

Alessandra Mara Franzin

**Imunobiologia das infestações de bovinos pelo carrapato
Rhipicephalus (Boophilus) microplus: estudo dos correlatos imunes
de resistência e de susceptibilidade**

Tese apresentada a Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
para obtenção de título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Imunologia Básica e Aplicada

Orientação: Prof^a Dr^a Isabel K. F. de Miranda Santos

Ribeirão Preto-SP
2009

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

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

Franzin, Alessandra Mara

Imunobiologia das infestações de bovinos pelo carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: Estudo dos correlatos imunes de resistência e de susceptibilidade. Ribeirão Preto, 2009.

134p. ; 30cm

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

Orientador: De Miranda Santos, Isabel Kinney Ferreira.

1. Carrapato. 2. Bovinos. 3. Resistência. 4. Suscetibilidade. 5. Pele.

DEDICATÓRIA

*“O nosso verdadeiro lugar de nascimento
é aquele no qual, e pela primeira vez,
lançamos um olhar inteligente e consciente
sobre nós mesmos.”*

Desconhecido

Por esse motivo eu humildemente dedico essa tese à Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada, à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e à Universidade de São Paulo. Agradeço solenemente a maravilhosa oportunidade de ter estudado num dos melhores programas de pós-graduação.

AGRADECIMENTOS AOS FAMILIARES

À minha querida família, cujos integrantes são meus companheiros nessa vida, compartilho feliz com vocês o meu bem mais precioso. Aquele pelo qual eu luto todos os dias e que foi presente da minha mãe Lourdes: a vida. Com os irmãos Ricardo e Vanessa, também presenteados com a vida pela nossa querida mãe, compartilho a irmandade do parentesco e do amor incondicional. Com a Eneida, Josiane e Thamara eu compartilho mutuamente as alegrias e as tristezas dessa vida que são vivências que só as famílias cultivam. Assim como a saudade deixada pelo padrinho Nelson e pela Elenise, compartilhada por todos.

Aos queridos Ricardo Nelson, Rubens, a todos vocês meus familiares e ao meu pequeno Frederico eu digo com a alegria de quem está viva: obrigada, é emocionante compartilhar a minha vida com vocês.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Professora Doutora Isabel K. F. de Miranda Santos, por me orientar, por confiar a mim este trabalho e pelos sábios conselhos que contribuíram para o meu amadurecimento profissional e pessoal.

À Professora Doutora Beatriz Rossetti Ferreira, pelo auxílio e sugestões que contribuíram para o desenvolvimento do meu trabalho e pela compreensão a um temperamento complicado.

Ao Professor Doutor João Santana da Silva, por permitir o desenvolvimento deste trabalho em seu laboratório e por ser um dos principais construtores do Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada. Sua obra não conhece fronteira, ela espalha suas sementes pelo mundo todo, disseminando através destas o conhecimento.

À Ana Cristine por sua participação imprescindível na construção do Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada, não existe um ex-aluno deste programa que não se recorde da “Aninha” com alegria e saudades.

Ao professores doutores Julio Aliberti e Monica Zini, ex-alunos do Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada, por despertarem em mim o interesse pela Imunologia quando eu ainda era aluna do curso de graduação.

Aos meus colegas do grupo do carrapato, Daniela, Carlo, Sandra, Gustavo, Elen e Wanessa, pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho e por compartilhar o interesse científico dentro da mesma linha de pesquisa.

À minha querida irmãzinha Daniela Moré, a quem tive a satisfação em conhecer, de compartilhar sua generosa amizade e a de seus tão estimados familiares. Vocês despertaram em mim o amor compartilhado entre familiares, foi quando percebi que poderia voltar para

a minha família e compartilhar o que havia sido despertado. Seu Carlos e tia Cida, vocês são exemplos de pais, com vocês eu aprendi a ser filha. À Fernanda e Luis Fernando, vocês são exemplos de alegria e esperança. Ao Diego, o mais novo integrante da família, que trouxe consigo carinho e musicas novas.

Aos meus amigos Luis Henrique, Neto, Everton, Alan e Camila, a amizade sincera que compartilhamos é um dos meus bens mais preciosos que já tive. Cuido de nossa amizade com cuidado e muito carinho, pois quem tem amigos nunca está sozinho.

À Sara, pela feliz descoberta de todos os dias que compartilhamos. As nossas diferenças e igualdades, presentes em seres tão humanos, que se completam e de tal maneira que acabam se esquecendo do mundo ao redor.

Aos meus amigos e colegas do Departamento de Bioquímica e Imunologia e da Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada, pela satisfação de compartilhar o agradável convívio de tantos anos.

Às agências de fomento, pelo financiamento deste trabalho e, em especial a CAPES, pela concessão da bolsa que possibilitou a realização desta tese.

“De tudo, ficaram três coisas:

A certeza de que estamos sempre começando...

A certeza de que precisamos continuar...

A certeza de que seremos interrompidos antes de terminar....

Portanto, devemos

Fazer da interrupção um caminho novo....

Da queda um passo de dança....

Do medo, uma escada...

Do sonho, uma ponte...

Da procura, um encontro...”

Ao ler essa poesia de Fernando Pessoa, eu descobri que os cientistas e os poetas têm em comum: o amor pelo trabalho e a perseverança de nunca desistir de uma idéia.

RESUMO

A pele dos vertebrados é alvo da maioria das 15.000 espécies de artrópodes hematófagos existentes e pouco se sabe sobre as estratégias imunológicas utilizadas pelos hospedeiros para expulsar esse tipo de ectoparasitos. É fato que carrapatos, como artrópodes hematófagos, são capazes também de induzi-las. Entre a grande variedade de hospedeiros, os bovinos, que apresentam fenótipos variáveis de resistência ao *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, constituem o único modelo no qual é possível correlacionar as respostas imunológicas entre os fenótipos contrastantes na mesma espécie hospedeira. Para tal, as populações celulares do infiltrado induzido na pele pelo carrapato foram quantificadas nos bovinos resistentes, *Bos taurus indicus* e nos suscetíveis, *Bos taurus taurus*. Como esperado, o carrapato induziu inflamação cutânea local nos bovinos estudados e a composição celular do infiltrado apresentou diferenças que variaram entre os fenótipos contrastantes de infestação. A pele resistente apresentou maior número de basófilos em comparação a pele suscetível infestada pelo carrapato adulto ($P < 0,05$) o que sugere a participação desse tipo de granulócito na resposta imune, prejudicando a hematofagia do carrapato. Eosinófilos não foram observados na pele naïve, mas sim na pele normal e infestada, apresentando maiores quantidades ($P < 0,05$) na pele resistente infestada por ninfa e por adulto. Esse granulócito também se mostrou importante para a aquisição de resistência a carrapatos, a cinética observada na pele dos animais sugere um efeito sistêmico de eosinófilos na infestação. Já mastócitos se mostraram reduzidos de forma semelhante na pele resistente e suscetível infestada por ninfa e adulto em comparação a pele não infestada das mesmas ($P < 0,05$), sugerindo desgranulação induzida pela saliva do carrapato. As citocinas e mediadores inflamatórios liberados por mastócitos poderiam desencadear e até modular as respostas imunes de contra o carrapato. Neutrófilos estavam em

quantidades semelhantes na pele infestada de ambas as raças, apresentando maior quantidade na fase de adulto em relação à fase de ninfa ($P < 0,05$). Esse fato sugere que a saliva da ninfa expressa desintegrinas contendo RGD, que possivelmente são específicas para esse granulócito. Em contrapartida, as células mononucleares foram mais abundantes na pele resistente e suscetível infestadas por ninfa em relação às infestadas por adulto ($P = 0,001$). Entre as populações mononucleares fenotipadas, as células T $CD3^+$ foram recrutadas em maior número na pele resistente infestada por ninfa e adulto que na pele suscetível nas mesmas fases ($P < 0,05$), indicando sua importância na regulação da resposta imune de resistência ao ectoparasito. Células $CD4^+$ foram mais numerosas na pele resistente infestada por adulto que a pele suscetível infestada pela mesma fase ($P < 0,05$); já as células $CD8^+$ estavam em maior número na pele resistente infestada por ninfa do que na pele suscetível na mesma fase de infestação ($P < 0,05$). Células T $\gamma\delta/WC1^+$ foram mais abundantes ($P < 0,05$) na pele resistente infestada por adulto que a mesma não infestada, indicando que esses linfócitos podem desempenhar papel importante na aquisição de resistência. Já os linfócitos B estiveram em número reduzido na pele suscetível infestada por ninfa e por adulto em comparação à mesma não infestada ($P < 0,05$). Entretanto, na pele resistente infestada por adulto, o número desses linfócitos foi maior ($P < 0,05$) em comparado ao encontrado na pele suscetível infestada pela mesma fase, sugerindo a participação de anticorpos na aquisição de resistência a carrapatos. Embora não significativa, o maior número de células *Natural Killers* na pele resistente, sugere seu envolvimento na proteção contra doenças transmitidas por carrapatos. Em suma, os resultados obtidos sugerem que a resposta imune local envolve células residentes e recrutam outras que, em conjunto, atuam na imunorregulação e na elaboração de respostas imunes efetoras e de memória eficazes contra carrapatos.

ABSTRACT

The skin of vertebrates is the largest for over 15,000 species of hematophagous arthropods. Among them are ticks, which are long-term feeders and interact with host defenses for days to weeks. Little is known about specialized strategies for eliminating ectoparasites, but ticks can induce immune responses in host. Bovines present variable and heritable levels of resistance to the *Ripicephalus (Boophilus) microplus* and are the only model in which distinct outcomes of infestation can be examined in the same species of host. In order to obtain some of the immune correlates of these outcomes, we quantified populations of leukocytes and lymphocytes present in the inflammatory infiltrates elicited by tick bites in skin of resistant and susceptible bovine breeds, respectively, *Bos taurus indicus* and *Bos Taurus taurus*. As expected, ticks induce cutaneous inflammatory infiltrates around their mouthparts. However the composition of infiltrate presented with significant differences that varied according to the phenotype of infestation. Inflammation of resistant breed contained significantly more basophils than in susceptible adult-infested skin ($P<0.05$). Eosinophils were absent in skin from naïve animals, but were present in normal and infested skin. They were present in infested skin of both breeds and more significantly so in nymph and adult-infested skin of resistant breed ($P<0.05$). However, mast cell numbers were equally diminished in nymph and adult-infested skin of both breeds when compared with non-infested skin ($P<0.05$). The neutrophils were equally present in infested skin of both breeds, but they are more numerous in skin infested with adults than with nymphs ($P<0.05$). Conversely, mononuclear cells were more abundant in skin infested with nymphs than with adults ($P=0.001$). Bites by nymphs and adults recruit more $CD3^+$ T cells in skin of resistant breeds than in that of susceptible ones ($P<0.05$). The $CD4^+$ populations of cells

were more numerous in adult-infested skin of resistant than in that of susceptible ($P < 0.05$); $CD8^+$ cells were increased in nymph-infested skin of resistants relative to that of susceptibles ($P < 0.05$). The population of $\gamma\delta/WC1^+$ T cells were more abundant ($P < 0.05$) in adult-infested skin of resistant when compared with those found in control skin of the same animals. The numbers of B lymphocytes were diminished in nymph and adult-infested skin of susceptibles when compared with those found in control skin ($P < 0.05$); in adult-infested skin of resistants, B lymphocytes were more numerous ($P < 0.05$) than in skin of susceptibles. Bites by nymph and adult tends to recruited more Natural Killers cells to skin in resistant breed than in susceptible one ($P > 0.05$). The results suggest that mast cells are source of cytokines and inflammatory mediators that play effectors and modulator roles in immune responses, their reduction possibly due to degranulation by tick saliva. Amount of neutrophils in infested skin may reflect the fact that only nymphs express RGD-containing disintegrins, which are possibly neutrophils-specific. Eosinophils, as well as basophils, are important to ticks resistance, their skin kinetic suggesting a systemic effect of tick infestations. Basophils resistant host increasing suggesting that they are the pivotal cells that impair haematophagy. The observed increase of $CD3^+$ T cells in nymph and adult-infested skin of resistants suggests their importance to regulate anti-tick immune responses. The diminished numbers of B cells in susceptible breed indicate that antibodies are important in acquired resistance to ticks. On the other hand, the reduction of $\gamma\delta/WC1^+$ T cells seen in the infested skin of susceptible bovines indicates that these cells may play a role in resistance to ticks. Natural Killers cells could help the development of efficacious immune responses to ticks-borne diseases. In conclusion, these results reflect the fact that local responses involve resident and infiltrating leukocytes and lymphocytes that are sources of immunoregulatory, effectors and memory responses elicited against ticks.

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO.....	14
1. Artrópodes hematófagos	
1.1. Origens do hábito da hematofagia em artrópodes.....	15
1.2. Carrapatos: um dos primeiros artrópodes hematófagos.....	16
1.3. Carrapatos: organização taxonômica, distribuição geográfica, processo de fixação à pele do hospedeiro e ciclo de vida.....	18
1.4. <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> : perdas econômicas, distribuição geográfica, espécie-especificidade e ciclo de vida.....	20
1.5. Saliva de artrópodes: sua importância para o sucesso da hematofagia.....	22
1.6. Saliva de carrapatos: um poderoso <i>cocktail</i> de moléculas antihemostáticas, imunomoduladoras e antiinflamatórias.....	24
1.7. Saliva de carrapatos: veículo de transmissão de agentes causadores de doenças infecciosas em humanos, animais de companhia e rebanhos.....	27
2. O Hospedeiro	
2.1. Interface ectoparasito e hospedeiro: coevolução e imunidade cutânea a ectoparasitas.....	29
2.2. Interface carrapato e hospedeiro: imunidade cutânea, resistência e suscetibilidade a carrapatos..	31
2.3. Interface <i>Rhipicephalus (B.) microplus</i> e hospedeiros bovinos: justificativa e respostas imunes cutâneas de resistência e de suscetibilidade.....	33
II. OBJETIVOS	38
III. MATERIAIS E MÉTODOS.....	40

3.1. Animais experimentais e carrapatos.....	41
3.2. Coleta de biópsias de pele de bovinos resistentes e suscetíveis.....	41
3.3. Contagens de carrapatos.....	42
3.4. Cortes histológicos e colorações específicas.....	43
3.5. Caracterização das zonas de contagens das células e da área do infiltrado celular.....	43
3.6. Reação de imunoistoquímica e anticorpos utilizados.....	45
3.7. Análise estatística.....	46
IV RESULTADOS.....	47
4.1. Infestação de bovinos resistentes e suscetíveis ao <i>R. (B.) microplus</i> em condições naturais: evolução do ciclo de vida do carrapato e coleta de biópsias de pele.....	48
4.1.1. Infestação de bovinos resistentes e suscetíveis ao <i>R. (B.) microplus</i> em condições naturais: estudo do infiltrado celular recrutado à pele pelos diferentes estágios evolutivos do carrapato.....	48
4.1.2. Infestação de bovinos resistentes e suscetíveis ao <i>R. (B.) microplus</i> em condições: contagem diferencial das células recrutadas à pele pelos diferentes estágios evolutivos do carrapato.....	54
4.2. Infestação de bovinos resistentes e suscetíveis ao <i>R. (B.) microplus</i> em condições experimentais: evolução do ciclo de vida do carrapato e coleta de biópsias de pele.....	69
4.2.1. Infestação de bovinos resistentes e suscetíveis ao <i>R. (B.) microplus</i> em condições experimentais: estudo da densidade celular do infiltrado recrutado à pele pelos estágios evolutivas do carrapato.....	74
4.2.2. Infestação de bovinos resistentes e suscetíveis ao <i>R. (B.) microplus</i> em condições experimentais: contagem diferencial das células recrutadas à pele infestada pelos diferentes estágios evolutivas do carrapato.....	77

4.3. Infestação de bovinos resistentes e suscetíveis ao <i>R. (B.) microplus</i> em condições experimentais: caracterização fenotípica dos linfócitos T (CD3 ⁺) e linfócitos B (CD21 ⁺) recrutados à pele pelos diferentes estágios evolutivos do carrapato.....	90
4.3.1. Infestação de bovinos resistentes e suscetíveis ao <i>R. (B.) microplus</i> em condições experimentais: caracterização fenotípica das células CD4 ⁺ e CD8 ⁺ recrutados à pele pelos diferentes estágios evolutivos do carrapato.....	96
4.3.2. Infestação de bovinos resistentes e suscetíveis ao <i>R. (B.) microplus</i> em condições experimentais: caracterização fenotípica dos linfócitos T $\gamma\delta$ /WC1 ⁺ e <i>Natural Killers</i> recrutados à pele pelos diferentes estágios evolutivos do carrapato.....	100
V. DISCUSSÃO.....	107
VI. CONCLUSÕES.....	116
VII. BIBLIOGRAFIA.....	118

I. INTRODUÇÃO

1. Artrópodes hematófagos.

1.1. Origens do hábito da hematofagia em artrópodes.

Alimentar-se do sangue de vertebrados terrestres é um comportamento observado em muitas ordens e famílias de artrópodes. Estima-se que, por diferentes caminhos evolutivos, aproximadamente 15.000 espécies distribuídas em 400 gêneros de artrópodes tornaram-se hematófagos (RIBEIRO, 1995). As primeiras evidências fósseis de artrópodes hematófagos datam do final do Período Cretáceo (145 a 65 milhões de anos). Mas não é descartada a possibilidade de que artrópodes hematófagos tenham surgido antes, na metade do Período Devoniano (417 a 362 milhões de anos), quando divergiram os primeiros vertebrados terrestres, os anfíbios (MANS E NEITZ, 2004).

Acredita-se que a co-habitação de artrópodes, mamíferos e aves dentro de abrigos, tocas e ninhos, nos Períodos Jurássico e/ou Cretáceo, situados entre 200 e 65 milhões de anos, possa ter sido o passo inicial para o desenvolvimento da hematofagia quando se estreitaram as relações entre artrópodes e hospedeiros vertebrados (BALASHOV, 2006). Com a mudança de habitat, a antiga dieta alimentar dos artrópodes tornou-se restrita e gradualmente foi sendo substituída por uma nova. Constituída por sangue de feridas e partes mortas do corpo dos vertebrados, a nova dieta era o alimento relativamente de fácil acesso e abundante no novo habitat (BALASHOV, 2006). Artrópodes lambedores ocasionais de sangue de feridas, com o passar do tempo, possivelmente adaptaram suas peças bucais para raspar, cortar e até furar a superfície da pele íntegra de seus co-habitantes vertebrados em busca do novo alimento. Esses artrópodes estabeleceram, de forma irrevogável, as bases das relações entre ectoparasitos hematófagos e hospedeiros vertebrados (BALASHOV, 2006).

Localizar vasos sanguíneos na pele dos hospedeiros é uma tarefa formidável, pois o sangue não é muito abundante na pele da maioria dos vertebrados, representando menos de 5 % do volume do

órgão (RIBEIRO, 1995). As adaptações das peças bucais dos artrópodes hematófagos tornaram os processos mecânicos de busca por sangue na pele dos hospedeiros mais rápidos e eficientes (RIBEIRO, 1995). Uma vez rompida a barreira mecânica da pele, artrópodes hematófagos podiam alimentar-se do sangue proveniente tanto do foco hemorrágico local, onde as peças bucais cortam ou furam a pele, como da canulação direta de vasos sanguíneos cutâneos (LAVOPIERRE, 1964). O foco hemorrágico local pode ser pequeno devido à dilaceração de um ou poucos capilares, como os produzidos por flebotomíneos e simulídeos, ou relativamente extenso, com a ruptura de vênulas e arteríolas, como os produzidos por carrapatos. No caso dos triatomíneos, a alimentação ocorre somente através da canulação de vênulas ou arteríolas, embora um foco hemorrágico local possa ser formado para guiar as peças bucais na canulação de vasos adjacentes (RIBEIRO, 1988). A adaptação mecânica das peças bucais da maioria dos artrópodes hematófagos é muito bem elaborada, mas no caso dos carrapatos a adaptação das peças bucais é menos sofisticada. As peças bucais de insetos contêm ductos separados para sugar sangue e inocular saliva permitindo-lhes salivar e ingerir sangue ao mesmo tempo. Em contrapartida, carrapatos possuem peças bucais dotadas de apenas um ducto, obrigando-os a alternarem a salivagem com a sucção de sangue (RIBEIRO, 1995).

O sucesso da hematofagia não dependeu somente da capacidade de ultrapassar a barreira mecânica da pele e encontrar sangue. Também foi necessário impedir a coagulação do sangue, as defesas imunológicas e os processos inflamatórios e de reparo tecidual da pele dos hospedeiros vertebrados. A secreção salivar dos ancestrais dos artrópodes hematófagos facilitou não só a ingestão e a digestão do alimento como também teve papel importante na adaptação a hematofagia ao permitir que o sangue fluísse sem inconvenientes (RIBEIRO, 1987).

1.2. Carrapatos: um dos primeiros artrópodes hematófagos.

Carrapatos são considerados um dos primeiros ácaros terrestres, com origens propostas no período Devoniano (417 a 362 milhões de anos). Tal hipótese foi estimulada pelo fato dos carrapatos parasitarem anfíbios (OLIVER 1989) e estes serem os primeiros vertebrados terrestres, com origem também no período Devoniano. Esses primeiros vertebrados terrestres são dotados de um sistema hemostático rudimentar que inclui trombina, fator Xa e plaquetas (LEWIS, 1996). A hematofagia dos carrapatos adaptada num ambiente com variedade restrita de hospedeiros poderia ter selecionado mecanismos antihemostáticos rudimentares antes da divergência de aves e mamíferos, ocorrida no final do período Cretáceo (145 a 65 milhões de anos) (MANS, LOUW, NEITZ, 2002a). Embora a descoberta de um fóssil de carrapato pertencente à família *Argasidae* (*Carios jerseyi*) datado do período de 90 a 94 milhões de anos, no Cretáceo, é a evidência fóssil mais antiga da possível origem cronológica dos carrapatos (KLOMPEN, 1996, KLOMPEN E GRIMALDI, 2001).

Relatos sobre canibalismo entre algumas espécies de carrapatos da família *Argasidae* sugerem a existência de um ancestral entomofágico (BALASHOV, 1972), e essa sugestão é reforçada pela proximidade filogenética existente entre carrapatos (família *Ixodidae*) e ácaros parasitiformes (família *Holothyrida*) (DOBSON E BARKER, 1999; KLOMPEN ET AL., 2000). A família *Holothyrida* compreende grupos de ácaros de vida livre que se alimentam basicamente de fluidos corpóreos de organismos mortos, o que pode sugerir a possibilidade de carrapatos compartilharem da mesma dieta que os ácaros antes da adaptação ao ambiente hematofágico (WALTER E PROCTOR, 1998).

Um possível ancestral entomofágico precisaria necessariamente de enzimas capazes de degradar matriz extracelular para tornar a comida mais acessível e ajudar na digestão. A hialuronidase, por exemplo, é uma enzima capaz de degradar matriz extracelular, é encontrada na sua forma ativa na saliva de carrapatos e pode contribuir para a formação do hematoma durante a refeição de sangue (NEITZ E VERMEULEN, 1987). A coagulação da hemolinfa também poderia atrapalhar a

alimentação do ancestral entomofágico, tornando-se um problema. A presença de inibidores de serinas proteases poderia resolver o problema da coagulação inibindo qualquer atividade proteolítica presente nos fluidos dos artrópodes mortos. Esses inibidores de serinas proteases poderiam ser os precursores dos fatores antihemostáticos presentes na saliva dos atuais carrapatos (MANS E NEITZ, 2004). Estudos sobre a fisiologia das glândulas salivares e da ação anticoagulante, antiinflamatória e imunomoduladora da saliva de carrapatos são necessários para a compreensão do sucesso adaptativo da hematofagia (GILLESPIE, MBOW E TITUS, 2000; TITUS E RIBEIRO, 1990; STEEN, BARKER e ALEWWOD, 2006). Com o advento de tecnologias genômicas esses estudos tornaram-se realidade e descreveram inúmeras moléculas antihemostáticas em glândulas salivares de carrapatos (FRANCISCHETTI ET AL., 2009).

1.3. Carrapatos: organização taxonômica, distribuição geográfica, processo de fixação à pele do hospedeiro e ciclo de vida.

Carrapatos formam um grupo bem sucedido de artrópodes hematófagos obrigatórios, que estão amplamente distribuídos em quase todo o planeta e estão adaptados a se alimentarem do sangue de mamíferos, aves, répteis e anfíbios (KEIRANS E DURDEN, 2005). Esses ácaros estão classificados na ordem *Ixodida* que compreende aproximadamente 879 espécies divididas em três famílias: a *Argasidae* ou carrapatos de corpo mole, a *Ixodidae* ou carrapatos de corpo duro e a *Nuttalliellidae*. A família *Argasidae* é dividida em duas subfamílias, *Argasinae* e *Ornithodorinae*; a família *Ixodidae* é dividida em *Prostriata* (subfamília *Ixodinae*) e *Metastriata* (subfamilias *Amblyomminae*, *Haemaphysalinae*, *Hyalomminae* and *Rhipicephalinae*) (GUGLIELMONE ET AL., 2009).

Aproximadamente 80% dos carrapatos existentes na fauna pertencem à família *Ixodidae*, compreendendo aproximadamente 692 espécies, com uma única espécie pertencente à família *Nuttalliellidae* e os carrapatos remanescentes estão classificados na família *Argasidae*, com

aproximadamente 186 espécies. (GUGLIELMONE ET AL., 2009). No ponto de vista de espécie animal, os gêneros mais importantes de carrapatos pertencem à família *Ixodidae* e são: *Amblyomma*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Hyalomma*, *Ixodes*, *Rhipicephalus* e *Boophilus*. Atualmente as cinco espécies do gênero *Boophilus* estão reclassificadas no gênero *Rhipicephalus* devido à proximidade filogenética existente entre ambos os gêneros (HORAK, 2002).

Embora existam diferenças nas peças bucais dos carrapatos das famílias *Argasidae* e *Ixodidae*, o que acarreta diferentes níveis de dano à pele dos hospedeiros (BINNINGTON E KEMP, 1980), o processo inicial de fixação é comum para ambas às famílias. A superação das barreiras não específicas da pele é inicialmente mecânica e começa pela varredura da pele em busca de um sítio propício para fixação do carrapato. Utilizando suas quelíceras, os carrapatos cortam a epiderme do hospedeiro para introduzir o hipostômio. Este por sua vez, dilacera os tecidos adjacentes provocando lesão, onde é inoculada a saliva (ARTHUR, 1973). Os carrapatos *Argasidae* alimentam-se, em modesta quantidade, durante curtos períodos de tempo, demorando algumas horas e ingerindo apenas sangue. Em contrapartida, os carrapatos *Ixodidae* alimentam-se por longos períodos de tempo, permanecendo fixados ao hospedeiro por vários dias e até semanas para completar seu ingurgitamento. São extremamente vorazes e não ingerem apenas sangue, mas também linfa e detritos celulares presentes na cavidade alimentar (SAUER, ESSENBERG, BOWMAN, 2000; ARTHUR, 1973; MANS E NEITZ, 2004).

Devido ao longo período de tempo em que carrapatos *Ixodidae* permanecem fixados a pele dos hospedeiros, com a exceção de alguns do gênero *Ixodes*, eles secretam uma substância denominada cimento que, quando endurece, auxilia no ancoramento das peças bucais penetrantes (ARTHUR, 1973). No caso dos carrapatos dos gêneros *Amblyomma* e *Hyalomma*, que inserem suas longas peças bucais na derme do hospedeiro, a deposição de cimento que ocorre na superfície da pele é pouca ou nenhuma. O cimento, no caso desses gêneros, é depositado totalmente na derme envolvendo as

peças bucais do carrapato. Já os gêneros *Dermacentor* e *Rhipicephalus (Boophilus)*, que possuem peças bucais curtas e que não penetram a pele até a derme, a deposição do cimento é predominantemente superficial (ARTHUR, 1973).

O ciclo de vida dos carrapatos *Ixodidae* é complexo, desenvolve-se em grande parte no ambiente, a chamada fase de vida livre, sendo intercalada pela fase parasitária composta pelos estágios evolutivos de larva, ninfa e adultos. A fase parasitária pode envolver uma, duas ou até três espécies diferentes de hospedeiros, dependendo da espécie do carrapato. De modo geral, o ciclo de vida dos carrapatos *Ixodidae* inicia-se com a fêmea ingurgitada ou teleógena ovipondo no ambiente, os ovos eclodem e as larvas recém nascidas desenvolvem-se em larvas infestantes terminando a fase de vida livre. As larvas infestantes parasitam a pele de um possível hospedeiro para se alimentar, iniciando a primeira fase parasitária. Uma vez ingurgitadas, as larvas voltam ao ambiente para sofrerem ecdise e evoluem para ninfas. As ninfas livres, quando encontram um hospedeiro, fixam-se na pele o mesmo iniciando a segunda fase de parasitismo. Elas ingurgitam e voltam para o ambiente onde sofrem ecdise novamente e evoluem para carrapatos adultos. Machos e fêmeas fixam-se próximos um do outro na pele do hospedeiro para a realização da terceira fase parasitaria, na qual ocorre a cópula. A fêmea ingurgitada fecha o ciclo quando se solta da pele do hospedeiro e realiza a postura dos ovos no ambiente (JONGEJAN E UILENBERG, 2004; ANDERSON E MAGNARELLI, 2008).

1.4. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: perdas econômicas, distribuição geográfica, espécie-especificidade e ciclo de vida.

O *Rhipicephalus (B.) microplus* tem suas origens provavelmente na Ásia e distribui-se geograficamente por locais de clima quente e úmido, condições que favorecem o desenvolvimento do seu ciclo de vida (HOOGSTRAAL E WASSEF, 1985). Com o advento das expedições

exploradoras e comerciais no século XV, o carrapato disseminou-se para outras regiões tropicais e subtropicais do globo terrestre, concentrando sua ocupação na África, Ásia, Oceania e nas Américas do Sul e Central, causando grandes prejuízos à pecuária local (NUÑES ET AL, 1982). Embora não se saiba ao certo sobre sua introdução no Brasil, acredita-se que ocorreu pela região sul com animais advindos do Chile durante o século XVIII (GONZÁLES,1995). Atualmente, o carrapato *R. (B.) microplus* encontra-se amplamente distribuído no território nacional, variando suas concentrações de acordo com as condições climáticas e tipos raciais de bovinos presentes em cada região (GONZÁLES, 1995).

Conhecido popularmente como o “carrapato do boi”, o *Rhipicephalus (Boophilus.) microplus* é um dos mais importantes transmissores de patógenos para o gado (DE CASTRO, 1997), causando grandes perdas econômicas para a pecuária mundial (GEORGE, DAVEY, POUND, 2002). O rebanho bovino comercial do Brasil é o maior do mundo e contribui expressivamente para nossa economia. Sofre, porém, com os prejuízos causados pelo carrapato, estimados em US\$ 2 bilhões/ano (GRISI, 2002); em nível global, ultrapassam US\$ 13 bilhões/ano (ANON, 2002). A utilização de agentes químicos como forma de controle de carrapatos tem levado à contaminação do meio ambiente, à presença de resíduos dos mesmos em produtos de origem animal e a seleção de parasitas resistentes (FLOATE ET AL., 1997; GLENN KENNED, CANNAVAN, MCCRACKEN, 2000; KUNZ e KEMP, 1994). Os prejuízos podem ser ainda maiores com o estabelecimento de barreiras sanitárias contra resíduos (ANON, 1996). Além da preferência pelos produtos orgânicos, que movimenta um mercado de US\$ 25 bilhões e em crescimento de 30% ao ano (ANON, 2001). Por essas razões o uso de carrapaticidas se torna cada vez mais limitados e se faz necessário o desenvolvimento de alternativas sustentáveis para o controle do carrapato, tais como vacinas (WILLADSEN E JONGEJAN, 1999) e marcadores genéticos para resistência (PRUETT, 1999; WILLADSEN E JONGEJAN, 1999).

Diferente das demais espécies de carrapatos pertencentes à família *Ixodidae*, o *R. (B.) microplus* realiza toda a parte parasitária do seu ciclo de vida, incluindo as trocas de estágios evolutivos, fixados a pele do seu hospedeiro natural. Os bovinos são os hospedeiros naturais dessa espécie de carrapato, mas ele pode, eventualmente, parasitar outras espécies de mamíferos (ARTHUR, 1965; JONGEJAN E UILENBERG, 2004). O ciclo de vida do carrapato *R. (B.) microplus* dura em média de 21 dias (JONGEJAN E UILENBERG, 2004) e cada fêmea ingurgitada ovipõe cerca de 2.000 a 3.000 ovos que eclodem após 22 a 30 dias de ovipostura (GONZÁLES, 1975). Isso significa que teoricamente essa espécie de carrapato acaba enfrentando a imunidade adaptativa secundária do hospedeiro.

Embora o *R. (B.) microplus* tenham peças bucais curtas, o dano tecidual causado por esse carrapato é considerável (JONGEJAN E UILENBERG, 2004). O cimento secretado pelas glândulas salivares dessa espécie de carrapato é inerte e a lesão formada na pele dos bovinos desenvolve-se como resultado das respostas inflamatória e imunológica do hospedeiro elicitadas pela saliva do carrapato (TATCHELL E MOORHOUSE, 1968; ARTHUR, 1973). De grande interesse, existem também diferenças na suscetibilidade a esse carrapato entre as diferentes raças bovinas. Em geral, é aceito que raças zebuínas (*Bos indicus*) são menos suscetíveis a infestação de *R. (B.) microplus* quando comparadas às raças européias (*Bos taurus*) (KELLEY, 1943; REIK, 1962; FRANCIS E LITTLE, 1964).

