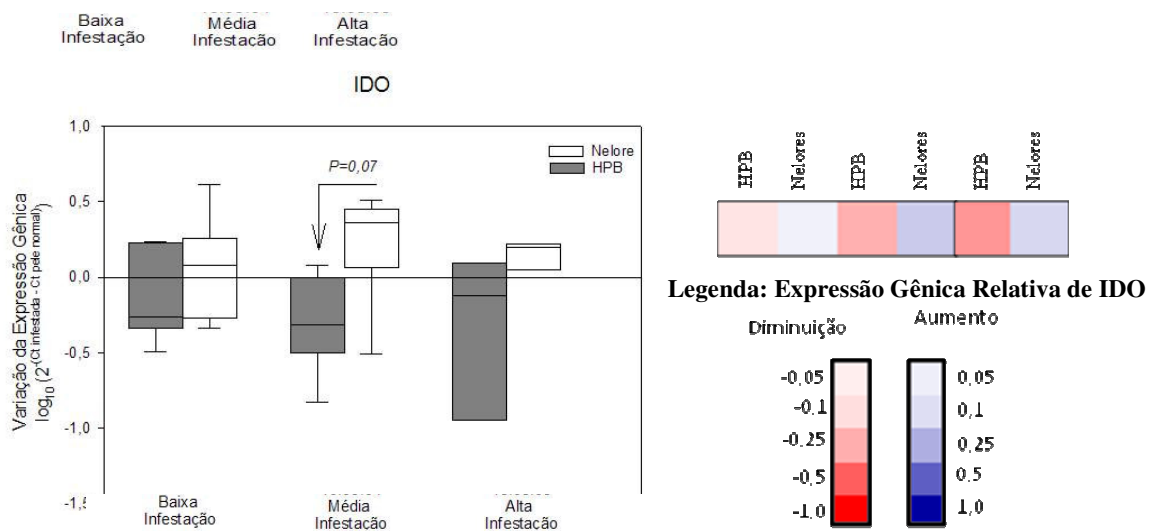
A expressão relativa de IFN $\alpha$  mostrou-se diminuída em ambas as raças no primeiro período de baixa infestação e no período de alta infestação quando comparada às respectivas peles normais, porém sem diferenças estatísticas entre os grupos. No período de média infestação seguinte, os HPB apresentaram um aumento da expressão relativa quando comparado ao período de baixa infestação ( $P=0,05$ ; teste  $t$ ) e quando comparado aos níveis expressos por Nelores no mesmo período ( $P=0,06$  ; teste  $t$ , Figura 35 e Tabela 35).



**Figura 33– Expressão Relativa do Gene Codificante de iNOS em Pele de Bovinos Resistentes e Susceptíveis Infestados com Fêmeas Ingurgitadas de *B. microplus* e Manejados em Pasto Apresentando Diferentes Níveis de Infestação.** Resultados de PCR em Tempo Real representados pelas médias do DCt.

**Tabela 33. Expressão Relativa do Gene Codificante de iNOS em Pele de Bovinos Resistentes e Susceptíveis Infestados com Fêmeas Ingurgitadas de *B. microplus* e Manejados em Pasto Apresentando Diferentes Níveis de Infestação.** Média dos DCt nos diferentes níveis de infestação seguido do Desvio Padrão. **H**= Diferença significativa da expressão relativa de iNOS em HPBs quando comparado aos índices de expressão no período anterior para mesma raça ( $P=0,003$ ), **H\***= Diferença Significativa da Expressão Relativa de iNOS em HPBs na alta infestação comparado aos índices de expressão gênica do período anterior para mesma raça ( $P=0,02$ ), **N**= Diferença Significativa da Expressão Gênica Relativa de iNOS em Nelores na média infestação comparado aos índices de expressão do período anterior para mesma raça ( $P=0,008$ ). **N\***= Diferença Significativa da Expressão Relativa de iNOS em Nelores na alta infestação quando comparado aos índices de expressão no período de baixa infestação para mesma raça ( $P=0,004$ ).

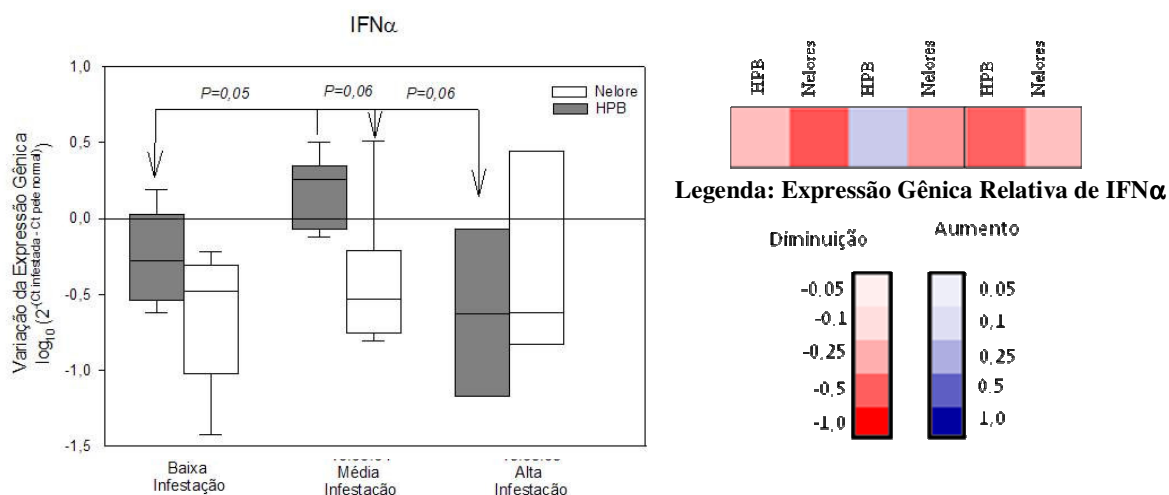
Níveis de infestação	Expressão Gênica iNOS (DDCt) $\pm$ Desvio Padrão		
	Baixo	Médio	Alto
<b>Fenótipo</b>			
<b>Susceptível (HPB)</b>	<b>0,3420</b> $\pm$ 0,2956	<b>1,3968 H</b> $\pm$ 0,4657	<b>-0,1054 H'</b> $\pm$ 0,8896
<b>Resistente (Nelore)</b>	<b>9,3319e-3</b> $\pm$ 0,2148	<b>1,0521 N</b> $\pm$ 0,6231	<b>0,7626 N'</b> $\pm$ 0,2547



**Figura 34– Expressão Relativa do Gene Codificante de IDO em Pele de Bovinos Resistentes e Susceptíveis Infestados com Fêmeas Ingurgitadas de *B. microplus* e Manejados em Pasto Apresentando Diferentes Níveis de Infestação.** Resultados de PCR em Tempo Real representados pelas médias do DCt.

**Tabela 34. Expressão Relativa do Gene Codificante de IDO em Pele de Bovinos Resistentes e Susceptíveis Infestados com Fêmeas Ingurgitadas de *B. microplus* Manejados em Pasto Apresentando Diferentes Níveis de Infestação.** Média dos DCt nos diferentes níveis de infestação

Níveis de infestação	Expressão Gênica IDO (DDCt) $\pm$ Desvio Padrão		
	Baixo	Médio	Alto
<b>Fenótipo</b>			
<b>Susceptível (HPB)</b>	<b>-0,1171</b> $\pm$ 0,3298	<b>-0,2980</b> $\pm$ 0,3539	<b>-0,3913</b> $\pm$ 0,7310
<b>Resistente (Nelore)</b>	<b>0,0479</b> $\pm$ 0,3781	<b>0,2092</b> $\pm$ 0,4138	<b>0,1405</b> $\pm$ 0,1226



**Figura 35– Níveis de Expressão Gênica Relativa de IFNα na Pele de Bovinos com Fenótipo Resistente (Nelore) e Susceptível (HPB) Submetidos a Infestação Natural com Fêmeas Ingurgitadas de *B. microplus* em Diferentes Períodos.** Resultados de PCR em Tempo Real representados pelas médias do DCt.

**Tabela 35. Expressão Relativa do Gene Codificante de IFNα em Pele de Bovinos Resistentes e Susceptíveis Infestados com Fêmeas Ingurgitadas de *R. microplus* e Manejados em Pasto Apresentando Diferentes Níveis de Infestação.** Médias dos DCt nos diferentes períodos de infestação seguido do Desvio Padrão. H= Diferença significativa da expressão relativa de IFNα em HPBs quando comparado aos índices de expressão no período anterior para mesma espécie (P=0,05).

Fenótipo	Expressão Gênica IFNα DCt Desvio Padrão		
	Baixo	Médio	Alto
<b>Susceptível (HPB)</b>	-0,2532 ± 0,3351	0,1746 ± 0,254H	-0,6221 ± 0,7376
<b>Resistente (Nelore)</b>	-0,6689 ± 0,4895	-0,4034 ± 0,5325	-0,2408 ± 0,9107

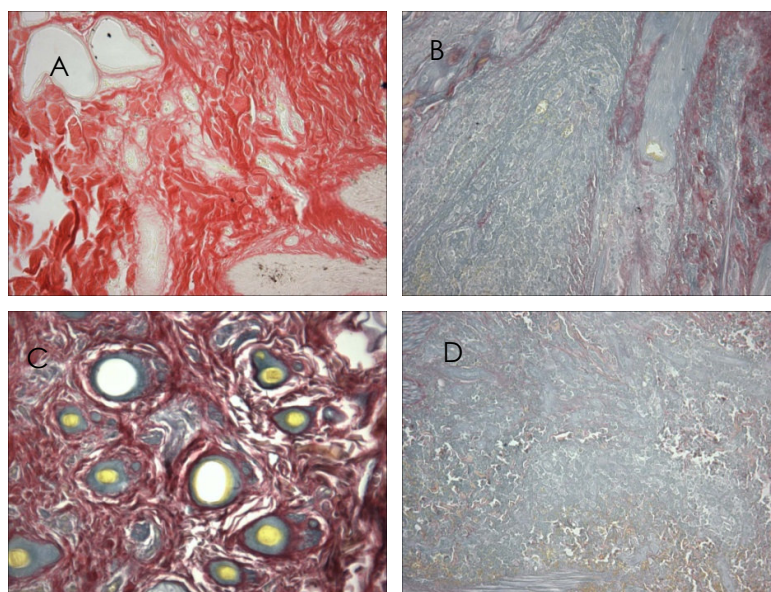


#### **4.3 Quantificação da Matriz Colagenosa em Pele de Bovinos Resistentes e Susceptíveis Naturalmente Expostos a Infestação pelo *B. microplus* Mediante Utilização da Coloração de Picrosírúrus Red.**

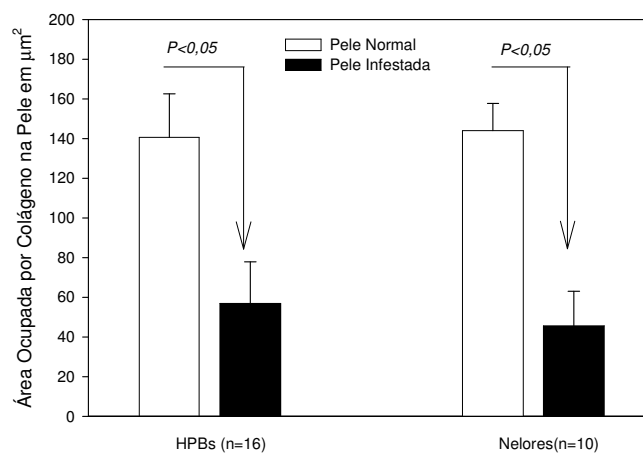
Além das diferenças na elaboração da resposta imune, outros fatores podem estar relacionados com a resistência de Nelores ao desenvolvimento do carrapato. Dentre eles, sugerimos uma possível diferença na produção e manutenção da matriz colagenosa que conferiria aos Nelores uma importante barreira física contra a fixação do artrópode. Junto a essa hipótese, ditos populares em relação a uma maior espessura e resistência do couro de Nelores quando comparado a outras raças enfatizam a importância da barreira física na resistência ao processo de infestação. É sabido, como mencionado na introdução desta tese, que carrapatos de diversas espécies liberam metaloproteases (MMP) em sua saliva que auxiliam na degradação tecidual e conseqüentemente permitem o repasto sanguíneo do artrópode.

