

CARLO JOSÉ FREIRE DE OLIVEIRA

**Saliva de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806)
modula a migração e função de células dendríticas**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para a
obtenção do Grau de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada

Orientador: Profa. Dra. Beatriz Rossetti Ferreira

Ribeirão Preto/SP

2006

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E/OU DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO OU PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca Central do Campus Administrativo de
Ribeirão Preto / USP

Oliveira, Carlo José Freire

Saliva de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) modula a migração e função de células dendríticas. Ribeirão Preto, 2006. 88 f. il.; 29 cm

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

Orientadora: Ferreira, Beatriz Rossetti.

1. Células dendríticas, 2. Saliva, 3. Quimiocinas, 4. *Rhipicephalus sanguineus*, 5. Carrapatos

Trabalho realizado com auxílio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

“Cariri-mirim – Moreilândia – PE: eita lugazim bom, só é longe”.

Fábio Freire de Oliveira (irmão)

A esperança é uma coisa boa.

Roberto Gabriel (Amigo)

Quando eu vim do sertão,
seu môleço, do meu Bodocó
A malota era um saco
e o cadeado era um nó
Só trazia a coragem e a cara

.....

Tudo isso eu trouxe no meu matolão

“Pau de arara”

(Luiz Gonzaga e Guio de Moraes)

AGRADECIMENTOS

A Deus...

A minha orientadora Prof^a. Dra. Beatriz Rossetti Ferreira, pelos ensinamentos que contribuíram para o meu crescimento profissional, pela paciência, pelo respeito e confiança depositados em mim. Minha gratidão...

Ao Prof. Dr. João Santana da Silva, por ter me aceito em seu laboratório, pela garra, humildade e por acreditar numa imunologia cada dia mais forte.

A Prof^a. Dra. Izabel de Miranda Santos pelos conselhos, ensinamentos, pelo carisma e pelo refinamento.

Aos docentes da área de Imunologia Básica e Aplicada do curso de Pós-Graduação desta Faculdade, pelo apoio, credibilidade e conhecimento adquirido.

A Karen Cavassani, pela constante ajuda e amizade. Sorriso e graça que precisava todos os dias ao chegar ao laboratório.

Ao Prof. Dr. Júlio Aliberti, pela atenção e discussões sobre quimiocinas e receptores envolvidos na migração de células dendríticas.

Ao Prof. Dr. Fernando Cunha que cedeu seu laboratório para a realização de algumas leituras de ELISA e por ter me cedido as amostras de quimiocinas para os ensaios de migração.

A meus pais “*in memoriam*”: Meu coração aperta de saudade quando lembro. Aos meus irmãos e irmãs: a distância e a saudade (durante esses 13 anos) me fizeram amar vocês cada vez mais.

À técnica de Laboratório Giuliana Bertozzi (Gil), pela ajuda nos ensaios de migração e pela amizade. Onde a atenção e a simpatia se encontram.

Aos colegas de laboratório, pelo convívio diário, que contribuíram decisivamente para a aquisição de conhecimento, pessoal ou profissional. À Daniela, Alessandra e Cláudia, pelo companheirismo e dedicação, à Cris (Minduin) pelas dicas e pelo tino com que lida com a ciência, à Ana (Anika), fonte de ternura, à Vanessa, ponto de prudência, a meu amigo Fredy, olho-d'água de serenidade, à Cristiane (Xuxa), ponto de equilíbrio, ditame e organização, aos técnicos de Laboratório Wander C. R. Silva e Lúcia H. Pacheco, pela amizade, e auxílio no laboratório.

À Marcelo, Dr. Luciano, Dra. Neide, Walter, Dr. Gustavo Garlet, Antônio, Gustavo Bronzi, Valdir e Wander Pavanelli pelos momentos de descontração e aprendizado. A Flávia, Ellen, Sandra, Lucinda, Luciana, Wanessa, Jackeline, Pauline, Angélica e Gláucia pelas alegrias e palavras de carinho.

Aos funcionários do Biotério do Depto. de Imunologia, Júlio A. Siqueira, Sávio Miranda e Ednelson Mazoto pela dedicação e apoio técnico. Ao Sr. João Sérgio Epifânio (Seu bibi), Sr. Rinaldo, Sr. Ângelo e Sr. Antônio Ferreira de Sousa pela grandiosa ajuda nas infestações dos cães. Exemplos de humildade.

Aos meus amigos Antônio Grangeiro, João Walter, Cícero Alexandre, Quintino, Janailson, André, Zé Wilson, Roberto Gabriel, Rodrigo, Hawlinston Rubin, Gustavo Colnago e a todos os amigos que fiz na Escola agrotécnica federal de Crato-CE e na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Somos todos viajantes pelas agruras do mundo, o melhor que podemos achar em nossas viagens são amigos honestos (Robert Louis Stevenson).

À Ana Cristine S. Ferreira, fonte de dedicação, inspiração, carinho e eficiência, ao Ronaldo S. Campanini e à Rosângela C.P. Mesquita, pela amizade e dedicação de sempre.

Aos colegas e ex-colegas da Casa de pós-graduação 13, pela paciência e carinho. Garotiiiiiiiiinhos e garotiiiiiiiiinhas de primeira qualidade.

Aos amigos e colegas do departamento de imunologia, pela amizade e respeito.

A todos os amigos da minha terra natal que mesmo sem saber categoricamente o que estou fazendo vibram e rogam pelo meu sucesso.

Ao Conselho Nacional de desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), e a Fundação de Amparo a pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa (6 primeiros e 18 últimos meses respectivamente) que possibilitou a realização deste trabalho.

RESUMO

OLIVEIRA, C.J.F. **Saliva de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) modula a migração e função de células dendríticas.** 2006. 88 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

Carrapatos são artrópodes hematófagos parasitas de vertebrados que causam inúmeros prejuízos aos animais domésticos, silvestres e ao homem, resultado da espoliação direta e da transmissão de doenças. Diversos trabalhos vêm mostrando que substâncias ativas presentes na saliva de carrapatos modulam a atividade de células e/ou moléculas relacionadas com a resposta imune. Um exemplo seria uma proteína isolada da saliva de algumas espécies de carrapatos com atividade anti-IL-8 humana. Uma das células críticas envolvidas na modulação e indução de resposta imune a diversos patógenos é a célula dendrítica (CDs). Estudos prévios do nosso grupo demonstram que a saliva de carrapatos *R. sanguineus* inibe a diferenciação e maturação de CDs de camundongos. Assim, o presente trabalho procurou elucidar o efeito da saliva de carrapatos na migração e função de CDs (CD11c+) diferenciadas na presença de GM-CSF e IL-4 a partir de células da medula óssea. A saliva inibiu mais de 50% a função quimiotática de MIP-1 α para CDs, mas não a de RANTES, MIP-1 β , SDF-1 α e MCP-1. Também verificou-se que CDs pré-incubadas com saliva por 24 ou 48 h reduziram em cerca de 60% a migração induzida por quimiocinas associadas com a migração de CDs imaturas (MIP-1 α e RANTES). Por outro lado, a saliva não alterou a migração de CDs amadurecidas com lipopolissacarídeo (LPS) em direção a MIP-3 β , uma quimiocina relevante na indução de migração de CDs maduras. A redução da migração de CDs imaturas devido à ação da saliva pode resultar num menor repovoamento de CDs no sítio de fixação dos carrapatos, processo essencial para a vigilância imune nos tecidos periféricos. Nos ensaios de migração *in vivo*, a inoculação de saliva de carrapatos na pele em conjunto com aplicação tópica de isotiocianato de fluoresceína (FITC) não alterou a migração de CDs CD11c+FITC+ da pele para os linfonodos drenantes. Esses achados corroboram nossos resultados *in vitro*, indicando que a saliva não altera a migração de CDs maduras e sustentam a teoria que apenas CDs com fenótipo maduro migram para os órgãos linfóides secundários. Procurando avaliar o efeito da saliva sobre a capacidade das CDs sensibilizarem células T *naive in vivo*, CDs CD11c+ foram incubadas com saliva, pulsadas com hemocianina (KLH) e inoculadas em camundongos, sendo estes sacrificados após 5-6 dias para avaliação da ativação imune específica das células dos linfonodos. Os resultados mostraram que apesar da saliva não inibir as CDs a induzirem uma proliferação de células T específicas ao antígeno KLH (sensibilização de células T *naive*), a produção de IFN- γ e TGF- β por essas células foi praticamente extinguida, enquanto que a síntese de IL-10 mostrou-se significativamente menor que a observada para camundongos que receberam CDs pulsadas com KLH sem saliva. Linfócitos com estas características podem ser enquadrados num estágio semelhante ao de anergia celular, uma vez que a estimulação antigênica específica dos linfócitos T *naive* não induziu diferenciação destes num padrão Th1 ou Th2 de resposta imune. Finalmente, ao se caracterizar o fenótipo das CDs pulsadas com KLH na presença de saliva verificou-se uma reduzida expressão das moléculas CD80 e CD86, embora a expressão de MHC-II, CD54 e CD40 tenham se mostrado similar às CDs pulsadas apenas com KLH. A deficiência da expressão de CD80 e CD86 em

CDs pode levar a indução de células T anérgicas, hipótese anteriormente sugerida para explicar os resultados encontrados nos ensaios de apresentação de antígenos. Tomados em conjunto, os achados destacam um novo mecanismo pelo qual a saliva de carrapatos possa estar comprometendo a montagem da resposta imune adquirida a carrapatos e/ou a patógenos por eles transmitidos.

Palavras-chave: Células dendríticas, saliva, quimiocinas, *R. sanguineus*, carrapatos.

ABSTRACT

OLIVEIRA, C.J.F. **Saliva from *Rhipicephalus sanguineus* ticks (Latreille, 1806) modulates migration and function of murine dendritic cells.** 2006. 88 f. Dissertation (Master) – School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2006

Ticks are bloodsucking arthropods that feed on vertebrates and are responsible for severe economic losses both through the effects of blood sucking and as vectors of pathogens. Many researchers have shown that tick saliva contains a variety of pharmacologically active molecules that modulates the host immune response, such as the protein that inhibits the activity of human IL-8. Dendritic cells (DCs) are one of the main cells known to play a critical role in modulation and assembly of the immune response against pathogens. Previously, our group has shown that saliva from *Rhipicephalus sanguineus* ticks inhibits the differentiation and maturation of murine DCs. We now report that tick saliva affects the migration and function of mice bone marrow-derived dendritic cells differentiated in the presence of GM-CSF and IL-4. We show that saliva from *R. sanguineus* ticks reduced by more than 50% the response of DCs to the chemotactic function of MIP-1 α to DCs but did not to affect their response to RANTES, MIP-1 β , SDF-1 α and MCP-1. We also show that pre-exposure of differentiated DCs to tick saliva for 24 or 48 h also reduced by 60% of their migration in response to MIP-1 α and RANTES, chemokines that are involved in the migration of immature dendritic cells. On the other hand, saliva did not alter migration of LPS-matured DCs towards MIP-3 β a chemokine which is fundamental for mature DCs emigration from peripheral site to lymph nodes. This study shows that saliva inhibits the chemotactic function of MIP-1 α and selectively inhibits chemotaxis of DCs towards chemokines like MIP-1 α and RANTES. This may reduce repopulation of the sites of tick-induced lesions with DCs decreasing the number of these cells maintaining surveillance of peripheral tissues for incoming antigens. We tested the hypothesis that emigration of DCs from peripheral sites to lymph nodes is also compromised by tick saliva *in vivo*. Mice received intradermal inoculations of PBS, LPS or saliva and were sensitized with FITC. The draining lymph nodes were examined for the presence of CD11c+ FITC+ DCs. Our results show that saliva did not inhibit the emigration of DCs presenting FITC+ as positively stained cells were present in similar numbers in both groups of animals. These findings are in accordance with previous results that indicate the homing response of DCs in the presence of tick saliva is not impaired, resulting in normal numbers of cells reaching the draining lymphoid tissue following peripheral stimulation. We examined whether saliva can inhibit the function of DCs in priming specific naïve T cells *in vivo*. We injected into mice DCs previously cultured in the presence or absence of tick saliva and loaded with the antigen KLH. Lymph nodes were harvested 5-6 days after inoculation of DCs and several functional aspects of T cells were analysed. In response to stimulation with KLH T cells from recipients of adoptively transferred DCs exposed to saliva were able proliferate, but were not able to secrete the cytokines IFN- γ and TGF- β . The antigen-specific production of IL-10 was significantly lower in mice that received DCs incubated without saliva when compared to mice that received saliva-treated DCs. This atypical lymphocyte response can possibly be recognized as being

due to "anergic" cells because upon specific antigenic stimulation naïve T cells did not go into a Th1 or Th2 differentiation pathway. To characterize the phenotype of injected DCs loaded with KLH, we determined the average intensity of expression of stimulatory, co-stimulatory and adhesion molecules on these cells. The expression of the co-stimulatory molecules CD80 and CD86 were reduced by tick saliva, while expression of MHC-II, CD54 ad CD40 was not modified. The adoptive transfer experiments show that saliva-exposed DCs had a reduced number of co-stimulatory molecules CD80 and CD86, possibly favouring the induction of anergic T cells *in vivo*, hypothesis suggested before explaining the results found in the antigen's presentation assay. Taken together, these findings reveal a new mechanism by which ticks control specific T cells to facilitate their feeding and transmission of pathogens into the host.

Keywords: Dendritic cells, saliva, chemokines, *R. sanguineus*, ticks

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APCs	Células apresentadoras de antígenos
CD	Cluster of differentiation
Céls.	Células
Con-A	Concanavalina-A
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GM-CSF	Fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos
IFN-γ	Interferon-gama
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
KLH	Hemocianina de ouriço marinho
LPS	Lipopolissacarídeo
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MIF	Média de intensidade de fluorescência
MMPs	Metaloproteases da matriz
NK	Natural killer
PBS	Solução de fosfato tamponada
PE	Ficoeritrina
PGE₂	Prostaglandina E ₂
RPMI	Meio de cultura RPMI 1640
SBF	Soro bovino fetal
Th	Linfócito T auxiliar
TGF-β	Fator de crescimento e transformação- β
TNF-α	Fator de necrose tumoral- α

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Importância parasitária, vetorial e sanitária dos carrapatos	2
1.2	O carrapato <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	5
1.3	Relação carrapato-hospedeiro	6
1.3.1	Mecanismos de resistência do hospedeiro aos carrapatos	6
1.3.2	Mecanismos de parasitismo dos carrapatos	12
1.4	Células dendríticas (CDs) e a resposta imune a carrapatos	16
2	OBJETIVOS	22
2.1	Objetivos gerais	23
2.2	Objetivos específicos	23
3	MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1	Submissão do projeto para avaliação pela CETEA	25
3.2	Reagentes e soluções	25
3.2.1	Anticorpos monoclonais utilizados para citometria de fluxo	25
3.2.2	Meio de cultura	26
3.2.3	Solução de Turk	26
3.2.4	Tampão de lise	26
3.2.5	Citocinas utilizadas na cultura de células	27
3.3	Animais de experimentação	27
3.3.1	Camundongos	27
3.3.2	Cobaias	27
3.3.3	Cães domésticos	27
3.3.4	Parasita	28
3.4	Manutenção da colônia de carrapatos	28
3.5	Coleta de saliva de carrapatos	29
3.6	Cultura de células dendríticas	30
3.7	Fenotipagem de células dendríticas diferenciadas <i>in vitro</i>	30

3.8	Ensaio de migração, <i>in vitro</i> , usando câmaras de Boyden	31
3.9	Ensaio de migração de CDs da pele para os linfonodos	32
3.10	Ensaio de apresentação de antígenos	33
3.11	Dosagem de citocinas	34
3.12	Fenotipagem das CDs usadas nos ensaios de apresentação de antígenos	35
3.13	Análise estatística	35
4	RESULTADOS	36
4.1	Obtenção das células dendríticas	37
4.2	Efeito da saliva de carrapatos <i>R. sanguineus</i> sobre a atividade de quimiocinas associadas com a migração de CDs	39
4.3	Efeito da pré-incubação das CDs com saliva de carrapatos <i>R. sanguineus</i> na migração frente a quimiocinas	42
4.4	Efeito da pré-incubação de CDs com LPS e saliva de carrapatos <i>R. sanguineus</i> na migração frente a quimiocina MIP-3 β	45
4.5	Efeito da inoculação intradérmica de saliva de carrapatos <i>R. sanguineus</i> na migração de CDs da pele para os linfonodos	47
4.6	Efeito da incubação das CDs com saliva de carrapatos <i>R. sanguineus</i> sobre a expressão de moléculas de superfície <i>in vitro</i>	49
4.7	Efeito da saliva de carrapatos <i>R. sanguineus</i> sobre a capacidade de CDs em apresentar antígenos e induzir a produção de citocinas por linfócitos	51
5	DISCUSSÃO	54
6	CONCLUSÕES	67
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1	Perfil populacional das células derivadas da medula óssea cultivadas na presença de GM-CSF e IL-4.	38
FIGURA 2	Saliva de carrapatos <i>R. sanguineus</i> inibe o efeito quimioatrativo de MIP-1 α .	41
FIGURA 3	CDs pré-incubadas com saliva de carrapatos <i>R. sanguineus</i> têm reduzida capacidade migratória para MIP-1 α , RANTES e SDF-1 α .	44
FIGURA 4	Saliva de carrapatos <i>R. sanguineus</i> não altera a migração de CDs maduras para a quimiocina MIP-3 β .	46
FIGURA 5	A inoculação intradérmica de saliva de carrapatos <i>R. sanguineus</i> não altera a migração de CDs induzida por sensibilização com FITC.	48
FIGURA 6	Saliva de carrapatos <i>R. sanguineus</i> inibe a expressão das moléculas co-estimulatórias CD80 e CD86 em CDs estimuladas com KLH.	50
FIGURA 7	CDs pulsadas com KLH na presença de saliva de carrapatos <i>R. sanguineus</i> quando transferidas para camundongos singênicos são capazes de pré-sensibilizar células T específicas para KLH.	52
FIGURA 8	CDs pulsadas com KLH na presença de saliva de carrapatos <i>R. sanguineus</i> quando transferidas para camundongos singênicos são capazes de inibir a produção de citocinas em células T específicas para KLH.	53

1. Introdução

1.1 Importância parasitária, vetorial e sanitária das infestações por carrapatos

Carrapatos (Classe: Arachnida, Ordem: Acari. Subordem: Ixodida) são ectoparasitas de distribuição cosmopolita, obrigatoriamente hematófagos no seu estágio pós-embriônico. Para sua sobrevivência requerem obrigatoriamente a ingestão de sangue de vertebrados, sejam estes mamíferos, aves, répteis ou anfíbios.

A descrição de uma figura em uma tumba egípcia, datada de 1500 A.C. representando um animal semelhante à hiena com três protuberâncias no pavilhão auricular interno foi a primeira evidência histórica que descreve a presença de carrapatos em nosso meio. Na Grécia antiga o carrapato era chamado de Cróton (semelhante à mamona) e, pelo mesmo motivo, foi denominado Ricinus na Roma Antiga. No ano 77 D.C. Plínio, em sua *Historia Naturalis*, citou carrapatos como hematófagos (revisto por ANDREOTTI, 2002).

Atualmente existe registro de 867 espécies de carrapatos, das quais, pelo menos 700 possuem especificidade de hospedeiro (CORDOVÉS, 1997; JONGEJAN; UILENBERG, 2004). Além dos prejuízos diretos causados pela infestação, aproximadamente 10% de todas as espécies descritas na literatura prejudicam indiretamente seus hospedeiros transmitindo-lhes doenças (BROSSARD; WIKEL, 2004; JONGEJAN; UILENBERG, 2004). Para se ter uma idéia, nenhum outro artrópode é vetor de tão ampla variedade de patógenos (fungos, vírus, riquetsias, helmintos, bactérias e protozoários) (ESTRADA-PEÑA; JONGEJAN, 1999).

Os carrapatos são divididos em duas famílias: Argasidae (carrapatos moles: desprovidos de escudo dorsal) e Ixodidae (Carrapatos duros: providos de escudo dorsal). Os carrapatos da família Ixodidae são mais conhecidos uma vez que são de ocorrência mais comum e podem levar a sérios agravos para a pecuária e para a saúde pública. No Brasil as

espécies mais conhecidas dessa família são: *Boophilus microplus*, *Amblyomma cajennense*, *Anocentor nitens* e *Rhipicephalus sanguineus* (EVANS *et al.*, 2000). Dentro da família Argasidae, apenas a espécie *Argas miniatus*, principal vetor da *Borrelia anserina* para as aves, tem importância econômica para o nosso país (EVANS *et al.*, 2000).

As perdas econômicas resultantes do parasitismo por carrapatos no mundo não são nada otimistas. Estima-se que cerca de 80% do rebanho bovino mundial é infestado por carrapatos, o que, de acordo com a "Food and Agriculture Organization" (FAO) produz um prejuízo anual avaliado em 13 bilhões de dólares (ANON, 2001). No Brasil, estima-se que a espécie *B. microplus* é responsável pelo prejuízo de aproximadamente dois bilhões de dólares/ano (GRISI *et al.*, 2002).

Outras espécies, tais como *R. sanguineus*, *A. cajennense* e *A. nitens* (carrapatos preferencialmente encontrados em cães e eqüídeos) também têm mostrado grande importância para a pecuária e para a saúde pública, porém, uma estimativa aproximada do valor anual gasto no controle destas espécies ainda não foi mensurada.

Os prejuízos econômicos causados por consequência da infestação com carrapatos são ocasionados devido a: (1) ação mecânica, pela dilaceração de células e tecidos; (2) espoliação direta, levando a anemia, caquexia e estresse; (3) inoculação de toxinas neurotrópicas paralisantes; (4) depreciação do couro por trauma mecânico da fixação; (5) soluções de continuidade causadas pela fixação do carrapato que podem tornar-se também portas de entrada para infecções bacterianas e miíases e; (6) transmissão de doenças.

Dentre as principais doenças transmitidas por carrapatos de importância na medicina veterinária podemos citar: babesiose, anaplasmose, teileriose, erliquiose, doença de Lyme, entre outras. Já de importância na medicina humana, carrapatos podem ser vetores de doenças tais como, febre maculosa, erliquiose, babesiose, febre hemorrágica do Congo e da Criméia, encefalites e doença de Lyme.

Dentre as doenças acima citadas, a doença de Lyme (cujo agente etiológico é a espiroqueta *Borrelia burgdorferi*) e a febre maculosa (cujo agente etiológico é a *Rickettsia rickettsii*) são consideradas as doenças emergentes humanas transmitidas por carrapatos que mais tem preocupado as autoridades sanitárias nacionais.

Os primeiros casos clínicos referentes à doença de Lyme no Brasil foram registrados no início da década de 1990 (AZULAY *et al.*, 1991). O perfil desta doença foi caracterizado com o registro da ocorrência de 30 casos humanos, tendo sido discutidos a clínica, o diagnóstico sorológico, o tratamento e a epidemiologia com o envolvimento de canídeos, bovinos, animais silvestres e carrapatos (YOSHINARI *et al.*, 1997; 2003). Os carrapatos provavelmente envolvidos no ciclo silvestre da doença de Lyme pertencem ao gênero *Ixodes* enquanto que os do gênero *Amblyomma* provavelmente estariam implicados na transmissão para animais domésticos e seres humanos (ABEL *et al.*, 2000; GUIMARÃES *et al.*, 2001).

No Brasil, em especial no Estado de São Paulo, a febre maculosa tem ganhado relevante destaque devido às inúmeras mortes ocorridas no ano de 2005. Dados do Ministério da Saúde apontam que nos últimos dez anos foram registrados 366 casos com 102 óbitos. Somente em São Paulo, o número de casos confirmados por critério clínico-epidemiológico foi de 144, no período de Janeiro de 1998 a Novembro de 2005, sendo que dentre esses, 57 levaram ao óbito (ANON, 2005).

