

Daniela Dantas Moré

Modulação da resposta imune pela saliva de carrapatos

***Rhipicephalus sanguineus*: estudo do envolvimento**

de células T regulatórias

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, para obtenção do Grau de Mestre em Imunologia Básica e Aplicada.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Beatriz Rossetti Ferreira

Colaboração: Prof^ª. Dr^ª. Ana Paula Campanelli

Ribeirão Preto

2006

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

FICHA CATALOGRÁFICA

Moré, Daniela Dantas

Modulação da resposta imune pela saliva de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus*: estudo do envolvimento de células T regulatórias. Ribeirão Preto, 2006.

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

Orientador: Ferreira, Beatriz Rossetti.

1. Modulação da resposta imune – 2. Células T regulatórias – 3. Saliva – 4. Carrapatos – 5. *Rhipicephalus sanguineus*

Daniela Dantas Moré

Modulação da resposta imune pela saliva de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus*: estudo do envolvimento de células T regulatórias

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, para obtenção do Grau de Mestre em Imunologia Básica e Aplicada.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Beatriz Rossetti Ferreira

Colaboração: Prof^a. Dr^a. Ana Paula Campanelli

Data da Aprovação: / /

Prof^a. Dr^a. Beatriz Rossetti Ferreira – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto -
Universidade de São Paulo (FMRP-USP)

Prof^a. Dr^a. Vânia Luiza Deperon Bonato Martins – Faculdade de Medicina de Ribeirão
Preto – Universidade de São Paulo (FMRP-USP)

Prof^a. Dr^a. Luciana de Deus Vieira de Moraes – Instituto de Ciências Biomédicas –
Universidade de São Paulo (ICB-USP)

Ribeirão Preto

2006

Veja, não diga que a canção está perdida
Tenha fé em Deus, tenha fé na vida
Tente outra vez
Beba, pois a água viva ainda tá na fonte
Você tem dois pés para cruzar a ponte
Nada acabou
Não, não, não
Tente, levante sua mão sedenta e recomece a andar
Não pense que a cabeça agüenta se você parar
Não, não, não
Há uma voz que canta, uma voz que dança, uma voz que gira
Bailando no ar
Queira, basta ser sincero e desejar profundo
Você será capaz de sacudir o mundo
Tente outra vez
Tente e não diga que a vitória está perdida
Se é de batalhas que se vive a vida
Tente outra vez

Agradecimentos

Agradeço à Natureza, força maior que orchestra a existência de todo o Universo

A meus pais, pelo amor, carinho e apoio incondicional. Por me ajudar a crescer pessoal e profissionalmente. Por serem sempre tão presentes. Obrigado!

À minha irmã, pelo incentivo constante, pela ajuda financeira desde a graduação, pelo apoio, por cuidar dos nossos pais... ao Luiz Fernando, por fazer da Fernanda uma pessoa mais feliz.

A todos os meus familiares que ansiaram por este trabalho, mesmo muitas vezes sem entender o significado dele...

Ao Prof. Dr. João Santana da Silva, obrigado pela enorme ajuda, da moradia às desaprovações, pelas oportunidades de aprendizado, pelos recursos, pelas conversas de política, economia e culinária, “pelo sítio”... muito obrigado!

À Profa. Dra. Beatriz Rossetti Ferreira, muito obrigada por me aceitar como orientada e prontamente me incluir no grupo dos “carrapatólogos”... obrigada por acreditar em mim e me dar a oportunidade de trabalhar com o que almejava. Obrigado pelos cuidados, pela amizade sincera. Ainda vou te dar trabalho...

À Isabel, que com sua mente brilhante contribui enormemente para o aprendizado de todos, pelos comentários durante a execução deste trabalho, pelos agradáveis almoços, pelos cuidados maternos, pela amizade.

Aos demais professores do programa de pós-graduação, que contribuem para a formação dos novos pesquisadores do nosso país. Orgulhosos serão responsáveis por um Brasil melhor.

Ao Prof. Félix, por me introduzir no mundo científico. Você foi um exemplo... que esteja em paz...

Aos funcionários do biotério de criação: Júlio, um abraço especial... e não é só pelos camundongos; Cris e Rubinho, aliás um beijo especial prometido... aos funcionários do biotério central Sr. Antonio Ferreira de Souza e Sr. João Sérgio Epifânio (Sr. Bibi) que tão prestativamente nos ajudam... pelos cuidados com as cobaias e os cães e pela confiança... aos funcionários do biotério de experimentação, Edi e Sávio, pelos cuidados com os nossos animais.

D. Lúcia e meninas que mantêm nosso departamento limpo e agradável.

D. Lúcia da sala de lavagem, pelo apoio base.

Wander, por sua ajuda e carinho...por encher de graça nosso corredor e nos alegrar com sua música.

Xuxa, pelos cuidados com o laboratório.

Ana, pela infundável paciência...

Luís, pela amizade e auxílio...por cada centavo devolvido.

Walter, pela paciência e boa vontade em adquirir minhas células. Você se tornou fundamental para nossos trabalhos.

Olindo, pela enorme contribuição nos momentos de desamparo na citometria de fluxo.

A duas pessoas muito especiais pra mim, sem as quais os resultados desse trabalho não seriam os mesmos...Campanelli e Karen...vocês foram muito importantes pra mim... sempre prestativas em ajudar. Contribuíram muito para meu aprendizado. Vocês são exemplos a seguir. Obrigada pelos protocolos, discussões e correções. Obrigada mesmo...jamais me esquecerei...

Obrigada a todos os meus amigos de São Paulo, que mesmo de longe esperaram pelos resultados deste estudo.

A todos os amigos do Laboratório que muito contribuíram para o meu aprendizado, além do ótimo ambiente de trabalho: Beatriz, Isabel, João, Alessandra, Carlo, Wanessa, Elen,

Karen, Anika, Marcelão, Vanessa, Lucy, Sandra, Fredy, Mindu, Flávia, Neide, Luis, Lucinda, Pauline, Antonio, Gustavo, Cláudia, Wander, Jaqueline, Diego, Luciana.

Ao Carlo, grande companheiro de trabalho, e a Cláudia, por podermos aprender a trabalhar em grupo. À nossa colônia...

Aos amigos “ex” do lab: Ana Paula, Gustavo e Luciano, três grandes exemplos...saudades.

Obrigada Bi, pelo carinho e momentos de descontração.

Obrigada Jairo, companheiro de todas as horas.

Obrigada às que se tornaram minhas amigas pessoais: Alessandra, Wanessa e Elen... obrigada pelos bons momentos que tivemos juntas, pelas risadas, pelas experiências...

Animais, pela vida que doaram em prol destes estudos. A cada animalzinho sacrificado, uma lágrima de gratidão, esperança e tristeza...

Banca, pela contribuição na finalização deste trabalho e na confecção do manuscrito.

À Universidade de São Paulo e à FAPESP, por proporcionarem o desenvolvimento científico e tecnológico do país.

Aos contribuintes, pela contribuição anônima, mas fundamental...

Resumo

Carrapatos são artrópodes hematófagos de distribuição cosmopolita que têm grande importância médica e veterinária devido ao efeito deletério direto causado por se fixarem e sugarem seus hospedeiros, como também por serem importantes vetores de doenças para o homem e para os animais domésticos.

Sabendo que carrapatos permanecem fixos em seus hospedeiros por longos períodos de tempo sem serem rejeitados, é possível inferir que esses ácaros possuam um arsenal de mecanismos que atuem no controle da resposta imune do hospedeiro. De fato, diversos trabalhos têm demonstrado que carrapatos são capazes de modular a resposta imune de seus hospedeiros através de componentes presentes na saliva, que são inoculados durante o repasto sanguíneo. Assim, este trabalho procurou investigar se carrapatos exercem a modulação da resposta imune do hospedeiro através do recrutamento de células T regulatórias CD4⁺CD25⁺ (Tregs), com a intenção de conter uma resposta inflamatória / imune prejudicial à sua alimentação.

Para isso, células isoladas de amostras de pele e linfonodos de camundongos BALB/c infestados com carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* foram analisadas quanto à expressão das moléculas de superfície CD4, CD25, CTLA-4, CD45RB, GITR e CD103 (fenótipo de células Tregs), por citometria de fluxo. Adicionalmente, as células obtidas dos linfonodos foram avaliadas quanto à expressão de mensagem para o fator de transcrição Foxp3 (característico da função regulatória), por PCR quantitativo. Paralelamente, saliva de *R. sanguineus* foi inoculada na orelha de animais da mesma linhagem, a fim de se comparar o infiltrado celular com o obtido na pele dos camundongos infestados com carrapatos.

Os resultados mostraram que as infestações não alteraram a percentagem de células T CD4⁺CD25⁺ nem a expressão de moléculas associadas ao fenótipo de células Tregs nas células infiltradas na lesão de fixação dos carrapatos ou nos linfonodos em comparação a

camundongos controles. Também não se verificou aumento da expressão do gene para Foxp3 nos linfonodos em nenhum dos grupos analisados. Por outro lado, a inoculação de saliva na orelha de camundongos induziu um aumento significativo da população de células T CD4⁺, porém estas também não apresentavam fenótipo regulatório, sugerindo que o mecanismo de imunomodulação exercido pelos carrapatos sobre seus hospedeiros não é mediado por essas células.

Resultados adicionais mostraram que a saliva de carrapatos reduziu significativamente a percentagem de células dendríticas nas orelhas dos camundongos, sugerindo que carrapatos podem estar modulando a resposta imune de seus hospedeiros por diminuir o repovoamento da pele com células dendríticas, as quais são essenciais na vigilância imune dos tecidos periféricos.

Abstract

Ticks are bloodsucking arthropods that feed on vertebrates and are responsible for serious global economic losses both through the effects of blood sucking and as vectors of pathogens. A tick's bloodmeal lasts for several days, during which it remains fixed to the host and avoids rejection by local inflammatory and immunological reactions. This status is achieved by the escape mechanisms ticks have evolved. In fact, many studies have demonstrated that ticks modulate the host immune response through salivary compounds inoculated during their bloodmeals.

This study investigated if during bloodfeeding ticks can recruit regulatory T cells in an attempt to modulate the host immune response and to control inflammatory responses that could be harmful to tick feeding. BALB/c mice were infested with *Rhipicephalus sanguineus*, the skin at feeding sites and the regional lymph nodes were collected, and the cells forming the local infiltrates were analyzed by flow cytometry for simultaneous expression of CD4, CD25, CTLA-4, CD45RB, GITR and CD103 molecules. Additionally, expression of mRNA for Foxp3 was measured in the lymph node cells. Tick saliva was also inoculated into the ears of BALB/c mice in order to compare the local cellular infiltrate with that elicited by artificial infestation. Control animals were sham infested.

The results show that, relative to sham-infested tissues, tick infestations did not alter the percentage of CD4⁺CD25⁺ T cells present at the site of their attachment or in draining lymph nodes. Infestations also did not increase the expression of Foxp3 in skin and lymph nodes. On the other hand, saliva inoculated into the ear induced a significant increase in the number of CD4⁺ T lymphocytes recruited to the site of inoculation, although these cells did not express a regulatory phenotype. These results suggest that the modulation of the host immune response by ticks does not involve CD4⁺CD25⁺ T cells.

Additional results showed that tick saliva reduced the percentage of dendritic cells in the skin of infested mice. This finding indicates that ticks may modulate the host immune response by diminishing the repopulation of skin with dendritic cells, which are essential for maintaining surveillance of peripheral tissues for incoming antigens.

Abreviaturas

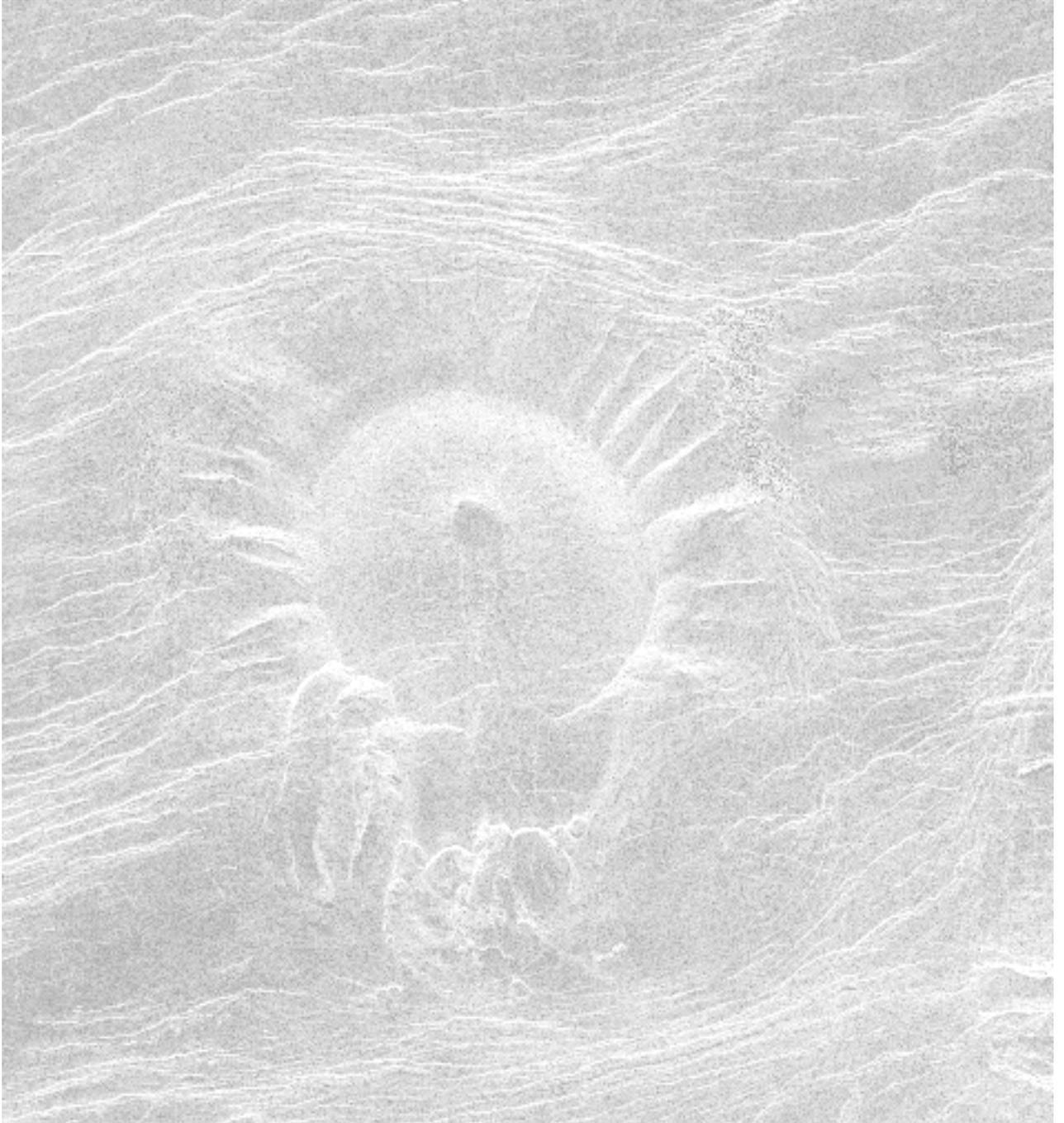
- APC:** células apresentadoras de antígeno
- BSA:** albumina sérica bovina
- CD:** *cluster of differentiation*
- Con-A:** concanavalina A
- FITC:** isotiocianato de fluoresceína
- IFN- γ :** interferon-gama
- IDO:** indoleamina 2,3 dioxigenase
- IL:** interleucina
- KC:** quimiocina derivada de queratinócito
- LPS:** lipopolissacarídeo
- MIP-1 α :** proteína inflamatória de macrófago -1 α
- NK:** *natural killer*
- PE:** ficoeritrina
- PBS:** solução tamponada fosfato
- PCR:** reação de polimerase em cadeia
- RAG:** gene ativador da recombinação
- RPMI:** meio de cultura RPMI 1640
- SBF:** soro bovino fetal
- TCR:** receptor de célula T
- Th:** linfócito T *helper*
- TGF- β :** fator de crescimento e transformação-beta

Sumário

1 INTRODUÇÃO.....	10
1.1 Relação Parasito-Hospedeiro.....	10
1.2 Células T Regulatórias.....	15
2 OBJETIVOS.....	21
2.1 Geral.....	21
2.2 Específicos.....	21
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
3.1 Animais Experimentais.....	22
3.1.1 Cães.....	22
3.1.2 Cobaias.....	22
3.1.3 Camundongos.....	22
3.2 Manutenção da Colônia de Carrapatos.....	23
3.3 Coleta de Saliva de Carrapatos.....	24
3.4 Inoculação de Saliva de Carrapatos em Camundongos.....	24
3.5 Infestação de Animais Experimentais.....	25
3.6 Separação de Leucócitos do Sítio de Inoculação/Fixação.....	25
3.7 Histopatologia.....	26
3.8 Anticorpos.....	27

3.9 Fenotipagem.....	27
3.10 Extração de RNA.....	27
3.11 Reação de RT-PCR para Confeção de DNA Complementar (cDNA).....	28
3.12 Reação de PCR Quantitativo.....	29
3.13 Marcação Intracelular Para o Fator de Transcrição Foxp3.....	30
3.14 Comitê de Ética.....	31
3.15 Análise Estatística dos Resultados.....	31
4 RESULTADOS.....	32
4.1 Análise Histopatológica da Pele de Camundongos Infestados ou Inoculados com Saliva de <i>R. sanguineus</i>	32
4.1.1 Efeito da Inoculação de Saliva na Pele do Dorso de Animais BALB/c.....	32
4.1.2 Efeito da Infestação por Carrapatos em Animais BALB/c.....	32
4.2 Análise das Células Isoladas da Pele de Animais Infestados com Carrapatos <i>R. sanguineus</i>	32
4.3 Análise das Células Isoladas dos Linfonodos de Animais Infestados com Carrapatos <i>R. sanguineus</i>	42
4.4 Determinação da Expressão do Fator de Transcrição Foxp3 nas Células dos Linfonodos de Animais Infestados.....	45

4.5 Análise das Células T Ativadas na Pele e Linfonodos de Animais Infestados com Carrapatos.....	47
4.6 Análise dos Granulócitos na Pele de Animais Infestados com Carrapatos.....	49
4.7 Inoculação de Saliva de Carrapatos <i>R. sanguineus</i>	49
4.7.1 Caracterização do Infiltrado Inflamatório Induzido pela Inoculação de Saliva.....	49
4.7.2 Avaliação da Presença de Células T Regulatórias.....	51
4.7.3 Células Dendríticas.....	55
5 DISCUSSÃO.....	58
6 CONCLUSÕES.....	67
7 REFERÊNCIAS	68



Introdução

1 Introdução

1.1 Relação Parasito-Hospedeiro

Carrapatos são artrópodes hematófagos de distribuição cosmopolita que têm grande importância médica e veterinária devido ao efeito deletério direto causado por se fixarem e sugarem seus hospedeiros, como também por serem importantes vetores de doenças para o homem e para os animais domésticos.

As perdas econômicas resultantes de infestações por carrapatos são imensas e relacionam-se principalmente ao parasitismo em bovinos pelo *Rhipicephalus microplus*. Estima-se que 80% do rebanho bovino mundial seja infestado por carrapatos, o que de acordo com a "Food and Agriculture Organization" (FAO) origina um custo de 13 bilhões de dólares anuais (ANON, 2001). Entre as principais doenças de importância médico veterinária transmitidas por carrapatos no Brasil estão a babesiose, a anaplasmose e a erliquiose.

Embora infestações com carrapatos em animais de companhia não resultem em perdas econômicas relevantes, os transtornos ocasionados são evidentes, visto que cães residem em ambiente doméstico e seguidamente são acometidos por infestações maciças de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus*. Esta espécie é de ampla distribuição mundial, podendo completar seu ciclo de vida em dois meses, atingindo um número exorbitante em um curto período de tempo (cada fêmea pode originar 2.000-3.000 ovos) (PEGRAM et al., 1987; FREITAS et al., 1982). O *R. sanguineus* é vetor de diversos patógenos de importância para os caninos, incluindo os agentes da babesiose, haemobartonelose, hepatozoonose e erliquiose. A participação desse carrapato na transmissão de outros agentes infecciosos para os animais e o homem ainda vem sendo pesquisada (STEPHEN; ACHYUTHARAO, 1980; PETER et al., 1984; SIMPSON et al., 1991; MUMCUOGLU et al., 1993).

Carrapatos são parasitas obrigatórios e precisam permanecer fixos a seus hospedeiros por vários dias, até completarem seu ingurgitamento. Dessa forma, eles alternam entre a

ingestão de componentes de origem sangüínea presentes na lesão de alimentação e regurgitamento do excesso das substâncias ingeridas de volta ao hospedeiro, via saliva, de forma a concentrar os nutrientes de sua refeição e regular seu equilíbrio iônico e eletrolítico (hemoconcentração). Cálculos baseados em dados obtidos com carrapatos *Dermacentor andersoni* sugerem que uma fêmea não alimentada, pesando apenas 7-10 mg, consegue processar aproximadamente 4 g de sangue do hospedeiro, até atingir seu peso final de regurgitamento (KAUFMAN, 1989). Adicionalmente, foi estimado que, durante o regurgitamento, cerca de 500 µl de saliva são inoculados a cada 96 h no hospedeiro (BALASHOV, 1972). Sendo assim, a contribuição da saliva na montagem do micro ambiente onde a resposta imune do hospedeiro se desencadearia é de extrema relevância.

Diversas pesquisas vêm demonstrando que a saliva de diferentes espécies de carrapatos contém componentes farmacologicamente ativos, os quais possuem atividades anti-hemostáticas, anti-inflamatórias, vasodilatadoras e imunossupressoras (RIBEIRO et al., 1985; SAUER et al., 1995). Esses componentes modulam a resposta de seus hospedeiros, envolvendo anticorpos, citocinas (RAMACHANDRA; WIKEL, 1992; MACALUSO; WIKEL, 2001; FERREIRA; SILVA 1999), sistema complemento (RIBEIRO; SPIELMAN, 1986), células NK (KUBES et al., 1994), macrófagos (RAMACHANDRA; WIKEL, 1992, 1995; URIOSTE et al., 1994; FERREIRA; SILVA, 1998), células de Langerhans (ALLEN; KHALIL; WIKEL, 1979; NITHIUTHAI; ALLEN, 1985), linfócitos T e B, neutrófilos (RIBEIRO; WEIS; TELFORD, 1990), basófilos, eosinófilos (ALLEN, 1973; BROSSARD et al., 1982; SZABÓ; MORELLI; BECHARA, 1995b), mastócitos (MATSUDA et al., 1985) e células dendríticas (CAVASSANI et al., 2005).

A despeito da modulação exercida pela saliva, algumas espécies hospedeiras são capazes de adquirir resistência aos ácaros. A resistência dos hospedeiros é caracterizada por aumento no período de alimentação dos ácaros, redução do número de carrapatos que se

alimentam adequadamente, do peso de ingurgitamento, da capacidade de ecdise, da taxa de fecundidade e ainda morte dos carrapatos que se fixam (ALLEN, 1989; BECHARA et al., 1995). O mecanismo pelo qual a resposta imune de animais que desenvolvem resistência atua negativamente sobre os carrapatos ainda é desconhecido.

Em vista dos fatos mencionados, a interface entre o carrapato e hospedeiro é caracterizada por uma batalha imunológica complexa. Carrapatos secretam um arsenal de substâncias bioativas com a saliva e, adicionalmente, induzem a produção de outras tantas pelo seu hospedeiro. Patógenos que, porventura, entrarem nesse campo de batalha, encontram no local de fixação do carrapato um sítio privilegiado que está sendo profundamente modificado pelos efeitos imunomodulatórios exercidos pela secreção salivar de seu vetor (JONES; KAUFMAN; NUTTALL, 1992; NUTTALL 1998; TITUS; RIBEIRO, 1998). Com efeito, a inoculação experimental do vírus Thogoto, o qual é transmitido por carrapatos, quando realizada na presença de saliva de carrapatos *Ixodes dammini* resultou em infecção nos camundongos, enquanto que a inoculação desse vírus realizada na ausência de saliva não causou infecção (JONES; KAUFMAN; NUTTALL, 1992). Dentro da mesma perspectiva, outros autores mostraram que a transmissão da Doença de Lyme em camundongos é dependente da inoculação da bactéria *Borrelia burgdorferi* via carrapatos (GERN; SCHAIBLE; SIMON, 1993).