Os resultados mostram que há uma queda significativa da matriz colagenosa na pele infestada quando comparado à pele normal em ambas as raças (Fig. 37), porém sem diferenças significativas entre as raças. Isto nos permite dizer que o carrapato possui a mesma capacidade de degradação da matriz tecidual em ambos os hospedeiros, não nos permitindo ligar a constituição colagenosa da matriz extracelular com o desenvolvimento de resistência frente à infestação.

1)



2)



**Figura 36- Quantificação de Colágeno em Pele Normal e Infestada com Fêmeas Ingurgitadas de *B. microplus*.** 1) A – Pele Normal de Nelore, B- Pele Infestada de Nelore, C- Pele Normal de HPB, D- Pele Infestada de HPB. A área vermelha representa o colágeno presente no tecido em objetiva de 20X (Coloração de Picosírius Red). 2) Representação Gráfica da Área de Colágeno Quantificada.

#### **4.4 - Análise Genotípica dos Animais e Caracterização de Marcadores Moleculares de Resistência Através da Determinação de SNP's (*Single Nucleotide Polimorfisms*).**

Após determinar que ocorrem diferenças nos níveis de expressão gênica relativa de diversos genes alvos possivelmente envolvidos com a elaboração da resposta imune bovina frente a antígenos do carrapato, pesquisamos a presença de polimorfismos genéticos em alguns genes pertencentes ao sistema imunológico. Para desenvolver esse experimento foi obtido DNA de Nelores (n=16) e Holandeses Preto-Branco (n=16) como descrito em materiais e métodos.

##### **4.4.1 – Determinação da Posição e Frequência dos SNP's Mapeados em Genes Imunológicos Anti-inflamatórios e Pró-Inflamatórios em Nelores e Holandeses Preto-Branco.**

Os SNP's encontrados após o seqüenciamento dos produtos de PCR dos genes TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  e TGF $\beta$  foram analisados de acordo com sua frequência na população bovina estudada.

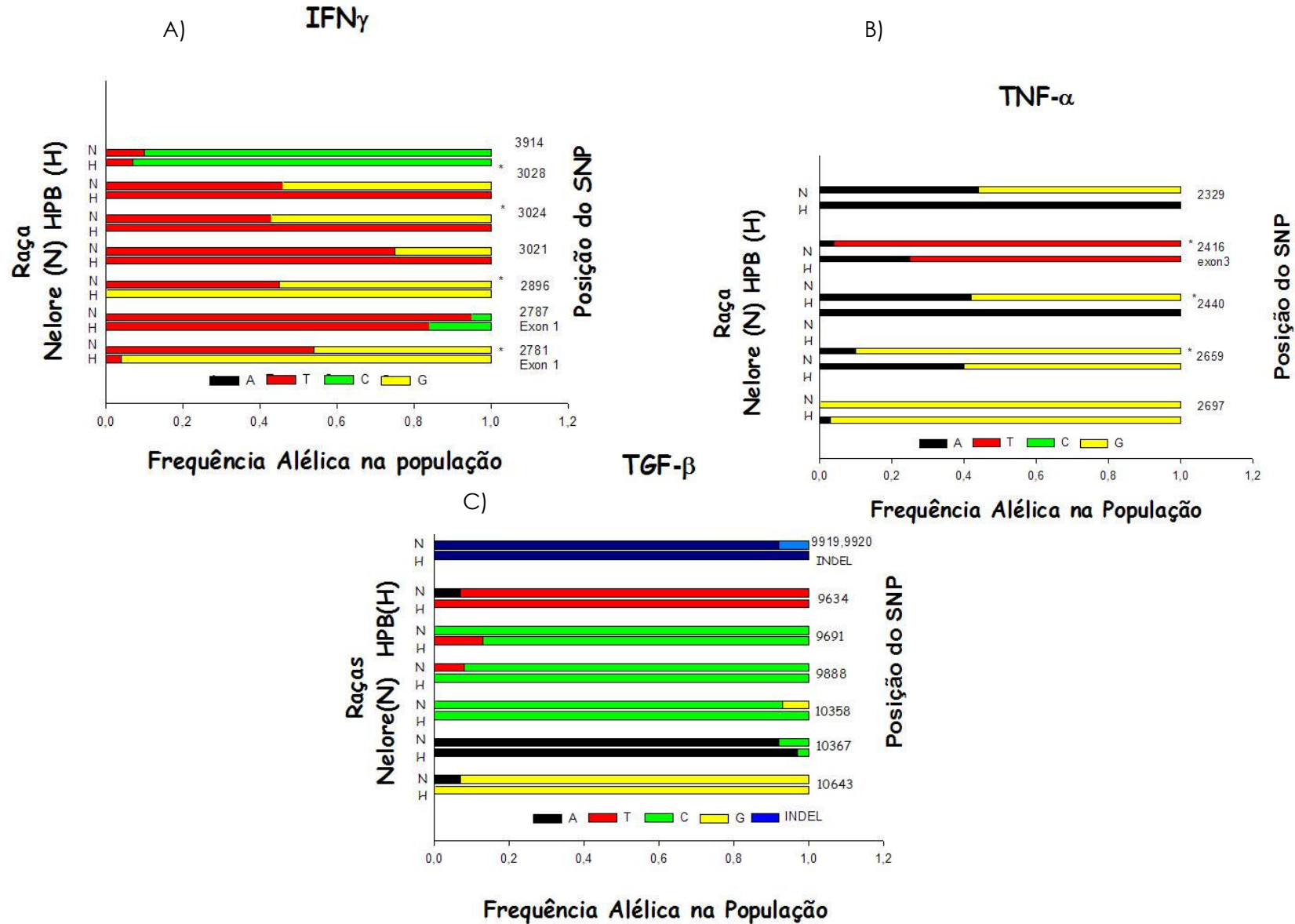
O seqüenciamento do amplicon com 1400pb posicionado entre os éxon 1 e íntron 3 do IFN $\gamma$  identificou a presença de sete posições distintas contendo SNP's, sendo as alterações que ocorreram nas posições 3028, 3024, 2896 (distribuídos nos íntrons) e 2781 (presente no éxon 1) específicas para Nelores. A frequência de todos os SNP's específicos para Nelores era

significativamente maior ( $P < 0,05$ ;  $Chi^2$ ). A alteração na posição 2781 não acarretou alteração de aminoácido na seqüência protéica, sendo, portanto, considerado uma mutação pontual conservativa (Figura 37 A e Tabela 36).

O seqüenciamento do amplicon com 1400pb posicionado entre os éxons 1 e 4 do TNF $\alpha$  identificou a presença de quatro posições distintas contendo SNP's, sendo que as alterações nas posições 2329 e 2440 eram específicas para Nelores e a da posição 2697 específica para a raça HPB. A frequência dos SNP's encontrados nas posições 2329 e 2440 era significativamente maior em Nelores ( $P < 0,05$ ;  $Chi^2$ ) e a dos SNPs nas posições 2416 (correspondente ao éxon 3 do gene) e 2659 era significativamente maior em HPB ( $P < 0,05$ ;  $Chi^2$ ). Nelores apresentaram quatro deleções nucleotídicas identificadas e HPB duas deleções na região gênica analisada (Figura 37B e Tabela 36).

O seqüenciamento do amplicon com 1350pb posicionado entre os éxons 6 e 7 do TGF $\beta$  identificou a presença de seis posições distintas contendo SNPs. As posições 9634, 9888, 10358 e 10643 foram específicas para Nelores e a posição 9691 específica para a raça HPB. Embora os SNPs fossem raça-específicas, nenhum alcançou uma frequência populacional significativa. Nelores apresentaram também duas deleções nucleotídicas identificadas nas posições 9919 e 9920 do gene (Figura 37C e Tabela 36).





**Figura 37- Análise da Frequência de Single Nucleotide Polimorfisms (SNP's) Mapeados em Genes Codificantes de Proteínas do Sistema Imune com Atividades Anti e Pró-inflamatórias em Raças Bovinas Susceptíveis e Resistentes a Infestações pelo *R. microplus*. A) Frequência Alélica de SNP's Mapeados para IFN $\gamma$ , B) Frequência Alélica de SNP's Mapeados para TNF $\alpha$ , C) Frequência Alélica de SNP's Mapeados para TGF $\beta$ .; Diferença Estatisticamente Significante na Proporção de Alelos nas Diferentes Raças, teste do Qui-Quadrado, sendo  $P < 0,05$ .**

#### **4.4.2 – Determinação da Posição e Frequência dos SNP's Mapeados em Genes Imunológicos com Função Quimiotática em Nelores e Holandeses Preto-Branco.**

Os SNP's encontrados após o seqüenciamento dos produtos de PCR dos genes IGF-1, IP-10, MCP-1 e MIP-1 $\alpha$  foram analisados de acordo com sua frequência na população bovina estudada.

O seqüenciamento do amplicon com 830pb posicionado entre o éxon 1 e íntron 3 do IGF-1 identificou a presença de três posições distintas contendo SNP's, sendo a alteração que ocorreu na posição 1914 específica para raça HPB. Embora com especificidade raça-específica, o SNP da posição 1914 não obteve uma frequência significativa. O SNP presente na posição 1388, embora não sendo raça-específica apresentou uma frequência significativamente maior ( $P < 0,05$ ;  $Chi^2$ ) em HPB (Figura 38 A e Tabela 36).

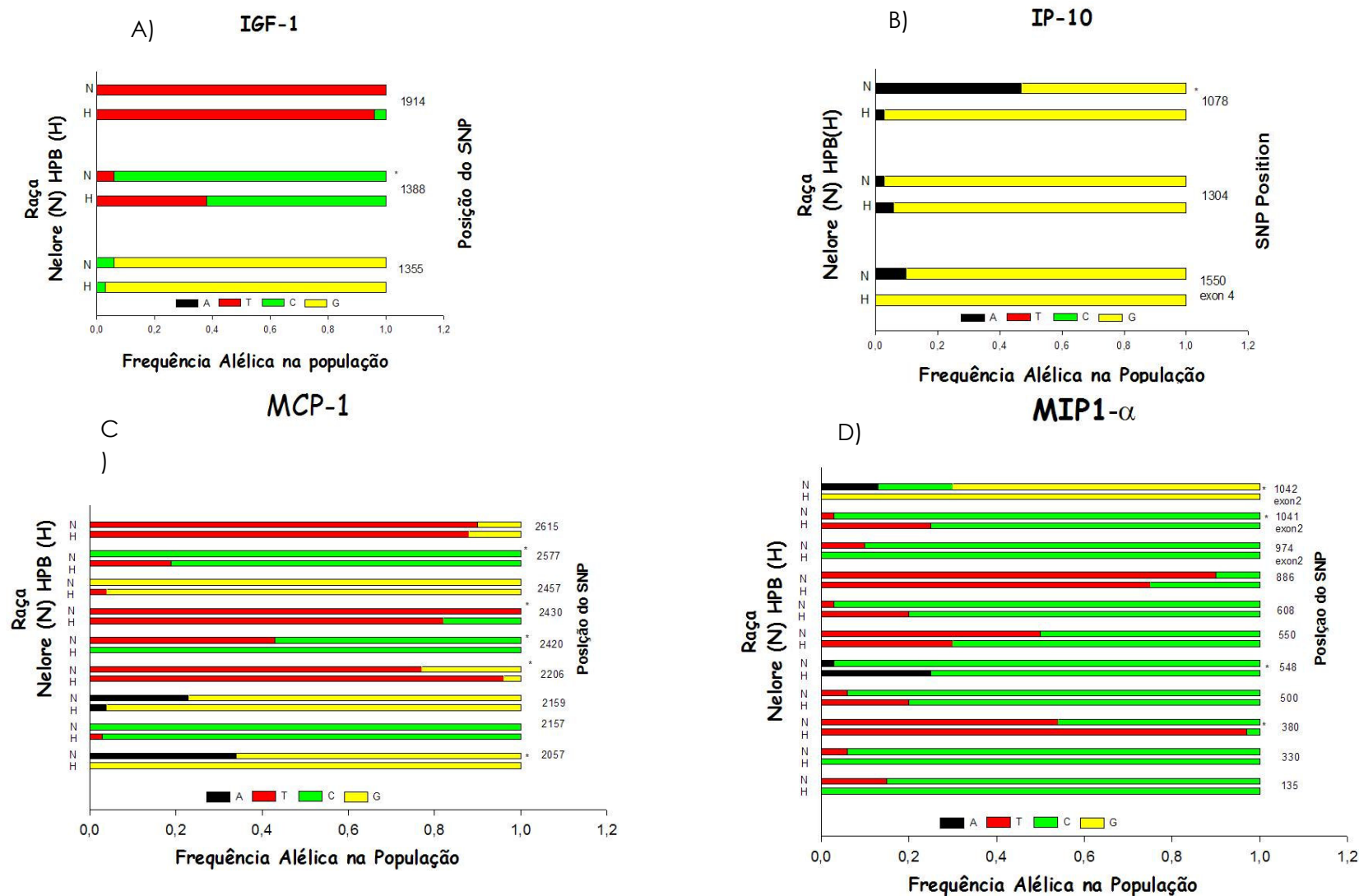
O seqüenciamento do amplicon com 970pb posicionado entre os éxons 1 e 4 do IP-10 identificou a presença de três posições distintas contendo SNP's, sendo a alteração que ocorreu na posição 1550 (presente no éxon 1) específica para raça Nelore. Embora com especificidade raça-específica, o SNP da posição 1550 apresentou uma frequência significativa. O SNP presente na posição 1078, embora não sendo raça-específica, apresentou uma frequência significativamente maior ( $P > 0,05$ ) (Figura 38B e Tabela 36).