Uma vez sabido que carrapatos trazem diversos prejuízos para o homem, animais domésticos e silvestres, seria muito proveitoso para a economia e para a saúde pública descobrir formas eficazes de controle para seu parasitismo. Atualmente o controle de carrapatos vem sendo feito através do uso de carrapaticidas, tais como organoclorados, organofosforados, piretróides sintéticos e amitraz. Levando-se em conta que esses princípios ativos geralmente selecionam linhagens de carrapatos resistentes aos produtos e contaminam o meio ambiente e produtos destinados a alimentação, seria de grande valor encontrar vias

alternativas mais eficientes para controlar esses ácaros. Para tanto, é necessário empenhar esforços no sentido de compreender a interação dos carrapatos aos seus hospedeiros.

Apesar dos recentes avanços nos campos da imunologia e biologia molecular, diversos aspectos da interação carrapato-hospedeiro ainda são pouco conhecidos. Resultados obtidos nessas linhas de pesquisas poderiam fornecer bases para o desenvolvimento de novos medicamentos e vacinas anti-carrapatos que substituíssem os métodos atuais de controle.

1.2 O carrapato *Rhipicephalus sanguineus*

A literatura especializada cita *R. sanguineus* (ordem Acarina, família ixodidae, gênero *Rhipicephalus*), popularmente conhecido como "carrapato marrom dos cães", a espécie mais prevalente nos cães domésticos (Cupp, 1991). Trata-se da espécie de carrapato com a maior disseminação no mundo, em razão não somente da ampla distribuição de seus hospedeiros caninos, mas principalmente por sobreviver em diferentes tipos de clima e ter especificidade restrita aos cães domésticos (HOOGSTRAAL *et al.*, 1985).

No Brasil, *R. sanguineus* é usualmente encontrado em cães tanto na zona rural como na zona urbana (DANTAS-TORRES *et al.*, 2006). Adicionalmente há registros desta espécie parasitando coelhos, gatos, ratos novérgicos, pombos, canídeos selvagens e o homem (ARAGÃO, 1936; DIOGO *et al.*, 2003; LABRUNA, 2004).

Apesar dos prejuízos econômicos no Brasil e no mundo terem sido mensurados apenas para o carrapato do boi (*B. microplus*), cães parasitados por carrapatos freqüentemente trazem diversos prejuízos, visto que estes animais residem em ambiente doméstico em contato direto com o homem e seguidamente são acometidos por infestações maciças de carrapatos *R. sanguineus*. Além das conseqüências mais evidentes de parasitismo, tais como anemia, irritabilidade, lesões epidérmicas e caquexia, esta espécie de carrapato é capaz de transmitir doenças como febre botonosa, erliquiose granulocítica humana, babesiose, hemobartolose,

hepatozoonose e erliquiose canina (ESTRADA-PENÑA; JONGEJAN, 1999; WALKER *et al.*, 2000; revisto por SHAW *et al.*, 2001; DEMMA *et al.*, 2005).

Doenças transmitidas por carrapatos são reconhecidas como um problema emergente de saúde pública em muitos países do mundo e, *R. sanguineus* tem sido relacionado em várias dessas doenças, um exemplo é o caso da febre botonosa. Tem sido mostrado também que *R. sanguineus* encontrados em regiões endêmicas para *Rickettsia rickettsii* (agente da Febre Maculosa), também podem estar infectados (LANGE *et al.*, 1992) por esta bactéria. Assim, a certeza que esta espécie de carrapato parasita o homem levanta a possibilidade de uma nova situação epidemiológica para as doenças transmitidas por carrapatos no Brasil.

1.3 Relação carrapato-hospedeiro

1.3.1 Mecanismos de resistência do hospedeiro ao carrapato

O sistema imune da pele é composto de vias imunes inata e adquirida intrinsecamente organizadas, que fornecem proteção contra organismos causadores de doença e/ou agressões mecânicas. A imunidade inata corresponde às fases iniciais da resposta do hospedeiro, na qual, uma variedade de mecanismos inespecíficos reconhece e respondem à presença de agentes patogênicos. Dentre esses mecanismos presentes na pele podemos citar: barreira física da pele, ácidos graxos cutâneos, secreções sebáceas, microbiota natural da pele e lisozimas presentes nas suas secreções. Uma vez que a pele é agredida e a barreira física é rompida, mediadores solúveis e celulares também contribuem para a imunidade inata. Dentre estes mediadores podemos citar: proteínas de fase aguda, sistema complemento, citocinas, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, mastócitos e células natural killer (NK) (JANEWAY, *et al.*, 2001).

Organismos que escapam das defesas inatas do hospedeiro serão alvos da resposta imune adquirida (adaptativa). A imunidade adquirida corresponde a uma fase secundária da

resposta do hospedeiro onde uma variedade de mecanismos celulares e humorais reconhecem e respondem especificamente a um imunógeno. As principais células da resposta imune adquirida são as células apresentadoras de antígenos (células dendríticas, macrófagos e linfócitos B) e linfócitos B e T específicos a antígenos (JANEWAY *et al.*, 2001).

A resistência do hospedeiro a carrapatos é medida por alterações no ciclo biológico dos ácaros tais como: inibição da fixação, redução do peso de ingurgitamento, aumento do período de ingurgitamento, diminuição na produção de ovos pelas fêmeas ingurgitadas, diminuição do volume de sangue ingerido, diminuição no número de ovos viáveis, redução dos carrapatos que se alimentam numa infestação desafiada, redução da capacidade de larvas e ninfas de sofrerem ecdise e aumento da mortalidade dos carrapatos que se fixam (CHABAUD, 1950; ALLEN, 1989; BECHARA *et al.*, 1995; WIKEL, 1996a).

Nesse contexto, a reação inflamatória e/ou imunológica no local, bem como os efeitos sistêmicos da fixação dos carrapatos, vem sendo largamente estudada nas últimas décadas. Características individuais e raciais dos animais hospedeiros, tais como idade, variações hormonais, quantidade de glândulas sebáceas, espessura da pele, densidade da pelagem e fatores genéticos pode estar relacionados com resistência inata a carrapatos (UTECH *et al.*, 1978; SAHIBI *et al.*, 1997; JONES *et al.*, 2000). Para se ter uma idéia, o simples ato de auto-limpeza dos hospedeiros consiste em um importante elemento na expressão da resistência inata a carrapatos (BENNETT, 1969).

Sahibi *et al.* (1997), observaram que a susceptibilidade a carrapatos *B. microplus* aumenta dependendo da idade e raça do hospedeiro, sendo o fator raça a característica que obteve maior influência nesse parasitismo. De fato, uma correlação direta entre resistência e o número de anastomoses artério-venosas na vasculatura dermal, mais rica em bovinos *Bos indicus* (zebuínos) do que em bovinos *Bos taurus* (taurinos), favorecendo uma resposta inflamatória local mais exuberante foi relatada por Amakiri (1976).

Apesar da grande importância de mecanismos inatos de defesa do hospedeiro à fixação e desenvolvimento dos carrapatos, a resistência a estes é um fenômeno adquirido (TRAGER, 1939; RANDOLPH, 1979; SZABÓ *et al.*, 1995a). As bases imunológicas da resposta imune adquirida para carrapatos ainda estão sendo estabelecidas. O primeiro relato desse fenômeno foi feito por TRAGER (1939), onde foi demonstrado que apesar de cobaias serem susceptíveis a infestação de carrapatos da espécie *Dermacentor andersoni* numa primeira infestação, cobaias que eram expostas a uma segunda infestação ao mesmo carrapato, mostravam-se resistentes. Mais ainda, a pesquisa mostrou que essa resistência podia ser transferida passivamente através do soro para animais que não tinham sido previamente expostos aos carrapatos. Baseado no trabalho de TRAGER (1939) outros investigadores reportaram que a resistência adquirida a infestações por carrapatos envolve ainda células apresentadoras de antígenos (particularmente células de Langerhans na epiderme), complemento, linfócitos T e B, citocinas, anticorpos e granulócitos com seus mediadores bioativos (WILLADSEN, 1980; WIKEL, 1996; GILLESPIE *et al.*, 2000; BROSSARD; WIKEL, 2004).

As primeiras pesquisas mostraram a importância de basófilos como componentes fundamentais na aquisição da resistência adquirida, durante a reação de hipersensibilidade basofílica cutânea (BROWN; ASKENASE, 1985). Neste modelo de hipersensibilidade, cobaias que tinham desenvolvido imunidade adquirida para *Amblyomma americanum* tinham basófilos que eram rapidamente recrutados para o sítio de fixação levando a rejeição dos carrapatos. Análise detalhada dos tipos de células no sítio de fixação mostraram que cobaias sensibilizadas para o carrapato da espécie *Rhiphicephalus appendiculatus*, apresentavam basófilos em maiores concentrações, correspondendo a valores acima de 90% das células infiltradas (BROWN *et al.*, 1983).

Procurando avaliar qual tipo de reação de hipersensibilidade cutânea seria induzida no local de fixação dos carrapatos *R. sanguineus* em seus hospedeiros infestados, mostrou-se que

cães e camundongos re-infestados com carrapatos *R. sanguineus* desenvolvem uma forte reação de hipersensibilidade imediata, enquanto que cobaias desenvolvem uma pequena reação imediata e forte reação de hipersensibilidade tardia (SZABÓ *et al.*, 1995b; FERREIRA *et al.*, 2003). O desenvolvimento de reação tardia em cobaias nesse teste de hipersensibilidade cutânea a antígenos de carrapatos (hospedeiros resistentes), sugere o envolvimento do braço celular da resposta imune no processo de aquisição de resistência.

Outras células que tem papel relacionado com a resposta imune a carrapatos são os eosinófilos, mastócitos, células dendríticas e linfócitos (BOS; KAPSENBERG, 1993; WIKEL; BERGMAN, 1997; GILLESPIE *et al.*, 2000). Administração passiva de anticorpos anti-eosinófilos bloqueou parcialmente a resistência de cobaias, indicando um papel crucial destas células na resistência adquirida (GLEICH *et al.*, 1995). Camundongos deficientes de mastócitos infestados com larvas de *Haemaphysalis longicornis* não adquiriram resistência à infestação, enquanto os camundongos “wild-type”, que tiveram a mesma infestação adquiriram (MATSUDA *et al.*, 1985). A reação do hospedeiro por meio de degranulação de mastócitos e infiltração de eosinófilos no local da picada é capaz de dificultar a alimentação do carrapato e causar irritação cutânea no hospedeiro, suficientes para desencadear as reações de auto-limpeza (PEREIRA, 1982).

A associação de antígenos de carrapatos e células apresentadoras de antígenos foi primeiramente descrita por ALLEN *et al.* (1979). Eles demonstraram que antígenos de carrapatos inoculados na pele de hospedeiros através da saliva são capturados por células dendríticas (CDs) da pele (ex: células de Langerhans) e apresentados para linfócitos T nos linfonodos drenantes da região onde estava havendo a picada. Posteriormente, foi demonstrado que o número de células de Langerhans está reduzido na epiderme durante a primeira infestação com carrapatos e estar aumentado durante o início da segunda infestação, quando a resistência é evidente (NITHIUTHAI; ALLEN, 1984a). Ademais, é sugerido que

células de Langerhans presentes na pele de cobaias resistentes sejam capazes de apresentar antígenos salivares a células T antígeno-específicas (NITHIUTHAI; ALLEN, 1985).

O envolvimento das células de Langerhans na resistência de cobaias a carrapatos foi ainda mais aceito quando foi mostrado que a depleção das mesmas pelo tratamento com radiação ultravioleta durante a primeira infestação induz redução significativa na capacidade de adquirir resistência (NITHIUTHAI; ALLEN, 1984b).

Linfócitos B e T são células centrais para a efetiva resposta imune contra carrapatos (WIKEL, 1996). Estas células desempenham funções efetoras e de regulação do sistema imune, incluindo produção de anticorpos, hipersensibilidade tardia e citotoxicidade (SCHOELER; WIKEL, 2001). Um dos principais trabalhos que comprovam a importância dessas células foi feito usando um bloqueador preferencial da atividade de linfócitos denominado ciclosporina A. Coelhos re-infestados com *Ixodes ricinus* que foram tratados com essa droga tiveram significativa redução na hipersensibilidade imediata, redução parcial de anticorpos circulantes e diminuída hipersensibilidade tardia quando foram desafiados com antígenos de glândulas salivares da mesma espécie de carrapatos (GIRARDIN; BROSSARD, 1989).

Coelhos e camundongos infestados com carrapatos produzem anticorpos específicos para imunógenos presentes na saliva que são capazes de ligar em receptores Fc presentes em basófilos (BROSSARD; GIRARDIN, 1979; CHRISTE *et al.*, 1998). Após complexação dos receptores de superfície dessas células com estes anticorpos ligados a imunógenos ocorre a liberação de moléculas bioativas (ex: histamina). A histamina é uma molécula derivada de basófilos que inibe a salivação e o ingurgitamento de carrapatos (PAINÉ *et al.*, 1983). Adicionalmente, a infestação de carrapatos induz a produção de anticorpos circulantes específicos para imunógenos presentes na saliva (WIKEL, 1996).

Camundongos da linhagem BALB/c repetidamente infestados com ninfas de *Ixodes ricinus* estimulam um aumento na razão de linfócitos T CD4+ em relação aos linfócitos T CD8+ na pele do hospedeiro (MBOW *et al.*, 1994). Infestações repetidas com ninfas de *Ixodes ricinus* em camundongos BALB/c estimulam a migração de linfócitos dos linfonodos para o local da fixação produzindo níveis significantes de fator de necrose tumoral (TNF- α) e fator estimulador de macrófago (M-CSF) quando estes são estimulados *in vitro* com concanavalina A (Con-A) ou com anticorpo anti-CD3 (GANAPAMO *et al.*, 1997). Proteínas de glândulas salivares ou saliva de carrapatos *I. ricinus* e *R. sanguineus* induzem proliferação *in vitro*, antígeno-específica de linfócitos, em coelhos ou cobaias previamente infestados (SCHORDERET; BROSSARD, 1994; FERREIRA *et al.*, 2003).

Proteínas do sistema complemento são moléculas efetoras no sangue e se tornam ativadas em resposta as infestações por carrapatos (LAWRIE *et al.*, 2005). O nível de C3 médio no soro de coelhos infestados com *Ixodes ricinus* mostra-se acentuado e aumenta consideravelmente após subseqüentes re-infestações (PAPATHEODOROU; BROSSARD, 1987). Deposição de proteínas do complemento foi detectada na junção dermo-epidermal próximo ao sitio de fixação de carrapatos *D. andersoni* depois de repetidas infestações em cobaias (ALLEN *et al.*, 1979). Cobaias infestadas com esta espécie de carrapato, que tiveram a atividade do sistema complemento depletada pelo uso de fatores presentes no veneno de cobras tiveram um aumento significativo no peso de ingurgitamento das larvas ingurgitadas (WIKEL; ALLEN, 1977). Mais ainda, proteína C3 intacta foi detectada no intestino de ninfas de *I. scapularis* parcialmente alimentadas em camundongos da linhagem C57BL/6 (RATHINAVELU *et al.*, 2003).

As citocinas pertencem a um grupo de diversas proteínas que também estão relacionadas com a resposta imune a carrapatos (WIKEL, 1999). Pele de camundongos infestados com *I. ricinus* foi examinada quanto a expressão de mRNAs para citocinas por

hibridização *in situ* (MBOW *et al.*, 1994). Após 72h da infestação inicial, células infiltrantes no sítio de fixação estavam com aumentada expressão de genes para as citocinas IL-4 e IFN- γ . Após repetidas infestações, células contendo mRNA para IL-4, IFN- γ e IL-2 foram detectadas, entretanto o número de células contendo mRNA para IL-4 foi menor que o número de células que expressaram mRNA para IFN- γ e IL-2. Infestações sucessivas aumentam a produção de IL-2 por linfócitos estimulados *in vitro* com Con- A (GANAPAMO *et al.*, 1996a). Esses dados sugerem que a partir do momento que há sucessivas infestações pode haver uma mudança do perfil de citocinas produzidas.

Da mesma forma que os hospedeiros possuem esses mecanismos efetivos de defesa, os carrapatos criaram, ao longo da evolução, medidas para modular ou desviar os mecanismos de resposta do hospedeiro para poderem garantir a sobrevivência de sua espécie (RIBEIRO, 1989).

1.3.2 Mecanismos de parasitismo dos carrapatos

Carrapatos precisam permanecer fixos aos seus hospedeiros por dias ou semanas, até completarem seu ingurgitamento. Para escapar das possíveis estratégias de defesa do hospedeiro, os carrapatos desenvolveram diferentes táticas, ao longo da coevolução de cerca de 37 milhões de anos para conter e/ou escapar desses mecanismos (HOOGSTRAAL; KIM, 1985).

Já foi demonstrado que carrapatos levam a redução da proliferação e função de linfócitos T, supressão e desvio da produção e ação de citocinas, diminuição da resposta de anticorpos, clivagem enzimática de imunoglobulinas, inibição da função de macrófagos e de células NK, contenção de mediadores essenciais para a promoção de prurido e dor, bloqueio da ativação do sistema complemento (WIKEL *et al.*, 1996; FERREIRA; SILVA, 1998; WIKEL, 1999). Segundo KOTWAL (1996) e WIKEL e BERGMAN (1997), os mesmos

elementos efetores da modulação ou desvio da resposta imune ao parasito parecem estar também envolvidos na proteção e dispersão dos agentes infecciosos transmitidos por carrapatos.

Durante o período de alimentação, carrapatos alternam entre a ingestão de componentes de origem sanguínea e o regurgitamento do excesso das substâncias ingeridas de volta ao hospedeiro via saliva. Cálculos baseados em dados obtidos com carrapatos *D. andersoni* sugerem que uma fêmea não alimentada, pesando apenas 7-10 mg, consegue processar aproximadamente 4g de sangue do hospedeiro, até atingir seu peso de ingurgitamento final (KAUFMAN, 1989). Foi estimado que, durante o ingurgitamento, cerca de 500 µl de saliva são inoculados a cada 96 horas no hospedeiro (BALASHOV, 1972). Assim, a contribuição da saliva na montagem do microambiente onde se dará a resposta imune do hospedeiro possivelmente deve ser de extrema importância. De fato, é intrigante que tais ácaros permaneçam um longo período (4-10 dias, dependendo do estágio) se alimentando sem que haja o desenvolvimento de uma resposta imune/inflamatória eficaz contra componentes da saliva inoculada, ou mesmo contra o hipostômio (aparelho bucal) do parasita.

De fato, foi demonstrado que a saliva de carrapatos *Ixodes dammini* contém diversas substâncias anti-inflamatórias e anti-hemostáticas (RIBEIRO *et al.*, 1995). Esta espécie consegue fazer um eficiente repasto sanguíneo através da inibição de diferentes vias, tais como: (1) inibição agregação plaquetária, pela ação de uma enzima apyrase; (2) vasoconstricção, pela ação de prostaglandina E2; (3) inibição da ação de anafilatoxinas, pela enzima carboxipeptidase B-like; inibição do sistema complemento, por reduzir a atividade da diástase C3 convertase; inibição da coagulação, por reduz a via intrínseca da coagulação sanguínea (RIBEIRO *et al.*, 1985; RIBEIRO; SPIELMAN, 1986; RIBEIRO, 1987).

A modulação da resposta de linfócitos T por carrapatos tem sido foco de vários estudos. Respostas *in vitro* para mitógenos de células T estão reduzidas em linfócitos

derivados de hospedeiros infestados com *Dermacentor andersoni* (WIKEL, 1982), *I. scapularis* (URIOSTE *et al.*, 1994), *I. ricinus* (GANAPAMO *et al.*, 1996b), *B. microplus* (INOKUMA *et al.*, 1993), assim como para *R. sanguineus* (FERREIRA; SILVA, 1999). Essa magnitude de supressão da resposta para mitógenos torna-se menos intensa depois de repetidas infestações com *D. andersoni* (WIKEL, 1982), sugerindo que o hospedeiro torna-se menos susceptível após sucessivos desafios ao mesmo carrapato.

Estudos sobre o efeito da saliva de carrapatos sobre a produção de citocinas revelaram a inibição da produção das citocinas IL-1 e TNF- α por macrófagos, bem como para as citocinas IL-2 e interferon- γ (IFN- γ) derivadas de linfócitos (RAMACHANDRA; WIKEL, 1992). O efeito supressivo de extrato de glândulas salivares de *R. appendiculatus* sobre a produção de citocinas (IFN- α , IFN- γ , IL-1, IL-5, IL-6, IL-7 and IL-8) produzidas por leucócitos humanos também foi demonstrado (FUCHSBERGER *et al.*, 1995).

Células de camundongos C3H/HeJ re-infestados com carrapatos *R. sanguineus* sintetizaram reduzidos níveis de citocinas associadas com células do tipo Th1, ou seja IL-2, IFN- γ e IL-12, enquanto produziram níveis aumentados de citocinas associadas com Th2 (IL-4, IL-10 e TGF- β) (FERREIRA; SILVA, 1999). A citocina IL-4 é produzida após a fixação de carrapatos *Ixodes ricinus* e induz significativa redução de anticorpos IgG2a anti-*Borrelia burgdorferi* quando em comparação com camundongos que apenas foram infectados com a *B. burgdorferi* (CHRISTE *et al.*, 2000).

Ferreira; Silva (1998), demonstraram que saliva de carrapatos *R. sanguineus* suprime de forma dose-dependente a proliferação de esplenócitos murinos normais estimulados *in vitro* com Con-A ou a proliferação celular antígeno-específica, inibe a capacidade microbicida (dependente de óxido nítrico) de macrófagos estimulados com IFN- γ , reduz a produção de IFN- γ e aumenta a produção de IL-10 por esplenócitos de camundongos co-cultivados com *Trypanosoma cruzi*.

A fim de investigar os mecanismos envolvidos na relação carrapato-hospedeiro, o nosso laboratório tem estudado a interação de carrapatos da espécie *R. sanguineus* (hospedeiro natural de cães domésticos) e camundongos (hospedeiro experimental susceptível). O uso de camundongos reproduz uma situação similar de resposta imune aos hospedeiros naturais (cães) e fornece a possibilidade de se realizar diversos tipos de experimentos, pois é grande a disponibilidade de reagentes para murinos. Assim, o que motiva e direciona essa pesquisa é a possibilidade de uma melhor compreensão dos mecanismos imunes envolvidos nesse parasitismo, bem como o entendimento de como este processo pode estar ocorrendo nos hospedeiros naturais.

Vários mecanismos supressivos mediados por carrapatos da espécie *R. sanguineus* têm sido descritos na literatura, como por exemplo, a redução da produção de anticorpos, alteração na função de neutrófilos e resposta blastogênica de linfócitos a mitógenos (BECHARA *et al.*, 1994; MATSUMOTO *et al.*, 2001; INOKUMA *et al.*, 1997; INOKUMA *et al.*, 1998). Nosso grupo mostrou que camundongos das linhagens C57BL/6, BALB/c e C3H/HeJ infestados com carrapatos *R. sanguineus* não desenvolvem resistência, nem mesmo após sucessivas infestações, e que o modelo de resposta imune nesses camundongos infestados é de um padrão Th₂ de produção de citocinas (FERREIRA *et al.*, 1998 e 1999).

Estudos recentes têm associado à evasão por patógenos com a interferência na biologia de células dendríticas (CDs), células cruciais na formação e expressão da resposta imune (URBAN *et al.*, 1999; SALIO *et al.*, 1999; TORTORELLA *et al.*, 2000; RESCIGNO, 2002). Em trabalho publicado recentemente por CAVASSANI *et al.* (2005), evidencia-se o efeito da saliva de carrapatos *R. sanguineus* sobre a diferenciação e maturação de CDs de camundongos.

Uma vez que os mecanismos pelos quais os carrapatos interferem na biologia das CDs ainda são pobremente entendidos, elucidar tais processos pode responder importantes questões

em relação à inabilidade de hospedeiros em montar uma resposta imune eficiente contra carrapatos.