O estudo da interação de diferentes espécies de hospedeiros com carrapatos *R. sanguineus* é particularmente interessante, já que o hospedeiro natural (cão) e camundongos não desenvolvem resistência, nem mesmo após diversas infestações, enquanto que cobaias desenvolvem uma resistência bastante significativa já num segundo contato com o ácaro (THEIS; BUDWISER, 1974; SZABÓ et al., 1995b; FERREIRA; SILVA, 1998).

Ao descrever a reação inflamatória na pele de cães e camundongos C3H/HeJ reinfestados com carrapatos *R. sanguineus* (suscetíveis), observou-se que esta é composta

principalmente por neutrófilos e eosinófilos, enquanto que a resposta de cobaias reinfestadas com carrapatos (resistentes) principalmente por mononucleares, eosinófilos e basófilos (SZABÓ; BECHARA, 1999; FERREIRA et al., 2003). Szabó et al., 1995b e Ferreira et al., 2003, ao estudarem a reação de hipersensibilidade cutânea induzida pela inoculação de extrato bruto de carrapatos em hospedeiros previamente infestados com carrapatos ou não, observaram que cães e camundongos reinfestados desenvolvem uma forte reação de hipersensibilidade imediata, enquanto que cobaias desenvolvem uma pequena reação imediata e forte reação de hipersensibilidade tardia. O desenvolvimento de reação tardia num teste de hipersensibilidade cutâneo a antígenos de carrapatos em cobaias (hospedeiros resistentes) sugere o envolvimento do braço celular (Th1) da resposta imune no processo de aquisição de resistência.

Resultados de estudos sobre modulação de citocinas por carrapatos têm proposto que estes induzem preferencialmente um padrão de citocinas do tipo Th2 quando infestam animais suscetíveis (GANAPAMO; RUTTI; BROSSARD, 1995, 1996; FERREIRA; SILVA, 1998, 1999). Demonstrou-se que células dos linfonodos de camundongos C3H/HeJ sucessivamente infestados por carrapatos *R. sanguineus* produzem elevadas concentrações de IL-4, IL-10 e TGF- β , em detrimento de IL-2, IFN- γ e IL-12 quando comparadas com a síntese de citocinas de células de linfonodos de camundongos não infestados. Considerando que esses camundongos não desenvolvem resistência a carrapatos e que suas células esplênicas não proliferam frente à estimulação com Con-A (FERREIRA; SILVA, 1998), é possível argumentar que essa condição pode comprometer sobremaneira o desenvolvimento de uma resposta protetora anti-carrapatos. A resposta Th2 desenvolvida por camundongos infestados com carrapatos pode ser vantajosa para os ácaros, considerando que citocinas associadas a um padrão Th2 têm sido atribuídas à resposta anti-inflamatória (ABBAS et al., 2005) e que

inflamação no local de fixação dos carrapatos pode prejudicar o ingurgitamento dos ácaros (RIBEIRO et al., 1985).

1.2 Células T Regulatórias CD4⁺ CD25⁺

As células T regulatórias são células envolvidas na modulação da resposta imune em três principais situações: na manutenção da tolerância a antígenos próprios (SAKAGUCHI; SAKAGUCHI, 2000; PARIJS; ABBAS, 1998; MADAKAMUTIL et al., 2003), na regulação da imunopatologia desenvolvida pelos hospedeiros a diferentes patógenos (HORI; CARVALHO; DEMENGEOT, 2002; POWRIE, et al., 2003) e no transplante de órgãos (KARIM et al., 2001). Atualmente são divididas em três grupos distintos: as células T regulatórias CD4⁺CD25⁺, conhecidas como Tregs, as chamadas células Tr1 (regulatórias tipo 1) e as células Th3 (referindo-se à terminologia já utilizada para denominar células T auxiliares ou *helper*). As primeiras são diferenciadas no timo de animais neonatos, por isso conhecidas como células regulatórias naturais, e as duas últimas induzíveis na periferia por mecanismos ainda não totalmente elucidados, embora se discuta a participação de células dendríticas e citocinas como IL-10 e TGF-β na sua diferenciação.

As células Tregs, como dito anteriormente, são diferenciadas no timo de animais neonatos até o terceiro dia após o nascimento, já que animais timectomizados antes do terceiro dia de nascimento desenvolvem doença auto-imune e, quando realizada após o terceiro dia de nascimento, ocorre uma diminuição do número de células CD4⁺CD25⁺ na periferia, mas ainda são encontradas em número considerável, sem o desenvolvimento de doença auto-imune (FONTENOT; RUDENSKY, 2005). Alguns autores têm sugerido que durante o seu desenvolvimento no timo, assim como para as células T não regulatórias, o TCR desempenhe uma importante participação, visto que camundongos transgênicos com *background* deficiente do gene ativador de recombinação (RAG) não desenvolvem células Tregs, enquanto na presença de RAG as células CD4⁺CD25⁺ podem ser encontradas na

periferia (FEHERVARI; SAKAGUCHI, 2004; HSIEH; RUDENSKY, 2005). Além disso, outras evidências indicam para a participação do TCR na seleção tímica das células Tregs, tais como demonstram os trabalhos de Jordan et al., 2001 e Apostolou et al., 2002. Nesses trabalhos observou-se um aumento na proporção de células Tregs que se desenvolvem na prole de camundongos TCR transgênicos cruzados com camundongos que expressam o ligante específico para o TCR em seus tecidos. Outros trabalhos demonstram diminuição da população de Tregs em animais deficientes em componentes da cascata de sinalização intracelular após a ligação do TCR ao seu ligante, tais como I κ B quinase-2, Bcl-10 e PKC- θ (SCHMIDT-SUPPRIAN et al., 2003, 2004). A participação da ligação do TCR ao seu ligante específico ainda no ambiente tímico parece, porém, não ser o único sinal necessário para a seleção das células Tregs. Alguns autores discutem a participação de um segundo sinal, diferentemente das células T não regulatórias, que indique sua seleção. Esse sinal poderia ser proveniente de células estromais tímicas e possivelmente seria uma interação Notch-Notch ligante (VAN SANTEM et al., 2004), visto que moléculas co-estimulatórias clássicas como CD80, CD86 e CTLA-4 não são essenciais para sua diferenciação. Provavelmente, ocorre uma associação desses sinais que possibilita a seleção das células Tregs (FONTENOT; RUDENSKY, 2005).

Após a seleção tímica, as células Tregs migram para a periferia e correspondem a 5 a 10% das células CD4⁺ presentes no sangue periférico tanto em humanos como em camundongos e apresentam grande diversidade de repertório de TCR (FONTENOT; RUDENSKY, 2005).

Atualmente essas células são caracterizadas pela presença de algumas moléculas expressas em sua superfície, tais como CD4, CD25, CD45RB^{low}, CTLA-4, GITR e CD103, pela expressão constitutiva do fator de transcrição Foxp3 em seu citoplasma (KHATTRI et al., 2003; SAKAGUCHI, 2005), além de secretarem IL-10 e TGF- β (SHEVACH, 2002).

Porém, as células recuperadas da periferia que apresentam esse fenótipo devem apresentar atividade supressora sobre a proliferação de células T efetoras, essencialmente células T auxiliares do tipo 1 (Th1), bem como na produção de citocinas pró-inflamatórias, principalmente IFN- γ , em ensaios *in vitro*, visto que com exceção do fator de transcrição Foxp3, nenhum desses marcadores é exclusivo desse tipo celular.

Ainda assim, o fator de transcrição Foxp3 tem sido tema de controvérsias entre os pesquisadores. Alguns autores demonstram a expressão constitutiva desse fator já na diferenciação tímica das células Tregs, fazendo dele um fator de especificação de linhagem celular (FONTENOT; GAVIN; RUDENSKY, 2003), enquanto outros demonstram ser induzível em populações CD4⁺ CD25⁻ (FU et al., 2004) e detectado, em baixas concentrações, tanto em CD4⁺CD25⁻ quanto em células CD8⁺. Entretanto, os estudos atuais demonstram uma intrínseca relação entre Foxp3 e o desenvolvimento e a função de células regulatórias CD4⁺ CD25⁺ (FONTENOT; RUDENSKY, 2005).

Sakaguchi, 2005 demonstrou que animais deficientes do gene Foxp3, conhecidos como animais *scurfy*, desenvolvem doença auto-imune semelhante àquela desenvolvida por animais depletados de células T CD4⁺CD25⁺, o que levou os cientistas a estudarem a expressão desse gene e de seu produto no desenvolvimento e função de células regulatórias CD4⁺CD25⁺, sabidamente fundamentais para o controle de doenças auto-imunes. Essa patologia inclui poliendocrinopatia, enteropatia, síndrome ligada ao cromossomo X e síndrome de desregulação alérgica ligada ao X, caracterizada por intenso infiltrado linfocitário em múltiplos órgãos e ativação não controlada de linfócitos T CD4, levando os animais a óbito aos 21 dias de idade; paralelamente, a transdução retroviral ou a expressão transgênica de Foxp3 pode converter células T virgens CD4⁺CD25⁻ em células com fenótipo regulatório, como por exemplo, apresentarem menor proliferação e produção de citocinas, como IL-2 e IL-10, após estimulação via TCR, aumento na expressão de superfície de CD25 e

CTLA-4 e atividade supressora sobre a proliferação de outras células T de maneira contato dependente. Isso sugere um papel fundamental dessa molécula na regulação homeostática de células T (YAGI et al., 2004, SCHUBERT et al., 2001). De fato, Clark et al., 1999 mostraram que células de animais *scurfy* são hiperresponsivas à ligação do TCR e exibem um menor requerimento de co-estímulo via CD28, quando comparadas às de animais controles, e em contrapartida apresentam maior co-estímulo via B7.1 e B7.2, que por sua vez estão mais expressas na superfície celular, sugerindo que a mutação presente nesses animais pode interferir com o controle na ativação de células T. Além disso, camundongos mutantes ou deficientes para Foxp3 apresentam baixo número de células regulatórias CD4⁺CD25⁺ e a inoculação destas provenientes de um animal normal previne o desenvolvimento de doença auto-imune/inflamatória nesses recipientes, corroborando a hipótese desse gene controlar o desenvolvimento e a função de células regulatórias CD4⁺CD25⁺ em camundongos (YAGI et al., 2004).

Foxp3 codifica um membro da família *forkhead* de fatores de transcrição. Trabalhos demonstram que esse domínio estrutural é necessário para localização nuclear e ligação com o DNA celular na síntese de várias moléculas (SCHUBERT et al., 2001). Seu produto, conhecido como *scurfin*, reprime a transcrição de um gene repórter que contém um sítio multimérico de ligação de membros da família *forkhead*. Quando superexpresso em células CD4⁺, atenua a proliferação e a produção de citocinas induzidas pela ativação celular. Schubert et al., 2001 identificaram uma seqüência de ligação de membros dessa família adjacente a sítios críticos de regulação de outro fator de transcrição, o NFAT, nos promotores de vários genes de citocinas, cuja expressão é sensivelmente alterada quando da presença de *scurfin*. Vale observar que o NFAT juntamente com o fator de transcrição NF-κB, constituem a principal via de sinalização intracelular para a síntese de citocinas anti e pró-inflamatórias. Esses autores sugerem que a habilidade do fator de transcrição *scurfin* se ligar ao DNA, e

supostamente inibir a transcrição gênica, desempenhe um papel crucial na determinação da amplitude da resposta de células T CD4⁺ ativadas (SCHUBERT et al., 2001). Sakaguchi, 2005 mostra ainda que Foxp3 está envolvido na ativação das células Tregs, através da indução da expressão de diversas moléculas preditas na função dessas células. Na presença de IL-2, Foxp3 ativaria a expressão de genes codificadores das moléculas CD25, GITR e CTLA-4.

Trabalhos mais recentes têm mostrado a participação de TGF- β como importante indutor da expressão de Foxp3 em camundongos (FU, et al., 2004, CHEN, et al., 2003). Esses autores sugerem que na presença de citocinas como IL-2, o tratamento com TGF- β concomitante à estimulação via TCR converte células T CD4⁺CD25⁻ em células com função regulatória Foxp3⁺, e em contrapartida, fortes sinais co-estimulatórios preveniriam o desenvolvimento de células regulatórias dependente de IL-4 (FU, et al., 2004).

Embora muitos estudos têm sido realizados no intuito de se elucidar os mecanismos de atuação das células Tregs, estes ainda não foram totalmente determinados. De acordo com a literatura atual, vários mecanismos podem estar envolvidos na supressão de células T por células Tregs, e estes ainda diferem em condições *in vitro* e *in vivo* (KLEIN; KHAZAIE; VON BOEHMER, 2003). De forma geral, essas células *in vitro* suprimem células T efectoras de forma contato dependente, atingindo o gene que codifica IL-2 nessas células, inibindo sua proliferação. *In vitro*, mesmo na ausência de células dendríticas, as células Tregs são capazes de suprimir células T efectoras, indicando que, embora ocorra a ativação da enzima indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO) através da interação entre CTLA-4 nas células supressoras e CD80 e CD86 em células dendríticas, o que diminui a disponibilidade de triptofano livre e promove a liberação de metabólitos (cinureninas) - que conseqüentemente diminuem a ativação das células efectoras - esse mecanismo parece não ser essencial (MELLOR, 2005; VON BOEHMER, 2005).

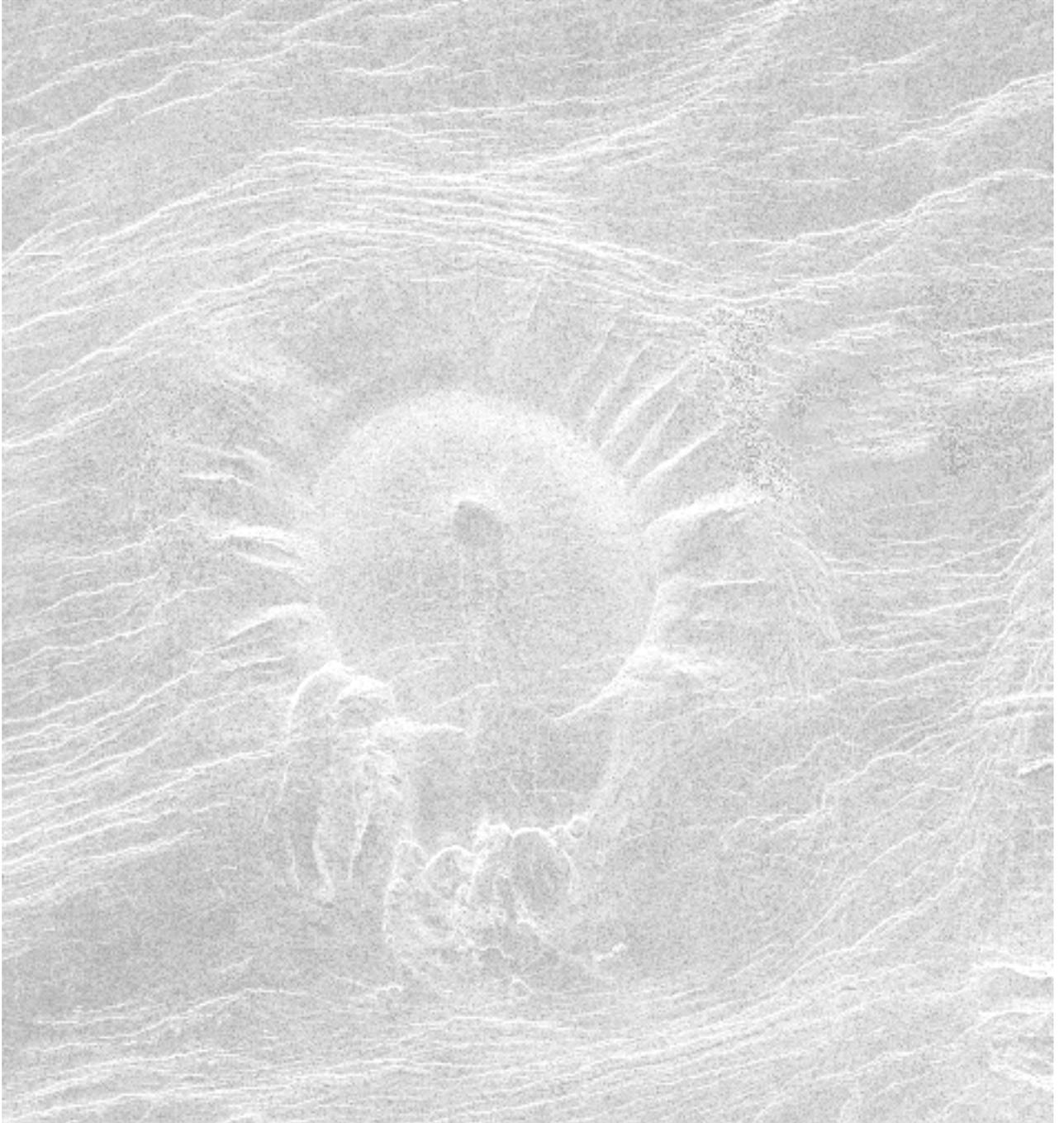
In vivo, a citocina IL-2 parece estar envolvida na manutenção da integridade funcional e do número dessas células nos órgãos linfóides secundários, não tendo participação nos mecanismos efetores das células Tregs, já que segundo Malek et al., 2002, células CD4⁺CD25⁺ são capazes de suprimir a resposta de células deficientes do receptor de IL-2 (CD25), excluindo a possibilidade de que a competição por IL-2 ou a inibição do gene que a codifica seja um mecanismo essencial de supressão (SHEVACH, 2002). Além disso, a via supressora da ativação de células efectoras pela indução de IDO após a ligação de CTLA-4 e CD80 e CD86 também parece ocorrer *in vivo* e, mais ainda, as citocinas IL-10 e TGF-β, que *in vitro* parecem não participar da função efetora das células Tregs, estão envolvidas *in vivo*. De fato, já foi demonstrado que células CD4⁺CD25⁺ produzem IL-10 *in vivo*, e essas citocinas provenientes das células Tregs, inibem o desenvolvimento de algumas doenças auto-imunes (VON BOEHMER, 2005). Por outro lado, a participação de TGF-β na função efetora das células Tregs ainda é bastante controversa, mas parece estar mais relacionada com a supressão da proliferação, secreção de citocinas e atividade citolítica das células CD8⁺, como demonstrado em alguns estudos de auto-imunidade, transplantes e rejeição a tumores (VON BOEHMER, 2005).

Assim, resumidamente, a supressão exercida pelas células Tregs pode ser mediada por citocinas, por contato entre as células regulatórias e as efectoras a serem suprimidas e ainda por mecanismos indiretos, via células apresentadoras de antígenos (seja através do metabolismo de triptofano ou pela secreção de citocinas como IL-10 e TGF-β) e que para isso, requerem sinalização via seu receptor TCR. Ainda é importante observar que as células regulatórias CD4⁺CD25⁺ são capazes de afetar seletivamente diferentes funções das células T, como a secreção de citocinas, a expressão de receptores de quimiocinas e as suas atividades proliferativa e citolítica. (VON BOEHMER, 2005).

Embora as células Tregs estejam envolvidas no controle de doenças auto-imunes e rejeição de transplantes, recentemente, grande atenção tem sido dada à participação das células Tregs em doenças infecciosas. Vários trabalhos vêm demonstrando que essas células participam da resposta induzida por infecções crônicas com a função de minimizar o dano tecidual causado por uma resposta inflamatória exacerbada. Adicionalmente, essas células parecem estar envolvidas em tecidos que exigem maior controle da resposta imune, como trato gastrointestinal, pulmões, fígado, olhos e a pele (BELKAID; ROUSE, 2005).

Em camundongos C57BL/6, os quais desenvolvem resistência a *Leishmania major*, há indução de uma forte resposta imune Th1 que resulta na cura da doença, no entanto baixos níveis de parasitas persistem na lesão. A eliminação completa da carga parasitária possivelmente não é vantajosa para o hospedeiro, pois não seria gerada uma resposta de memória ao parasita. A ausência de desenvolvimento de imunidade estéril parece ser dependente de células Tregs, que atuam através da produção de IL-10 (BELKAID et al., 2002). De fato, camundongos infectados com *L. major* e tratados com anti-IL-10 ou camundongos RAG^{-/-} infectados e reconstituídos com células CD4⁺CD25⁻ eliminam completamente a carga parasitária (BELKAID et al., 2001, 2002).

Até o momento, a supressão da resposta imune do hospedeiro exercida por carrapatos vinha sendo associada com o recrutamento de células Th2 ao local de fixação. Porém, de acordo com os dados apresentados, supõe-se que a saliva de carrapatos pode estar exercendo essa imunossupressão através da participação de células T regulatórias CD4⁺CD25⁺, o que será o alvo deste estudo.



Objetivos

2 Objetivos

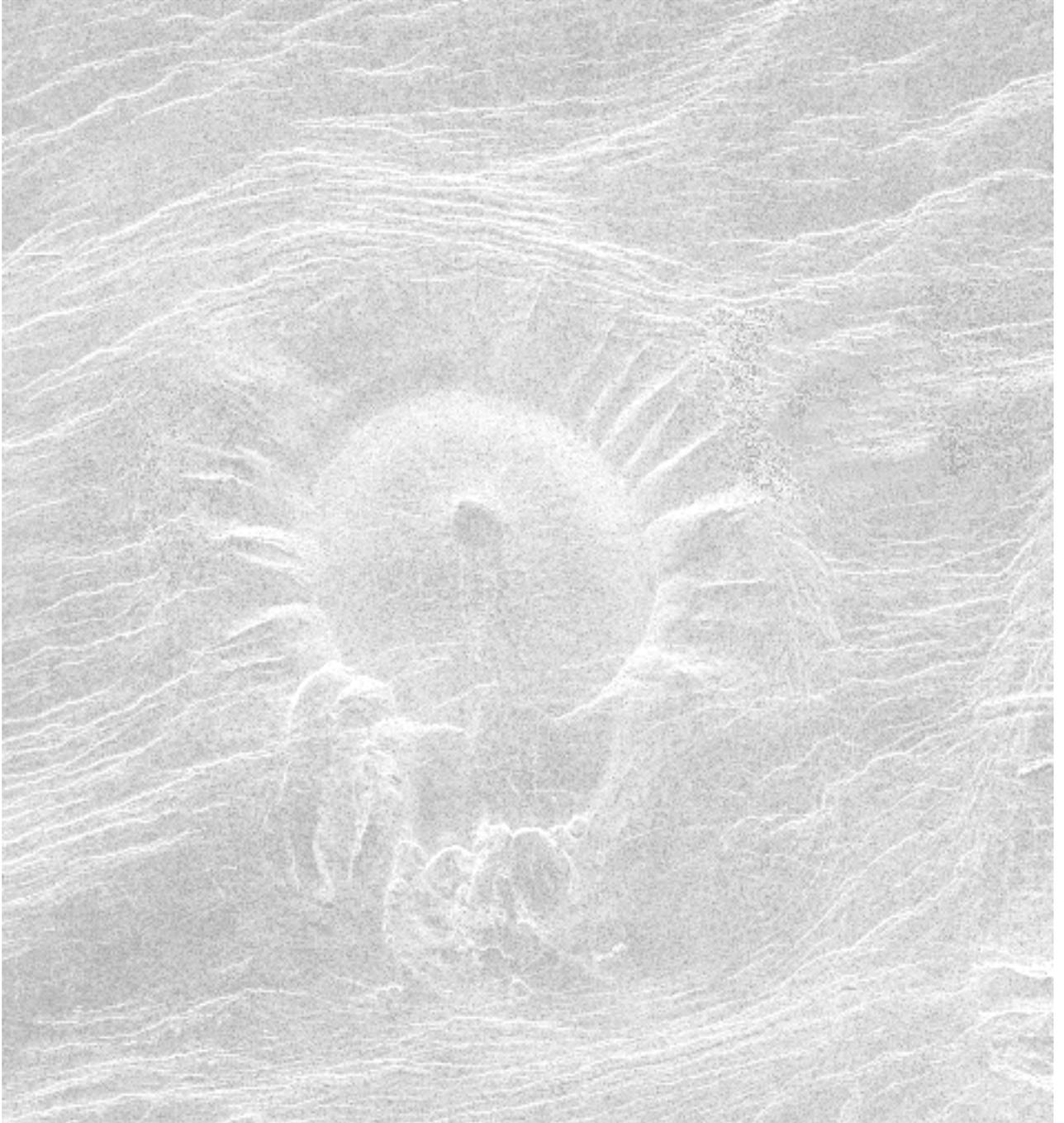
2.1 Geral

Estudar os mecanismos de modulação envolvidos na interação carrapato-hospedeiro através da análise das células presentes no sítio de infestação ou de inoculação de saliva.

2.2 Específicos

2.2.1 Analisar o fenótipo do infiltrado celular na pele de camundongos infestados com carrapatos ou inoculados com saliva.