O seqüenciamento do amplicon com 1300pb posicionado entre os éxons 1 e 3 do MCP-1 identificou a presença de nove posições distintas contendo SNP's, sendo as alterações que ocorreram nas posições 2577, 2457, 2430 e 2157 específicas para raça HPB e nas posições 2420 e 2057 específicas para raça Nelore. Dos SNP's específicos para raça HPB as mutações pontuais nas posições 2577, 2430 e 2157 apresentaram uma frequência significativamente maior ( $P < 0,05$ ;  $CHI^2$ ); assim como as duas alterações identificadas em Nelores ( $P < 0,05$ ;  $Chi^2$ ) (Figura 38C e Tabela 36).

O seqüenciamento do amplicon com 1350pb posicionado entre os éxons 1 e 3 do MIP-1 $\alpha$  identificou a presença de onze posições distintas contendo SNP's, sendo as alterações que ocorreram nas posições 135, 330, 974 (éxon 2) e 1042(éxon 2) específicas para raça Nelore. Desses SNP's, somente a mutação pontual na posição 1042 (éxon 2) obteve uma freqüência significativamente maior ( $P<0,05$ ;  $Chi^2$ ). Os SNP's presentes nas posições 380 e 1041, embora não sendo raça-específica, apresentou freqüência significativamente maior em Nelores ( $P<0,05$ ;  $Chi^2$ ), o mesmo ocorreu para o SNP da posição 548 que foi mais freqüente na raça HPB ( $P<0,05$ ;  $Chi^2$ ) (Figura 38D e Tabela 36).

Nossos resultados sugerem que essas disposições de SNPs podem ser úteis na associação dos estudos de segregação das populações resultante do cruzamento de *B. taurus* e *B. indicus* averiguando se estes marcadores são associados com modificações que conferem marca de resistência para *B. indicus*.





**Figura 38- Análise da Frequência de *Single Nucleotide Polimorfisms* (SNP's) Mapeados em Genes Codificantes de Proteínas da Resposta Imune com Atividade Quimiotática nas Raças Bovinas Susceptíveis e Resistentes a Infestações pelo *B. microplus*.** A) Frequência Alélica de SNP's Mapeados para IGF-1, B) Frequência Alélica de SNP's Mapeados para IP-10, C) Frequência Alélica de SNP's Mapeados para MCP-1 e D) Frequência Alélica de SNP's Mapeados para MIP-1 $\alpha$ .

**Tabela 36. Frequência dos Genótipos dos SNPs Mapeados em Genes Codificantes de Proteínas do sistema Imune em Raças Bovinas Susceptíveis ou Resistentes a Infestações pelo *B. microplus***  
 Comparação da Frequência Genotípica dos SNP's em Nelores e Holandeses para os genes estudados. Os números em vermelho representam genótipos específicos para a raça. :Diferença Estatisticamente Significante na Proporção de Alelos nas Diferentes Raças. Teste do Chi<sup>2</sup>, sendo  $P < 0,05$ .

Gene/Posição do SNP	Genótipo	HPB	Nelore	* Valor de P
<b>IP-10</b> 1078	AA	0	<b>3</b>	<b>0,001</b>
	AG	<b>1</b>	<b>8</b>	
	GG	<b>15</b>	<b>4</b>	
<b>TNF<math>\alpha</math></b> 2659	GG	<b>4</b>	<b>11</b>	<b>0,027</b>
	GT	<b>1</b>	<b>0</b>	
	AA	<b>2</b>	<b>0</b>	
	AG	<b>9</b>	<b>3</b>	
2440	AA	<b>16</b>	<b>1</b>	<b>0,001</b>
	AG	<b>0</b>	<b>10</b>	
	GG	<b>0</b>	<b>3</b>	
2416	TT	<b>9</b>	<b>13</b>	<b>0,001</b>
	AT	<b>6</b>	<b>1</b>	
	AA	<b>1</b>	<b>0</b>	
2329	GG	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0,01</b>
	AA	<b>1</b>	<b>0</b>	
	AG	<b>0</b>	<b>7</b>	
<b>MIP-1<math>\alpha</math></b> 380	CC	<b>0</b>	<b>4</b>	<b>0,004</b>
	CT	<b>1</b>	<b>6</b>	
	TT	<b>13</b>	<b>5</b>	
548	AA	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0,07</b>
	AC	<b>5</b>	<b>1</b>	
	CC	<b>8</b>	<b>14</b>	
608	CC	<b>9</b>	<b>14</b>	<b>0,08</b>
	CT	<b>5</b>	<b>1</b>	
1042	GG	<b>15</b>	<b>9</b>	<b>0,03</b>
	AG	<b>0</b>	<b>3</b>	
	AA	<b>0</b>	<b>2</b>	

## Continuação

Gene/Posição do SNP	Genótipo	HPB	Nelore	* Valor de P	
<b>IGF-1</b>	<b>CC</b>	<b>8</b>	<b>15</b>	<i>0,02</i>	
	<b>CT</b>	<b>4</b>	<b>0</b>		
	<b>TT</b>	<b>4</b>	<b>1</b>		
<b>1388</b>					
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	<b>GG</b>	<b>14</b>	<b>3</b>	<i>0,001</i>	
	<b>GT</b>	<b>1</b>	<b>5</b>		
	<b>TT</b>	<b>0</b>	<b>4</b>		
	<b>2781</b>				
		<b>CT</b>	<b>5</b>	<b>1</b>	<i>0,06</i>
	<b>2787</b>				
		<b>TT</b>	<b>11</b>	<b>9</b>	
	<b>2896</b>	<b>GG</b>	<b>16</b>	<b>8</b>	<i>0,005</i>
		<b>GT</b>	<b>0</b>	<b>6</b>	
		<b>TT</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	
	<b>3021</b>	<b>TT</b>	<b>16</b>	<b>12</b>	<i>0,02</i>
		<b>GT</b>	<b>0</b>	<b>4</b>	
<b>3024</b>	<b>TT</b>	<b>16</b>	<b>3</b>	<i>0,001</i>	
	<b>GT</b>	<b>0</b>	<b>8</b>		
	<b>GG</b>	<b>0</b>	<b>5</b>		
<b>3028</b>	<b>TT</b>	<b>16</b>	<b>4</b>	<i>0,001</i>	
	<b>GT</b>	<b>0</b>	<b>7</b>		
	<b>GG</b>	<b>0</b>	<b>5</b>		

## Continuação

Gene/Posição do SNP	Genotipo	HPB	Nelore	* Valor de P
<b>MCP-1</b> 2057	GG	16	7	0.002
	AA	0	2	
	AG	0	7	
2159	GG	1	9	0.002
	AG	15	5	
	AA	0	1	
2206	TT	15	9	0.07
	GT	1	5	
	GG	0	1	
2420	CC	16	5	0.001
	CT	0	7	
	TT	0	3	
2430	TT	11	15	0.06
	CT	4	0	
	CC	1	0	
2577	CC	11	15	0.06
	CT	4	0	
	TT	1	0	

**DISCUSSÃO**

## 5 - DISCUSSÃO

Para obterem sangue, os carrapatos ixodídeos necessitam permanecer fixados ao hospedeiro por um longo período de tempo, permitindo que ele tenha tempo suficiente para desenvolver reações contra a infestação. No entanto, o sucesso do parasitismo do carrapato é possível graças às estratégias imunomoduladoras que desenvolveu e que são capazes de reduzir a resposta do hospedeiro e garantir o repasto sanguíneo até o fim. O repertório imunomodulador está contido na saliva de carrapatos que vem sendo descrito por diversos autores. O que as diferentes espécies de carrapatos possuem em comum é o fato de todos neutralizarem componentes da reação inflamatória inata e resposta adaptativa presente no momento da fixação (Ribeiro, 1995). A saliva também pode ser tóxica ou irritante para o hospedeiro, fato refletido pela ocorrência de intoxicações ou reações pruriginosas após picadas de carrapatos.

O tipo de resposta elaborada pelo hospedeiro determina ou não o desenvolvimento de resistência à infestação pelo artrópode. Experimentos com camundongos infestados com carrapatos *R. sanguineus*, demonstraram que esses animais não são capazes de desenvolver uma resposta imune eficaz contra o parasita, mesmo após diversas infestações (Ferreira & Silva, 1998) e polarizam a resposta adaptativa para o tipo Th2. Por outro lado, alguns hospedeiros são capazes de reagir contra as infestações e terminam por inibir a hematofagia. Tal fenômeno é refletido por um menor peso da fêmea ingurgitada e da massa de ovos, menor tempo de postura e de eclosão dos ovos, dentre outros parâmetros biológicos. Cobaias apresentam, no local da picada, infiltrado inflamatório formado de mononucleares e basófilos (Szabó e Bechara, 1999) e também desenvolvem reações de hipersensibilidade imediata e tardia (Szabó et.al, 1995), enquanto que em camundongos o infiltrado inflamatório provocado pela picada de mesma espécie de carrapato é composto predominantemente por neutrófilos e eosinófilos e desenvolvem apenas reações de hipersensibilidade imediata (Ferreira et al,

2003). Linfócitos T de camundongos infestados apresentam uma proliferação reduzida (Ganapamo et al., 1996).