1.4 Participação de células dendríticas (CDs) na resposta imune a patógenos

A resposta imune inata e adquirida para diferentes tipos de antígenos é desencadeada primordialmente pelas CDs (RESCIGNO, 2002). CDs constituem uma população de leucócitos com diferentes subtipos altamente especializados em reconhecer, capturar, processar e apresentar antígenos, sendo então conhecidas como células apresentadoras de antígenos profissionais (APCs). Estas células possuem um papel central na estimulação de células T linfócitos B “naives”, eliminação de timócitos auto-reativos e indução de tolerância periférica (STEINMAN, 1991; CELLA *et al.*, 1997; BANCHEREAU; STEINMAN, 1998; ARDAVIN *et al.*, 2001).

Morfologicamente, CDs apresentam projeções citoplasmáticas dendríticas, um ou mais núcleos lobulados, cromatina frouxa e citoplasma claro e grande (LIU *et al.*, 1992). Originam-se da medula óssea e constantemente migram para diversos tecidos não linfóides, tais como pele (onde são denominadas células de Langerhans), trato gastrointestinal, urogenital e respiratório, órgãos sólidos tais como fígado e coração, sangue e linfa. Nesses locais as CDs são consideradas imaturas e exercem função de sentinela para o reconhecimento de antígenos (SALLUSTO; LANZAVECCHIA, 1999; BANCHEREAU *et al.*, 2000; STEINMAN *et al.*, 2003).

Na presença de sinais inflamatórios, tais como citocinas e/ou quimiocinas ou produtos microbianos, CDs imaturas sofrem alterações fenotípicas e funcionais. Logo após a captura de antígenos e sob influência de sinais inflamatórios, CDs perdem a capacidade de fagocitose e tornam-se excelentes APCs (BANCHEREAU *et al.*, 2000; STEINMAN *et al.*, 2003).

Após essa transição funcional, que leva 1-2 dias, essas células são consideradas CD45^{hi} maduras e migram através dos tecidos e vasos até atingirem os órgãos linfóides secundários (INABA *et al.*, 1986; SALLUSTO *et al.*, 1995; BANCHEREAU; STEINMAN, 1998; SOUSA *et al.*, 1999; ARDAVIN *et al.*, 2001). A migração de CD45^{hi} do sangue para os tecidos bem como dos tecidos para órgãos linfóides secundários ocorre através de uma cascata de interações entre as CD45^{hi} e o endotélio vascular (SPRINGER, 1995). Essa migração é orquestrada por um complexo de quimiocinas e seus receptores, moléculas de adesão, bem como metaloproteinases da matriz (MMPs) e mediadores lipídicos (YOSHIDA *et al.*, 1997; SALLUSTO *et al.*, 1998; 1999; HIRAO *et al.*, 2000). Acredita-se que a expressão e regulação de receptores quimiotáticos funcionais são os prováveis responsáveis pelos diferentes subtipos de CD45^{hi} nos diferentes tecidos (SOZZANI, 2005).

CD45^{lo} imaturas expressam predominantemente receptores CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5 e CCR6 que as capacitam na migração para tecidos em condições normais ou inflamatórias (SOZZANI, 1997; 2005; YAMAZAKI, *et al.*, 1998). Esses receptores expressam um repertório único de quimiocinas inflamatórias incluindo CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1 α), CCL4 (MIP-1 β), CCL5 (RANTES), CCL19 (MIP-3 β), CCL11 (Eotaxina) e CCL22 (MDC). Em adição, CD45^{lo} imaturas também expressam o receptor CXCR4 funcional que se liga especificamente à quimiocina CXCL12 humana (SOZZANI *et al.*, 2005). É muito importante mencionar que apesar de algumas quimiocinas se ligarem a receptores específicos, parece que a maioria das quimiocinas são funcionalmente redundantes, fenômeno que poderia ser explicado não apenas pela promiscuidade com que uma mesma quimiocina tem de se ligar a vários receptores mas também pela variação temporal da expressão em cada tipo e estágio de desenvolvimento celular (FU; CHEN, 2004).

No foco inflamatório especificamente, há também um aumento acentuado da expressão de moléculas de adesão incluindo os ligantes E - e P-selectina, ICAM-1, VCAM-1 e

L-selectina (CAVANAGH; VON ANDRIAN, 2002). Esses ligantes juntamente com os receptores de quimiocinas estão diretamente relacionados com a rápida migração de CDs para esses locais (SOZZANI, 2005).

Como previamente citado, após a captura de antígenos as CDs se ativam, ocorrendo uma dramática mudança no repertório de receptores de quimiocinas que induz a migração das CDs da periferia para os linfonodos. Os sinais que promovem essa mudança de repertório incluem IL-1, TNF- α , CD40L e produtos de patógenos, tais como lipopolissacarídeo (LPS) (SOZZANI *et al.*, 1998; DIEU *et al.*, 1998; VECCHI *et al.*, 1999). A ativação e maturação de CDs usualmente são associadas com a aquisição de um fenótipo maduro que consiste do aumento da expressão de moléculas estimulatórias (MHC-I e II) e co-estimulatórias (CD80, CD86 e CD40, dentre outras).

A maturação de CDs também está associada com a redução da expressão de receptores de quimiocinas inflamatórias e a aumento da expressão do receptor CCR7, ligante para as quimiocinas CCL19 (MIP-3 β) e CCL21 (6CKine), duas quimiocinas que são expressas em células do endotélio nos órgãos linfóides secundários (DIEU *et al.*, 1998).

O passo crucial na indução de uma resposta imune adaptativa é a eficiente sensibilização e ativação de células T antígeno-específicas por CDs nos órgãos linfóides secundários. A ativação de células T pode ser influenciada por muitas variáveis, tais como concentração do antígeno, duração da apresentação e interação celular e molecular. Os sinais que levam a ativação de células T são gerados após a formação da sinapse imunológica (área de contato entre células T e APCs) onde ocorre a interação de complexos MHC-peptídeo com os receptores das células T (TCRs) (GRAKOU *et al.*, 1999). Essa interação é auxiliada por moléculas de adesão (CD54) e moléculas co-estimulatórias (CD80, CD86 e CD40, OX40) expressas nas CDs, que interagem com seus respectivos ligantes nas células T (CD28/CD152,

CD40L e OX40L). O resultado desta sinalização é um aumento na produção de IL-2 e seu receptor (CD25), com conseqüente expansão clonal das células T antígeno-específicas.

Segundo Kalinski *et al.* (1999), a natureza do estímulo e/ou fatores, tais como citocinas, presentes no microambiente onde as CDs se tornam maduras (tecidos periféricos) podem guiar o padrão de diferenciação dos linfócitos (Th1 ou Th2) nos tecidos linfóides secundários. CDs maduras podem produzir IL-12, que direciona a polarização de clones de células Th para a secreção de citocinas do padrão Th1 (BANCHEREAU; STEINMAN, 1998). Por outro lado, CDs também podem produzir IL-18, IFN- γ e IL-10, sendo que esta última freqüentemente inibe o processo de maturação de outras CDs, reduzindo a ativação de células T nos órgãos linfóides secundários (LANZAVECCHIA; SALLUSTO, 2001; BANCHEREAU *et al.*, 2000)

As CDs podem ser divididas em diferentes subtipos dependendo da expressão de marcadores de superfície, das funções especializadas, distribuição tecidual e origem (SHORTMAN; CAUX, 1997; LIU, 2001). Dependendo da população, as CDs podem ainda ser divididas em CDs linfóides ou mielóides (SHORTMAN & LIU, 2002). Ambas as populações expressam CD11c, moléculas de adesão, moléculas estimulatórias e co-estimulatórias, no entanto se distinguem pela presença de moléculas CD8 α que estão presentes apenas nas CDs linfóides (SHORTMAN; CAUX, 1997). Apesar das diferenças, ambas as populações têm capacidade de estimular linfócitos T “naives” antígeno-específicos e induzir um padrão Th1 ou Th2 de resposta imune (MALDONADO-LÓPEZ *et al.*, 1999a, 1999b, 2001).

Desde que se evidenciou o papel fundamental das CDs no desencadeamento da resposta imune, vários estudos vêm sendo realizados buscando-se avaliar a ação de microrganismos, toxinas, hormônios, drogas antiinflamatórias, entre outros fatores, no desenvolvimento e atividade destas células. Foi demonstrado que a 1 α ,25-dihydroxyvitamina

D3, um hormônio que reduz a proliferação de linfócitos, inibe a diferenciação e a maturação de CDs derivadas de monócitos humanos (PIEMONTI *et al.*, 2000). De forma similar, *Leishmania mexicana* e *Plasmodium falciparum* impediram a maturação de CDs, contribuindo para falha no desenvolvimento de resposta imune à infecção (BENNET *et al.*, 2001; URBAN *et al.*, 1999).

Numerosos fatores podem interferir na atividade das CDs, dentre eles o balanço entre sinais pro-inflamatórios e anti-inflamatórios no local de entrada do patógeno. Como exemplo, estímulos como TNF- α do hospedeiro ou LPS, e DNA bacteriano induzem a maturação de CDs, enquanto que estímulos como IL-10, M-CSF e IL-6 do hospedeiro inibem a diferenciação e/ou a capacidade de apresentar antígenos destas células (RESCIGNO *et al.*, 1999; ENK *et al.*, 1994). Recentemente foi descrito que alguns patógenos também são capazes de alterar a produção de citocinas por CDs modulando sua atividade de forma que lhes beneficie (RESCIGNO; BORROW, 2001; REIS E SOUSA, 2001, CAVASSANI *et al.*, 2005).

Com relação ao envolvimento de CDs com a resposta de hospedeiros a carrapatos existem poucos trabalhos publicados até o momento. Os primeiros trabalhos, utilizando técnicas disponíveis naquela época, sugeriram que há migração de células de Langerhans da pele para os linfonodos após a infestação com carrapatos *D. andersoni*, e que a presença destas células nos linfonodos é um evento fundamental para que o hospedeiro desenvolva uma resposta imune específica a carrapatos (ALLEN *et al.*, 1979; NITHIUTHAI; ALLEN, 1984a, 1984b, 1985).

Recentemente foi avaliado o efeito da saliva de carrapatos *R. sanguineus* em CDs de camundongos (CAVASSANI *et al.*, 2005). Este estudo mostrou que a saliva deste carrapato reduz em 65,4% a diferenciação de precursores da medula óssea em CDs (CD11c+CD11b+), além de reduzir significativamente a população de CDs expressando moléculas co-

estimulatórias (CD80 e CD86), enquanto que a população de CDs expressando MHC-II e CD40 não foi alterada. Adicionalmente, quando as CDs já diferenciadas foram estimuladas com LPS (para indução de maturação) na presença de saliva, observou-se redução da expressão das moléculas co-estimulatórias CD80, CD86 e CD40, e inibição da produção de IL-12.

Uma vez que a saliva de carrapatos *R. sanguineus* é capaz de modular a diferenciação e maturação das CDs *in vitro*, o presente trabalho buscou elucidar o efeito da saliva na migração e função de CDs, etapas decisivas para a indução de uma efetiva resposta imune a vários patógenos.

3. Materiais e Métodos

3.1 Submissão do projeto para avaliação pela comissão de ética em experimentação animal - CETEA

O projeto intitulado “Efeito da saliva de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* (LATREILLE, 1806) na migração e função de células dendríticas de camundongos” foi analisado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, em sua 16^a Reunião Ordinária, realizada em 13 de setembro de 2004, e enquadrado na categoria: APROVADO, de acordo com o protocolo N^o 033/2004.

3.2 Reagentes e soluções

3.2.1 Anticorpos monoclonais utilizados para citometria de fluxo

Para a caracterização de células dendríticas (CDs) de camundongos foram utilizados os seguintes anticorpos monoclonais: anti-CD11c (IgG γ de hamster, clone HL3) marcado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) ou ficoeritrina (PE), anti-CD11b (anti-Mac-1) (IgG2b de rato, clone M1/70.15) marcado com FITC, anti-Ly-6G (anti-Gr1) (IgG2bk de rato, clone RB6-8C5) marcado com PE, anti-CD19 (IgG2ak de rato, clone 1D3) marcado com PE.

Para detecção de moléculas estimulatórias, co-estimulatórias e de adesão nas CDs de camundongos foram utilizados os seguintes anticorpos monoclonais: (1) marcados com PE: anticorpo anti-CD80 (anti-B7.1) (IgG2 ak de rato, clone 1G10), anticorpo anti-CD86 (anti-B7.2) (IgG2 ak de rato, clone GL1), anticorpo anti-CD40 (IgMk de hamster, clone HM40-3), anticorpo anti-CD54 (anti-ICAM-1)(IgGk de Hamster, clone 3E2) e anticorpo anti-MHC classe II (IgGk de hamster, clone NIMR-4).

Os anticorpos anti-CD11c, anti-CD40, anti-CD54, anti-CD19 e anti-Ly-6G foram adquiridos da Pharmingen® (San Diego, CA); o anticorpo anti-CD11b da Caltag® (Burlingame, CA) e o restante da Southern Biotechnology Associates®, Inc. (Birmingham, AL) e usados de acordo com os protocolos indicados pelo fabricante. Os anticorpos não

relacionados (isotipos controles) utilizados foram: IgG de hamster, IgG2a de rato, IgG2b de rato e IgM de hamster, marcados com FITC ou PE.

3.2.2 Meio de cultura

Foi utilizado meio RPMI-1640 incompleto já em solução (Sigma®, St. Louis, MI), que foi suplementado com 5 ou 10% de soro bovino fetal inativado (SBF), 5×10^{-5} M de 2-mercaptoetanol, 2 mM de L-glutamina, 100 µg/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, 1 mM de piruvato de sódio, todos provenientes da Sigma®, e aminoácidos não essenciais (Gibco-BRL® Life Technologies, Gaithersburg, MD). Após suplementação o meio foi filtrado num sistema de filtragem de polipropileno estéril sob pressão (Corning-Costar Incorporated®, NY) e mantido a 4°C até o uso.

3.2.3 Solução de Turk

Solução usada na contagem de células em câmara de Neubauer. Para tanto, foram adicionados 2,0 ml de violeta de genciana a 2% e 10,0 ml de ácido acético em um volume de 488,0 ml de água destilada. A solução foi estocada à temperatura ambiente até o momento do uso.

3.2.4 Tampão de lise

O tampão de lise foi usado para lisar hemácias presentes nas suspensões celulares preparadas a partir da medula óssea de camundongos, suspensões essas usadas posteriormente para a diferenciação de CDs. Para a confecção deste tampão foram misturadas nove partes de solução de cloreto de amônio 0,16 M e uma parte de Tris 0,17 M. A solução foi filtrada, autoclavada a 120°C e mantida a 4°C até o momento do uso. Durante o procedimento de coleta das células da medula óssea, imediatamente após a primeira lavagem das células,

adicionou-se 2,0 ml do tampão de lise e aguardou-se de 2 a 4 min para realização das lavagens subsequentes de acordo com o protocolo experimental indicado.

3.2.5 Citocinas utilizadas na cultura de células

Com o intuito de obter CDs diferenciadas *in vitro* foi realizada cultura de células da medula óssea na presença de meio RPMI suplementado adicionado de GM-CSF (30 ng/ml) e IL-4 (10 ng/ml), adquiridas da R & D Systems® (Minneapolis, MN).

3.3 Animais de experimentação

3.3.1 Camundongos

Foram usados camundongos C57B1/6 machos com 4 a 6 semanas de idade, criados e mantidos no biotério de camundongos isogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP).

3.3.2 Cobaias

As cobaias utilizadas na manutenção da colônia de carrapatos tinham de 3 a 6 meses de idade e foram adquiridas do biotério central da FMRP-USP e mantidas no biotério da FMRP-USP.

3.3.3 Cães domésticos

Os cães foram obtidos e mantidos no biotério central da FMRP-USP. Dois dias antes da infestação com carrapatos adultos os cães foram banhados e mantidos em baias individuais. Esses animais serviram para a obtenção de teleógenas ingurgitadas (usadas para a coleta de saliva ou para oviposição com conseqüente obtenção de novas larvas a serem usadas na

manutenção da colônia carrapatos). Foram utilizados cães de ambos os sexos, sem raça definida e com idades variadas.

3.3.4 Parasita

Foram utilizados carrapatos da espécie *Rhipicephalus sanguineus*, popularmente conhecidos como carrapato marrom, os quais têm como hospedeiros preferenciais cães domésticos. Os carrapatos utilizados nos experimentos foram provenientes da colônia de carrapatos instalada em nosso laboratório.

3.4 Manutenção da colônia de carrapatos

A colônia de carrapatos *R. sanguineus* está implantada em nosso laboratório e foi mantida de acordo com BECHARA *et al.* (1995). Para sua manutenção, carrapatas fêmeas ingurgitadas (teleógenas) foram coletadas e colocadas para oviposição em recipientes plásticos. Após um período de aproximadamente 10 a 12 dias, quando ocorreu o término da oviposição, as fêmeas foram retiradas e desprezadas e os ovos postos para eclosão por um período que variou de 18 a 25 dias. Para a obtenção de todos os estágios de vida do carrapato, larvas e ninfas não ingurgitadas foram alimentadas em cobaias nunca antes infestadas e os adultos foram colocados para se alimentarem em cães domésticos. Em ambos os casos, os carrapatos foram mantidos dentro de câmaras de alimentação fixadas com uma cola atóxica (Britannia Adhesives® P4 104 Latex, UK) ao dorso previamente tricotomizado dos animais. As câmaras de alimentação foram confeccionadas de acordo com Bechara *et al.* (1989), com pequenas modificações. Resumidamente, cilindros plásticos com 2,5 cm de largura por 3,0 cm de profundidade foram colados em uma peça de borracha fina de 1-2 mm de espessura, cortada em formato de disco (com diâmetro de 7,0 cm), contendo uma janela central de diâmetro equivalente ao do cilindro utilizado. Sob o disco de borracha colou-se um tecido de algodão de dimensões e formato iguais ao do disco, tornando a superfície do disco adequada

para serem colados na pele dos animais. A câmara de alimentação, uma vez fixada, foi fechada com uma tampa de encaixe perfurada para que houvesse ventilação no seu interior.

A colônia de carrapatos foi mantida numa estufa incubadora para B.O.D. (demanda bioquímica de oxigênio) umidificada, a uma temperatura de $28 \pm 1^\circ\text{C}$. Os carrapatos mantiveram os parâmetros normais de ciclo biológico como descritos por Freitas *et al.* (1982).

3.5 Coleta de saliva de carrapatos

A obtenção de fêmeas de carrapatos para a coleta de saliva foi realizada através de infestações com 4 câmaras de alimentação por cão, onde 140 carrapatos (machos e fêmeas na proporção de 1:1) foram liberados por câmara. A saliva foi coletada segundo a técnica de Bechara *et al.* (1988), adaptada para carrapatos *R. sanguineus*. Resumidamente, fêmeas ingurgitadas, provenientes da colônia e alimentadas em cães por 6 a 8 dias, foram recolhidas, limpas em solução de tampão fosfato bicarbonato 0,1 M (PBS) e em seguida inoculadas 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 Systems®, San Jose, CA). Os carrapatos foram então fixados a uma fita crepe e mantidos em câmara úmida com temperatura superior a 25°C . A coleta da secreção salivar do hipostômio das carrapatas foi realizada com uma pipeta automática e mantida em banho de gelo. Após a coleta, a saliva foi filtrada através de uma membrana com poro de 0,22 μm (Corning-Costar incorporated, NY) e mantida a -20°C até o momento do uso. Cada lote de saliva compreendeu material coletado de 100 a 600 carrapatas. Os experimentos foram realizados com diferentes lotes de saliva. O teor de proteína final na saliva de diferentes coletas foi determinado de acordo com o método de Bradford (Coomassie® Protein Assay, Hercules, CA), sendo a média encontrada nas diferentes amostras de 138,2 $\mu\text{g/ml}$.

3.6 Cultura de células dendríticas (CDs)

As precursoras de CDs foram obtidas da medula óssea de fêmures e tíbias de camundongos e cultivadas com GM-CSF e IL-4 conforme descrito por Lutz *et al.*, (1999), com algumas modificações. Resumidamente, 3-4 camundongos foram sacrificados e seus fêmures e tíbias cuidadosamente removidos, partidos em ambiente estéril e lavados com PBS utilizando uma seringa com agulha 13 x 4,5 mm. As células recém colhidas foram lavadas e centrifugadas a 250 x g por 10 min e logo depois de incubadas com tampão de lise de hemácias, lavadas e centrifugadas novamente por mais 10 min. Em seguida, as células foram diluídas em RPMI-1640 suplementado, e distribuídas em placas de 24 poços (Corning-Costar) numa concentração de $3,9 \times 10^6$ células/ml ($2,5 \times 10^6$ células/poço) na presença de GM-CSF (30 ng/ml) e IL-4 (10 ng/ml). O meio de cultura suplementado adicionado de citocinas foi substituído a cada três dias. Entre o sétimo e o nono dia de cultura as células foram fenotipadas por citometria de fluxo (FACScan, Becton Dickinson Immunocytometry®, San Jose, CA), e dependendo da porcentagem de células CD11c+ diferenciadas, os experimentos foram iniciados.

3.7 Fenotipagem de células dendríticas (CDs)

A análise fenotípica das células cultivadas foi realizada por citometria de fluxo conforme protocolo padrão descrito por Gazzinelli *et al.*, 1993. Resumidamente, as células foram lavadas através de centrifugação a 250 x g por 10 min e ressuspensas em 1 ml de PBS suplementado com 3% de SBF (Gibco-BRL). As células foram incubadas com anticorpos anti-CD16/32, bloqueadores da porção Fc de imunoglobulinas (Fc blockTM), por 45 min a 4°C a fim de evitar ligações inespecíficas. Em seguida foram adicionados os anticorpos monoclonais específicos marcados com FITC ou PE ($0,75 \mu\text{g} / 10^6$ células) e deixados a incubar no escuro por 30 min a 4°C. Após este procedimento, as células foram lavadas duas vezes com PBS-SBF 2% (2 ml/tubo), e ressuspensas em PBS-formol (200 μl /tubo). As

preparações celulares (20.000 eventos por amostra) foram adquiridas no aparelho de citometria de fluxo (FACScan, Becton Dickinson Immunocytometry®, San Jose, CA, USA) e analisadas utilizando o programa Cell Quest Pro® (BD Biosciences PharMingen, San Jose, CA, USA). As populações de células foram compensadas a fim de evitar a interferência do canal de fluorescência FITC no canal de fluorescência PE e vice-versa.

3.8 Ensaio de migração celular usando câmaras de Boyden

Ensaio de quimiotaxia foram realizados utilizando uma câmara de Boyden de quimiotaxia ((Neuro Probe, Cabin John, MD, USA)) com filtros de policarbonato contendo poros de 5 μ m (Millipore, Bedford, MA, USA) como descrito previamente (SOZZANI *et al.*, 1995). Como estímulo para migração foram utilizados 27 μ l das quimiocinas recombinantes murinas MCP-1 (CCL2), MIP-1 α (CCL3), MIP-1 β (CCL4), RANTES (CCL5), SDF-1 α (CXCL12) e MIP-3 β (CCL-19) (PeproTech® Inc., Rocky Hill, NJ, EUA). Neste ensaio, as quimiocinas foram colocadas no lado inferior da câmara e, do lado superior foi disposto 50 μ l da suspensão celular de CDs (1x10⁶ células/ml). Após 1,5 h de incubação a 37°C, o filtro foi retirado, lavado, e fixado com metanol 70%. Em seguida foi realizado a coloração com o corante Diff Quick (Baxter Diagnostics, Düringen, Switzerland) e foram contados 5 campos diferentes por triplicata, totalizando 15 campos por tratamento, com uso de um microscópio óptico de luz comum com uma objetiva de aumento de 1000x (Olympus, Tokyo, Japan). Os resultados deste ensaio são apresentados como a média \pm SD de células migradas para cada tratamento. Os experimentos foram repetidos pelo menos 3 vezes.