2.2.2 Investigar a participação de células T regulatórias na resposta induzida pela infestação por carrapatos, através da determinação do fenótipo $CD4^+$, $CD25^+$, $CTLA-4^+$, $CD45RB^{low}$, $GITR^+$ e $CD103^+$ na superfície celular, além do fator de transcrição Foxp3.



Materiais e Métodos

3 Materiais e Métodos

3.1 Animais Experimentais

3.1.1 Cães

Fêmeas SRD obtidas no Biotério Central da FMRP-USP e mantidas no canil do citado biotério foram utilizadas para a manutenção da colônia de carrapatos (fêmeas para oviposição) e obtenção de saliva (fêmeas semi-ingurgitadas).

3.1.2 Cobaias

Cobaias albinas não isogênicas foram utilizadas para a infestação com os estádios de larva e ninfas não alimentadas para a manutenção da colônia de carrapatos, como descrito na seção 3.3.

3.1.3 Camundongos

O estudo das células envolvidas na resposta imune induzida pela saliva de carrapato bem como a verificação do envolvimento de células Tregs foi realizado em camundongos da linhagem BALB/c, obtidos no Biotério do departamento de Genética da FMRP-USP e mantidos no Biotério do Departamento de Bioquímica e Imunologia da FMRP-USP. O grupo de animais infestados foi dividido em animais controle (sham) submetidos apenas à colocação de câmara de alimentação 1 (1x) e 3 vezes (3x), e animais 1 e 3x infestados com carrapatos *Rhipicephalus sanguineus*. Os grupos foram subdivididos em lotes de animais (n=5-7/grupo/experimento) que foram sacrificados 24, 48 e 72 h após o início da infestação. Cada experimento foi realizado agrupando de 5 a 7 animais por tempo e condição experimental. Os animais submetidos à inoculação na orelha (n=24) foram divididos em animais inoculados

com solução tamponada de fosfato (PBS) (n=8), lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) (n=8) e saliva de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* (n=8), subdivididos em animais inoculados 1x ou 3x.

3.2 Manutenção da Colônia de Carrapatos

A colônia de carrapatos *R. sanguineus* foi mantida segundo Bechara *et al.* (1995). Brevemente, carrapatos fêmeas ingurgitadas foram colocadas para oviposição em recipientes plásticos numa estufa incubadora para B.O.D (demanda bioquímica de oxigênio) umidificada, a 28°C. Após um período de 10 dias, completada a oviposição, as fêmeas foram desprezadas e a massa de ovos foi mantida até a eclosão completa (18-25 dias). Para a obtenção dos estágios de ninfas e adultos não ingurgitados, cobaias nunca antes infestadas foram utilizadas. Para a obtenção das larvas, as fêmeas para oviposição eram obtidas da infestação em cães, como descrito anteriormente. Os carrapatos foram liberados dentro de câmaras de alimentação fixadas sobre o dorso tricotomizado dos animais com uma cola atóxica (Britannia Adhesives P4104 Latex, UK). As câmaras de alimentação foram confeccionadas com potes plásticos com 2,5 cm de largura por 3 cm de altura, com tampa rosqueável e o fundo retirado. Esses foram colados a uma peça de borracha fina de 1-2 mm de espessura cortada em formato de disco (com diâmetro de 7 cm), que foram proporcionalmente adaptadas para os cães e para os camundongos. Sob o disco de borracha, colou-se um tecido de algodão de dimensão e formato iguais ao disco, tornando a superfície do disco adequada para ser colada na pele dos animais. A tampa da câmara de alimentação foi perfurada para permitir a transpiração.

Os carrapatos mantiveram normais os parâmetros de ciclo biológico (SRIVASTAVA; VARMA, 1964; FREITAS *et al.*, 1982; BECHARA *et al.*, 1995).

3.3 Coleta de Saliva de Carrapatos

Para a coleta de saliva de carrapatos foram utilizados os ácaros provenientes da infestação em cães que foram sistematicamente realizadas. Para a obtenção das fêmeas adultas alimentadas utilizadas na salivação, dois cães foram infestados simultaneamente com três câmaras de alimentação em cada, onde 140 carrapatos/câmara (machos e fêmeas, proporção 1:1) foram liberados. A saliva foi coletada segundo a técnica de Bechara *et al.* (1988) e adaptada para carrapatos *R. sanguineus*. Para tal, fêmeas adultas providas da infestação em cães decorridos 7 dias de fixação, foram recolhidos, limpos com PBS 0,1M pH 7,2 e em seguida inoculados subcuticularmente na hemocele com 10-20 µL de uma solução de dopamina a 0,2% diluída em PBS, com o auxílio de uma agulha 12,7 x 0,33 mm (Becton Dickinson, NJ). Os ácaros foram então fixados a uma fita crepe e mantidos em câmara úmida, com temperatura superior a 25°C. A coleta de secreção salivar do hipostômio das carrapatos foi realizada com pipeta automática, sendo a saliva mantida em tubo tipo “eppendorf” fechado sob banho de gelo. Após a coleta, a saliva foi filtrada através de uma membrana com poro de 0,22 µm (Costar-Corning Incorporated, NY) e mantida a -20°C até o momento do uso. Os experimentos de inoculações intradérmicas foram realizados utilizando pool de salivas obtidas em diferentes dias, compreendendo material de mais de 500 carrapatos.

Foram confeccionadas alíquotas de 30µl, e estas liofilizadas e mantidas a -20°C, até o momento do uso. Imediatamente antes da inoculação, a saliva liofilizada foi ressuspensa em 10µl de PBS livre de LPS.

3.4 Inoculação de Saliva de Carrapato em Camundongos

Animais BALB/c (2 animais por grupo) foram inoculados intradermicamente na orelha 1 (uma) e 3 (três) vezes com 30µl de saliva (concentrados em 10µl), bem como 10µl de

PBS livre de LPS como controle negativo e ainda como controle positivo 1µg de LPS ressuspenso nos mesmos 10µl. As inoculações foram intradérmicas com uso de seringas de 1ml e agulha 12,7 x 0,33 mm (Becton-Dickinson, NJ) hipodérmica estéreis. O intervalo entre as inoculações para os animais 3 vezes inoculados foi de 7 dias.

3.5 Infestação de Animais Experimentais

Cinco casais de carrapatos não alimentados provenientes da colônia foram sexados previamente às infestações utilizando-se dos caracteres morfológicos observados para a sexagem dos carrapatos descritos por Freitas *et al.*, 1982.

As infestações foram conduzidas de forma controlada dentro de câmaras de alimentação fixas e preparadas como descrito para os animais da manutenção da colônia, apenas com a utilização de um tubo menor ao descrito anteriormente (criovial), segundo Ferreira e Silva, 1998.

3.6 Separação de Leucócitos do Sítio de Inoculação/Fixação

Para caracterização dos leucócitos presentes no local da inoculação/infestação, após o sacrifício dos animais, foram coletadas amostras cutâneas correspondentes ao local de fixação dos carrapatos ou a orelha direita do animal, na qual se padronizou a inoculação da saliva. As amostras foram incubadas por 1 (uma) hora a 37°C com meio de cultura (RPMI) contendo 500 µg/ml de liberase (Sigma). A seguir, os tecidos foram processados em trituradores na presença de 0,05% de DNase (Sigma) usando Medimachine® (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) e meio RPMI contendo 10% de soro bovino fetal (SBF) (RPMI completo), conforme indicações do fabricante. Em seguida, a suspensão celular foi filtrada e então centrifugada a 250 x g por dez minutos. Nas amostras de pele de animais infestados, as células foram ressuspenso em aproximadamente 10ml de meio RPMI completo e mantidas em banho de gelo para realizar-se a

separação dos leucócitos através da utilização de gradiente de ficoll (Ficoll-Hypaque™ PLUS, Amersham Biosciences). Para tal, adicionou-se 5ml de Ficoll-Hypaque no fundo do tubo, e sem agitação do mesmo, este foi levado à centrifugação por 20 minutos a 306 x g a 25°C. Após a centrifugação coletou-se a interface entre meio e Ficoll, correspondente ao halo de leucócitos, em volume aproximado de 7 ml. Essas células foram novamente centrifugadas a 250 x g por 10 minutos, ressuspensas em RPMI completo e contadas em câmara de Neubauer.

3.7 Histopatologia

A análise histológica foi realizada em tecidos obtidos de animais BALB/c sacrificados 24, 48, 72 e 96 h após uma ou três inoculações de saliva e animais sacrificados 72 horas após a fixação de carrapatos. Os fragmentos de pele foram coletados e durante aproximadamente 15 minutos pré-fixados em formaldeído 10% apoiado em filtro de papel e em seguida acondicionado em cassetes para processamento. As amostras foram fixadas em formaldeído 10% em PBS 1x por no mínimo 12h, podendo chegar até 48h. A seguir, os cassetes foram transferidos para álcool 80%, permanecendo 24 horas e então para álcool 90% por 30 minutos. Os tecidos foram submetidos à desidratação em uma bateria de álcool absoluto (4 banhos, 30 minutos cada) e na seqüência em uma de xilol (3 banhos, 30 minutos nos dois primeiros e 1 hora no terceiro). Retirados do xilol, os cassetes foram levemente secos e transferidos para o banho de parafina. As amostras foram então emblocadas em parafina e cortadas em micrótomo Reichert-Jung Mod. As lâminas com cortes de 5µm foram submetidas à coloração de hematoxilina-eosina e observadas em microscópio óptico (Olympus®). Os tecidos foram fotografados utilizando o sistema Q Color 3 Olympus® American INC e Adobe Photoshop como editor de imagem.

3.8 Anticorpos

Para a realização do bloqueio do receptor de Fc, realizado imediatamente antes da incubação dos anticorpos específicos utilizou-se anti-CD16/32 – sobrenadante de cultura de clone 2.4G2 (PharMingen, San Diego, CA, USA). Para a fenotipagem celular foram utilizados anticorpos conjugados a FITC (anti-CD25), PE (anti-CD3, anti-CTLA-4, anti-CD45RB, anti-GITR e anti-CD103) ou PerCP (anti-CD4), e os respectivos isotipos controle. Todos os anticorpos utilizados foram fabricados por BD Biosciences PharMingen (San Jose, CA, USA).

3.9 Fenotipagem

A análise fenotípica das células obtidas do sítio de fixação dos carrapatos, da orelha de animais inoculados com saliva e das células dos linfonodos regionais foi realizada por citometria de fluxo, conforme protocolo padrão. As células foram incubadas com anticorpo monoclonal bloqueador da porção Fc de imunoglobulinas por 1 (uma) hora a 4°C (clone 2G4.8). Após esse período foram adicionados os anticorpos contra os determinantes específicos por mais 30 minutos a 4°C. Após este procedimento, as células foram lavadas 2 (duas) vezes com PBS-BSA por 10 (dez) minutos a 250 x g e ressuspensas em 200 ml de PBS contendo 1% formol. A aquisição das células foi realizada em citômetro de fluxo (FACScan, Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA - BD) e a análise realizada utilizando o programa Cell Quest Pro®, também da BD.

3.10 Extração de RNA

Os linfonodos regionais de animais infestados 3 (três) vezes com carrapatos, após 48 ou 72 horas da fixação dos mesmos foi coletado e o RNA total extraído utilizando-se o reagente

Trizol (Invitrogen) e o kit para extração de RNA (RNAeasy mini-kit, Quiagen, CA), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. Brevemente, linfonodos de animais normais (não infestados), controles (submetidos apenas à colocação da câmara de alimentação) e experimentais (infestados com carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* por 48 ou 72 horas, em terceira infestação) recém coletados foram transferidos para um tubo tipo “eppendorf” contendo 800 µl de Trizol (Invitrogen Corporation, Cidade, CA) e trituradas por aproximadamente 30 segundos utilizando o homogeneizador Ultra-Turrax T8 (Ika-Werke GmbH & Co., Alemanha) e armazenadas em freezer -70°C até o momento do uso. Para a extração de RNA as amostras foram descongeladas à temperatura ambiente, adicionou-se 200 µl de clorofórmio (Sigma) e, após 15 minutos, foram transferidas para outro tubo do tipo “eppendorf” contendo uma coluna gelatinosa (Fase Gel) que permite uma melhor separação das fases após a centrifugação de 12000 x g por 15 minutos a 4°C . A fase aquosa foi então transferida para outro tubo e acrescentou-se etanol 70% em proporções iguais à amostra (v:v). A solução amostra/etanol foi agitada delicadamente e transferida para uma coluna de afinidade para RNA. Em seguida foram adicionados os tampões específicos (kit), intercalados por rápidas centrifugações de 15 segundos a 80000 x g cada. As amostras de RNA foram eluídas da coluna com 30 µl de água MilliQ livre de RNAase, e mantidas em banho de gelo para a confecção do DNA complementar (cDNA), que, invariavelmente, foi realizada no mesmo dia. Para determinar a concentração de RNA ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) nas amostras utilizou-se o aparelho GeneQuant (Pharmacia, USA). A integridade do RNA e a possibilidade de contaminação das amostras com DNA genômico foi determinada realizando-se uma eletroforese do material em gel de agarose contendo formaldeído (SAMBROOK *et al.*, 1989).

3.11 Reação de RT-PCR para Confecção de DNA Complementar (cDNA)

O cDNA foi sintetizado através de reação de transcrição reversa (RT), com a utilização da enzima M-MVL Reverse Transcriptase (Promega Corporation, Madison, WI), 1

µg de RNA, 1µl de Oligo dT e água DEPC qsp 14µl de volume final. A temperatura de anelamento foi de 70°C por 5 minutos, seguido de choque térmico (em banho de gelo); a extensão foi realizada a 42°C por 1 hora após a adição dos dNTPs, transcriptase reversa e do tampão, totalizando um volume final de reação de 25µl, que ao final da reação foram diluídos em 175µl de água MilliQ autoclavada (200µl totais) e mantidos a -20°C. A reação de polimerase em cadeia (PCR) foi realizada no termociclador PTC-200 Gradiente Cyclor (MJ Research, Watertown, MA) com a enzima *Taq* polimerase (*Taq* DNA Polymerase, Promega), dNTP e primer específico para o fator de transcrição (Invitrogen). As condições da reação foram: 3 minutos a 95°C para desnaturação, seguidos por 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 56°C ou em gradiente de 48°C a 56°C para o anelamento dos primers às fitas do cDNA e 2 minutos 72°C de extensão acrescidos de um passo de extensão final de 7 minutos a 72°C. Além das reações para detecção de mensagem para *foxp3*, as amostras também foram submetidas a PCRs para β -actina, gene murino de expressão constitutiva que foi utilizado como controle positivo das reações de amplificação. Como controles negativos das reações, foram submetidas à PCRs amostras contendo apenas *Taq* polimerase, dNTP e primers para descartar a amplificação de produtos inespecíficos.

Os produtos de PCR obtidos foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% e os géis corados com nitrato de prata 0,2%, secos (temperatura ambiente) e digitalizados, em tons de cinza, utilizando scanner com resolução de 300 dpi.

3.12 Reação de PCR em Quantitativo

A expressão do gene analisado (β -actina e *Foxp3*) foi quantificada pela técnica de PCR em tempo real. Para isso foram utilizados 12,5 µl do reagente SYBR Green, 2,0 µl do primer específico, que foram desenhados de acordo com as necessidades da reação, 5,0 µl da amostra e 5,5 µl de água Mili-Q autoclavada duas vezes. A reação foi submetida ao protocolo

de ciclos, seguindo as orientações do fabricante em um aparelho GeneAmp 7000 (Applied Biosystems – USA), descrito a seguir: 2 min a 50°C, 10 min a 95°C e quarenta ciclos de 30 segundos a 95° C, 30 segundos a 56° C e 1 minuto a 72° C. Por fim, foi empregado um ciclo final de vinte minutos com temperatura crescente de 60 a 95°C para a obtenção da curva de dissociação dos produtos da reação, utilizada para a análise da especificidade de amplificação.

Os resultados foram analisados com base no valor de *threshold cycle* ou linha de corte, definido após a reação, sendo este o ponto correspondente ao número de ciclos aonde a amplificação atinge um dado limiar, que permite a análise quantitativa da expressão do fator avaliado em relação ao gene constitutivo (β -actina).

3.13 Marcação Intracelular Para o Fator de Transcrição Foxp3

A marcação intracelular para Foxp3 foi realizada utilizando-se o kit Cytofix/Cytoperm Plus (com Golgi Stop), da Becton Dickinson, e seguiu as recomendações do fabricante, adaptadas às condições experimentais, visto que as células também foram marcadas para moléculas de superfície. A etapa inicial do protocolo envolveu um período de 4 horas de estimulação das células em estufa a 37°C com 5% de CO₂, que foi realizado na presença ou não de Con-A (2µg/ml) (Sigma-Co, St. Louis, USA), em meio RPMI completo. Após transcorrido o tempo de 4 h de incubação, adicionou-se o Stop Golgi presente no kit, 1 µl/poço e incubou-se por mais 2h. Nessa etapa, as células têm seu metabolismo abolido e as proteínas já sintetizadas permanecem no seu interior (não são excretadas para o meio e não há mais síntese protéica). Após este período, realizaram-se duas lavagens consecutivas com PBS-BSA 1% seguida pela marcação extracelular. Para tal, inicialmente realizou-se o bloqueio dos receptores Fc da superfície das células, seguindo-se o protocolo já descrito anteriormente. Ao final do protocolo para marcação extracelular realizaram-se duas lavagens consecutivas com PBS-BSA 1%, a fim de se retirar as moléculas de anticorpo não ligadas. Assim, as células

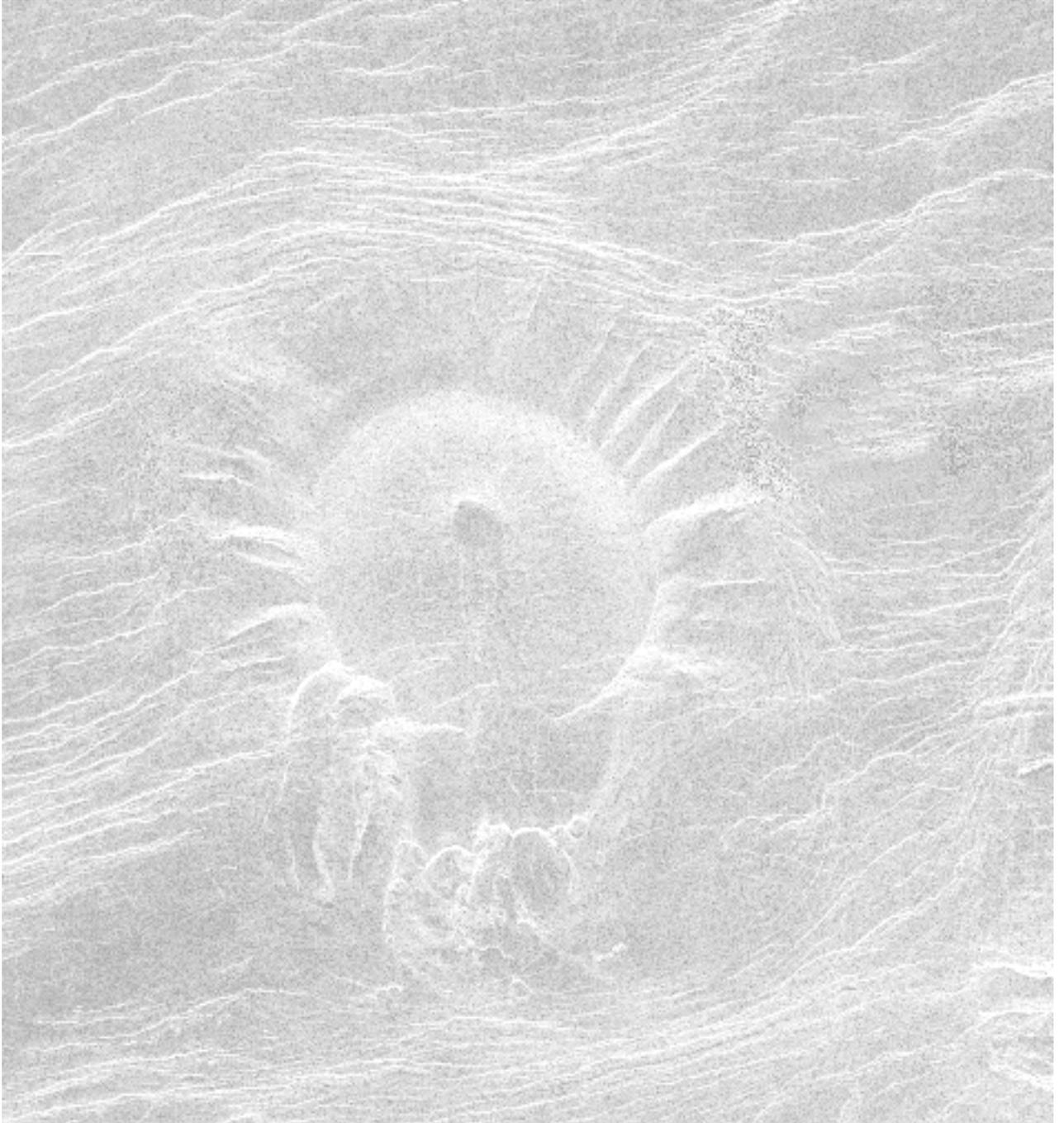
então já estariam marcadas para CD4 (PerCP) e CD25 (PE) extracelulares, e retornou-se, então, para a preparação das células para a marcação intracelular. Para tal, foi adicionado 100 µl de Cytoperm/Cytofix (Pharmingen®) por tubo e incubou-se por 15 minutos a temperatura ambiente. Duas lavagens com PBS-BSA 1% foram realizadas e então adicionou-se o anticorpo anti-Foxp3. O anticorpo foi diluído 1:100 numa solução de PermWash (Pharmingen®), e 100 ml dessa solução foi adicionada aos tubos para marcação. A etapa de incubação com os anticorpos durou 30 minutos a 4°C. Após este período, realizou-se a marcação indireta com um anticorpo anti-cabra, produzido em coelho, conjugado a FITC, 30 minutos a 4°C. Entre as etapas 2 lavagens com PBS-BSA 1% eram realizadas. Finalmente, as células foram ressuspensas em PBS-Formol 1%.

3.14 Comitê de Ética

O projeto intitulado “Modulação da resposta imune pela saliva de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus*: estudo do envolvimento de células T regulatórias” foi analisado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, em sua 16ª Reunião Ordinária, realizada em 13 de setembro de 2004, sendo aprovado de acordo com o protocolo N° 034/2004.

3.15 Análise Estatística dos Resultados

Os resultados foram comparados utilizando-se análise de variância (ANOVA) e o método de Turkey-Kramer para determinar as diferenças existentes entre os grupos de animais. Os resultados estão apresentados como média ± erro padrão da média (EPM). As análises foram realizadas pelo programa estatístico INSTAT, Graph Pad, San Diego, Califórnia.



Resultados

4 Resultados

4.1 Análise Histopatológica da Pele de Camundongos Infestados ou Inoculados com Saliva de *R. sanguineus*

4.1.1 Efeito da Inoculação de Saliva na Pele do Dorso de Animais BALB/c

Após 24 h da inoculação de saliva na pele de camundongos BALB/c observou-se a presença de um intenso infiltrado inflamatório, composto de células mono e polimorfonucleares, e que esse infiltrado é ainda maior após três inoculações. Adicionalmente, foi possível observar que mesmo após 48 h da inoculação da saliva, o infiltrado inflamatório ainda estava presente na derme dos animais, e da mesma forma, a inflamação induzida foi maior após 3 inoculações (Figuras 1 e 2).

4.1.2 Efeito da Infestação por Carrapatos em Animais BALB/c

Semelhante ao observado nas inoculações de saliva, a pele de animais infestados com carrapatos por 72h apresentou um significativo infiltrado inflamatório na derme, composto basicamente dos mesmos tipos celulares já citados, mono e polimorfonucleares, como mostra a figura 3. É possível também observar que a terceira infestação agravou a inflamação induzida, quando comparada com apenas 1 infestação. Além disso, foi possível notar um marcante aumento do número de capilares sanguíneos presentes no local após a exposição aos carrapatos (Figura 3).