Os bovinos são hospedeiros naturais do carrapato *B. microplus* e apresentam raças susceptíveis (*Bos taurus* - Holandês Preto e Branco) e resistentes ao processo de infestação (*Bos indicus* - Nelores). Constituem o único hospedeiro de carrapatos onde é possível estudar numa mesma espécie as respostas elicitadas pelos fenótipos contrastantes de infestações. Neste estudo, quantificamos a expressão relativa de genes candidatos a participarem dos fenótipos de infestações tanto na pele de bovinos submetidos à infestação natural com *B. microplus* quanto na pele de animais imunes tratada com extrato de larva do carrapato.

a) Genes Envolvidos no Recrutamento de Leucócitos:

Como dito acima, as propriedades tóxicas e irritantes da saliva e do cone de cimento do carrapato, bem como a lesão causada pelos palpos e o hipostômio do carrapato promovem reações inflamatórias cutâneas. Os mecanismos moleculares responsáveis por essas reações ainda não foram estudados na interface carrapato-hospedeiro, mas observações feitas sobre outras patologias cutâneas permitem inferir que a reação ocorre por meio da indução da produção de citocinas pró-inflamatórias, moléculas de adesão e quimiocinas por células residentes da pele. De fato, alguns alérgenos de contato induzem diretamente a ativação de queratinócitos para produzirem quimiocinas, citocinas pró-inflamatórias e ICAM-1 (Pivarsci, 2007). A natureza das células efectoras recrutadas durante a reação ao carrapato dependerá, por sua vez, do perfil de quimiocinas induzido inicialmente. Como informado acima, a composição celular dessa reação correlaciona-se com o sucesso da hematofagia apesar da reação do hospedeiro ou com prejuízo para o parasitismo do carrapato. Com efeito, a fim de escapar da resposta inflamatória, a saliva de carrapato possui um ligante genérico de quimiocinas (Hajnicka, et. al, 2001). Em trabalho recente foi identificado um ligante das

quimiocinas CCL3 (MIP1a) e CCL2 (MCP-1) em biblioteca de cDNA de glândula salivar de *R. sanguineus* denominado evasina-1 (Frauensschuh, et. al, 2007) o que evidencia um importante papel dessas moléculas na construção do infiltrado inflamatório e nos mecanismos de ataque ao artrópode. Com base nos achados dos estudos anteriores que mostram um predomínio de eosinófilos e basófilos nos animais resistentes e de neutrófilos e polarização de resposta adaptativa para o perfil Th2 nos animais suscetíveis, o presente trabalho focalizou seus esforços sobre as quimiocinas que recrutam basófilos, eosinófilos, neutrófilos e linfócitos T helper tipo 1.

No experimento em que bovinos foram desafiados com extrato de larva não alimentadas de *B. microplus*, Nelores, mas não HPBs, elaboraram uma reação tardia caracterizada por um aumento significativo no número de basófilos e eosinófilos 72 e 96hr após receber o estímulo. A reação tardia envolvendo basófilos pode representar a hipersensibilidade tipo Jones-Mote, definida na introdução. O recrutamento maior de basófilos em pele de Nelores foi acompanhado pelo aumento significativo da expressão relativa de IGF-1 na reação tardia ao extrato de larvas de carrapatos. Quando expostos a uma infestação natural por *B. microplus*, a pele infestada de bovinos Nelores também expressam mais IGF-1 do que a pele infestada de HPB, os quais exibiram uma inibição da expressão de IGF-1 na pele infestada em todos os períodos de coleta. O IGF-1 é um fator quimiotático seletivo para basófilos (Hartnell et al., 2004) e modula liberação de histamina por essas células (Hirai et al., 1993), sendo também fator de crescimento que estimula a mitose e diferenciação celular de queratinócitos (Sharp et al., 2005). Recentemente foi descrito a presença de uma molécula ligante, tipo lipocalina, de IGF-1 (IGFBP) em transcriptomas de glândulas salivares de *B. microplus* (Mulenga, 2007).

A expressão relativa de MCP-1 (CCL2) em Nelores aumentou de forma significativa 72hr após o tratamento com extrato de larva, fato que não foi observado em HPBs. Na infestação natural, Nelores exibem um aumento da expressão relativa de MCP-1 comparado



aos HPBs na alta infestação. O MCP-1 é um importante fator quimiotático para basófilos e estimulador da desgranulação de histamina por essas células independente da presença de IgE (Kuna, et al 1993). Alguns trabalhos demonstram que a reação cutânea tardia com participação de mastócitos, eosinófilos e basófilos está associada com resistência ao artrópode (Szabó e Bechara, 1999). Enfatizando os possíveis efeitos deletérios da histamina no desenvolvimento do artrópode, foi identificada uma proteína ligante de histamina na saliva de carrapatos (Ribeiro, 1995). Esses achados fortalecem a hipótese da ativação basofílica e desgranulação histamínica na resposta imune de hospedeiros resistentes. Na reação tardia de 72hr, Nelores apresentaram um aumento significativo da expressão relativa de IL-16, que é quimiotático para basófilos, linfócitos T e eosinófilos (Ferland et al, 2004), participa do desenvolvimento da reação de hipersensibilidade tardia e estimula a produção de triptase nos grânulos de basófilos (Qi et al, 2002), enzima que pode estimular o aumento prurido local (Steinhoff, 2003), contribuindo para irritabilidade do animal e remoção mecânica do artrópode. A expressão relativa de MIP1 $\alpha$  (CCL3) comportou-se de forma contrastante nos experimentos realizados. Quando expostos a antígenos de extrato de larva, ambas as raças exibiram uma queda da expressão de MIP1 $\alpha$  no decorrer da reação tardia, enquanto que, durante a infestação natural, variados níveis de expressão foram observados. No período de alta infestação, Nelores exibem um aumento da expressão relativa de MIP1 $\alpha$  comparado a HPBs, os quais sofrem uma forte inibição da sua expressão na pele infestada. O aumento da expressão relativa de MIP1 $\alpha$  nos animais resistentes pode estimular o recrutamento de basófilos e eosinófilos (Heinemann et al., 2000) ao local de fixação do carrapato. O MIP1 $\alpha$  é uma quimiocina capaz de estimular a produção de superóxidos em neutrófilos (Oliveira et al 1999). É sabido que a saliva de *R. sanguíneos* inibe a produção de NO por macrófagos murinos (susceptíveis) quando submetidos à cultura com saliva de *R. sanguíneos* (Ferreira e Silva, 1999), caracterizando uma possível participação da produção de superóxidos na rejeição do ectoparasita.

Um achado interessante na expressão gênica na pele de bovinos desafiados com extrato de larva de *B. microplus*, foi do SLURP-1. Em nossos experimentos constatou-se um aumento da expressão relativa de SLURP-1 na pele de Nelores e HPBs nos tempos de 72hr e 96hr após inoculação do extrato de larva, porém somente Nelores apresentara índices significativos. O SLURP-1 é um homólogo solúvel do receptor do ativador de plasminogênio tipo urokinase (uPA) e sua seqüência peptídica é muito semelhante a toxinas de veneno de cobra (Fischer, 2001). Dados da literatura mostram que uPA é um potente agente quimiotático para basófilos, porém não estimula sua desgranulação tampouco a produção de citocinas (de Paulis, 2004). O SLURP-1 induz a expressão de caspase 3 e 8 em queratinócitos e regula o índice apoptótico dessas células (Arredondo, 2005). Mutações presentes no gene humano esta associado ao desenvolvimento do Mal de Meleda (Fischer, 2001). Junto a essas informações sugerimos a participação do SLURP-1 na regulação do índice migratório de basófilos e no controle apoptótico dos queratinócitos. Animais HPB têm um aumento contínuo da expressão relativa do SLURP-1 na formação da reação tardia, enquanto Nelores demonstram uma queda da expressão relativa de SLURP-1 96hr após o estímulo. Embora sem bases conclusivas para este perfil de expressão, pode-se sugerir que Nelores exibem uma espécie de *feedback* negativo entre quimiocinas recrutantes de basófilos e a expressão de SLURP-1 regulando o potencial quimiotático do ambiente inflamatório no local da picada.

O presente trabalho também demonstrou que Nelores apresentam níveis mais elevados de expressão do IP-10 (CXCL-10) 96h após tratamento com extrato de larva. Em pele infestada os níveis de expressão relativa do IP-10 também são maiores em Nelores quando são comparados aos HPB. O IP-10 está envolvido no recrutamento de células Th1 e manutenção das respostas de hipersensibilidade tardia (Goebeler et. al., 2001), no recrutamento de mastócitos (Marone, et al. 2005 e de eosinófilos participantes de reações tardias (Akahira-Azuma, 2004). Queratinócitos estimulados com IFN $\gamma$ , citocina cuja expressão é maior em

Nelores, e eosinófilos, célula presente em maior número na pele de bovinos resistentes tratada com extrato de larvas ou infestada com ninfas e com adultos do que na pele de bovinos suscetíveis, são fontes importantes desse fator quimiotático (Klunker, 2003 e Gillitzer, 1991).

Por fim, quantificamos a expressão de IL-8. Experimentos prévios demonstraram a inibição da atividade biológica de IL-8 quando exposta a antígenos salivares *in vitro* (Hajnicka, 2001). Importante no recrutamento de neutrófilos, fato condizente com o fenótipo susceptível de acordo com Szabó, et al. (1995), a IL-8 apresentou-se elevada na pele de HPBs, com exceção do período de alta infestação, evidenciando um forte papel do nível da infestação no processo de resposta imune.

Os resultados obtidos em relação à expressão de quimiocinas em hospedeiros resistentes e susceptíveis ao carrapato, nos permite dizer que Nelores utilizam diversas vias de recrutamento para formação do infiltrado celular local, vias estas que estão envolvidas na quimiotaxia de eosinófilos, basófilos e linfócitos Th1 para a pele em contato com antígenos do carrapato.

#### b) Citocinas Pró-Inflamatórias

Há uma aparente discrepância entre os estudos que associam uma resposta imune tipo Th2 ora a susceptibilidade, ora a resistência (hospedeiros resistentes recrutam eosinófilos, basófilos e liberam mais histamina) ao carrapato. Informações recentes mostram que o paradigma Th1/Th2 não se aplica a mastócitos, eosinófilos e basófilos porque podem ser modulados por citocinas Th1 e Th2, com desfechos funcionais distintos (Lebman e Coffman 1988). Por outro lado já foi demonstrado que hospedeiros resistentes ao carrapato apresentam reações tardias a antígenos parasitários. Ao analisar o padrão de citocinas inflamatórias e estimuladoras da manutenção da reação tardia, verificamos que bovinos resistentes expostos a antígenos de extrato larva ou a infestação natural, têm aumento relativo da expressão gênica

de IFN $\gamma$  na pele quando comparado a HPB. Animais susceptíveis sofrem intensa inibição da expressão de IFN $\gamma$ . Dentre os diversos efeitos biológicos já descritos envolvendo a participação do IFN $\gamma$ , destaca-se sua participação no desenvolvimento da hipersensibilidade tardia (Mosmann, 1989) e a capacidade indutora da produção de outras moléculas imunes, tais como, MCP-1 e IP-10 por eosinófilos (Dajotoy et. al, 2004). Corroborando esses achados, observamos o aumento dos níveis de expressão relativa do MCP-1 e IP-10 no desenvolvimento da reação tardia já descritos anteriormente. O IFN $\gamma$  é a principal citocina indutora da expressão de IDO por eosinófilos (Dajotoy et al, 2004). Nelores aumentam o número de eosinófilos em reação tardia de 96hr e maior produção de IDO quando comparado a outros tempos de análise no mesmo grupo de animais. Na infestação natural o aumento da expressão relativa de IFN $\gamma$  na média infestação, foi acompanhado do aumento IDO por Nelores. Estes resultados sugerem uma participação importante do IFN $\gamma$  na indução da produção de IDO na pele desses animais. A IDO degrada o amino ácido triptofano, gerando quinureninas, substâncias que impedem a proliferação de linfócitos Th1, mas não de Th2 (Odemuyiwa et. al, 2004). A produção de IDO aumentada em Nelores sugere que esses animais não somente primam pela ativação do sistema imune como também pelo controle na elaboração da resposta. O controle da resposta local evita uma possível lesão tecidual que poderia beneficiar o processo de repasto sanguíneo e desenvolvimento do artrópode

O carrapato expressa abundantemente proteínas ligantes de histamina (Mulenga, 2007; Ribeiro, 1995; Brandão et al., 2007, manuscrito em preparação), indicando que esse mediador é prejudicial ao seu repasto sanguíneo. Quando ativado, o mastócito é uma das maiores fontes de TNF- $\alpha$ , citocina cuja expressão aumenta significativamente em pele de Nelores durante a alta infestação, embora, não aumente na pele desses animais quando desafiada com extrato de larva. O TNF $\alpha$  liberado por mastócitos pode ativar a maturação de células dendríticas e

hipertrofiar linfonodos, contribuindo para uma maior ativação imunológica e capacidade de resposta aos antígenos salivares (McLachlan et. al, 2003). Quando em contato com células endoteliais o TNF- $\alpha$  aumenta a expressão de E-selectinas e diapedese de linfócitos para o sítio inflamatório (Walcheck et. al, 1993). O TNF $\alpha$  é um forte indutor da expressão de iNOS (Katedra et. al, 2004). A iNOS apresentou maior expressão em pele de Nelores durante a alta infestação. A iNOS é mediadora da produção de radical reativo potencialmente tóxico para carrapatos, podendo auxiliar no processo de rejeição à fixação do ectoparasita.