Dentro desse protocolo padrão, a avaliação do efeito da saliva foi feita seguindo duas variações procurando responder diferentes questionamentos. O primeiro ensaio consistiu da utilização de CDs diferenciadas por 9 dias, sendo a saliva colocada em conjunto com os estímulos quimioatrativos no compartimento inferior ou superior, imediatamente antes de

iniciar a migração. O segundo ensaio também empregou CDs diferenciadas *in vitro*, no entanto elas foram pré-incubadas com saliva na presença ou não de lipopolissacarídeo (Sigma Chemical Co.) por diferentes tempos de incubação (24 ou 48 h).

3.9 Ensaio de migração de células dendríticas (CDs) da pele para os linfonodos

Para esse experimento foram utilizados protocolos previamente descritos por Macatonia *et al.* (1986). Camundongos previamente tosados na região do dorso foram inoculados intradermicamente com 20 µl/área de PBS, LPS (2 µg/ml) ou de saliva (1:20 v/v) em seis regiões delimitadas do dorso. Imediatamente após, as mesmas seis regiões delimitadas foram pintadas (20 µl por área) com isotiocianato de fluoresceína (FITC) dissolvido em uma mistura de acetona e dibutylphthalate (1:1 v/v). Após 24 h os animais foram sacrificados e seus linfonodos regionais coletados, fragmentados e incubados por 30 min com meio RPMI contendo 500 µg/ml de liberase (Blendzyme). Em seguida as células foram colhidas, lavadas e a viabilidade celular determinada por exclusão com azul de trypan. Em seguida foi determinada a porcentagem de células CD11c+FITC+ por citometria de fluxo. Adicionalmente, avaliou-se a intensidade de expressão de moléculas estimulatórias (MHC-II) e co-estimulatórias (CD80 e CD86) nessas células CD11c+FITC+.

A porcentagem de células viáveis foi determinada pela coloração com azul de trypan. Nesse ensaio células viáveis são excluídas de não viáveis, sendo as últimas visualizadas por se corarem em azul quando observadas pelo microscópio óptico. Para tal, juntaram-se quatro partes da solução de azul de trypan (0,2% de azul de trypan diluído em solução salina a 4,25%) com uma parte da suspensão da cultura de células. A contagem foi realizada numa câmara de Neubauer, sendo que a porcentagem de células viáveis foi calculada dividindo-se o número de células viáveis pela soma de células viáveis com as células mortas e multiplicando-se o resultado por 100.

3.10 Ensaio de apresentação de antígenos

CDs diferenciadas com GM-CSF e IL-4 foram tratadas com ou sem saliva (1:20 v/v) por 24 h, sendo as 3 h finais na presença de hemocianina de ouriço marinho (10 µg/ml) (KLH, Sigma, St. Louis, MI). Após esse período, as células foram coletadas, lavadas por 3 vezes com RPMI incompleto e injetadas no coxim plantar de camundongos (2×10^5 células/coxim plantar). Cinco a seis dias depois, os animais foram sacrificados e tiveram seus linfonodos poplíteos drenantes removidos, sendo as suspensões celulares preparadas.

As células foram dispostas em placas de cultura de 96 poços (Costar-Corning) (5×10^5 células/poço) e incubadas em RPMI suplementado adicionado de KLH (1-10 µg/ml) em triplicata. A proliferação celular foi determinada pela incorporação de timidina, que foi mensurada com 72 h de cultura, após um pulso de 16 h com methyl- ^3H thymidine (0,5 µCi/poço, Amersham Life Science, Bucks, UK). As células foram então colhidas com um coletor de células (Cambridge Technology, Inc., Watertown, MA) e a radioatividade determinada contador beta de cintilação líquida (Beckman Instruments Inc., Fullerton, CA). Os valores obtidos estão expressos como média para a contagem por minuto (cpm \pm SD) em triplicata.

Para a coleta de sobrenadantes para dosagem de citocinas realizou-se cultura de células dos linfonodos (2×10^6 células/poço em triplicata) na presença de KLH (1, 5 e 10 µg/ml) por um período de 48 h usando-se placas de cultura de 24 poços (Corning-Costar). Como antígeno não relacionado, as células dos linfonodos também foram incubadas com ovalbumina (OVA) (10 µg/ml, Sigma®).

3.11 Dosagem de citocinas

Os níveis de IFN- γ , IL-10, TGF- β e IL-4 foram determinados com uso de kits específicos (Pharmingen e R & D Systems®, San Diego, CA) por meio de ensaio imunoenzimático ELISA do tipo “sanduíche” conforme protocolo especificado pelo fabricante. Os pares de anticorpos monoclonais usados nesse estudo foram (clones para captura e detecção, respectivamente): IFN- γ , R4-6A2 e XMG1.2; IL-10, JES5-2A5 e SXC-1; IL-4, 11B11 e BVD6-24G2 e; TGF- β , A75-2 e A75-3.

Brevemente, placas de ELISA de alta afinidade (Corning-Costar) foram recobertas com anticorpo monoclonal específico (50 μ l) para as citocinas de interesse diluídas no tampão indicado e incubadas por 12-16 h a 4°C. Após esse procedimento, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS/Tween 0,05% (Sigma) (PBS-T) em lavador automático de placas (ImmunoWash, BioRad laboratories®, Hercules, CA) e bloqueadas a temperatura ambiente por 2 h com 200 μ l de uma BSA a 1%. Em seguida, as placas foram lavadas novamente, e 50 μ l de amostras ou da curva padrão de citocinas, em duplicata, foram colocadas para incubação por 2 h a temperatura ambiente. Após nova lavagem foram adicionados 50 μ l do anticorpo secundário biotilado e incubados por mais 1 h a temperatura ambiente. As placas foram então lavadas novamente e incubadas com uma solução de peroxidase conjugada à avidina (1,25 ng/ml) (Genzyme Diagnostics®, Cambridge, Mass.) diluída em PBS-BSA a 1% durante 20 min a 37°C. Após 3 lavagens com PBS, foram adicionados 100 μ l de reagente tetrametilbenzidina (TMB - Sigma®) para revelar a reação. A reação foi interrompida com ácido sulfúrico a 30% e a absorbância foi lida em um comprimento de onda de 450 nm num leitor de ELISA (EMAX, Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA). A concentração das amostras foi estimada através da comparação com uma curva padrão feita com as respectivas citocinas murinas recombinantes, empregadas em diluição seriada específica para cada uma. Os resultados da absorbância foram analisados por regressão linear em um

programa de análise de curvas (GraphPad Prism[®] Software Versão 2, San Diego, CA, USA). Os limites de detecção para IFN- γ , IL-10 TGF- β e IL-4 foram 39,1, 7,8 e 8,37 pg/ml respectivamente.

3.12 Fenotipagem das CDs usadas nos ensaios de apresentação de antígenos

Antes que as CDs fossem utilizadas para os ensaios de apresentação de antígenos, avaliamos o efeito da saliva na expressão de moléculas de superfície relacionadas com a apresentação. Para tanto, CDs diferenciadas com GM-CSF e IL-4 por 9 dias foram tratadas com saliva (1:20 v/v) por 24 h, sendo as 4 h finais na presença de KLH (10 μ g/ml). A análise fenotípica das células cultivadas foi realizada por citometria de fluxo conforme protocolo já descrito. Vale apenas ressaltar que a população de células foi primeiramente selecionada de acordo com os parâmetros de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC), e em seguida selecionada a população CD11c+. Uma vez feito isso, analisou-se dentro da população CD11c+, a expressão de moléculas co-estimulatórias (CD40, CD80 e CD86), estimulatórias (MHC-II) e de adesão (CD54).

3.13 Análise estatística

Os resultados foram analisados por análise de variância (ANOVA) e o método de Tukey-Kramer para determinar as diferenças existentes entre os grupos. Para tanto, utilizou-se o programa estatístico INSTAT (Graph Pad[®], San Diego, Califórnia). Foram consideradas significativas comparações com P igual ou menor a 0,05.

Resultados

4.1 Obtenção das células dendríticas (CDs)

Células da medula óssea de camundongos C57BL/6 machos foram cultivadas na presença de GM-CSF e IL-4 visando induzir a diferenciação em células CD11c+. Em seguida estabeleceu-se o seu perfil populacional por citometria de fluxo. Para selecionar a população de células a ser estudada foram utilizados os parâmetros de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC).

Após 9 dias de cultura, o perfil populacional das células diferenciadas a partir de células precursoras alterou-se significativamente, de forma que houve elevação do número de células de tamanho médio e grande, além de ter ocorrido um aumento acentuado na granulosidade das mesmas (Figura 1A e B). Quando se caracterizou fenotipicamente a população de células dentro da “Gate” R1, 5,78% das células recém colhidas da medula óssea expressava a molécula CD11c em sua superfície (Figura 1C). Após 9 dias de cultura, 82,43 % (variando de 63,4% a 92,49% dentre os experimentos) das células expressavam a molécula CD11c (Figura 1D), o que equivale a um aumento de 14,26 vezes.

Ainda em relação à caracterização fenotípica, a população de células CD11c+ obtida em nossos ensaios, 9 dias após diferenciação, apresentava ainda um fenótipo CD11b+, CD40+, CD80+, CD86+, CD4-, CD8 α - e Gr-1, fenótipo este similar àqueles encontrados por Cavassani *et al.* (2005) empregando a mesma metodologia.

Os experimentos de migração de CDs em câmaras de Boyden bem como os ensaios de apresentação de antígenos empregaram as células CD11c+ obtidas pela metodologia acima descrita.

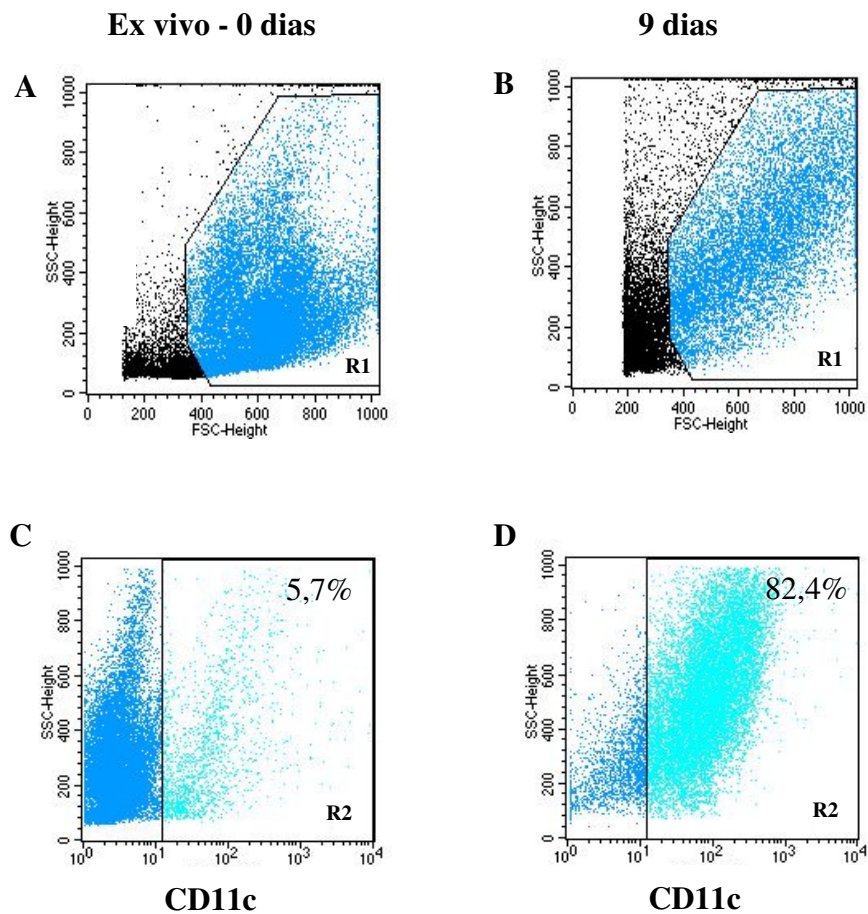


Figura 1. Perfil populacional das células derivadas da medula óssea cultivadas na presença de GM-CSF e IL-4. Células da medula óssea de camundongos C57BL/6 foram cultivadas ($2,5 \times 10^6$ céls /poço) na presença de GM-CSF (30 ng/ml) e IL-4 (10 ng/ml). As células foram colhidas e analisadas por citometria de fluxo nos dias 0 e 9 após diferenciação. A população de células obtida (R1) foi selecionada de acordo com os parâmetros de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) (A e B). A população mostrada em R2 expressa a positividade para CD11c+ entre as células selecionadas na região R1 (C e D). Os controles não relacionados (isotipos controle) definiram o limite entre as populações positiva e negativa para os anticorpos utilizados. Figura representativa de 12 experimentos independentes

4.2 Efeito da saliva de carrapatos *R. sanguineus* sobre a atividade de quimiocinas associadas com a migração de CDs

Já está bem documentada a importância de quimiocinas na migração de células inflamatórias/imunes para o sítio de infecção por diferentes patógenos. Interessantemente, pesquisas recentes vêm mostrando que alguns vírus, bactérias e carrapatos desenvolveram mecanismos para controlar essa migração celular através da produção de moléculas com atividade anti-quimiocinas (HAJNICKÁ *et al.*, 2001; LISTON; MCCOOL, 2003). Sendo assim, questionamos a possibilidade da saliva de carrapatos *R. sanguineus* inibir as propriedades quimioatrativas dessas moléculas.

Utilizando um sistema de migração de células *in vitro* (câmaras de Boyden) verificou-se que a saliva de carrapatos inibiu significativamente e de maneira dose dependente a capacidade de MIP-1 α (CCL3) em atrair CDs. O número de CDs que migraram para o poço inferior da câmara de Boyden foi reduzido à medida que se aumentou a concentração de saliva, conforme demonstrado na figura 2A. A inibição mais significativa ($p < 0,001$) foi atingida com a diluição de saliva a 1:20 (v/v), o que equivale a 6,9 $\mu\text{g/ml}$ de saliva (inibição de 40,8% em comparação ao controle). A inibição menos significativa foi encontrada para a diluição de 1:40 ($p < 0,05$) com uma redução de 16,8%. Quando se adicionou saliva na concentração de 1:10 (v/v), o efeito inibitório da migração foi similar àquele encontrado para a diluição de 1:20 mostrando que o pico de inibição foi atingido quando a concentração da saliva foi 1:20 (v/v).

De forma interessante, independentemente da concentração de saliva adicionada ao compartimento inferior da câmara de Boyden, não houve alteração na migração de CDs em direção a RANTES (CCL5) MIP-1 β , MCP-1, SDF-1 α e MIP-3 β (Figura 2B, C e D).

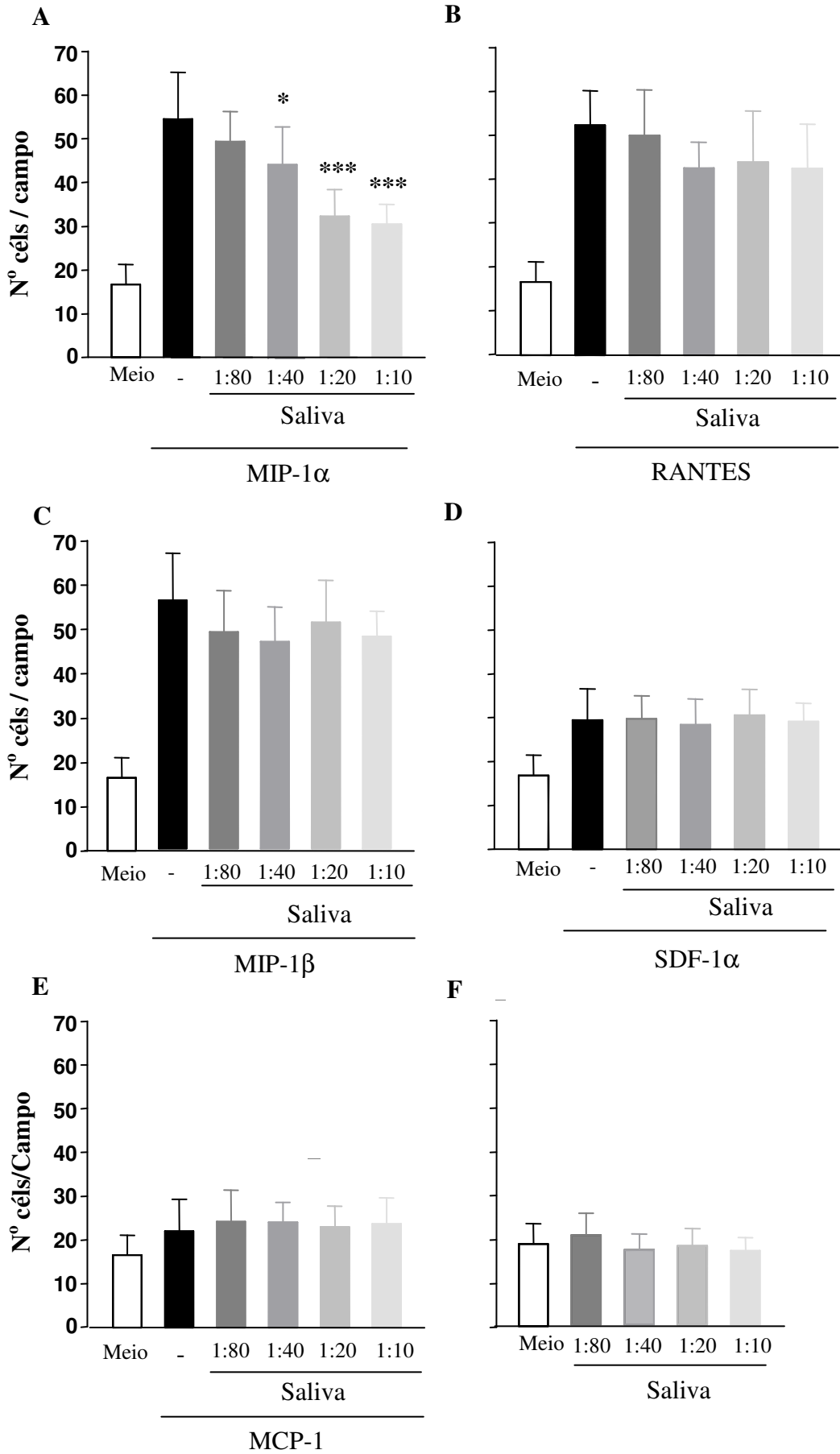
Cabe comentar que durante os ensaios de padronização foram testadas diferentes concentrações de quimiocinas (variando de 10 a 200 ng/ml) e, a concentração de 100 ng/ml

foi a escolhida para os experimentos, pois induziu maior migração das CDs para a maioria das quimiocinas (dados não mostrados). Ademais, a saliva quando adicionada sozinha no compartimento inferior da câmara de migração não exerceu efeito algum sobre a migração das CDs, em nenhuma das concentrações testadas (Figura 2F).

MCP-1 (CCL2) não induziu migração significativa de CDs diferenciadas na presença de GM-CSF e IL-4, independentemente da concentração testada (10 a 200 ng/ml) (dados não mostrados). Essa informação está representada na figura 2E, mostrando que MCP-1, na concentração de 100 ng/ml, induziu um aumento médio de apenas 23,5% na migração de CDs (resultado não significativo).

Por fim, verificou-se a possibilidade da concentração empregada de RANTES e MIP-1 β (100 ng/ml) ter sido muito alta, de forma a impedir que o efeito da saliva fosse observado. Para tal, combinaram-se diferentes concentrações de quimiocinas (10, 50 e 100 ng/ml) com a concentração de saliva que teve maior efeito inibitório para MIP-1 α (1:20 v/v). Os resultados mostraram que independentemente da concentração destas quimiocinas, a saliva não foi capaz de inibir a migração das CDs.

Figura 2. Saliva de carrapatos *R. sanguineus* inibe o efeito quimioatrativo da quimiocina MIP-1 α . CDs da medula óssea diferenciadas com GM-CSF e IL-4 por 9 dias foram recuperadas, lavadas e em seguida dispostas no compartimento superior da câmara de Boyden (1×10^6 células/poço) e permitidas migrarem por 1,5 h. O estímulo para migração utilizado no compartimento inferior da câmara foi MIP-1 α (A) RANTES (B), MIP-1 β (C), SDF-1 α (D) e MCP-1 (E) na presença ou ausência de saliva (todas na concentração de 100 ng/ml). A própria saliva também foi testada quanto ao seu efeito quimiotrativo (F). As barras representam a média \pm SD do número de células migradas por 15 campos (aumento de 1000 X). *: $p < 0,05$ ***: $p < 0,001$ comparadas com células migradas apenas para a quimiocina (A, B, C, D e E) ou meio (RPMI) (F). Esses resultados representam 3 experimentos



4.3 Efeito da pré-incubação das CDs com saliva de carrapatos *R. sanguineus* na migração frente a quimiocinas

Além dos efeitos sobre a função de quimiocinas, muitos patógenos têm mostrado possuir substâncias capazes de alterar a capacidade migratória de CDs frente a um gradiente quimiotático (LISTON; MCCOOL, 2003; SKINNER *et al.*, 2005).

Com o objetivo de avaliar o efeito da pré-incubação das CDs com saliva de carrapatos na migração das mesmas frente a quimiocinas, CDs foram pre-incubadas por 24 e 48 h com saliva, (1:20 v/v), lavadas e dispostas para migrarem em câmara de Boyden. Na porção inferior da câmara foram testados diferentes estímulos quimioatrativos para CDs.

Os resultados demonstraram que, independentemente do tempo de pré-incubação, a saliva de carrapatos *R. sanguineus* inibiu a migração de CDs para MIP-1 α e RANTES, ambas quimiocinas envolvidas no recrutamento de CDs imaturas. CDs incubadas por 24 e 48 h com saliva mostraram uma redução na migração de 68,9 e 58,3% respectivamente, frente a quimiocina MIP-1 α ($P < 0,001$) (Figura 3A e B). Já a migração frente a RANTES foi inibida em 55,3 e 56,5% respectivamente ($p < 0,001$) (Figura 3C e D).