1.5. Saliva de artrópodes: sua importância para o sucesso da hematofagia.

A adaptação dos artrópodes à hematofagia exigiu soluções moleculares para conter os complexos sistemas responsáveis em manter a homeostasia do hospedeiro. Um dos primeiros desafios a ser transposto era um sistema de coagulação sanguínea, existente há pelo menos 200 milhões de anos (DOOLITTLE E FENG, 1987), extremamente eficiente na sua função de evitar

perdas sanguíneas. Outro desafio era um sistema imunológico dotado de resposta adaptativa que surgiu nos primeiros vertebrados, aproximadamente há 400 milhões de anos atrás (COOPER E ALDER, 2006). A resposta imune adaptativa inovou por sua alta especificidade, diversidade de reconhecimento e memória. Um sistema imunológico dotado dessas características é extremamente eficaz em eliminar agentes invasores. As moléculas presentes na saliva dos ectoparasitos foram as “ferramentas moleculares” encontradas para transpor os novos desafios encontrados no microambiente da pele dos hospedeiros.

A evolução da hematofagia foi observada quando moléculas salivares se adaptaram a novas funções, atuando por diferentes vias, convergindo ao mesmo propósito: adquirir sangue. Foi observado na saliva de insetos pertencentes à mesma família, mas não ao mesmo gênero, como *Aedes* e *Anopheles*, que existem moléculas vasodilatadores e inibidores da coagulação sanguínea de naturezas bioquímicas diferentes. Enquanto o *Aedes* tem na sua saliva um inibidor de fator Xa membro da família das serpinas (STARK E JAMES, 1998), o *Anopheles* secreta um pequeno peptídeo antitrombina que não é semelhante a nenhum outro tipo de peptídeo anticoagulante conhecido (FRANCISCHETTI, ET AL., 1999; VALENZUELA, ET AL., 1999). Ambas as moléculas convergem ao mesmo propósito: impedir a coagulação sanguínea. A saliva de artrópodes hematófagos possui como regra geral, ao menos uma molécula com ação anticoagulante, uma com ação antiplaquetária e uma com ação vasodilatadora (RIBEIRO E FRANCICHETTI, 2003).

Quando a integridade da pele do hospedeiro é desafiada pela ação espoliadora do artrópode, mecanismos imunológicos e inflamatórios diversificados entram em ação na tentativa de expulsar o ectoparasita. As moléculas salivares secretadas, em um contexto inflamatório local, são reconhecidas como imunógenos pelo sistema imunológico do hospedeiro. MELLANBY (1946) foi um dos primeiros pesquisadores a descrever essas reações imunes e caracterizá-las como reações de hipersensibilidade cutâneas a picada de ectoparasitos. Diferente da coagulação do sangue, que é

impedida totalmente, parece que as defesas do hospedeiro são apenas parcialmente inibidas e, em alguns casos, moduladas a favor do ectoparasito (BELKAID ET AL., 2000). Moléculas antiinflamatórias e com potencial antinoceptivo como, por exemplo, quinases que degradam a bradicinina, proteínas ligantes de serotonina e de histamina e as prostaglandinas também foram encontradas na saliva de diversos artrópodes hematófagos (ALJAMALI ET AL., 2002; INOKUMA ET AL., 1994; PAESEN ET AL., 1999; RIBEIRO, 1982; RIBEIRO, 1998).

1.6. Saliva de carrapatos: um poderoso *cocktail* de moléculas antihemostáticas, imunomoduladoras e antiinflamatórias.

A saliva dos ectoparasitas é um *cocktail* que contem, como regra geral, ao menos uma molécula anticoagulante, uma inibidora de plaquetas e uma vasodilatadora (RIBEIRO E FRANCISCHETTI, 2003). Entre os artrópodes hematófagos, os mais surpreendentes são os carrapatos. Sua saliva possui uma ampla diversidade de moléculas que foram se adaptando às novas funções: inibir a coagulação sanguínea e processos inflamatórios e modular as respostas imunológicas do hospedeiro (TITUS, BISHOP E MEJIA, 2006; MANS E NEITZ, 2003, RIBEIRO E FRANCICHETTI, 2003).

A razão da diversidade molecular da saliva de carrapatos pode estar relacionada à maneira pela qual esses ectoparasitas obtêm sangue. Diferente da maioria dos artrópodes hematófagos que canulam vasos e obtêm sangue rapidamente, carrapatos cortam a pele do hospedeiro e levam bem mais tempo para encontrá-lo. O método de obtenção de sangue adaptado pelos carrapatos é demorado, leva dias até ser concluído, e talvez por isso esses ectoparasitos apresentem um repertório de moléculas salivares antihemostáticas, antiinflamatórias e imunomoduladoras tão diversificado e que, com o tempo converjeu em funções redundantes (TITUS, BISHOP E MEJIA, 2006; STEEN, BARKER, ALEWOOD, 2006).

Ao se fixar na pele do hospedeiro, um dos primeiros desafios encontrados pelos carrapatos foi conter a rápida coagulação sanguínea local de fixação. Enzimas encontradas na saliva são dotadas de ação anticoagulante e atuam mantendo a fluidez do sangue enquanto o carrapato se alimenta. Por exemplo, a apirase é uma enzima anticoagulante, de ação rápida e que hidrolisa o ATP liberado por células rompidas presentes na lesão, impedindo a agregação plaquetária local mediada por ATP (VALENZUELA ET AL., 1998). Também foram encontradas na saliva de diferentes espécies de carrapatos inibidores de serinas proteases capazes de inibirem enzimas participantes da cascata da coagulação sanguínea do hospedeiro, (VALENZUELA, 2004; FRANCISCHETTI ET AL., 2002; TANAKA ET AL., 1999).

Ultrapassada a barreira da hemostasia, o próximo desafio do carrapato foi escapar das respostas inflamatórias e imunológicas do hospedeiro. Ao inocular antígenos salivares na pele do hospedeiro, obrigatoriamente o carrapato desencadeia um complexo de respostas imunes inatas e adaptativas envolvendo componentes celulares e humorais que tem por objetivo expulsar o ectoparasita (WIKEL 1996; TITUS, BISHOP E MEJIA, 2006). Em contrapartida, as alternativas de escape proporcionadas pela adaptação das moléculas salivares do carrapato são muitas. O exemplo mais bem estudado é a proteína salivar de 15 kDa denominada Salp 15. Essa proteína foi identificada primeiramente na saliva do carrapato *Ixodes scapularis* (ANGUITA ET AL., 2002). Recentemente, HOVIUS e colaboradores (2007) identificaram uma proteína semelhante na saliva de outra espécie, *I. ricinus*, e a comparação entre as proteínas de ambas as espécies demonstrou a existência de regiões conservadas sugerindo que a Salp 15 do carrapato *I. ricinus* também possa ser capaz de inibir a ativação de células T (HOVIUS ET AL., 2007).

A Salp 15 foi o primeiro antígeno de carrapato identificado que tem a capacidade de inibir a produção de interleucina-2 (IL-2) durante a resposta imune adquirida (ANGUITA ET AL., 2002). A Salp 15 se liga ao correceptor CD4 expresso em linfócitos T, essa ligação regula negativamente a

cascata de sinalização intracelular da IL-2, reduzindo sua produção e inibindo a proliferação dos linfócitos T (GARG ET AL., 2006; ANGUITA ET AL., 2002). A ligação específica de Salp 15 com a molécula CD4 foi o primeiro exemplo da interação de uma proteína salivar de carrapatos com linfócitos T de mamíferos (GARG ET AL., 2006). Outras moléculas salivares como a p36, a Iris e proteínas ligantes de IL-2 também atuam inibindo a proliferação dos linfócitos T (TITUS, BISHOP E MEJIA, 2006).

As prostaglandinas possuem largo espectro de ação, interagindo tanto com as respostas inflamatórias quanto imunológicas do hospedeiro. De acordo com BOWMAN ET AL (1996) esses derivados do ácido araquidônico estão presentes em altos níveis na saliva de carrapatos e parece atuarem na fisiologia da secreção salivar (QIAN ET AL., 1997). As prostaglandinas PGE₂ e PGF₂α foram descritas na saliva de diferentes espécies de carrapatos (ALJAMALI ET AL., 2002; INOKUMA ET AL., 1994) e recentemente foi demonstrado por SÁ-NUNES e colaboradores (2007) que a prostaglandina PGE₂, presente no *I. scapularis* possui ação inibidora da função de apresentadora de antígenos e da maturação das células dendríticas. Além disso, é capaz de inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-12 e TNF-α por esse tipo celular. O efeito inibidor da saliva sobre as células dendríticas parece afetar não somente a capacidade de primar células T, mas também de modular a produção de citocinas dessas células predominando o tipo Th2 em detrimento ao tipo Th1 e Th17 de resposta imune (SKALLOVA ET AL., 2008). Diversos trabalhos demonstraram que a saliva de carrapatos favorece o desenvolvimento de um tipo Th2 de resposta imune, caracterizado pela produção de altos níveis das citocinas IL-4 e IL-10 e baixa produção de IFN-γ e IL-12 (FERREIRA E SILVA, 1998; MEJRI ET AL., 2001).

Impedir o recrutamento ou a migração de células para o local de fixação pode ser um mecanismo eficiente de evasão das defesas do hospedeiro adaptado pelos carrapatos. Diversos trabalhos relatam

sobre as propriedades antiquimiotáticas da saliva de diferentes espécies de carrapatos (VANCOVA ET AL., 2007; DÉRUAZ ET AL., 2008). A mais recente descoberta foram proteínas capazes de se ligarem seletivamente a quimiocinas. Essas proteínas apresentam atividade antiquimiotática ao impedirem a ligação da quimiocina ao seu receptor, inibindo o recrutamento ou migração de alguns tipos celulares imprescindíveis às respostas imunes (VANCOVA ET AL., 2007; DÉRUAZ ET AL., 2008). Além disso, recentemente foi demonstrado que a saliva de carrapatos pode regular negativamente a expressão de receptores de quimiocinas na superfície de células dendríticas prejudicando a organização das respostas imunes adaptativas (OLIVEIRA ET AL., 2008).

Diversos outros mecanismos do sistema imune também são alterados pela ação da saliva ou de extrato de glândula salivar de carrapatos: a ativação do sistema complemento pela via alternativa (RIBEIRO, 1987), a fagocitose de patógenos e a inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias de macrófagos (RAMACHANDRA E WIKEL, 1992; URIOSTE ET AL., 1994; KYCKOVA E KOPECKY, 2006; FERREIRA E SILVA, 1998), a inibição das atividades das células Natural Killers (KUBES ET AL., 2002), e a proliferação de células B (HANNIER ET AL., 2003). Estudar as interações da saliva de carrapatos com o sistema imunológico do hospedeiro é vital para compreender a hematofagia, a transmissão e o estabelecimento de patógenos nos hospedeiros.

1.7. Saliva de carrapatos: veículo de transmissão de agentes causadores de doenças infecciosas em humanos, animais de companhia e rebanhos.

Artrópodes hematófagos são vetores de microrganismos causadores de graves doenças infecciosas em humanas como Malária, Leishmaniose, Filariose, Tripanosomiase, Doença de Lyme entre outras (MOORE, 1993). A saliva utilizada por artrópodes hematófagos para obter uma refeição de sangue também propicia um microambiente favorável para a transmissão e o estabelecimento de patógenos nos hospedeiros. O mecanismo exato que potencializa a infectividade dos patógenos

ainda não está totalmente elucidado. Entretanto, a interferência da saliva nas defesas imunológicas do hospedeiro parece ser um dos mecanismos envolvidos na transmissão e no estabelecimento da infecção com os microrganismos (TITUS, BISHOP E MEJIA, 2006). Os primeiros a observarem essa propriedade da saliva de ectoparasitos foram TITUS E RIBEIRO (1988) ao demonstrar que a coinoculação de formas promastigotas de leishmania com homogenato de glândula salivar de *Lutzomia longipalpis* aumentava o tamanho da lesão e o número de leishmanias encontrados no local.

Carrapatos estão em segundo lugar na lista dos artrópodes hematófagos transmissores de microrganismos causadores de doenças em humanos, perdendo apenas para os mosquitos. São os mais importantes ectoparasitos transmissores de patógenos para animais de companhia e rebanhos (BALASHOV, 1972). Diferentes de outros grupos de artrópodes vetores, carrapatos são capazes de transmitir grande variedade de microrganismos como protozoários, rickettsias, espiroquetas e vírus (JONGEJAN E UILENBERG, 2004). Essa grande versatilidade contribui para a importância, na saúde pública e animal, dos carrapatos como vetores de doenças infecciosas. A Doença de Lyme, causada pela *Borrelia burgdorferi*, é a mais conhecida das doenças transmitidas por carrapatos nos Estados Unidos (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION). Nos Estados Unidos, a *B. burgdorferi* é transmitida pelas espécies de carrapatos *Ixodes scapularis* e *I. pacificus*. O *I. scapularis* é também vetor da *Babesia microti*, que é o agente causador da erliquiose granulocítica humana (SPIELMAN ET AL., 1985). No Brasil, a febre Maculosa é a zoonose mais importante transmitida por carrapatos. É causada pelo agente etiológico *Rickettsia rickettsii* e cursa com sintomas como febre aguda, dor de cabeça e manchas avermelhadas pelo corpo. Quando não diagnosticada a tempo, a febre Maculosa pode levar o indivíduo à morte (WWW.PORTAL.SAUDE.GOV.BR).

Com as mudanças climáticas e o desmatamento os carrapatos estão cada vez mais próximos das zonas urbanas, provocando a emergência de novas zoonoses e a re-emergência de outras já conhecidas. Outros fatores também contribuem para a emergência e re-emergência das zoonoses transmitidas por carrapatos, e entre eles estão o desenvolvimento de resistência a acaricidas, mutações genéticas e fatores econômicos e sociais (GUBLER, 1998; MOLYNEUX, 1998).

2. O Hospedeiro

2.1. Interface ectoparasito e hospedeiro: coevolução e imunidade cutânea a ectoparasitas.

A coevolução entre as espécies ocorre de forma recíproca e em resposta à seleção imposta por uma espécie sobre a outra (CLAYTON ET AL., 1999). Ectoparasitas estão presentes em praticamente todos os ambientes e, pelo menos em algum momento do seu ciclo de vida, parasitam alguma espécie de vertebrado para sobreviverem e se reproduzirem (PRINCE 1980). O modo de vida adotado pelos ectoparasitas promove alimento e habitat, mas requerem adaptações evolutivas às defesas do hospedeiro (WAAGE, 1979; MARSHALL, 1981). Por outro lado, a ação espoliadora dos ectoparasitos também é um fator importante de pressão seletiva sobre os hospedeiros vertebrados, obrigando-os a adaptações evolutivas para sobreviverem (CLAYTON ET AL., 1999). Essas adaptações permitiram que alguns hospedeiros vertebrados interferissem no ectoparasitismo, dificultando o acesso ao alimento, com conseqüente redução na taxa de reprodução e sobrevivência, e mantendo níveis de infestação compatíveis com a vida. Sendo assim, a seleção natural favoreceu hospedeiros vertebrados que apresentavam algum grau de resistência a ectoparasitos (DEVANEY E AUGUSTINE 1988; ALLEN 1994; RANDOLPH 1994; WIKEL 1996).

A pele é a principal barreira de defesa dos vertebrados ao meio ambiente, é um órgão complexo, também sendo responsável pela regulação hídrica, manutenção da temperatura corporal,

sensibilidade tátil e proteção contra agressões externas físicas, químicas e biológicas (JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2004). A necessidade de meios efetivos de proteção contra os desafios ambientais foi fundamental para a evolução da imunidade cutânea. A pele dos vertebrados é dotada de mecanismos inatos e adaptativos que atuam coordenadamente na vigilância imunológica do tecido (KUPPER E FUHLBRIGGE, 2004). Dessa forma, a pele participa ativamente nas defesas do hospedeiro, sendo capaz de gerar e suportar reações inflamatórias e imunológicas no local da injúria (ABBAS E LICHTMAN, 2003). É através da ação conjunta dessas reações que a pele dos hospedeiros tenta expulsar artrópodes invasores, como pulgas (STUKE ET AL., 2008, VON RUEDORFFER ET AL., 2003), percevejos (LEVERKUS ET AL., 2006), ácaros (POCHANKE ET AL., 2006) e carrapatos (GALARIA, CHAUDHARY, MAGRO, 2003).

Diante de uma imunidade cutânea tão eficiente, grande parte dos ectoparasitos adotou métodos menos invasivos de fixação à pele, evitando em ativar a imunidade da mesma (GORB E BEUTEL, 2001). Contudo, por menos invasiva que seja a estratégia adotada, a injúria tecidual provocada pela espoliação do ectoparasito e pela inoculação de saliva, resultaram em inflamação local, com edemaciamento do tecido envolvido, produção de citocinas e recrutamento de células. As reações cutâneas resultantes da picada dos ectoparasitos variam desde pequenas pápulas pruriginosas, como as causadas por flebotomíneos, até dermatites alérgicas tópicas, como a causada por pulgas e percevejos. Muitas vias inflamatórias e imunológicas contribuem para o desenvolvimento das reações cutâneas alérgicas contra ectoparasitos e geralmente culminam em hipersensibilidades dos tipos I ou imediata, do tipo III ou formação de imunecomplexo e do tipo IV ou tardia (GROSS E HALLIWELL, 1985; BELKAID ET AL., 2000; POUCHANKE ET AL., 2006; SICHERER ET AL., 2005). As diferentes manifestações de hipersensibilidades podem ser estratégias que o organismo hospedeiro emprega para combater também ectoparasitos (RAJAN, 2003), embora em alguns casos elas possam ser do interesse dos mesmos (BELKAID ET AL., 2000). Ao elicitar reação de

hipersensibilidade tardia através de componentes salivares inoculados na pele hospedeira, os flebotomíneos aumentam o fluxo de sangue e o edemaciamento do tecido local. Ambos os fatores permitem uma alimentação mais rápida, antes que as defesas do hospedeiro sejam capazes de atuar sobre o ectoparasito (BELKAID ET AL., 2000). Dessa forma, o balanço entre as hipersensibilidades cutâneas manifestadas pelo hospedeiro e os mecanismos de evasão adaptados contra as mesmas pelos ectoparasitos determinam a suscetibilidade ou a resistência de alguns indivíduos dentro de uma população hospedeira (STRANDE E PECH, 1995).

2.2. Interface carrapato e hospedeiro: imunidade cutânea, resistência e suscetibilidade a carrapatos.

Diferente da maioria dos ectoparasitos hematófagos, os carrapatos adaptaram uma estratégia relativamente agressiva para obter sangue, na qual a pele do hospedeiro sofre injúrias consideráveis, classificadas como lesão inflamatória edematosa (HOOKER, BISHOPP E WOOD, 1912, citados por TRAGER, 1939). A estratégia para obtenção de sangue dos carrapatos inicia-se com o estabelecimento do ectoparasito à pele do hospedeiro, na qual ele introduz suas peças bucais através da epiderme. Enquanto a pele do hospedeiro é cortada pelas quelíceras do ectoparasito, este saliva concomitantemente uma substância pegajosa e de composição variada denominada de cimento. O cimento é depositado ao longo da ruptura da epiderme, envolvendo o hipostômio do carrapato formando um canal de acesso à derme superior, denominado “canal alimentar”. Logo abaixo, ocorre a formação da “cavidade alimentar” na qual a saliva propriamente dita é inoculada e difunde-se pelo tecido adjacente. Então, durante o longo período de alimentação do carrapato, ele alterna entre sugar sangue e injetar saliva no hospedeiro (RIBEIRO, 1995; SONENSHINE, 1991). Apesar da ação das moléculas salivares, que como descrito anteriormente, não permitem que o sangue coagule na cavidade alimentar e impedem o reparo da injúria tecidual, assim mesmo ocorre a formação de

infiltrado celular ao redor dessa cavidade (BINNINGTON E KEMP, 1980, RIBEIRO E FRANCISCHETTI, 2003).

TRAGER (1939) foi o primeiro a demonstrar que certos hospedeiros, no caso cobaias, poderiam elaborar uma resposta protetora contra o carrapato após uma primeira infestação. Ele também demonstrou que essa imunidade poderia ser transmitida através da transferência de soro obtido de animais resistentes. A resistência adquirida foi observada pela dificuldade de acesso ao sangue, com conseqüente redução na sobrevivência e na taxa de reprodução do carrapato (TRAGER, 1939). Desde então, diversos trabalhos confirmaram a resistência adquirida por cobaias a diferentes espécies de carrapatos (ALLEN, 1973; WIKEL E ALLEN, 1976; MCTIER, GEORGE E BENNETT, 1981; ASKENASE, BAGNALL E WORMS, 1982; KRINSKY ET AL., 1982). Estudos mais detalhados dessa resistência demonstraram a presença de basófilos e eosinófilos na reação inflamatória crônica cutânea local. Também demonstraram que quanto maior o número desses tipos celulares menor foi o sucesso do artrópode (ALLEN, 1973; BROWN E KNAPP, 1980; SCHELGER, LINCON E KEMP, 1981; BROWN ET AL., 1982; BROWN, BARKER E ASKENASE, 1984; SZABÓ E BECHARA, 1999). Quando esses granulócitos foram depletados, aboliu-se parcialmente a aquisição de resistência a carrapatos em cobaias, confirmando sua importância no processo (BROWN ET AL., 1982; BROWN E ASKENASE, 1983). A imunidade adquirida contra carrapatos também pode ser transmitida de um animal para outro através da transferência de células linfóides. Porém proteção total só foi observada quando ambos foram transferidos, demonstrando que fatores humorais e celulares são complementares no estabelecimento da resistência a carrapatos (WIKEL E ALLEN, 1976; ASKENASE, BAGNALL, WORMS, 1982).

A aquisição de resistência a carrapatos é um fenômeno imunológico complexo que envolve reações de hipersensibilidade cutânea basofílica mediada por IgE (WILLADSEN, WOOD E RIDING, 1979; REIK, 1962; ALLEN, 1977; ASKENASE, 1980), em resposta aos antígenos

salivares secretados pelo carrapato (WIKEL, 1982). Os mecanismos envolvidos nesse tipo de reação de hipersensibilidade são numerosos e incluem acúmulo de basófilos no tecido, que são recrutados por mecanismos quimiotáticos específicos (ASKENASE ET AL., 1978; MITCHELL, BROWN E ASKENAS, 1982., WARD ET AL., 1979; LEONARD, LETT-BROWN E ASKENASE, 1979; LETT-BROWNET AL., 1976) dependentes de linfócitos T (DVORAK ET AL., 1971) e de anticorpos IgG1 (ASKENASE, 1973; ASKENASE, HAYNES E HAYNES, 1976; HAYNES, ROSENSTEIN E ASKENASE, 1978; BROWN ET AL., 1982; MITCHELL E ASKENASE, 1982). Em contrapartida, a resposta imune cutânea observada em hospedeiros suscetíveis a carrapatos envolve reações de hipersensibilidade imediata (SZABÓ, MORELLI E BECHARA, 1995), com reduzida proliferação de linfócitos T (FERREIRA ET AL., 2003) e favorece o desenvolvimento de um tipo Th2 de resposta imune, caracterizado pela produção de altos níveis das citocinas IL-4 e IL-10 e baixa produção de IFN- γ e IL-12 (FERREIRA E SILVA, 1998; MEJRI ET AL., 2001).

2.3. Interface *Rhipicephalus (B.) microplus* e hospedeiros bovinos: justificativa e respostas imunes cutâneas de resistência e de suscetibilidade.

Entre as raças de bovinos, as pertencentes à espécie *Bos taurus indicus* ou zebuínos são mais resistentes ao carrapato *R. (B.) microplus* do que a espécie *B. t. taurus* ou bovinos da raça taurina. (KELLEY, 1943; REIK, 1962; FRANCIS E LITTLE, 1964; UTECH ET AL, 1978). Em cruzamentos feitos entre essas raças, observa-se que quanto maior a proporção de sangue indiano, maior é a resistência ao carrapato e de caráter herdável (HONER E GOMES, 1990, MATTIOLI, 1998; MELTZER, 1996). Fatores como sexo, idade, cor do pêlo, e estação do ano, podem interferir na resistência dos animais às infestações, porém a raça é o fator mais importante e determinante na caracterização do fenótipo de resistência, (MATTIOLI, 1998; MELTZER, 1996). Segundo LEMOS

(1986), o *Bos t. indicus* tem convivido há milhares de anos com essa espécie de carrapato. Essa pressão seletiva propiciou a eliminação natural dos animais mais suscetíveis e a permanência apenas dos resistentes. Sendo assim, *B. t. indicus* e *B. t. taurus*, como hospedeiros naturais do carrapato *R. (B.) microplus*, constituem um dos poucos modelos no qual é possível estudar de forma comparativa e dentro da mesma espécie, os mecanismos imunes de resistência e de suscetibilidade ao carrapato.

Como é um órgão do sistema imune, a pele alberga diversos tipos de leucócitos que são responsáveis pela primeira linha de defesa do organismo contra agressões, sejam de natureza química, física ou biológica (ABBAS E LICHTMAN, 2003). Entre os leucócitos presentes na pele, mastócitos e eosinófilos são tipos celulares associados a reações alérgicas cutâneas e a manifestação de hipersensibilidade do tipo imediato (ABBAS E LICHTMAN, 2003). Esse tipo de hipersensibilidade foi observado em cães, hospedeiro natural e suscetível do *Rhipicephalus sanguineus* (SZABÓ ET AL., 1995; SZABÓ E BECHARA, 1999), e em bovinos da raça taurina, suscetíveis ao *R. (B.) microplus* (TATCHELL E MOORHOUSE, 1967; BECHARA ET AL., 2000), quando desafiados com antígenos dos respectivos carrapatos. BROWN, BARKER E ASKENASE (1984) também demonstraram a participação de mastócitos e eosinófilos na aquisição de resistência em bovinos taurinos infestados por *Amblyomma americanum*. Esses mesmos animais apresentaram hipersensibilidade cutânea e número elevado de basófilos no sítio de fixação do carrapato. Resultados semelhantes foram demonstrados por GILL (1986) em bovinos taurinos infestados por outra espécie de carrapato. Esses resultados contraditórios observados em diferentes modelos experimentais não deixam claro o papel de mastócitos e de eosinófilos nas respostas imunes de resistência a ectoparasitos. Já, no caso dos basófilos, eles parecem estar comprometidos com a aquisição de resistência a carrapatos de modo geral. Porém nenhum estudo avaliou, de forma comparativa, o papel dos basófilos nos fenótipos de resistentes e suscetíveis na mesma espécie de hospedeiros infestados pela mesma espécie de carrapato. Outro tipo leucocitário presente no

infiltrado inflamatório causado por carrapatos são os neutrófilos. Esse granulócito esteve presente no infiltrado inflamatório recrutado à pele infestada de hospedeiros resistentes e suscetíveis (SZABÓ E BECHARA, 1999). Embora TATCHELL E MOORHOUSE (1970) tenham demonstrado que a lesão causada pelo *Rhipicephalus sanguineus* na pele de cachorros é menor e apresenta reduzida destruição das fibras de colágeno, esse fato não foi demonstrado na pele de hospedeiros resistentes. Dessa forma, fica evidente que existem poucas informações sobre a participação desses polimorfonucleares na aquisição de resistência ou de suscetibilidade a carrapatos.

Entre as populações de linfócitos presentes na pele, as células T com receptor de antígeno $\gamma\delta$ são alvo de interesse particular, uma vez que bovinos apresentam essa população celular em abundância quando comparada a outros mamíferos. Na pele bovina, os linfócitos T $\gamma\delta^+$ representam 44% dos linfócitos T, sugerindo que possivelmente participem de uma primeira linha de defesa contra ectoparasitos (HEIN E DUDLE, 1997; MACHUGH, 1993; CROCKER, 1993). As células T $\gamma\delta^+$ também participam da homeostasia da pele, pois através da produção de IGF-1, elas regulam a taxa de proliferação de queratinócitos (SHARP ET AL., 2005) e o recrutamento de basófilos (HARTNELL ET AL., 2004). Em bovinos existem duas subpopulações de linfócitos T $\gamma\delta^+$, sendo uma positiva para a molécula CD8 e negativa para o antígeno WC1 e outra apresentando reciprocidade de expressão de marcadores, ou seja, é $CD8^- / WC1^+$ (MACHUG, 1993; CROCKER, 1993). A molécula WC1 tem homologia com moléculas tipo *scavenger*, não tem contrapartida em linfócitos T $\gamma\delta$ humanos e de camundongos e até o momento já foram descritas três diferentes isoformas dessa molécula em bovinos (ROGERS ET AL., 2005). Essa molécula é expressa na maioria dos linfócitos T $\gamma\delta^+$ bovinos e promove o controle da proliferação desse tipo celular, como também podem estar envolvidas na migração e na produção de citocinas (WIJNGAARD ET AL., 1992; KIRKHAM ET AL., 1997). O papel dos linfócitos T $\gamma\delta^+/WC1^+$ nas respostas contra

carrapatos é pouco explorado, porém sabe-se que em ovinos suscetíveis infestados com carrapatos ocorreu depleção sistêmica de células T $\gamma\delta^+$ (BOPPANA ET AL., 2004) e infestações cutâneas em ovinos com um outro ácaro, *Psoroptes ovis*, induzem recrutamento sistêmico inicial de células T $\gamma\delta^+$ cuja frequência diminui com a evolução da infestação (VAN DEN BROEK, 2005). Esses achados sugerem que a infestação por ectoparasitos altera a homeostasia dos linfócitos T $\gamma\delta^+$, embora não se saiba ao certo como.

Células *Natural Killers* (NK) são conhecidas pela sua citotoxicidade em respostas contra vírus e tumores (MORETTA, 2002; RAULET, VANCE E MCMAHON, 2001; ROLSTAD ET AL., 2001). Além disso, elas promovem uma conexão entre a imunidade inata e a adaptativa através da produção de citocinas e da interação com células apresentadoras de antígenos (MORETTA, 2002; BIRON E GAZZINELLI, 1995; FERLAZZO ET AL., 2002; SPAGGIARI ET AL., 2001). Em bovinos esse tipo celular foi identificado e caracterizado através da expressão do receptor de ativação NKp46 (STORSET ET AL., 2004). As células NKp46⁺ compreendem de 1 a 10% dos linfócitos do sangue periférico de bovinos e não expressam os receptores CD3, CD4, TCR, marcadores nem para célula B e granulócitos (STORSET ET AL., 2004). Essas células apresentam atividade citolítica mediada por IgG e sua distribuição nos tecidos bovinos é semelhante à dos demais mamíferos, sendo encontradas no sangue, fígado, pulmão, baço e linfonodos (STORSET ET AL., 2004). Estão envolvidas nas respostas de defesa contra *Mycobacterium bovis* (BASTOS ET AL., 2008) e patógenos transmitidos pelo carrapato (GOFF ET AL., 2006), nas quais predomina padrão Th1 de resposta imune caracterizado pela intensa produção de IL-12 e IFN- γ . O papel dessas células na aquisição de resistência a carrapatos é pouco estudado, mas sabe-se que a saliva de carrapatos inibe a atividades das células NK (KUBES ET AL., 2002). São necessários mais estudos para elucidar o papel das *Natural Killers* na resistência contra carrapatos.

As reações de hipersensibilidade cutânea envolvem resposta imune adquirida, com ativação de linfócitos T e B que, através da produção de citocinas e anticorpos, organizam e potencializam os mecanismos inatos atuantes que não foram capazes de rejeitar parasitos em primeira instância (ABBAS E LICHTMAN, 2003). As reações de hipersensibilidade encontradas na pele de animais resistentes e suscetíveis sugerem o envolvimento de linfócitos T e B nas respostas contra carrapatos (BROWN, BARKER E ASKENASE, 1984; GILL, 1986; BECHARRA, MORELLI E ZSABÓ, 2000; SZABÓ ET AL., 1995). Essa sugestão é reafirmada pelo efeito inibidor da saliva sobre a proliferação de linfócitos T e B (FERREIRA ET AL., 2003; HANNIER ET AL., 2003), na modulação para o tipo Th2 em detrimento ao padrão Th1 e Th17 de citocinas em hospedeiros suscetíveis (FERREIRA E SILVA, 1998; MEJRI ET AL., 2001; SKALOVA ET AL., 2008) e no predomínio de anticorpos das classes IgG1 e IgG2 em bovinos resistentes (KASHINO ET AL., 2005). Dessa forma, demonstrando que a seleção natural favoreceu ectoparasitos que conseguissem impedir ou dificultar o estabelecimento de respostas imunes adquiridas eficazes e, por outro lado, hospedeiros capazes de resistir a essa modulação e adquirir imunidade a carrapatos.

Estudar os mecanismos imunológicos existentes na pele, sabendo que esta é o órgão alvo dos carrapatos, é de suma importância compreender as respostas imunes de resistência e suscetibilidade ao ectoparasito. Os conhecimentos sobre a resposta local anti o *Rhipicephalus (B.) microplus* em bovinos é limitado, mas é seguro afirmar sua complexidade. Determinar a formação do infiltrado celular na pele de animais resistentes e suscetíveis ao carrapato é de suma importância para a compreensão da imunidade cutânea a esse ectoparasito utilizando um modelo experimental de resistência e suscetibilidade numa mesma espécie hospedeira submetida à infestações com o *Rhipicephalus (B.) microplus*.

II. OBJETIVOS

Obter os correlatos de resistência e susceptibilidade ao carrapato por meio do estudo das respostas imunes cutâneas locais decorrentes da picada do *R. (B.) microplus* em bovinos das raças *Bos t. indicus*, hospedeiro resistente, e *Bos t. taurus*, hospedeiro suscetível. Mais detalhadamente, pretendeu-se:

1. Estudar o infiltrado inflamatório cutâneo provocado pela fixação do carrapato à pele dos bovinos resistentes e suscetíveis por meio de técnicas histológicas e análise morfométrica do infiltrado celular provocado pelo carrapato.

2. Determinar o fenótipo das células componentes do infiltrado encontrado na pele infestada de bovinos resistentes e suscetíveis, utilizando técnicas de histologia e de imunoistoquímica.

3. Correlacionar os infiltrado inflamatórios provocados pelo carrapato nas fases evolutivas de larva, ninfa e adultos elicitado na pele dos bovinos resistentes e suscetíveis ao *R. (B.) microplus*.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais experimentais e carrapatos.