Enfatizando o ambiente inflamatório gerado nos animais resistentes, destacamos a inibição da expressão de IFN $\alpha$  durante a infestação natural em ambas as raças de bovinos. A IFN- $\alpha$  inibe a expansão de linfócitos T  $\gamma\delta$  WC1<sup>+</sup> pró-inflamatórias e estimula a expansão de linfócitos T  $\gamma\delta$  CD8<sup>+</sup> que modulam a inflamação e são abundantes em pele (Tuo, et al 1999). Antígenos salivares aumentaram a expressão dessa molécula em animais susceptíveis, mas não em resistentes, o que poderia conter o poder inflamatório das células T $\gamma\delta$  WC1<sup>+</sup> desses animais. O IFN- $\alpha$  é secretada por células da epiderme, inclusive células dendríticas plasmacitóides (pDCs), e inibe a liberação de IL-4 por basófilos primados com IL-3, mas não a liberação de histamina e LTC<sub>4</sub>, atenuando a dermatite atópica (Chen et. al, 2003)

Desses resultados conclui-se que hospedeiros resistentes possuem um maior poder de montar e manter uma resposta inflamatória ao *B. microplus* ao conseguir controlar a evolução do parasita fixado.

### c) Citocinas Antiinflamatórias

O TGF $\beta$ , citocina envolvida com reparo tecidual, revelou um aumento da expressão relativa na reação tardia de 72hr após inoculação do extrato de larva na pele de Nelores quando comparado aos valores obtidos na reação imediata para mesma raça. Durante a

infestação natural, com exceção da baixa infestação, Nelores exibiram uma maior expressão relativa quando comparado aos HPBs. Uma das principais fontes produtoras de TGF $\beta$  são os eosinófilos, células envolvidas no reparo tecidual (Phipps et. al, 2002). Sua atividade é controlada de forma parácrina pela IL-5 (Phipps, 2004). A expressão de IL-5 foi maior em pele de Nelores durante a infestação natural, porém sem diferenças quando em contato com extrato de larva. Podemos dizer que a salivacão contínua durante o processo de repasto sanguíneo do artrópode, estimula a produção de IL-5 em Nelores e isto pode contribuir para ativação de eosinófilos. Como Nelores apresentam um aumento significativo dessas células no local da inoculação do extrato de larva em 72hr e 96hr após inoculação, os resultados indicam que os animais da raça Nelore possuem maior poder de reparo tecidual e controle da resposta imune ao carrapato do boi.

Estudos prévios demonstraram ocorrer inibição da produção de IL-10 por macrófagos murinos (hospedeiros susceptíveis) quando em contato com a saliva de *I. ricinus* (Hannier, et al 2003). De encontro a essa informação, nosso trabalho enfatiza uma maior expressão de IL-10 tanto no decorrer da infestação natural quanto na reação tardia induzida após tratamento com extrato de larva nos animais resistentes. A principal função da IL-10 na regulação da resposta imune é inibição da produção de IFN $\gamma$  (Sher et. al, 1992). Isto pode explicar a redução na expressão do IFN $\gamma$  após o pico de expressão de IL-10 quando os animais são tratados com extrato de larva. Na baixa infestação, Nelores comportam-se de forma a expressar uma fraca resposta imunológica. Genes antiinflamatórios como IL-4 e TGF $\beta$ , apresentam um aumento significativo de expressão em HPBs quando comparados aos Nelores para este período. No entanto, quando expostos a níveis maiores de infestação os níveis de expressão de genes codificando proteínas quimiotáticas e inflamatórias aumentam de forma significativa em Nelores e acabam por estimular o aumento de expressão dos genes codificantes de proteínas antiinflamatórias mantendo o equilíbrio da resposta imune.

Os achados histológicos e moleculares na pele de bovinos resistentes e susceptíveis desafiados com extrato de larva de *B. microplus* sugere que basófilos e eosinófilos são células que estão relacionadas ao desenvolvimento do fenótipo de resistência, sendo que no ambiente inflamatório de animais resistentes manifesta um maior poder quimiotático para essas células e um padrão de misto de citocinas expressas. O nível de infestação do *B. microplus* tem uma enorme capacidade de interferir no nível de expressão gênica tanto em animais resistentes quanto em animais susceptíveis para diversos genes-alvos analisados.

A diferença de expressão em diversos genes participantes do processo de elaboração da resposta imune estimulou a pesquisa de mutações de alguns dos genes que estudamos. Alguns trabalhos buscam marcadores moleculares para qualificação da maciez de carne bovina e/ou relacionados à resposta imune (Higushi, 1999). Existe polimorfismo genético descrito para promotor de TNF- $\alpha$  bovino que afeta níveis de transcrição (Higuchi et al, 1999). Em outros mamíferos, há relatos de polimorfismo no iNOS com diferentes níveis de expressão do gene (Burgner, et al 1998), mas nada ainda foi caracterizado em relação ao processo de resistência bovina ao carrapato. A pesquisa de SNP's nos permitiu comprovar a existência de diversas mutações pontuais, sendo algumas, com frequência alélica e genotípica raça-específica. Esses dados aumentaram o repositório de informações que poderão fornecer possíveis marcadores moleculares de resistência genética de bovinos e gerar melhores condições de manejo frente à presença do carrapato.

Em resumo, este trabalho descreve a participação de alguns dos componentes da resposta imune local frente aos antígenos do carrapato no desenvolvimento do fenótipo de resistência bovina a esse parasita.

**CONCLUSÕES**



## 6- CONCLUSÕES

Este trabalho descreve a participação de alguns dos componentes da resposta imune local frente a antígenos ou a infestações do carrapato no desenvolvimento do fenótipo de resistência de bovinos contra esse parasita. Baseado nas diferenças observadas para os perfis de expressão gênica apresentados em pele de diferentes raças de bovinos submetida a diferentes tipos de estímulos, o presente trabalho permite concluir que:

1- O perfil de expressão de alguns genes codificantes de moléculas envolvidas na resposta imune varia de acordo com a composição genética do hospedeiro bovino e correlaciona-se com o fenótipo apresentado pelo hospedeiro para infestações com carrapatos.

2- A expressão relativa de fatores envolvidos no recrutamento de basófilos e eosinófilos (IGF-1, MIP-1 $\alpha$ , MCP-1, SLURP-1), células que estão presentes em maior número na pele de bovinos resistentes tratada com extratos de larvas, foi maior em pele de hospedeiros bovinos resistentes (Nelores) quando comparada à pele tratada de bovinos suscetíveis (HPB) ao carrapato.

3- A expressão relativa de fator quimiotático envolvido no recrutamento de linfócitos Th1 (IP-10) foi maior em pele tratada de hospedeiros bovinos resistentes quando comparada à pele tratada de bovinos suscetíveis ao carrapato.

4- O nível de intensidade da infestação natural com carrapatos modula a expressão de genes codificantes de moléculas envolvidas na resposta imune em ambas as raças, porém os perfis de expressão de genes codificantes de citocinas quimiotáticas e pró-inflamatórias são semelhantes aos encontrados no experimento com extrato de larva, sendo maiores nos animais resistentes.

---

5- Mutações pontuais (SNP's) foram detectadas em alguns dos genes estudados, sendo que alguns alelos e genótipos eram encontrados apenas em uma das raças avaliadas. Esses dados contribuem para o repositório de marcadores moleculares, importantes ferramentas para o melhoramento genético de bovinos para resistência a carrapatos, para criação de melhores condições de manejo frente à presença do carrapato.



## 7- REFERÊNCIA

AESCHIMANN,A. Ticks and diseases susceptible hosts, resevoir hosts and vectors. **Oxford University Press**,8: 148-56, 1991.

AKAHIRA-AZUMA M, SZCZEPANIK M, TSUJI RF, et al. Early delayed-type hypersensitivity eosinophil infiltrates depend on T helper 2 cytokines and interferon-gamma via CXCR3 chemokines. **Immunology**. 111:306-17, 2004.

ALBERT MULENGA, MARIA BLANDON, RABUESAK KHUMTHONG. The molecular basis of the *Amblyomma americanum* tick attachment phase. **Exp Appl Acarol** 41:267–287, 2007.

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

AMRANI Y, MOORE P.E., HOFFMAN R., SHORE S.A., PANETTIERI R.A. Interferon-gamma modulates cysteinyl leukotriene receptor-1 expression and function in human airway myocytes. **Am J Respir Crit Care Med** 164: 2098-2101, 2001.

Anon. **In Yearbook Production**. FAO, Rome. 2002

ARREDONDO, J.,CHERNYAVSKY, A.I. ROBERT, J., WEBBER,W AND GRANDO, SA. Biological Effects of SLURP-1 on Human Keratinocytes. **J Invest Dermatol** 125:1236 –1241, 2005.

ARTHUR D.R. Feeding in ectoparasitic acari with special reference to tick. **Adv Parasitol** 3:249-98. 1965.

ASKEANSE PW, ATWOOD JE. Basophils in tuberculin and “Jones-Mote” delayed reactions of humans. **J Clin Invest** 58: 1145-1154, 1976.

BANDEIRA-MELO C, SUGIYAMA K, WOODS LJ, et al. IL-16 promotes leukotriene C<sub>4</sub> and IL-4 release from human eosinophils via CD4-and autocrine CCR3-chemokine-mediated signaling. **J Immunol** 168: 4756-4763, 2002.

BARKER, D.M., OWNBY,C.L., KROLAK,J.M, CLAYPOOL,P.L. & SAUER, J.R. The effects of attachment, feeding and mating on yhr motphology of the type I alveolus of the salivary glands of the lone star tick *A. americanum*. **Journal of Parasitology** 70, 99-113, 1984.

BARKER S.C., MURREL, A., Phylogeny, evolution and historical zoogeografy of tick: A Review of recent progress. **Exp. Appl. Acarol.**, 28: 55-68, 2002.

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

- BENNET G.F. Oviposition of *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acarina:Ixodidae). II. Influences of temperature, humidity and light. **Acarology**.16:250-7, 1974
- BENNET GF. Oviposition of *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acarina:Ixodidae). II. Influences of temperature, humidity and light. **Acarologia** 1974;16:250-7.
- BENNETT GF. Oviposition of *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acarina:Ixodidae). II. Influences of temperature, humidity and light. **Acarologia**, 16: 250-7,1974.
- BINNINGTON K.C.; STONE B.F. Distribution of catecholamines in the cattle tick *Boophilus microplus*. **Comp Biochem Physiol**. 58(1C):21-8, 1977.
- BOWMAN A.S AND SAUER, J.R. Tick Salivary Glands: functions, physiology and future. **Parasitology**, 129: 77-81, 2004.
- BOWMAN, A.S., SAUER, J.R., ZHU K., DILLWITH, J.W. Biosynthesis of salivary prostaglandins in the lone star tick, *Amblyomma americanum*. **Insect Biochem Mol Biol**. 25 (6): 735-41, 1995.
- BROSSARD M, FIVAZ V. *Ixodes ricinus*: mast cells, basophils and eosinophils in the sequence of cellular events in the skin of infested or re-infested rabbits. **Parasitology**. 85: 583-592, 1982.
- BROWN SJ, BAGNALL BG, ASKENASE PW. *Ixodes holocyclus*: kinetics of cutaneous basophil responses in naive, and actively and passively sensitized guinea pigs. **Exp Parasitol**, 57(1):40-7, 1984.
- BROWN SJ, BARKER RW, ASKENASE PW. Bovine resistance to *Amblyomma americanum* ticks: an acquired immune response characterized by cutaneous basophil infiltrates. **Vet Parasitol**. 16(1-2):147-65. 1984.
- BROWN, S.J., ASKENASE, P.W. Blood eosinophil and basophil responses in guinea pigs parasitized by *Amblyomma americanum* ticks. **Am. J. Trop. Med. Hyg**. 31: 593-8. 1982.
- BURGNER D, XU W, ROCKETT K et al. Inducible nitric oxide synthase polymorphism and fatal cerebral malaria. **Lancet** 352: 1193-1194, 1998.
- CARMEN PENIDO, C., VIEIRA-DE-ABREU, A., BOZZA, M.T., CASTRO-FARIA-CGIAR **Annual Report**, 2002.
- CHAMPAGNE DE E VALENZUELA J. Pharmacology of haematophagous arthropod saliva. **The Immun.of Host-Ectop. Arthro. Relationships**. SK Wikel editor. CAB International, Wallingford 85-106,1996.
- CHEN Y.H., BIENEMAN A.P., CRETICOS P.S., CHICHESTER K.L., SCHROEDER J.T. IFN-alpha inhibits IL-3 priming of human basophil cytokine secretion but not leukotriene C4 and histamine release. **J All. Clin Immunol**. 112: 944-950, 2003.