4.2 Análise das Células Isoladas da Pele de Animais Infestados com Carrapatos *R. sanguineus*

Inicialmente avaliou-se o efeito da saliva de carrapatos *R. sanguineus* na modulação da resposta imune. Nos períodos pré-estabelecidos, um fragmento de pele, correspondente ao sítio de fixação dos carrapatos, foi coletado, processado e as células inflamatórias isoladas e

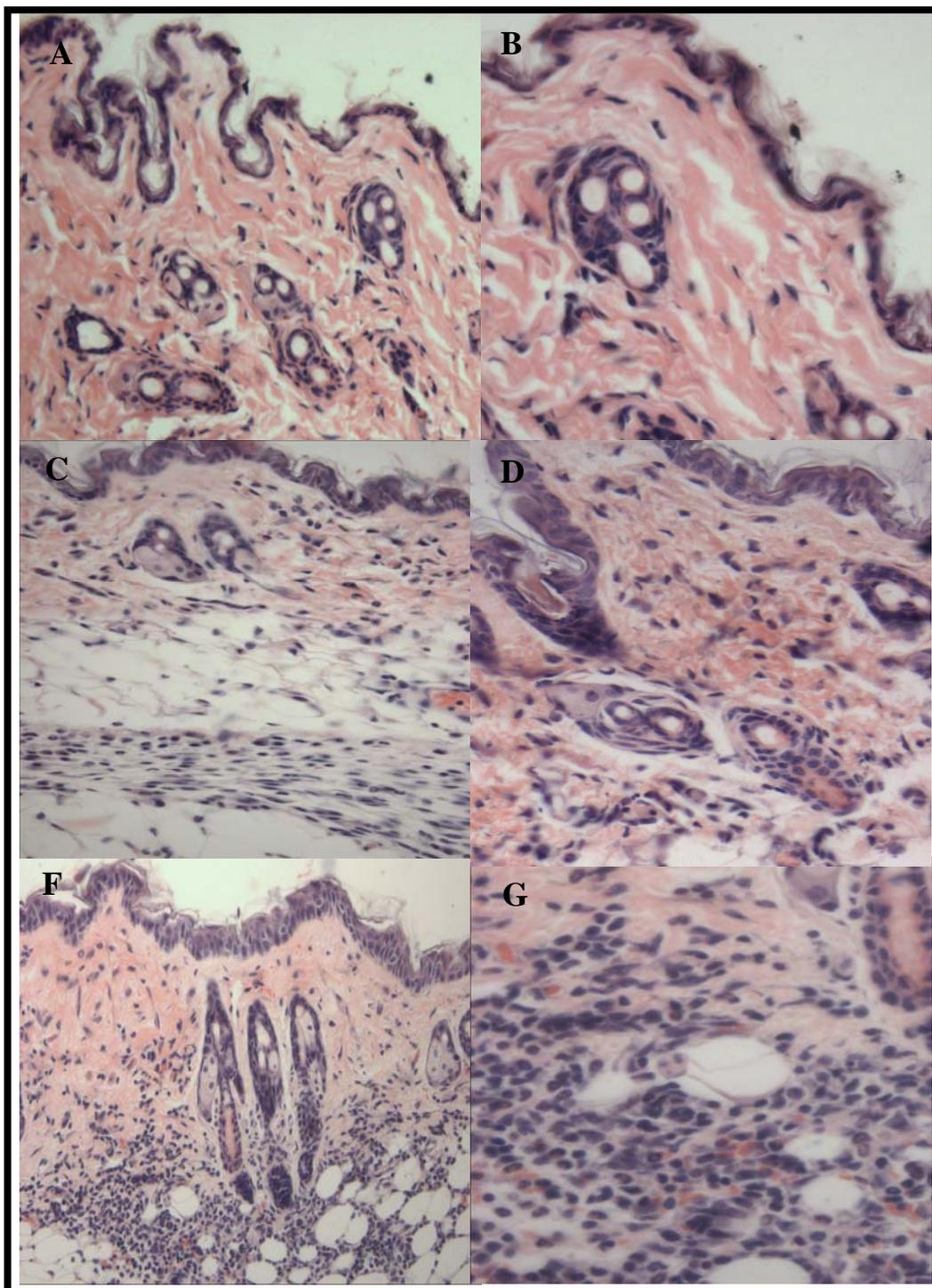


Figura 1: Infiltrado inflamatório presente na pele após 24 h da inoculação de saliva de carrapatos *R. sanguineus*. Animais foram inoculados 1 ou 3 vezes com saliva de carrapatos *R. sanguineus* ou com PBS e após 24 h foram sacrificados e o fragmento de pele coletado e processado para avaliação histopatológica. Coloração de HE. A coluna da esquerda representa cortes num aumento de 200 x, enquanto a da direita, 400 x. **A e B**, 1 vez inoculado com PBS (controles); **C e D**, 1 vez inoculado com saliva; **E e F**, 3 vezes inoculados com saliva.

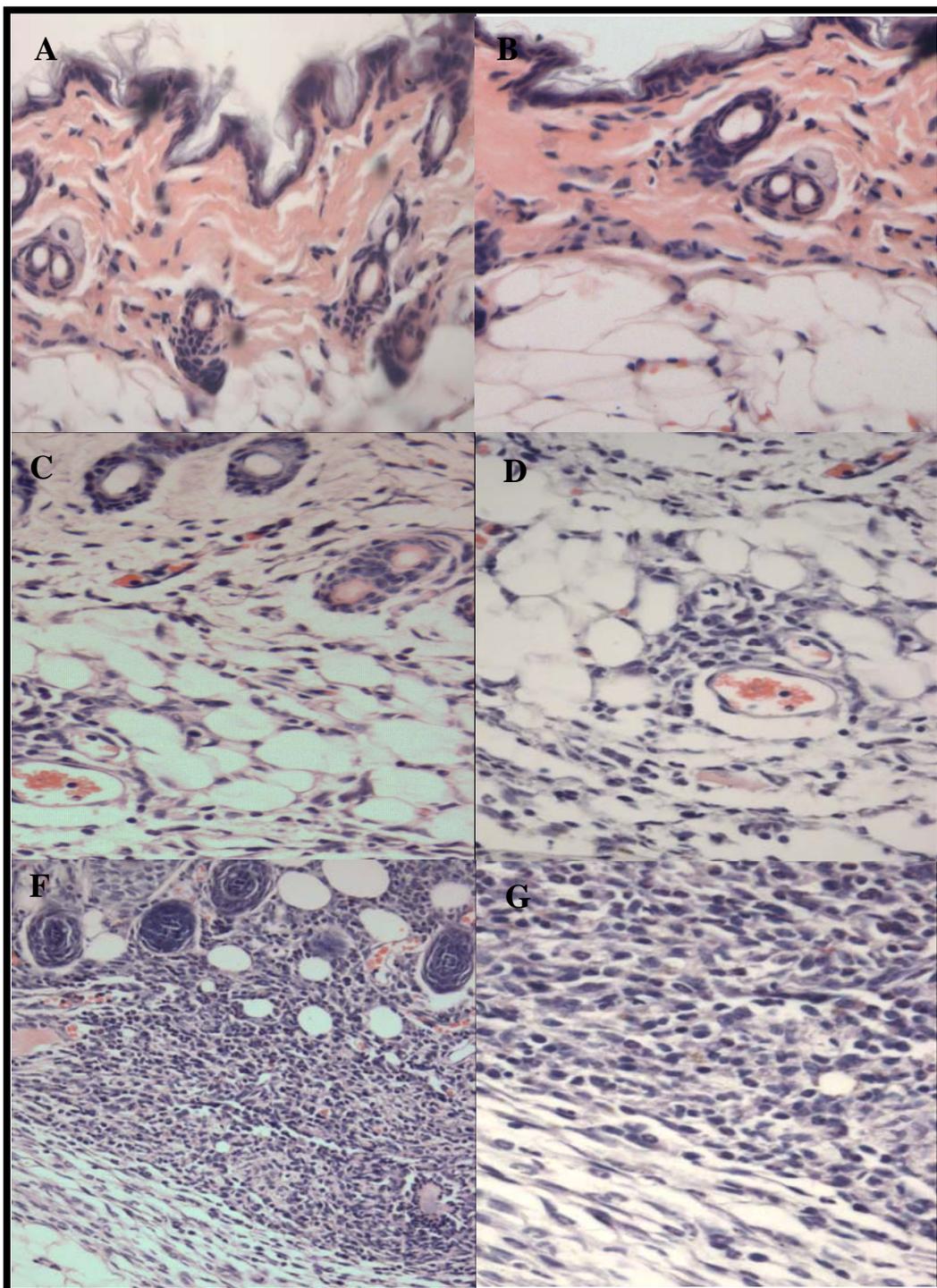


Figura 2: Infiltrado inflamatório presente na pele após 48 h da inoculação de saliva de carrapatos *R. sanguineus*. Animais foram inoculados 1 ou 3 vezes com saliva de carrapatos *R. sanguineus* ou com PBS e após 48 h foram sacrificados e o fragmento de pele coletado e processado para avaliação histopatológica. Coloração de HE. A coluna da esquerda representa cortes num aumento de 200 x, enquanto a da direita, 400 x. . A e B, 1 vez inoculado com PBS (controles); C e D, 1 vez inoculado com saliva; E e F, 3 vezes inoculados com saliva.

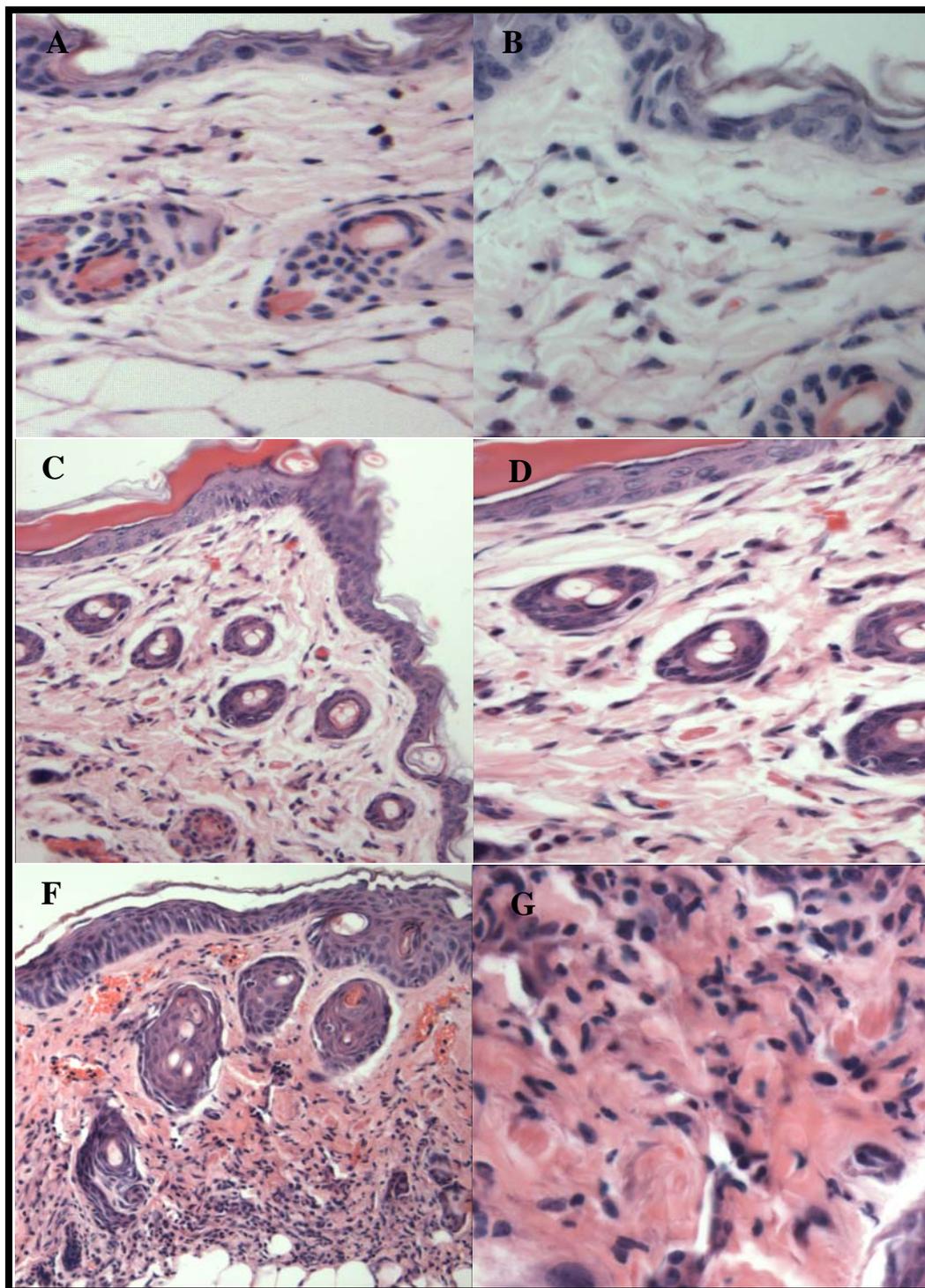


Figura 3: Infiltrado inflamatório presente na pele após 72 h de fixação de carrapatos *R. sanguineus*. Animais foram infestados 1 ou 3 vezes com carrapatos *R. sanguineus* ou submetidos apenas a colocação da câmara de alimentação (sham) e após 72 h foram sacrificados e o fragmento de pele coletado e processado para avaliação histopatológica. Coloração de HE. A coluna da esquerda representa cortes num aumento de 200 x, enquanto a da direita, 400 x . **A e B**, sham 1 vez (controles); **C e D**, 1 infestação; **E e F**, 3 infestações.

analisadas por citometria de fluxo. Não foram encontradas diferenças quanto ao perfil das células isoladas da pele de animais normais, controles (animais submetidos apenas à colocação da câmara de alimentação) e infestados com carrapatos por 72 h (Figura 4). Esta análise revelou ainda que as células apresentaram tamanho e granulosidade variados sendo possível identificar a presença de diferentes populações celulares, entre elas, linfócitos, monócitos e granulócitos. Entretanto, o número de células isoladas da pele foi maior no grupo de animais infestados e, comparando os animais estudados, pôde-se observar a presença de uma população celular distinta entre esses (seta); essas células induzidas pela infestação por carrapatos possuíam grânulos e apresentaram tamanho intermediário (Figura 4). As células recuperadas nos demais tempos estudados apresentaram o mesmo padrão de tamanho e granulosidade; desta forma, optou-se por apresentar apenas os resultados das 72h de infestação.

A população de linfócitos foi selecionada e avaliada quanto à expressão de diferentes marcadores fenotípicos de células T regulatórias $CD4^+CD25^+$ (Tregs). A presença de células $CD4^+$ na pele de animais normais foi baixa, em torno de 0,46% das células isoladas (Figura 5A). Contudo, animais submetidos à câmara de alimentação e à infestação por carrapatos apresentaram um aumento significativo na população de células $CD4^+$ sendo que as percentagens variaram em torno de 27,69% para animais sham (1x), 15,90% para animais infestados (1x), 30,12% para animais sham (3x) e 32,64% para animais infestados (3x) (Figura 6A). Em seguida, as células foram avaliadas quanto à expressão concomitante das moléculas CD4 e CD25 (Figuras 5B e 6B). Encontrou-se uma baixa população de células duplo positivas ($CD4^+CD25^+$) na pele de animais normais (0,16%) (Fig. 5B) e observou-se um aumento significativo nesta percentagem em animais submetidos apenas uma vez à colocação da câmara (16,16%) e nos animais infestados 1x (2,89%). As infestações consecutivas (3x) não alteraram significativamente a percentagem de células $CD4^+CD25^+$

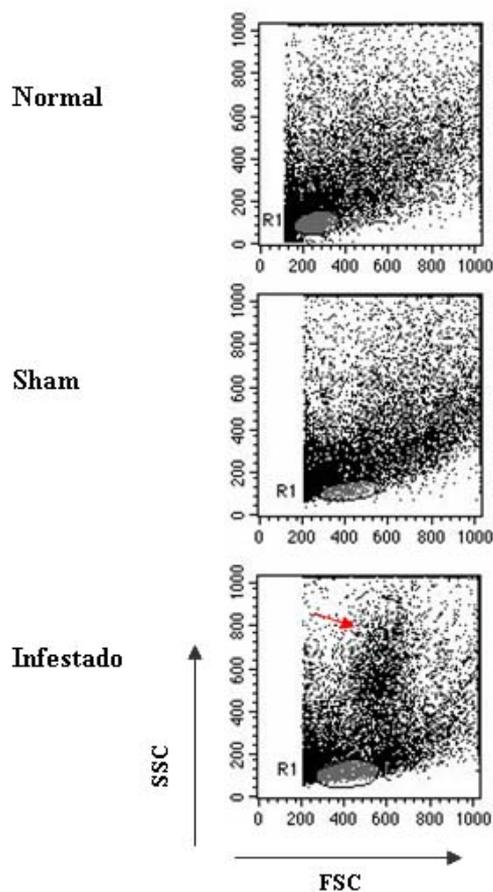


Figura 4: Perfil populacional das células recuperadas da pele do dorso de animais dos diferentes grupos estudados. Fragmentos de pele de animais normal, submetidos apenas a colocação da câmara de alimentação (sham) e infestados com carrapatos foram coletados, agrupados e processados conforme protocolo padrão para análise por citometria de fluxo. A figura acima mostra as células analisadas quanto ao seu tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) obtidas da análise do pool de 5 animais por grupo estudado. R1 representa a população linfocitária utilizada para as análises posteriores. Os *dot plots* apresentados mostram 10.000 células, adquiridas durante as análises.

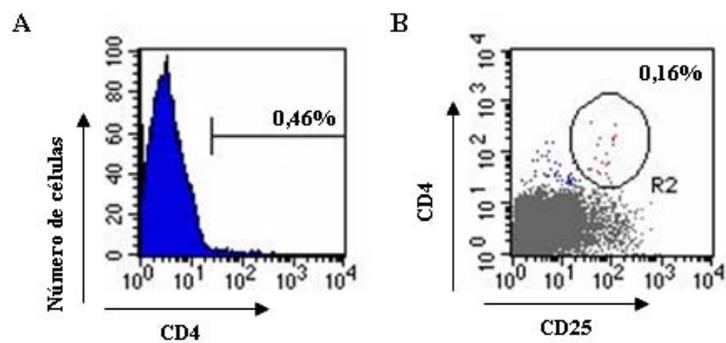
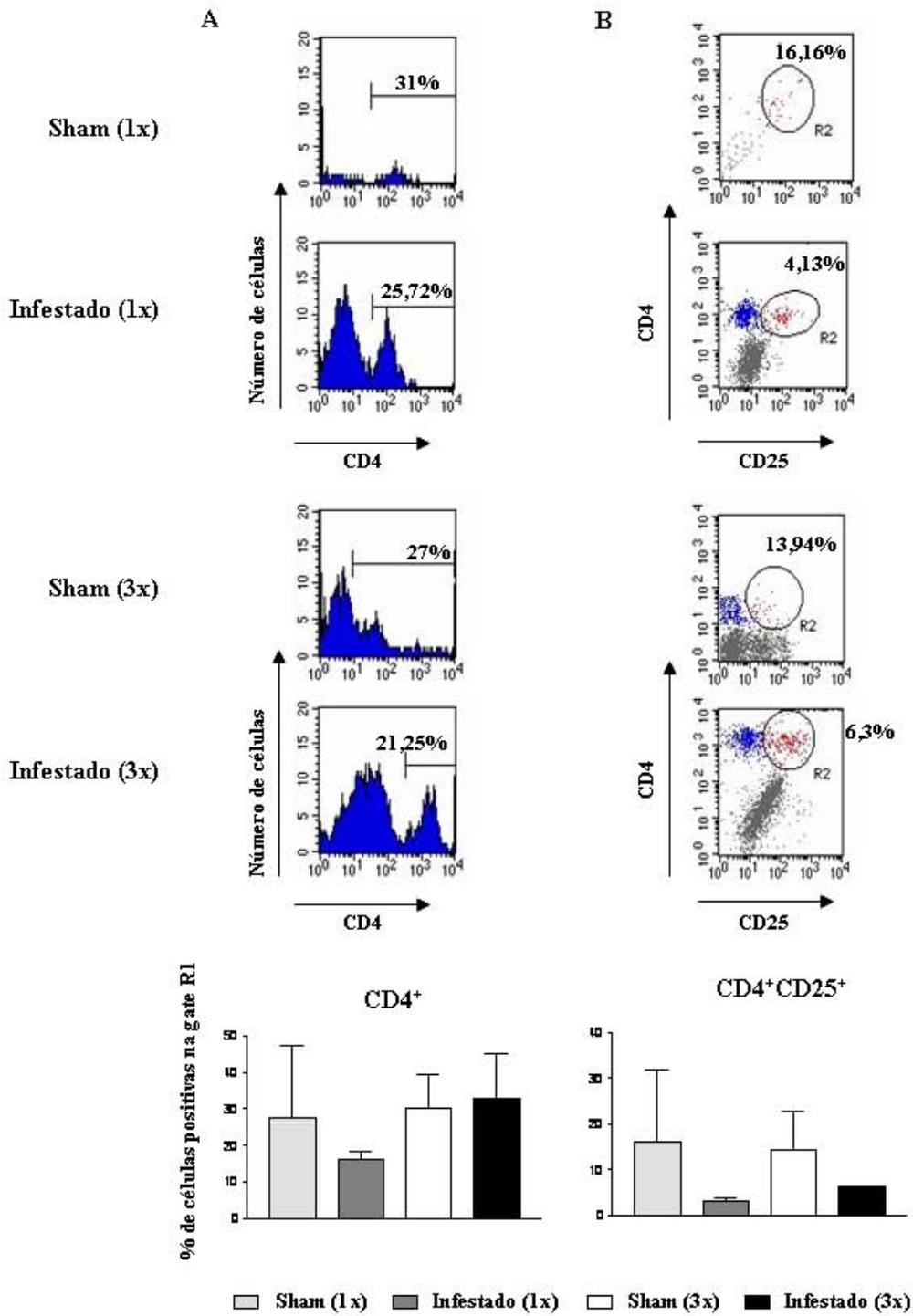


Figura 5: Perfil populacional das células recuperadas da pele de animais normais. Fragmentos de pele de animais normais foram coletados e processados para análise por citometria de fluxo. Em seguida, as células de tamanho e granularidade interna compatíveis com linfócitos (R1) foram selecionadas e então primeiramente analisadas quanto à presença da população $CD4^+$ (A) e em seguida à população $CD4^+CD25^+$ (B). O histograma (A) representa a ligação do anticorpo anti- $CD4$ às células recuperadas da pele de animais normais. O dot plot (B) expressa a porcentagem de células positivas para $CD4^+CD25^+$ representada na gate R2. A população $CD4^+$ pode ser observada em azul em ambos os gráficos, enquanto a população $CD4^+CD25^+$ é observada em vermelho. A porcentagem apresentada expressa a positividade encontrada entre os linfócitos (R1).

Figura 6: Determinação da população CD4⁺CD25⁺ presente na pele de animais uma e três vezes infestados com carrapatos *R. sanguineus*. Animais foram infestados com 5 casais de carrapatos *R. sanguineus* e após 72h foram sacrificados e tiveram o fragmento de pele correspondente ao sítio de fixação dos carrapatos coletado e processado para determinação da população CD4⁺ e CD4⁺CD25⁺ por citometria de fluxo. Após a seleção da população linfocitária, as células foram primeiramente analisadas quanto à presença da população CD4⁺ (em A) e em seguida à população CD4⁺CD25⁺ (em B). A população CD4⁺ pode ser observada em azul em ambos os gráficos, enquanto a população CD4⁺CD25⁺ é observada em vermelho. As percentagens apresentadas expressam a positividade encontrada entre as células selecionadas na região R1. Os gráficos de barra expressam as médias das percentagens de células CD4⁺ (A) e CD4⁺CD25⁺ (B) ± EPM presentes na população R1. Animais sham (1x) barras cinza claro; infestados (1x), cinza escuro; sham (3x), barras abertas; infestados (3x), barras pretas. Os dados são representativos de 2 experimentos independentes.



recuperadas dos animais sham (13,93%) e infestados (6,22%) (Figura 6B), quando comparado aos animais 1x infestados.