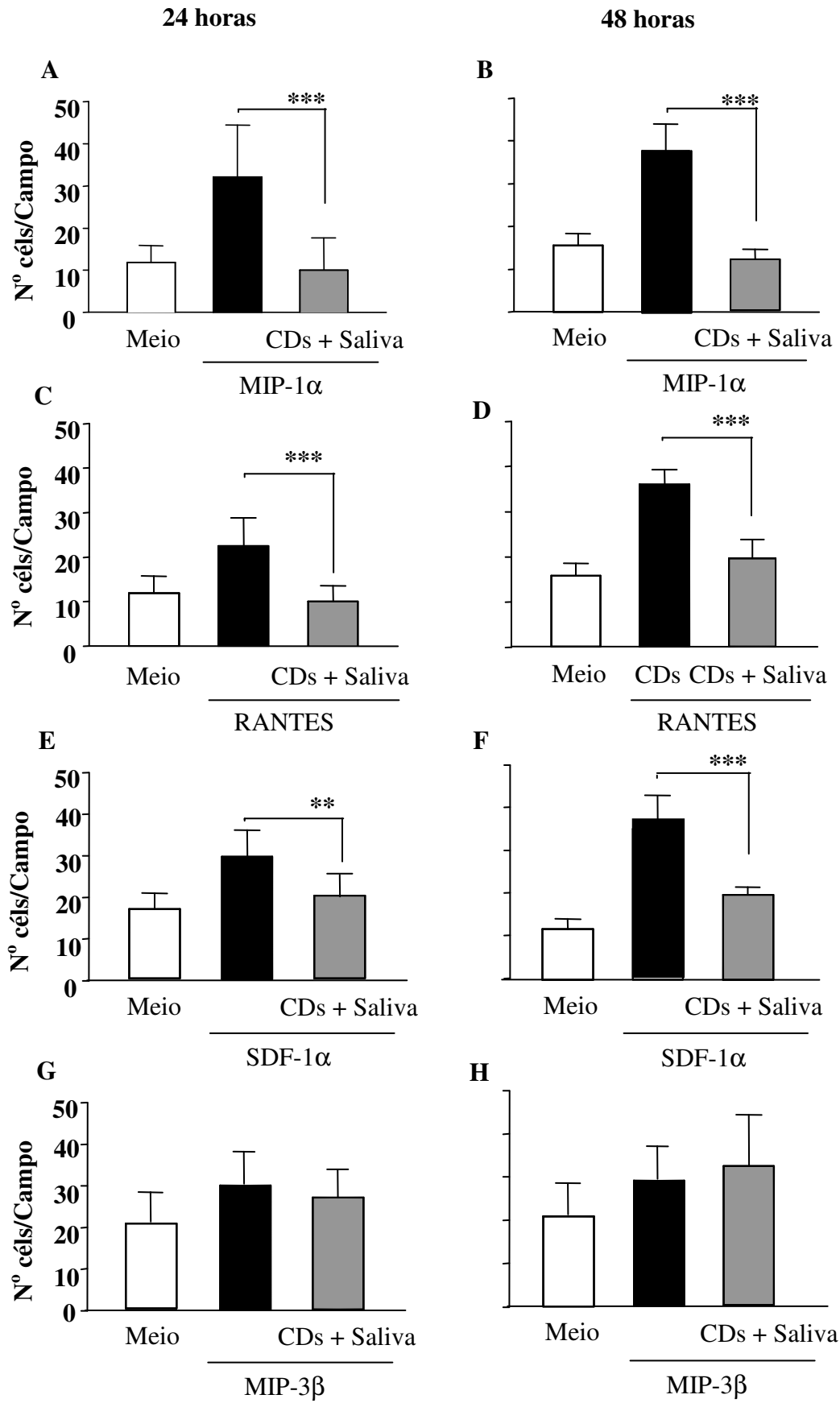
Diversas outras quimiocinas têm sido mostradas relevantes para indução da migração de CDs, como por exemplo, SDF-1 α quimiocina que se liga às CDs via CXCR4, um receptor constitutivo presente tanto em CDs maduras quanto imaturas (DELGADO *et al.*, 1998; VECCHI *et al.*, 1999; VANBERVLIET *et al.*, 2003). Ao testarmos a influência da pré-incubação com saliva na migração induzida por SDF-1 α também verificamos inibição, no entanto o efeito inibitório foi menor para o tempo de pré-incubação de 24 h ($p < 0,01$) (23,3 e 45,1%, para 24 e 48 h de incubação, respectivamente) comparado a inibição de migração frente a MIP-1 α e RANTES (Figura 3E e F).

Quando se testou a migração das CDs frente à MIP-3 β , quimiocina eficiente apenas para CDs maduras, não se verificou migração e a pré-incubação das CDs com saliva não alterou essa tendência (Figura 3G e H).

A inibição da migração de CDs pré-incubadas com saliva não foi devido a um efeito tóxico inespecífico da saliva sobre as células, visto que, por meio de um ensaio de exclusão com azul de trypan, não foi observada diferença significativa entre a porcentagem de células viáveis cultivadas na presença ou ausência de saliva. Num ensaio representativo, a viabilidade das CDs que foram pré-incubadas com saliva por 24 ou 48 h foi de 79,1 e 77,6% respectivamente, enquanto que a CDs que foram incubadas sem saliva foi de 82,9% (resultados não mostrados).

Cabe comentar ainda que a adição de saliva no compartimento superior da câmara de Boyden, imediatamente antes da confecção do ensaio, não alterou a migração das mesmas em direção a nenhuma quimiocina testada (resultados não mostrados).

Figura 3. CDs pré-incubadas com saliva de carrapatos *R. sanguineus* tem reduzida capacidade migratória para MIP-1 α , RANTES e SDF-1 α . CDs diferenciadas da medula óssea com GM-CSF e IL-4 por 9 dias foram incubadas com saliva (1:20) por 24 (A, C, E e G) ou 48 h (B, D, F e H) e lavadas. Em seguida as CDs foram dispostas no compartimento superior da camara de Boyden (1×10^6 células/poço) e permitidas migrarem por 1,5 h em direção ao meio (RPMI), MIP-1 α , RANTES, SDF-1 α ou MIP-3 β (100 ng/ml). As barras representam a média \pm SD do número de células migradas em 15 campos (aumento de 1000 X). **: $p < 0,01$ e ***: $p < 0,001$ comparada com células migradas apenas para meio. Esses resultados representam 3 experimentos independentes.



4.4 Efeito da pré-incubação de CDs com LPS e saliva de carrapatos *R. sanguineus* na migração frente a quimiocina MIP-3 β

Frente a um estímulo patogênico, CDs (com fenótipo imaturo) presentes na pele fagocitam antígenos presentes no sítio da injúria, amadurecem e migram para os órgãos linfóides secundários onde participam da indução da resposta imune específica (SOZZANI *et al.*, 1998). Esse processo de amadurecimento das CDs é acompanhado de uma alteração de expressão de moléculas específicas na superfície celular. Dentre essas, receptores CCR7, que se ligam a MIP-3 β produzido por células nos órgãos linfóides secundários, passam a ter sua expressão aumentada e participam da migração coordenada das CDs para os linfonodos (DIEU *et al.*, 1998)

Como carrapatos permanecem fixos sobre a pele de seus hospedeiros por vários dias para obtenção de seu repasto sangüíneo, e durante esse período inoculam ininterruptamente saliva, questionamos a possibilidade de a saliva estar interferindo com a maturação e migração das CDs maduras para os linfonodos.

Para tanto, células de medula óssea que foram diferenciadas na presença de GM-CSF e IL-4 por 9 dias, foram incubadas por 24 ou 48 h com LPS (200 ng/ml) (eficiente indutor de maturação celular), saliva (1:20 v/v) ou LPS + saliva e colocadas para migrarem em câmara de Boyden. Os resultados mostraram que o amadurecimento das CDs com LPS (por 24 ou 48 h) induziu migração significativa das mesmas em direção a MIP-3 β (Figura 4). Quando comparada a porcentagem de migração entre as células que foram incubadas apenas com LPS ou com LPS + saliva, nenhuma diferença foi observada (Figura 4).

Cabe comentar que a pré-incubação das CDs com saliva não estimulou nem reduziu a migração randômica das mesmas, achado similar ao encontrado usando células pré-incubadas apenas com meio de cultura (Figura 4).

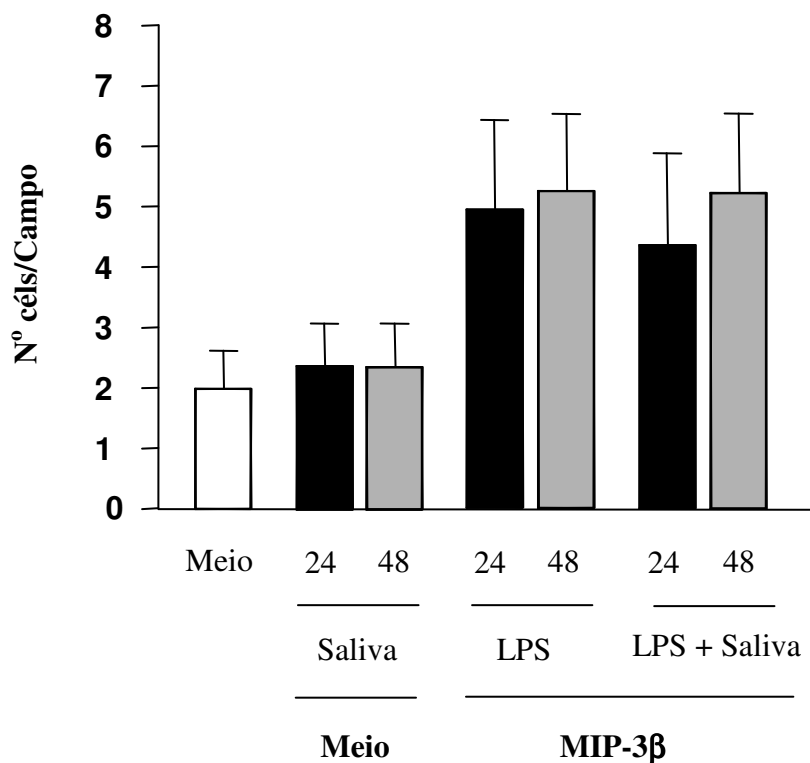


Figura 4. Saliva de carrapatos *R. sanguineus* não altera a migração de DCs maduras para a quimiocina MIP-3β. CD_s diferenciadas da medula óssea com GM-CSF e IL-4 por 9 dias foram incubadas por 24 ou 48 h com LPS (200 ng/ml), LPS + saliva ou saliva (1:20) e lavadas. Em seguida as CD_s foram dispostas na câmara de Boyden (1×10^6 células/poço) e permitidas migrarem por 1,5 h em direção ao meio (RPMI) ou a MIP-3β (100 ng/ml). As barras representam a média \pm SD do número de células migradas em 15 campos (aumento de 1000 X). Esses resultados representam 3 experimentos independentes.

4.5 Efeito da inoculação intradérmica de saliva de carrapatos *R. sanguineus* na migração de CDs da pele para os linfonodos

As células de Langerhans (CDs da pele) possuem papel crítico na iniciação das respostas imunes cutâneas. Estes subtipos de CDs capturam e processam antígenos cutâneos e migram para os linfonodos regionais para apresentar antígenos a linfócitos T/B “naives” (STINGL *et al*, 1993). Seguindo aplicação epicutânea de haptenos, tais como o isotiocianato de fluoresceína (FITC), CDs capturam-nos e podem ser encontradas nos linfonodos drenantes da região dentro de 18-24 h após aplicação (WANG *et al*, 1999).

Sabendo que carrapatos fixados aos seus hospedeiros mantêm um longo contato com essas células, buscamos avaliar se a saliva destes artrópodes tem algum efeito na emigração de CDs da pele para os linfonodos, *in vivo*. Sendo assim, camundongos C57BL/6 foram inoculados intradermicamente com 20 µl PBS, saliva (1:20 v/v) ou LPS (2 µg/ml diluído em PBS) em seis regiões delimitadas do dorso, sendo imediatamente pintados nos mesmos locais com FITC (8 µg/ml). Após 24 h da aplicação, os animais foram sacrificados, seus linfonodos coletados, sendo suas células examinadas por citometria de fluxo. Animais inoculados com LPS e pintados com FITC apresentaram um maior número de CDs (CD11c+FITC+) nos linfonodos, como esperado. Sendo esse aumento de 42.3 % comparado com os animais controles ($p < 0,001$). Já quando foram inoculados com saliva e pintados com FITC não mostraram diferença significativa na população de CDs CD11c+FITC+ que migrou para os linfonodos (Figura 5).

A fim de investigar o efeito da saliva inoculada sobre a capacidade estimulatória e co-estimulatória das CDs migradas para os linfonodos avaliamos intensidade média de expressão das moléculas MHC-II, CD80 e CD86 nas CDs FITC+ presentes nos linfonodos. Os resultados mostraram que a saliva de carrapatos não alterou a expressão das moléculas analisadas nas células migradas (dados não mostrados).

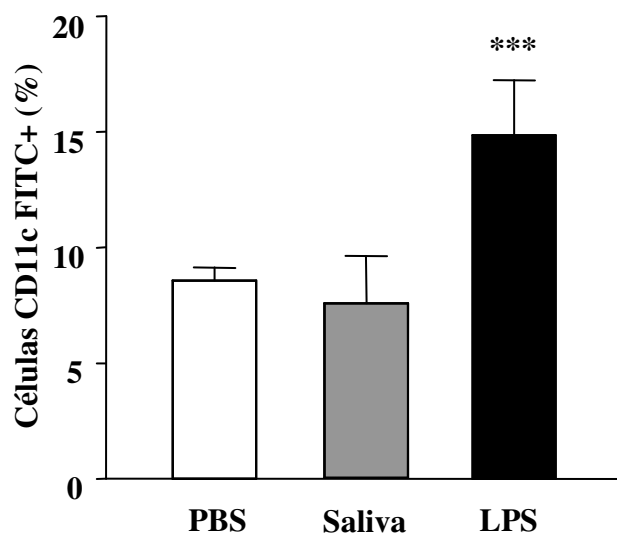


Figura 5. A inoculação intradérmica de saliva de carrapatos *R. sanguineus* não altera a migração de CDs induzida por sensibilização com FITC. Camundongos C57Bl/6 foram inoculados intradermicamente com 20 μ l de PBS, saliva (1:20 v/v) ou LPS (2 μ g/ml em PBS) em seis regiões delimitadas do dorso sendo imediatamente pintados com FITC topicamente (15 μ l/área). após 24 h à aplicação, os animais foram sacrificados, seus linfonodos drenantes coletados, sendo suas células analisadas por citometria de fluxo. As barras representam a média \pm SD da porcentagem de células dendríticas CD11c+ FITC+ migradas para os linfonodos. ***: $p < 0,001$ comparada com células migradas apenas para PBS (animais controle). Esses resultados representam 3 experimentos independentes.

4.6 Efeito da incubação das CDs com saliva de carrapatos *R. sanguineus* sobre a expressão de moléculas de superfície *in vitro*

Uma vez observado que saliva inibiu diretamente a atividade da quimiocina MIP-1 α e reduziu a migração de CDs pré-incubadas frente às quimiocinas MIP-1 α , RANTES e SDF-1 α questionou-se o efeito da saliva sobre a expressão de moléculas estimulatórias, co-estimulatórias e de adesão celular nas CDs. O conhecimento do padrão de expressão dessas moléculas nos ajudará a entender melhor os mecanismos utilizados por carrapatos para modular a capacidade das CDs migradas em apresentarem antígenos.

Procurando analisar se saliva de carrapatos possui algum efeito sobre a expressão de moléculas estimulatórias (MHC-II), co-estimulatórias (CD40, CD80 e CD86) e de adesão (CD54), células da medula óssea foram diferenciadas com GM-CSF e IL-4 por 9 dias, incubadas com ou sem saliva por 24 h, sendo as 3 h finais na presença de KLH (10 μ g/ml). Após esse período, as células foram coletadas e analisadas por citometria de fluxo. A população de células foi primeiramente selecionada de acordo com os parâmetros de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC), e em seguida selecionada a população CD11c+, sendo analisada a expressão das moléculas co-estimulatórias (CD40, CD80 e CD86), estimulatórias (MHC-II) e de adesão (CD54).

Embora não significativo do ponto de vista estatístico, adição de KLH nas culturas de CDs induziu um pequeno aumento na expressão de moléculas co-estimulatórias CD80 e CD86. Quando adicionada saliva nessa cultura houve uma redução significativa dessas mesmas moléculas, sendo a redução de 67,10 e 56,54% para as moléculas CD80 e CD86 respectivamente ($p < 0,05$) (Figura 6). Não se observou alteração na expressão das moléculas MHC-II, CD54 e CD40 entre os grupos analisados (Figura 6).

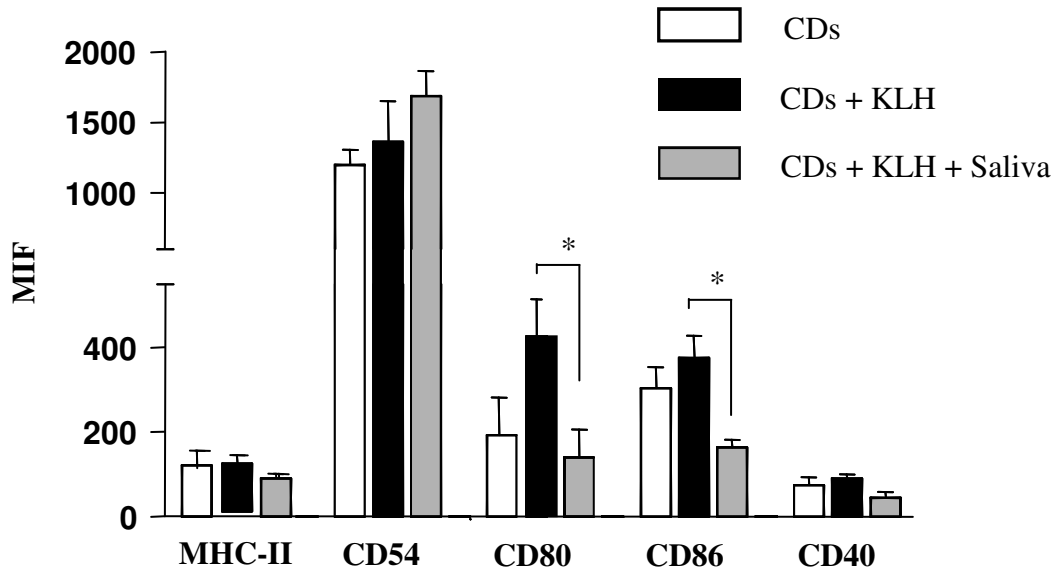


Figura 6. Saliva de carrapatos *R. sanguineus* inibe a expressão das moléculas co-estimulatórias CD80 e CD86 em CDs estimuladas com KLH. CDs diferenciadas da medula óssea com GM-CSF e IL-4 por 9 dias foram incubadas por 24 h com ou sem saliva (1:20) e pulsadas com KLH (10 μ g/ml) nas últimas 3 horas. Essas células foram colhidas, lavadas, marcadas com os anticorpos monoclonais específicos e analisadas por citometria de fluxo. A população de células de interesse foi selecionada primeiramente de acordo com os parâmetros de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) e, em seguida selecionada a população CD11c+ para avaliação da MIF das moléculas de superfície MHCII, CD54, CD80, CD86 e CD40 nos respectivos tratamentos (CDs, CDs + KLH (10 μ g/ml) e CDs + KLH + Saliva 1/20 v/v). As barras representam a média \pm SD da intensidade de fluorescência (MIF) *: $p < 0,05$ comparada com CDs cultivadas somente com KLH. Esses resultados representam 3 experimentos independentes.

4.7 Efeito da saliva de carrapatos *R. sanguineus* sobre a capacidade de CDs em apresentar antígenos e induzir a produção de citocinas por células T

Existe uma interação complexa e bidirecional entre CDs e células T que determina a natureza da resposta imune com que células T ativadas subsequentemente montam. No contexto dos linfócitos TCD4+ essa resposta é caracterizada pela proliferação e inerente produção de citocinas que caracterizam um padrão Th1 ou Th2 de resposta imune (PEARCE *et al.*, 2006). Com o intuito de verificar o efeito da saliva sobre a capacidade de CDs apresentarem antígenos e induzirem ativação de linfócitos, CDs derivadas da medula óssea de camundongos foram cultivadas na presença ou ausência de saliva, pulsadas com antígeno específico e inoculadas em camundongos. Após 6 dias de inoculação os animais foram sacrificados e os linfonodos poplíteos drenantes coletados e cultivados por 72 h na presença de KLH (10 µg/ml) para a avaliação da proliferação celular ou por 48 h para a coleta de sobrenadantes dosagem de citocinas por ELISA.

Como mostrado na figura 7, a exposição de CDs a saliva, seguida de estimulação com KLH não alterou a capacidade das mesmas em induzirem células T antígeno-específicas. A proliferação das células T específicas em resposta ao KLH foi mais evidente quando usado 10 µg/ml de KLH ($p < 0,001$ comparado com células incubadas somente com o meio). Cabe comentar que a estimulação com um antígeno não correlacionado (ovoalbumina) não induziu proliferação.

O estudo funcional revelou ainda que, apesar de serem capazes de proliferar, as células T que foram pré-sensibilizados por CDs cultivadas na presença de saliva perderam a capacidade de produzir IFN- γ e TGF- β quando re-estimuladas com KLH. Enquanto ainda foram capazes de produzir IL-10, muito embora em concentrações significativamente inferiores às produzidas por células T pré-sensibilizados na ausência de saliva (Figura 8). A produção de IL-4 foi igual e baixa em ambos os grupos experimentais (dados não mostrados).

Linfócitos que foram pré-sensibilizados por CDs cultivadas na ausência de KLH e saliva não mostraram proliferação antígeno-específica nem produziram de citocinas (dados não mostrados).

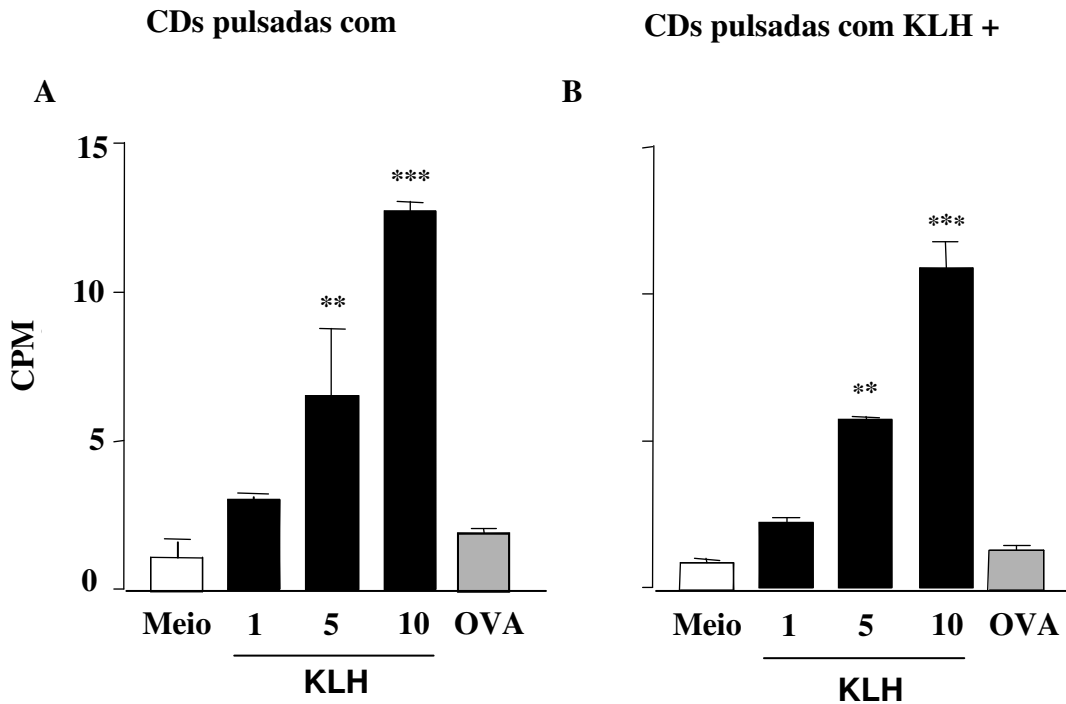


Figura 7. CDs pulsadas com KLH na presença de saliva de carrapatos *R. sanguineus* quando transferidas para camundongos singênicos são capazes de pré-sensibilizar células T específicas para KLH. CDs diferenciadas da medula óssea com GM-CSF e IL-4 por 9 dias foram incubadas por 24 h com ou sem saliva (1:20) e subsequentemente pulsadas com KLH (10 µg/ml) por 3 h. Essas células foram lavadas e inoculadas no coxim plantar de camundongos (2.5×10^5 / Coxim plantar). Após seis dias, os camundongos foram sacrificados e seus linfonodos poplíteos coletados e suas células cultivadas por 72 h com ou sem KLH (1, 5 e 10 µg/ml) ou com um antígeno não relacionado (OVA, 10 µg/ml). A proliferação celular foi avaliada pela incorporação de methyl-[3H]-timidina. (A) DCs cultivadas apenas com KLH (B); CDs cultivadas com KLH mais saliva. As barras representam a média \pm SD de culturas realizadas em triplicatas. **: $p < 0,01$ e ***: $p < 0,001$ comparada com células cultivadas somente com meio.