- CHEN YH, BIENEMAN AP, CRETICOS PS, CHICHESTER KL, SCHROEDER JT. IFN- $\alpha$  inhibits IL-3 priming of human basophil cytokine secretion but not leukotriene C4 and histamine release. **J All. Clin Immunol.** 112: 944-950, 2003.
- COONS LB, KAUFMAN WR. Evidence that developmental changes in type III acini in the tick *Amblyomma hebraeum* (Acari:Ixodidae) are initiated by hemolymph-borne factor. **Exp Appl Acarol.** 4:117-39.1988.
- CUPP,E. Biology of ticks. **Vet. Clin. N. Am.: Small Anim. Pract.** 21 (1): 1-25,1991.
- DAJOTOY T., ANDERSSON P., BJARTELL A., LOFDAHL C.G., TAPPER H., EGESTEN A. Human eosinophils produce the T cell-attracting chemokines MIG and IP-10 upon stimulation with IFN- $\gamma$ . **J Leukoc Biol.** 76: 685-91, 2004.
- DE MIRANDA SANTOS I.K.F., VALENZUELA J.G., RIBEIRO J.M.C., et al. Gene discovery in *Boophilus microplus*, the cattle tick: the transcriptomes of ovaries, salivary glands, and hemocytes. **Ann N Y Acad Sci.** 1026: 242-6, 2004.
- DE PAULIS A., MONTUORI N., PREVETE N., et al. Urokinase induces basophil chemotaxis through a urokinase receptor epitope that is an endogenous ligand for formyl peptide receptor-like 1. **J. Immunol** 173: 5739-5748, 2004.
- DEMEURE, C. E., L. P. YANG, C. DESJARDINS, et al. Prostaglandin E<sub>2</sub> primes naive T cells for the production of anti-inflammatory cytokines. **Eur. J. Immunol.** 27:3526-3531, 1997.
- DOUBLE B.M., KEMP D.H. The influence of temperature, relative humidity and host factors on the attachment and survival of *Boophilus microplus* (Canestrini) larvae to skin slices. **Int J Parasitol.** 9:449-54. 1979.
- ERVIN RT, EPPLIN FM, BYFORD RL, HAIR JA. Estimation and economic implication of lone star tick (Acari, Ixodidae) infestation on weight-gain of cattle, *Bos taurus* and *Bos indicus* x *Bos taurus*. **J Econ Entomol** 80:443-45, 1987.
- FALCONE FH, PRITCHARD, GIBBS BF. Do basophils play a role in immunity against parasites? **Trends Parasitol** 17: 126-129, 2001.
- FARIAS NA DA R. Diagnóstico e controle da tristeza parasitária bovina. **Guaíba/RS: Agropecuária;** 1995.
- FEARON, D.T. The complement system and adaptative immunity. **Seminars in Immunology** 10: 355-361.1998.
- FELDMAN-MUHSAM B, BORUT S, SALITERNIK-GIVANT S. Salivary secretion of the male tick during copulation. **J Insect Physiol.** 16(10):1945-9, 1970.
- FERLAND C, FLAMAND N, DAVOINE F, CHAKIR J, LAVIOLETTE M. IL-16 activates plasminogen-plasmin system and promotes human eosinophil migration into extracellular matrix via CCR3-chemokine-mediated signaling and by modulating CD4 eosinophil

expression. **J Immunol** 173:4417-24, 2004.

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

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

FERREIRA BR, SILVA JS. Successive tick infestations selectively promote a T helper 2 cytokine profile in mice. **Immunology**, 96: 434-440, 1999.

FISCHER J, BOUADJAR B, HEILIG R, et al. Mutations in the gene encoding SLURP-1 in Mal de Meleda. **Hum Mol Genet** 10:875-880, 2001.

FLECHTMANN CHW. ÁCAROS DE IMPORTÂNCIA Médico Veterinária. 2 ed. São Paulo: **Nobel**; 1990.

FRANCIS J, LITTLE DA. Resistance of droughtmaster cattle to tick infestation and babesiosis. **Aust Vet J** 40:247-53, 1964 .

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

FRAUENSCHUH A, POWER CA, DÉRUAZ M, FERREIRA BR, SILVA JS, TEIXEIRA MM, DIAS JM, MARTIN T, WELLS TN, PROUDFOOT AE. Molecular cloning and characterization of a highly selective chemokine-binding protein from the tick *Rhipicephalus sanguineus*. **J Biol Chem** 14: 282(37), 27250-8, 2007.

FRISCH JE, DRINKWATER R, HARRISON B, JOHNSON S. Classification of the southern African sanga and east African shorthorned zebu. **Anim Genet**, 28(2):77-83, Apr/1997.

FURQUIM, K.C.S, BECHARA, G.H, CMARGO-MATHIAS, M. Cytoplasmic RNA and nuclear changes detected cytochemically during the degeneration of salivary glands of the tick *R. sanguineus* . *Micron* (no prelo).

GANAPAMO F, RUTTI B, BROSSARD M. Immunosuppression and cytokine production in mice infested with *Ixodes ricinus* ticks: a possible role of laminin and interleukin-10 on the in vitro responsiveness of lymphocytes to mitogens. **Immunology**, 87(2):259-63, 1996.

Gill HS, Walker AR. Differential cellular responses at *Hyalomma anatolicum anatolicum* feeding sites on susceptible and tick-resistant rabbits. **Parasitology**, .3:591-607, 1985.

- GILLESPIE RD, DOLAN MC, PIESMAN J, TITUS RG. Identification of an IL-2 binding protein in the saliva of the Lyme disease vector tick, *Ixodes scapularis*. **J Immunol** 166: 4319-4326, 2001.
- GIROLOMONI, G., SEBASTIANI, S., ALBANESI, C. & CAVANI, A. T-cell subpopulations in the development of atopic and contact allergy. **Curr. Opin. Immunol.** 13: 733-737 (2001)
- GOEBELER M, TRAUTMANN A, VOSS A, BRÖCKER EV, TOKSOY A, GILLITZER . Differential and sequential expression of multiple chemokines during elicitation of allergic contact hypersensitivity. **Am J Pathol.** 158(2):431-40, feb/2001.
- GONZÁLES JC. O controle do carrapato do boi. **Porto Alegre: Edição do Autor** 1995.
- GONZÁLES, J.C. **O Carrapato do Boi: vida, resistência e controle.** São Paulo: **Mestre Jou**, 101, 1974.
- GONZALES, J.C. **O Controle dos carrapatos dos bovinos.** Porto Alegre: Sulina, 104. 1975.
- GRISI L.MASSARD C.L., MOYA BORJA G.E., PEREIRA J.B. Impacto Econômico das Principais Ectoparasitoses em Bovinos no Brasil. **À Hora Veterinária** 125: 8-10, 2002.
- GYETKO MR, SUD S, CHENSUE SW. Urokinase-deficient mice fail to generate a type 2 immune response following schistosomal antigen challenge. **Inf Immunity** 72: 461-467, 2004.
- HAJNICKA V, KOCAKOVA P, SLAVIKOVA M, et al. Anti-interleukin-8 activity of tick salivary gland extracts. **Parasite Immunol** 23: 483-489, 2001.
- HANNIER S, LIVERSIDGE J, STERNBERG JM, BOWMAN AS. *Ixodes ricinus* tick salivary gland extract inhibits IL-10 secretion and CD69 expression by mitogen-stimulated murine splenocytes and induces hyporesponsiveness in B lymphocytes. **Parasite Immunol.** 25: 27-37, 2003.
- HARRIS, R.A & KAUFMAN, W.R. Hormonal Control of salivary gland degeneration on the ixoidid tick, *A. hebraeum*. **J Insect Physiol** 27, 2421-48, 1981.
- HARRIS, S.G., PADILLA, J., KOUMAS, L., RAY, D. & PHIPPS, R.P. Prostaglandins as modulators of immunity. **Trend's In Immunology**, 23: 144-50, 2002
- HARTNELL A, HEINEMANN A, CONROY DM, WAIT R, et al. Identification of selective basophil chemoattractants in human nasal polyps as insulin-like growth factor-1 and insulin-like growth factor-2. **J Immunol** 173: 6448-57, 2004.
- HEINEMANN A, HARTNELL A, STUBBS VEL, et al. Basophil Responses to Chemokines Are Regulated by Both Sequential and Cooperative Receptor Signaling. **J Immunol.** 165: 7224-33, 2000.
- HIGUCHI M, MIYASHITA N, AWATA T. Rapid communication: a PCR-RFLP in the coding region of the bovine tumor necrosis factor-alpha locus. **J Anim Sci** 77: 3400-01, 1999.



- HIRAI K, MIYAMASU M, YAMAGUCHI M, NAKAJIMA K, OHTOSHI T, KOSHINO T, TAKAISHI T, MORITA Y, ITO K. Modulation of human basophil histamine release by insulin-like growth factors. **J Immunol.**, 150(4):1503-8 feb/1993.
- HONER MR, GOMES A. O manejo integrado de mosca-dos-chifres, berne e carrapato em gado de corte. **Circular Técnica EMBRAPA-CNPGC** 22:1-60, 1990.
- HOOGSTRAAL H. WASSEF HY. Dermacentor (Indocentor)arosignatus (Acari; Ixodoidea: Ixodidae): hosts and distribution in the Malay Peninsula, Indonesia, Borneo and Southern Philippines. **J Med Entomol.** 22(6): 644-7, 1985.
- HOSKINS, J.D.; CUPP,E.W. Ticks of veterinary importance. Part I. The Ixodidae family: identification, behavior and associated diseases. **Comp. Cont. Educ. Pract. Vet.** 10: 564-80, 1988.
- HULTNER,L., EHRENREICH,H. Mast cells and endothelin-1: alife-saving biological liaison? **Trend's in Immunology** 26(5): 2005.
- JOÃO MORELLI FILHO. Imunopatologia das reações de hipersensibilidade cutânea a antígenos do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. 2005. Tese (Doutorado em Patologia Veterinária) - FACULDADE DE CIENCIAS AGRARIAS E VETERINARIAS.
- JOHNSTON L.A.Y., KEMP D.H & PEARSON R.D. Immunization of cattle against *Boophilus microplus* using extract derived from adult female ticks: Effects of induced immunity on tick populations. **International Journal for Parasitology.** 16: 27-34, 1986.
- KASHINO SS, RESENDE JJ, SACCO AMS, et al *Boophilus microplus*: The pattern of bovine immunoglobulin isotype responses to high and low tick infestations. **Exp Parasit**, 110: 12-21, 2005.
- KEMP DH, BOURNE A. *Boophilus microplus*: the effect of histamine on the attachment of cattle-tick larvae-studies in vivo and in vitro. **Parasitol.** 80:487-496, 1980.
- KLUNKER, S. ET AL. A second step of chemotaxis after transendothelial migration: keratinocytes undergoing apoptosis release IFN- $\gamma$ -inducible protein 10, monokine induced by IFN-g, and IFN-g-inducible  $\alpha$ -chemoattractant for T cell chemotaxis toward epidermis in atopic dermatitis. **J. Immunol.** 171, 1078–84, 2003.
- KUNA, P, REDDIGARI SR, SCHALL TJ, et al. Characterization of the human basophil response to cytokines, growth factors and histamine releasing factors of the intercrine/chemokine family. **J Immunol** 150: 1932-43, 1993.
- KUNZ SE, KEMP DH. Insecticides and acaricides: resistance and environmental impact. **Rev Sci Tech.** 13:1249-86, 1994.
- KUPPER TS, FUHLBRIGGE RC. Immune surveillance in the skin: mechanisms and clinical consequences. **Nat. Rev. Immunology**, 4(3):211-22, 2004.
- KUPPER, T. S. & GROVES, R. W. The interleukin-1 axis and cutaneous inflammation. **J. Invest. Dermatol.** 105,62S–66S, 1995.