Embora não se tenham observado diferenças estatísticas nas populações de células CD4⁺ e CD4⁺CD25⁺ entre os grupos controles (sham) e infestados, ainda não seria possível afirmar que não existam diferenças quanto à presença de células T regulatórias, uma vez que, a expressão de CD25 não é restrita apenas as células T regulatórias convencionais, sendo observada também em outras populações de linfócitos (células T efectoras). Desta forma, para melhor caracterizar as células T CD4⁺CD25⁺ e estabelecer sua participação na resposta imune à saliva de carrapatos *R. sanguineus*, avaliou-se a expressão de outros marcadores de superfície que auxiliam na identificação/caracterização das células T regulatórias (CD3, CTLA-4, CD45RB, GITR e CD103) (KHATTRI et al., 2003; SAKAGUCHI, 2005). Os resultados mostraram alto percentual de células CD4⁺CD25⁺CD3⁺ recuperadas da pele de animais sham 1x (45%), infestado 1x (68,40%), sham 3x (40,7%) e infestado 3x (93,24%) e indicam uma tendência de aumento da população de células T nos animais quando da presença dos carrapatos, seja após uma ou três infestações (Figura 7). Em relação à expressão de CTLA-4, os resultados revelam que a expressão desta molécula foi significativamente maior em células de animais sham 1x e 3x (81,39% e 37,35%, respectivamente) que em células de animais infestados [8,78% (1x) e 6,48% (3x)]. Para a expressão da molécula CD45RB foram analisadas apenas as células que apresentaram baixa expressão dessa molécula, visto que as células Tregs são sabidamente CD45RB^{low} (KHATTRI et al., 2003; SAKAGUCHI, 2005). Os resultados demonstraram que a expressão de CD45RB foi similar e não variou significativamente entre os grupos (Figura 7). Outra molécula estudada foi GITR e observou-se um maior percentual de células positivas para essa molécula no grupo de animais sham 1x (63,53%). Células isoladas de animais sham 3x apresentaram diminuição da

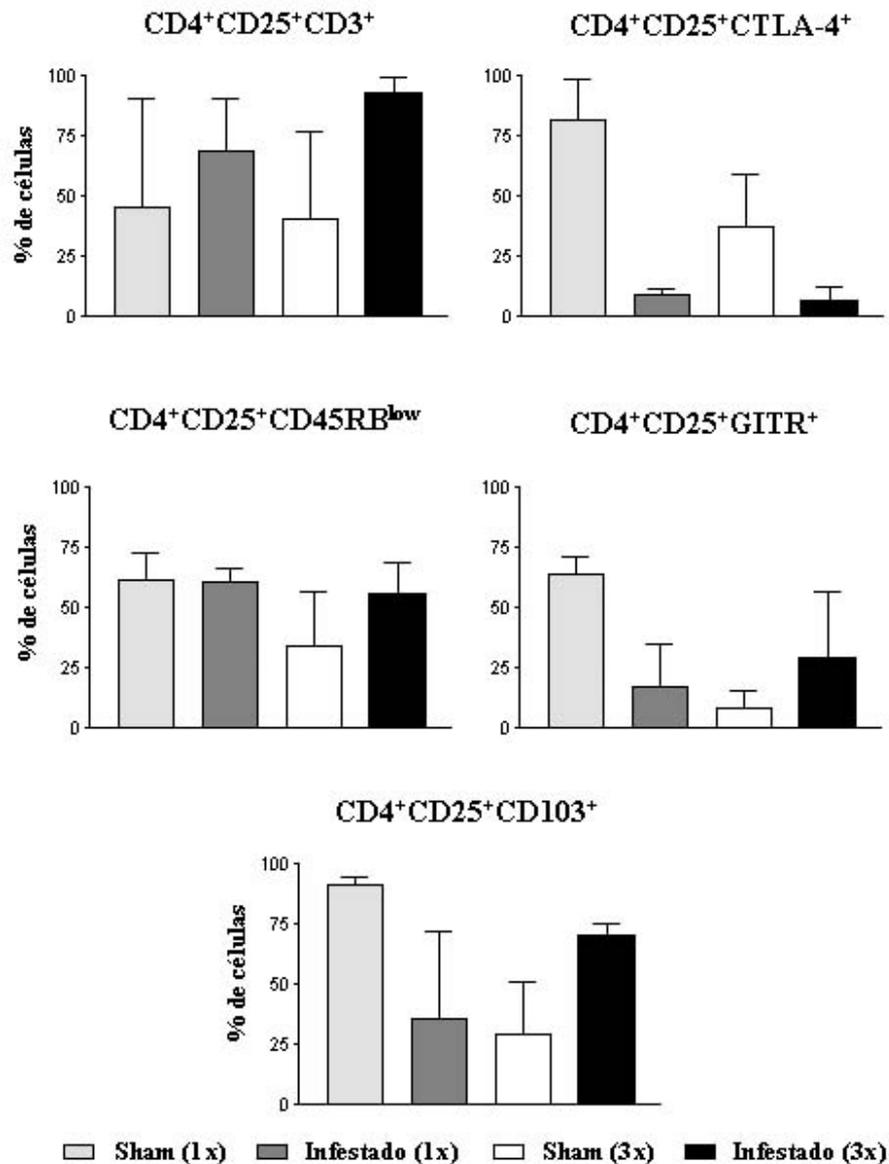


Figura 7: Determinação do fenótipo regulatório de células CD4⁺CD25⁺ presentes na pele de animais uma e três vezes infestados com carrapatos *R. sanguineus*. Animais 1 ou 3 vezes infestados com carrapatos *R. sanguineus* ou submetidos apenas à colocação da câmara de infestação (sham) foram sacrificados após transcorridas 72 h de infestação. O fragmento de pele correspondente ao sítio de fixação foi coletado e processado para análise fenotípica das células presentes no infiltrado por citometria de fluxo. A expressão das moléculas CD3, CTLA-4, CD45RB, GITR e CD103 foi avaliada na população CD4⁺CD25⁺. Os resultados apresentados correspondem as médias ± EPM das percentagens de células positivas para animais sham (1x), barras cinza claro; infestados (1x), barras cinza escuro; sham (3x), barras abertas, e infestados (3x), barras pretas. Os dados são representativos de 2 experimentos independentes.

positividade para GITR (17,27%), em relação às células de animais sham 1x. A infestação com carrapatos não alterou de forma significativa a percentagem de células positivas para esta molécula (7,85% e 28,77%). A última análise quanto ao fenótipo de células Tregs se realizou com a determinação das células positivas para a molécula CD103. Novamente, os maiores níveis de expressão foram observados nas células isoladas de animais que foram submetidos à colocação da câmara de alimentação apenas uma vez (sham 1x, 91,13%). Entretanto, nenhuma diferença estatística entre os grupos foi observada (Figura 7).

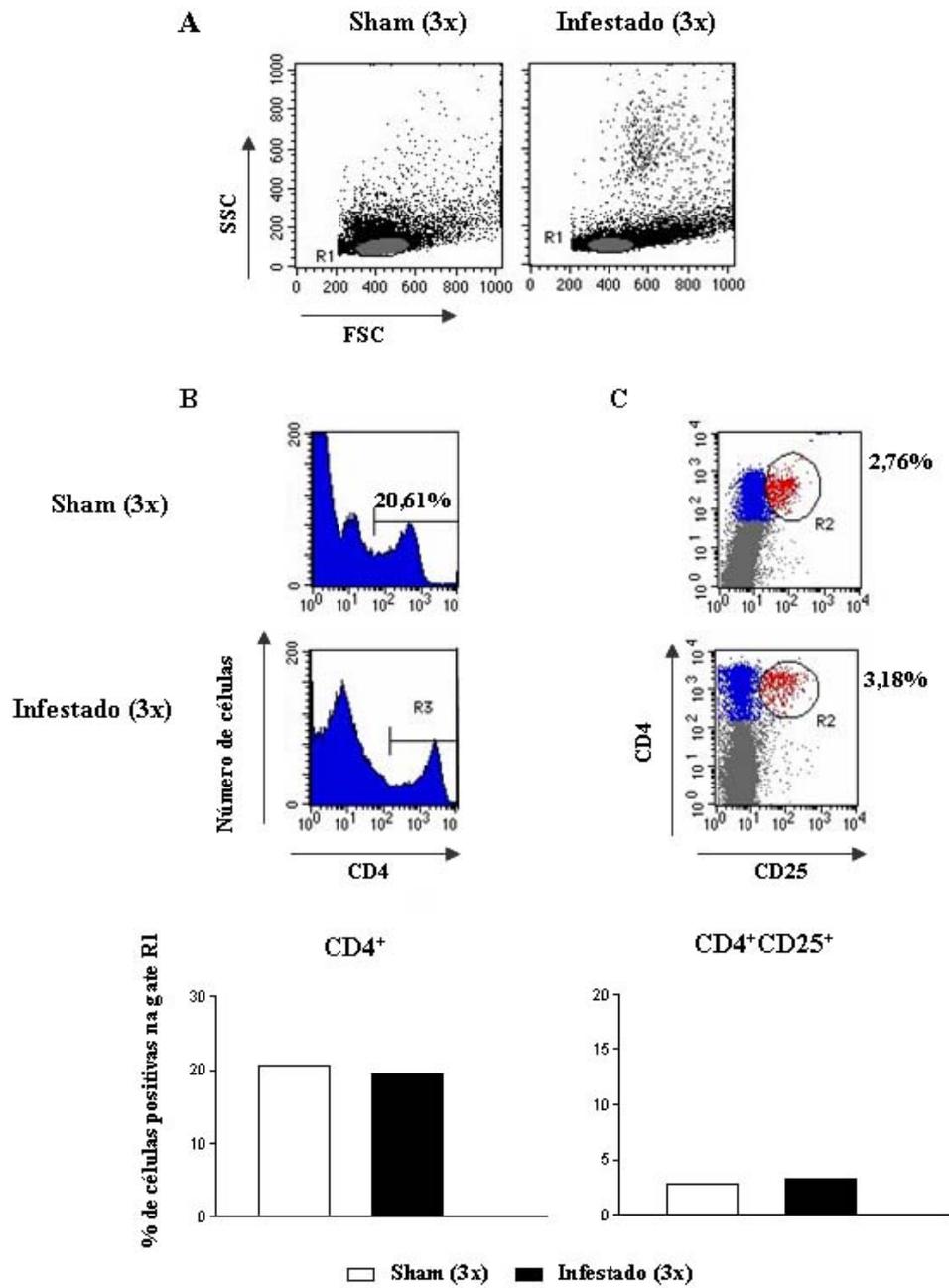
A caracterização das células T regulatórias presentes na pele de animais infestados foi realizada após diferentes tempos de infestação (24 e 48 h, 1 e 3 vezes), porém também não foram observadas diferenças estatísticas nesses outros tempos analisados (dados não apresentados).

4.3 Análise das Células Isoladas dos Linfonodos de Animais Infestados com Carrapatos *R. sanguineus*

As células isoladas dos linfonodos regionais ao sítio de fixação dos carrapatos foram primeiramente avaliadas quanto ao seu tamanho (FSC) e granularidade (SSC). Na composição celular do linfonodo foi possível observar a presença de células que coincidem com tamanho e complexidade interna de linfócitos e monócitos (Figura 8A). Após esta primeira análise, procedeu-se à caracterização das células através da utilização de anticorpos específicos para a molécula CD4 e, em seguida, foram avaliadas as células CD4⁺CD25⁺. Os valores encontrados para a expressão de CD4, bem como para a expressão concomitante de CD4 e CD25 foram semelhantes (Figura 8).

O próximo passo foi avaliar a população de células CD4⁺CD25⁺ quanto à expressão de moléculas características do fenótipo regulatório (CD3, CTLA-4, CD45RB, GITR e CD103)

Figura 8: Determinação da população CD4⁺CD25⁺ presente nos linfonodos regionais de animais infestados com carrapatos *R. sanguineus*. Animais foram infestados com 5 casais de carrapatos *R. sanguineus* e após 72 h de fixação, foram sacrificados e tiveram o linfonodo regional ao sítio de fixação dos carrapatos coletado e processado para determinação da população CD4⁺ e CD4⁺CD25⁺ por citometria de fluxo. Após a seleção da população linfocitária (A), as células foram primeiramente analisadas quanto a presença da população CD4⁺ (B) e em seguida a população CD4⁺CD25⁺ (C). A população CD4⁺ pode ser observada em azul enquanto a população CD4⁺CD25⁺ é observada em vermelho. As percentagens apresentadas expressam a positividade encontrada entre as células selecionadas na região R1. Os gráficos de barras expressam as médias das percentagens de células CD4⁺ (A) e CD4⁺CD25⁺ (B) ± EPM presentes na população R1. Animais sham (3x), barra aberta (pool de 7 animais); infestados (3x), barras pretas (pool de 7 animais).



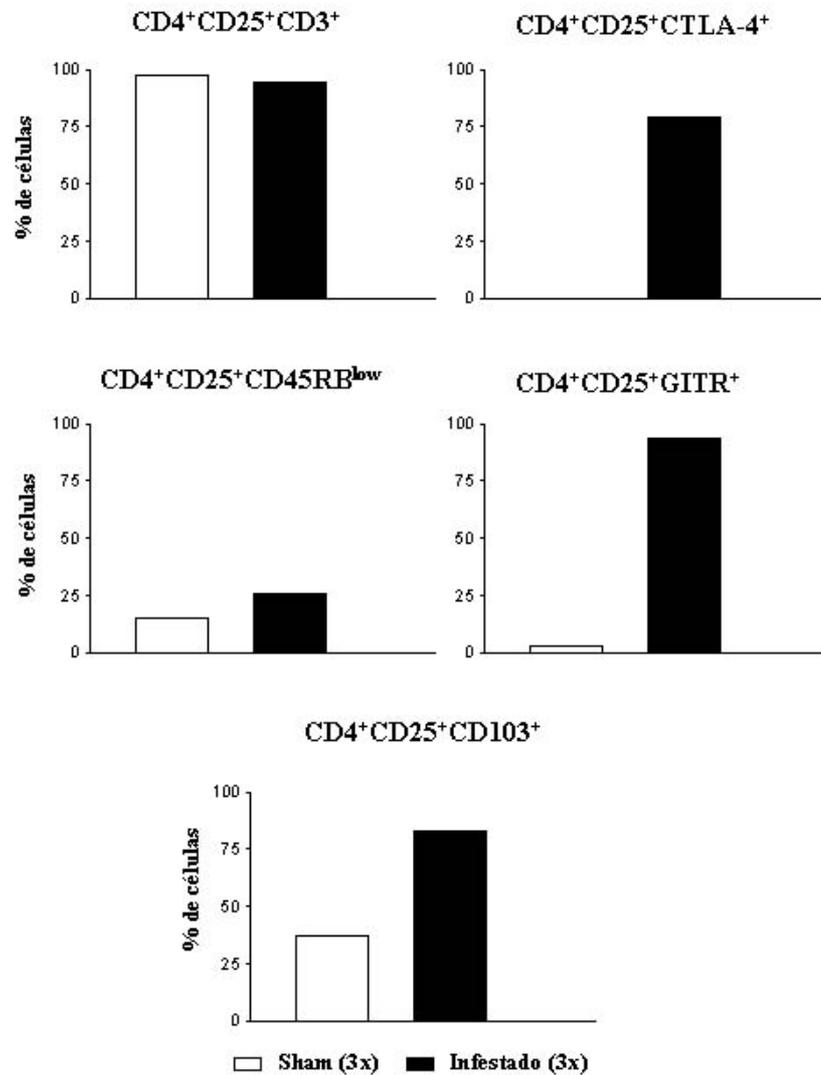


Figura 9: Aumento da população de fenótipo regulatório no linfonodo de animais (3x) infestados com carrapatos *R. sanguineus*. Animais 3 vezes infestados com carrapatos *R. sanguineus* ou submetidos apenas a colocação da câmara de infestação (sham) foram sacrificados após transcorridas 72 h de fixação. O linfonodo regional foi coletado e processado para análise fenotípica das células presentes, por citometria de fluxo. A expressão da moléculas CD3, CTLA-4, CD45RB, GITR e CD103 foi avaliada na população CD4⁺CD25⁺. Os resultados apresentados correspondem às percentagens de células positivas para animais sham (3x), barra aberta (pool de 7 animais) e infestados (3x), barra preta (pool de 7 animais).

(Figura 9). Os resultados mostraram que não há diferenças na percentagem de células $CD4^+CD25^+CD3^+$ entre os animais sham 3x (97,245) e animais infestados (94,02%). De forma interessante, a expressão de CTLA-4, GITR e CD103 foi significativamente maior em células do linfonodo de animais infestados 3x que em células dos animais do grupo controle, enquanto que a expressão de CD45RB foi similar entre os grupos (Figura 9). Esses resultados mostraram aumento no número de células T com fenótipo regulatório no linfonodo de animais infestados. Vale observar que a análise do linfonodo também foi realizada em outros tempos, porém não revelou resultados significativamente diferentes entre os grupos (dados não mostrados).

4.4 Determinação da Expressão do Fator de Transcrição Foxp3 nas Células dos Linfonodos de Animais Infestados

Várias evidências da literatura demonstram que a expressão do gene Foxp3 está diretamente relacionada com a diferenciação da população de células T regulatórias naturais e seria o principal marcador para identificar tais células (FONTENOT; RUDENSKY, 2005). Como os resultados mostraram aumento no número de células T com fenótipo regulatório no linfonodo dos animais infestados, julgou-se necessária a determinação da expressão do fator de transcrição Foxp3 entre as células $CD4^+CD25^+$. Para tal, avaliou-se a expressão de mensagem para Foxp3 e para β -actina (gene constitutivo) pela de reação de PCR quantitativo. Os resultados obtidos com a análise dos linfonodos de animais normais serviram para calibrar as equações de determinação da expressão relativa de Foxp3. Não foi possível verificar diferenças significantes entre os grupos estudados, nos dois tempos avaliados (Figura 10).

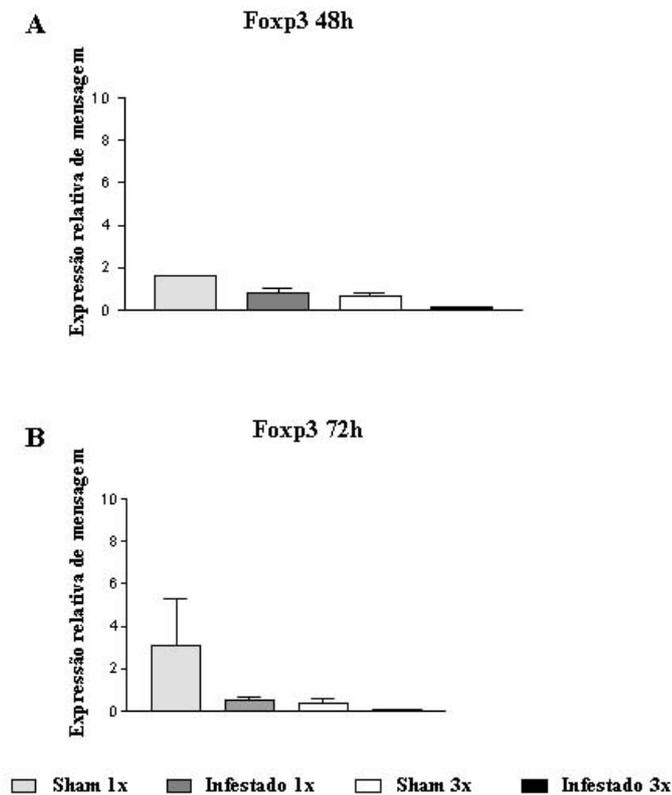


Figura 10: Determinação da expressão de Foxp3 nos linfonodos regionais de animais uma e três vezes infestados com carrapatos *R. sanguineus*. Animais infestados por 48 (A) ou 72 h (B), acompanhados de seus respectivos controles, foram sacrificados e tiveram seus linfonodos regionais (ao sítio de fixação dos carrapatos) coletados e processados para avaliação da expressão de mensagem gênica para o fator de transcrição Foxp3, por PCR quantitativo. O RNA do material foi extraído e em seguida confeccionado o DNA complementar (cDNA). As amostras foram levadas ao termociclador e quantificadas em tempo real. Os gráficos mostram a média \pm EPM da expressão relativa de mensagem, normalizada para β -actina para animais sham (1x), barras cinza claro (n=3); animais infestados (1x), barras cinza escuro (n=3); animais sham (3x), barras abertas (n=3) e animais infestados (3x), barras pretas (n=3), tendo como calibrador do cálculo da expressão relativa as mensagens observadas na pele normal.

4.5 Análise das Células T Ativadas na Pele e Linfonodos de Animais Infestados com Carrapatos

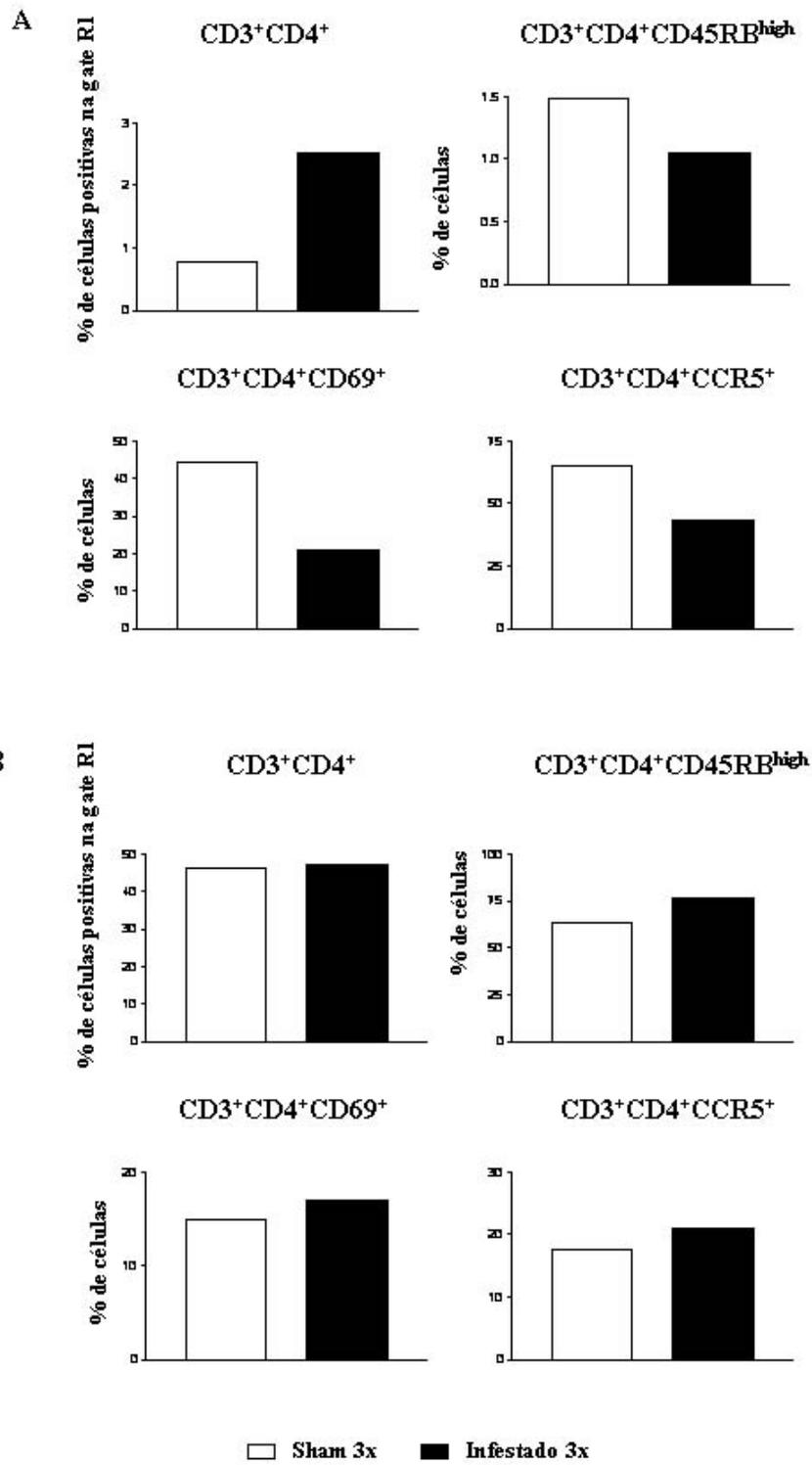
Visto que as células recuperadas de animais infestados não apresentaram o fenótipo característico de células T regulatórias naturais, julgou-se interessante avaliar se estas células T pertenceriam à população de células T ativadas. Assim, as células recém isoladas foram avaliadas quanto à expressão de moléculas que caracterizam o estado de ativação das células T. Para isso, analisou-se a expressão das moléculas CD3 e CD4, e concomitantemente a elas, a expressão das moléculas CD45RB em altos níveis (*high*), CD69 e CCR5 (LINDELL et al., 2006) por citometria de fluxo.

As células foram primeiramente avaliadas quanto ao tamanho e granularidade para a seleção da população de linfócitos conforme descrito anteriormente. A percentagem de células CD3⁺CD4⁺ na pele de animais sham foi de 0,78%, enquanto que nos animais infestados foi de 2,51%; dentre essas, as células que co-expressavam, em altos níveis, a molécula CD45RB nos animais sham eram de 1,48%, enquanto nos animais infestados, 1,05%.