Bovinos da raça indiana (Nelore) ou *Bos t. indicus* (resistentes à infestação) e da raça taurina (Holandês Preto e Branco) ou *Bos t. taurus* (suscetíveis), em número igual a 12 por grupo experimental, não irmãos entre si, já expostos ao *R. (B.) microplus* foram introduzidos em pastagens previamente infestadas pela mesma espécie de carrapato. Os animais foram mantidos em regime de semiconfinamento durante o período de dois anos, nos quais sofreram sucessivas infestações pelos *R. (B.) microplus*. Os mesmos se alimentaram de pastagem e suplementos de sal e concentrado no cocho e água *ad libitum*, estiveram sob os cuidados de responsáveis técnicos e médico veterinário e recebem as vacinas obrigatórias.

Bovinos das mesmas raças, em número igual a 4 por grupo experimental, nunca antes infestados por carrapatos (naïves), foram infestados com 10.000 larvas de *R. (B.) microplus* e mantidos em regime de confinamento sob cuidados de responsáveis técnico e médico veterinário. Os animais se alimentaram de pastagem e suplementos de sal e concentrado no cocho e água *ad libitum* e também recebem as vacinas obrigatórias.

As larvas de carrapatos *R. (B.) microplus* utilizadas para a infestação experimental foram obtidas de fêmeas ingurgitadas em bovinos da raça suscetível. Essas teleógenas foram mantidas em estufa B.O.D. (Câmara de germinação TE-401, Tecnal, Br) umedecida e na temperatura de 28°C para oviposição. A massa de ovos obtida foi pesada e separada em recipientes isolados contendo 500 miligramas (mg) da mesma. Após a eclosão dos ovos, cada recipiente continha um número aproximado de 10.000 larvas de carrapato que, após o período de uma semana, tornaram-se hábeis para infestar os bovinos.

3.2. Coleta de biópsias de pele de bovinos resistentes e suscetíveis.

Biopsias de pele infestadas pelos estágios evolutivos de ninfa (N) e adulto (A) do carrapato e biópsias de pele não infestadas, utilizadas como controles (C' e C''), foram coletadas nos animais de ambas as raças estudadas durante o período no qual os mesmos foram mantidos em condições naturais de infestação. Já nos animais mantidos sob condições experimentais, foram coletadas biópsias de pele naïve (C'), ou seja, coletadas antes do início da infestação, de pele não infestada (C''), de pele infestada pelos estágios de larva (L), ninfa (N) e adulto no início do ingurgitamento (A') e no final da mesma fase (A'').

Todas as biopsias de pele foram coletadas utilizando *punch* de 6 milímetros (mm) de diâmetro, posteriormente as mesmas foram lavadas PBS diluído 1/1000 e secadas em papel de filtro. Parte das biopsias coletadas foi fixada em PBS/Formol 10%, para inclusão em parafina, e parte foram preservadas em meio de criopreservação (Tissue-Tek[®]O.C.T, Sakura Finetek), mantidas a -80°C.

3.3. Contagens de carrapatos.

De acordo com a técnica descrita por OLIVEIRA E ALENCAR (1989) e preconizada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, as contagens das fêmeas ingurgitadas, medindo mais que 4 mm de diâmetro e fixadas do lado esquerdo de cada animal foram realizadas quinzenalmente. As contagens de carrapatos em bovinos infestados naturalmente tiveram início em abril do primeiro ano de coleta e mantiveram-se ininterruptamente até dezembro do segundo ano nos quais os animais foram submetidos à infestação natural. O controle dos carrapatos, em animais suscetíveis altamente infestados, foi feito por meio de pulverizações com carrapaticidas tópicos quando a saúde clínica se encontrava comprometida devido à infestação. Nos animais infestados artificialmente, a contagem dos carrapatos foi feita apenas no final do período de ingurgitamento da fase adulta.

3.4. Cortes histológicos e colorações específicas.

As biopsias de pele coletadas foram fixadas em PBS/formol 10% por um período entre 12 e 16 horas e posteriormente incluídas em parafina de acordo com técnicas convencionais. Os cortes foram seccionados na espessura entre 4 e 5 micrômetros (μm) com o auxílio de micrótomo (Modelo RM 2125RT, Leica) e submetidos a colorações específicas para cada tipo de análise realizada. A densidade do infiltrado celular foi determinada em secções de pele infestada das raças estudadas coradas por Hematoxilina e Eosina. A contagem diferencial das células presentes na pele das mesmas foi realizada em secções coradas por May-Grünwald e Giemsa, que permite a identificação das diferentes populações de granulócitos. Os mastócitos presentes nas secções analisadas foram detectados pela coloração de Azul de Toluidina. Todas as lâminas foram montadas com meio para montagem e lamínula e observadas em microscópio ótico (Modelo DM LB2, Leica).

3.5. Caracterização das zonas de contagens das células e da área do infiltrado celular.

Foram analisadas somente secções que apresentavam o centro da lesão provocada pelo carrapato. O mesmo foi caracterizado pela presença do cone de cimento depositado na pele e pela ruptura da epiderme feita pelas peças bucais do carrapato. O infiltrado inflamatório observado na derme foi dividido em zonas 1, 2 e 3 (Figura 1) e as contagens foram feitas apenas nas zonas 1 e 2 utilizando retícula 7/7 (Olympus Optical Co., Japão) acoplado ao microscópio BX 50 (Olympus Optical Co., Japão) para delimitar as áreas de contagens estabelecidas dentro das zonas. A contagem total das células encontradas no infiltrado foi feita em secções de pele infestada

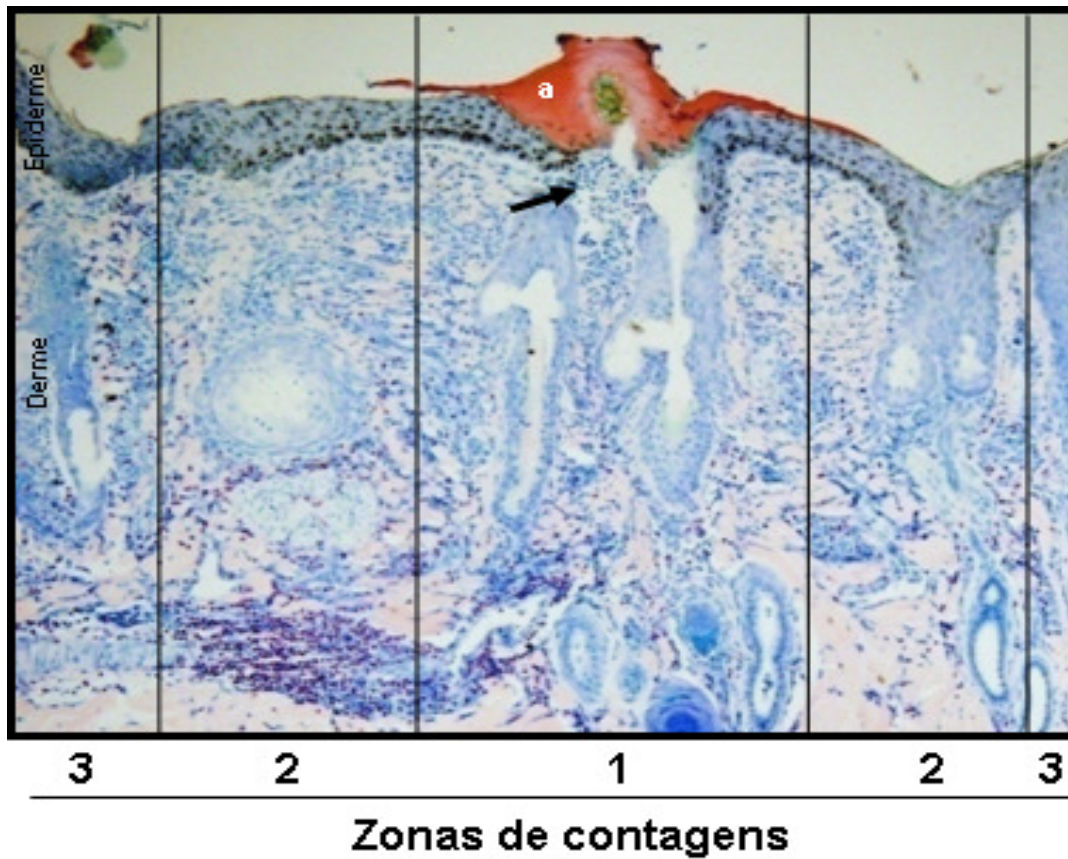


Figura 1. Determinação das zonas de contagens global e diferencial das células recrutadas à pele de bovinos resistentes e suscetíveis infestada pelo *R. (B.) microplus*. A figura acima é uma secção de pele infestada pelo carrapato no estágio evolutivo de adulto (A); (a) presença do cone de cimento produzido pelo carrapato depositado na superfície da epiderme e através dela (seta preta), formação do infiltrado inflamatório na derme. As divisões esquematizam as zonas 1, 2 e 3 de contagens. Corte histológico incluído em parafina e corado pelo May-Grünwald e Giemsa (aumento de 100x).

utilizando aumento de 400 vezes e a contagem diferencial das populações de granulócitos foi realizada nas mesmas secções utilizando aumento de 1000 vezes. A área total do infiltrado celular encontrada em cada secção foi mensurada utilizando o programa Image-Pro plus versão 6.3 (MediaCybernetics).

3.6. Reação de imunoistoquímica e anticorpos utilizados.

Nas reações de imunistoquímica-peroxidase, foram empregados os seguintes anticorpos primários de isotipo G de imunoglobulina, purificados, produzidos em camundongos, monoclonais com especificidade para moléculas da superfície de células bovinas: CD3 (MM1A, VMRD), utilizado na concentração de 1/100; CD4 (MCA1653, Serotec), utilizado na concentração de 1/30; CD8 (MCA837, Serotec), utilizado na concentração de 1/100; CD21 (MCA1424, Serotec), utilizado na concentração de 1/100; WC1 (MCA1655, Serotec), utilizado na concentração 1/50 e Nkp46 (MCA2365, Serotec), utilizado na concentração de 1/30. Foi empregado o anticorpo secundário monoclonal biotilado, produzido em cabra e específico para região Fc de IgG de camundongo (SC-2039, Santa Cruz), utilizado na concentração de 1/500, em reações de imunoistoquímica/peroxidase reveladas com DAB (diamino-benzidina) (Avidina-Biotina-Peroxidase, Vector Laboratories).

Resumidamente, as biopsias de pele criopreservadas e mantidas a -80°C foram seccionadas, com o auxílio de criostato (Modelo CM1850, Leica) na espessura de 4-5 micrometros e as secções de material congelado foram fixados em lâmina (Star Frost, Knittel Glaser) utilizando acetona gelada. As secções foram incubadas em câmara úmida, a temperatura ambiente, por 30 minutos com solução de peróxido de hidrogênio a 3% para retirada de peroxidases endógenas. Em seguida, os mesmos foram tratados, por 30 minutos, com solução de bloqueio contendo (leite em pó desnatado a 3% acrescido de imunoglobulina de cabra purificada na concentração de 1/100) para

impedir ligações inespecíficas. Os anticorpos primários foram colocados em cortes individuais, de acordo com a especificidade e incubados em câmara úmida por 2 horas a temperatura de 36°C em estufa seca. Posteriormente, o anticorpo secundário biotilado foi adicionado e incubado por 30 minutos, a temperatura ambiente. Para a visualização da reação antígeno-anticorpo foi utilizado o complexo ABC, incubado por 30 minutos a temperatura ambiente e os sítios imunorreativos foram revelados com diamino-benzidina. Os cortes foram contracorados com a coloração de May-Grünwald e Giemsa e as lâminas foram montadas para a contagem das marcações, em aumento de 400x, utilizando retículo 7/7 (Olympus Optical Co., Japão) acoplado ao microscópio ótico BX 50 (Olympus Optical Co., Japão) A contagem das células marcadas seguiu os mesmos critérios adotados no item 3.5 dessa seção.

3.7. Análise estatística.

Os valores obtidos com as contagens total e diferencial foram submetidos a tratamento estatístico utilizando o teste-t, para valores paramétricos, e o teste Mann-Whitney Rank Sum, para valores não paramétricos, utilizando o programa Sigma Stat versão 2.0 (SAS, Chicago, EUA), sendo considerados estatisticamente significantes os valores de $P < 0,05$. A expressão gráfica dos resultados foi feita utilizando o programa Sigma Plot versão 2.0(SAS, Chicago, EUA).

IV RESULTADOS

4.1. Infestação de bovinos resistentes e suscetíveis ao *R. (B.) microplus* em condições naturais: evolução do ciclo de vida do carrapato e coleta de biópsias de pele.

Bovinos da raça zebuína (resistentes) e da taurina (suscetíveis), em número igual a 12 por grupo experimental, foram mantidos em pastagens infestadas pelo carrapato *R. (B.) microplus* por dois anos consecutivos. Os níveis de infestação foram monitorados através de contagens quinzenais das teleógenas fixadas à pele dos bovinos resistentes e suscetíveis durante o período ao quais os animais foram submetidos à infestação natural. As médias obtidas das contagens de carrapatos em animais das duas raças estudadas foram comparadas e os resultados estão demonstrados na figura 2. Como pode ser observado, os níveis de infestação dos animais suscetíveis estiveram significativamente elevados ($P \leq 0,019$) durante o primeiro ano de infestação (Figura 2 A), com valor médio de $28,5 \pm 26$ de carrapatos, quando comparado aos mesmos níveis observados em animais resistentes, que apresentaram valor médio de $3,2 \pm 3,6$ de carrapatos no mesmo período (Tabela 1). Fato semelhante foi observado entre os mesmos animais quanto aos níveis de infestação no ano seguinte, os quais continuaram elevados ($P \leq 0,033$) nos animais suscetíveis, com valor médio de $26,3 \pm 28,9$ de carrapatos, em comparação aos animais resistentes, com o mesmo de $4,3 \pm 5,0$ de carrapatos (Figura 2 A e Tabela 1). Esses resultados confirmaram os fenótipos de resistência e suscetibilidade dos animais experimentais estudados.

4.1.1. Infestação de bovinos resistentes e suscetíveis ao *R. (B.) microplus* em condições naturais: estudo do infiltrado celular recrutado à pele pelos diferentes estágios evolutivos do carrapato.

A fim de determinar a região central da lesão, estruturas que caracterizam a mesma foram localizadas nas secções de pele infestada de ambas as raças estudadas. Dessa forma, foram

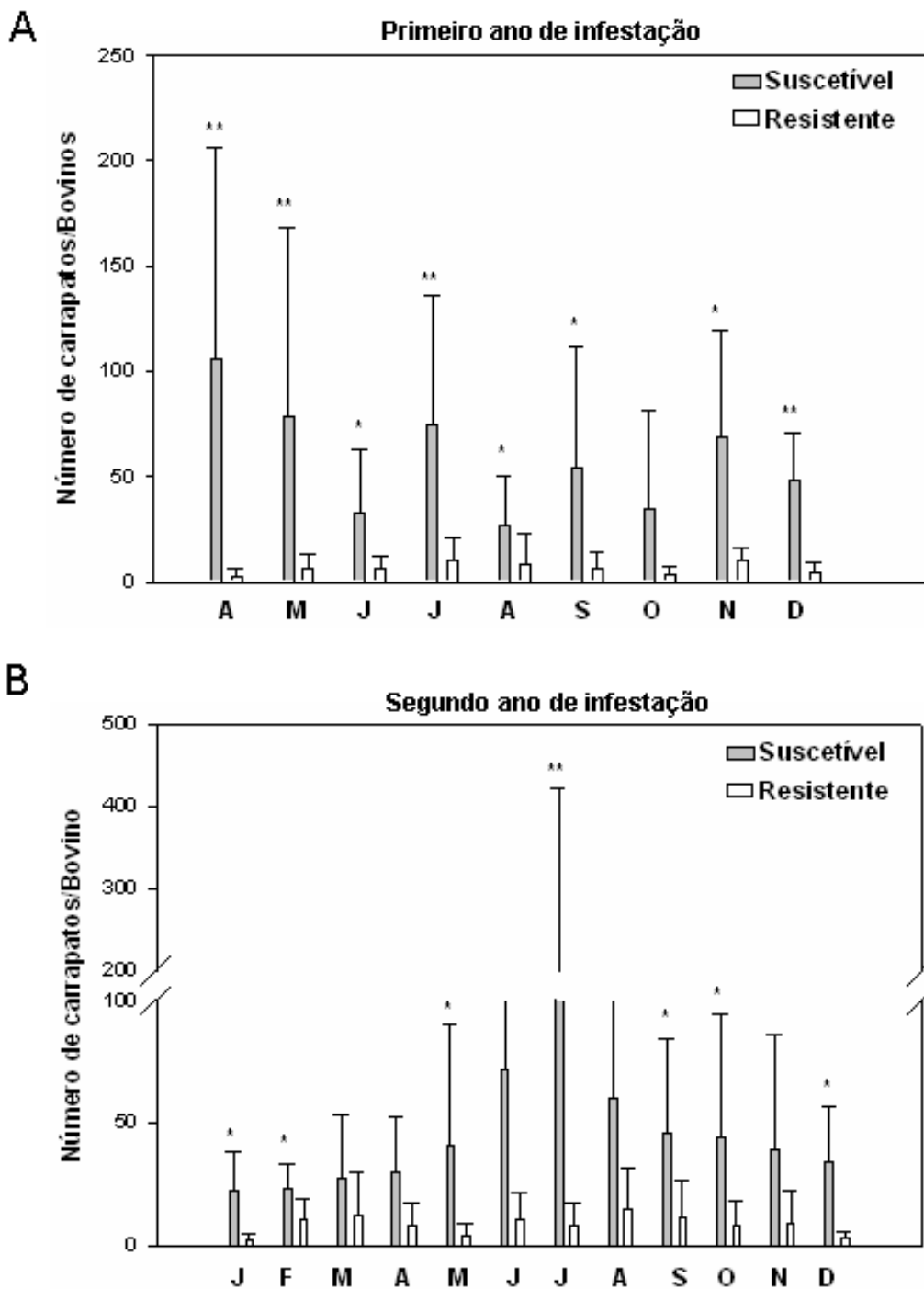


Figura 2. Níveis de infestação monitorados em bovinos resistentes e suscetíveis submetidos a infestação natural pelo carrapato *R. (B.) microplus*. Os gráficos A e B representam o número de teleógenas contadas em bovinos resistentes (barras brancas) e suscetíveis (barras cinzas) mantidos durante dois anos consecutivos em pastagens infestadas pelo *R. (B.) microplus*. (*) indica diferenças estatísticas de $P < 0,05$ entre bovinos resistentes e suscetíveis.

Tabela 2. Nível de infestação observado em bovinos resistentes e suscetíveis submetidos à infestação experimental pelo carrapato *R. (B.) microplus*.

Ano	Fenótipos de Infestação	Número de carrapato/bovinos (Média ± DP)											
					A	M	J	J	A	S	O	N	D
1º Ano	Suscetível				52,9**	39,3**	16,4*	37,7**	13,2*	27,0*	17,0	29,0*	24,0**
					±	±	±	±	±	±	±	±	±
				50,2	44,8	15,0	30,5	11,9	29,0	23,0	19,0	11,4	
	Resistente				1,2**	3,0**	3,3*	5,4**	4,0*	3,0*	1,5	5,2*	2,2**
			±	±	±	±	±	±	±	±	±		
			1,9	3,4	3,0	5,3	7,5	3,9	2,2	2,9	2,4		
		J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
2º Ano	Suscetível	11,3*	11,8*	13,7	15,0	20,4*	36,0	98,0**	29,8	22,7*	22,0*	19,5	16,0*
		±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	7,7	4,9	12,9	11,3	24,4	60,0	113,0	35,3	19,5	25,0	23,5	9,6	
	Resistente	1,2*	5,3*	6,2	4,0	2,1*	5,3	4,1**	7,3	5,9*	4,1*	4,8	1,7*
±		±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	
		1,2	4,2	8,8	4,7	2,4	5,4	4,5	8,6	7,3	5,2	6,7	1,4

(*) Indica diferença estatística significativa de $p < 0,05$ e (**) indica $p = < 0,001$ na comparação entre bovinos suscetíveis e resistentes ao carrapato.

selecionadas para análise somente secções de pele infestada que apresentaram depósito de cimento na superfície da epiderme e ao longo da ruptura da mesma (Figura 3). O canal alimentar sustentado pela deposição do cimento, permitiu o acesso do carrapato à derme superior onde foi formada a cavidade alimentar. Ela é caracterizada pela destruição da derme e pela formação de uma área contendo material necrótico e detritos celulares (Figura 3). A visualização dessas estruturas foi utilizada para selecionar as secções de pele analisadas que fossem representativas do centro da lesão (Zona 1 e/ou 2). Ao redor da cavidade alimentar, foram observadas a formação do infiltrado celular, de edemaciamento do tecido conjuntivo adjacente e hiperemia. Essas características variaram quanto à intensidade entre os estágios evolutivos estudados, sendo moderadas no estágio de (N) (Figura 3 A e 3C) e mais intensas no estágio de (A) (Figura 3 B e 3 D).

O primeiro parâmetro a ser determinado foi a densidade celular do infiltrado nas secções de pele resistente e suscetível selecionadas. Para tal, foi calculada a área total do infiltrado encontrado nas mesmas, utilizando o *software* Image-Pro plus[®], e realizada a contagem global das células encontradas no infiltrado, utilizando retícula para delimitar a área de contagem. Os campos contados foram situados nas zonas 1 e/ou 2 das secções selecionadas e foi determinado o número médio de células contadas presentes no infiltrado. O número médio de células obtido foi multiplicado pela área total do respectivo infiltrado a fim de obter a densidade celular do mesmo em cada secção analisada. Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística, como descrito na seção Materiais e Métodos no item 3.7, e foram feitas comparações entre as raças bovinas e entre os diferentes estágios do carrapato dentro das mesmas.

Os resultados obtidos demonstraram não existir diferenças significativas entre a densidade do infiltrado formado na pele infestada de ambas as raças estudadas (Figura 4). Porém a comparação entre os estágios de (N) e de (A) dentro da mesma raça, demonstrou maior densidade celular ($P \leq 0,001$) no infiltrado encontrado na pele infestada pelo estágio de (A) de

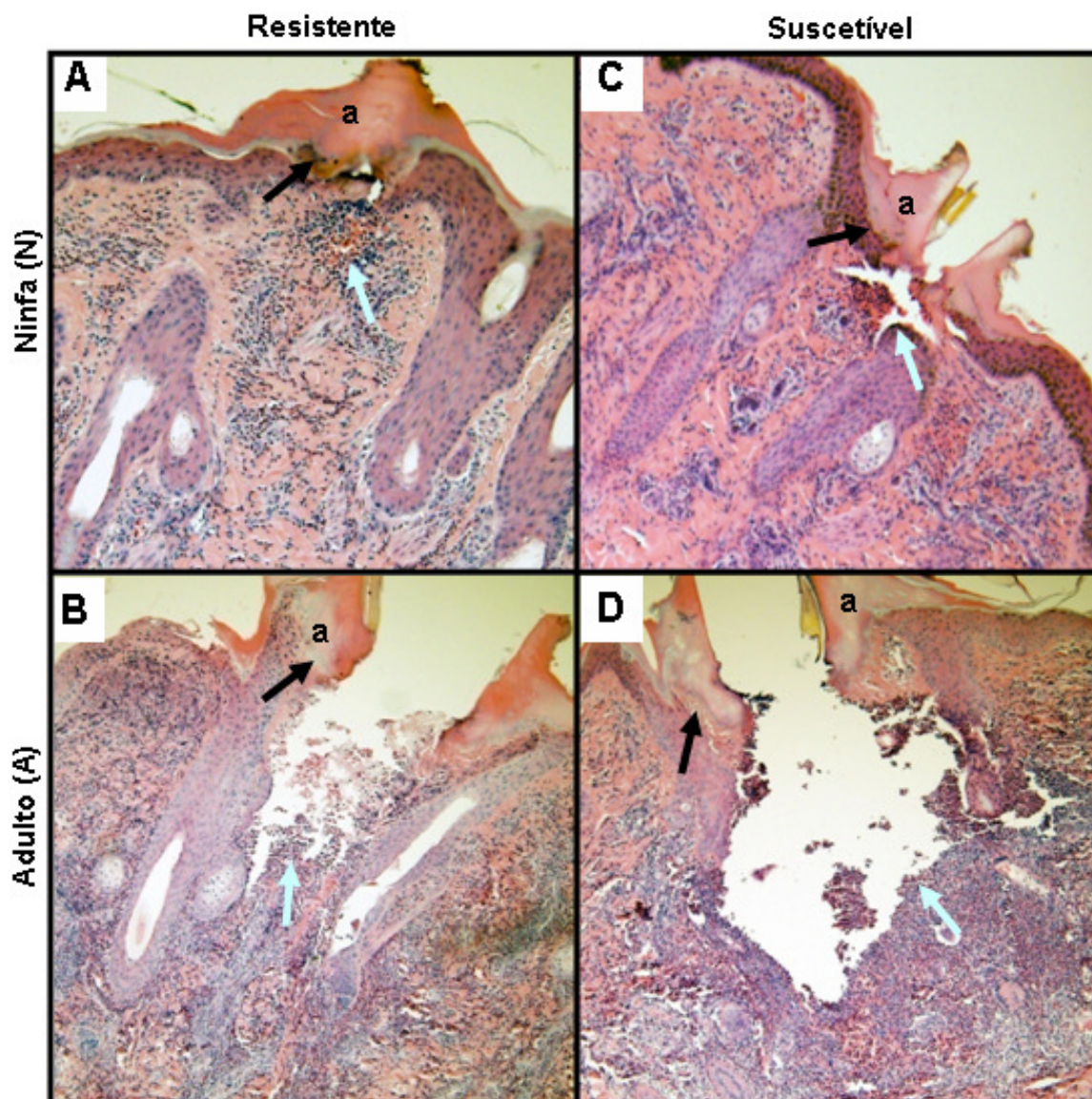


Figura 3. Caracterização do sítio de fixação do carrapato à pele de bovinos resistentes e suscetíveis infestados pelo carrapato *R. (B.) microplus* em condições naturais. A figura acima demonstra o sítio de fixação do carrapato à pele de bovinos resistentes (A e B) e suscetíveis (C e D). A pele infestada por ninfa (A e C) e pele infestada por adulto (B e D) representam o centro da lesão (secções em zona 1). Deposição do cone de cimento na epiderme dos hospedeiros (a), ruptura da epiderme adjacente ao cone de cimento com formação do canal alimentar (setas pretas) e da cavidade alimentar, destruição da derme superior (setas azuis) e presença do infiltrado celular. Cortes histológicos incluídos em parafina e corados pela hematoxilina e eosina (aumento 100x).

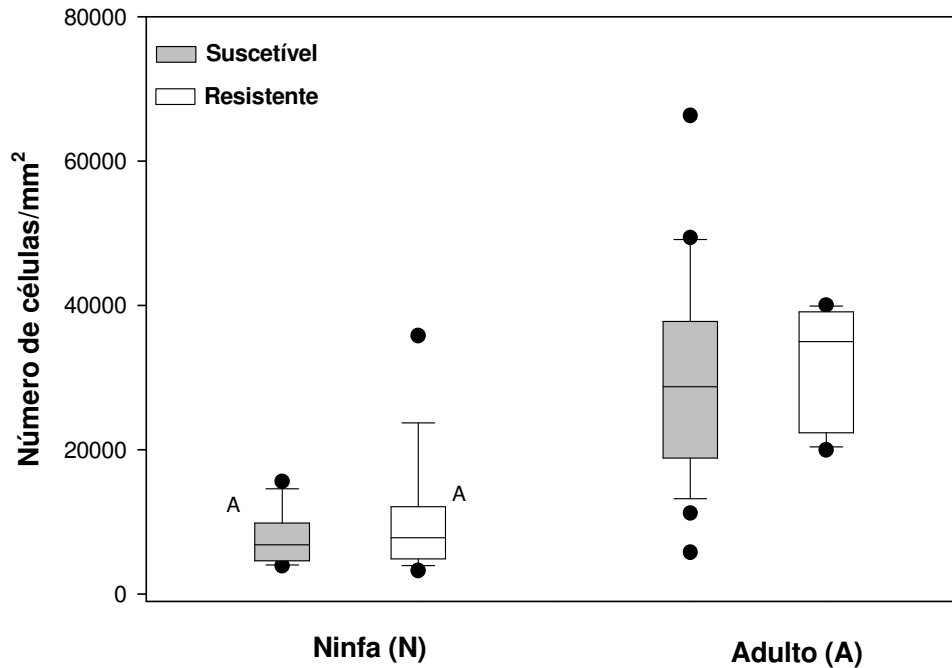


Figura 4. Densidade celular do infiltrado formado na pele de bovinos resistentes e suscetíveis ao carrapato *R. (B.) microplus*. O gráfico acima demonstra a densidade celular do infiltrado formado na pele de bovinos resistentes (caixas brancas) e suscetíveis (caixas cinzas) pelo carrapato pelos estágios de ninfa (N) e adultos (A) infestados em condições naturais. As letras indica diferenças estatísticas significativas ($P < 0,05$) entre as fases do carrapato na mesma raça bovina. (*) representa diferenças estatísticas ($P < 0,05$) entre bovinos resistentes e suscetíveis.

forma semelhante em ambas as raças (Figura 4). A densidade média de $30.226,0 \pm 14.987,0$ do infiltrado na pele da raça suscetível infestada por (A) foi 3,9 vezes maior que a mesma de $7.746,9 \pm 4.148,0$ encontrada na pele desses animais no estágio de (N) (Tabela 2). De maneira semelhante, a densidade média de $31.641,5 \pm 8.611,8$ do infiltrado da pele resistente infestada por (A), apresentou aumento de 3,1 vezes em comparação a densidade de $10.230,1 \pm 9.307,7$ do infiltrado recrutado no estágio de (N) dos mesmos animais (Tabela 2).

4.1.2. Infestação de bovinos resistentes e suscetíveis ao *R. (B.) microplus* em condições: contagem diferencial das células recrutadas à pele pelos diferentes estágios evolutivos do carrapato.

Os diferentes tipos de leucócitos contados na pele de ambas as raças estudadas foram identificados nas secções de pele não infestada e infestada pelos estágios de (N) e (A) coradas por May-Grünwald e Giemsa, como descrito em Materiais e Métodos no item 3.3. Os campos de contagem foram situados dentro das zonas 1 e/ou 2 de lesão das secções de pele infestada de ambas as raças bovinas. Nas secções de pele naïve e pele não infestada, os campos de contagem foram situados ao longo do corte, de forma aleatória.

Entre os granulócitos de interesse, os basófilos foram diferenciados dos demais granulócitos por apresentarem núcleo volumoso, em forma retorcida e irregular, grânulos elétricos densos que, quando corados pela coloração de May-Grünwald e Giemsa, apresentaram tonalidade violeta (Figura 5 A e 5 B). De acordo com as características morfológicas descritas, basófilos foram identificados e contados nas secções de pele analisadas e seu percentual no infiltrado celular foi determinado. O resultado obtido quanto à comparação do percentual médio de basófilos entre as raças demonstrou que o mesmo foi maior ($P = 0,016$) na pele resistente infestada por (A) (Figura 6

A). O percentual médio de $3,1 \pm 2,8\%$ basófilos na pele resistente aumentou 1,2 vezes em relação ao de $2,5 \pm 6,0\%$ desse tipo celular encontrado na pele suscetível (Figura 5 A e 5 C,

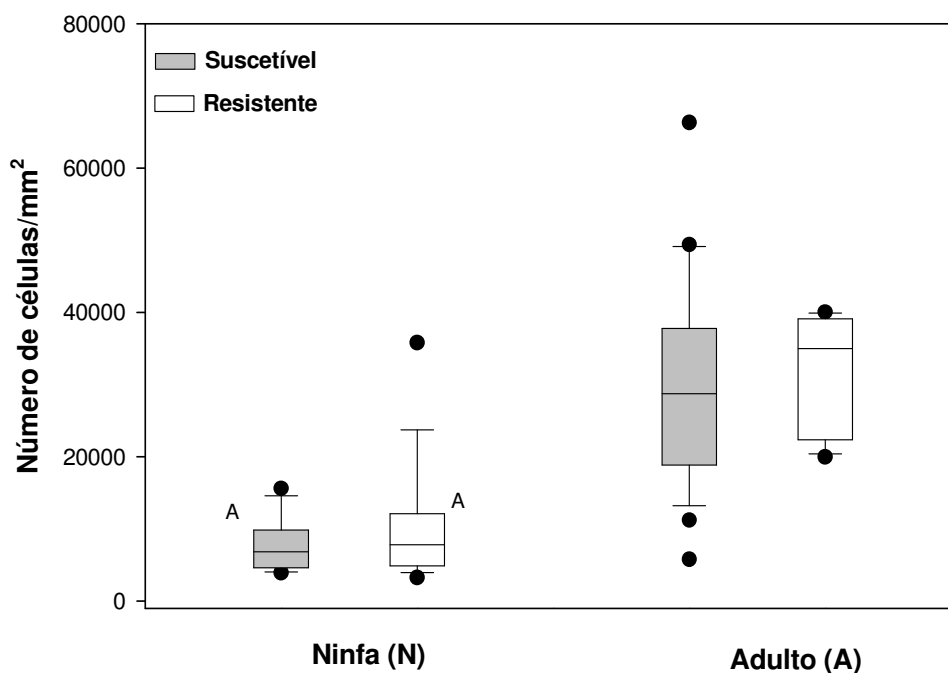


Figura 4. Densidade celular do infiltrado formado na pele de bovinos resistentes e suscetíveis ao carrapato *R. (B.) microplus*. O gráfico acima demonstra a densidade celular do infiltrado formado na pele de bovinos resistentes (caixas brancas) e suscetíveis (caixas cinzas) pelo carrapato pelos estágios de ninfa (N) e adultos (A) infestados em condições naturais. As letras indica diferenças estatísticas significativas ($P < 0,05$) entre as fases do carrapato na mesma raça bovina. (*) representa diferenças estatísticas ($P < 0,05$) entre bovinos resistentes e suscetíveis.