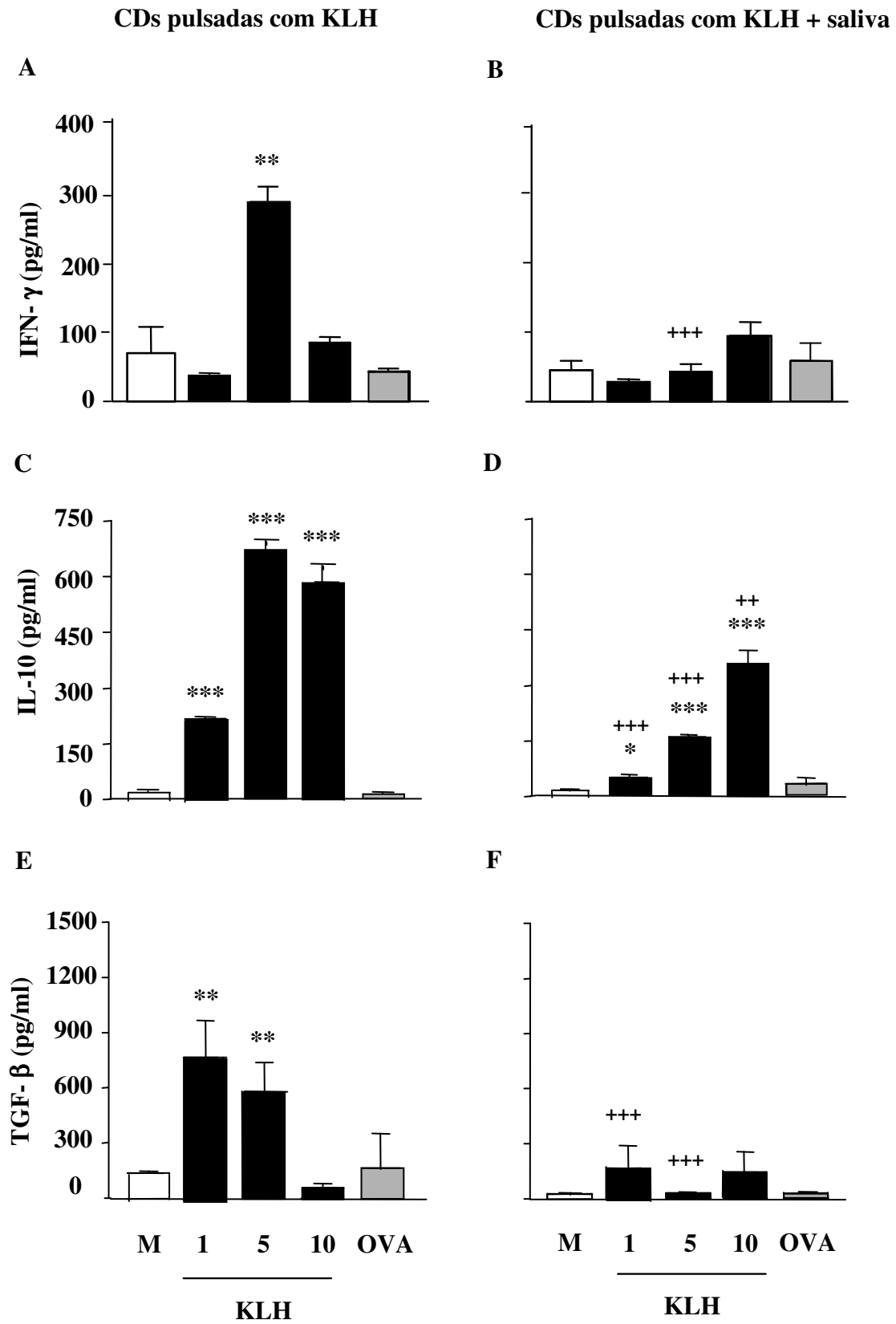


Figura 8. CDs pulsadas com KLH na presença de saliva de carrapatos *R. sanguineus* quando transferidas para camundongos singênicos são capazes de inibir a produção de citocinas em células T específicas para KLH. CDs derivadas da medula óssea de camundongos foram cultivadas por nove dias e subsequentemente pulsadas com KLH (10 µg/ml) na presença ou ausência de saliva (1:20) e inoculadas no coxim plantar de camundongos. Após seis dias, os camundongos foram sacrificados e seus linfonodos poplíteos coletados e suas células cultivadas por 48 h com ou sem KLH (1, 5 e 10 µg/ml), ou com um antígeno não relacionado (OVA, 10 µg/ml). Os sobrenadantes das culturas foram coletados e analisados para detecção de IFN- γ (A e B), IL-10 (C e D) e TGF- β (E e F) por ELISA. As barras representam a média \pm SD de culturas realizadas em duplicatas (produção de citocinas). *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$ e ***: $p < 0,001$ comparadas com CDs cultivadas somente com meio (M). ++: $p < 0,01$ e +++: $p < 0,001$ comparada com CDs cultivadas e pulsadas com KLH (M).

5. Discussão

O carrapato *Rhipicephalus sanguineus*, parasita habitual de cães, mas também de outros animais domésticos, animais silvestres e do homem, possui relevante importância na medicina humana e veterinária do Brasil. Este ectoparasito hematófago espolia seu hospedeiro, veicula agentes de doenças infecciosas, incluindo algumas zoonoses e causa prejuízos econômicos variados (FREITAS *et al.*, 1978; DUMLER; BAKKEN, 1998). Apesar de sua importância, é surpreendente a escassez de informações sobre esses carrapatos, particularmente no que se refere à soma dos prejuízos econômicos no Brasil e no mundo, às doenças transmitidas e os mecanismos imunes implicados na sua relação com os seus hospedeiros.

Recentemente tem-se identificado diversas atividades anti-hemostáticas, imunossupressoras e anti-inflamatórias na saliva de carrapatos. Dentre estas atividades podemos mencionar: redução da proliferação e função de linfócitos T, supressão e desvio da produção e ação de citocinas, diminuição da resposta de anticorpos, clivagem enzimática de imunoglobulinas, inibição da função de macrófagos e de células NK, contenção de mediadores essenciais para a promoção de prurido e dor, e bloqueio da ativação do sistema complemento (RIBEIRO *et al.*, 1985; 1990; KOPECKY; KUTHJLOVA, 1998; RIBEIRO; SPIELMAN, 1986; RIBEIRO, 1987; RAMACHANDRA; WIKEL, 1992; 1995; FERREIRA; SILVA, 1998; URIOSTE *et al.*, 1994; KOVAR, 2004).

Com relação ao envolvimento de CDs na resposta de hospedeiros a carrapatos existem poucos trabalhos publicados até o momento, sendo os últimos da década de 1980. Foi sugerido que há migração de CDs da pele para os linfonodos após a infestação com carrapatos *Dermacentor andersoni*, e que a presença dessas células nos linfonodos é um evento fundamental para que o hospedeiro desenvolva resistência a carrapatos (ALLEN *et al.*, 1979; NITHIUTHAI; ALLEN, 1984a,b; 1985). No entanto, na época em que esses trabalhos foram

realizados ainda não se dispunha de técnicas mais específicas que pudessem identificar os fatores envolvidos na migração das CDs para os órgãos linfóides secundários.

As CDs são potentes apresentadoras de antígenos e caso sejam moduladas, em alguma fase da sua biologia natural (diferenciação, maturação e migração), podem sofrer grandes alterações na sua capacidade de ativar linfócitos T *naive* e de montar uma resposta imune adquirida.

O presente trabalho buscou elucidar o efeito da saliva de carrapatos na migração e função de CDs, etapas decisivas para a indução de uma efetiva estimulação de linfócitos T e desencadeamento da resposta imune adquirida.

Primeiramente foi avaliado o efeito da saliva de carrapatos *R. sanguineus* sobre a atividade de quimiocinas envolvidas na migração de CDs. Nossos resultados mostraram que a saliva inibiu a quimiotaxia de CDs induzida por MIP-1 α de maneira dose-dependente. Por outro lado, nenhuma diferença foi observada sobre a atividade das quimiocinas RANTES, MIP-1 β , SDF-1 α e MIP-3 β .

A inibição de migração das CDs para MIP-1 α poderia ser explicada por uma ação direta sobre a quimiocina ou por competição pelo receptor de MIP-1 α na superfície celular. Essa segunda possibilidade foi descartada, pois verificamos que a adição de saliva no compartimento superior da câmara de migração não alterou a mobilidade das CDs frente aos diferentes estímulos quimiotáticos. Sendo assim, sugerimos que a saliva de carrapatos tenha alguma molécula que ocupe o sítio de interação da quimiocina MIP-1 α , impedindo que ela se ligue ao seu receptor, e desta forma compromete sua atividade.

Dado a importância da quimiocina MIP-1 α na resposta imune não é surpreendente que carrapatos tenham desenvolvido mecanismos para contê-la. MIP-1 α é quimiotático tanto para neutrófilos quanto para fagócitos mononucleares e linfócitos T (WOLPE *et al.*, 1988;

STANDIFORD *et al.*, 1993; TAUB *et al.*, 1993). Somando-se a isso, MIP-1 α é uma quimiocina que promove a diferenciação de células T para um fenótipo Th1 de resposta imune e conseqüentemente há regulação dos receptores específicos para esse padrão (KARPUS *et al.* 1997). Sendo assim, a inibição da atividade dessa molécula pode ser um dos prováveis mecanismos por onde carrapatos podem se esquivar de uma resposta imune eficaz no sítio de fixação.

Resultados similares para a inibição de MIP-1 α e outras quimiocinas têm sido encontrados para vários outros patógenos. Como por exemplo, podemos citar o herpes vírus, para o qual já foi descrita uma proteína ligante das quimiocinas MIP-1 α , RANTES, MCP-1 (VAN BERKEL *et al.*, 2000), e o poxvírus, que produz duas proteínas que interagem com quimiocinas específicas, sendo que uma delas é MIP-1 α (LALANI; MCFADDEN, 1997).

Seria de grande interesse isolar essas moléculas com propriedades inibitórias, pois poderíamos ter em mãos uma potente molécula capaz de suprimir o recrutamento de leucócitos em diversas doenças autoimunes ou alo-enxertos. Um exemplo marcante que contribui para essa idéia é o caso da confecção de uma série de oligopeptídios que atuam como inibidores funcionais de quimiocinas (RECKLESS; GRAINGER, 1999). Um desses oligopeptídios (NR58-3.14.3), que já está sendo testado em modelos *in vivo*, tem amplo espectro e pode atuar sobre diferentes quimiocinas, incluindo MIP-1 α , MCP-1, IL-8, SDF-1 α e RANTES (RECKLESS *et al.*, 2001).

Com relação à presença de substâncias com atividade anti-quimiocinas em carrapatos, apenas uma proteína presente na saliva das espécies *Dermacentor reticulatus*, *Rhipicephalus appendiculatus*, *Haemophysalis inermis*, *Amblyomma variegatum* e *Ixodes ricinus* foi descrita (KOCAKOVA *et al.*, 2003). Hajnická *et al.* (2001) descreveram esta como sendo uma molécula com atividade anti-IL-8, quimiocina muito importante para a migração de

neutrófilos. A presença de atividade anti-IL-8 na saliva de carrapatos indica que neutrófilos podem ter papel importante na resposta imune ao parasitismo por este artrópode.

No presente estudo observamos que apenas a atividade de MIP-1 α foi inibida pela saliva de carrapatos, mas não podemos descartar o envolvimento da saliva sobre atividade de outras quimiocinas não avaliadas. Neste sentido, ainda é necessária a realização de estudos adicionais para melhor definir a extensão e os mecanismos pelos quais a saliva de carrapatos modula a atividade das quimiocinas durante a resposta imune.

Uma vez constatado que a saliva inibiu a atividade funcional da quimiocina MIP-1 α investigamos também o possível efeito da saliva sobre a capacidade migratória de CDs imaturas e maduras.

A escolha das quimiocinas usadas para esses experimentos baseou-se em relatos da literatura que mostraram que CDs imaturas, como a que empregamos neste estudo, expressam receptores tais como CCR1, CCR3, CCR5, e CXCR4 em suas membranas e dessa forma respondem a quimiocinas produzidas por células nos tecidos inflamados tais como MIP-1 α , RANTES e MCP-1, ou quimiocinas produzidas constitutivamente como o SDF-1 α (SALLUSTO *et al.*, 1998; OGATA *et al.*, 1999; VECCHI *et al.*, 1999; YAMAZAKI *et al.*, 1998).

Nossos resultados mostraram que CDs pré-incubadas com saliva por 24 ou 48 horas tiveram uma redução significativa na migração de CDs em direção as quimiocinas MIP-1 α , RANTES e SDF-1 α . A inibição foi tal, que a porcentagem de células migradas chegou a patamares similares àquela observada para as CDs migradas sem estímulo (quimioquese). A adição de saliva junto às CDs no compartimento superior da câmara de Boyden imediatamente antes do início do ensaio não exerceu qualquer efeito sobre a migração das mesmas, sugerindo que os mecanismos modulados pela saliva somente são evidenciados

quando ocorre um contato mais prolongado, como visto com a pré-incubação com saliva por 24 e 48 horas.

Entre as principais explicações para justificar esta inibição podemos mencionar bloqueio, dessensibilização, internalização e inibição da expressão de receptores de superfície para quimiocinas. A modulação da produção, atividade ou expressão de receptores é um mecanismo comumente empregado por vários microorganismos para escapar da resposta imune (LISTON; MCCOOL, 2003). Por exemplo, o contato de CDs com fatores solúveis de *Helicobacter pylori*, *Bordetella pertussis* ou *Clostridium difficile* resulta na regulação dos fatores de transcrição NF- κ B and AP-1, que estão relacionados com a expressão de quimiocinas e de seus receptores (BELCHER *et al*, 2000; YAMADA *et al*, 2001). CDs derivadas de monócitos infectados com citomegalovírus humano têm diminuída migração para tecidos periféricos graças a um aumento da internalização dos receptores CCR1 e CCR5 de superfície, essenciais para a migração para quimiocinas (MURAYAMA *et al.*, 1997). O herpesvírus (HSV-1) inibiu a maturação das CDs, afetando sua capacidade de migrar para diferentes quimiocinas (SALIO *et al.*, 1999). Aliberti *et al.* (2002), demonstraram que inoculação de um extrato de *Toxoplasma Gondii* em camundongos induz a produção de lipoxina A₄, que está associada a supressão da produção de IL-12, redução da expressão de receptores CCR5 e marcada diminuição do número de CDs no baço.

Partindo do princípio que a saliva de carrapatos pode difundir-se, ou ainda, que seus componentes podem ser carregados para órgãos distantes do local de inoculação (KAUFMAN, 1989; SAUER *et al.*, 1995) podemos sugerir que o re-povoamento de CDs no sítio de fixação dos carrapatos poderia estar comprometido devido a ação inibitória da saliva durante uma infestação natural. Esse dado corrobora outros estudos que demonstraram que a saliva de carrapatos inibe a diferenciação de células precursoras em CDs, o que provavelmente resulta em menor número de CDs na pele, onde o carrapato está fixado (CAVASSANI *et al.*, 2005).

Adicionalmente, foi descrito que o número de células de Langerhans está reduzido durante a primeira infestação com carrapatos e aumentado durante o início da segunda infestação, quando a resistência é evidente (NITHIUTHAI; ALLEN, 1984a).

Após a captura de antígenos, as CDs se tornam maduras e perdem a capacidade migratória em direção a quimiocinas relacionadas com a migração de CDs imaturas devido a regulação negativa ou dessensibilização do receptor. Em seguida adquirem responsividade para MIP-3 β e 6CKine, quimiocinas envolvidas na migração de CDs para órgãos linfóides, via um aumento de expressão de CCR7 em sua membrana celular (SOZZANI *et al.*, 1997; SALLUSTO *et al.*, 1998; DIEU *et al.*, 1998; HIRAO *et al.*, 2000 *et al.*, 2000).

Supondo que antígenos presentes na saliva poderiam ter amadurecido as CDs, de forma a aumentar ou modular a expressão do receptor CCR7 investigou-se o efeito da pré-incubação de CDs com saliva sobre a migração frente a MIP-3 β . Nossos achados demonstraram que a saliva de carrapatos não alterou a migração de CDs em direção a essa quimiocina, refutando a idéia inicial. Sugerimos então que talvez fosse necessário induzir a maturação das CDs e somente depois verificar o efeito da saliva sobre a migração, etapa que foi conduzida posteriormente. Quando amadurecidas por estimulação com LPS, as CDs foram capazes de migrar em direção a MIP-3 β na mesma proporção que CDs incubadas com LPS na presença de saliva, sugerindo que a saliva não altera a migração destas para os linfonodos. Como era de se esperar, foi observado que após maturação estimulada por LPS, CDs perdem responsividade para MIP-1 α e RANTES, evento que também foi evidenciado após maturação de CDs estimulada por LPS na presença de saliva.

Importante lembrar que havíamos visto anteriormente que a incubação com saliva inibia a migração de CDs imaturas frente a SDF-1 α e que isso poderia contribuir para a diminuição do re-povoamento de CDs na periferia. Levando em conta que esta quimiocina atua via CXCR4, receptor expresso de forma constitutiva tanto em CDs imaturas quanto em

maduras, podemos sugerir que a saliva estaria inibindo também a chegada de CDs nos tecidos linfóides secundários. Ao nosso entender, esse efeito não teria grande importância se nos referirmos a migração de CDs para os órgãos linfóides secundários, uma vez que a chegada de CDs nesses locais se dá principalmente pela ligação das quimiocinas MIP-3 β e 6CKine a receptores CCR7 (SOZZANI *et al.*, 1997; SALLUSTO *et al.*, 1998; HIRAO *et al.*, 2000). Experimentos estão sendo realizados para testar essa possibilidade.

Diversos trabalhos na literatura vêm a confirmar que CCR7 é o principal receptor envolvido na migração de CDs maduras. CDs derivadas de medula óssea que foram incubadas com *Salmonella typhimurium*, LPS, TNF e CD40L tiveram um aumento na migração em direção a MIP-3 β e 6CKine, resultado de uma “up-regulation” na expressão de CCR7 (CHEMINAY *et al.*, 2002; SAEKI *et al.*, 1999; SOZZANI *et al.*, 1998; YANAGIHARA *et al.*). Chen *et al.*, (2005) mostraram que a resposta quimiotática para MIP-3 β de CDs estimuladas com LPS foi prejudicada pelo tratamento com triptolide (constituente de uma planta da família Celastraceae muito utilizada na medicina chinesa), como consequência da regulação negativa do receptor CCR7.

A fim de confirmar os resultados de migração obtidos *in vitro* foi avaliado o efeito da inoculação intradérmica de saliva sobre a migração de CDs para os linfonodos. Os resultados mostraram que a inoculação de saliva de carrapatos na pele em conjunto com a aplicação tópica de FITC não conduz a nenhuma alteração da migração de CDs CD11c+ FITC+ da pele para os linfonodos drenantes. Esses resultados reforçam os resultados encontrados *in vitro*, que mostraram que nenhuma diferença foi encontrada para a migração frente à MIP-3 β , quimiocina que está relacionada à migração de CDs para os linfonodos.

Sabendo que há envolvimento da resposta imune adquirida a infestações com carrapatos (TRAGER, 1939; WILLADSEN, 1980; MEJRI, *et al.*, 2002) e que para que isso aconteça é preciso que CDs migrem para órgãos linfóides secundários, incluindo linfonodos,

não é de surpreender que a saliva de carrapatos não interfira na migração *in vitro* ou *in vivo* de CDs para estes locais. Como será discutido posteriormente, nos experimentos de apresentação de antígenos, CDs pré-incubadas com saliva de carrapatos *R. sanguineus* são capazes, efetivamente, de induzir uma resposta imune com envolvimento de linfócitos T antígeno-específicos.

Diferentemente dos resultados para saliva de carrapatos, outros patógenos têm capacidade de modular negativamente a capacidade migratória de CDs maduras. *Leishmania major* possui substâncias secretadas ou de parede celular (lipofosfoglicano) que inibem a migração de CDs frente a diferentes estímulos (LPS e TNF- α) (PONTE-SUCRE *et al.*, 2001; ARGELI *et al.*, 2001). Larvas do parasito *Schistosoma mansoni* também liberam prostaglandina D₂ capaz de inibir a migração de CDs maduras (VAN DER KLEIJ *et al.*, 2002).

Ainda são poucos os dados existentes na literatura a respeito da influencia da saliva de carrapatos sobre a migração de CDs para os órgãos linfóides secundários. Nesse estudo, tanto para os ensaios de migração *in vitro* como *in vivo*, saliva não exerceu qualquer efeito sobre a migração dessas células para os linfonodos. É provável a modulação da migração de CDs para órgãos linfóides secundários não seja um fator preponderante para a determinação da resistência a carrapatos.

Uma vez que a apresentação de antígenos e ativação de resposta imune por linfócitos T está intrinsecamente relacionada com as mudanças morfológicas e funcionais das CDs, investigamos o efeito da saliva sobre a expressão de moléculas estimulatórias (MHC-II), coestimulatórias (CD40, CD80 e CD86) e de adesão (CD54) nessas células.

Nossos achados mostraram que CDs pulsadas com o antígeno KLH na presença de saliva têm uma redução significativa na expressão de CD80 e CD86. Nenhuma diferença foi encontrada na expressão de MHC-II, CD40 e CD54.

Similarmente, Cavassani *et al.* (2005) demonstraram que diferenciação de células da medula óssea em CDs na presença de saliva de carrapatos *R. sanguineus* também reduz a expressão de moléculas CD80 e CD86. Adicionalmente, o mesmo trabalho mostra ainda que a saliva altera o padrão de maturação de CDs induzido por LPS, por inibir a expressão de CD40 e CD86. Tomados em conjunto, esses dados indicam que a saliva de carrapatos modula a expressão dessas moléculas de superfície desde a diferenciação até a sua maturação.

Algumas infecções persistentes tais como aquelas de herpesvírus, citomegalovírus, *Plasmodium falciparum* e *Trypanosoma cruzi* também inibem a maturação e expressão de moléculas em CDs, diminuindo a eficiência da resposta imune do hospedeiro (SALIO *et al.*, 1999; ANDREWS *et al.*, 2001; URBAN *et al.*, 1999; CHAUSSABEL *et al.*, 2003). Diferentemente, CDs imaturas incubadas com ovos de *Schistosoma mansoni*, mostraram aumentada a expressão de MHC-II, embora a expressão de CD80 e CD86 permanecesse inalterada. Por outro lado, CDs expostas ao *Propionebacterium acnes* induzem um aumento de CD40, CD54, CD80 CD86 e OX40L (MACDONALD *et al.*, 2001).

De forma simplista, a ativação de linfócitos T por células apresentadoras de antígenos, incluindo CDs, é dependente de 3 sinais: (1) o nível de complexos MHC/ peptídeo capaz de iniciar a transdução de sinal intracelular; (2) o nível de moléculas co-estimulatórias que amplificam o processo de sinalização; e (3) a estabilidade da ligação e sinapse imunológica, as quais determinam a duração do processo de sinalização.

A presença do sinal 1 na ausência do sinal 2 leva para a anergia ou apoptose dos linfócitos T (LI *et al.*, 1999; APPLEMAN; BOUSSIOTIS, 2003; KOENEN *et al.*, 2005). Um exemplo disso é a ligação das moléculas CD80 e CD86 às moléculas de CD28 nos linfócitos T, pois só essa ligação é capaz de amplificar em até 100 vezes o processo de sinalização iniciado pela ligação MHC-TCR. Em situações onde há ausência ou inibição de co-

estimulação, as células T “naive” somente podem ser ativadas com altas doses de antígeno e/ou prolongada estimulação (LANZAVECCHIA; SALLUSTO, 2001).

Levando em consideração o acima exposto, apesar da saliva não ter alterado a expressão de MHC-II, CD54 e CD40, ela reduziu a expressão das moléculas co-estimulatórias CD80 e CD86, fato que pode ser correlacionado com uma apresentação de antígenos deficiente.

Procurando avaliar se a redução de moléculas co-estimulatórias nas CDs pré-incubadas com saliva poderia comprometer a capacidade das mesmas em sensibilizarem células T *naive in vivo*, CDs CD11c+ foram incubadas com saliva, pulsadas com hemocianina (KLH) e inoculadas em camundongos, sendo estes sacrificados após 5-6 dias para determinação da ativação imune específica das células dos linfonodos.