Em relação à expressão de CD69, os resultados mostraram um alto percentual de células CD69⁺ (44,53%) na pele de animais que receberam apenas a câmara de alimentação, quando comparado com os animais que foram infestados com o carrapato (21,05%). A expressão de CCR5 também predominou nas células isoladas de animais controle (65,34%), quando comparada com os animais infestados (43,17%). Esses resultados sugerem que, embora a percentagem de células T CD4⁺ nos animais infestados seja maior que nos animais controles, a presença dos carrapatos e, conseqüentemente, a saliva por eles produzida, induzem uma menor ativação das células T que migram para o sítio de fixação (Fig. 11A).

Diferentemente do observado na pele, as percentagens de células CD3⁺CD4⁺ isoladas dos linfonodos regionais ao sítio de fixação dos carrapatos, bem como as células que co-

Figura 11: Determinação do fenótipo de ativação das células T presentes na pele e nos linfonodos de animais três vezes infestados com carrapatos *R. sanguineus*. Animais três vezes infestados com carrapatos *R. sanguineus* ou submetidos apenas a colocação da câmara de alimentação (sham) foram sacrificados após transcorridas 72 h de infestação. O fragmento de pele correspondente ao sítio de fixação (A) ou os linfonodos regionais (B) foram coletados e processados para determinação da população de células CD3⁺CD4⁺ em estado de ativação celular, presentes no infiltrado, por citometria de fluxo. Os resultados apresentados correspondem às percentagens de células positivas para as moléculas indicadas em animais sham (3x), barras abertas (*pool* de 5 animais); infestados (3x), barras pretas (*pool* de 5 animais). Notar a diferença das escalas entre os gráficos apresentados.



expressam os demais marcadores de superfície, foram semelhantes entre os grupos controles e experimentais (Figura 11B).

4.6 Análise dos Granulócitos na Pele de Animais Infestados com Carrapatos

Como já tratado anteriormente, observou-se que animais submetidos à infestação por carrapatos apresentaram uma população adicional de granulócitos, quando comparados com o grupo controle. Essas células foram caracterizadas após 72 h de fixação, em 3^o infestação. A figura 12A mostra a população que foi selecionada e analisada quanto à expressão de GR1. Animais infestados apresentaram um aumento na percentagem de células GR1⁺ recuperadas da pele (36,99%), quando comparados com animais submetidos apenas à colocação da câmara de alimentação (23,12%) (Fig. 12B).

4.7 Inoculação de Saliva de Carrapatos *R. sanguineus*

Paralelamente aos estudos de infestação com *R. sanguineus*, realizaram-se ensaios de inoculação de saliva desses carrapatos na orelha de animais BALB/c para estudar a imunomodulação exercida pela saliva desses ácaros. Assim, a saliva de *R. sanguineus* foi inoculada intradermicamente na orelha de camundongos, uma ou três vezes, e após 48 h da inoculação as orelhas foram coletadas, agrupadas (2 animais/grupo) e processadas como descrito na seção de materiais e métodos. Os controles consistiram da inoculação de PBS como controle negativo, e LPS como controle positivo (dados não mostrados).

4.7.1 Caracterização do Infiltrado Inflamatório Induzido pela Inoculação de Saliva

As células foram avaliadas quanto ao tamanho (FSC) e granulosidade (SSC), e semelhantemente ao observado nas infestações, a saliva também foi capaz de induzir o acúmulo de granulócitos no local de inoculação, sendo detectada também a presença de

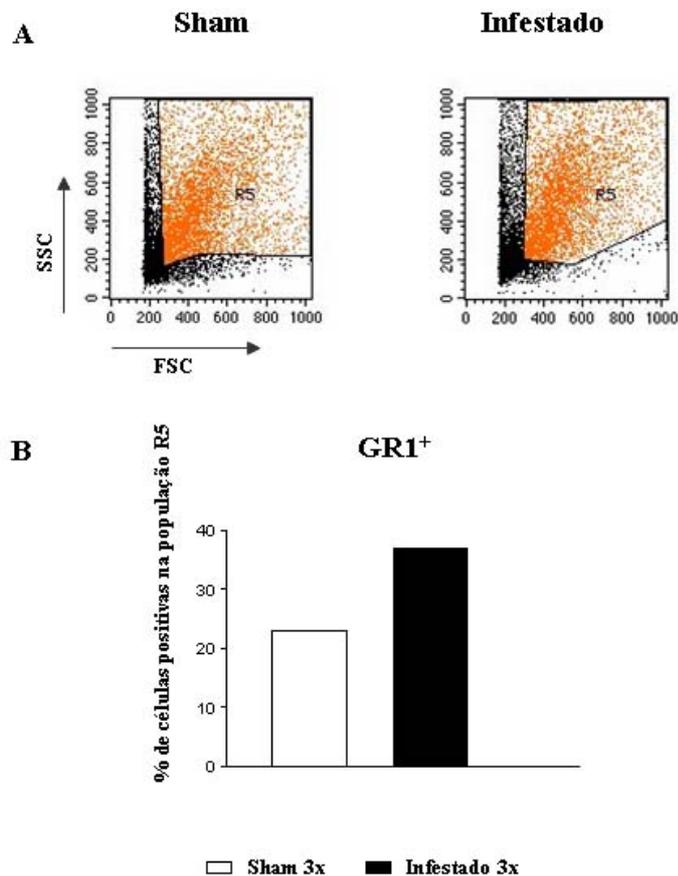


Figura 12: Determinação da presença de granulócitos no infiltrado celular em resposta a infestação por carrapatos *R. sanguineus*. Animais 3 vezes infestados com carrapatos *R. sanguineus* ou submetidos apenas à colocação da câmara de alimentação foram sacrificados após 72 h de fixação dos carrapatos. O fragmento de pele correspondente ao sítio de fixação foi coletado e processado para análise da população de granulócitos presentes no infiltrado celular, por citometria de fluxo. Primeiramente as células foram analisadas quanto ao seu tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) em A e, em seguida, avaliadas quanto à expressão da molécula GR1 (B). As barras representam as percentagens de células GR1⁺ obtidas da pele de animais controle (barra aberta, *pool* de 5 animais) e animais infestados (barra preta, *pool* de 5 animais).

monócitos e linfócitos (Figura 13). Após a seleção da população de linfócitos caracterizou-se o infiltrado linfocitário induzido pela saliva de carrapatos. Para isso, as células presentes na orelha foram avaliadas quanto à expressão de CD3, CD19, CD4 e CD8 (Figura 14).

Os resultados apontaram que as três inoculações de saliva de carrapatos *R. sanguineus* induziram, significativamente, uma maior migração de células T para o local de inoculação (9,45%), quando comparada com os animais inoculados apenas com PBS (2,49%). Vale ressaltar que a população de células T CD3⁺ não variou de forma significativa entre os grupos de animais que foram inoculados apenas uma vez com saliva (1,64%) ou PBS (1,65%). Para as células T CD4, também pôde-se observar um maior recrutamento dessas células nos animais submetidos a três inoculações de saliva de carrapatos, porém dessa vez com $p < 0,001$. Os valores médios observados para animais sham 1x, infestados 1x, sham 3x e infestados 3x foram, respectivamente, 0,64%, 0,16%, 0,40% e 3,63%.

A análise das populações de células T citotóxicas (CD3⁺CD8⁺), bem como das células B (CD19⁺) mostraram um pequeno recrutamento desses tipos celulares em resposta a inoculação de saliva e não se observou diferença estatística entre os grupos estudados. (Figura 14).

4.7.2 Avaliação da Presença de Células T Regulatórias

As células recuperadas da orelha de animais inoculados com saliva e de animais controle, após 48 h da primeira ou terceira inoculação, foram avaliadas quanto à presença de células T regulatórias. Animais submetidos a três inoculações de saliva apresentaram um aumento de 9,5 vezes, em média, das células CD4⁺, em relação aos demais grupos. Não se observaram diferenças estatísticas entre os grupos quando se analisou a percentagem de células CD4⁺CD25⁺, observando-se uma percentagem muito pequena dessas células em todos os grupos estudados (< 1%) (Figura 15). Em seguida, avaliou-se nas células CD4⁺CD25⁺ a

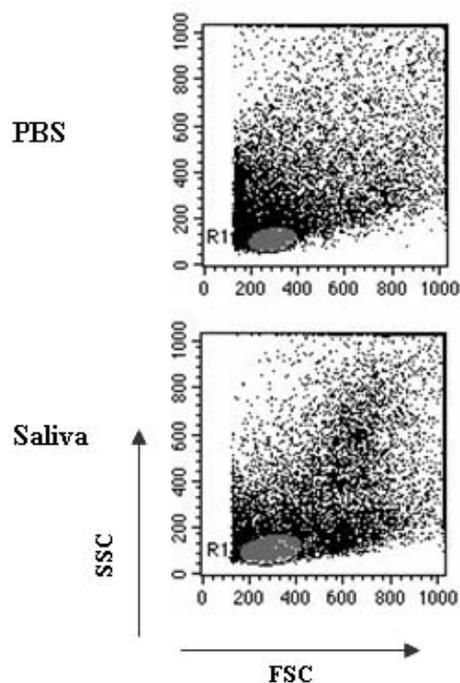


Figura 13: Perfil populacional das células recuperadas da orelha de animais inoculados com saliva de carrapatos *R. sanguineus*. A orelha de camundongos BALB/c foi inoculada, uma ou três vezes com saliva de carrapatos *R. sanguineus*, PBS como controle negativo ou com LPS como controle positivo (dados não mostrados), a fim de se estudar o infiltrado inflamatório induzido pela inoculação. Após 48h da inoculação, os animais foram sacrificados e a orelha coletada para análise das células recrutadas para o local, por citometria de fluxo. A figura acima mostra as células analisadas quanto ao seu tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) obtidas da análise das células recuperadas de 2 animais por grupo estudado. R1 representa a população linfocitária utilizada para as análises posteriores. Os *dot plots* apresentados mostram 10.000 células, adquiridas durante as análises.

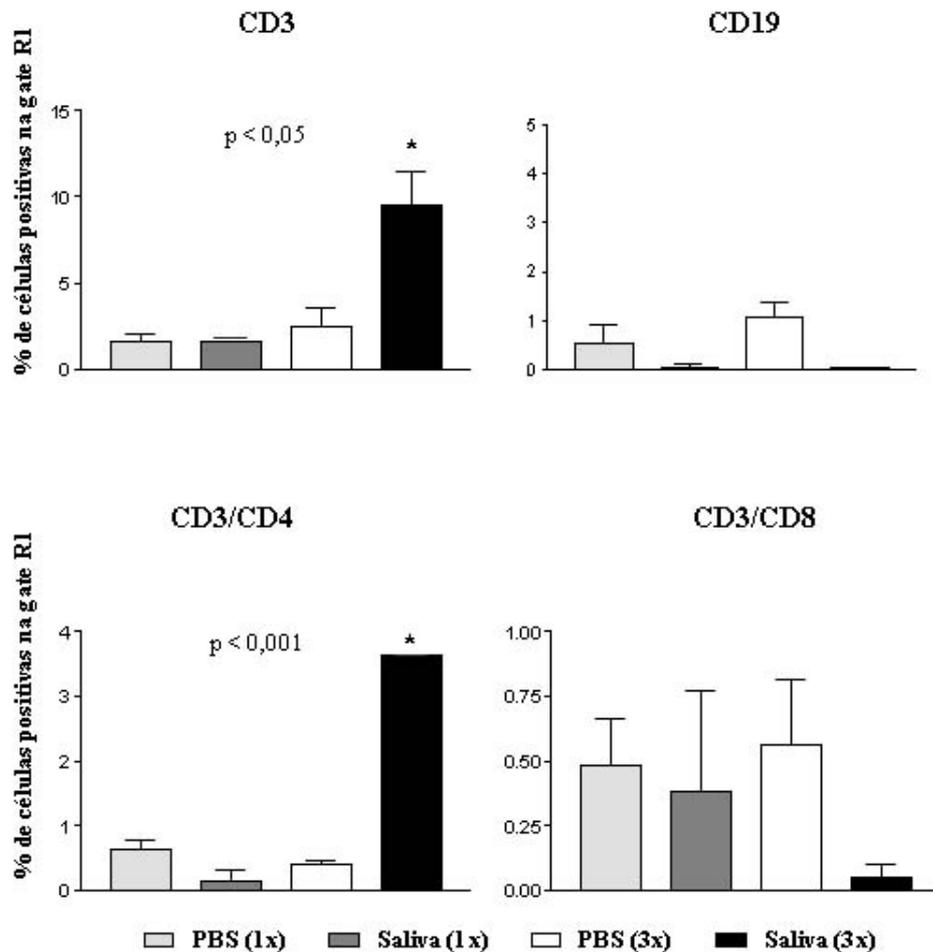
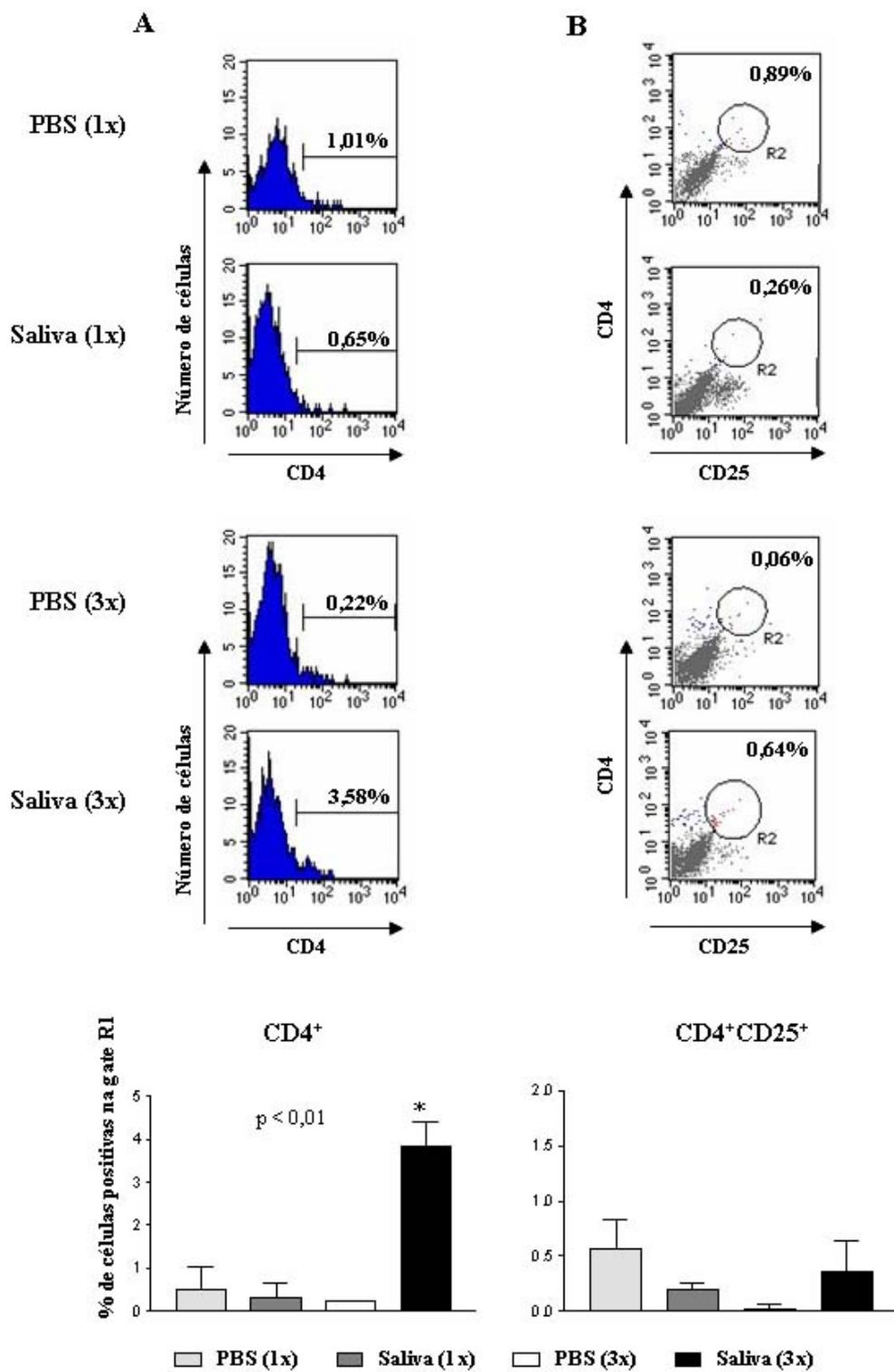


Figura 14: Caracterização dos linfócitos recuperados da orelha de animais uma e três vezes inoculados com saliva de carrapatos *R. sanguineus*. A orelha de camundongos BALB/c foi inoculada uma ou três vezes com saliva de carrapatos *R. sanguineus*, PBS como controle negativo ou com LPS como controle positivo (dados não apresentados), a fim de se estudar o infiltrado inflamatório induzido. Após 48h da inoculação, os animais foram sacrificados e a orelha coletada para análise das células, por citometria de fluxo. As células de tamanho e complexidade interna compatíveis com linfócitos foram selecionadas e em seguida analisadas quanto à expressão das moléculas CD3, CD4, CD8 e CD19. Os gráficos de barra expressam as médias das percentagens de células CD3⁺, CD19⁺, CD3⁺CD4⁺ e CD3⁺CD8⁺ ± EPM presentes na população R1. Animais inoculados 1x com PBS, barras cinza claro; animais inoculados 1x com saliva, barras cinza escuro; animais inoculados 3x com PBS, barras abertas; inoculados 3x com saliva, barras pretas. Para as células CD3⁺, p<0,05 em relação aos três outros grupos; para as células CD3⁺CD4⁺, p<0,001, em relação aos três outros grupos. Os dados são representativos de 2 experimentos independentes. Notar a diferença entre as escalas dos gráficos apresentados.

Figura 15: Determinação da população CD4⁺CD25⁺ presente na orelha de animais uma e três vezes inoculados com saliva de carrapatos *R. sanguineus*. A orelha de camundongos BALB/c foi inoculada uma ou três vezes com saliva de carrapatos *R. sanguineus*, PBS como controle negativo ou com LPS como controle positivo (dados não apresentados), a fim de se estudar o infiltrado inflamatório induzido. Após 48h da inoculação, os animais foram sacrificados e a orelha coletada e processada para determinação das células CD4⁺CD25⁺, por citometria de fluxo. Após a seleção da população linfocitária, as células foram primeiramente analisadas quanto à presença da população CD4⁺ (A) e em seguida à população CD4⁺CD25⁺ (B), representada por R2. A população CD4⁺ pode ser observada em azul, enquanto a população CD4⁺CD25⁺ é observada em vermelho. As percentagens apresentadas expressam a positividade encontrada entre as células selecionadas na região R1. As barras expressam as médias das percentagens de células CD4⁺ (A) e CD4⁺CD25⁺ (B) ± EPM presentes na população R1. Animais inoculados 1x com PBS, barras cinza claro; inoculados 1x com saliva, barras cinza escuro; animais inoculados 3x com PBS, barras abertas, e, animais inoculados 3x com saliva, barras pretas. Os dados são representativos de 2 experimentos independentes. * p<0,01 em relação aos três outros grupos.



expressão concomitante das moléculas CTLA-4 e GITR (Figura 16). Em relação à CTLA-4, os valores observados foram 81,6%, 98,86%, 92,81% e 68,39%, respectivamente para animais inoculados 1x com PBS, 1x com saliva, 3x com PBS e 3x com saliva de carrapatos. Seguindo a mesma ordem dos grupos, os valores médios observados para a expressão de GITR entre as células CD4⁺CD25⁺ foram: 48,06%, 73,86%, 96,06% e 63,22% (Fig. 16).

4.7.3 Células Dendríticas

Trabalhos recentes têm mostrado que a saliva exerce uma importante influência sobre a diferenciação, migração e função de células dendríticas (CAVASSANI et al., 2005; OLIVEIRA (manuscrito em fase de preparação)). Assim, julgou-se interessante avaliar a influência da saliva sobre as células dendríticas em ensaios *in vivo*. Para tal, avaliou-se a população de células CD11b⁺CD11c⁺ presentes nos infiltrados induzidos pela inoculação de saliva na orelha dos animais, por citometria de fluxo (Figura 17A). Os resultados revelaram que embora não haja diferenças estatísticas entre os grupos quanto à percentagem de células CD11b⁺CD11c⁺, há uma tendência de diminuição no número de células dendríticas recuperadas da orelha dos animais após uma inoculação de saliva, embora esse resultado não tenha se repetido para as três inoculações. Os valores médios observados para as percentagens de células dendríticas foram, para animais uma vez inoculados com PBS 3,47%, com saliva, 1,01%; para animais submetidos a três inoculações de PBS foi 4,48% e de saliva, 4,44% (Figura 17B).

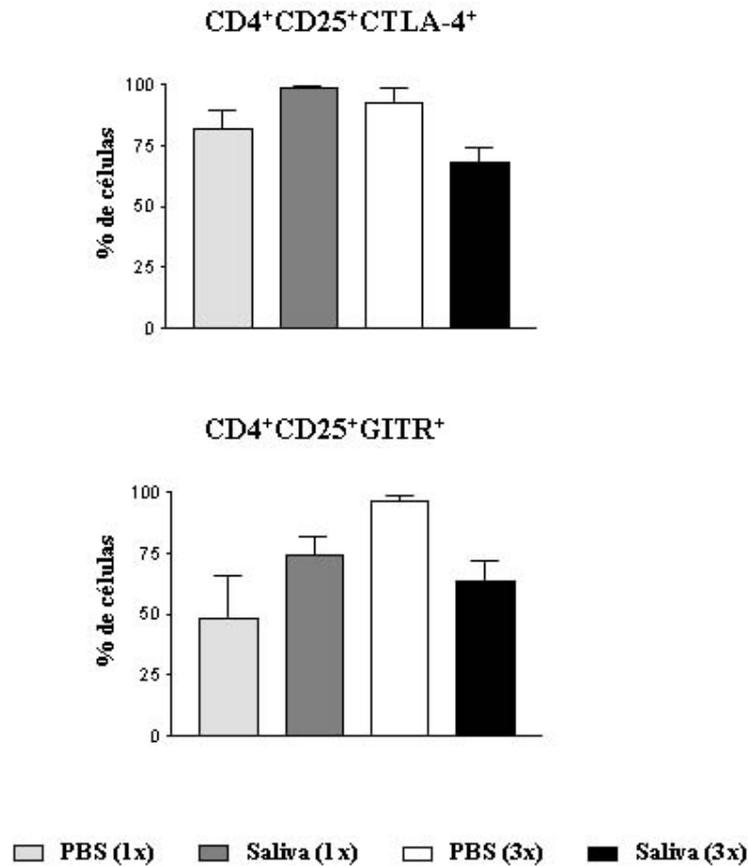


Figura 16: Determinação do fenótipo regulatório das células CD4⁺CD25⁺ presentes na orelha de animais uma e três vezes inoculados com saliva de carrapatos *R. sanguineus*. Animais 1 ou 3 vezes inoculados com PBS ou saliva de carrapatos *R. sanguineus* foram sacrificados após transcorridas 48 h da inoculação. A orelha foi então coletada e processada para análise fenotípica das células presentes no infiltrado por citometria de fluxo. A expressão das moléculas CTLA-4 e GITR foi avaliada na população CD4⁺CD25⁺. Os resultados apresentados correspondem as médias ± EPM das porcentagens de células positivas para animais inoculados (1x) com PBS, barras cinza claro; inoculados (1x) com saliva, barras cinza escuro; inoculados (3x) com PBS, barras abertas, e inoculados (3x) com saliva, barras pretas. Os dados são representativos de 2 experimentos independentes.