Tabela 2. Densidade celular do infiltrado formado na pele de bovinos resistentes e suscetíveis ao carrapato *R. (B.) microplus*.

Fenótipos de Infestação	Densidade celular/mm ² (Média ± DP)			
	Número de biópsias	Ninfa (N)	Número de biópsias	Adulto (A)
Suscetível	14	7.746,9 ^A	19	30.226,0
		± 4.148,0		± 14.987,0
Resistente	16	10.230,1 ^A	24	31.641,5
		± 9.307,7		± 8.611,8

As letras representam as fases de ninfa (N) e adulto (A) do carrapato fixado na pele de bovinos resistentes e suscetíveis infestados em condições naturais. A presença das letras indica diferenças estatísticas significativas ($P < 0,05$) existentes entre as fases do carrapato dentro da mesma raça.

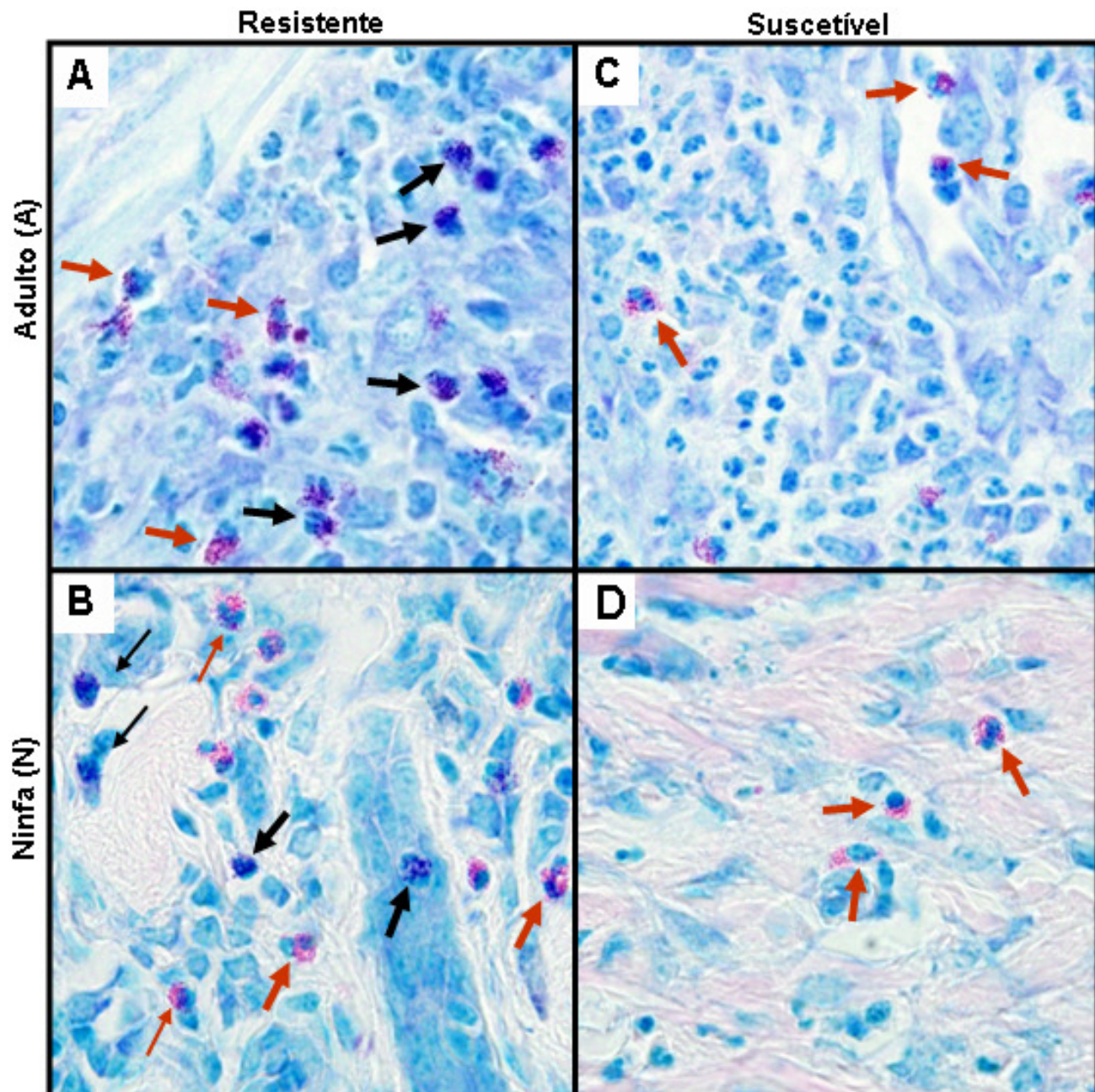


Figura 15. Presença de basófilos e eosinófilos na pele de bovinos resistentes e suscetíveis infestados pelo *R. (B.) microplus* em condições experimentais. Pele de bovinos resistentes (A) e suscetíveis (C) infestadas pelo estágio inicial de ingurgitamento A', setas pretas apontam para basófilos. Pele de bovinos resistentes (B) e suscetíveis (D) infestada pelo carrapato no estágio de N, setas vermelhas apontam para eosinófilos. Cortes histológicos incluídos em parafina e corados por May-Grünwald e Giemsa (aumento de 1000x).

Tabela 3). Embora não significativa ($P = 0,061$), foi observada maior percentual médio de $4,1 \pm 3,9\%$ de basófilos na pele resistente infestada por (N) em relação ao mesmo de $1,8 \pm 2,4\%$ desse tipo celular na pele suscetível (Figura 5 B e 5 C, Tabela 3). A pele infestada por (N) e (A) de ambas as raças apresentou percentuais maiores ($P \leq 0,006$) de basófilos do que a pele não infestada das mesmas (Figura 6 A) demonstrando que esse granulócito foi recrutado somente à pele infestada.

Eosinófilos presentes nas secções analisadas foram identificados por apresentar núcleo bilobado e granulação alaranjada como mostra a figura 5. De acordo com as características morfológicas descritas, eosinófilos foram identificados e contados nas secções de pele analisadas e seu percentual no infiltrado celular foi determinado. Na comparação entre as raças, foi observado maior percentual ($P \leq 0,048$) de eosinófilos na pele resistente infestada por (N) e por (A) em comparação ao mesmo encontrado da pele infestada pelos mesmos estágios (Figura 6 B). A pele suscetível infestada por (A) apresentou porcentagem média de $4,2 \pm 5,6\%$ de eosinófilos, sendo 1,6 vezes menor que a mesma de $6,9 \pm 5,5\%$ desse granulócito na pele resistente também infestada por (A) (Figura 5 A e 5 C, Tabela 3). O mesmo foi observado na pele suscetível infestada por (N), com percentual médio de $7,3 \pm 6,8\%$ de eosinófilos, esse valor foi 2,0 vezes menor ($P = 0,013$) que o mesmo de $14,1 \pm 10,4\%$ desse granulócito na pele resistente no estágio de (N) (Figuras 5 A e 5 B e Tabela 3). Apenas a pele suscetível infestada por (A) apresentou percentual médio de $4,2 \pm 5,6\%$ de eosinófilos menor ($P = < 0,001$) que o de $15,2 \pm 10,4\%$ dessas células no respectivo controle (Tabela 3).

Os mastócitos contados nas secções analisadas foram identificados por apresentar núcleo monomórfico, grande e circular e granulação fina e delicada de tonalidade violeta. De acordo com as características morfológicas descritas, mastócitos foram identificados e contados nas secções de

Tabela 3. Contagem diferencial de basófilos e eosinófilos na pele de bovinos resistentes e suscetíveis infestados pelo *R. (B.) microplus* em condições naturais.

Tipo Celular	Fenótipos de Infestação	Porcentagem de células/mm ² (Média ± DP)					
		Número de biopsias	Não infestada (C')	Ninfa (N)	Número de biopsias	Não Infestada (C'')	Adulto (A)
Basófilos	Suscetível	14	0,2 ^N	1,8	19	0,1 ^A	2,5*
			±	±		±	±
	Resistente	16	0,5	2,4	24	0,3	6,0
			±	±		±	±
Eosinófilos	Suscetível	14	0,8 ^N	4,1	19	0,1 ^A	3,1*
			±	±		±	±
	Resistente	16	12,2 ^N	7,3*	24	15,2 ^A	4,2*
			±	±		±	±
Resistente	16	9,1	6,8	24	10,4	5,6	
		±	±		±	±	
			7,7 ^N	14,1* ^A		11,6	6,9*
			±	±		±	±
			8,1	10,4		9,1	5,5

* Indica diferença estatística significativa ($P < 0,05$) entre bovinos suscetíveis e resistentes ao carrapato.

As letras representam os estágios de ninfa (N) e adulto (A) do carrapato fixado na pele de bovinos resistentes e suscetíveis infestados experimentalmente. Pele não infestada coletadas no estágio de N (C') e pele não infestada coletada na fase de A (C'') foram utilizadas como controles. A presença das letras indica diferenças estatísticas significativas ($P < 0,05$) entre as fases do carrapato na mesma raça bovina.

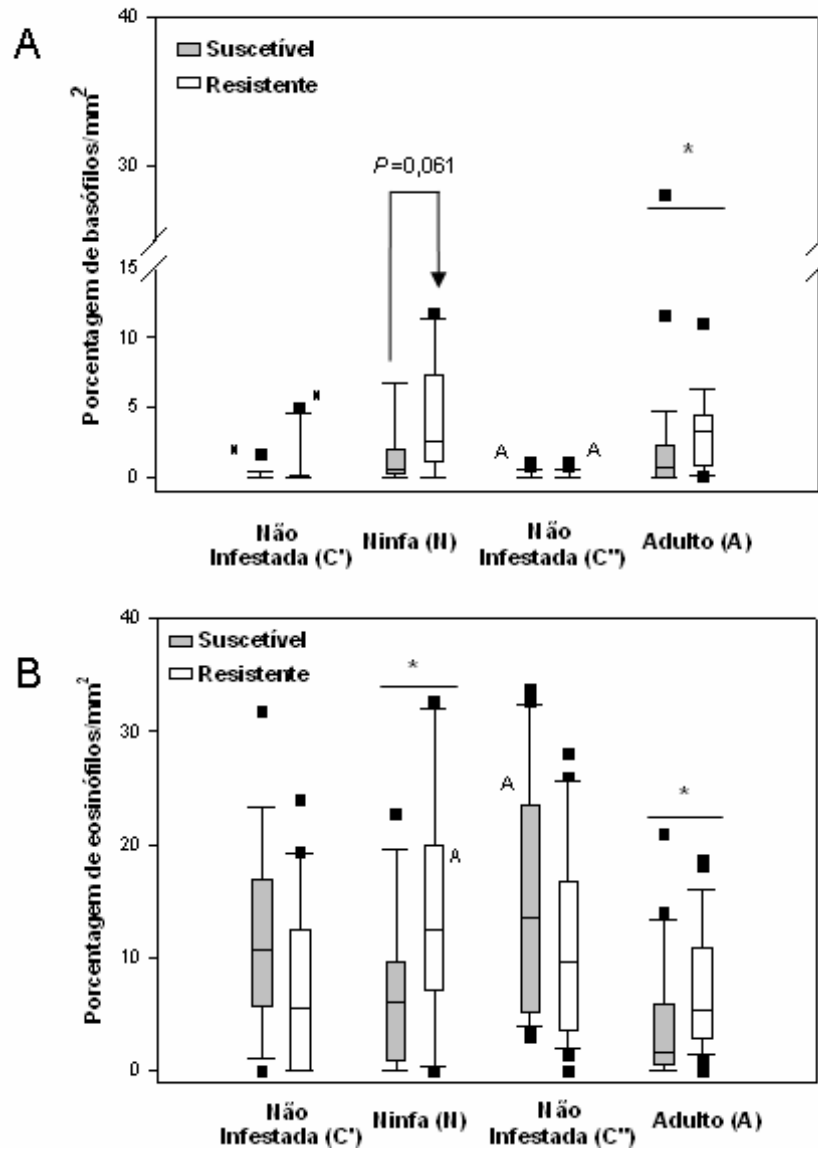


Figura 6. Contagem diferencial de basófilos e eosinófilos na pele de bovinos resistentes e suscetíveis infestados pelo *R. (B.) microplus* em condições naturais. Os gráficos demonstram a porcentagem de basófilos (A) e de eosinófilos (B) contados na pele de bovinos resistentes (caixas brancas) e suscetíveis (caixas cinzas) infestados naturalmente pelo carrapato pelos estágios de N e adulto A. Pele não infestada coletadas na fase de ninfa C' e pele não infestada coletada na fase de adulto C'' foram utilizadas como controles. A presença das letras indica diferenças estatísticas significativas ($P < 0,05$) entre as fases do carrapato dentro da mesma raça bovina. (*) representa diferenças estatísticas ($P < 0,05$) entre bovinos resistentes e suscetíveis.

pele analisadas, coradas por May-Grünwad e Giemsa, e seu percentual no infiltrado celular foi determinado. Os resultados obtidos demonstraram redução significativa no percentual médio de mastócitos encontrados nas secções de pele infestada por (N) e por (A) de ambas as raças em comparação ao percentual encontrado nos respectivos controles (Figura 7 A). A pele suscetível infestada por (N), com percentual médio de $2,0 \pm 2,3\%$ de mastócitos, apresentou redução de 8,7 vezes ($P = 0,008$) que o mesmo de $17,4 \pm 8,0\%$ desse tipo celular que a pele controle (Figura 8 D e 8 E, Tabela 4). Assim com também foi 17,1 vezes menor ($P = 0,009$), o percentual médio de $1,7 \pm 1,9\%$ de mastócitos na pele resistente infestada por (N) em comparação ao mesmo de $29,0 \pm 8,2\%$ desse granulócito no respectivo controle (Figura 8 A e 8 B, Tabela 4). Fenômeno semelhante foi observado na pele suscetível infestada por (A), com percentual médio de $2,0 \pm 4,2\%$ de mastócitos, que apresentou redução de 11,1 vezes ($P = < 0,001$) no mesmo de $22,1 \pm 9,6\%$ desse granulócito encontrado no controle suscetível (Figura 8 D e 8 F, Tabela 4). O mesmo foi observado na pele resistente infestada por (A), com percentual médio de $0,8 \pm 2,0\%$ de mastócitos, apresentando redução de 34,3 vezes em comparação ao mesmo de $27,4 \pm 9,7\%$ desses granulócitos encontrados no controle resistente (Figuras 8 A e 8 C, Tabela 4).

A fim de confirmar os resultados descritos acima referentes ao percentual médio de mastócitos, secções de pele não infestada e infestada naturalmente por (N) e (A) de ambas as raças foram coradas pelo azul de toluidina, coloração específica para esse tipo celular (Figura 9). Assim como observado na figura 7 B, não houve diferenças significativas no percentual de mastócitos encontrados entre a pele resistente e suscetível em todos os pontos analisados. A comparação entre a pele infestada e a não infestada confirmou os resultados obtidos nas secções coradas pelo May-Grünwald e Giemsa analisadas. A pele resistente infestada por (N), com densidade média de $0,6 \pm 0,6\%$ de mastócitos, mostrou-se 30,0 vezes menor ($P = < 0,001$) a de $18,0 \pm 6,5\%$ desses

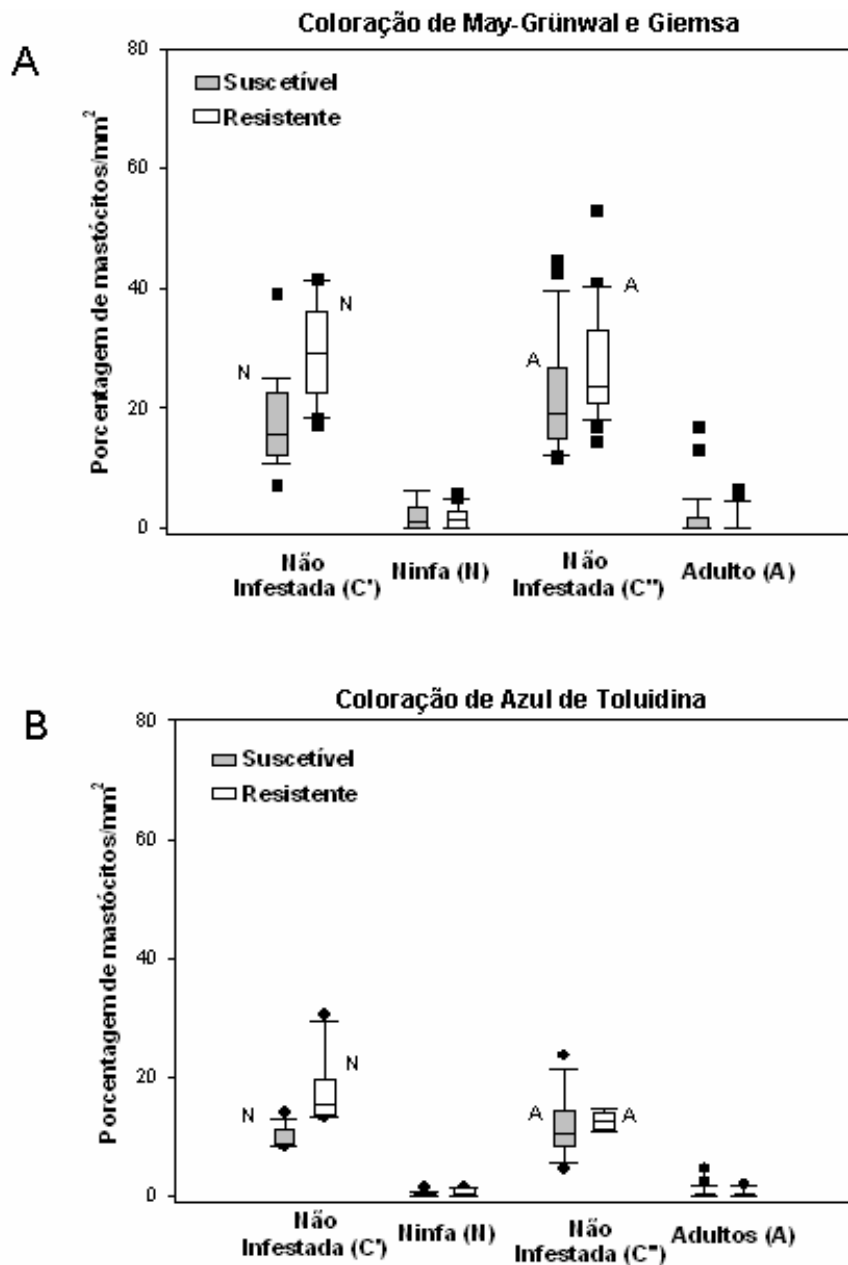


Figura 7. Contagem diferencial de mastócitos na pele de bovinos resistentes e suscetíveis infestados pelo *R. (B.) microplus* em condições naturalmente. Os gráficos demonstram a porcentagem de mastócitos em secções coradas pelo May-Grünwald Giemsa (A) e secções coradas pelo Azul de Toluidina (B) na pele de bovinos resistentes (caixas brancas) e suscetíveis (caixas cinzas) infestados pelo carrapato nos estágios ninfa (N) e adultos (A). Pele não infestada coletadas na fase de N (C') e pele não infestada coletada pelo estágio de A (C'') foram utilizadas como controles. A presença das letras indica diferenças estatísticas significativas ($P < 0,05$) entre os estágios do carrapato dentro da mesma raça bovina. (*) representa diferenças estatísticas ($P < 0,05$) entre bovinos resistentes e suscetíveis.

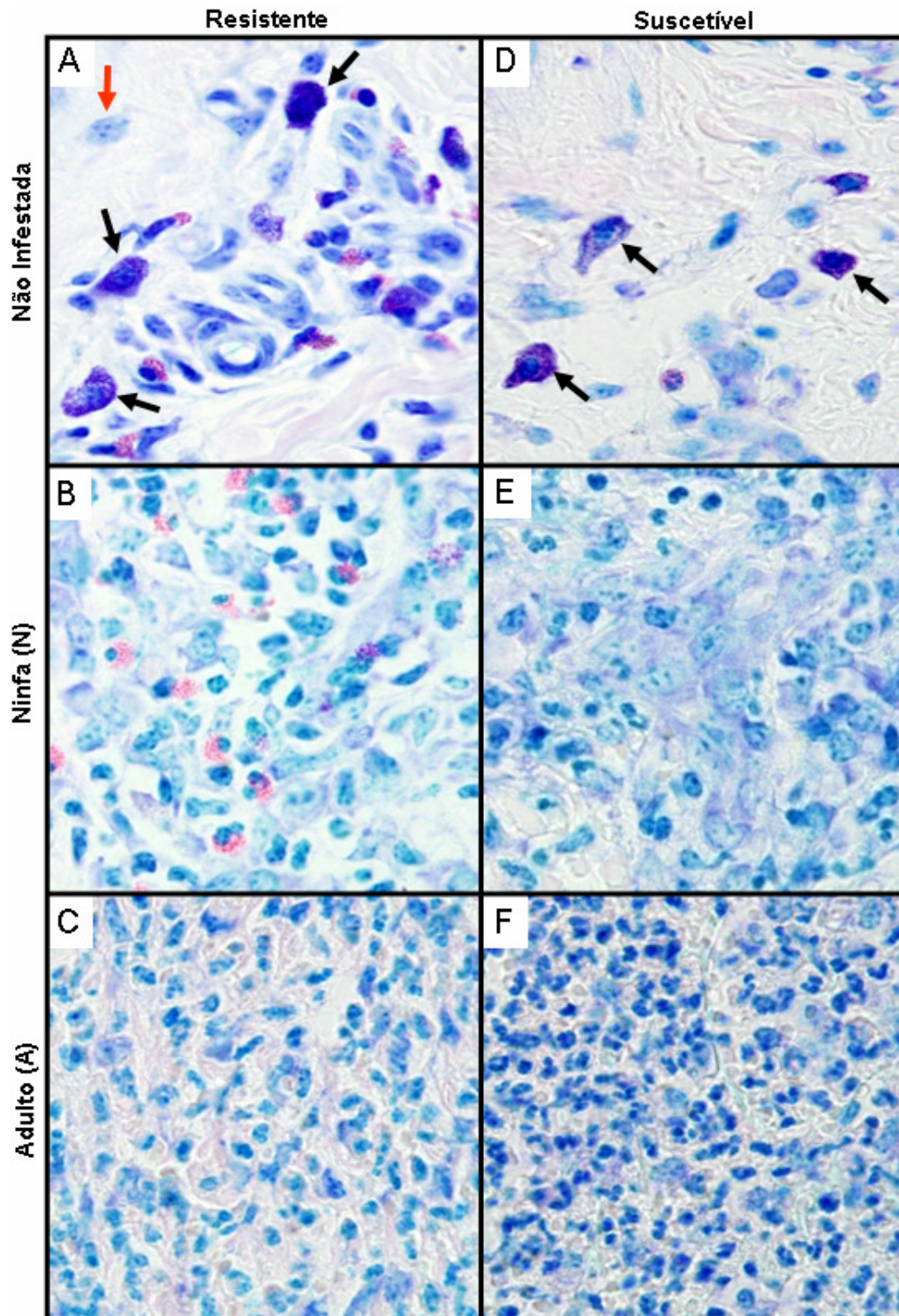


Figura 8. Presença de mastócitos na pele de bovinos resistentes e suscetíveis infestados pelo carrapato *R. (B.) microplus* em condições naturais. Pele não infestada de bovinos resistentes (A) e suscetíveis (D); pele infestada de bovinos resistentes (B) e de suscetíveis (E) pelo carrapato no estágio de N; pele de bovinos resistentes (C) e suscetíveis (F) infestada pelo estágio de A. Setas pretas apontam para mastócitos. Cortes histológicos incluídos em parafina e corados por May-Grünwald e Giemsa (aumento de 1000x).

Tabela 4. Contagem diferencial de mastócitos na pele de bovinos resistentes e suscetíveis infestados pelo *R. (B.) microplus* em condições naturalmente

Tipos de Coloração	Fenótipos de Infestação	Porcentagem de células/mm ² (Média ± DP)					
		Número de biopsias	Não infestada (C')	Ninfa (N)	Número de biopsias	Não Infestada (C'')	Adulto (A)
Mastócitos (May-Grünwal Geimsa)	Suscetível	14	17,4 ^N	2,0	19	22,1 ^A	2,0
			±	±		±	±
	Resistente	16	8,0	2,3	24	9,6	4,2
			±	±		±	±
Mastócitos (Azul de Toluidina)	Suscetível	14	29,0 ^N	1,7	19	27,4 ^A	0,8
			±	±		±	±
	Resistente	16	8,2	1,9	24	9,7	2,0
			±	±		±	±
	Suscetível	14	9,8 ^N	0,3	19	11,9 ^A	0,5
			±	±		±	±
	Resistente	16	2,0	0,4	24	5,9	1,2
			±	±		±	±
	Resistente	16	18,0 ^N	0,6	24	12,6 ^A	0,4
			±	±		±	±
			6,5	0,6		1,6	0,7

As letras representam os estágios de ninfa (N) e adulto (A) do carrapato fixado na pele de bovinos resistentes e suscetíveis infestados. Pele não infestada controle (C') do estágio de ninfa e pele não infestada controle (C'') do estágio de A. A presença das letras indica diferenças estatísticas significativas ($P < 0,05$) entre os estágios do carrapato dentro da mesma raça bovina.

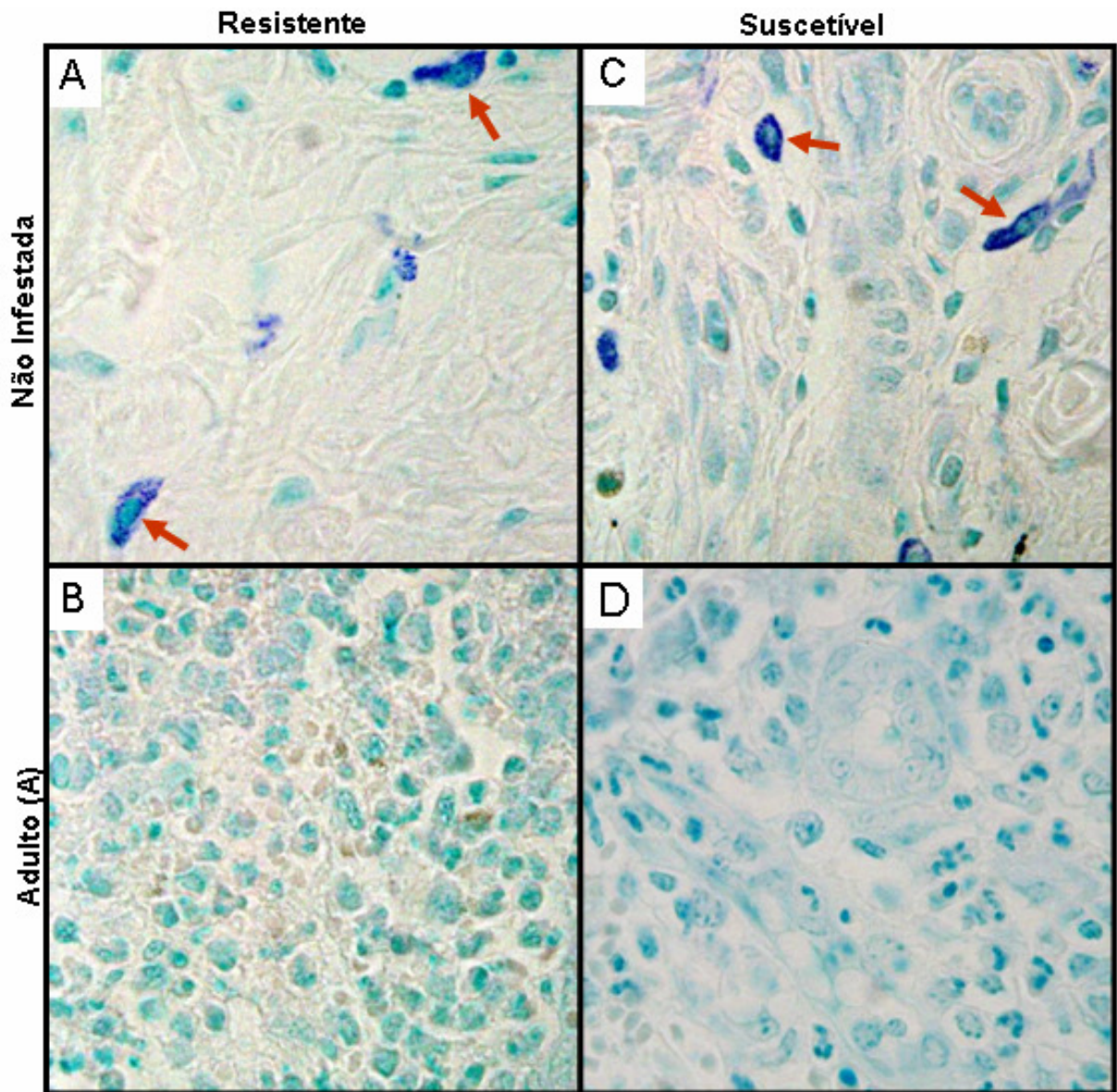


Figura 9. Presença de mastócitos na pele de bovinos resistentes e suscetíveis infestados pelo *R. (B.) microplus* em condições naturais. Pele não infestada de bovinos resistentes (A) e suscetíveis (C), setas vermelhas apontam para mastócitos. Pele de bovinos resistentes (B) e suscetíveis (D) infestada por A. Cortes histológicos fixados em parafina e corados por Azul de Toluidina (aumento de 1000x).

granulócitos na pele controle (Tabela 4). A pele suscetível infestada por (N), com percentual médio de $0,3 \pm 0,4\%$ de mastócitos, apresentou redução de 32,7 vezes ($P = 0,003$) em relação comparação

ao de $9,8 \pm 2,0\%$ desses granulócitos no controle suscetível (Tabela 4). De forma semelhante, o percentual médio de $0,4 \pm 0,7\%$ de mastócitos na pele resistente infestada por (A) foi 31,5 vezes menor ($P = 0,003$) que o percentual de $12,6 \pm 1,6\%$ desses granulócitos encontrados no controle resistente (Figuras 9 A e 9 B, Tabela 4). E na pele suscetível, com porcentagem média de $0,5 \pm 1,2\%$ de mastócitos, houve redução de 23,8 vezes ($P = <0,001$) em comparação a porcentagem de $11,9 \pm 5,9\%$ dos mesmos no respectivo controle (Figura 9 C e 9 D, Tabela 4).

Os neutrófilos foram identificados nas secções de pele analisada através do núcleo polimórfico e ausência de tonalidade dos grânulos (Figura 10). Dessa forma, foi realizada a contagem dos polimorfonucleares encontrados nas secções de pele analisadas de ambas as raças estudadas. Os resultados obtidos, apresentados na figura 11 A, demonstram não existirem diferenças significativas no percentual médio de neutrófilos encontrado entre a pele resistente e suscetível. Já a comparação entre os estágios do carrapato demonstrou que a pele resistente infestada pelo estágio de (N), com percentual médio de $29,9 \pm 14,7\%$ de neutrófilos, foi 1,8 vezes menor ($P = 0,006$) que a mesma no estágio de (A), com percentual médio de $54,1 \pm 20,3\%$ desse granulócito (Figura 10 A e 10 C, Tabela 5). O mesmo foi observado na pele suscetível infestada por (N), com percentual médio de $33,8 \pm 20,6\%$ de polimorfonucleares, que se mostrou 1,7 vezes menor ($P = < 0,001$) que o percentual de $58,6 \pm 27,3\%$ desse tipo celular na mesma no estágio de (A) (Figuras 10 C e 10 D, Tabela 5). A pele resistente infestada por (N), com porcentagem média de $29,9 \pm 14,7\%$ de neutrófilos, e por (A), com média de $54,1 \pm 20,3\%$ do mesmo, foram 24,9 vezes e 67,6 vezes maiores ($P = < 0,001$) que o percentual médio de $1,2 \pm 2,3$ e de $0,8 \pm 1,6$ desse tipo celular nos respectivos controles resistentes (Tabela 5). De forma semelhante, a pele suscetível infestada por (N), com média de $33,8 \pm 20,6$ de neutrófilos, e por (A), com média de $58,6 \pm 27,3$ do mesmo,

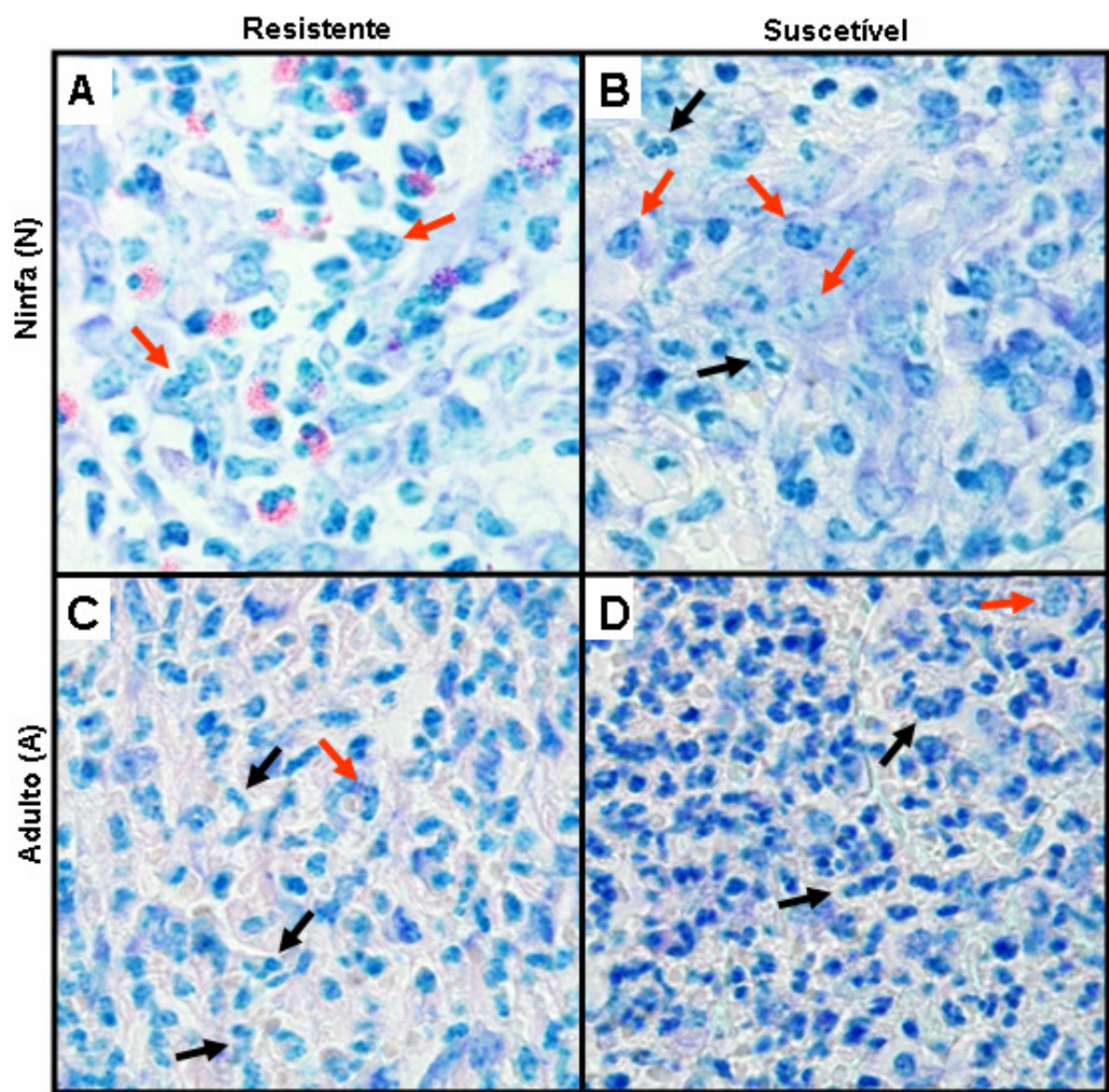


Figura 10. Presença de neutrófilos e células mononucleares na pele de bovinos resistentes e suscetíveis infestados pelo carrapato *R. (B.) microplus* em condições naturais. Pele infestada de bovinos resistentes A e suscetíveis (C) pelo estágio de N. Pele infestada de bovinos resistentes (C) e de suscetíveis (D) pelo carrapato no estágio de A. Setas pretas indicam a presença de neutrófilos e setas vermelhas a de células mononucleares. Cortes histológicos fixados em parafina e corados por May-Grünwald e Giemsa (aumento de 1000x).