Os resultados mostraram que apesar da saliva não inibir as CDs a induzirem uma proliferação de células T específicas ao antígeno KLH (sensibilização de células T *naive*), a produção de IFN- γ e TGF- β por essas células foi praticamente extinguida, enquanto que a síntese de IL-10 mostrou-se significativamente menor que a observada para camundongos que receberam CDs pulsadas com KLH sem saliva. Linfócitos com estas características podem ser enquadrados num estágio semelhante ao de anergia celular.

Anergia celular é definida como a ocorrência de tolerância imunológica devido a não responsividade de células T a antígenos específicos (SCHWARTZ, 1996). Esse estado, além de ser induzido por falta de co-estimulação, pode ser determinado também por células T sensibilizadas na presença de antígenos em excesso, assim como por certos antígenos específicos (ZHENG *et al.*, 2004). Interessantemente, foi mostrado que o bloqueio simultâneo da interação CD40- CD40L, CD80/CD86 – CD28 durante ativação alogênica induz anergia de células T alo-antígeno-específicas, com reduzida produção de diversas citocinas, incluindo IFN- γ , IL-4 e TGF- β , e aumentada produção de IL-10 (VAN GOOL *et al.*, 1999).

Esses achados são muito interessantes, pois CDs incubadas na presença de saliva foram incapazes de polarizar células T para um padrão específico (Th1 ou Th2) de resposta imune. Isso está de acordo com os resultados anteriores mostrando que a saliva reduziu expressão das moléculas co-estimulatórias CD80 e CD86, visto que em alguns trabalhos têm mostrado que a interação das CDs com linfócitos T na ausência de co-estimulação pode levar ativação deficiente ou até mesmo anergia celular (SCHWARTZ, 1990; FREEMAN *et al.*, 1995; KUCHROO, *et al.*, 1995 revisto por MELLMAN; STEINMAN, 2001; STEINMAN; NUSSENZWEIG, 2002; TAYLOR, *et al.*, 2002).

O atual estudo mostrou que a saliva de carrapatos *R. sanguineus*, além de inibir a quimiotaxia de CDs imaturas, altera a capacidade de CDs em estimular adequadamente células T *naive*. Esses resultados sugerem que durante a infestação por carrapatos poderia haver redução da reposição das CDs, bem como a formação do infiltrado inflamatório na periferia, comprometendo o desenvolvimento da resposta imune inata e adquirida aos carrapatos e aos diversos patógenos por estes transmitidos.

Assim, esse trabalho fornece informações para um melhor entendimento de um provável mecanismo por onde substâncias presentes na saliva de carrapatos, e em especial da espécie *R. sanguineus*, suprime a resposta imune dos seus hospedeiros. Cabe ressaltar que esses resultados indicam a necessidade de pesquisas que identifiquem as moléculas responsáveis pela diminuída propriedade migratória e prejudicada função das CDs presentes na saliva de carrapatos. Tais estudos podem levar ao desenvolvimento de uma série de imunoterapias que podem ser empregadas no combate a infestação de carrapatos ou até mesmo de outras doenças onde a resposta imune esteja exacerbada, como por exemplo, doenças autoimunes e rejeição a enxertos.

6. Conclusão

Nossos resultados permitem concluir que:

- A saliva de carrapatos *R. sanguineus* inibe especificamente e de maneira dose dependente a função quimiotática de MIP-1 α (CCL3) em atrair células dendríticas (CDs), enquanto nenhuma alteração é observada sobre a atividade das quimiocinas RANTES, MIP-1 β , MCP-1 SDF-1 α e MIP-3 β .
- CDs incubadas com saliva de carrapatos mostram reduzida capacidade migratória para quimiocinas envolvidas no recrutamento de CDs imaturas MIP-1 α (CCL3), RANTES (CCL5) e SDF-1 α (CXCL12). Por outro lado, a saliva não altera a migração de CDs maduras em direção a quimiocina MIP-3 β .
- A inoculação de saliva de carrapatos na pele em conjunto com aplicação tópica de isotiocianato de fluoresceína (FITC) não altera a migração de CDs CD11c+FITC+ da pele para os linfonodos drenantes.
- CDs incubadas com saliva de carrapatos mostram uma redução significativa na expressão das moléculas co-estimulatórias CD80 e CD86, enquanto que nenhuma diferença é encontrada na expressão de MHC-II, CD40 e CD54.
- Apesar da saliva não inibir as CDs a induzirem uma proliferação de células T específicas ao antígeno KLH (sensibilização de células T *naive*), a produção de IFN- γ e TGF- β por essas células é praticamente extinguida, enquanto que a síntese de IL-10 mostra-se significativamente menor que a observada para camundongos que recebem CDs pulsadas com KLH sem saliva.

7. Referências bibliográficas*

ABEL, I. S.; MARZAGÃO, G.; YOSHINARI, N. H.; SCHUMAKER, T. T. S. Borrelia-like spirochetes recovered from ticks and small mammals collected in the Atlantic Forest Reserve. Cotia County, State of São Paulo: **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 95, 621-4, 2000.

ANDREWS, D. M.; ANDONIOU, C. E.; GRANUCCI, F.; RICCIARDI-CASTAGNOLI, P.; DEGLI-ESPOSTI, M. A. Infection of dendritic cells by murine cytomegalovirus induces functional paralysis. **Nat Immunol**, 2(11):1077-84, 2001.

ALIBERTI, J.; REIS E SOUSA, C.; SCHITO, M.; HIENY, S.; WELLS, T.; GARY B. HUFFNAGLE, B. G.; SHER, A. CCR5 provides a signal for microbial induced production of IL-12 by CD8 α^+ dendritic cells. **Nature**, 1(1):83-7, 2000.

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

ALLEN, J. R. Immunology of interactions between ticks and laboratory animals. **Exp Appl Acarol**, 7(1):5-13, 1989.

AMAKIRI, S. F. Arteriovenous anastomoses in the skin of tropical cattle. **Acta Anat**, 96(2):285-300, 1976.

ANDREOTTI, R. Caracterização de inibidores de serinoproteases (bmtis) presentes em larvas de carrapatos *boophilus microplus* e o seu efeito no controle da infestação parasitária em bovinos. São Paulo, **Tese (Doutorado)** –. Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo. 2002, 98p.

ANON. **Yearbook Production**. Food and Agriculture Organisation. Rome. 2001.

ANON. **Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilância em Saúde**. Brasil. Surto de febre maculosa no Município de Petrópolis, RJ. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nota_maculosa.pdf>. Acesso em: 12 nov. 2005.

* **De acordo com**

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**:
Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro 2002

APPLEMAN, L. J.; BOUSSIOTIS, V. A. T cell anergy and costimulation. **Immunol Rev**, 192:161-80, 2003.

ARAGÃO H. Ixodidae brasileiros e de alguns países limítrofes. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 31:759-843, 1936.

ARDAVIN, C.; DEL HOYO, G. M.; MARTIN, P.; ANJUERE, F.; ARIAS, C. F.; RUIZ, S.; MARIN, A. F. Origin and differentiation of dendritic cells. **Trends Immunol**, 22(12): 691-700, 2001.

ARGELI, V.; FAVEEUW, C.; ROYE, O.; FONTAINE, J.; TEISSIER, E.; CAPRON, A. *et al.* Role of parasite-derived prostaglandin D₂ in the inhibition of epidermal Langerhans cell migration during schistosomiasis infection. **J Exp Med**, 193:1135–1147, 2001.

AZULAY, R. D.; ABULAFIA, L.; SODRE, C. S. Lyme disease in Rio de Janeiro, Brazil. **Int J Dermatol**, 30:569-71, 1991.

BALASHOV, Y. S. Bloodsucking ticks (Ixodidae): vectors of diseases in man and animals. **Mis Pub Entomol Soc Am**, 8:161-166, 1972.

BANCHEREAU, J.; STEINMAN, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. **Nature**, 392:245–252, 1998.

BANCHEREAU, J.; BRIERE, F.; CAUX, C.; DAVOUST, J.; LEBECQUE, S.; LIU, Y. J.; PULENDRAN, B.; PALUCKA, K. Immunobiology of dendritic cells, **Annu Rev Immunol**, 18:767–811, 2000.

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

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, 1887) using a chemical stimulation. Environmental and temporal influences on secretion yield. **Braz J med Biol Res**, 21(3): 479-84, 1988.

BECHARA, G. H.; SZABÓ, M. P. J.; MUKAI, L.S.; ROSA, P. C. Immunisation of dogs, hamsters and guinea pigs against *Rhipicephalus sanguineus* using crude unfed adult tick extracts. **Vet Parasitol**, 52(1-2):79-90, 1994.

BECHARA, G. H.; SZABÓ, M. P. J.; FERREIRA, B. R.; GARCIA, M. V. *R. sanguineus* tick in Brazil: feeding and reproductive aspects under laboratorial conditions. **Braz J Vet Parasitol**, 4:61-66, 1995.

BELCHER, C. E.; DRENKOW, J.; KEHOE, B.; GINGERAS, T. R.; MCNAMARA, N.; LEMJABBAR, H.; BASBAUM, C.; RELMAN, D.A. The transcriptional responses of respiratory epithelial cells to *Bordetella pertussis* reveal host defensive and pathogen counter-defensive strategies. **Proc Natl Acad Sci**, 97(25):13847-52, 2000.

BENNETT, G. F. *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae): experimental infestations on cattle restrained from grooming. **Exp Parasitol**, 26: 323-328, 1969.

BENNETT, C. L.; MISSLITZ, A.; COLLEDGE, L.; AEBSCHER, T.; BLACKBURN, C. C. Silent infection of bone marrow-derived dendritic cells by *Leishmania mexicana* amastigotes. **Eur J Immunol**, 31(3):876-83, 2001.

BOS, J. D.; KAPSENBERG, M. L. The skin immune system: progress in cutaneous biology. **Immunol Today**. 14:75-78, 1993.

BROSSARD, M.; GIRARDIN, P. Passive transfer of resistance in rabbits infested with adult *Ixodes ricinus* L. Humoral factors influence feeding and egg laying. **Experientia**. 35:1395-1396, 1979.

BROSSARD, M.; WIKEL, S. K. Tick immunobiology. **Parasitology**. 129:S161-S167, 2004.

BROWN, S. J.; WORMS, M. J.; ASKENASE, P. W. *Rhipicephalus appendiculatus*: larval feeding sites in guinea pigs actively sensitized and receiving immune serum. **Exp Parasitol**, 55:111-120, 1983.

BROWN, S. J.; ASKENASE, P. W. Rejection of ticks from guinea pigs by anti-hapten-antibody-mediated degranulation of basophils at cutaneous basophil hypersensitivity sites: role of mediators other than histamine. **J Immunol**, 134:1160-1165, 1985.

CAVANAGH, L. L.; VON ANDRIAN, U. H. Travellers in many guises: the origins and destinations of dendritic cells. **Immunol Cel Biol**, 80(5):448-62, 2002.

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

CELLA, D.; SALLUSTO, F.; LANZAVECCHIA, A. Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. **Curr Opin Immunol**, 9(1):10-6, 1997.

CHABAUD, A. G. L'infestation par des ixodins provoque-t-elle une immunité chez l-h&e (2 rae note). **Ann Parasit**, 25:474-479, 1950.

CHAUSSABEL, D.; PAJAK, B.; VERCRUYSSSE, V.; BISSEYE, C.; GARZE, V.; HABIB, M.; GOLDMAN, M.; MOSER, M.; VRAY, B. Alteration of migration and maturation of dendritic cells and T-cell depletion in the course of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Lab Invest**, 83:1373–1382, 2003.

CHEMINAY, C.; SCHOEN, M.; HENSEL, M.; WANDERSEE-STEINHAUSER, A.; RITTER, U.; KORNER, H.; ROLLINGHOFF, M.; HEIN, J. Migration of *Salmonella typhimurium* harboring bone marrow-derived dendritic cells towards the chemokines CCL19 and CCL21. **Microb Pathog**, 32:207–218, 2002.

CHEN, X.; MURAKAMI, T.; OPPENHEIM, J. J.; HOWARD, O. M. Z. Triptolide, a constituent of immunosuppressive Chinese herbal medicine, is a potent suppressor of dendritic-cell maturation and trafficking. **Blood**, 106(7):2409-16, 2005.

CHRISTE, M.; BUTTI, B.; BROSSARD, M. Susceptibility of BALB/c mice to nymphs and larvae of *Ixodes ricinus* after modulation of IgE production with anti-interleukin-4 or anti-interferon- γ monoclonal antibodies. **Parasitol Res**, 84:388–393, 1998.

CHRISTE, M.; RUTTI, B.; BROSSARD, M. Cytokines (IL-4 and IFN- γ) and antibodies (IgE and IgG2a) produced in mice infected with *Borrelia burgdorferi sensu stricto* via nymphs of *Ixodes ricinus* ticks or syringe inoculations. **Parasitol Res**, 86(6):491-6, 2000.

CORDOVÉS, C. O. **Carrapato: controle ou erradicação**. 2a ed. Guaíba/RS: Agropecuária, 1997.

CUPP, E. W. Biology of ticks. **Vet Clin North Am Small Anim Pract**, 21(1):1-26, 1991.

DANTAS-TORRES, F.; FIGUEREDO L. A.; BRANDÃO-FILHO, S.P. *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae), the brown dog tick, parasitizing humans in Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, 39: 1, 2006

DELGADO, E.; FINKEL, V.; BAGGIOLINI, M.; MACKAY, C. R.; STEINMAN, R. M.; GRANELLI-PIPERNO, A. Mature dendritic cells respond to SDF-1, α but not to several β -chemokines. **Immunobiology**, 198:490, 1998.

DEMMA, L. J.; TRAEGER, M. S.; NICHOLSON, W. L.; PADDOCK, C. D.; BLAU, D. M. V.; EREMEEVA, M. E.; DASCH, G. A.; LEVIN, M. L.; SINGLETON, J.; ZAKI, S. R.; CHEEK, J.; SWERDLOW, D.; MCQUISTON, J. H. Rocky Mountain spotted fever from an unexpected tick vector in Arizona. **N Engl J Med**, 353(6):587-94, 2005.

DIEU, M. C.; VANBERVLIET, B.; VICARI, A.; BRIDON, J. M.; OLDHAM, E.; AIT-YAHIA, S.; BRIERE, F.; ZLOTNIK, A.; LEBECQUE, S.; CAUX, C. Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. **J Exp Med**, 188(2):373-386, 1998.

DIOGO, A. A. R.; GUERIM, L.; PIRES, J.R.; COUTO, A. L. G.; SERRA-FREIRE, N. M. Parasitismo por *Rhipicephalus sanguineus* Latreille, 1806 em *Columbia livia* Linnaeus na Cidade do Rio de Janeiro, Brasil. **Entomologia y Vectores**, 10:277-280, 2003.

DUMLER, J. S.; BAKKEN, J. S. Human ehrlichioses: newly recognized infections transmitted by ticks. **Annu Rev Med**, 49: 201-213, 1998.

ENK, A. H.; SALOGA, J.; BECKER, D.; B1P6MADZADEH, M.; KNOP, J. Induction of hapten-specific tolerance by interleukin 10 in vivo. **J Exp Med**, 179(4):1397-402, 1994.

EVANS, D. E.; MARTINS, J. R.; GUGLIELMONE, A. A. A review of the ticks (Acari, ixodida) of Brazil, their hosts and geographic distribution - 1. The state of Rio Grande do Sul, southern Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 95(4):453-70, 2000.

ESTRADA-PEÑA, A.; JOGENJAN F. Ticks feeding on humans: a review of records on human-biting Ixodoidea with special reference to pathogen transmission. **Exp Appl Acarol**, 23(9):685-715, 1999.

FERREIRA, B. R.; SILVA, J. S. Saliva of *Rhipicephalus sanguineus* tick impairs T cell proliferation and IFN- γ -induced macrophage microbicidal activity. **Vet Immunol Immunopathol**, 64:279-293, 1998.

FERREIRA, B. R.; SILVA, J. S. Successive tick infestations selectively promote a T helper 2 cytokine profile in mice. **Immunology**, 96:434-9, 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 resistant but not in susceptible animals. **Vet Parasitol**, 115:35-48, 2003.

FORSTER, R.; SCHUBEL, A.; BREITFELD, D.; KREMMER, E.; RENNER-MULLER, I.; WOLF, E.; LIPP, M. CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. **Cell**, 99(1):23-33, 1999.

FREEMAN, G. J.; BOUSSIOTIS, V. A.; ANUMANTHAN, A.; BERNSTEIN, G. M.; K E, X.Y.; RENNERT, P. D.; GRAY, G. S.; GRIBBEN, J. G.; NADLER, L. M. B7-1 and B7-2 do not deliver identical costimulatory signals, since B7-2 but not B7-1 preferentially costimulates the initial production of IL4. **Immunity**, 2:523-32, 1995.

FREITAS, M. G.; COSTA, H. M. A.; COSTA, J. O.; IIDE, P. **Entomologia e Acarologia Médica e Veterinária**. 6^a ed. Belo Horizonte: Editora Gráfica, 1982. 35-62.

FU, W.; CHEM, W. Roles of chemokines in thymopoiesis: redundancy and regulation. **Cell Mol Immunol**, 1(4):266-73, 2004.

FUCHSBERGER, N.; KITA, M.; HAJNICKA, V.; IMANISHI, J.; LABUDA, M.; NUTTALL, P. A. Ixodid tick salivary gland extracts inhibit production of lipopolysaccharide-induced mRNA of several different human cytokines. **Exp Appl Acarol**, 19(11):671-676, 1995.

GANAPAMO, F.; RUTTI, B.; BROSSARD, M. Cytokine production by lymph node cells from mice infested with *Ixodes ricinus* ticks and the effect of tick salivary gland extracts on IL-2 production. **Scand J Immunol**, 44:388-393, 1996a.

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

GANAPAMO, F.; RUTTI, B.; BROSSARD, M. Identification of an *Ixodes ricinus* salivary gland fraction through its ability to stimulate CD4 T cells present in BALB/c mice lymph nodes draining the tick fixation site. **Parasitology**, 115 (1):91-6, 1997.

GAZZINELLI, R. T.; ELTOUN, I.; WYNN, T. A.; SHER, A. Acute cerebral toxoplasmosis is induced by *in vivo* neutralization of TNF- α and correlates with the down regulated expression of inducible nitric oxide syntase and other markers of macrophage activation. **J Immunol**, 151:3672-3681, 1993.

GILLESPIE, R. D.; MBOW, M. L.; TITUS, R. G. The immunomodulatory factors of bloodfeeding arthropod saliva. **Parasite Immunol**, 22:319-31, 2000.

GIRARDIN, P.; BROSSARD, M. Effects of cyclosporin A on humoral immunity to ticks and on cutaneous immediate and delayed hypersensitivity reactions to *Ixodes ricinus* L. salivary-gland antigens in re-infested rabbits. **Parasitol Res**, 75(8):657-62, 1989.

GLEICH, G. J.; KITA, H.; ADOLPHSON, C. R. Eosinophils. In FRANK, M. M.; AUSTEN, K. F.; CLAMAN, H. N.; UNANUE, E. R. **Samter's Immunologic Diseases**. Boston: Little Brown and Co., 1995. 205-245.

GRACOUI, A.; BROMLEY, S. K.; SUMEM, C.; DAVIS, M. M.; ALLEN, P. M.; DUSTIN, M. L. The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. **Science**, 285(5425):221-7, 1999.

GRISI L.; MASSARD, C. L.; MOYA BORJA, G. E.; PEREIRA, J. B. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. **A hora veterinária**. 21, 8-10, 2002.

GUIMARÃES, J. H.; TUCCI, C. E.; BARROS-BATTESTI, D. M. **Ectoparasitos de Importância Veterinária**. São Paulo: Editora Plêiade / FAPESP, 2001. p. 218.

HAJNICKÁ, V.; KOCÁKOVÁ, P.; SLÁVIKOVÁ, M.; SLOVÁK, M.; GAŠPERÍK, J.; FUCHSBERGER, N.; NUTTALL, P. A. Anti-interleukin-8 activity of tick salivary gland extracts. **Parasite Immunol**, 23(9):483, 2001.

HIRAO, M.; ONAI, N.; HIROISHI, K.; WATKINS, S. C.; MATSUSHIMA, K.; ROBBINS, P. D.; LOTZE, M. T.; TAHARA, H. CC chemokine receptor-7 on dendritic cells is induced after interaction with apoptotic tumor cells: critical role in migration from the tumor site to draining lymph nodes. **Cancer Res**, 60: 2209–2217, 2000.

HOOGSTRAAL, H.; KIM, K. C. Tick and mammal coevolution, with emphasis on *Haemaphysalis*. In: KIM, K. C. **Coevolution of parasitic arthropods and mammals**. New York: Wiley-Interscience. 505-568, 1985.

INOKUMA, H. KERLIN, R. L. KEMP, D. H; WILLADSEN, P. Effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on the bovine immune system. **Vet Parasitol**, 47(1-2): 107-18, 1993.

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

INOKUMA, H.; AITA, T.; OHNO, K.; ONISHI, T. Effects of infestation by *Rhipicephalus sanguineus* on lymphocyte blastogenic responses to mitogens in dogs. **J Vet Med Sci**, 60(9):1013-1016, 1998.

INABA, K.; SCHULER, G.; WITMER, M. D.; VALINKSY, J.; ATASSI, B.; STEINMAN, R.M. Immunologic properties of purified epidermal Langerhans cells. **J Exp Med**, 164: 605-613, 1986.

JANEWAY, C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. **Immunobiology**. 5th ed. New York: Garland publishing, 2001.

JONES, T. C.; HUNT, R. D.; KING, N. W. Imunopatologia. In: **Patologia veterinária**. 6a Ed. São Paulo: Manole, 185-204, 2000.

JONGEJAN, A; UILENBERG, G. The global importance of ticks. **Parasitology**. 129:3-14, 2004.

KALINSKI, P.; HILKENS, C. M.; WIERENGA, E. A.; KAPSENBERG, M. L. T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. **Immunol Today**, 20(12):561-7, 1999.

KARPUS, W. J.; JUKACS, N. W.; KENNEDY, K. J.; SMITH, W. S.; HURST, S. D.; BARRETT, T. A. Differential CC chemokine-induced enhancement of T helper cell cytokine production. **J Immunol**, 158:4129-4136, 1997.

KAUFMAN, W. R. Tick-host interaction: a synthesis of current concepts. **Parasitol Today**, 5(2):47-56, 1989.

KOCÁKOVÁ, P.; SLÁVIKOVÁ, M.; HAJNICKÁ, V.; SLOVÁK, M.; GAŠPERÍK J.; VANCOVA, I.; FUCHSBERGER, N.; NUTTALL, P. A. Effect of fast protein liquid chromatography fractionated salivary gland extracts from different ixodid tick species on interleukin-8 binding to its cell receptors. **Folia Parasitol (Praha)**, 50(1):79-84, 2003.

KOENEN, H. J.; FASSE, E.; JOOSTEN, I. Cyclosporine preserves the anergic state of human T cells induced by costimulation blockade in vitro. **Transplantation**. 80(4):522-9, 2005.

KOPECKY, J.; KUTHEJLOVA, M.; PECHOVA, J. Salivary gland extract from *Ixodes ricinus* ticks inhibits production of interferon-gamma by the upregulation of interleukin-10. **Parasite Immunol**, 21:351-356, 1999.

KOTWAL, G. J. The great escape. Immune evasion by pathogens. **The Immunologist**, 4:157–164, 1996.

KOVAR, L. Tick saliva in anti-tick immunity and pathogen transmission. **Folia Microbiol**, (Praha), 49(3):327-36, 2004.

KUCHROO, V. K.; DAS, M. P.; BROWN, J. A.; RANGER, A. M.; ZAMVIL, S. S.; SOBEL, R. A.; WEINER, H. L.; NABAVI, N.; GLIMCHER, L. H. B7–1 and B7–2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/ Th2 developmental pathways: application to autoimmune disease therapy. **Cell**, 80:707–18, 1995.