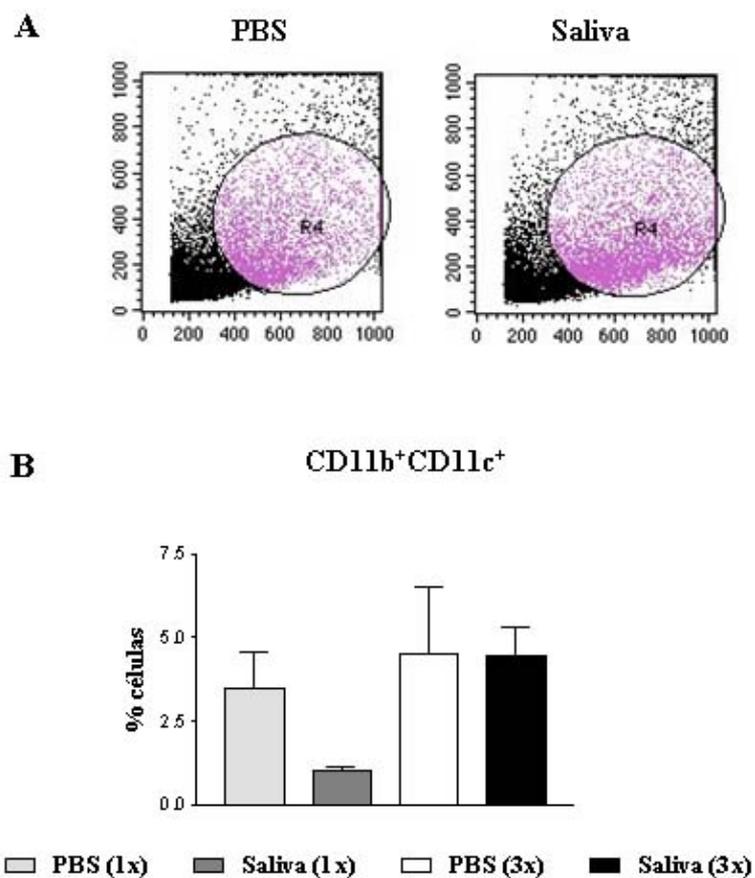
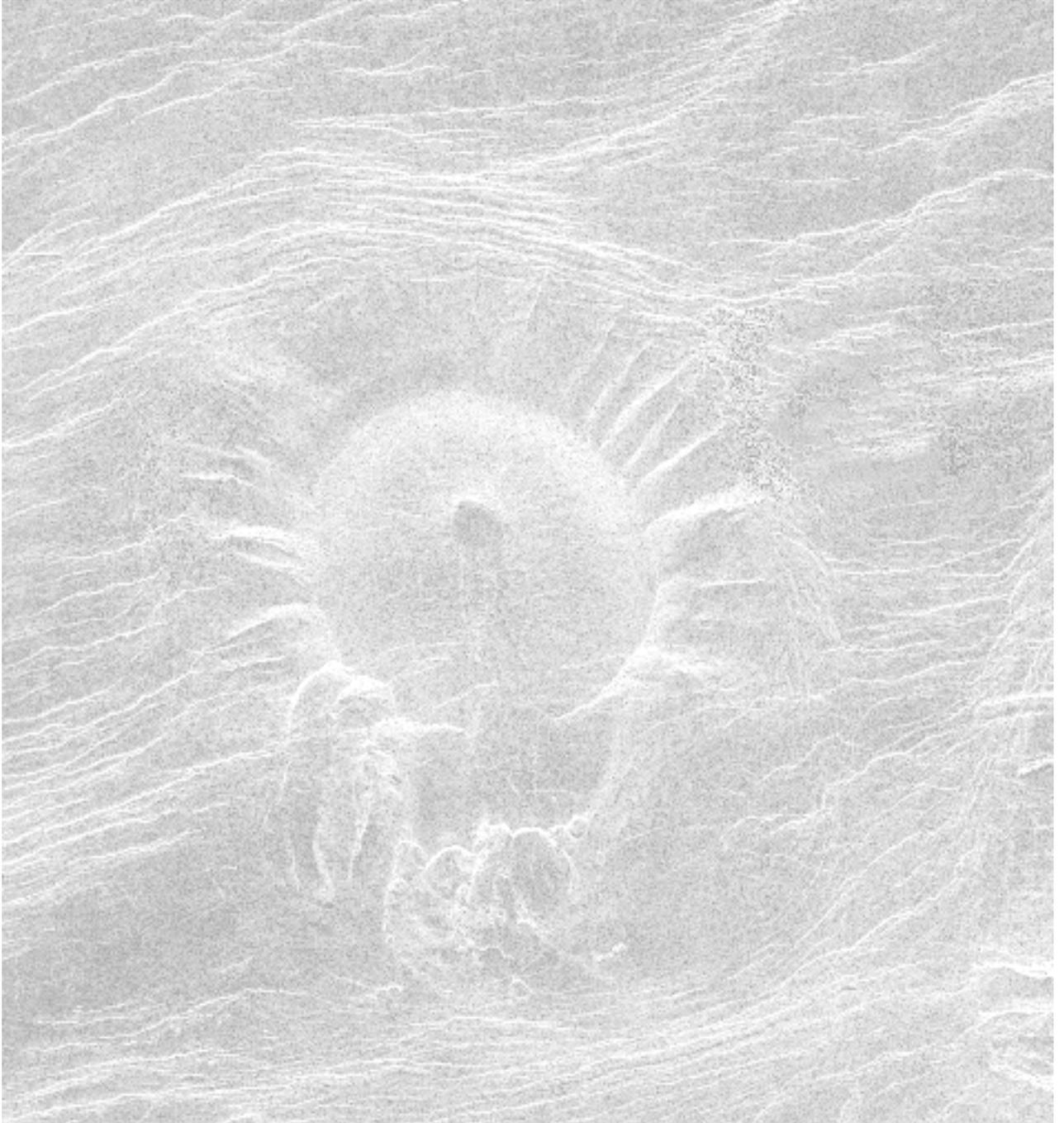


Figura 17: Determinação da presença de células dendríticas na pele de animais inoculados com saliva de carrapatos *R. sanguineus*. Animais foram inoculados 1 ou 3 vezes, na orelha, com PBS ou saliva de carrapatos. Transcorridas 48 h da inoculação, foram sacrificados e a orelha coletada e processada para determinação da população de células dendríticas presentes no infiltrado, por citometria de fluxo. Primeiramente as células foram analisadas quanto ao seu tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) (A) e, em seguida, avaliadas quanto à dupla expressão das moléculas CD11b e CD11c (B). As barras representam as médias \pm EPM das percentagens de células CD11b⁺CD11c⁺ para animais inoculados (1x) com PBS, barras cinza claro; inoculados (1x) com saliva, barras cinza escuro; inoculados (3x) com PBS, barras abertas, e inoculados (3x) com saliva, barras pretas. Os dados são representativos de 2 experimentos independentes.



Discussão

5 Discussão

Sabendo que carrapatos permanecem fixos em seus hospedeiros por longos períodos (dias), é possível inferir que esses ácaros possuam um arsenal de mecanismos que atuem no controle da resposta imune do hospedeiro. De fato, diversos trabalhos têm demonstrado que carrapatos são capazes de modular a resposta imune de seus hospedeiros através de componentes presentes na saliva, que são inoculados durante o repasto sanguíneo (RIBEIRO et al, 1985; SAUER et al, 1995). Adicionalmente, diferentes espécies de carrapatos são capazes de induzir a produção de citocinas, como IL-4, IL-10 e TGF- β , e suprimir a produção de citocinas como IFN- γ , IL-2 e IL-12 nos linfonodos, o que parece favorecer a sobrevivência dos carrapatos (CHRISTE; RUTTI, BROSSARD, 1999; FERREIRA; SILVA, 1999). O mecanismo envolvido na indução de uma resposta imune com um padrão de citocinas mais associado com Th2 durante infestações não é conhecido.

Pesquisas recentes têm relacionado uma nova subclasse de linfócitos (células T regulatórias – Tregs) capaz de produzir essas citocinas e induzir supressão da resposta imune periférica, inclusive participando da manutenção de infecções crônicas (SHEVACH, 2002; BELKAID; ROUSE, 2005). Nesses modelos, as Tregs têm sido associadas principalmente ao controle de uma resposta inflamatória exacerbada, patológica aos tecidos dos hospedeiros, bem como na manutenção do agente patogênico, etapa necessária para o desenvolvimento de memória imunológica (BELKAID et al., 2002; BELKAID; ROUSE, 2005). No atual estudo procurou-se avaliar se carrapatos seriam capazes de recrutar Tregs para o local de sua fixação com o intuito de controlar uma resposta inflamatória prejudicial à sua alimentação.

Assim, inicialmente avaliou-se o infiltrado celular inflamatório induzido pela inoculação de saliva e infestações com carrapatos através da observação ao microscópio óptico de secções histológicas da pele dos camundongos. Cabe esclarecer que camundongos

foram inoculados com saliva de carrapatos para verificação de um possível “efeito colâ-câmara”, que era inevitável no grupo de animais infestados.

Os resultados mostraram que tanto a inoculação da saliva quanto a infestação com ácaros foi capaz de recrutar um significativo infiltrado celular à pele dos animais. Esse infiltrado era composto majoritariamente por células granulares, especialmente neutrófilos, e células mononucleares. Também se observou a presença de outros tipos celulares no local da lesão, tais como fibroblastos e outros granulócitos, porém em quantidades bem menos expressivas. Adicionalmente, após sucessivas exposições à saliva ocorreu um aumento do número de capilares sangüíneos no local, além de extravasamento de células, especialmente hemácias. Esse achado condiz com a biologia alimentar de carrapatos, visto que esses não utilizam a canulação de vasos sangüíneos para se alimentar, e sim se nutrem a partir de uma cavidade de alimentação formada pela destruição de tecidos, acompanhada do acúmulo de sangue na região de fixação (SAUER et al., 1996).

A análise mais detalhada (com identificação de células com fenótipo de Tregs) das células da pele e dos linfonodos regionais ao sítio de fixação de animais infestados com carrapatos foi realizada por citometria de fluxo, sendo primeiramente avaliado o tamanho e granulosidade celular. As células isoladas da pele de animais normais, sham e infestados apresentaram perfil bastante semelhante entre si, embora células de animais infestados fossem sempre recuperadas em maior número. A comparação entre os grupos mostrou que os tipos celulares apresentavam tamanho e granularidade compatíveis com linfócitos, monócitos e granulócitos, embora uma diferença marcante pôde ser observada: animais infestados com carrapatos apresentaram uma população celular adicional, compatível com células contendo muitos grânulos. Esse resultado também foi observado entre os animais submetidos à inoculação de saliva na orelha. De fato, foi observado que animais infestados apresentaram um maior número de células GR1⁺ recuperadas da pele, quando comparados ao seu controle

(sham). Esses achados são coerentes com outros obtidos pelo nosso grupo, onde foram observados níveis significativamente maiores de mensagem gênica para KC (quimiocina responsável pela indução de migração de neutrófilos (ELSNER; ESCHER; FORSSMANN, 2004)) na pele de animais infestados com carrapatos (manuscrito em fase de preparação), e comprovam a efetiva participação de células granulares na resposta imune inata induzida por carrapatos de acordo com estudos recentes (FERREIRA et al., 2003).

A despeito de ser observado um acúmulo de granulócitos na lesão de alimentação, não se visualizou destruição tecidual. Talvez isso possa estar relacionado à descrição de que saliva de carrapatos *R. sanguineus* pode inibir a função de neutrófilos *in vitro* (INOKUMA et al., 1997; FERREIRA et al., 2003). Trabalhos ainda em execução pelo nosso grupo encontraram numa biblioteca de cDNA de glândulas salivares de carrapatos *R. microplus* um clone codificador de uma proteína ligante de neutrófilos, sugerindo que evolutivamente carrapatos foram selecionados quanto à expressão de produtos gênicos capazes de burlar a resposta imune inata de seus hospedeiros.

Já as células recuperadas dos linfonodos de animais infestados e sham apresentaram um perfil mais uniforme quanto aos tipos celulares quando comparados com a pele, sendo composto basicamente por células que coincidem com tamanho e complexidade interna de linfócitos e monócitos. Tal como na pele, os linfonodos obtidos de camundongos infestados com carrapatos também mostraram conter uma população celular definida com grande quantidade de grânulos.

Em seguida, analisou-se o fenótipo das células de tamanho e complexidade interna compatíveis a linfócitos na pele e nos linfonodos regionais de animais infestados com carrapatos. Quando foi avaliada a percentagem de células CD4⁺ na pele verificou-se que animais submetidos à câmara de alimentação e à infestação por carrapatos apresentaram um aumento estatisticamente significativo em relação aos camundongos normais. Esse fato indica

que a cola empregada nos experimentos induz migração celular, e assim pode diluir ou mascarar a visualização do efeito da infestação por carrapatos sobre a formação do infiltrado celular. Esse contratempo foi tratado posteriormente, com os experimentos de inoculação de saliva.

Posteriormente as células foram avaliadas quanto à expressão concomitante das moléculas CD4 e CD25. Contrariamente ao esperado, foram observadas menores percentagens de células CD4⁺CD25⁺ na pele de animais submetidos à infestação em comparação aos sham, embora essa diferença não tenha sido significativa de acordo com o teste estatístico empregado.

Embora não se tenham observado diferenças estatísticas nas populações de células CD4⁺ e CD4⁺CD25⁺ entre os grupos controles (sham) e infestados, ainda não era possível afirmar que não ocorreriam diferenças quanto à presença de células T regulatórias, uma vez que a expressão de CD25 não é restrita apenas às células T regulatórias convencionais, sendo observada também em outras populações de linfócitos (células T efectoras). Desta forma, para melhor caracterizar as células T CD4⁺CD25⁺ e estabelecer sua participação na resposta imune à saliva de carrapatos *R. sanguineus*, avaliou-se a expressão de outros marcadores de superfície que auxiliam na identificação/caracterização das células T regulatórias (CD3, CTLA-4, CD45RB, GITR e CD103) (KHATTRI et al., 2003; SAKAGUCHI, 2005).

Os resultados mostraram que dentre as células CD4⁺CD25⁺ não surgiram diferenças estatísticas entre os grupos quanto à percentagem de células apresentando moléculas associadas ao fenótipo regulatório analisado.

Isso nos levou a suspeitar que, embora não percentualmente diferentes, as células CD4⁺CD25⁺ presentes nos animais sham e infestados se tratassem de populações celulares distintas, possivelmente de células ativadas entre os animais sham e regulatórias entre os infestados.

Julgou-se interessante, portanto, avaliar se estas células T pertenceriam à população de células T ativadas. Assim, as células recém isoladas foram avaliadas quanto à expressão de moléculas que caracterizam o estado de ativação das células T. Para isso, a expressão das moléculas CD3 e CD4, e concomitantemente a elas, a expressão das moléculas CD45RB em altos níveis (*high*), CD69 e CCR5 (LINDELL et al., 2006), foi analisada por citometria de fluxo.

Curiosamente, animais infestados apresentaram maior percentagem de células CD3⁺CD4⁺ que animais sham, porém uma menor proporção delas expressou marcadores de ativação (CD45RB, CD69 e CCR5). Isso pode indicar que carrapatos são capazes de induzir a anergia das células inflamatórias que migram para o local de fixação, embora não tenham sido realizados ensaios comprobatórios. Vale comentar que, embora presentes no local de fixação, essas células não são capazes de impedir a alimentação dos ácaros.

A análise das células dos linfonodos regionais de camundongos mostrou que, embora não tenham sido observadas diferenças na percentagem das populações CD4⁺ e CD4⁺CD25⁺ entre os animais sham e infestados, houve uma forte tendência de aumento da expressão das moléculas CTLA-4 e GITR entre as células CD4⁺CD25⁺ recuperadas de animais infestados. Esses achados poderiam indicar o envolvimento de células Tregs nos tecidos linfóides em resposta à infestação por carrapatos. Para confirmar o fenótipo regulatório dessas células, a expressão de mensagem para o fator de transcrição Foxp3 foi avaliada, visto que várias evidências da literatura demonstram que a expressão do gene Foxp3 está diretamente relacionada com a diferenciação da população de células T regulatórias naturais e seria o principal marcador para identificar tais células (FONTENOT; RUDENSKY, 2005; SAKAGUCHI, 2005).

A expressão de mensagem para Foxp3 foi avaliada após 1 e 3 infestações, 48 e 72 h após a fixação dos carrapatos, porém não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos.

Assim, como descrito anteriormente para as células recuperadas da pele, as células isoladas dos linfonodos regionais de animais submetidos a três infestações, bem como de animais controle, foram também avaliadas quanto ao estado de ativação. Não foram observadas diferenças nas percentagens de células T isoladas dos diferentes grupos, tampouco de células T (CD3⁺) ativadas. Esses resultados sugerem que a modulação da ativação de células T induzida pelo carrapato (saliva) não atinge níveis sistêmicos, ficando restrita ao local de sua fixação (pele).

Com base nos resultados até agora expostos pode se concluir que a infestação com carrapatos não é capaz de induzir diferencialmente o recrutamento de células T regulatórias para a pele e linfonodos, quando comparados com os animais submetidos apenas à colocação da câmara de alimentação. Esses dados, porém, não necessariamente significam a ausência de Tregs na resposta induzida pelos ácaros, uma vez que a cola utilizada para fixação da câmara de alimentação dos carrapatos pode estar induzindo uma resposta tal que não é possível identificar a resposta aos antígenos dos carrapatos, ou seja, a resposta aos carrapatos estaria sendo mascarada pela resposta à câmara de alimentação.

Uma vez que sabidamente a saliva de carrapatos possui diversas moléculas bioativas que modulam mecanismos inatos e adaptativos da resposta imune (ALLEN, 1973, 1979; BROSSARD et al, 1982; FERREIRA; SILVA, 1998, 1999; KUBES et al, 1994; MACALUSO; WIKEL, 2001; MATSUDA et al, 1985; NITHIUTHAI; ALLEN, 1985; RAMACHANDRA; WIKEL, 1992, 1995; RIBEIRO; SPIELMAN, 1986; RIBEIRO; WEIS; TELFORD, 1990; SZABÓ; MORELLI; BECHARA, 1995b; URIOSTE et al., 1994)

procurou-se avaliar se a inoculação intradérmica de saliva (excluindo o “efeito-cola”) seria capaz de induzir o recrutamento de células Tregs.

A inoculação de saliva foi capaz de recrutar uma população de linfócitos T (CD3⁺) significativamente maior que a inoculação controle negativo (PBS) e semelhante ao controle positivo realizado com LPS após três inoculações. Entre os linfócitos recrutados, corroborando os resultados da literatura, ocorre maior participação de linfócitos T auxiliares (CD4⁺), em contrapartida aos linfócitos T citotóxicos (CD8⁺) e B (CD19⁺). Conjuntamente, esses resultados indicaram que há o acúmulo preferencial de células T auxiliares após a inoculação da saliva de *R. sanguineus*, em relação aos demais tipos linfocitários, embora poucas dessas células sejam encontradas no local de inoculação. Adicionalmente, esses resultados podem indicar a importância de outros tipos celulares, dentre eles, células da resposta imune inata.

Por outro lado, a inoculação de saliva também não foi capaz de recrutar uma maior população de células Tregs, embora houvesse maior recrutamento de células em relação à inoculação controle. Além disso, pôde-se observar nesses animais que a saliva induz o desenvolvimento de resposta imune adaptativa, uma vez que foram detectados maiores níveis de células T CD4⁺ após 3 inoculações. Portanto, pode-se concluir que mecanismos da resposta imune inata se somam aos mecanismos da resposta imune adaptativa na tentativa de rejeitar o ectoparasita.

Considerados em conjunto, esses resultados parecem indicar que a saliva de carrapatos, seja por inoculação artificial ou natural, não recruta células T regulatórias CD4⁺CD25⁺ para o local, embora induza intenso recrutamento celular em ambos os casos. Isso pode apontar que carrapatos estariam induzindo supressão da resposta inflamatória/imunológica de seus hospedeiros através de outros mecanismos, que não via células Tregs.

Como seria a supressão exercida pelos carrapatos então? Algumas hipóteses podem ser consideradas nesse contexto: carrapatos poderiam prejudicar a função efetora de células T ou ainda interferir com a função de células dendríticas, considerando a importância desses tipos celulares na vigilância de tecidos periféricos? Poderiam os carrapatos induzir anergia de células T ou inibir a migração de células dendríticas para o local? Ou ainda, as células dendríticas recrutadas ao local de fixação estariam num estado de menor ativação, induzindo assim uma menor ativação de células T CD4?

O estudo do recrutamento de células dendríticas em resposta à inoculação de saliva mostrou uma redução da porcentagem dessas células na pele dos camundongos inoculados, sugerindo que a saliva de carrapatos pode estar, de fato, modulando a resposta imune adquirida do hospedeiro por intervir na participação das células dendríticas na indução de resposta a antígenos de carrapatos.

Essas hipóteses estão de acordo com resultados obtidos por outro estudo realizado pelo nosso grupo. Oliveira (manuscrito em fase de preparação) observou que a saliva de carrapatos *R. sanguineus* diminui a expressão das moléculas co-estimulatórias CD80 e CD86 na superfície de células dendríticas diferenciadas *in vitro*, além de interferir com a migração das mesmas frente a quimiocinas como MIP-1 α e RANTES.

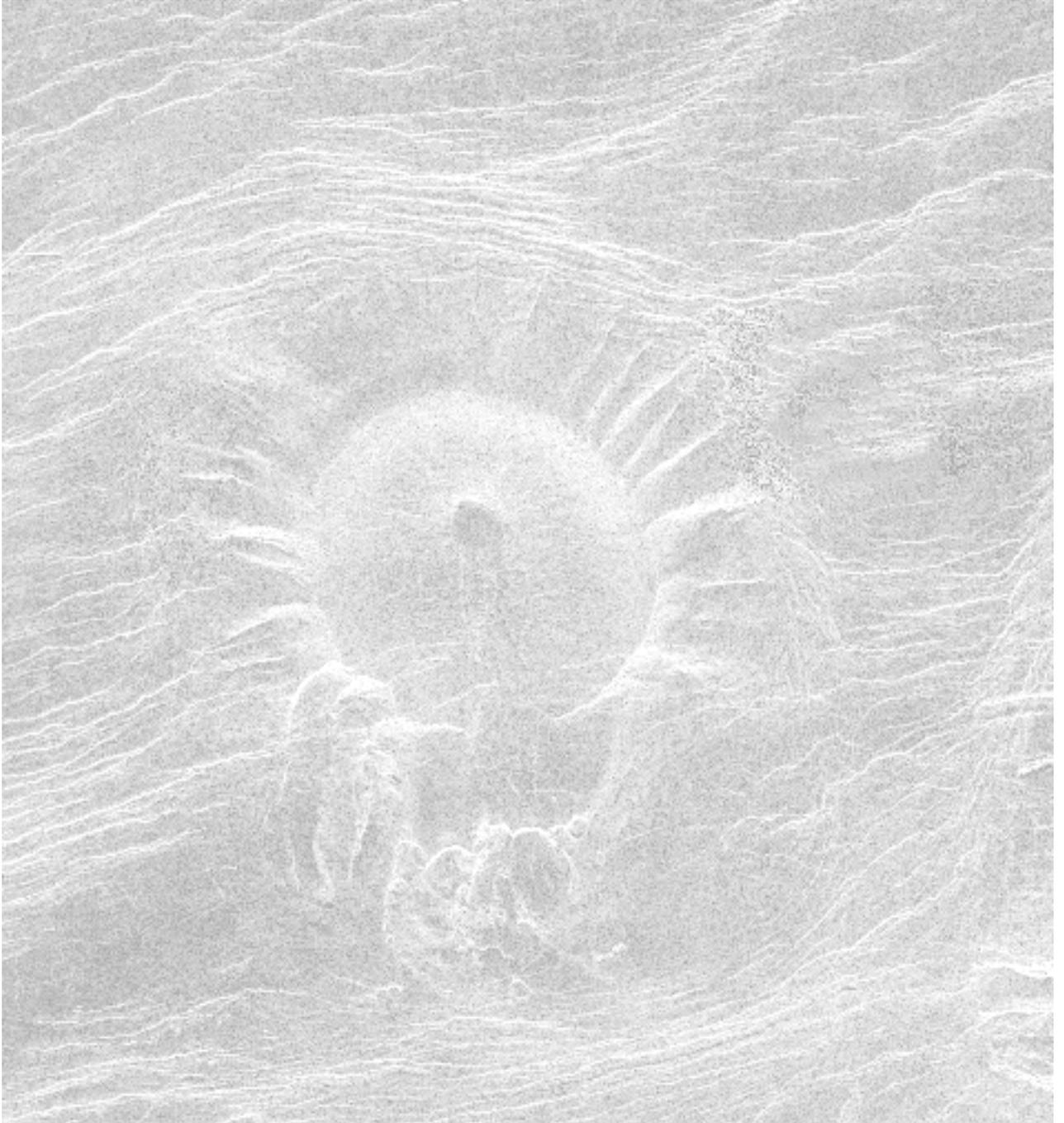
Esses achados se tornam particularmente interessantes visto que células dendríticas menos ativadas (ou tolerogênicas) podem não apenas levar células T a um estado de anergia, bem como induzir células regulatórias na periferia, tais como as células Tr1 (T regulatória tipo 1) ou ainda Th3 (auxiliar ou *helper* 3) (MILLS; MCGUIRK, 2004). Esses dois tipos de células regulatórias, brevemente tratadas na introdução deste trabalho, podem ser induzidas na periferia a partir de células CD4⁺ convencionais pela exposição a condições estimulatórias específicas, como o bloqueio das moléculas co-estimulatórias, citocinas desativadoras ou drogas (BELKAID; ROUSE, 2005). Células dendríticas imaturas produtoras de IL-10

(WAKKACH et al., 2003; GONZALEZ-REY et al., 2006), além de alguns antígenos (PRICE et al., 2005), são capazes de induzir essas células na periferia.