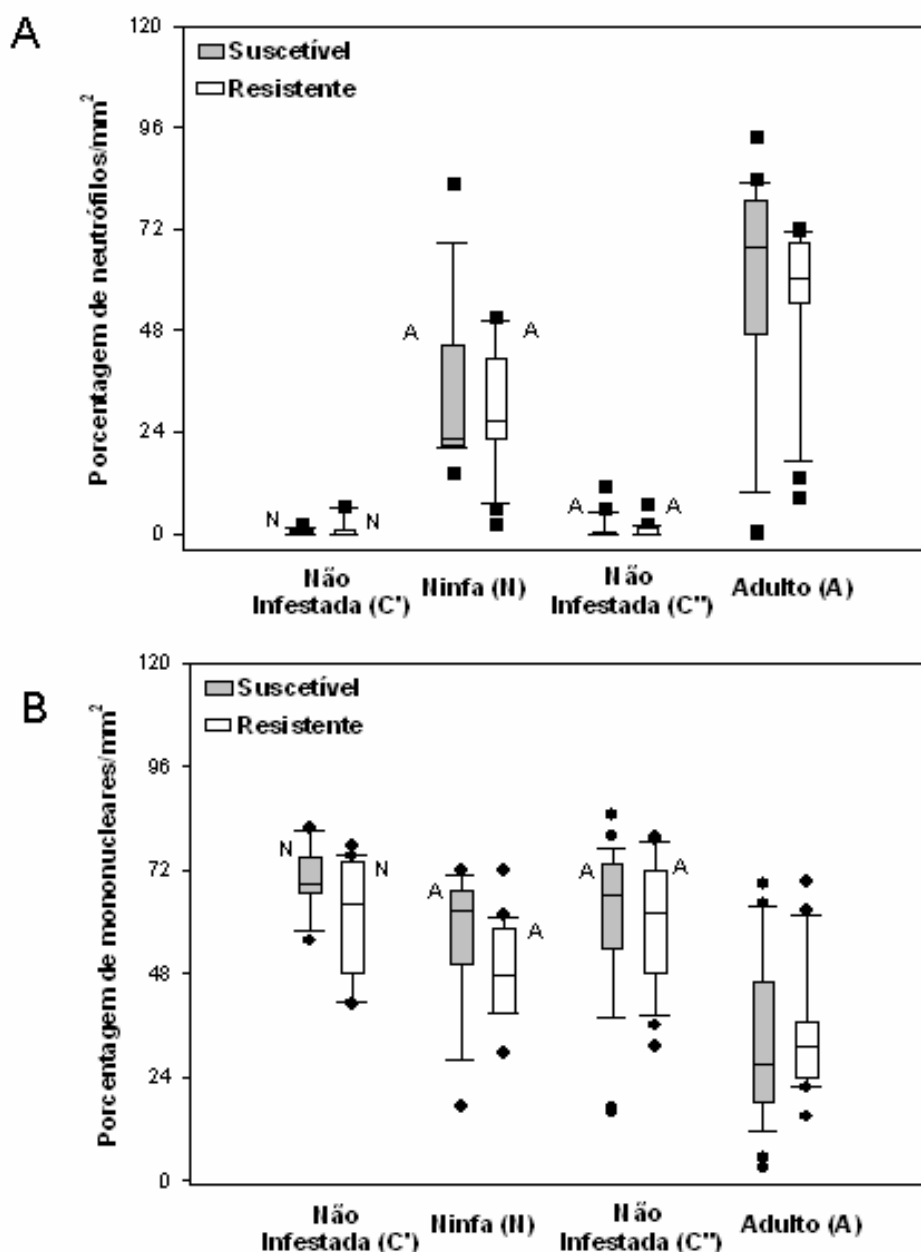


Figura 11. Contagem diferencial de neutrófilos e de células mononucleares na pele de bovinos resistentes e suscetíveis infestados pelo *R. (B.) microplus* em condições naturais. Os gráficos demonstraram a porcentagem de neutrófilos (A) e de células mononucleares (B) na pele de bovinos resistentes (caixas brancas) e suscetíveis (caixas cinzas) infestados pelo carrapato nos estágios de N e adulto A. Pele não infestada coletadas no estágio de ninfa C' e no de adulto C'' foram utilizadas como controles. As letras indica diferenças estatísticas significativas ($P < 0,05$) entre as fases do carrapato dentro da mesma raça bovina.

Tabela 5. Contagem diferencial de neutrófilos e de células mononucleares na pele de bovinos resistentes e suscetíveis infestados pelo *R. (B.) microplus* em condições naturais.

Tipo Celular	Fenótipos de Infestação	Porcentagem de células/mm ² (Média ± DP)					
		Número de biopsias	Não infestada (C')	Ninfa (N)	Número de biopsias	Não Infestada (C'')	Adulto (A)
Neutrófilos	Suscetível	14	0,6 ^N ± 0,6	33,8 ^A ± 20,6	19	1,1 ^A ± 2,6	58,6 ± 27,3
		16	1,2 ^N ± 2,3	29,9 ^A ± 14,7		24	0,8 ^A ± 1,6
	Resistente	14	69,6 ^N ± 7,8	55,1 ^A ± 17,4	19	61,6 ^A ± 17,4	32,7 ± 19,7
		16	61,4 ^N ± 13,1	49,3 ^A ± 11,2		24	59,8 ^A ± 14,8

As letras representam as fases de N e A do carrapato fixado na pele de bovinos resistentes e suscetíveis infestados experimentalmente. Pele não infestada coletadas na fase de N (C') e pele não infestada coletada na fase de A (C'') foram utilizadas como controles. A presença das letras indica diferenças estatísticas significativas ($P < 0,05$) entre as fases do carrapato na mesma raça bovina.

foram 56,3 vezes e 53,2 vezes maiores ($P = < 0,001$) que o percentual médio de $0,6 \pm 0,6$ e de $1,1 \pm 2,6$ do mesmo tipo celular nos respectivos controles (Tabela 5).

As células mononucleares encontradas nas secções analisadas foram diferenciadas dos granulócitos por apresentar núcleo monomórfico, ovalado, grande em relação ao citoplasma, contendo grumos de cromatina com propriedades basofílicas mais intensas e pela ausência de grânulos (Figura 10). Adotando essas características de identificação, as células mononucleares foram contadas nas secções de pele analisadas. Os resultados obtidos apresentados na figura 11 B, demonstram não existirem diferenças significativas entre a porcentagem média de células mononucleares encontradas na pele resistente e na suscetível. Já a comparação entre a pele resistente infestada por (N), com média de $49,3 \pm 11,2 \%$ de mononucleares, mostrou-se 1,4 vezes maior ($P = 0,004$) que a porcentagem média de $35,1 \pm 15,5\%$ desses tipos celulares encontrado na mesma raça infestada por (A) (Figuras 11 A e 11 B, Tabela 5). O mesmo foi observado na pele suscetível, com média de $55,1 \pm 17,4\%$ de mononucleares, 1,7 vezes maior ($P = 0,001$) que a porcentagem média de $32,7 \pm 19,7\%$ dessas celular na mesma infestada por (A) (Figuras 11 C e 11 D, Tabela 5). A pele suscetível infestada por (N), com porcentagem média de $55,1 \pm 17,4\%$ de mononucleares, e por (A), com média de $32,7 \pm 19,7\%$ do mesmo, foram 1,2 vezes e 1,9 vezes menores ($P \leq 0,008$) que o percentual médio de $69,6 \pm 7,8$ e de $61,6 \pm 17,4\%$ desse tipo celular nos respectivos controles resistentes (Figura 11 B e Tabela 5). De forma semelhante, a pele resistente infestada por (N), com média de $49,3 \pm 11,2\%$ de mononucleares, e por (A), com média de $35,1 \pm 15,5\%$ dos mesmos, foram 1,2 vezes e 1,7 vezes maiores ($P = < 0,009$) que o percentual médio de $61,4 \pm 13,1\%$ e de $59,8 \pm 14,8\%$ do mesmo tipo celular nos respectivos controles (Tabela 5).

4.2. Infestação de bovinos resistentes e suscetíveis ao *R. (B.) microplus* em condições experimentais: evolução do ciclo de vida do carrapato e coleta de biópsias de pele.

No experimento a seguir, bovinos da raça zebuína (resistentes a infestação) e da raça taurina (suscetíveis), naïves, em número igual a 4, foram infestados pela primeira vez com 10.000 larvas de *R. (B.) microplus* em condições experimentais. O nível de infestação foi mensurado através da contagem de teleógenas ingurgitadas realizada 19 dias após o início da infestação. Os dados obtidos foram analisados e o resultado obtido demonstrou nível elevado de infestação elevado, com $p < 0,029$, em bovinos da raça suscetível quando comparados ao nível de infestação observado nos bovinos da raça resistente (Figura 12). Enquanto os primeiros apresentaram em média $597,0 \pm 208,0$ carrapatos, os seguintes apresentaram em média $42,5 \pm 35,8$ do ectoparasito (Tabela 6). Foi possível estimar que cerca de 5,0% das larvas infestantes liberadas nos bovinos suscetíveis conseguiram chegar até o estágio de fêmeas ingurgitadas, enquanto que nos animais resistentes apenas 0,5% das mesmas chegaram ao estágio de teleógena.

Durante o período no qual transcorreu a infestação, as biópsias de pele parasitadas pelos estágios de larva, ninfa e adulto do carrapato foram coletadas nos animais experimentais estudados. Para tal, a primeira coleta foi feita 48 horas após a liberação das larvas infestantes a fim de obter biópsias de pele parasitada por larvas ingurgitadas (L). A segunda coleta, realizada para obter pele parasitada por ninfa ingurgitada (N), foi feita uma semana após a primeira coleta. Respeitando o mesmo intervalo de tempo, a terceira coleta foi realizada para obter pele parasitada por carrapatos adultos no início de ingurgitamento (A') e a quarta coleta foi feita três dias após a terceira, com o intuito de coletar pele parasitada por teleógenas em final de ingurgitamento (A''). Paralelamente foram coletadas biópsias de pele não infestadas (C''), utilizadas como controles; assim como as biópsias de pele naïve, coletadas antes do início da infestação, que também foram utilizadas como controles. Em seguida, todas as biópsias de pele coletadas foram preservadas como descrito em

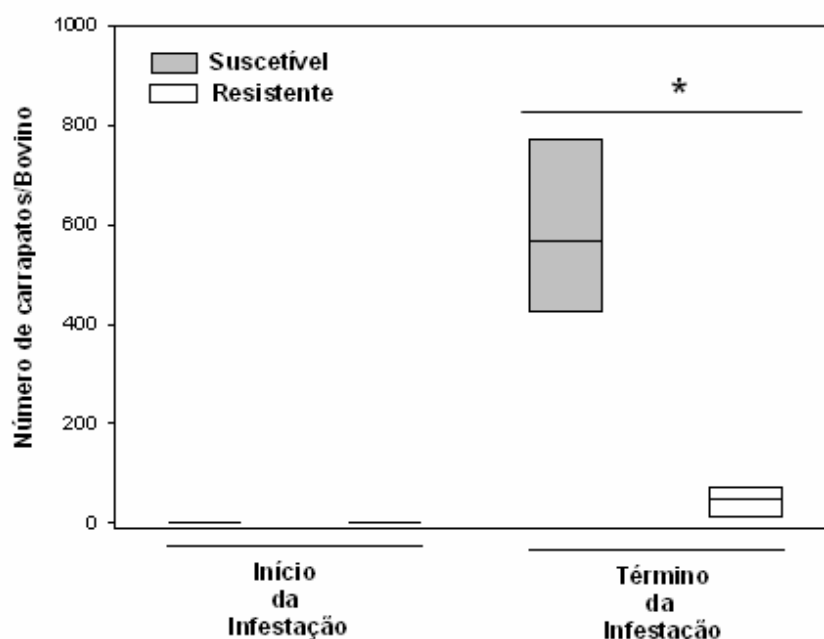


Figura 12. Nível de infestação observado em bovinos resistentes e suscetíveis infestados pelo carrapato *R. (B) microplus* em condições experimentais. O gráfico acima representa o número médio de teleógenas ingurgitadas fixadas na pele de bovinos resistentes (caixa branca) e suscetíveis (caixa cinza) 19 dias após a liberação de 10.000 larvas infestantes. (*) indica diferenças estatísticas de $P < 0,05$ entre bovinos resistentes e suscetíveis.

Tabela 6. Nível de infestação observado em bovinos resistentes e suscetíveis infestados pelo carrapato *R. (B) microplus* em condições experimentais.

Fenótipos de Infestação	N	Número de carrapatos (Média ± DP)	
		Início da infestação	Término da infestação
Suscetível	4	0,0 ± 0,0	597,0 ± 208,0*
Resistente	4	0,0 ± 0,0	42,5 ± 35,8*

* Indica diferenças estatísticas significativas ($P < 0,05$) bovinos resistentes e suscetíveis e ao carrapato.

Materiais e Métodos no item 3.2, e processadas de acordo com técnicas histológicas e imunohistoquímicas descritas na seção Materiais e Métodos nos itens 3.1, 3.3 e 3.5 respectivamente. Os resultados obtidos serão descritos a seguir.

4.2.1. Infestação de bovinos resistentes e suscetíveis ao *R. (B.) microplus* em condições experimentais: estudo da densidade celular do infiltrado recrutado à pele pelos estágios evolutivos do carrapato.

O processo de fixação do carrapato à pele das raças bovinas infestadas em condições experimentais foi semelhante ao que foi observado em condições naturais de infestação. Dessa forma, foram utilizadas as mesmas características para selecionar as secções de pele infestadas pelos estágios de larva (L), ninfa (N) e adultos no início de ingurgitamento (A') e final de ingurgitamento (A''). O cálculo da densidade celular média do infiltrado encontrado nas secções analisadas foi obtido como descrito no item 4.1.1.

A comparação entre densidade celular do infiltrado entre a pele resistente e suscetível demonstrou não existir diferenças significativas entre elas em nenhuma dos estágios de infestação estudados (Figura 13). Mas foi observada tendência de aumento ($P = 0,057$) na densidade média na pele resistente infestada pelo estágio de (A') em comparação a pele suscetível no mesmo estágio (Figura 13). A pele resistente, com média de $16.934,1 \pm 7.459,0$, foi 2,2 vezes mais densa que a média de $7.691,5 \pm 2.478,7$ na pele suscetível (Tabela 7). A comparação entre os estágios evolutivos de (L), (N), (A') e (A'') demonstrou aumento gradual na densidade celular média do infiltrado, sendo o estágio adulto o com maior densidade (Figura 13). A pele suscetível no início do ingurgitamento (A'), embora tenha apresentado baixa densidade celular, média de $7.691,5 \pm 2.478,7$, aumentou 8 vezes ($P < 0,029$) na mesma suscetível infestada pelo de estágio (A''), com média de $61.970,9 \pm 47.712,3$ (Tabela 7). A pele resistente infestada pelo estágio de (A'), com

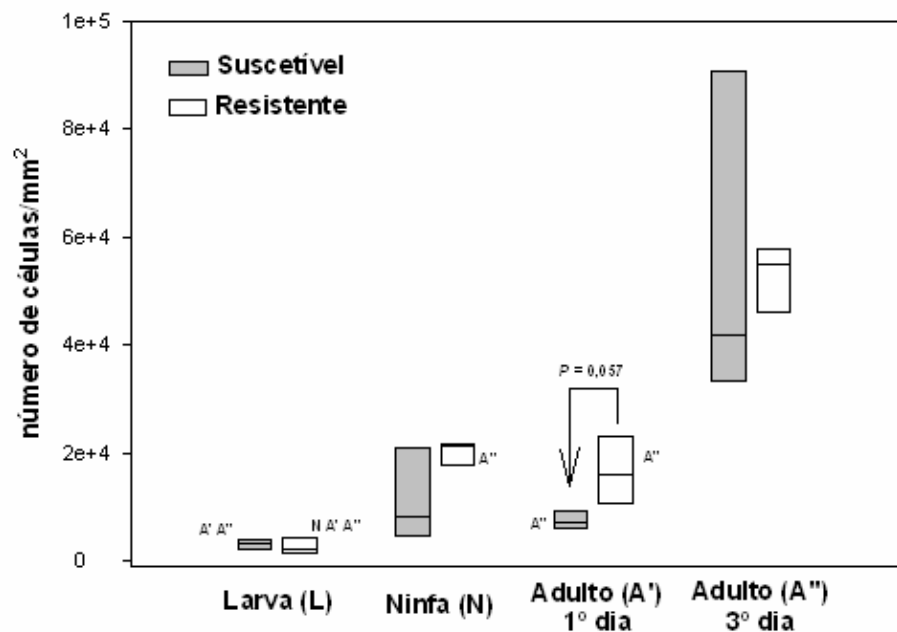


Figura 13. Densidade celular do infiltrado recrutado à pele de bovinos resistentes e suscetíveis no local de fixação do carrapato *R. (B.) microplus*. O gráfico acima demonstra a densidade celular do infiltrado formado na pele de bovinos resistentes (caixas brancas) e suscetíveis (caixas cinzas) submetidos à infestação experimental pelo carrapato. A densidade celular do infiltrado foi determinada em ambas as raças nos estágios de larva (L), ninfa (N) e adulto em início (A') e final de ingurgitamento (A'') do carrapato. As letras indicam diferenças estatísticas significativas ($P < 0,05$) entre os estágios do carrapato dentro da mesma raça bovina. A seta aponta tendência de aumento na densidade celular entre animais resistentes e suscetíveis, embora não estatisticamente significativa.

Tabela 7. Densidade celular do infiltrado recrutado à pele de bovinos resistentes e suscetíveis no local de fixação do carrapato *R. (B.) microplus*.

Fenótipo de Infestação	N	Densidade celular/mm ² (Média ± DP)			
		Larva (L)	Ninfa (N)	Adulto (A') 1º dia	Adulto (A'') 3º dia
Suscetível	4	31.121,0 ^{A'A''}	12.826,2	7.691,5 ^{A''}	61.970,9
		± 1.109,7	± 19.971,5	± 2.478,7	± 47.712,3
Resistente	4	2.736,8 ^{N A' A''}	19.595,9 ^{A''}	16.934,1 ^{A''}	52.185,6
		± 2.051,2	± 3.640,1	± 7.459,0	± 8.156,7

As letras representam os estágios de larva (L), ninfa (N) e adultos em início (A') e final de ingurgitamento (A'') do carrapato fixado na pele de bovinos resistentes e suscetíveis infestados. As letras indicam diferenças estatísticas significativas ($P < 0,05$) entre as fases do carrapato dentro da mesma raça bovina.

densidade média de $16.934,1 \pm 7.459,0$, aumentou 3 vezes ($P = > 0,001$) na mesma resistente infestada pelo estágio de (A''), com média de $52.185,6 \pm 8.156,7$ (Tabela 7). Apenas a pele resistente infestada pelo estágio de (N), com média de $19.595,9 \pm 3.640,1$, apresentou menor densidade celular ($P < = 0,001$) quando comparada à média de $52.185,6 \pm 8.156,7$ encontrada na pele resistente no estágio de (A''). A mesma, com média de $19.595,9 \pm 3.640,1$, foi 7,2 vezes mais densa ($P < 0,05$) que a mesma infestada pelo estágio de (L), com média de $2.736,8 \pm 2.051,2$ (Tabela 7). A pele resistente infestada pelo estágio de (L), com média de $2.736,8 \pm 2.051,2$, foi 6,2 vezes menor ($P < 0,05$) que a densidade da mesma infestada pelo estágio de (A'), com média de $16.934,1 \pm 7.459,0$, e foi 19,0 vezes menor que a densidade média de $52.185,6 \pm 8.156,7$ na pele resistente infestada pelo estágio de (A'') (Tabela 7).

4.2.2. Infestação de bovinos resistentes e suscetíveis ao *R. (B.) microplus* em condições experimentais: contagem diferencial das células recrutadas à pele infestada pelos diferentes estágios evolutivos do carrapato.

Assim como procedido no experimento anterior, as diferentes populações de granulócitos foram identificadas nas secções de pele de acordo com características morfológicas descritas em 4.1.2. Dessa forma, secções de pele infestada por larva (L), ninfa (N) e adulto (A) e controles foram analisadas nas duas raças estudadas como já descrito e a contagem diferencial de granulócitos e de células mononucleares foi determinada. Os resultados obtidos quanto à porcentagem das populações celulares observadas serão demonstrados a seguir.

Uma vez identificados nas secções analisadas, a quantidade desse tipo de granulócito foi determinada na pele de ambas as raças estudadas e o resultado obtido está demonstrado no gráfico A da figura 14. Como pode ser observado no mesmo, apenas a pele resistente infestada pelo estágio de (A') apresentou, de forma significativa ($P = 0,048$), maior porcentagem média de $3,7 \pm 3,0\%$, de

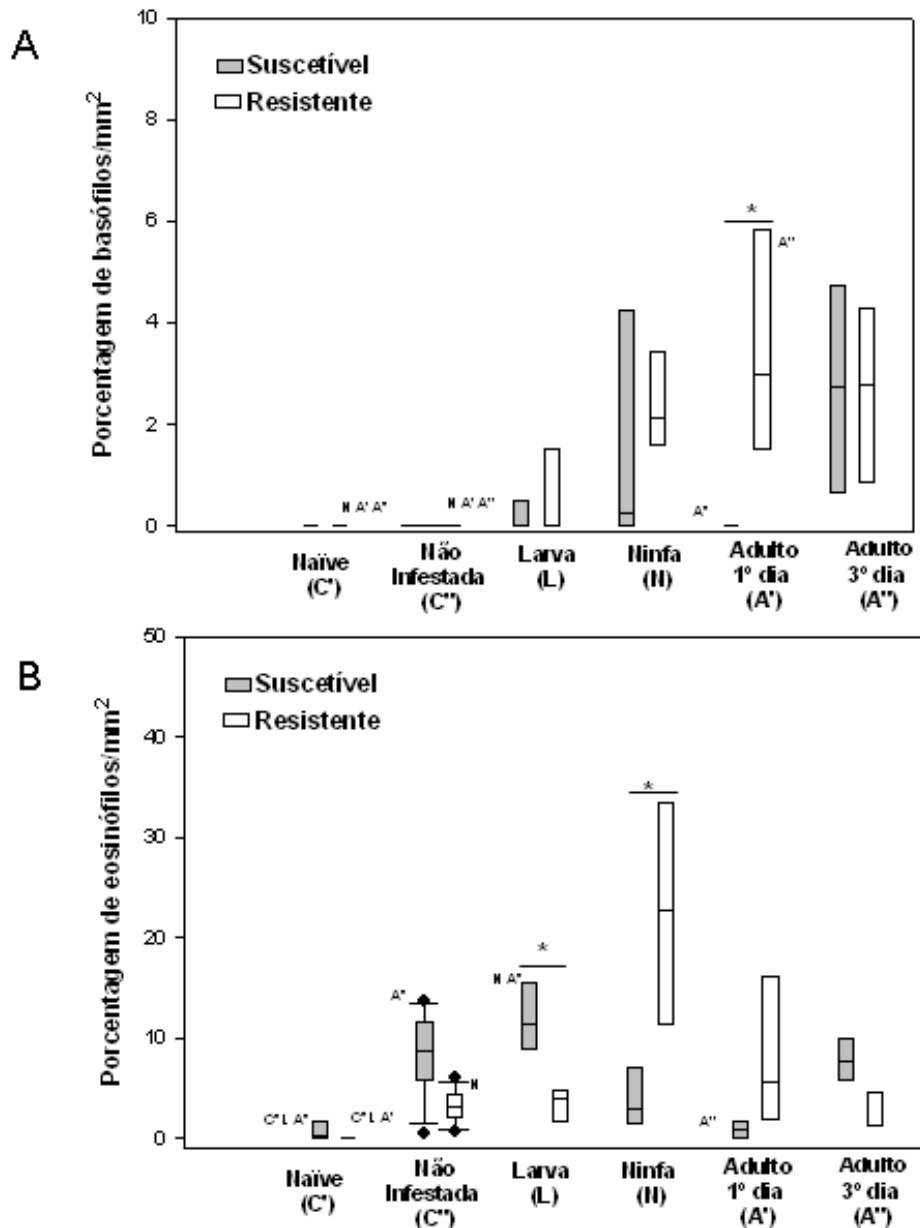


Figura 14. Contagem diferencial de basófilos e eosinófilos na pele de bovinos resistentes e suscetíveis infestados pelo *R. (B.) microplus* em condições experimentais. Os gráficos demonstram a porcentagem de basófilos (A) e de eosinófilos (B) na pele de bovinos resistentes (caixas brancas) e suscetíveis (caixas cinzas) infestados pelo carrapato nos estágios de larva (L), ninfa (N) e adultos em início (A') e final de ingurgitamento (A''). Pele naïve (C') e pele não infestada (C'') foram utilizadas como controles. As letras indicam diferenças estatísticas significativas ($P < 0,05$) entre os estágios do carrapato na mesma raça bovina. (*) representa diferenças estatísticas ($P < 0,05$) entre bovinos resistentes e suscetíveis.

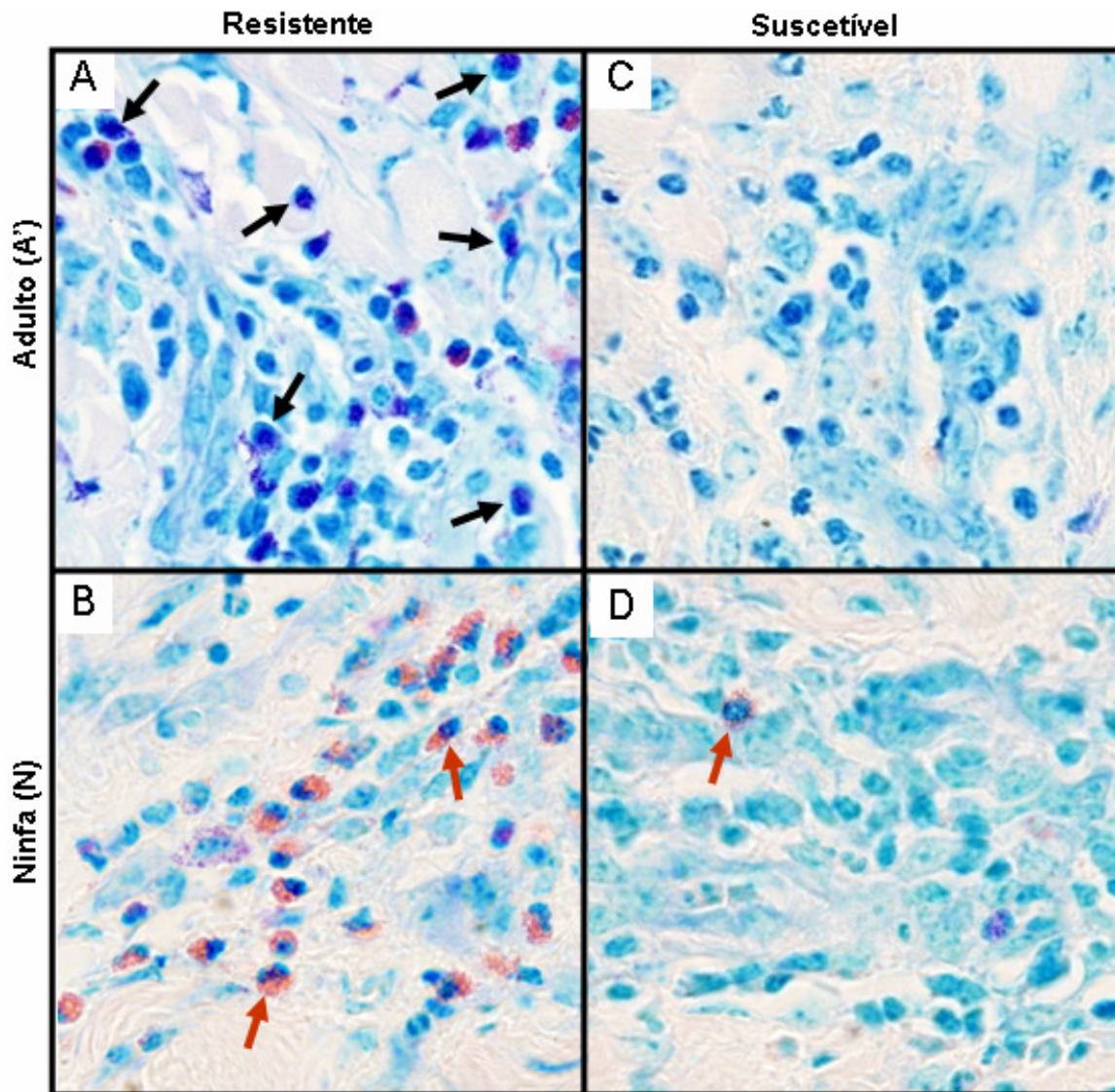


Figura 15. Presença de basófilos e eosinófilos na pele de bovinos resistentes e suscetíveis infestados pelo *R. (B.) microplus* em condições experimentais. Pele de bovinos resistentes (A) e suscetíveis (C) infestadas pelo estágio inicial de ingurgitamento A', setas pretas apontam para basófilos. Pele de bovinos resistentes (B) e suscetíveis (D) infestada pelo carrapato no estágio de N, setas vermelhas apontam para eosinófilos. Cortes histológicos incluídos em parafina e corados por May-Grünwald e Giemsa (aumento de 1000x).

Tabela 8. Contagem diferencial de basófilos e eosinófilos na pele de bovinos resistentes e suscetíveis infestados pelo *R. (B.) microplus* em condições experimentais.

Tipo Celular	N	Fenótipos de Infestação	Porcentagem de células/mm ²						
			(Média ± DP)						
			Naive (C')	Não Infestada (C'')	Larva (L)	Ninfa (N)	Adulto 1º dia (A')	Adulto 3º dia (A'')	
Basófilos	4	Suscetível	0,0 ^{A''}	0,0 ^{A''}	0,3	2,1	0,0 ^{*A''}	2,7	
			±	±	±	±	±	±	
				0,0	0,0	0,5	3,9	0,0	2,4
	4	Resistente	0,0 ^{N A' A''}	0,0 ^{NA'A''}	0,7	2,5	3,7*	2,6	
±			±	±	±	±	±		
			0,0	0,0	1,2	1,3	3,0	2,3	
Eosinófilos	4	Suscetível	0,9 ^{C''L A''}	0,0 ^{NA'A''}	12,3 *N	4,3*	0,1 ^{A''}	7,8	
			±	±	±	±	±	±	
				1,4	0,0	5,0	4,0	0,9	3,2
	4	Resistente	0,0 ^{C''NA'}	3,3 ^N	3,3 *A'	22,5*	9,0	3,1	
±			±	±	±	±	±		
			0,0	1,7	2,1	14,0	10,5	2,5	

* Indica diferença estatística significativa ($P < 0,05$) entre bovinos suscetíveis e resistentes ao carrapato.