KUPPER, T. S., CHUA, A. O., FLOOD, P., MCGUIRE, J. & GUBLER, U. Interleukin 1 gene expression in cultured human keratinocytes is augmented by ultraviolet irradiation. **J. Clin. Invest.** 80, 430–436, 1987.

LÁSZLÓ SZALAY, JÓZSEF KASZAKI, SÁNDOR NAGY, MIHÁLY BOROS. Endothelin-1 induces mucosa mast cell degranulation in the rat small intestine. **Life Sciences** 67, 1947-58, 2000.

LEBMAN DA, COFFMAN RL. Interleukin 4 causes isotype switching to IgE in T cell-stimulated clonal B cell cultures. **J Exp Med.** 168:853-62, 1988

LEMOS, A.M. A Resistência Genética de Bovinos e o Controle do Carrapato. Documento Embrapa/CNPGL, Coronel Pacheco, 6: 42, 1986.

MANS BJ, NEITZ AW. Adaptation of ticks to a blood-feeding environment: evolution from a functional perspective. **Insect Biochem Mol Biol.** 34(1):1-17, 2004.

MARONE G, TRIGGIANI M, DE PAULIS A. Mast cells and basophils: friends as well as foes in bronchial asthma? **Trend's Immunol** 26: 25-30, 2005.

MASSARD CL, FONSECA AH, BITTENCOURT VRE, *et al.* Avaliação da eficácia da vacina recombinante rBm86 “GAVAC” contra o carrapato *Boophilus microplus* no Brasil. **R Bras Med Vet** 17: 167-173, 1998.

MATTIOLI RC. Comment on "A possible explanation of the apparent breed-related resistance in cattle to bont tick (*Amblyomma hebraeum*) infestations" by M.I. Meltzer, *Veterinary Parasitology* 67 (1996) 275-279. **Vet Parasitol.** 16;79(3):263-6, 1998.

MCLACHLAN JB, HART JP, PIZZO SV, *et al.* Mast cell-derived tumor necrosis factor induces hypertrophy of draining lymph nodes during infection. **Nat Immunol** 4: 1199-1205, 2003 *J Exp Med* 178:853-63, 1993.

MCLAREN DJ, WORMS MJ, ASKENASE PW. Cutaneous basophil associated resistance to ectoparasites (ticks). Electron microscopy of *Rhipicephalus appendiculatus* larval feeding sites in actively sensitised guinea pigs and recipients of immune serum. **J Pathol.** 139(3):291-308, Mar/1983.

MELTZER MI. A possible explanation of the apparent breed-related resistance in cattle to bont tick (*Amblyomma hebraeum*) infestations. **Vet Parasitol.** 31; 67(3-4): 275-9, 1996.

MITCHELL, M. Acaricide resistance-back to basics. **Trop. Anim. Prod.** 28. 53-58. 1996.

MONTEIRO, R.Q., REZAIIE, A.R., RIBEIRO, J.M., FRANCISCHETTI, I.M. Ixolaris: a factor Xa heparin-binding exosite inhibitor. **Biochem. J.** 387: 871–877, 2005.

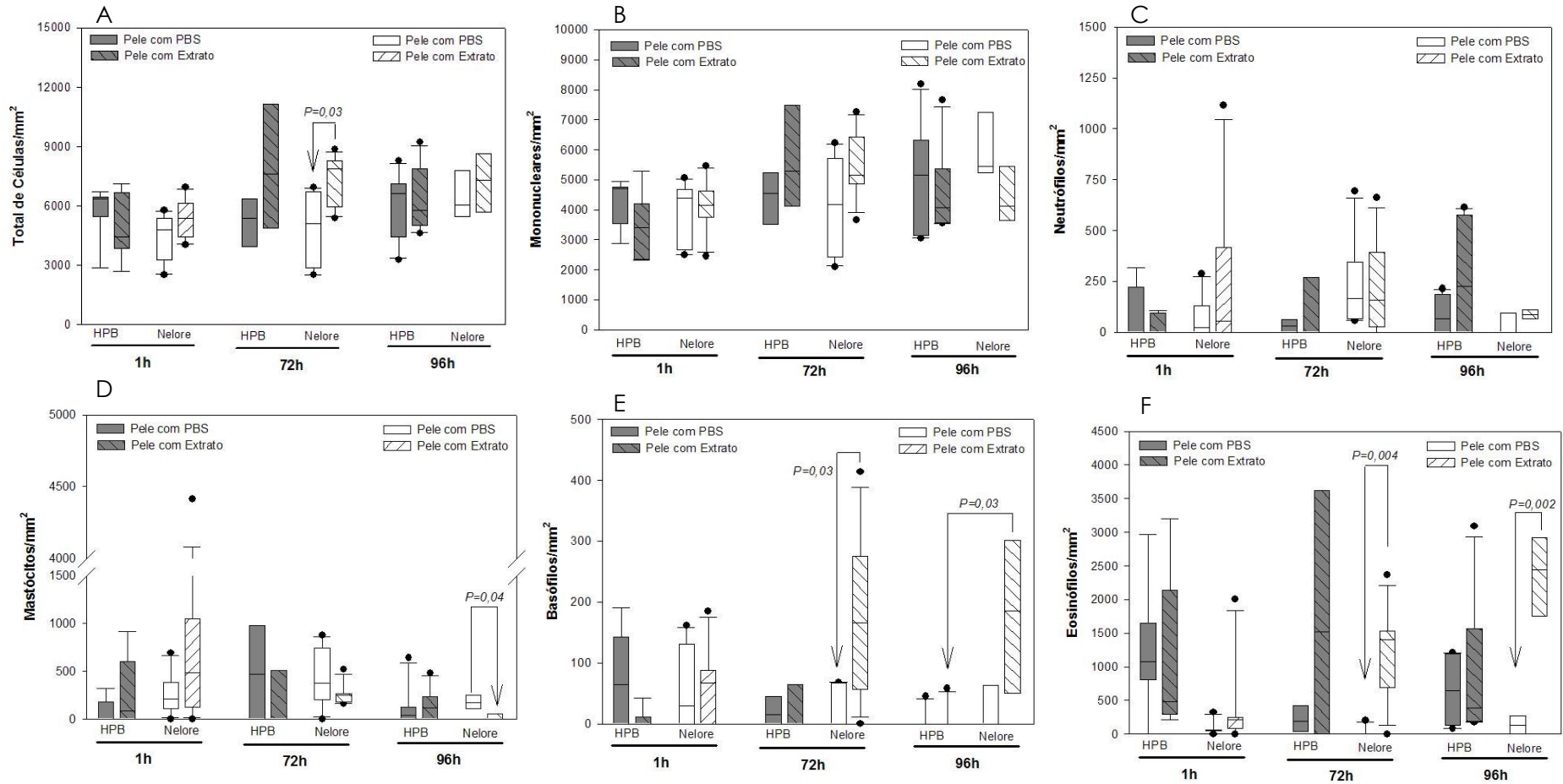
NOLAN, T., HANDS, E.R. & BUSTIN, S.A. Quantification of mRNA using real time RT-PCR. **Nature Protocols.** 1(3):1559-82. 2006.

- NUÑES JL, MUÑOZ COBENAS ME, MOLTEDO HL. *Boophilus microplus*, la garrapata comun del ganado vacuno. 1a ed. Buenos Aires: Hemisfério Sur; 1982.
- OAKS JF, MCSWAIN JL, BANTLE JA, ESSENBERG RC, SAUER JR. Putative new expression of genes in ixodid tick salivary gland development during feeding. **J Parasitol** 1991;77:378–83.
- ODEMUYIWA SO, GHAHARY A, LI Y, ET AL CUTTING EDGE: Human eosinophils regulate T cell subset selection through indoleamine 2,3-dioxygenase. **J Immunol** 173: 5909-5913, 2004.
- OLIVEIRA RB, MORAES MO, OLIVEIRA EB, SARNO EN, NERY JA, SAMPAIO EP. Neutrophils isolated from leprosy patients release TNF-alpha and exhibit accelerated apoptosis in vitro. **J Leukoc Biol.**;65(3):364-71, 1999.
- OLIVEIRA, G.P, ALENCAR, M.M., FREITAS, A.R. Resistência de bovinos ao carrapato *B. microplus* II. Infestação Natural. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, 24: 10, 1267-71, 1989.
- PACKILA M, GUILFOILE,PG. Mating, male *Ixodes scapularis* express several genes including those with sequence similarity to immunoglobulin-binding proteins and metalloproteases. **Exp Appl Acarol.** 2002;27(1-2):151-60.
- PAESEN GC, ADAMS PL, HARLOS K, NUTTALL PA, STUART DI. Tick histamine-binding proteins: isolation, cloning and three-dimensional structure. **Molecular Cell**, 3:661–71, 1999.
- PAINE SH, KEMP DH, ALLEN JR. In vitro feeding of *Dermacentor andersoni* (Stiles): effects of histamine and other mediators. **Parasitology**, 86 : 419-28, 1983.
- PEREIRA MC. *Boophilus microplus*: revisão taxonômica e morfológica. **Rio de Janeiro: Químico Divisão Veterinária**, 1982.
- PHILIP W. ASKENASE and J. EDWARD ATWOOD Basophils in Tuberculin and "Jones-Mote" Delayed Reactions of Humans. **The Journal of Clinical Investigation** 58: 1145-1154, Nov/1976.
- PHILIPS C, COWARD WR, PRITCHARD DI, HEWITT CRA. Basophils express a type 2 cytokine profile on exposure to proteases from helminths and house dust mites. **J Leukoc Biol** 73: 165-171, 2003.
- PHILLIPS RM, STUBBS VEL, HENSON MR, WILLIAMS TJ, PEASE JE, SABROE I. Variations in Eosinophil Chemokine Responses: An Investigation of CCR1 and CCR3 Function, Expression in Atopy, and Identification of a Functional CCR1 Promoter **J Immunol** 170: 6190-6201, 2003.
- PHIPPS S, FLOOD-PAGE P, MENZIES-GOW A, ONG YE, KAY AB. Intravenous anti-IL-5 monoclonal antibody reduces eosinophils and tenascin deposition in allergen-challenged human atopic skin. **J Invest Dermatol.** 122:1406-12, 2004.