As células Tr1 são produtoras de IL-10, enquanto as células Th3 produzem TGF- β . Esse perfil anti-inflamatório de citocinas parece ser adequado para os ácaros durante seu repasto no hospedeiro, visto que camundongos infestados com carrapatos que apresentam um perfil Th2 permanecem suscetíveis a reinfestações (FERREIRA et al., 2003). Infelizmente, porém, as células Tr1 e Th3 ainda não foram bem caracterizadas quanto ao fenótipo de moléculas de superfície, o que inviabiliza sua determinação no modelo estudado.

Embora trabalhos *in vitro* já tenham mostrado o envolvimento de IL-10 na resposta induzida por saliva de carrapatos (FERREIRA; SILVA, 1999), resta ainda determinar, nas condições estudadas, se essas citocinas estão envolvidas na resposta local à infestação, e por sua vez, quais seriam as células responsáveis por sua síntese e, assim, confirmar algumas hipóteses geradas durante a realização deste trabalho.

O conhecimento gerado com este estudo permite entender melhor os mecanismos envolvidos na relação parasita-hospedeiro e contribui para o desenvolvimento de medidas de controle à ectoparasitas bem como de patógenos transmitidos por eles.



Conclusões

6 Conclusões

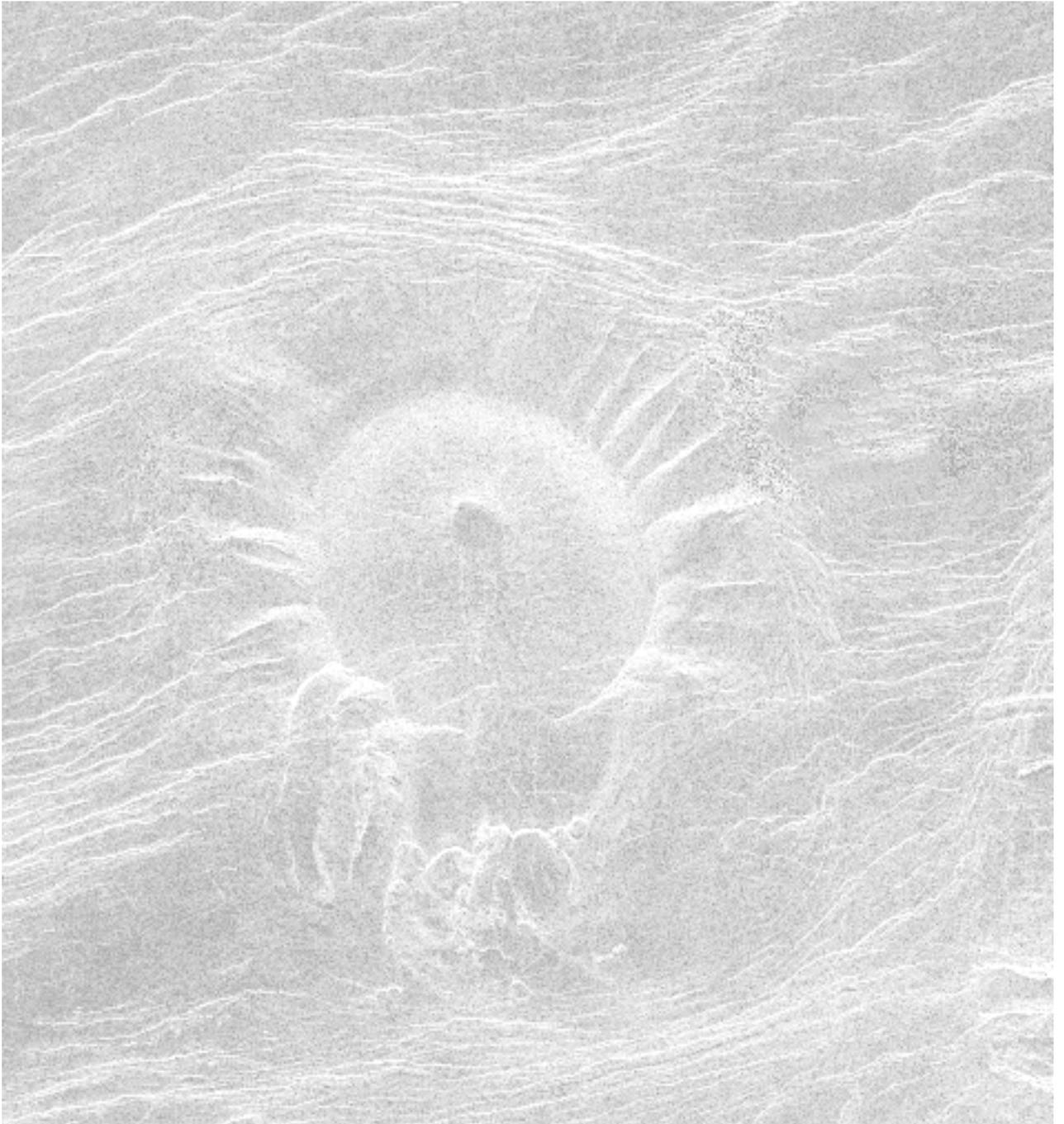
6.1 A infestação por carrapatos, bem como a inoculação de sua saliva, recrutaram um intenso infiltrado inflamatório, especialmente após a terceira exposição.

6.2 A saliva de carrapatos não recrutou células regulatórias $CD4^+CD25^+$ para o local de fixação dos carrapatos, bem como ao sítio de inoculação, nem tampouco para os linfonodos regionais.

6.3 A infestação por carrapatos induziu um aumento na população $GR1^+$ recuperada da pele.

6.4 A terceira inoculação intradérmica de saliva de carrapatos induziu um aumento na população de células T $CD4^+$ que migraram para a pele.

6.5 A saliva de carrapatos pareceu reduzir o número de células dendríticas recrutadas ao local de inoculação.



Referências

7 Referências

- ABBAS, A.K., LICHTMAN, A. H. **Cellular and Molecular Immunology** 5th ed., updated, 2005.
- ALLEN, J. R. Tick resistance: basophil in skin reactions of resistant guinea pigs. **Int. J. Parasitol.**, v. 3, p. 195-200, 1973.
- ALLEN, J. R., KHALIL, H. M., WIKEL, S. K. Langerhans cells trap tick salivary gland antigens in tick-resistant guinea pigs. **J. Immunology**, v. 55, f. 1, p. 157-167, 1979.
- ALLEN, J. R. Immunology of interactions between ticks and laboratory animals. **Exp. App. Acarol.**, v. 7, p. 5-13, 1989.
- ANON In *Yearbook Production*. Food and Agriculture Organisation, Rome, 2001.
- APOSTOLOU, I., SARUKHAN, A., KLEIN, L., von BOEHMER, H. Origin of regulatory T cells with know specificity for antigen. **Nature Immunology**, v. 3, p. 756-763, 2002.
- BALASHOV, Y. S. Bloodsucking ticks (Ixodidae): Vectors of diseases in man and animals. **Mis. Pub. Entomol. Soc. Am.**, v. 8, p. 161-166, 1972.
- BECHARA, G. H., SZABÓ, M. P. J., MACHADO, R. Z., ROCHA, U. F. A technique for collecting saliva from the cattle tick *Boophilus microplus* (Canestrini) using chemical stimulation. Environmental and temporal influences on secretion yield. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 21, f. 3, p. 479-484, 1988.
- BECHARA, G. H., SZABÓ, M. P. J., FERREIRA, B. R., GARCIA, M. V. *Rhipicephalus sanguineus* tick in Brazil: feeding and reproductive aspects under laboratorial conditions. **Braz. J. Vet. Parasitol.**, v. 4, p. 61-66, 1995.
- BELKAID, Y., HOFFMAN, K. F., MENDEZ, S., KAMHAWI, S., UDEY, M. C., WYNN, T. A., SACKS, D. L. The role of interleukin (IL)-10 in the persistence of *Leishmania major* in the skin after healing and the therapeutic potential of anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure. **J. Exp. Med.**, v. 194, f. 10, p. 1497-1506, 2001.
- BELKAID, Y., PICCIRILLO, C. A., MENDEZ, S., SHEVACH, E. M., SACKS, D. L. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. **Nature**, v. 420, p. 502-507, 2002.

BELKAID, Y., ROUSE, B. T. Natural regulatory T cells in infectious disease. **Nature Immunology**, v. 6, f. 4, p. 353-360, 2005.

BROSSARD, M., MONNERON, J. P., PAPTAEODOROU, V. Progressive sensitization of circulating basophils against *Ixodes ricinus* L. antigens during repeated infestations of rabbits. **Parasite Immunol.**, v. 4, p. 335-61, 1982.

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

CHEN, W., JIN, W., HARDEGEN, N., LEI, K., LI, L., MARINOS, N., McGRADY, G., WAHL, S. M. Conversion of Peripheral CD4⁺CD25⁻ Naïve T Cells to CD4⁺CD25⁺ Regulatory T Cells by TGF- β Induction of Transcription Factor Foxp3. **J. Exp. Med.**, v. 198, f. 12, p. 1875-1886, 2003.

CHRISTE, M., RUTTI, B., BROSSARD, M. Influence of the genetic background and parasite load of mice on the immune response developed against nymphs of *Ixodes ricinus*. **Parasitol. Res.**, v. 85, f. 7, p. 557-561, 1999.

CLARK, L. B., APPLEBY, M. W., BRUNKOW, M. E., WILKINSON, J. E., ZIEGLE, S. F., AMSDELL, F. Cellular and Molecular Characterization of the Scurfy Mouse Mutant. **J. Immunology**, v. 162, p. 2546-2554, 1999.

ELSNER, J., ESCHER, S. E., FORSSMANN, U. Chemokine receptor antagonists: a novel therapeutic approach in allergic diseases. **Allergy**, v. 59, f. 12, p.1243-58, 2004.

FEHERVARI, Z., SAKAGUCHI, S. Development and function of CD4⁺ CD25⁺ regulatory cells. **Current Opinion in Immunology**, v. 16, p. 203-208, 2004.

FERREIRA, B. R., SILVA, J. S. Saliva of *Rhipicephalus sanguineus* tick impairs T cell proliferation and IFN-gamma-induced macrophage microbicidal activity. **Vet. Immunol. Immunop.**, v. 64, p. 279-293, 1998.

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

FERREIRA, B. R., SZABÓ, M. J. P., CAVASSANI, K. A., BECHARA, G. H., SILVA, J. S. Antigens from *Rhipicephalus sanguineus* ticks elicit potent cell-mediated immune

responses in resistente but not in susceptible animals. **Veterinary Parasitology**, v. 115, p. 35-48, 2003.

FONTENOT, J. D., GAVIN, M. A., RUDENSKY, A. Y. Foxp3 programs the development na function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. **Nature Immunology**, v. 4, p. 330-336, 2003.

FONTENOT, J. D., RASMUSSEN, J. P., WILLIAMS, L. M., DOOLEY, J. L., FARR, A. G., RUDENSKY, A. Y. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor Foxp3. **Immunity**, v. 22, p. 329-341, 2005.

FONTENOT, J. D., RUDENSKY, A. A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. **Nature Immunology**, v. 6, f. 4, p. 331-337, 2005.

FREITAS M. G., COSTA H. M. A., COSTA J. O., LIDE P. Família Ixodidae. In: **Entomologia Médica e Veterinária**. 6° ed. Belo Horizonte, Precis Ed. Gráfica, 1982, p. 35-52.

FU, S., ZHANG, N., YOPP, A. C., CHEN, D., MAO, M., CHEN, D., ZHANG, H., DING, Y., BROMBERG, J. S. TGF- β Induces Foxp3⁺ T-Regulatory Cells from CD4⁺CD25⁻ Precursors. **American Journal of Transplantation**, v. 4, p. 1614-1627, 2004.

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

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

GERN, L., SCHAIBLE, U. E., SIMON, M. M. Mode of inoculation of the Lyme disease agent *Borrelia burgdorferi* influences infection and immune responses in inbred strains of mice. **J. Infect. Dis.**, v. 167, f. 4, p. 971-975, 1993.

GONZALEZ-REY, E., CHORNY, A., FERNANDEZ-MARTIN, A., GANEA, D., DELGADO, M. Vasoactive intestinal peptide generates human tolerogenic dendritic cells that induce CD4 and CD8 regulatory T cells. **Blood First Edition Paper**, prepublished online January 5, 2006.

HORI, S., CARVALHO, T. L., DEMENGEOT, J. CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells suppress CD4⁺ T cell-mediated pulmonary hyperinflammation driven by *Pneumocystis carinii* in immunodeficient mice. **Eur. J. Immunol.**, v. 32, p. 1282-1291, 2002.

HSIEH, C. S., RUDENSKY, A. Y. The role of TCR specificity in naturally arising CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cell biology. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v. 293, p. 25-42, 2005.

INOKUMA, H., HARA, Y., AITA, T., ONISHI, T. Effect of infestation with *Rhipicephalus sanguineus* on neutrophil function in dogs. **Med. Vet. Entomol.**, v. 11, f. 4, p. 401-403, 1997.

JONES L. D., KAUFMAN, W. R., NUTTALL, P. A. Modification of the skin feeding site by tick saliva mediates virus transmission. **Experientia**, v. 48, f. 8, p. 779-782, 1992.

JORDAN, M. S., BOESTEANU, A., REED, A. J., PETRONE, A. L., HOLENBECK, A. E., LERMAN, M. A., NAJI, A., CATON, A. J. Thymic selection of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. **Nature Immunology**, v. 2, p. 301-306, 2001.

KARIM, M., BUSHELL, A., WOOD, K. J. Regulatory T cells in transplantation. **Current Opinion in Immunology**, v. 14, p. 584-591, 2001.

KAUFMAN, W. R. Tick-host interaction: A synthesis of current concepts. **Parasitol. Today**, v. 5, p. 47-56, 1989.

KHATTRI, R., COX, T., YASAYKO, S. A., RAMSDELL, F. An Essential Role for Scurfin in CD4⁺CD25⁺ T Regulatory Cells. **Nature Immunology**, v. 4, p. 337-342, 2003.

KLEIN, L., KHAZAIE, K., VON BOEHMER, H. *In vivo* dynamics of antigen-specific regulatory T cells not predicted from behavior *in vitro*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 100, p. 8886-8891, 2003.

KUBES, M., FUCHSBERGER, N., LABUDA, M., ZUFFOVA, E., NUTTALL, P. A. Salivary gland extracts of partially fed *Dermacentor reticulatus* ticks decrease natural killer cell activity *in vitro*. **Immunology**, v. 82, p. 113-116, 1994.

LINDELL, D. M., MOORE, T.A., MCDONALD, R.A., TOEWS, G.B., HUFFNAGLE, G.B. Distinct compartmentalization of CD4 T-cell effector function versus proliferative capacity during pulmonary Cryptococcosis. **American Journal of Pathology**, v. 168, f. 3, p. 847-855, 2006.

MACALUSO, K. R., WIKEL, S. K. *Dermacentor andersoni*: effects of repeated infestations on lymphocyte proliferation, cytokine production, and adhesion-molecule expression by BALB/c mice. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 95, p. 413-427, 2001.

MADAKAMUTIL, L. T., MARICIC, I., SERCARZ, E., KUMAR, V. Regulatory T cells control autoimmunity *in vivo* by inducing apoptotic depletion of activated pathogenic lymphocytes. **J. Immunology**, v. 170, p. 2985-2992, 2003.

MALEK, T. R., YU, A., VINCEK, V., SCIBELLI, P., KONG, L. CD4 regulatory T cells prevent lethal autoimmunity in IL2Rb-deficient mice. Implications for the nonredundant function of IL-2. **Immunity**, v. 17, p. 167-178, 2002.

MATSUDA H., FUKUI, K., KISO, Y., KITAMURA, Y. Inability of genetically mast cell-deficient W/W^v mice to acquire resistance against larval *Haemaphysalis longicornis* ticks. **J. Parasitol.**, v.71, f. 4, p. 443-8, 1985.

MELLOR, A. Indoleamine 2,3 dioxygenase and regulation of T cell immunity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 338, p. 20-24, 2005.

MILLS, K. H. G., McGUIRK, P. Antigen-specific regulatory T cells – their induction and role in infection. **Seminars in Immunology**, v. 16, p. 107-117, 2004.

MUMCUOGLU, Y. Y., FRISH, K., SAROV, B., MANOR, E., GROSS, E., GAT, Z., GALUN, R. Ecological studies on the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in Southern Israel and its relationship to Spotted Fever group Rickettsiae. **J. Med. Entomol.**, v. 30, p. 114-21, 1993.

NITHIUTHAI, S., ALLEN, J. R. Langerhans cells present tick antigens to lymph node cells from tick-sensitized guinea-pigs. **Immunology**, v. 55, f. 1, p. 157-63, 1985.

NUTTALL, P.A. Displaced tick-parasite interactions at the host interface. **Parasitology**, v.116 Suppl., p. S65-72, 1998.

PARIJS, L. V., ABBAS, A. K. Homeostasis and self tolerance in the immune system: turning lymphocytes off. **Science**, v. 280, p. 243-248, 1998.

PEGRAM, R. G., CLIFFORD, C. M., WALKER, J. B., KEIRANS, J. E. Classification of *Rhipicephalus sanguineus* group (Acari; Ixodoidea, Ixodidae) *R. sulcatus* (Neuman, 1908) and *R. turanicus* (Pomerantsev,1936). **Sys. Parasitol.**, v. 10, p. 3-26, 1987.

PÉTER, O., BURGDORFER, W., AESCHLIMANN, A., CHATELANAT, P. *Rickettsia conorii* isolated from *Rhipicephalus sanguineus* introduced into Switzerland on a pet dog. **Zeitschrift für Parasitenkunde**, v. 70, p. 265-270, 1984.

POWRIE, F., READ, S., MOTTET, C., MALOY, K. Control of immune pathology by regulatory T cells. **Novartis Found. Symp.**, v. 252, p. 92-98, 2003.

PRICE, J. D., SCHAUMBURG, J., SANDIN, C., ATKINSON, J.P., LINDAHL, G., KEMPER, C. Induction of a Regulatory Phenotype in Human CD4 T Cells by Streptococcal M Protein 1. **J. Immunology**, v.175, p. 677-684, 2005.

RAMACHANDRA, R. N., WIKEL S. K. Modulation of host-immune responses to ticks (Acari: Ixodidae): effect of salivary gland extracts on host macrophages and lymphocyte cytokine production. **J. Med. Entomol.**, v. 29, p. 818-826, 1992.

RAMACHANDRA, R. N., WIKEL, S. K. Effects of *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) salivary gland extracts on *Bos indicus* and *B. taurus* lymphocytes and macrophages: in vitro cytokine elaboration and lymphocyte blastogenesis. **J. Med. Entomol.**, v. 32, p. 338-345, 1995.

RIBEIRO J. M. C., MAKOUL G. T., LEVINE J., ROBINSON D. R., SPIELMAN A. Antihemostatic, anti-inflammatory and immunosuppressive properties of the saliva of a tick, *Ixodes dammini*. **J. Exp. Med.**, v. 161, p. 332-344, 1985.

RIBEIRO, J. M., SPIELMAN, A. *Ixodes dammini*: salivary anaphylatoxin inactivating activity. **Exp. Parasitol.**, v. 62, p. 292-297, 1986.

RIBEIRO, J. M., WEIS, J. J., TELFORD 3RD, S. R. Saliva of the tick *Ixodes dammini* inhibits neutrophil function. **Exp. Parasit.**, v. 70, p. 382-388, 1990.

SAMBROOK, J., FRITSH, E. F., MANIATIS, T. Molecular cloning. **A laboratory manual**. Cold Spring Harbor Laboratory, N. Y., 1989.

SAKAGUCHI, S., SAKAGUCHI, N. Role of genetic factors in organ-specific autoimmune diseases induced by manipulating the thymus or T cells, and not self-antigens. **Rev. Immunogenet.**, v. 1, p. 147-53, 2000.

SAKAGUCHI, S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. **Nature Immunology**, v. 6, f. 4, p. 345-352, 2005.

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

SAUER, J. R., BOWMAN, A. S., McSWAIN, J. L., ESSENBERG, R. C. Salivary gland physiology of blood-feeding arthropods. In: WIKEL, SK **Immunology of host-parasite arthropod relationships**. SK Wikel, editor. CAB International, Wallingford, UK, 1996, Capítulo 3, p. 62-84.

SCHMIDT-SUPPRIAN, M., COURTOIS, G., TIAN, J., COYLE, A. J., ISRAËL, A., RAJEWSKY, K., PASPARAKIS, M. Mature T cells depend on signaling through the IKK complex. **Immunity**, v. 19, p. 377-389, 2003.

SCHMIDT-SUPPRIAN, M., TIAN, J., GRANT, E. P., PASPARAKIS, M., MAEHR, R., OVAA, H., PLOEGH, H. L., COYLE, A. J., RAJEWSKY, K. Differential dependence of CD4⁺ CD25⁺ regulatory and natural killer-like T cells on signals leading to NF- κ B activation **Proc. Natl Acad. Sci. USA**, v. 101, p. 4566-4571, 2004.

SCHUBERT, L. A., JEFFERY, E., ZHANG, Y., RAMSDELL, F., ZIEGLER, F. Scurfin (FOXP3) Acts as a Repressor of Transcriptional and Regulates T Cell Activation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, f. 40, p. 37672-37679, 2001.

SHEVACH, E. M. CD4⁺CD25⁺ supressor T cells: More questions than answers. **Nature Rev. Immunol.**, v. 2, p. 389-400, 2002.

SIMPSON, R.M., GAUNT, S. D., HAIR, J. A., KOCAN, K. M., HENK, W.G., CASEY, H. W. Evaluation of *Rhipicephalus sanguineus* as potential vector of Ehrlichia platys. **Amer. J. Vet. Res.**, v. 52, p. 1537-1541, 1991.

SRIVASTAVA, S. C., VARMA, M. G. R. The culture of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille) (Ixodidae) in the laboratory. **J. Med. Entomol.**, v. 1, p. 154-157, 1964.

STEPHEN, I. C., ACHYUTHARAO, K. N. Natural occurence of *Coxiella burnetii* in the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus*. **Indian J. Medical Res.**, v. 71, p. 865-869, 1980.

SZABÓ, M. P. J., MORELLI JR, J., BECHARA, G. H. Cutaneous hypersensitivity induced in dogs and guinea-pigs by extracts of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Acari:Ixodidae). **Exp. Appl. Acarol.**, v. 19, p. 723-730, 1995 b.

SZABO, M. P. J., BECHARA, G. H. Sequential histopathology at the *Rhipicephalus sanguineus* tick feeding site on dogs and guinea pigs. **Exp. Appl. Acarol.**, v.23, f. 11, p. 915-28, 1999.

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

TITUS, R. G., RIBEIRO, J. M. C. Salivary gland lysates from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity. **Science**, v. 239, p. 1306-1308, 1998.

URIOSTE, S., HALL, L. R., TELFORD 3RD, S. R., TITUS, R. G. Saliva of the Lyme disease vector, *Ixodes dammini*, blocks cell activation by a nonprostaglandin E₂-dependent mechanism. **J. Exp. Med.**, v. 180, p. 1077-1085, 1994.

VAN SANTEN, H. M., BENOIST, C., MATHIS, D. Number of Treg cells that differentiate does not increase upon encounter of agonist ligand on thymic epithelial cells. **J. Exp. Med.** V. 200, p. 1221-1230, 2004.

VON BOEHNER, H. Mechanisms of suppression by suppressor T cells. **Nature Immunology**, v. 6, f. 4, p. 338-344, 2005.

WAKKACH, A., FOURNIER, N., BRUN, V., BREITTMAYER, J. P., COTTREZ, F., GROUX, H. Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation *in vivo*. **Immunity**, v. 18, p. 605–617, 2003.

YAGI, H., NOMURA, T., NAKAMURA, K., YAMAZAKI, S., KITAWAKI, T., HORI, S., MAEDA, M., ONODERA, M., UCHIYAMA, T., FUJII, S., SAKAGUCHI, S. Crucial Role of Foxp3 in the Development and Function of Human CD25⁺CD4⁺ Regulatory T Cells. **The Japanese Society for Immunology**, v. 16, f. 11, p. 1643-1656, 2004.

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](#)