As letras representam os estágios de larva (L), ninfa (N) e adultos em início (A') e final de ingurgitamento (A'') do carrapato fixado na pele de bovinos resistentes e suscetíveis infestados experimentalmente. Pele naïve (C') e pele não infestada (C'') foram utilizadas como controles. A presença das letras indica diferenças estatísticas significativas ($P < 0,05$) entre as fases do carrapato na mesma raça bovina.

basófilos que a pele suscetível infestada pelo mesmo estágio do carrapato adulto, com a porcentagem média de $0,0 \pm 0,0\%$ (Figura 15 A 15 C e Tabela 8). Após três dias de fixação do carrapato adulto (A''), a raça suscetível recrutou porcentagem média de $2,7 \pm 2,4 \%$ de basófilos, valor significativamente maior ($P = 0,029$) que o de $0,0 \pm 0,0\%$ desse granulócito encontrado na pele suscetível no estágio de (A') (Tabela 8). A pele suscetível naïve e não infestada, com porcentagens médias de $0,0 \pm 0,0\%$ e de $0,0 \pm 0,0\%$ de basófilos, apresentou menor porcentagem ($P \leq 0,029$) em comparação a porcentagem de $2,7 \pm 2,4\%$ desse granulócito na mesma infestada pelo estágio de (A'') (Tabela 8). A pele resistente naïve e não infestada, com porcentagens médias de $0,0 \pm 0,0\%$ e de $0,0 \pm 0,0\%$ de basófilos, foi menor ($P \leq 0,05$) que a porcentagem encontrada na pele infestada pelos estágios de (N), (A') e (A''), com porcentagens médias de $2,5 \pm 1,3\%$, de $3,7 \pm 3,0\%$ e de $2,6 \pm 2,3\%$ respectivamente (Tabela 8).

Eosinófilos foram contados nas secções de pele analisadas e os resultados demonstrados na figura 14 B. A pele suscetível infestada por (L) apresentou maior porcentagem ($P = 0,035$) de eosinófilos, em média de $12,3 \pm 5,0\%$ desse granulócito, em comparação a porcentagem média de $3,3 \pm 1,7\%$ dos mesmos encontrada na pele resistente no estágio de (L) (Figura 15 B e Tabela 8). Já na pele infestada por (N), os animais resistentes apresentaram maior porcentagem ($P = 0,047$) de eosinófilos, com média de $22,5 \pm 14,0\%$ desse granulócito, em comparação a média de $4,3 \pm 4,0\%$ dos mesmos na pele de animais suscetíveis infestada pelo estágio de (N) (Figura 15 B e 15 D, Tabela 8). Foi observada uma redução na porcentagem de eosinófilos encontrados na pele da raça suscetível nos estágios evolutivos analisados (Figura 14 B). O estágio de (N), com porcentagem média de $4,3 \pm 4,0\%$ de eosinófilos, apresentou-se 2,9 vezes reduzida ($P = 0,047$) em relação a média de $12,3 \pm 5,0\%$ desse granulócito na pele infestada pelo estágio de (L) (Tabela 8). A pele suscetível infestada pelo estágio de (A') mostrou-se 1,8 vezes reduzido ($P = 0,006$), com

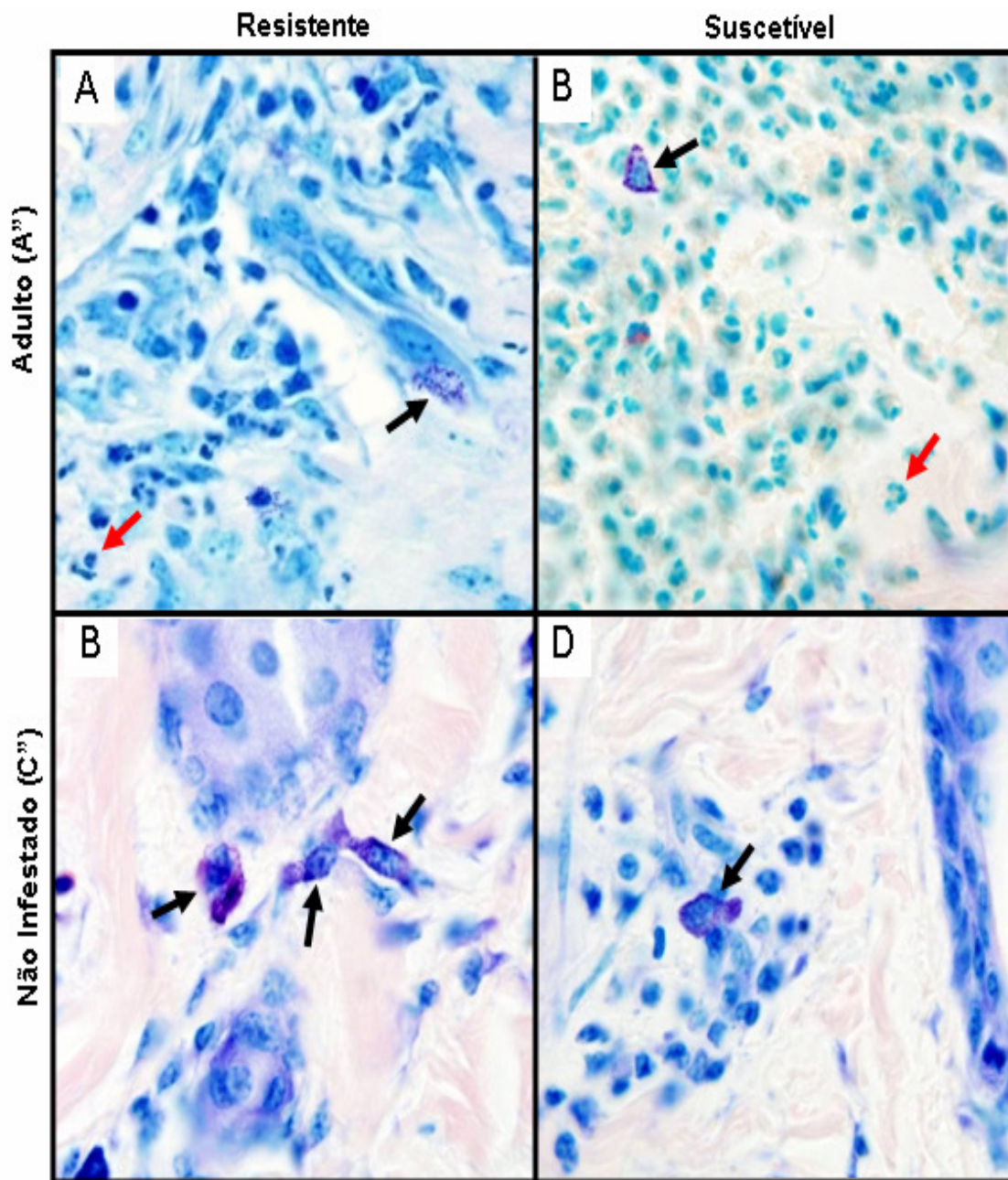


Figura 16. Presença de neutrófilos e mastócitos na pele de bovinos resistentes e suscetíveis infestados pelo *R. (B.) microplus* em condições experimentais. Pele de bovinos resistentes (A) e suscetíveis (B) infestada pelo carrapato no estágio final de ingurgitamento A'', setas vermelhas apontam para neutrófilos. Pele não infestada de bovinos resistentes (C) e suscetíveis (D), setas pretas apontam para mastócitos. Cortes histológicos incluídos em parafina e corados por May-Grünwald e Giemsa (aumento de 1000x).

porcentagem média de $0,1 \pm 0,9\%$ de eosinófilos, em comparação a de $7,8 \pm 3,2\%$ desse tipo celular na pele suscetível no estágio de (A'') (Tabela 8).

O resultado das porcentagens de neutrófilos presentes nas secções analisadas demonstra porcentagens médias semelhantes entre ambas as raças nos estágios evolutivos do carrapato estudados (Figura 16 A). A comparação entre os estágios evolutivos do carrapato demonstrou aumento gradual nos percentuais médios de neutrófilos em ambas as raças, sendo maior na pele infestada pelo estágio (A'') (Figura 16 A). Esse estágio evolutivo apresentou aumento de 3,4 vezes ($P = 0,014$) de neutrófilos na pele resistente, com porcentagem média de $52,0 \pm 5,8\%$ de neutrófilos, em comparação ao estágio de (A'') apresentou valor médio de $15,5 \pm 10,4$ desse tipo celular na pele resistente infestada por (A') (Tabela 9). O estágio final de ingurgitamento (A'') também apresentou aumento de 9,8 vezes ($P = 0,006$) de neutrófilos em comparação a média de $5,3 \pm 5,3\%$, do mesmo tipo celular (Tabela 9). A pele suscetível infestada por (L), com porcentagem média de $10,0 \pm 8,4\%$ de neutrófilos, foi 2,3 vezes menor ($P = 0,045$) que o percentual de $32,8 \pm 16,0\%$ no estágio de A' (Tabela 9); e 4,5 vezes menor ($P = 0,006$) que o percentual de $44,9 \pm 14,5\%$ desse granulócito no estágio A'' (Tabela 9). Não foram encontrados percentuais relevantes de neutrófilos no controle naïve e no mesmo não infestado de ambas as raças estudadas (Figura 16 A).

Mastócitos foram analisados nas secções de pele de ambas as raças e os resultados obtidos estão demonstrados na figura 16 B. Os mesmos demonstraram percentuais médios elevados de mastócitos, talvez até fisiológicos, na pele naïve e pele não infestada de ambas as raças (Figuras 16 B e 17). Porém o percentual médio desse tipo celular reduziu drasticamente ($P = <0,001$) e de forma semelhante na pele infestada de ambas as raças estudadas (Figura 16 B). A pele resistente não infestada, com porcentagem média de $13,0 \pm 2,3\%$ de mastócitos, mostrou-se 6,5 vezes maior ($P = <0,001$) que a mesma de $2,0 \pm 2,4\%$ desse granulócito na pele resistente infestada por (N), 3,0 vezes

Tabela 9. Contagem diferencial de neutrófilos e mastócitos na pele de bovinos resistentes e suscetíveis infestados pelo *R. (B.) microplus* em condições experimentais.

Tipo Celular	N	Fenótipo de Infestação	Porcentagem de células/mm ² (Média ± DP)					
			Naïve (C')	Não Infestada (C'')	Larva (L)	Ninfa (N)	Adulto 1º dia (A')	Adulto 3º dia (A'')
Neutrófilos	4	Suscetível	0,0 ^{C''LA''}	0,1 ^{A'}	10,0 ^{A'A''}	25,5	32,8	44,9
			±	±	±	±	±	±
	0,0	0,2	8,4	22,9	16,0	14,5		
	4	Resistente	0,0 ^{C''NA'}	0,1 ^N	5,3 ^{A''}	16,2	15,5 ^{A''}	52,0
±			±	±	±	±	±	
0,0	0,3	5,3	18,7	10,4	15,8			
Mastócitos	4	Suscetível	26,1 ^{C''LNA'A''}	7,1 ^{LNA'A''}	2,1	3,5	0,9	1,3
			±	±	±	±	±	±
	4,6	1,6	2,4	3,3	1,4	1,0		
	4	Resistente	32,5 ^{C''LNA'A''}	13,0 ^{NA'A''}	81,1	2,0	4,3	1,2
±			±	±	±	±	±	
7,6	2,3	5,9	2,4	2,5	1,0			

* Indica diferença estatística significativa ($P < 0,05$) entre bovinos suscetíveis e resistentes ao carrapato.

As letras representam os estágios de larva (L), ninfa (N) e adultos em início (A') e final de ingurgitamento (A'') do carrapato fixado na pele de bovinos resistentes e suscetíveis infestados experimentalmente. Pele naïve (C') e pele não infestada (C'') foram utilizadas como controles. A presença das letras indica diferenças estatísticas significativas ($P < 0,05$) entre as fases do carrapato na mesma raça bovina.

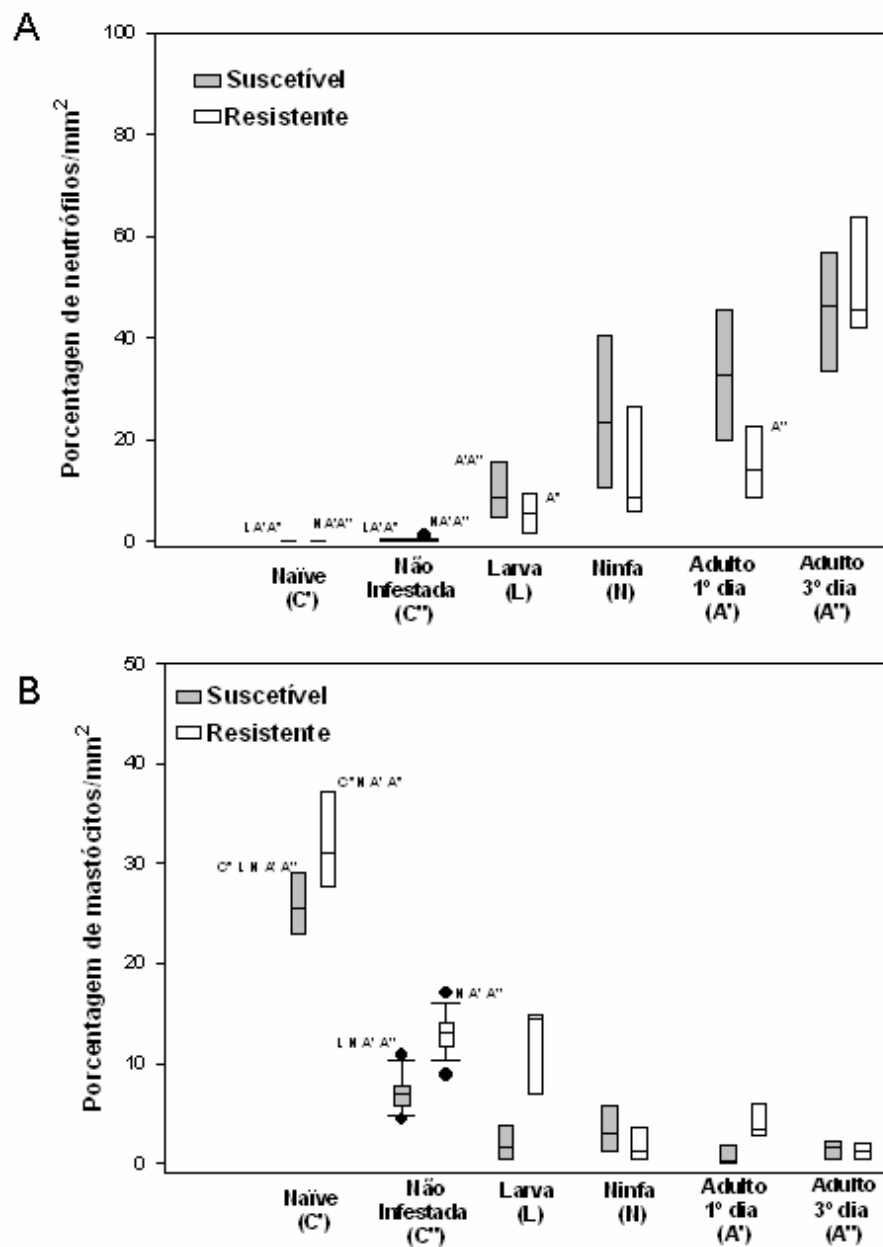


Figura 17. Contagem diferencial de neutrófilos e mastócitos na pele de bovinos resistentes e suscetíveis infestados pelo *R. (B.) microplus* em condições experimentais. Os gráficos demonstram a porcentagem de neutrófilos (A) e de mastócitos (B) na pele de bovinos resistentes (caixas brancas) e suscetíveis (caixas cinzas) infestados pelo estágio de larva (L), ninfa (N) e adultos em início (A') e final de ingurgitamento (A''). Pele naïve (C') e pele não infestada (C'') foram utilizadas como controles. As letras indicam diferenças estatísticas significativas ($P < 0,05$) entre os estágios do carrapato dentro da mesma raça bovina.

maior ($P = < 0,001$) que a porcentagem de $4,3 \pm 2,5\%$ desse tipo celular na mesma infestada por (A') e 10,8 vezes que a mesma de $1,2 \pm 1,0\%$ de mastócitos na pele resistente no estágio de (A'') (Tabela 9). O mesmo fenômeno foi observado na pele suscetível cujo controle (C''), com média de $7,1 \pm 1,6\%$ de mastócitos, foi 3,4 vezes maior ($P = < 0,001$) que a média de $2,1 \pm 2,4\%$ dessas células no estágio de (L), 2,0 vezes maior ($P = < 0,001$) que a média de $3,5 \pm 3,3\%$ de mastócitos no estágio de (N), 7,9 vezes menor ($P = < 0,001$) que o percentual de $0,9 \pm 1,4\%$ desse granulócito no estágio de (A') e 5,4 vezes maior ($P = < 0,001$) que a média de $1,3 \pm 1,0$ na fase (A'') na pele suscetível (Tabela 9). O controle naïve (C') também se mostrou maior em comparação aos demais pontos analisados em ambas as raças (Figura 16 B).

Adicionalmente, as secções de pele infestadas nos estágios de (N) e (A') de ambas as raças foram observados grânulos celulares dispersos pelo tecido no local de fixação do carrapato, sugerindo degranulação celular (Figura 18). Os grânulos de coloração violeta sugerem degranulação de basófilos e/ou mastócitos, e os de cor alaranjada sugerem a degranulação de eosinófilos (Figura 18). Foi observado degranulação mais intensa na pele resistente infestada (Figura 18 A e 18 B) em comparação a pele suscetível (Figura 18 C e 18 D). Células com morfologia alterada foram encontradas nas mesmas áreas de tecido contendo grânulos, estando mais alteradas principalmente na pele resistente (Figura 18 A e 18 B).

De acordo com as características morfológicas descritas no item 4.2.2, a porcentagem média das células mononucleares foi determinada nas secções de pele das raças estudadas. Os resultados obtidos não demonstrados diferenças significativas no percentual médios de mononucleares na comparação entre ambas as raças estudadas (Figura 19). Já a comparação entre os estágios evolutivos do carrapato demonstrou que a pele suscetível no estágio (A'') com porcentagem média de $47,0 \pm 11,0\%$ de mononucleares, foi 1,5 vezes menor ($P = 0,049$) que a média de $68,5 \pm 13,5\%$

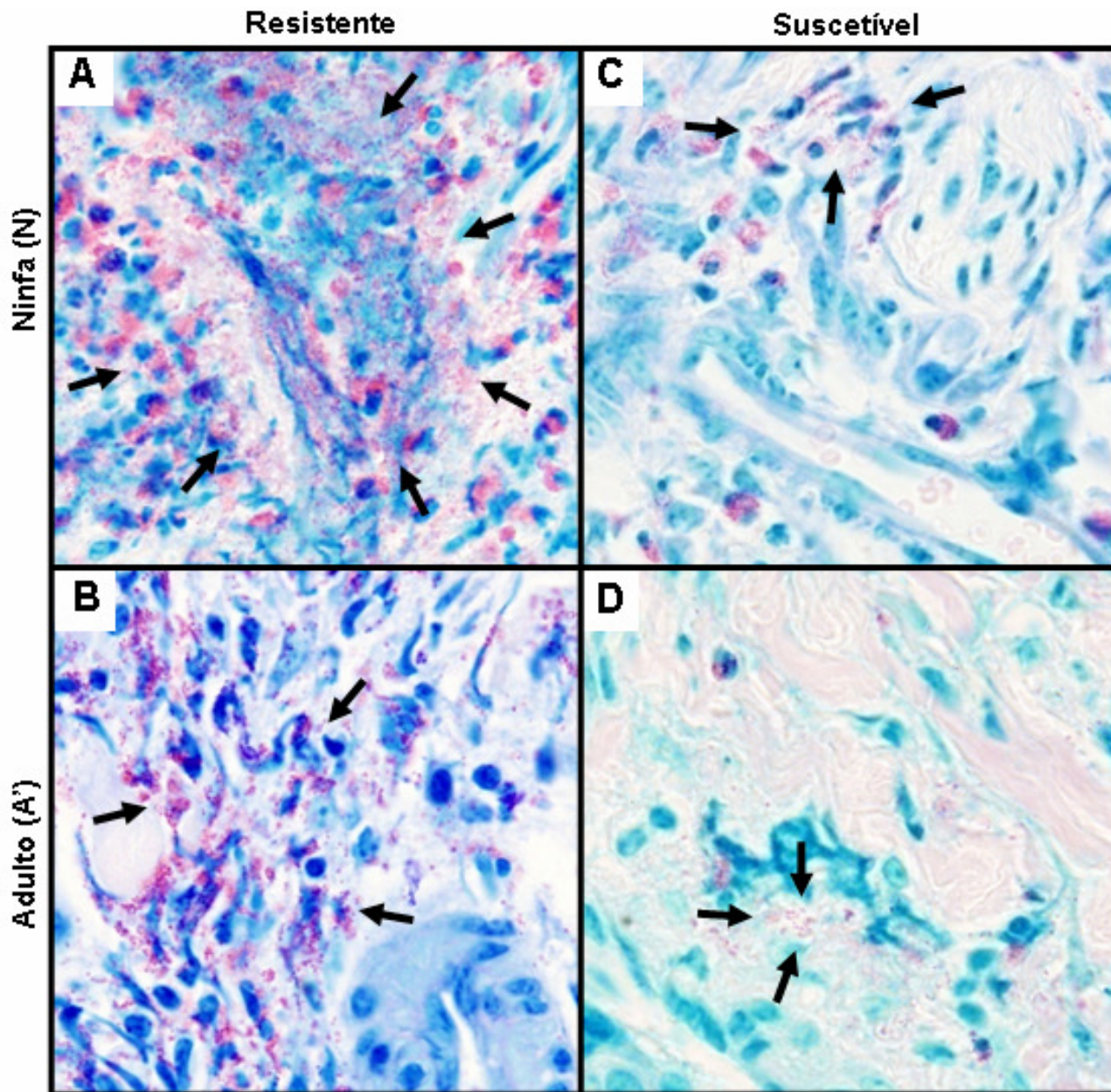


Figura 18. Presença de grânulos celulares dispersos no local de fixação do *R. (B.) microplus* na pele de bovinos resistentes e suscetíveis infestados em condições experimentais. Pele de bovinos resistentes (A) e suscetíveis (C) infestadas pelo estágio de (N) e pele de bovinos resistentes (B) e suscetíveis (D) infestada pelo estágio adulto no início do ingurgitamento (A'). As setas pretas apontam para grânulos celulares dispersos pelo tecido; Cortes histológicos incluídos em parafina e corados por May-Grünwald e Giemsa (aumento de 1000x).

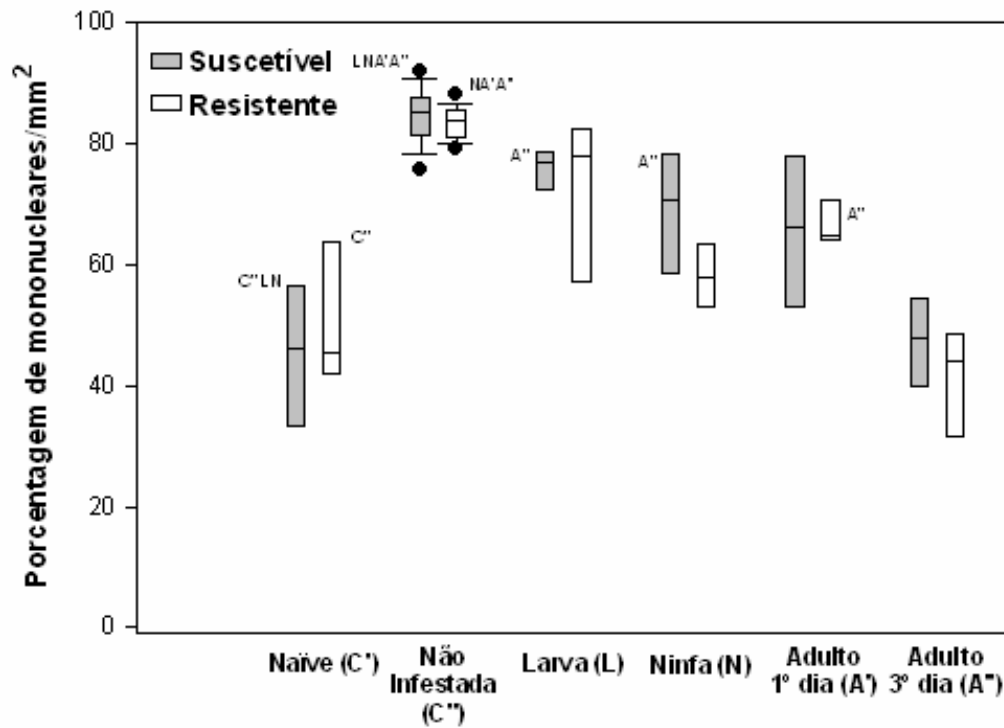


Figura 19. Contagem diferencial de células mononucleares na pele de bovinos resistentes e suscetíveis infestados pelo *R. (B.) microplus* em condições experimentais. O gráfico acima demonstra a porcentagem média de mononucleares na pele de bovinos resistentes (caixas brancas) e suscetíveis (caixas cinzas) infestados pelos estágios de larva (L), ninfa (N) e adultos em início (A') e final de ingurgitamento (A''). Pele naïve (C') e pele não infestada (C'') foram utilizadas como controles. As letras indica diferenças estatísticas significativas ($P < 0,05$) entre os estágios do carrapato dentro da mesma raça bovina.

Tabela 10. Contagem diferencial de células mononucleares na pele de bovinos resistentes e suscetíveis infestados pelo *R. (B.) microplus* em condições experimentais.

Fenótipos de Infestação	N	Porcentagem de células/mm ² (Média ± DP)					
		Naïve (C')	Não Infestada (C'')	Larva (L)	Ninfa (N)	Adulto 1º dia (A')	Adulto 3º dia (A'')
Suscetível	4	72,9 ^{C'LN} ± 6,0	84,3 ^{LNA'A''} ± 4,7	75,4 ^{A''} ± 4,3	68,5 ^{A''} ± 13,5	65,5 ± 14,9	47,0 ± 11,0
Resistente	4	67,5 ^{C''} ± 7,6	83,4 ^{NA'A''} ± 2,7	70,7 ± 18,1	58,2 ± 7,7	67,4 ^{A''} ± 5,8	40,5 ± 11,5

As letras representam os estágios de larva (L), ninfa (N) e adultos em início (A') e final de ingurgitamento (A'') do carrapato fixado na pele de bovinos resistentes e suscetíveis infestados experimentalmente. Pele naïve (C') e pele não infestada (C'') foram utilizadas como controles. A as letras indica diferenças estatísticas significativas ($P < 0,05$) entre os estágios do carrapato dentro da mesma raça bovina.

dessas células na mesma infestada por (N) e 1,6 vezes menor ($P = 0,003$) que a média de $75,4 \pm 4,3\%$ das mesmas na pele suscetível infestada pelo estágio de (L) (Tabela 10). Já a pele resistente infestada por (A''), com percentual médio de $40,5 \pm 11,5\%$ de mononucleares, mostrou-se 1,7 vezes menor ($P = 0,009$) que a média de $67,4 \pm 5,8\%$ dessas células na mesma infestada por (A') (Tabela 10). A pele (C'') de ambas as raças apresentaram em média $83,9\%$ mais mononucleares ($P = 0,004$) que a pele (C') com $69,5\%$ em média das mesmas células, representando aumento de 1,2 vezes (Figura 19). A primeira também demonstrou ser maior ($P \leq 0,009$) que $73,1\%$ em média de mononucleares na pele infestada na fase de (L), que $63,4\%$ dessas células na fase de (N), que $66,5\%$ e $47,8\%$ dessas células nas fases (A') e (A'') (Figura 19). Já a pele C' de animais resistentes com $67,5\%$ em média de mononucleares foi menor ($P = 0,013$) em relação a $58,2\%$ dessas células na fase de (N) e em relação a $67,4\%$ e $40,5\%$ nas fases (A') e (A'') respectivamente (Figura 19).

4.3. Infestação de bovinos resistentes e suscetíveis ao *R. (B.) microplus* em condições experimentais: caracterização fenotípica dos linfócitos T (CD3⁺) e linfócitos B (CD21⁺) recrutados à pele pelos diferentes estágios evolutivos do carrapato.

A primeira população mononuclear de interesse analisada na pele de ambas as raças foram os linfócitos T. Para tal, os linfócitos T foram marcados nas secções de pele resistente e suscetível selecionadas (zona 1 e/ou 2) através da molécula de superfície CD3 em reações de imunistoquímica-peroxidase como descrito na seção Materiais e Métodos no item 3.6. As células marcadas foram contadas de acordo com a padronização descrita no item 4.1.1 e os resultados obtidos estão apresentados na figura 20 A. Como pode ser observado, a pele resistente infestada por (N) recrutou em média $138,6 \pm 49,2$ de linfócitos T CD3⁺, sendo 2,3 vezes maior ($P = 0,025$) que a média de $60,9 \pm 17,3$ dessas células recrutadas à pele suscetível infestada pelo mesmo estágio

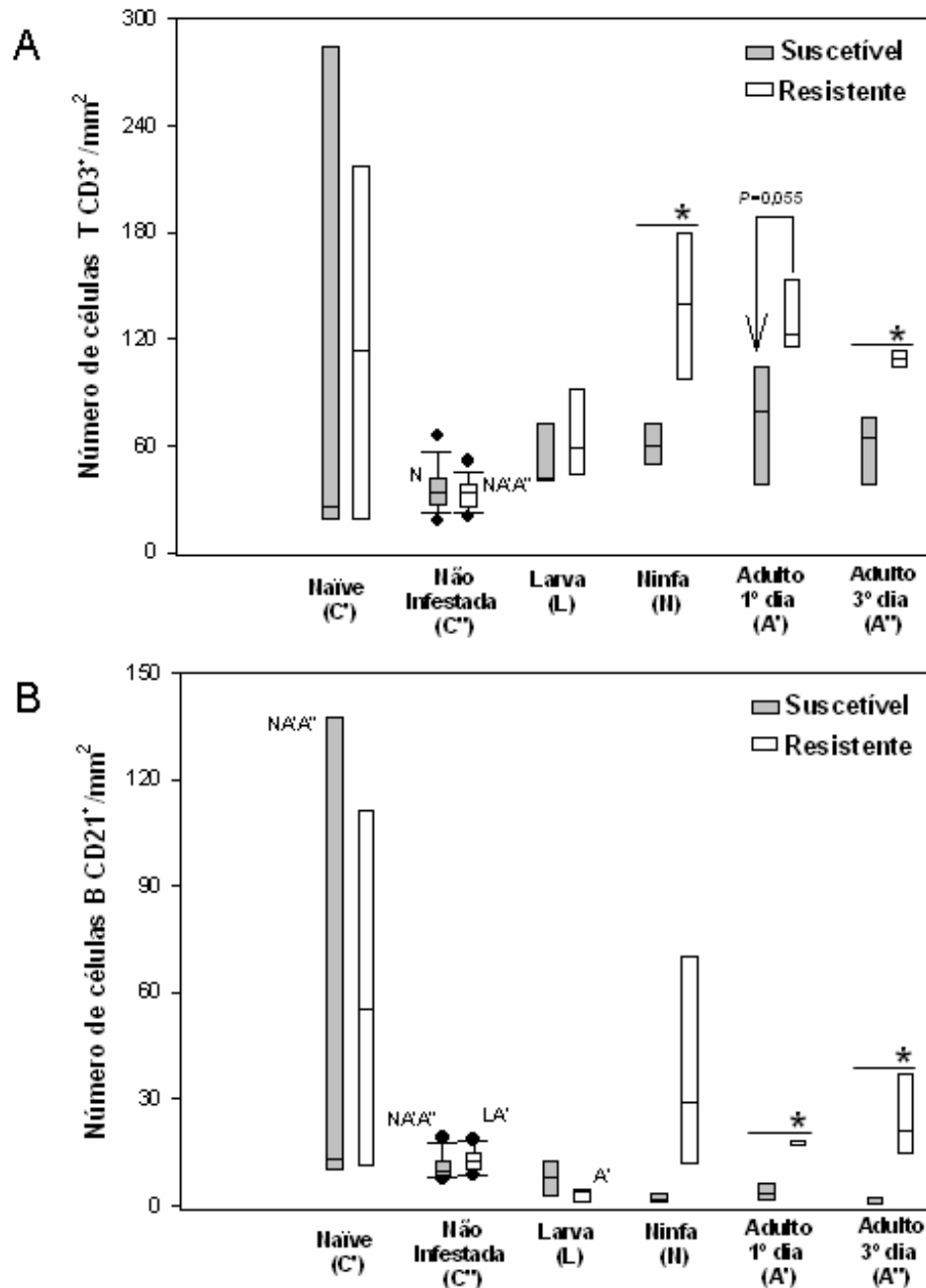


Figura 20. Contagem de linfócitos T CD3⁺ e linfócitos B CD21⁺ recrutadas à pele de bovinos resistentes e suscetíveis infestados pelo *R. (B.) microplus* em condições experimentais. Os gráficos demonstram a porcentagem de linfócitos T CD3⁺ (A) e de linfócitos B CD21⁺ (B) marcados na pele de bovinos resistentes (caixas brancas) e suscetíveis (caixas cinzas) infestados pelos estágios larva (L), ninfa (N) e adultos em início (A') e final de ingurgitamento (A''). Pele naïve (C) e pele não infestada (C'') foram utilizadas como controles. As letras indica diferenças estatísticas significativas ($P < 0,05$) entre os estágios do carrapato dentro da mesma raça. (*) representa diferenças estatísticas ($P < 0,05$) entre bovinos resistentes e suscetíveis.