- PHIPPS S, YING S, WANGOO A, ONG YE, LEVI-SCHAFFER F, KAY AB. The relationship between allergen-induced tissue eosinophilia and markers of repair and remodeling in human atopic skin. **J Immunol** 169:4604-12, 2002
- PIVARSCI A. Toll-like receptor 9-independent suppression of skin inflammation by oligonucleotides, **Invest Dermatol.** 127(4):746-8, 2007.
- PLSKOVA, J., GREINER, K., MUCKERISE, E., DUNCAN L., FORRESTER J. V. INF $\alpha$ : a key factor in autoimmune disease? **Ophthalmol. Vis. Sci.** 47(9): 3946-50, Sep/2006.
- PRUETT JH. Immunological control of arthropod ectoparasites, a review. **Int J. Parasitol.** 29: 25-32, 1999.
- QI JC, STEVENS RL, WADLEY R, et al. IL-16 regulation of human mast cells/basophils and their susceptibility to HIV-1. **J Immunol** 168:4127-34, 2002.
- QIAN Y, YUAN J, ESSENBERG RC, BOWMAN AS, SHOOK AL, DILLWITH JW, SAUR, J.R. Prostaglandin E2 in the salivary glands of the female tick, *Amblyomma americanum* (L.): calcium mobilization and exocytosis. **Insect Biochem Mol Biol.** Apr; 28(4):221-8, Apr/1998.
- REMUZZI G, PERICO N, BENIGNI A. New therapeutics that antagonize endothelin: promises and frustrations. **Nature Rev Drug Disc.** 1:986-1001. doi: 10.1038 ,2002.
- RIBEIRO JM. *Ixodes dammini*: salivary anti-complement activity. **Exp Parasitol.** 64(3):347-53, 1987.
- RIBEIRO JM. Role of saliva in tick/host interactions. **Expl Appl Acarol** 1989;7:15-20.
- RIBEIRO JMC. How ticks make a living. **Parasitol Today** 11: 91-93, 1995
- RIBEIRO, J.M.C. Blood-feeding arthropods: Live syringes or invertebrate pharmacologists? **Infection Agents and Diseases** 4, 143-152. 1995.
- RIBEIRO, J.M.C., MAKOUL, G.T., LEVINE, J., ROBINSON, D.R. & SPIELMAN, A. Antihemostatic, antiinflammatory and immunosuppressive properties of the saliva of a tick, *Ixodes dammini*. **Journal Experimental Medicine**, 161, 332-344, 1985.
- ROBERTS JA, KERR JD. *Boophilus microplus*: passive transfer of resistance in cattle. **J Parasitol.** 62(3):485-8, 1976.
- RODRIGUEZ M, PENICHET ML, MOURIS AE, et al. Control of *Boophilus microplus* populations in grazing cattle vaccinated with a recombinant Bm86 antigen preparation. **Vet Parasitol** 57:339-349, 1995
- SAMBROOK J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. Molecular cloning. A laboratory manual. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, second edition, New York, 1989.
- SAUER JR, ESSENBERG RC, BOWMAN AS. Salivary glands in ixodid ticks: control and mechanism of secretion. **J Insect Physiol** 46:1069-78, 2000.
- SAUER JR. Prostaglandin E2 in the salivary glands of the female tick, *Amblyomma americanum* (L.): calcium mobilization and exocytosis. **Insect Biochem Mol Biol.** 28(4):221-8, 1998.
- SCHNEIDER E, TONANNY M-B, LISBONNE M, LEITE-DE-MORAES M, DY M. Pro-

- Th1 cytokines promote Fas-dependent apoptosis of immature peripheral basophils. **J Immunol** 172: 5262-5268, 2004.
- SHARP LL, JANESON JM, CAUVI G, HAVRAN WL. Dendritic epidermal T cells regulate skin homeostasis through local production of insulin-like growth factor 1. **Nature Immunology** 6: 73-79, 2005.
- SHER A, GAZZINELLI RT, OSWALD IP, CLERICI M, KULLBERG M, PEARCE EJ, BERZOFISKY JA, MOSMANN TR, JAMES SL, MORSE HC. Role of T-cell derived cytokines in the downregulation of immune responses in parasitic and retroviral infection. **Immunol Rev.** 127:183-204, Jun/1992.
- SIGAL MD, YODER JA, NEEDAM GR. Palp-splaying behavior and a specific mouthpart site associated with active water vapor uptake in *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae). **J Med Entomol.** 36: 365-9, 1999.
- SONENSHINE, D.E. Biology of tick, **Oxford University**, New York. 1: 1991.
- STEINHOFF, M., BRZOSKA, T. & LUGER, T. A. Keratinocytes in epidermal immune responses. **Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.** 1, 469–476 (2001).
- STEINHOFF M, NEISIUS U, IKOMA A, FARTASCH M, HEYER G, SKOV PS, LUGER TA, SCHMELZ M. Proteinase-activated receptor-2 mediates itch: a novel pathway for pruritus in human skin. **J Neurosci.** 23(15):6176-80, Jul/2003.
- SZABÓ MPJ, BECHARA GH. Sequential histopathology at the *Rhipicephalus sanguineus* tick feeding site on dogs and guinea pigs. **Exp Appl Acarol.** 23: 915-928, 1999.
- TATCHELL RJ, BENNETT GF. *Boophilus microplus*: antihistaminic and tranquillizing drugs and cattle resistance. **Exp Parasitol**, 26:369–77, 1969.
- TATCHELL RJ. A modified method for obtaining tick oral secretion. **J Parasitol**, 53:1106–7, 1967.
- TERNESS P, BAUER TM, RÖSE L, DUFTER C, WATZLIK A, SIMON H, OPELZ G. Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites. **J Exp Med.** 2002 Aug 19;196(4):447-57, 2002.
- TRAGER, W. Acquired immunity to ticks. *Journal of Parasitology* 25: 57-81, 1939.
- TUO W, BAZER FW, DAVIS WC, ZHU D, BROWN WC. Differential effects of type I IFNs on the growth of WC1<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T cells and WC1<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> γδ T cells in vitro. **J Immunol** 162: 245-253, 1999.
- UTECH KWB, WHARTON RH, KERR JD. Resistance to *Boophilus microplus* (Canestrini) in different breeds of cattle. **Aust J Agric Res** 1978;29:885–95.
- UTHAYAKUMAR, S., NANDWANI, R., DRINKWATER, T., NAYAGAM, A. T. Valenzuela JG, Francischetti IM, Pham VM, Garfield MK, Mather TN, Ribeiro JM. Exploring the sialome of the tick *Ixodes scapularis*. **J Exp Biol.** 205(Pt 18):2843-64, 2002.

- WAGLAND BM. Host resistance to cattle tick (*Boophilus microplus*) in Brahman (*Bos indicus*) cattle. III. Growth on previously unexposed animal. **Aust J Agri Res**, 29:401-9, 1978.
- WALCHECK B, WATTS G, JUTILA MA. Bovine gamma/delta T cells bind E-selectin via a novel glycoprotein receptor: first characterization of a lymphocyte/E-selectin interaction in an animal model. **J Exp Med** 178:853-63, 1993.
- WANG H, NUTTALL PA. Immunoglobulin-G binding proteins in the ixodid ticks, *Rhipicephalus appendiculatus*, *Amblyomma variegatum* and *Ixodes hexagonus*. **Parasitology**. 111: 161-5, Aug/1995
- WIKEL S.K. Host immunity to ticks. **Ann Rev Entomol** 41: 1-22, 1996.
- WILLADSEN P, BIRD P, COBON GS, HUNGERFORD J. Commercialisation of a recombinant vaccine against *Boophilus microplus*. **Parasitology** 110: S43-S50, 1995
- WILLADSEN P, WOOD GM, RIDING GA. The relation between skin histamine concentration, histamine sensitivity, and the resistance of cattle to the tick, *Boophilus microplus*. **Z Parasitenkd.** 59(1):87-93, 1979.
- WILLADSEN P. & JONGEJAN F. Immunology of the tick host interaction and the control of ticks and tick-borne diseases. **Parasitology Today** 15: 258-262, 1999.
- WILLADSEN P. & JONGEJAN F. Immunology of the tick host interaction and the control of ticks and tick-borne diseases. **Parasitology Today** 15: 258-262, 1999
- WONG, E., CAMP, R. D. R. & GREAVES, M. W. The responses of normal and psoriatic skin to single and multiple topical applications of leukotriene B<sub>4</sub>. **J. Invest. Dermatol.** 84: 421-423, 1985.
- VALENZUELA JG, FRANCISCHETTI IM, PHAM VM, GARFIELD MK, MATHER TN, RIBEIRO JM. Exploring the sialome of the tick *Ixodes scapularis*. **J Exp Biol.** 205 (Pt 18):2843-64, 2002.



**Gráficos das Quantificações Celulares Global e Diferencial no Infiltrado Inflamatório de Pele de Holandeses (HPB) e Nelores Tratada com Extrato de Larva de *B. microplus* não alimentadas ou PBS.** A) Quantificação Total das Células no Infiltrado, B) Quantificação de Mononucleares, C) Quantificação de Neutrófilos, D) Quantificação de Mastócito, E) Quantificação de Basófilos, F) Quantificação de Eosinófilos.

**ANEXO A- Descrição da Técnica de Colaração Picrosírius-red em Bópsias de Pele Bovina Exposta a Infestação Natural pelo *B. microplus*.**

1- O tecido cortado foi colocado em banho histológico 45°C para extensão e aquisição do tecido com utilização de lâmina histológica.

2- As lâminas contendo os cortes foram armazenadas em estufa a 60°C para desparafinização e fixação do tecido por um período de 24 horas. Uma vez retirado o excesso de parafina as lâminas permaneceram 2hr em T.A.

3- Xilol I por 20min,

4- Xilol II por 20min,

5- Banhos rápidos em Álcool Absoluto I, Álcool Absoluto II e Álcool 95 Álcool 80, em sequência.

6- Banho em Água corrente da torneira 3 min.

7- Ácido Fosfomolibdico (GOLD LAB) 5% por 2min.

8- Lavar em Água destilada (1 banho rápido).

9- Picrosírius Red (SIGMA) por 90min.

10- Lavar em Água destilada (3 banhos seguidos)

11- Ácido Clorídrico 0,01N por 2min.

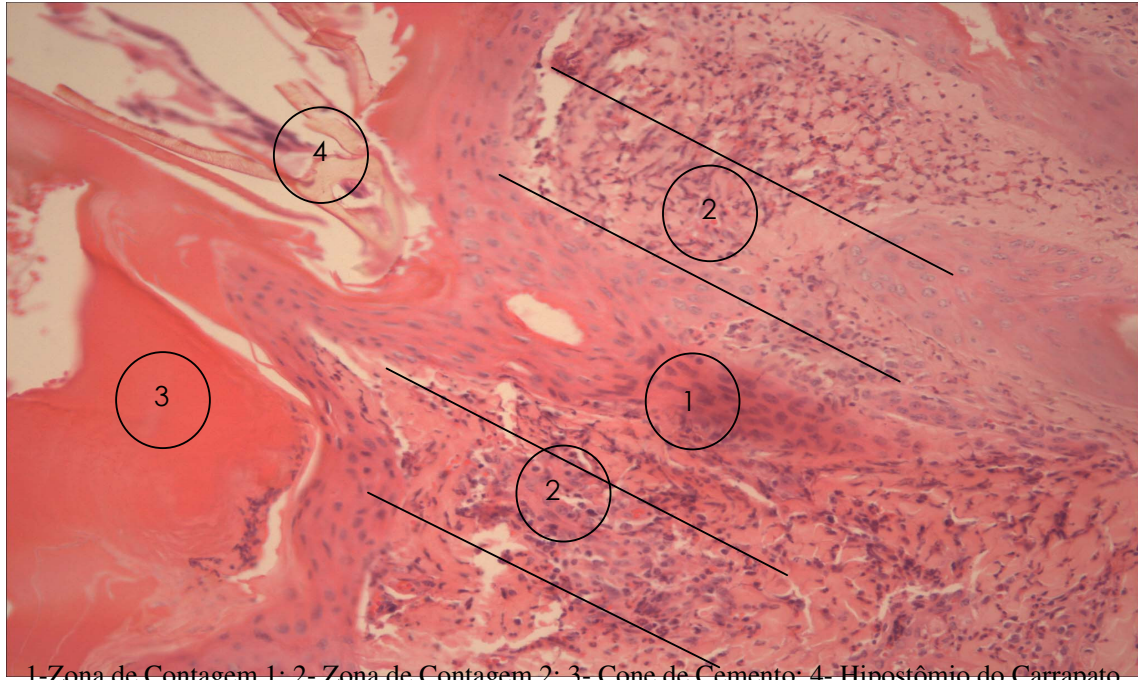
12- Banho em água destilada

13 - Etanol 70% por 40seg.

14 – Montagem da lâmina



**ANEXO B** – Ilustração da Fixação do *B. microplus* em Pele Bovina e Divisão Esquemática das Zonas de Contagem Preconizadas por Szabó (1995).



1-Zona de Contagem 1; 2- Zona de Contagem 2; 3- Cone de Cimento; 4- Hipostômio do Carrapato.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)