LABRUNA, M. B. Biologia-ecologia de *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). **Rev Bras Parasitol Vet**, 13: 123-124, 2004.

LALANI, A. S.; MCFADDEN, G. Secreted poxvirus chemokine binding proteins. **J Leukoc Biol**, 62(5):570-6, 1997.

LANGE, J. V.; EL DESSOUKY, A. G.; MANOR, E.; MERDAN, A. I.; AZAD, A. F. Spotted fever rickettsiae in ticks from the northern Sinai Governate, Egypt. **Am J Trop Med Hyg**, 46:546-551, 1992.

LANZAVECCHIA, A.; SALLUSTO, F. Regulation of T Cell Immunity by Dendritic Cells. **Cell**, 106:263–266, 2001.

LAWRIE, C. H.; SIM, R. B.; NUTTALL, P. A. Investigation of the mechanisms of anti-complement activity in *Ixodes ricinus* ticks. **Mol Immunol**, 42(1):31-38, 2005.

LI, Y.; LI, X. C.; ZHENG, X. X.; WELLS, A. D.; TURKA, L. A.; STROM, T. B. Blocking both signal 1 and signal 2 of T-cell activation prevents apoptosis of alloreactive T cells and induction of peripheral allograft tolerance. **Nat Med**, 5(11):1298-302, 1999.

LISTON, A.; MCCOLL, S. Subversion of the chemokine world by microbial pathogens. **Bioessays**, 25(5):478-88, 2003.

LIU, Y. J.; JOHNSON, G. D.; GORDON, J.; MACLENNON, C. M. Germinal center in T-cell dependent antibody response. **Immunol Today**, 13(1):17-21, 1992.

LIU, Y. J. Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity. **Cell**, 106:259–262, 2001.

LUTZ, M.; KUKUTSCH, N.; OGILVIE, A. L. J.; RÖBNER, S.; KOCH, F.; ROMANI, N.; SCHULER, G. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. **J Immunol Methods**, 223(1):77-92, 1999.

MACATONIA, S. E.; EDWARDS, A. J.; KINIGHT, S. C. Dendritic cells and the initiation of contact sensitivity to fluorescein isothiocyanate. **Immunology**, 59(4):509-14, 1986.

MACDONALD, A. S.; STRAW, A. D.; BAUMAN, B.; PEARCE, E. J. CD8- dendritic cell activation status plays an integral role in influencing Th2 response development. **J Immunol**, 167(4):1982-8, 2001.

MALDONADO-LÓPEZ, R.; SMEDT, T.; MICHEL, P.; GODFROID, J.; PAJAK, B.; HEIRMAN, C.; THIELEMANS, K.; LEO, O.; URBAIN, J.; MOSER M. CD8 α - and CD8 α + Subclasses of Dendritic Cells Direct the Development of Distinct T Helper Cells In Vivo. **J Exp Med**, 189(3):587-92, 1999a.

MALDONADO-LÓPEZ, R.; SMEDT, T.; PAJAK, B.; HEIRMAN, C.; THIELEMANS, K.; LEO, O.; URBAIN, J.; MALISZEWSKI, C. R.; MOSER M. Role of CD8 α + and CD8 α - dendritic cells in the induction of primary immune responses in vivo. **J Exp Med**, 66(2):242-6, 1999b.

MALDONADO-LÓPEZ, R.; MOSER, M. Dendritic cell subsets and the regulation of Th1/Th2 responses. **Semin Immunol**, 13(5):275-82, 2001.

MATSUMOTO, K.; INOKUMA, H.; OHNO, K.; ONISHI, T. Effects of salivary gland extract from *Rhipicephalus sanguineus* on immunoglobulin class productivity of canine peripheral blood lymphocytes. **J Vet Med Sci**, 63(3): 325-328, 2001.

MATSUDA, H.; FUKUI, K.; KISO, Y.; KITAMURA, Y. Inability of genetically mast cell deficient *w^v* mice to acquire resistance against larval *haemaphysalis longicornis* ticks. **J Parasitol**, 71:443-448, 1985.

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

MEJRI, N.; RUTTI, B.; BROSSARD, M. Immunosuppressive effects of ixodes ricinus tick saliva or salivary gland extracts on innate and acquired immune response of BALB/c mice. **Parasitol Res**, 88(3):192-7, 2002.

MELLMAN, I.; STEINMAN, R. M. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. **Cell**, 106(3):255-8, 2001.

MURAYAMA, T.; OHARA, Y.; OBUCHI, M.; KHABAR, K. S. A.; HIGASHI, H.; MUKAIDA, N.; MATSUSHIMA, K. Human cytomegalovirus induces interleukin-8 production by a human monocytic cell line, THP-1, through acting concurrently on AP-1 and NF-kappaB-binding sites of the interleukin-8 gene. **J Virol**, 71:5692–5695, 1997.

NITHIUTHAI, S.; ALLEN, J. R. Significant changes in epidermal Langerhans cells of guinea-pigs infested with ticks (*Dermacentor andersoni*). **Immunology**, 51(1):133-41, 1984a.

NITHIUTHAI, S.; ALLEN, J. R. Effects of ultraviolet irradiation on epidermal Langerhans' cells in guinea-pigs. **Immunology**, 51:143–51, 1984b.

NITHIUTHAI, S.; ALLEN, J. R. Langerhans' cells present tick antigens to lymph node cells from tick-sensitized guinea-pigs. **Immunology**, 55:157–63, 1985.

OGATA, M.; ZHANG, Y.; WANG, Y.; ITAKURA, M.; ZHANG, Y.; HARADA, A.; HASHIMOTO, S.; MATSUSHIMA, K. Chemotactic response toward chemokines and its regulation by transforming growth factor-beta1 of murine bone marrow hematopoietic progenitor cell-derived different subset of dendritic cells. **Blood**, 93(10):3225-32, 1999.

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

PAPATHEODOROU, V.; BROSSARD, M. C3 levels in the sera of rabbits infested and reinfested with *Ixodes ricinus* L. and in midguts of fed ticks. **Exp Appl Acarol**, 3:53–59, 1987.

PEARCE, E. J.; KANE, C.; SUN, J. Regulation of Dendritic Cell Function by Pathogen-Derived Molecules Plays a Key Role in Dictating the Outcome of the Adaptive Immune Response. **Chem Immunol Allergy**, 90:82-90, 2006.

PEREIRA, M. C. *Boophilus microplus: revisão taxonômica e morfológica*. Rio de Janeiro: Químico Divisão Veterinária, 1982.

PIEMONTI, L.; MONTI, P.; SIRONI, M.; FRATICELLI, P.; LEONE, B. E.; CI, E.; ALLAVENA, P.; DI CARLO, V. Vitamin D₃ Affects Differentiation, Maturation, and Function of Human Monocyte-Derived Dendritic Cells. **J Immunol**, 164(9):4443-51, 2000.

PONTE-SUCRE, A.; HEISE, D.; MOLL, H. *Leishmania major* lipophosphoglycan modulates the phenotype and inhibits migration of murine Langerhans cells. **Immunology**, 104:462, 2001.

RAMACHANDRA, R. N.; WIKEL, S. K. Modulation of host immune responses by ticks (Acari: Ixodidae): effect of salivary gland extracts on host macrophages and lymphocyte cytokine production. **J Med Entomol**, 29:818–826, 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**, 32:338–345, 1995.

RANDOLPH, S. E. Population regulation in ticks: the role of acquired resistance in natural and unnatural hosts. **Parasitology**, 79:141–156, 1979.

RATHINAVELU, S.; BROADWATER, A.; DE SILVA, A. M. Does host complement kill *Borrelia burgdorferi* within ticks? **Infect Immun**, 71:822–829, 2003.

RECKLESS, J.; GRAINGER, D. J. Identification of oligopeptide sequences which inhibit migration induced by a wide range of chemokines. **Biochem J**, 340:803, 1999.

RECKLESS, J.; TATALICK, L. M.; GRAINGER, D. J. The pan-chemokine inhibitor NR58-3.14.3 abolishes tumour necrosis factor- α accumulation and leucocyte recruitment induced by lipopolysaccharide *in vivo*. **Immunology**, 103(2):244-54, 2001.

REIS E SOUSA, C. Dendritic cells as sensors of infection. **Immunity**, 14:495–498, 2001.

RESCIGNO, M.; GRANUCCI, F.; CITTERIO, S.; FOTI, M.; RICCIARDI-CASTAGNOLI, P. Coordinated events during bacteria-induced DC maturation. **Immunol Today**, 20(5):200-3, 1999.

RESCIGNO, M.; BORROW, P. The host–pathogen interaction. new themes from dendritic cell biology. **Cell**. 106: 267–270. 2001.

RESCIGNO, M. Dendritic cells and the complexity of microbial infection. **Trends Microbiol**, 10(9):425-61, 2002.

RIBEIRO, J. M.; MAKOUL, G. T.; LEVINE, J.; ROBINSON, D. R.; SPIELMAN, A. Antihemostatic, antiinflammatory, and immunosuppressive properties of the saliva of a tick, *Ixodes dammini*. **J Exp Med**, 161(2):332-44, 1985.

RIBEIRO, J. M.; SPIELMAN, A. *Ixodes dammini*: salivary anaphylatoxin inactivating activity. **Exp Parasitol**, 62(2):292-7, 1986.

RIBEIRO, J. M. *Ixodes dammini*: salivary anti-complement activity. **Exp Parasitol**, 64:347–353, 1987.

RIBEIRO, J. M. Role of saliva in tick/host interactions. **Exp Appl Acarol**, 7(1):15-20, 1989.

RIBEIRO, J. M.; WEISS, J. J.; TELFORD, S. R. 3rd. Saliva of the tick *Ixodes dammini* inhibits neutrophil function. **Exp Parasitol**, 70(4):382-8, 1990.

RIBEIRO, J. M. How ticks make a living. **Parasitol Today**. 11(3):91-3, 1995.

SAEKI, H.; MOORE, A. M.; BROWN, M. J.; HWANG, S. T. Cutting edge: secondary lymphoid tissue chemokine (SLC) and CC chemokine receptor 7 (CCR7) participate in the emigration pathway of mature dendritic cells from skin to regional lymph nodes. **J Immunol**, 162:2472–2475, 1999.

SAHIBI, H.; RHALEM, A.; TIKKI, N.; BEN KOUKA F.; BARRIGA, O. Hyalomma ticks: bovine resistance under field conditions as related to host age and breed. **Parasite**, 4(2):159-65, 1997.

SALIO, M.; CELLA, M.; SUTER, M.; LANZAVECCHIA, A. Inhibition of dendritic cell maturation by herpes simplex virus. **Eur J Immunol**, 29:3245–3253, 1999.

SALLUSTO, F.; CELLA, D.; LANZAVECCHIA, A. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. **J Exp Med**, 182(2):389-400, 1995.

SALLUSTO, F.; SCHAERLI, P.; LOETSCHER, P.; SCHANIEL, C.; LENIG, D.; MACKAI, C. R.; QIN, S., LANZAVECCHIA, A. Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. **Eur J Immunol**, 28(9):2760-9, 1998.

SALLUSTO, F.; LANZAVECCHIA, A. Mobilizing dendritic cells for tolerance, priming, and chronic inflammation. **J Exp Med**, 189(4):611–614, 1999.

SAUER, J. R.; MCSWAIN, J. L.; BOWMAN, A. S.; ESSENBERG, R. C. Tick salivary gland physiology, **Annu Rev Entomol**, 40:245-67, 1995.

SCHWARTZ, R. H. A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy. **Science**, 248(4961):1349-56, 1990.

SCHWARTZ, R. H. Model of T cell anergy: is there a common molecular mechanism?. **J Exp Med**, 184: 1–8, 1996.

SCHOELER, G. B.; WIKEL, S.K. Modulation of host immunity by haematophagous arthropods. **Ann Trop Med Parasitol**, 95:755–771, 2001.

SCHORDERET, S.; BROSSARD. M. Effects of human recombinant interleukin-2 on the resistance, and on the humoral and cellular response of rabbits infested with adult *Ixodes ricinus* ticks. **Vet Parasitol**, 54:375–387, 1994.

SHAW, S. E.; Day, M.J.; BIRTLES, R. J.; BREITSCHWERDT, E. B. – Tick-borne infectious diseases of dogs. **Trends in Parasitol**, 17:74-80, 2001.

SHORTMAN, K.; CAUX, C. Dendritic cell development: multiple pathways to nature's adjuvants. **Stem Cells**, 15(6):409-19, 1997.

SHORTMAN, K.; LIU, Y. J. Mouse and human dendritic cell subtypes. **Nat Rev Immunol**, 2(3):151-61, 2002.

SKINNER, J. A.; PILIONE, M. R.; SHEN, H.; HARVILL, E. T.; MING, H. Y. *Bordetella* Type III Secretion Modulates Dendritic Cell Migration Resulting in Immunosuppression and Bacterial Persistence. **J Immunol**, 175:4647-4652, 2005.

SOUSA, C. R.; SHER, A.; KAYE, P. The role of dendritic cells in the induction and regulation of immunity to microbial infection. **Curr Opin Immunol**, 11:392-399, 1999.

SOZZANI, S.; SALLUSTO, F.; LUINI, W.; ZHOU, D.; PIEMONTE, L.; ALLAVENA, P.; VAN DAMME, J.; VALITUTI, S.; LANZAVECCHIA, A.; MANTOVANI, A. Migration of dendritic cells in response to formyl peptides, C5a, and a distinct set of chemokines. **J Immunol**, 155(7):3292-5, 1995.

SOZZANI, S.; LUINI, W.; BORSATTI, A.; POLENTARUTTI, N.; ZHOU, D.; PIEMONTE, L.; D'AMICO, G.; POWER, C. A.; WELLS, T.N.; GOBBI, M.; ALLAVENA, P.; MANTOVANI, A. Receptor expression and responsiveness of human dendritic cells to a defined set of CC and CXC chemokines. **J Immunol**, 159:1993, 1997.

SOZZANI, S.; ALLAVENA, P.; D'AMICO, G.; LUINI, W.; BIANCHI, G.; KATAURA, M.; IMAI, T.; YOSHIE, O.; BONECCHI, R.; MANTOVANI, A. Differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation: a model for their trafficking properties. **J Immunol**, 161(3):1083–1086, 1998.

SOZZANI, S. Dendritic cell trafficking: More than just chemokines. **Cytokine Growth Factor Rev**, 16(6):581-592, 2005.

SPRINGER, T. A. Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. **Annu Rev Physiol**, 57: 827–72, 1995.

STANDIFORD, T. J.; ROLFE, M. W.; KUNKEL, S. L.; LYNCH, J.P; BUDICK, M. D; GILBERT, A. R; ORRINGER, M. B.; WHYTE, R. I.; STRIETER, R. M. Macrophage inflammatory protein-1 alpha expression in interstitial lung disease. **J Immunol**, 151(5):2852-63, 1993.

STEINMAN, R. M. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. **Annu Rev Immunol**, 9:271-96, 1991.

STEINMAN, R. M.; NUSSENZWEIG, M. C. Avoiding horror autotoxicus: The importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. **Proc Natl Acad Sci**, 99(1):351-8, 2002.

STEINMAN, R. M.; HAWIGER, D.; NUSSENZWEIG, M.C. Tolerogenic dendritic cells. **Annu Rev Immunol**, 21:685–711, 2003.

STINGL, G.; HAUSER, C.; WOLFF, K. The epidermis: an immunologic microenvironment. *In*: FITZPATRICK, T. B.; EISEN, A. Z.; WOLFF, K.; FREEDBERG, I. M.; AUSTEN, K. F. eds. **Dermatology in General Medicine**, 4th Ed. 172. McGraw-Hill, New York, 1993.

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

SZABO, M. P. J.; MUKAI, L. S.; ROSA, P. C. S.; BECHARA, G. H. Differences in the acquired resistance of dogs, hamsters, and guinea pigs to repeated infestations with adult ticks *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). **Braz J Vet Res Anim Sci**, 32:43-50, 1995b.

TAUB, D. D.; CONLON, K.; LLOYD, A. R.; OPPENHEIM, J. J.; KELVIN, D. J. Preferential migration of activated CD4+ and CD8+ T cells in response to MIP-1 alpha and MIP-1 beta. **Science**, 260(5106):355-8, 1993.

TAYLOR, P. A.; FRIEDMAN, T. M.; KORNGOLD, R.; NOELE, R. J.; BLAZAR, B. R. Tolerance induction of alloreactive T cells via ex vivo blockade of the CD40:CD40L costimulatory pathway results in the generation of a potent immune regulatory. **Blood**, 99(12): 4601-4609, 2002.

TORTORELLA, D.; GEWURS, B.; SCHUST, D.; FURMAN, M. PLOEGH, H. Down-regulation of MHC class I antigen presentation by HCMV; lessons for tumor immunology. **Immunol Invest**, 29(2):97-100, 2000.

TRAGER, W. Acquired resistance to ticks. **J Parasitol**, 25:57-81, 1939.

URBAN, B. C.; FERGUSON, D. J.; PAIN, A.; WILLCOX, N. PLEBANSKI, M.; AUSTYN, J. M.; ROBERTS, D. J. Plasmodium falciparum-infected erythrocytes modulate the maturation of dendritic cells. **Nature**, 400(6739):73-7, 1999.

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

UTECH, K. B.; WHARTON, R. N.; KERR, J. D. Resistance to *Boophilus microplus* (Canestrini) in different breeds of cattle. **Aust J Agric Res**, 29:885-895, 1978.

VAN BERKEL, V.; BARRETT, J.; TIFFANY, H. L.; FREMONT, D. H.; MURPHY, P. M.; MCFADDEN, G.; SPECK, S. H.; VIRGIN, H. W. IV. Identification of a Gammaherpesvirus Selective Chemokine Binding Protein That Inhibits Chemokine Action. **J Virol**, 74(15):6741-7, 2000.

VAN DER KLEIJ, D.; LATZ, E.; BROUWERS, J. F.; KRUIZE, Y. C.; SCHMITZ, M.; KURT-JONES, E. A.; ESPEVIK, T.; DE JONG, E. C.; KAPSENBERG, M. L.; GOLENBOCK, D. T.; TIELENS, A. G.; YAZDANBAKHS, M. A novel host-parasite lipid cross-talk. Schistosomal lyso-phosphatidylserine activates Toll-like receptor 2 and affects immune polarization. **J Biol Chem**, 277:48122-48129, 2002.

VAN GOOL, S. W.; VERMEIREN, J.; RAFIQ, K.; LORR, K.; DE BOER, M.; CEUPPENS, J. L. Blocking CD40 – CD154 and CD80/CD86 – CD28 interactions during primary allogeneic stimulation results in T cell anergy and high IL-10 production. **Eur J Immunol**, 29:2367–2375, 1999.

VANBERVLIET, B.; BENDRISS-VERMARE, N.; MASSACRIER, C.; HOMEY, B.; DE BOUTEILLER O.; BRIERE, F.; TRINCHIERE, G.; CAUX, C. The inducible CXCR3 ligands control plasmacytoid dendritic cell responsiveness to the constitutive chemokine stromal cell-derived factor 1 (SDF-1 α)/CXCL12. **J Exp Med**, 198(5):823-30, 2003.

VECCHI, A.; MASSIMILIANO, L.; RAMPONI, S.; LUINI, W.; BERNASCONI, S.; BONECCHI, R.; ALLAVENA, P.; PARMENTIER, M.; MANTOVANI, A.; SOZZANI, S. Differential responsiveness to constitutive vs. inducible chemokines of immature and mature mouse dendritic cells. **J Leukoc Biol**, 66(3):489–494, 1999.

WALKER, J. B.; KEIRANS, J. E.; HORAK, I. G. The genus *Rhipicephalus* (Acari: Ixodidae). **A Guide to the Brown Ticks of the World**. Cambridge: Cambridge University Press, 2000. 643.

WANG, B.; ZHUANG, L.; FUJISAWA, H.; SHINDER, G. A.; FELICIANI, C.; SHIV, G. M.; SUZUKI, H.; AMERIO, P.; TOTO, P.; SAUDER, D. N. Enhanced Epidermal Langerhans Cell Migration in IL-10 Knockout Mice. **J Immunology**, 162:277-283, 1999.

WIKEL, S. K.; ALLEN, J. R. Acquired resistance to ticks. iii. Cobra venom factor and the resistance response. **Immunology**, 32(4):457-65, 1977.

WIKEL, S. K. Influence of *Dermacentor andersoni* infestation on lymphocyte responsiveness to mitogens. **Ann Trop Med Parasitol**, 76:627–632, 1982.

WIKEL, S. K.; RAMACHANDRA, R. N. Modulation of host-immune responses by ticks (Acari: Ixodidae): effect of salivary gland extracts on host macrophages and lymphocyte cytokine production. **J Med Entomol**, 29(5):818-26, 1992.

WIKEL, S. K. Tick modulation of host cytokines. **Exp Parasitol**, 84: 304–309, 1996.

WIKEL, S.K. Host immunity to ticks. **Annu Rev Entomol**, 41:1-22, 1996a.

WIKEL, S. K.; BERGMAN, D. Tick-host immunology: significant advances and challenges opportunities. **Parasitol Today**, 13:383–389, 1997.

WIKEL, S. K. Tick modulation of host immunity: an important factor in pathogen transmission. **Int J Parasitol**, 29(6):851-859, 1999.

WILLADSEN, P. Immunity to ticks. **Adv Parasitol**, 18:293-311, 1980

WOLPE, S. D.; DAVATELIS, G.; SHERRY, B.; BEUTLER, B.; HESSE, D. G.; NGUYEN, H.T.; MOLDAWER, L. L.; NATHAN, C. L.; LOWRY, S. F.; CERAMI, A. Macrophages secrete a novel heparin-binding protein with inflammatory and neutrophil chemokinetic properties. **J Exp Med**, 167(2):570-81, 1988.

YAMADA, H.; AIHARA, T.; OKABE, S. Mechanism for Helicobacter pylori stimulation of interleukin-8 production in a gastric epithelial cell line (MKN 28): roles of mitogen-activated protein kinase and interleukin-1beta. **Biochem Pharm**, 61:1595–1604, 2001.

YAMAZAKI, S.; YOKOZEKI, H.; SATOH, T.; KATAYAMA, I.; NISHIOKA, K. TNF-alpha, RANTES, and MCP-1 are major chemoattractants of murine Langerhans cells to the regional lymph nodes. **Exp Dermatol**, 7(1):35-41, 1998.

YANAGIHARA, S.; KOMURA, E.; NAGAFUNE, J.; WATARAI, H.; YAMAGUCHI, Y. EB1/CCR7 is a new member of dendritic cell chemokine receptor that is up-regulated upon maturation. **J Immunol**, 161:3096–102, 1998.

YOSHIDA, A.; IMAYAMA, S.; SUGAI, S.; KAWANO, Y.; ISHIBASHI, T. Increased number of IgE positive Langerhans cells in the conjunctiva of patients with atopic dermatitis. **Br J ophthalmol**, 81(5): 402-6, 1997.

YOSHINARI, N. H.; BARROS, P. J. L; BONOLDI, V. L. N; ISHIKAWA, M.; BATTESTTI, D. M. B.; FONSECA, A. H. F.; SCHUMAKER, T. T. S. Perfil da borreliose de lyme no Brasil. **Rev Hosp Clín Fac Med São Paulo**, 52:111-7, 1997.

YOSHINARY, N. H.; ABRAO, M. G.; BONOLDI, V. L.; SOARES, C. O.; MADRUGA, C. R.; SCOFIELD, A.; MASSARD, C. L.; DA FONSECA, A. H. Coexistence of antibodies to tick-borne agents of Babesiosis and Lyme Borreliosis in patients from Cotia County, State of São Paulo, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 98:311-8, 2003.

ZHENG, M. X.; WILLIAM, A.; KUZIEL, W. A.; ERIC, G.; PAMER, E. G.; SERBINA, N. V. Chemokine receptor 5 is dispensable for innate and adaptive immune responses to Listeria monocytogenes infection. **Infect Immun**, 72(2):1057-64, 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](#)