(Figura 21 A e 21 C, Tabela 11). O mesmo foi observado na pele resistente infestada por A', que recrutou em média $135,1 \pm 33,1$ de linfócitos T CD3⁺, embora não significativo ($P = 0,055$), aumentou 1,9 vezes em relação a média de $71,7 \pm 41,9$ desse tipo celular na pele suscetível no estágio de (A') (Figura 20 A e Tabela 11). Essa tendência de aumento também foi observada no estágio de (A''), no qual a pele resistente, com média de $109,1 \pm 6,0$ de linfócitos T CD3⁺, mostrou-se aumentada 1,9 vezes ($P = 0,032$) em comparação a mesma de $57,8 \pm 29,0$ dessas células na pele suscetível no estágio de A'' (Figura 21 B e 21 D, Tabela 11). A pele não infestada da raça resistente, com média de $32,9 \pm 7,8$ de linfócitos T CD3⁺, apresentou menor número ($P \leq 0,005$) dessas células em comparação a mesma infestada pelo estágio de (N), com média de $135,1 \pm 33,1$ de linfócitos T, e que os estágios de (A') e (A''), com médias de $71,7 \pm 41,9$ e $109,1 \pm 6,0$ do mesmo tipo celular respectivamente (Figura 20 A e Tabela 11). Na raça suscetível, a média de $36,8 \pm 13,2$ de linfócitos T CD3⁺ encontrados na pele não infestada foi menor ($P = 0,12$) somente em comparação com a pele dos mesmos animais infestada por (N), com média de $60,9 \pm 17,3$ (Figura 20 A e Tabela 11).

Outra população celular de interesse marcada nas secções de pele resistente e suscetível foi a de linfócitos B. Essas células, como efetoras de respostas humorais, expressam CD21 que é receptor para o fragmento C3d do sistema complemento, de forma quase que exclusiva (NAESSENS ET AL., 1990). Sendo assim, os linfócitos B foram identificados nas secções de pele analisadas através da marcação dessa molécula de superfície. Uma vez fenotipados, o número médio de linfócitos B CD21⁺ na pele dos animais de ambas as raças foi determinado e os resultados estão apresentados na figura 20 B. Como demonstrado no gráfico, a pele resistente infestada por (A') apresentou número médio de $17,9 \pm 0,8$ de linfócitos B, sendo este 4,5 vezes maior ($P = < 0,001$) que o número médio de $4,0 \pm 2,8$ desse tipo de linfócito encontrado na pele suscetível infestada pelo mesmo estágio

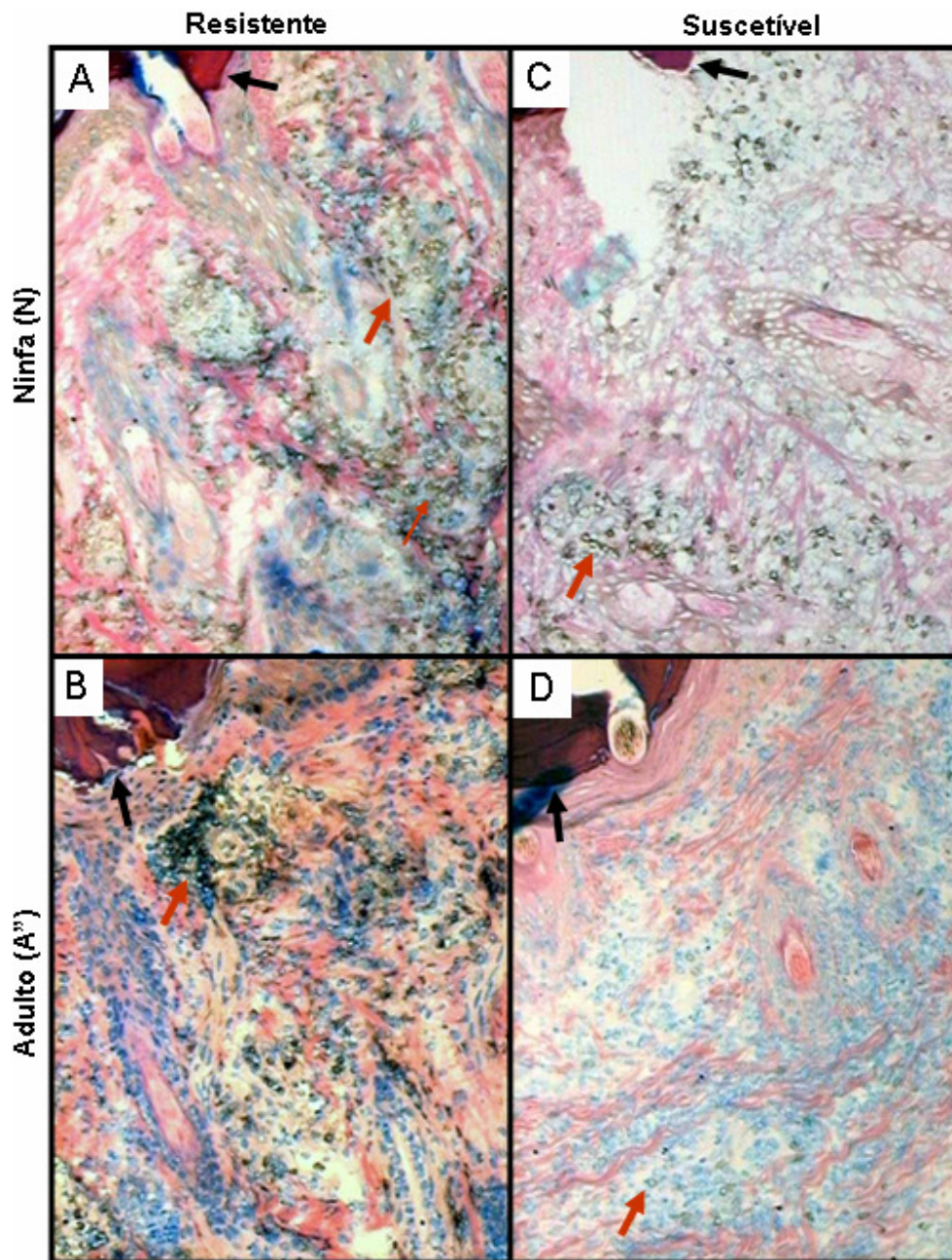


Figura 21. Marcação de linfócitos T CD3⁺ recrutadas à pele de bovinos resistentes e suscetíveis infestada pelo *R.* (B.) *microplus* em condições experimentais. Pele de bovinos resistentes (A) e suscetíveis (C) infestadas pelo estágio de N; pele de bovinos resistentes (B) e suscetíveis (D) infestada pelo estágio de A''. As setas vermelhas apontam para as células CD3⁺ marcadas no tecido e as setas pretas apontam para o cone de cimento formado pelo carrapato. Secções de pele criopreservadas e coradas por May-Grünwald e Giemsa (aumento de 100x).

Tabela 11. Contagem de linfócitos T CD3⁺ e linfócitos B CD21⁺ recrutadas à pele de bovinos resistentes e suscetíveis infestados pelo *R. (B.) microplus* em condições experimentais.

Tipo Celular	N	Fenótipo de Infestação	Número de células/mm ² (Média ± DP)					
			Naïve (C')	Não Infestada (C'')	Larva (L)	Ninfa (N)	Adulto 1º dia (A')	Adulto 3º dia (A'')
Linfócitos T (CD3 ⁺)	4	Suscetível	151,6	36,8 ^N	54,9	60,9*	71,7	57,8*
			±	±	±	±	±	±
	4	Resistente	257,0	13,2	23,8	17,3	41,9	29,0
			±	±	±	±	±	±
Linfócitos B (CD21 ⁺)	4	Suscetível	118,1	32,9 ^{NA'A''}	73,8	138,6*	135,1	109,1*
			±	±	±	±	±	±
	4	Resistente	115,2	7,8	40,5	49,2	33,1	6,0
			±	±	±	±	±	±
Linfócitos B (CD21 ⁺)	4	Suscetível	74,0 ^{NA'A''}	11,2 ^{NA'A''}	7,7	2,3	4,0*	4,0*
			±	±	±	±	±	±
	4	Resistente	123,9	2,9	6,3	1,9	2,8	2,8
			±	±	±	±	±	±
4	Resistente	61,4'	12,7 ^{LA'}	2,8 ^{A'}	39,9	17,9*	25,6*	
		±	±	±	±	±	±	
			58,7	5,0	2,5	39,7	0,8	15,4

* Indica diferença estatística significativa ($P < 0,05$) entre bovinos suscetíveis e resistentes ao carrapato.

As letras representam os estágios de larva (L), ninfa (N) e adultos em início (A') e final de ingurgitamento (A'') do carrapato fixado na pele de bovinos resistentes e suscetíveis infestados experimentalmente. Pele naïve (C') e pele não infestada (C'') foram utilizadas como controles. A presença das letras indica diferenças estatísticas significativas ($P < 0,05$) entre as fases do carrapato na mesma raça bovina.

evolutivo (Figura 22 A e 22 C, Tabela 11). No estágio de (A''), a raça resistente com número médio de $25,6 \pm 15,4$ de células B, demonstrou recrutar 21,3 vezes mais ($P = 0,023$) em relação a média de $1,2 \pm 1,5$ dessas células na pele suscetível infestada no mesmo estágio (Figura 22 B e 22 D, Tabela 11). Nas comparações entre os estágios de infestação, somente a pele resistente infestada por (A'), com média de $17,9 \pm 0,8$ de linfócitos B, demonstrou maior valor médio ($P = < 0,001$) em comparação ao valor médio de $2,8 \pm 2,5$ dessas células na pele resistente no mesmo estágio de (L) (Figura 20 B e Tabela 11). A pele resistente (C''), com média de $12,7 \pm 5,0$ de linfócitos B, recrutou maior número ($P = 0,002$) desse tipo celular em comparação à média de $2,8 \pm 2,5$ na pele resistente infestada por (L) e menor número ($P = 0,040$) que a pele resistente infestada por (A'), com média de $17,9 \pm 0,8$ de linfócitos B recrutados (Figura 20 B, Tabela 11). Já a pele suscetível não infestada, com média de $11,2 \pm 2,9$ de linfócitos B, mostrou maior valor ($P \leq 0,010$) desse tipo celular em relação ao valor médio de $2,3 \pm 1,9$ das mesmas na pele suscetível infestada por (N), em relação ao valor médio de $4,0 \pm 2,8$ de células B e ao de $4,0 \pm 2,8$ das mesmas na pele infestada pelos estágios de (A') e (A'') respectivamente (Figura 20 B e Tabela 11). A média das peles suscetíveis infestadas pelas fases de N, A' e A'' também foram menor ($P = 0,029$) em relação a pele naïve da mesma raça (Figura 20 B e Tabela 11).

4.3.1. Infestação de bovinos resistentes e suscetíveis ao *R. (B.) microplus* em condições experimentais: caracterização fenotípica das células CD4⁺ e CD8⁺ recrutados à pele pelos diferentes estágios evolutivos do carrapato.

Entre as células de interesse presentes no infiltrado, foram marcadas nas secções de pele estudadas aquelas que expressavam a molécula de superfície CD4. Essa molécula é expressa por

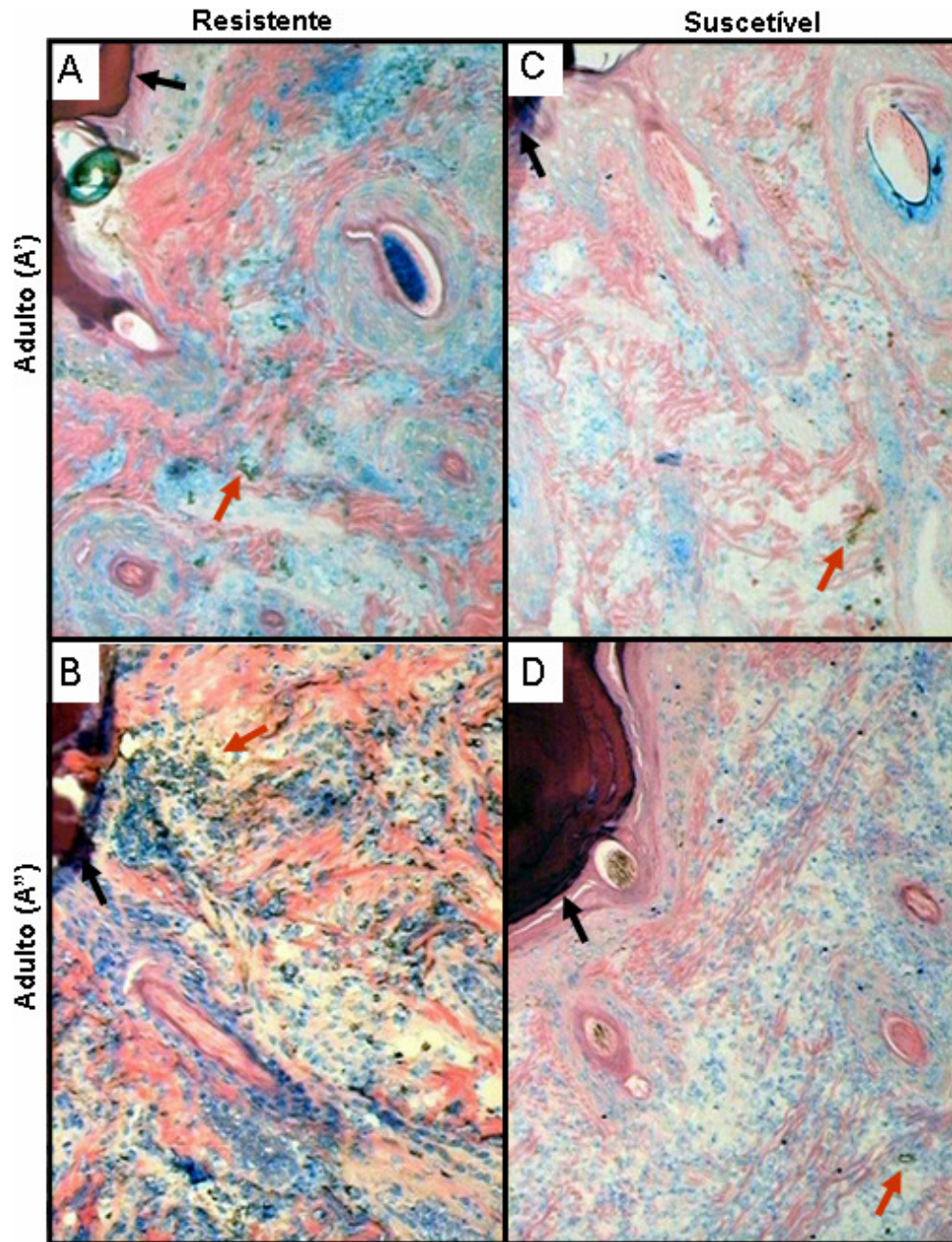


Figura 22. Marcação de linfócitos B CD21⁺ recrutadas à pele de bovinos resistentes e suscetíveis infestada pelo *R. (B.) microplus* em condições experimentais. Pele de bovinos resistentes (A) e suscetíveis (C) infestadas pelo estágio A'; pele de bovinos resistentes (B) e suscetíveis (D) infestada pelo estágio de A''; setas vermelhas apontam para as células CD21⁺ marcadas no tecido e setas pretas apontam para o cone de cimento formado pelo carrapato. Secções de pele criopreservadas e coradas por May-Grünwald e Giemsa (aumento de 100x).

linfócitos T; em macrófagos (ABBAS E LITCHMAN, 2003) e alguns granulócitos como eosinófilos e basófilos quando ativados (FERLAND ET AL., 2004; QI ET AL., 2002). Dessa forma, células CD4⁺ marcadas nas secções de pele analisadas foram contadas e os resultados apresentados na figura 23. Como pode ser observada no gráfico, a média de 88,5 ± 6,2 de células CD4⁺ marcadas na pele resistente infestada por (A'') foi 3,1 vezes maior ($P = 0,001$) que a média de 28,7 ± 15,2 dessas células na pele suscetível infestada no mesmo estágio (Figuras 24 A e 24 C, Tabela 12). A pele resistente (C'') com média de 22,4 ± 6,4 de células CD4⁺; mostrou-se 4,5 vezes menor ($P = 0,008$) que a média de 101,8 ± 69,7 dessas células na mesma infestada por (N). Fenômeno semelhante foi observado na pele resistente infestada pelos estágios de (A') e (A''), com médias de 85,2 ± 58,4 e de 88,5 ± 6,2 de células CD4⁺, que aumentaram 3,8 vezes ($P \leq 0,006$) em comparação a média de 22,4 ± 6,4 dessas células no controle (C'') (Figura 23 A e Tabela 12). A pele suscetível infestada pelo estágio de (L), com média de 38,0 ± 22,9 de células CD4⁺, também apresentou aumento de 2,2 vezes ($P = 0,034$) e manteve aumento semelhante a 2,1 ($P \leq 0,050$) vezes nos estágios de N e A', com médias de 35,8 ± 20,4 e 37,0 ± 24,6 dessas células, em comparação a média de 17,4 ± 7,7 das mesmas na pele suscetível (C'') (Figura 23 A e Tabela 12).

Outra população celular de interesse marcada nas secções de pele resistente e suscetível foram as que expressam a molécula de superfície CD8⁺, entre elas estão subpopulações de linfócitos T e Natural killers (MACHUGH, 1993; CROCKER, 1993; STORSET ET AL., 2004). Sendo assim, as diferentes populações de linfócitos CD8⁺ foram marcadas e contadas nas secções de pele estudadas. Os resultados obtidos, apresentados na figura 23 B, demonstraram que a pele resistentes infestada pelo estágio de (N), com média de 84,8 ± 38,4 de células CD8⁺, aumento de 6,0 ($P = 0,011$) em comparação a média de 14,1 ± 5,3 dessas células na pele suscetível infestada também por (N) (Figura 24 B e 24 D, Tabela 12). A pele resistente infestada por (N), com médias de 84,8 ± 38,4, e a

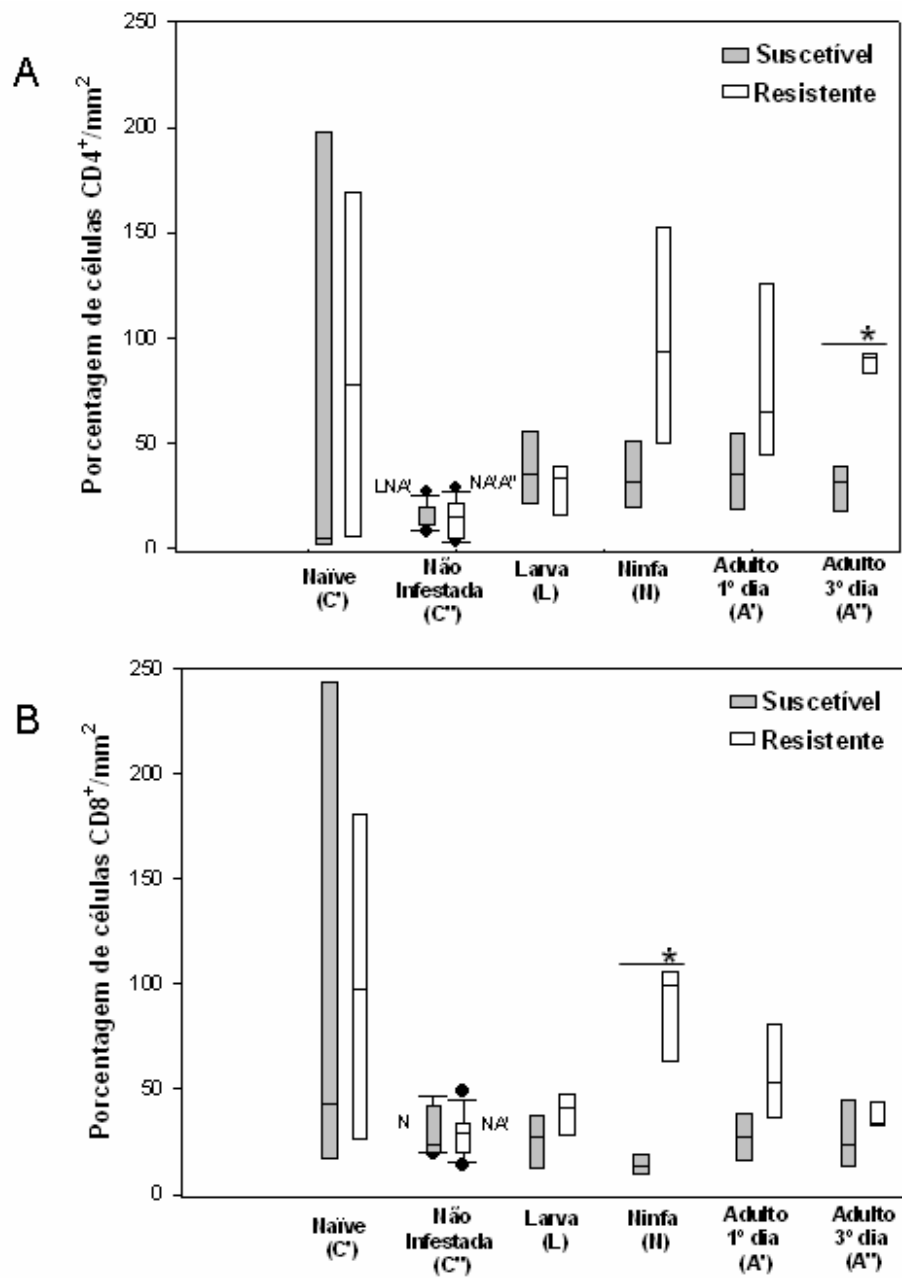


Figura 23. Contagem de células CD4⁺ e CD8⁺ recrutadas à pele de bovinos resistentes e suscetíveis infestados pelo *R. (B.) microplus* em condições experimentais. Os gráficos demonstram a porcentagem de células CD4⁺ (A) e CD8⁺ (B) marcadas na pele de bovinos resistentes (caixas brancas) e suscetíveis (caixas cinzas) infestados pelos estágios larva (L), ninfa (N) e adultos em início (A') e final de ingurgitamento (A''). Pele naïve (C') e pele não infestada (C'') foram utilizadas como controles. As letras indica diferenças estatísticas significativas ($P<0,05$) entre os estágios do carrapato dentro da mesma raça. (*) representa diferenças estatísticas ($P<0,05$) entre bovinos resistentes e suscetíveis.

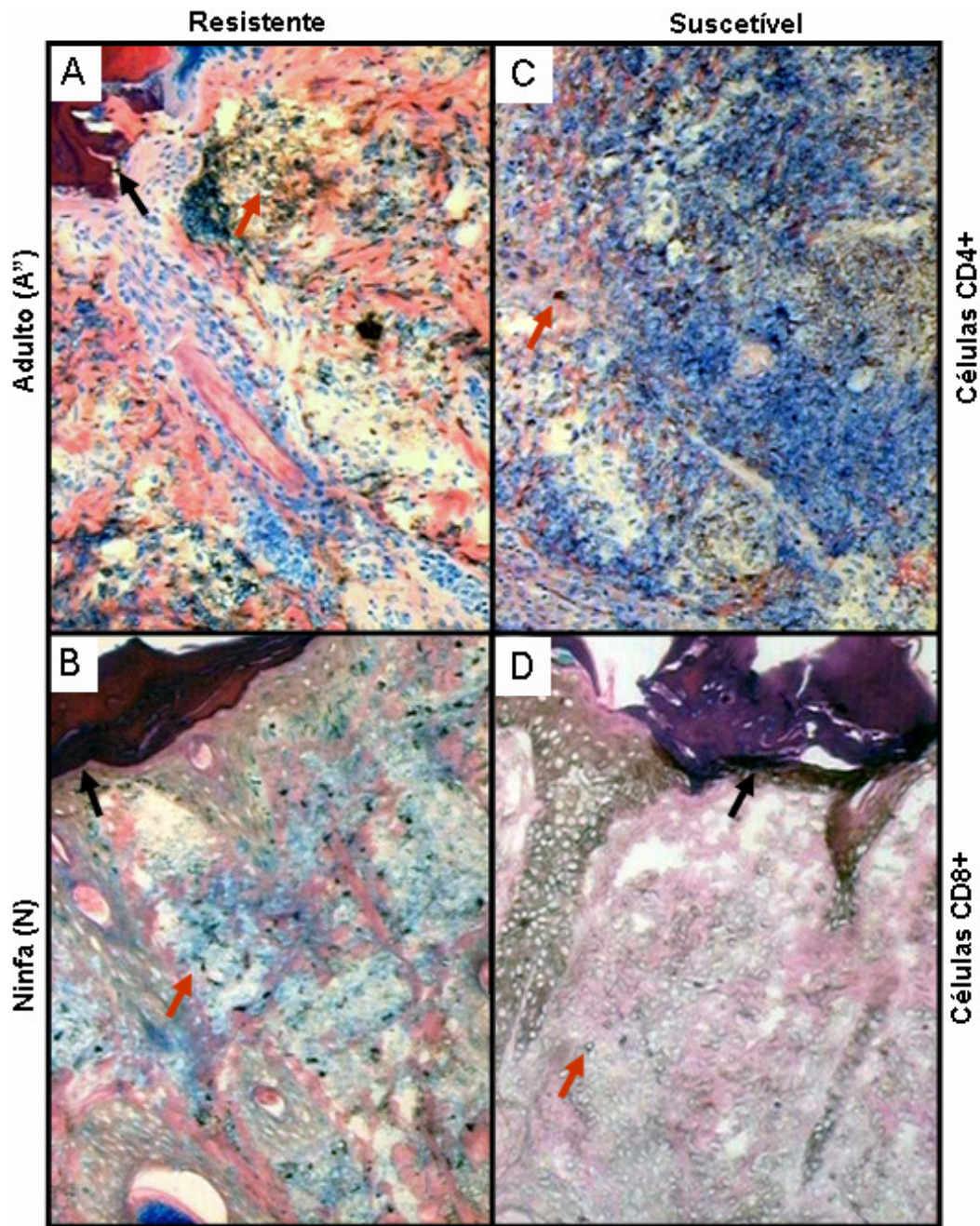


Figura 24. Marcação de células CD4⁺ e CD8⁺ recrutadas à pele de bovinos resistentes e suscetíveis infestada pelo *R. (B.) microplus* em condições experimentais. Marcação de células CD4⁺ na pele de bovinos resistentes (A) e suscetíveis (C) infestadas pelo estágio A''. Marcação de células CD8⁺ na pele de bovinos resistentes (B) e suscetíveis (D) infestada pelo estágio de (N). As setas vermelhas apontam para as células marcadas no tecido e setas pretas apontam para o cone de cimento formado pelo carrapato. Secções de pele criopreservadas e coradas por May-Grünwald e Giemsa (aumento de 100x).

Tabela 12. Contagem de células CD4⁺ e CD8⁺ recrutadas à pele de bovinos resistentes e suscetíveis infestados pelo *R. (B.) microplus* em condições experimentais.

Tipo Celular	N	Fenótipos de Infestação	Número de células/mm ²						
			Naïve (C')	Não Infestada (C'')	Larva (L)	Ninfa (N)	Adulto 1º dia (A')	Adulto 3º dia (A'')	
Células (CD4 ⁺)	4	Suscetível	99,9	17,4 ^{LNA''}	38,0	35,8	37,0	28,7*	
			±	±	±	±	±	±	
				192,0	7,7	22,9	20,4	24,6	15,2
	4	Resistente	87,6 ^{C''NA'}	22,4 ^{NA'A''}	28,2	101,8	85,2 ^{A''}	88,5*	
±			±	±	±	±	±		
			95,8	6,4	16,1	69,7	58,4	6,2	
Células (CD8 ⁺)	4	Suscetível	130,8	27,5 ^{N'}	25,1	14,1*	27,3	29,2	
			±	±	±	±	±	±	
				197,4	7,5	16,6	5,3	16,5	21,5
	4	Resistente	103,7	27,8 ^{NA'}	34,7	84,8*	59,2	37,9	
±			±	±	±	±	±		
			90,1	4,6	12,2	38,4	27,7	8,7	

* Indica diferença estatística significativa ($P < 0,05$) entre bovinos suscetíveis e resistentes ao carrapato.

As letras representam os estágios de larva (L), ninfa (N) e adultos em início (A') e final de ingurgitamento (A'') do carrapato fixado na pele de bovinos resistentes e suscetíveis infestados experimentalmente. Pele naïve (C') e pele não infestada (C'') foram utilizadas como controles. A presença das letras indica diferenças estatísticas significativas ($P < 0,05$) entre as fases do carrapato na mesma raça bovina.

infestada por (A'), com média de $59,2 \pm 27,7$ de células $CD8^+$, mostraram-se 3,1 e 2,1 vezes reduzidas ($P \leq 0,018$) em comparação a de $27,8 \pm 4,6$ de células $CD8^+$ presentes no controle (C'') (Figura 23 e Tabela 12). Em contrapartida, a média de $27,5 \pm 7,5$ desses linfócitos encontrados na pele suscetível (C''), foi 2,0 vezes maior ($P = 0,040$) que a mesma infestada por (N) (Figura 23 B e Tabela 12).

4.3.2. Infestação de bovinos resistentes e suscetíveis ao *R. (B.) microplus* em condições experimentais: caracterização fenotípica dos linfócitos T $\gamma\delta/WC1^+$ e *Natural Killers* recrutados à pele pelos diferentes estágios evolutivos do carrapato.

Linfócitos T $\gamma\delta/WC1^+$ são um subtipo pró-inflamatório de linfócitos T $\gamma\delta^+$ exclusivos de bovinos (MACHUGH, 1993; CROCKER, 1993). Essa população de linfócitos foi identificada nas secções de pele estudadas através de marcação específica da molécula de superfície WC1. Os resultados obtidos da contagem das células $WC1^+$ nas secções analisadas estão na figura 25 A e, como observado no gráfico, os valores médios de linfócitos T $\gamma\delta/WC1^+$ são semelhante entre as raças. Porém a comparação entre os estágios evolutivos do carrapato demonstrou que a pele suscetível (C''), com média de $17,1 \pm 6,7$ de linfócitos T $\gamma\delta/WC1^+$, foi 3,3 vezes maior ($P = < 0,001$) que a média de $5,2 \pm 3,6$ desse tipo celular na pele suscetível infestada por (N), foi 4,1 vezes menor ($P = < 0,001$) que a média de $4,1 \pm 1,0$ desse tipo linfocitário na mesma infestada por (A'); e 1,8 vezes menor que a média de $9,7 \pm 4,3$ dessas células na pele infestada por (A'') (Figura 26 C e 26 D, Tabela 13). A pele resistente (C''), com média de $22,5 \pm 6,1$ de linfócitos T $\gamma\delta/WC1^+$, foi 4,1 vezes menor ($P = 0,008$) apenas que a média de $5,5 \pm 4,1$ desse tipo celular em comparação a mesma infestada pelo estágio A'' (Figura 26 A e 26 B, Tabela 13). A comparação entre as fases evolutivas do carrapato demonstrou que a média de $5,5 \pm 4,1$ de linfócitos T $\gamma\delta/WC1^+$ encontrada

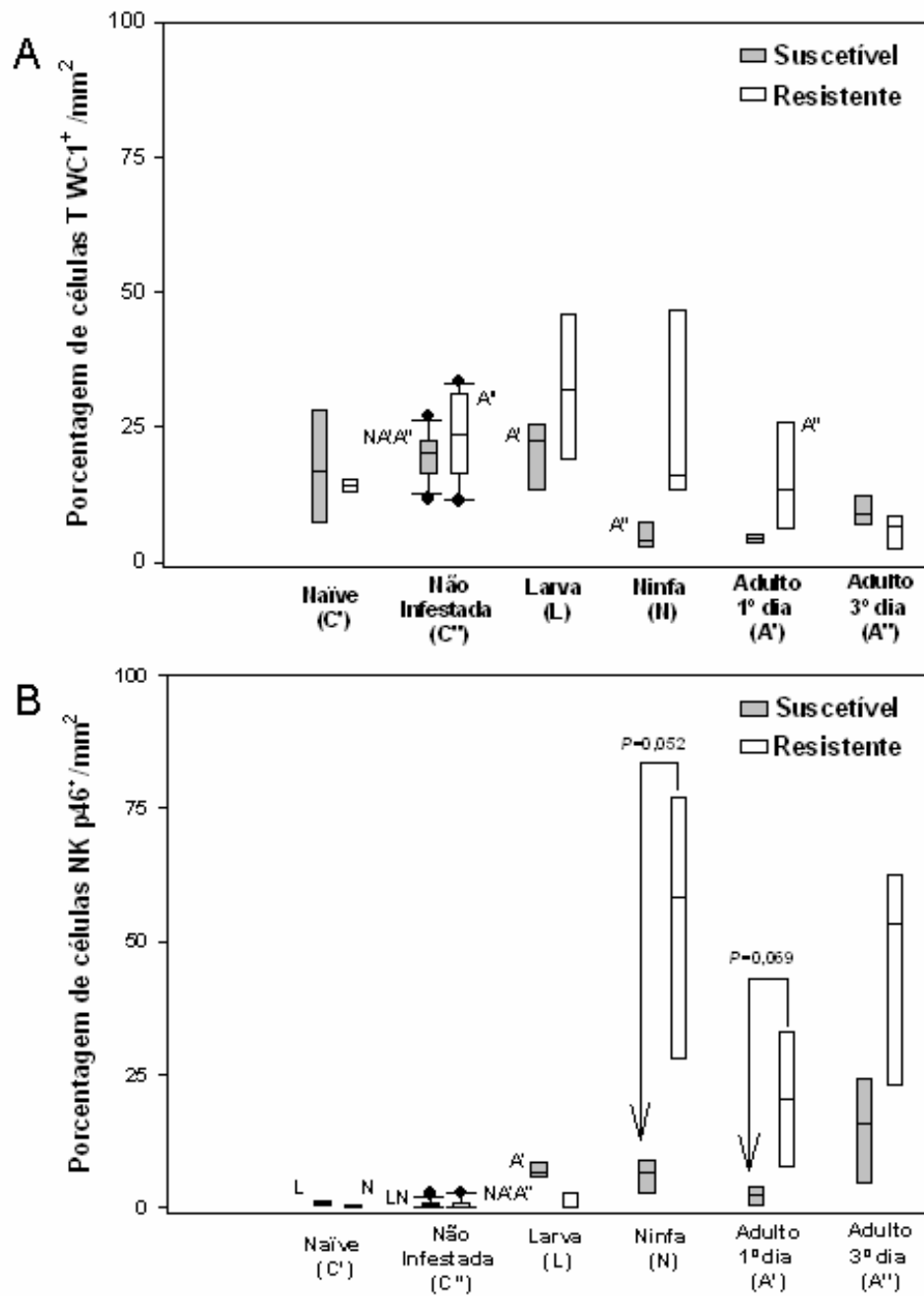


Figura 25. Contagem de linfócitos T $\gamma\delta$ WC1⁺ e de Natural Killers p46⁺ recrutadas à de bovinos resistentes e suscetíveis infestada pelo *R. (B.) microplus* em condições experimentais. Os gráficos demonstram a porcentagem de linfócitos T $\gamma\delta$ WC1⁺ (A) e de Natural Killers p46⁺ (B) marcadas na pele de bovinos resistentes (caixas brancas) e suscetíveis (caixas cinzas) infestados pelo estágio de larva (L), ninfa (N) e adultos em início (A') e final de ingurgitamento (A''). Pele naïve (C') e pele não infestada (C'') foram utilizadas como controles. As letras indica diferenças estatísticas significativas ($P<0,05$) entre os estágios do carrapato dentro da mesma raça. (*) representa diferenças estatísticas ($P<0,05$) entre bovinos resistentes e suscetíveis.

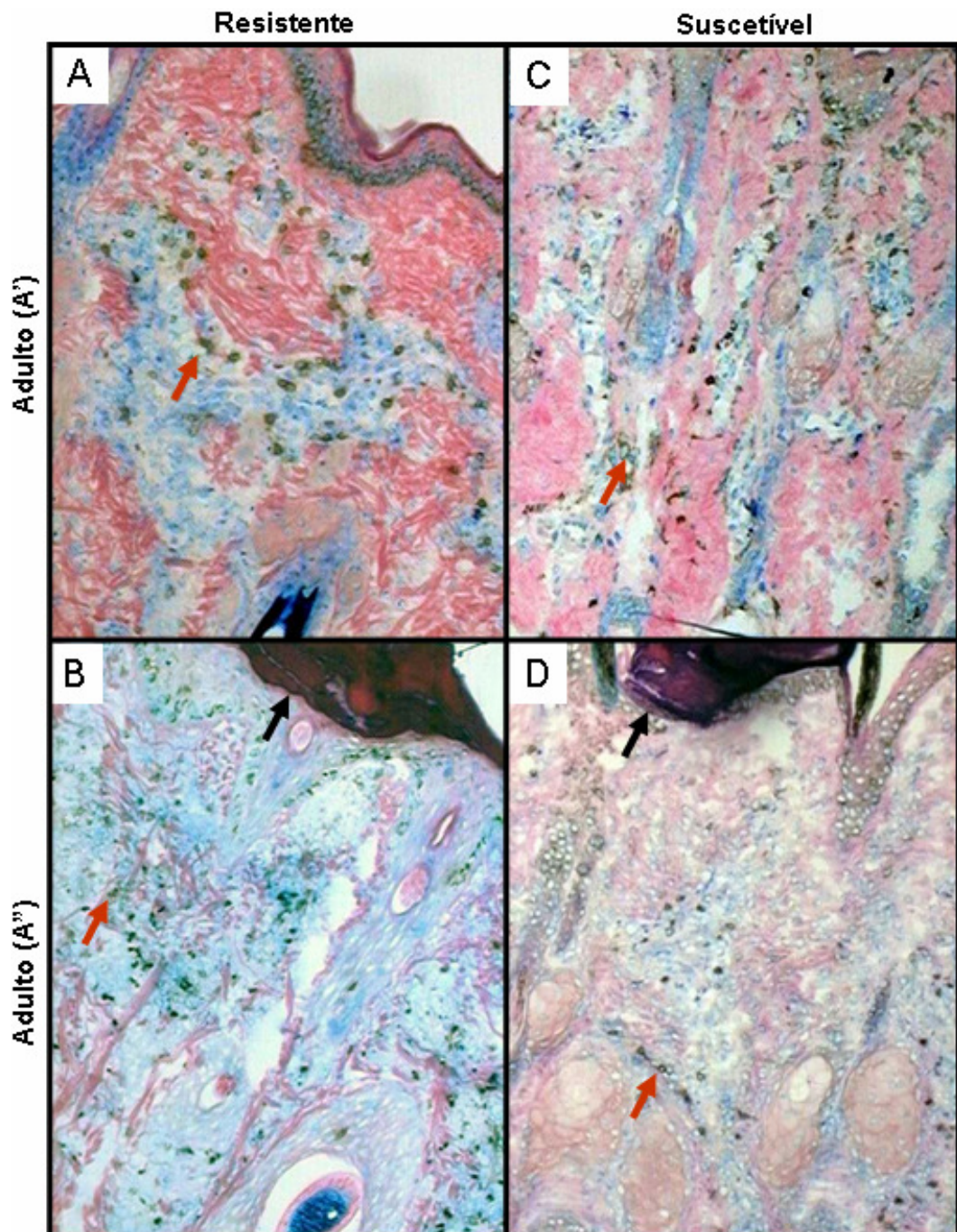


Figura 26. Marcação de linfócitos $T\gamma\delta WC1^+$ recrutados à pele de bovinos resistentes e suscetíveis infestados pelo *R.* (B.) *microplus* em condições experimentais. Pele não infestada de bovinos resistentes (A) e suscetíveis (C); pele de bovino resistente (B) infestada pelo estágio de A''; pele de bovino suscetível (D) infestada pelo estágio de N. As setas vermelhas para os linfócitos T $\gamma\delta WC1^+$ marcadas no tecido e setas pretas apontam para o cone de cimento formado pelo carrapato. Secções de pele criopreservadas e coradas por May-Grünwald e Giemsa (aumento de 100x).

Tabela 13. Contagem de linfócitos T γ δ WC1⁺ e de Natural Killers p46⁺ recrutadas à de bovinos resistentes e suscetíveis infestada pelo *R. (B.) microplus* em condições experimentais.

Tipo Celular	N	Fenótipos de Infestação	Número de células/mm ² (Média \pm DP)					
			Naïve (C')	Não Infestada (C'')	Larva (L)	Ninfa (N)	Adulto 1º dia (A')	Adulto 3º dia (A'')
Linfócitos T γ δ (WC1 ⁺)	4	Suscetível	17,8	17,1 ^{NA'A''}	19,8 ^{A'}	5,2 ^{A''}	4,1	9,7
			\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm
	4	Resistente	13,1	6,7	8,2	3,6	1,0	4,3
			14,2	22,5 ^{A''}	32,6	30,1	16,4	5,5 ^{A''}
			\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm
			1,7	6,1	17,8	31,1	14,2	4,1
Natural Killer (p46 ⁺)	4	Suscetível	1,0 ^L	0,8 ^{LN}	7,1 ^{A'}	5,7	2,3	14,5
			\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm
	4	Resistente	0,4	0,9	1,7	4,1	2,2	12,1
			0,4 ^N	0,7 ^{NA'A''}	1,2	52,5	20,4	43,9
			\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm
			0,3	0,9	2,0	30,9	16,2	27,4

As letras representam os estágios de larva (L), ninfa (N) e adultos em início (A') e final de ingurgitamento (A'') do carrapato fixado na pele de bovinos resistentes e suscetíveis infestados experimentalmente. Pele naïve (C') e pele não infestada (C'') foram utilizadas como controles. A presença das letras indica diferenças estatísticas significativas ($P < 0,05$) entre as fases do carrapato na mesma raça bovina.

na pele resistente infestada pelo estágio de (A'') diminuiu 3,0 vezes ($P = 0,021$) em relação a média de $16,4 \pm 14,2$ dessas células na mesma infestada pelo estágio de (A') (Figura 25 A e Tabela 13). Já a média de $9,7 \pm 4,3$ de linfócitos T $\gamma\delta/WC1^+$ na pele suscetível infestada pela fase de (A''), mostrou-se 1,9 vezes menor ($P = 0,024$) que a média de $5,2 \pm 3,6$ desse tipo celular na mesma infestada pelo estágio de (N); e 2,0 vezes menor ($P = 0,012$) que a média de $19,8 \pm 8,2$ dessas células na mesma infestada por (L) (Figura 25 A e Tabela 13).

E por fim, a última população de interesse observada nas secções de pele estudadas foram as *Natural Killers*. Essas células foram marcadas nas secções de pele resistente e suscetível através da expressão do receptor de superfície NKp46 (STORSET ET AL., 2004). O valor médio de *Natural Killers* p46⁺ marcadas nas secções de pele foi determinado e os resultados apresentados no gráfico da figura 25 B. Como pode ser observado no gráfico, não houve diferenças significativas entre os valores médios de *Natural Killers* as raças estudadas (Figura 25 B). Porém a pele resistente infestada pelo estágio de (N), com média e $52,5 \pm 30,9$ dessas células, apresentou aumento de 9,2, embora não significativo, em comparação a média de $5,7 \pm 4,1$ das mesmas na pele suscetível infestada por (N) (Figura 27 B e 27 D, Tabela 13). O mesmo foi observado na pele resistente infestada pelo estágio de (A'), com média e $20,4 \pm 16,2$ dessas células, apresentou aumento de 8,8, embora não significativo, em comparação a média de $2,3 \pm 2,2$ das mesmas na pele suscetível infestada por (A') (Tabela 13). A pele não infestada da raça resistente com média de $0,7 \pm 0,9$ de *Natural Killers* p46⁺, mostrou-se 75,0 vezes menor ($P = 0,006$) quando comparada a média de $52,5 \pm 30,9$ desse tipo celular na mesma infestada por (N); 29,0 vezes menor ($P = 0,013$) que a média de $20,4 \pm 16,2$ desse tipo linfocitário na mesma infestada por (A') e 66,0 vezes menor ($P = 0,014$) que a média de $43,9 \pm 27,4$ dessas células na pele infestada por (A'') (Figura 27 A e 27 B, Tabela 13). Já a pele suscetível não infestada, com média de $0,8 \pm 0,9$ de *Natural Killers* p46⁺, mostrou-se 8,8

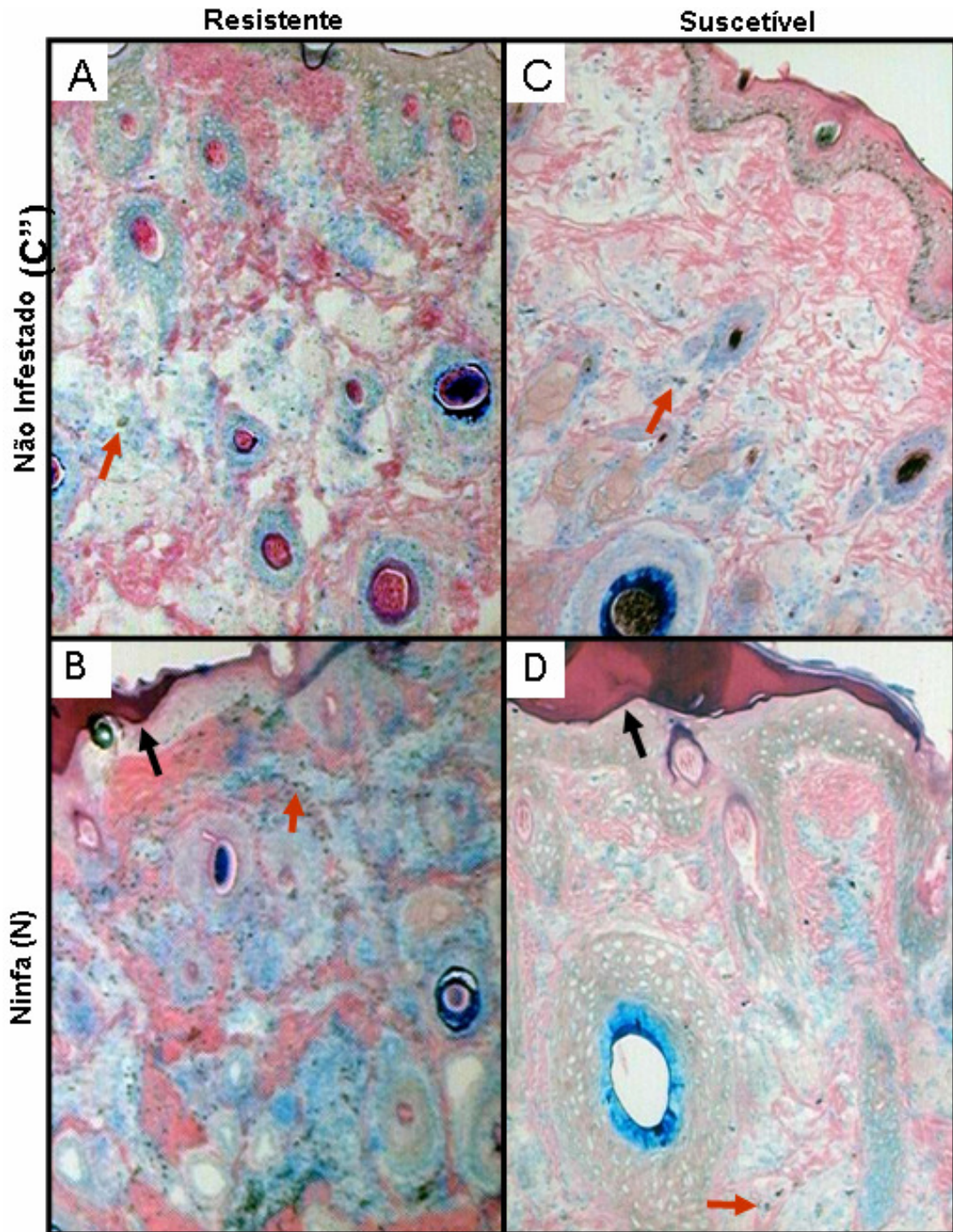


Figura 27. Marcação de células *Natural Killers* p46⁺ recrutadas à pele de bovinos resistentes e suscetíveis infestada pelo *R. (B.) microplus* em condições experimentais. Marcação de células *Natural Killers* p46⁺ na pele C'' de bovinos resistentes (A) e suscetíveis (C). Marcação de células *Natural Killers* p46⁺ na pele infestada de bovinos resistentes (B) e suscetíveis (D) pelo estágio de (N). Setas vermelhas indicam a presença de células marcadas no tecido e setas pretas apontam para o cone de cimento formado pelo carrapato. Seções de pele criopreservadas e coradas por May-Grünwald e Giemsa (aumento de 100x).

vezes menor ($P = < 0,001$) que a média de $7,1 \pm 1,7$ desse tipo celular na mesma infestada pelo estágio de (L), e 7,1 menor ($P = 0,09$) que a média de $5,7 \pm 4,1$ dessas células na mesma infestada pelo estágio de (N) (Figuras 25 B, 27 C e 27 D e Tabela 13). Comparações entre as diferentes fases evolutivas demonstraram redução de 2,0 vezes na média de $2,3 \pm 2,2$ de Natural Killers na pele suscetível infestada por (A') comparada a média de $7,1 \pm 1,7$ desses linfócitos na mesma infestada por (L) (Figura 25 B e Tabela 13).

V. DISCUSSÃO

Na sua busca por sangue, artrópodes hematófagos adaptaram diferentes mecanismos de evasão das defesas cutâneas dos hospedeiros vertebrados, sendo o principal deles a saliva inoculada na pele dos mesmos durante o ato da hematofagia. (RIBEIRO E FRANCISCHETTI, 2003; TITUS, BISHOP E MEJIA, 2006; FRANCISCHETTI ET AL., 2009). Embora apresente propriedades antiinflamatórias e imunomoduladoras, a saliva como todo xenobiótico, quando inoculada na pele causa manifestações cutâneas alérgicas no local (STUKE ET AL., 2008, VON RUEDORFFER ET AL., 2003; LEVERKUS ET AL., 2006; POCHANKE ET AL., 2006; GALARIA, CHAUDHARY, MAGRO, 2003). Essas manifestações cutâneas alérgicas são mediadas principalmente por mastócitos e basófilos através de anticorpos do tipo IgE e IgG (STUKE ET AL., 2008, VON RUEDORFFER ET AL., 2003; LEVERKUS ET AL., 2006; POCHANKE ET AL., 2006). Como os mastócitos são células residentes da pele e se localiza nas proximidades de vasos sanguíneos, os diversos mediadores inflamatórios e fatores quimiotáticos liberados promovem a permeabilização e ativação do endotélio culminando no recrutamento de células efetoras da imunidade e na formação do infiltrado inflamatório (MARSHALL, 2004; GALLI, NAKAE E TSAI, 2005). Esse fato foi comprovado por DEMEURE ET AL (2005), ao demonstrou que a saliva de mosquitos anofelíneos tem ação direta na ativação e desgranulação de mastócitos de pele. Utilizando hospedeiros deficientes em mastócitos, esses pesquisadores comprovaram que os mastócitos iniciam a resposta inflamatória local, com recrutamento de diversos tipos celulares e hiperplasia de linfonodos. Semelhante a saliva dos anofelíneos, a mesma do carrapato poderia estar ativando os mastócitos maduros presentes na pele infestada, pois os mesmos não foram visualizados no infiltrado celular através da coloração dos grânulos metacromáticos. A desgranulação dos mastócitos pode ter com consequência o recrutamento das células formadoras do infiltrado encontrado na pele infestada dos animais estudados.

Uma das particularidades dos mastócitos é a variedade de estímulos que podem conduzi-los a ativação; esta característica é conferida pelos diferentes tipos de receptores expressos na superfície celular dos mesmos (METZ, SIEBENHAAR E MAURER, 2008). Dessa forma, dependendo do tipo de receptor responsável pela ativação dos mesmos, eles desgranulam diferentes produtos biologicamente ativos que podem induzir respostas imunes cutâneas proinflamatórias, antiinflamatórias e/ou imunorreguladoras (METZ, SIEBENHAAR E MAURER, 2008). Sabe-se que componentes de helmintos e de veneno de artrópodes himenópteros ativam mastócitos, não via receptor para IgE, e induzem degranulação de mediadores pré-formados, mas não de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento por esse tipo celular (METZ, SIEBENHAAR E MAURER, 2008). A ausência de regeneração dos grânulos desses mastócitos ativados na pele infestada, pois não são visualizados nos infiltrados analisados, sugeriu que os mesmos podem ter sofrido múltiplos ciclos de ativação devido à inoculação constante de saliva durante o longo período de fixação dos carrapatos à pele hospedeira. É bem conhecido que a saliva de carrapatos tem ação moduladora sobre a ativação e produção de citocinas em diversos tipos celulares como macrófagos, células dendríticas e linfócitos (FERREIRA E SILVA, 1998; FERREIRA E SILVA, 1999, SÁ-NUNES ET AL., 2007). A mesma ação moduladora da saliva poderia acontecer também com os mastócitos da pele hospedeira, o que alteraria o perfil de mediadores lipídicos, citocinas e quimiocinas liberados por esse granulócito (METZ, SIEBENHAAR E MAURER, 2008). Quando ativados e dependendo da via de ativação induzida pela saliva, esses mastócitos poderiam desgranular diferentes tipos de mediadores inflamatórios, citocinas e quimiocinas no local da picada. Através da desgranulação dessas substâncias e, dependendo do conjunto das mesmas, os mastócitos pode também mediar o recrutamento preferencial de um tipo celular em detrimento de outros no local (METZ, SIEBENHAAR E MAURER, 2008). Os mastócitos da pele resistente talvez tenham sido ativados por uma via que preferencialmente desgranula fatores quimiotáticos para basófilos e eosinófilos ou

que não iniba o recrutamento dos mesmos como pode ocorrer na pele suscetível (PANG ET AL., 2006), com menor número desses granulócitos, embora a densidade celular do infiltrado seja semelhante entre os animais estudados.

A pressão seletiva exercida pelos carrapatos na pele resistente durante o convívio de milhares de anos (LEMOS, 1986) selecionou mecanismos inflamatórios e imunológicos capazes de conferir imunidade contra o ectoparasito. O estudo comparativo dos mecanismos inflamatórios e imunológicos entre as raças bovinas estudadas confirmou que as mesmas encontradas na pele resistente são mediadas principalmente por basófilos e eosinófilos (ASKENASE, BAGNALL E WORMS, 1982; BROWN, BARKER E ASKENASE, 1984; SCHLEGER, LINCOLN E KEMP, 1981). Esses granulócitos medeiam a resistência ao carrapato através da desgranulação de substâncias com propriedades pró-inflamatórias, imunomoduladoras e tóxicas, capazes de tornar o sangue pouco palatável (ROTHENBERG E HOGAN, 2006; SCHROEDER, DONALD E LICHTENSTEIN, 2001). Como são facilmente recrutados para tecidos inflamados e não precisam de exposição prévia ao antígeno para desgranularem esses granulócitos constituem uma rápida e eficiente defesa contra ectoparasitos capaz de conferir imunidade ao hospedeiro resistente (LEE E LEE, 2005; FALCONE, PRITCHARD E GIBBS, 2001). Os mecanismos de recrutamento de eosinófilos e basófilos para o local de fixação do carrapato pode envolver diversos fatores quimiotáticos como C5a; IL-16; IGF-1; PGD₂; CCL-2, 7, 8 e 13; CCL-3 e 4; CCL-11, 24 e 26; CCL-5 e CXCL-8, e alguns deles podem recrutar ambos os tipos celulares, como por exemplo, CCL-5, CCL-3 e CCL-11 (FALCONE, HAAS E GIBBS, 2000; MARONE ET AL., 2005; ROTHENBERG E HOGAN, 2006). Dentre estes, destacam-se o IGF-1, que é fator quimiotático seletivo para basófilos (HARTNELL ET AL., 2004), e CCL-13 e C5a, os mais potentes (HEINEMANN ET AL., 2000). Esses fatores quimiotáticos, em grande parte, são liberados por mastócitos ativados (BENOIST E MATHIS, 2002) o que levaria ao acúmulo de basófilos e

eosinófilos na pele infestada. ABATEPAULO e colaboradores (manuscrito em preparação) demonstraram que alguns desses fatores quimiotáticos, como CCL2, CCL3 e IGF-1, apresentaram níveis elevados de expressão gênica na pele resistente infestada pela fase adulta do *R. (B.) microplus*. Essa característica de bovinos resistentes pode ser um dos fatores que contribui para a aquisição de imunidade contra carrapatos. Em contrapartida, recentemente foi demonstrado que a saliva de carrapato possui ação anti-quimiotática (VANCOVA ET AL 2007), exercida através da regulação negativa de receptores de quimiocinas (OLIVEIRA ET AL., 2007) e da presença de proteínas ligantes de quimiocinas (DÉRUAZ ET AL., 2008). Porém, a detecção de SNPs (polimorfismo de um único nucleotídeo) em alguns fatores quimiotáticos importantes para o recrutamento de basófilos e eosinófilos como CCL2, CCL3 e IGF-1 em bovinos resistentes podem ser um mecanismo de evasão do hospedeiro resistente a ação anti-quimiotática da saliva (ABATEPAULO ET AL., 2008). Diante de mecanismos redundantes para impedir o recrutamento e ativação de basófilos e eosinófilos, fica claro que carrapatos repudiam os mediadores inflamatórios liberados por esses granulócitos. Esses mediadores tóxicos expulsam o carrapato não por meio de contração muscular e produção de muco como ocorre com parasitas intestinais e de vias aéreas, mas por lesarem o intestino do mesmo quando ingeridos (MCLAREN, WORMS E ASKENASE, 1983). Fato confirmado quando drogas anti-histamínicas foram administradas em bovinos e que resultaram em número elevado de fêmeas ingurgitadas por animal (TATCHELL E BENNETT, 1969; WILLADSEN, WOOD E RIDING ET AL., 1979). A presença de proteínas ligantes de histamina na saliva de algumas espécies de artrópodes hematófagos reforça a importância da mesma na rejeição a carrapatos (CALVO, ANDERSEN E RIBEIRO, 2006).

As respostas imunológicas contra carrapatos são um fenômeno complexo que parece ser mediado principalmente por basófilos, esse granulócito são também um importante componentes mediadores da reação de hipersensibilidade tardia do tipo Jones-Mote (MARTINS E RAFFEL,

1964). Reação semelhante foi induzida na pele por inoculação intradérmica de proteínas heterólogas solúveis (ASKENASE E ATWOOD, 1976), exatamente a situação que ocorre durante a alimentação do carrapato no hospedeiro. A cinética desse granulócito na reação de Jones-Mote difere da reação de hipersensibilidade imediata de fase tardia induzida por IgE (ASKENASE E ATWOOD, 1976) e coincide com a hipersensibilidade do tipo tardio observada na pele resistente contra antígenos do *R. (B.) microplus* (BECHARA ET AL., 2000). Basófilos são uma importante fonte de IL-4 e IL-13 (GIBBS ET AL., 1996; MITRE ET AL., 2004) e estão envolvidos também nas reações alérgicas induzidas por alérgenos protéicos com atividade enzimática (SOKOL ET AL., 2007) e a quitina (REESE ET AL., 2007), ambos presentes de forma representativa na saliva e pecas bucais do carrapato. Além disso, esse granulócito é capaz de apresentar antígenos para linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ com a mesma eficiência que células dendríticas, primando-os de forma a induzir a produção de citocinas de padrão TH2 (KIM ET AL., 2009; PERRIGOUE ET AL., 2009; YOSHIMOTO ET AL., 2009; SOKOL ET AL., 2009). As reações cutâneas induzidas pela saliva de carrapatos parecem envolver componentes da resposta imune adquirida humoral e celular, pois a resistência ao ectoparasito aumenta com repetidas exposições indicando o desenvolvimento de memória protetora específica (TRAGER, 1939; TATCHELL E MOOREHOUSE, 1968; REIK, 1962). A transmissão de imunidade adquirida a carrapatos através da transferência de soro e células linfóides obtidos de animais resistentes é um forte indício da participação da imunidade adaptativa e a ação conjunta de mecanismos humorais e celulares na aquisição de resistência a carrapatos (WIKEL E ALLEN, 1976; ASKENASE, BAGNALL E WORMS, 1982). Foi demonstrado por DENZEL e colaboradores (2008) que basófilos aumentam a elaboração de respostas de memória humoral e que a depleção desse granulócito reduziu em 50% a produção de IgG1 e em 60 a 80% a de IgG2a antígenos-específicas. A presença de proteínas ligantes de IgG na saliva (WANG ET AL., 1998), indica que anticorpos são o pivô da resposta controlando a infestação os níveis de infestação do carrapato

(KASHIMO ET AL., 2005). Trabalhos recentes também demonstraram que a saliva de carrapatos favorece o desenvolvimento de linfócitos T CD4⁺ produtores de citocinas pertencentes ao padrão Th2 e de IL-10 (FERREIRA E SILVA, 1998; MEJRI ET AL., 2001). Embora o tipo Th2 de resposta imune esteja correlacionado com suscetibilidade a carrapatos (CHRISTE ET AL., 1998; FERREIRA E SILVA, 1999), é fato que resposta imune contra helmintos envolvendo basófilos predominam o mesmo tipo (FALCONE, PRITCHARD E GIBBS, 2001), deixando dúvidas quanto ao padrão de citocinas predominante em hospedeiros resistentes a carrapatos. Como demonstrado neste trabalho, bovinos resistentes elaboram melhor a resposta imunológica adaptativa local que os bovinos suscetíveis. O maior número de linfócitos T e B presentes no infiltrado sugere que a saliva não interferiu no recrutamento desses tipos celulares e, uma vez no local, esses linfócitos reorganizam e direcionam os mecanismos inatos já ativos. A ação conjunta das células pertencentes as respostas inata e adaptativa e de seus produtos são responsáveis por expulsar o ectoparasito da pele hospedeira.

Como já mencionado na Introdução, os linfócitos T $\gamma\delta^+$ são muito abundantes na pele bovina, representando 44% dos linfócitos T (HEIN E DUDLE, 1997; MACHUGH ET AL, 1993; CROCKER ET AL, 1993) e evolutivamente conservados (RICHARDS E NELSON, 2000). Como se localizam nas barreiras epiteliais e são recrutados para tecidos inflamados (HAYDAY ET AL., 2001; WILSON, AYDINTUG E JUTILA, 1999) possivelmente participem de uma primeira linha de defesa contra ectoparasitos (HEIN E DUDLE, 1997; MACHUGH ET AL, 1993; CROCKER ET AL, 1993). A maioria dos linfócitos $\gamma\delta^+$ expressa o receptor do tipo *scavenger* WC1 (MACHUGH ET AL, 1997) e constituem uma subpopulação linfocitária produtora de citocinas pró-inflamatória como IL-12, IL-4, IL-10 e TNF- α (BROWN, DAVIS E TUO, 1996; LAHMERS ET AL, 2005; HEDGES, GRAFF E JUTILA, 2000) e de quimiocinas, ajudando no recrutamento celular

(LAHMERS ET AL., 2006). A presença constante desse tipo celular na pele resistente, mesmo durante a infestação, sugere uma possível participação desses linfócitos na defesa contra ectoparasitos. Esse tipo celular também participa da homeostasia da pele ao produzir fatores de crescimento como o IGF-1, que regula a taxa de proliferação de queratinócitos (SHARP ET AL., 2005), é quimiotático para basófilos (HARTNELL ET AL., 2004). Os níveis de expressão gênica de IGF-1 na pele resistente se demonstraram elevados, o que também sugere que esse tipo celular possa ajudar no recrutamento desse granulócito (ABATEPAULO ET AL., manuscrito em preparação).

Além da ação espoliadora dos carrapatos, eles também são capazes de transmitir grande variedade de microrganismos como protozoários, rickettsias, espiroquetas e vírus, como já mencionado (JONGEJAN E UILENBERG, 2004). Alguns dos tipos celulares encontrados no infiltrado podem ser responsáveis impedir a infecção do organismo hospedeiro pelos agentes transmitidos pelo carrapato. Os neutrófilos são os leucócitos mais abundantes no sangue e os primeiros a serem recrutados para tecidos inflamados. Atuam como pivô da imunidade contra infecções por microrganismos e, além de fagocitam e destroem os microrganismos, também produzem várias citocinas. Embora sejam células de vida curta, nos sítios inflamatórios seu tempo de vida aumenta (NATHAN, 2006). A degradação de matrix extracelular por metaloproteases presentes na saliva do carrapato (DECREM ET AL., 2008) pode gerar peptídeos que apresentam homologia com o domínio alfa de quimiocinas, induzindo quimiotaxia através dos receptores CXC (WEATHINGTON ET AL., 2006). Esse granulócito responde a quimiocinas do tipo CXC como as CXCL-1, 2, 3 e 8 (ROT E VON ADRIAN, 2004) o que resultaria no acúmulo de neutrófilos no infiltrado inflamatório de maneira não específica. Embora estejam presentes no infiltrado celular de ambas as raças estudadas de forma semelhante, não foi observada participação efetiva desse tipo celular na aquisição de resistência. Recentemente foi descrito um novo mecanismo de destruição de microrganismos exercida pelos neutrófilos. Esse mecanismo é chamado de NETose e é basicamente

uma rede extracelular de cromatina complexada com proteínas granulares que aprisionam e matam os microrganismos inoculados pela saliva do carrapato (BRINKMANN ET AL, 2004; BRINKMANN E ZYCHLINSKY, 2007; URBAN ET AL., 2006; URBAN, ZYCHLINSKY, 2007; FUCHS ET AL., 2007). As células *Natural Killers* que apresentam atividade citolítica mediada por IgG (STORSET ET AL., 2004), também podem estar envolvidas em repostas que conferem proteção contra o *Mycobacterium bovis* (BASTOS ET AL., 2008) e patógenos transmitidos pelo carrapato (GOFF ET AL., 2006), nas quais predomina padrão Th1 de resposta imune caracterizado pela intensa produção de IL-12 e IFN- γ . A ação inibidora da saliva de carrapatos sobre a atividades citotóxica das *Natural Killers* (KUBES ET AL.,2002) e da produção de citocinas próinflamatórias (KYCKOVA AND KOPECKY., 2006) pode ser uma vantagem utilizadas pelos agentes transmitidos pelo ectoparasito para o sucesso da infectividade e estabelecimento das doenças.

Em resumo, este trabalho teve o intuito de contribuir na elucidação dos componentes celulares que podem estar comprometidos com a aquisição de imunidade a carrapatos de forma comparativa. Dessa forma, foi utilizado um modelo experimental constituído por hospedeiros naturais ao *R. (B.) microplus* e de uma mesma espécie apresentando fenótipos contrastantes de infestação.

VI. CONCLUSÕES

Este trabalho descreveu a participação de algumas populações celulares que compõem o infiltrado inflamatório e participam da resposta imune local ao carrapato no desenvolvimento do fenótipo de resistência de bovinos contra esse ectoparasito. Baseado nos resultados obtidos quanto à composição do infiltrado celular formado na pele infestada de bovinos resistentes e suscetíveis infestados pelo carrapato *R. (B.) microplus*, foi possível concluir que:

1- O maior número de basófilos e eosinófilos no infiltrado recrutado à pele infestada está e diretamente correlacionado com a manifestação de resistência na raça zebuína.

2- A presença em maior número de linfócitos T e linfócitos B na pele de bovinos resistentes indica que este hospedeiro é capaz de elaborar respostas imunes adaptativas efetivas contra carrapatos e que a resposta imune humoral e celular podem colaborar de forma semelhante no processo de aquisição de resistência.

VII. BIBLIOGRAFIA

- ABATEPAULO, A.R., CAETANO, A.R., MENDES, C.T., JR., CARVALHO, W.A., FERREIRA, B.R., DE MIRANDA SANTOS, I.K. Detection of SNPs in bovine immune-response genes that may mediate resistance to the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Anim Genet.* 2008; 39, 328-329.
- ABBAS, A. K, LICHTMAN, A. H. *Cellular and Molecular Immunology.* 4^a ed Saunders; capitulo 2, 2003.
- ABRAMSON, D. I. Dermal blood vessels and lymphatics. In *Pharmacology of the skin.* M. W. Greaves and S. Shuster, Eds. *Handbook Exp. Pharmacol.* 1989; 87, 98-116.
- ALJAMALI, M., BOWMAN, A. S., DILLWITH, J. W., TUCKER, J. S., YATES, G. W., ESSEMBERG, R. C., SAUER, J. R. Identification and synthesis of prostaglandins in the lone star tick, *Amblyomma americanum*, as assessed by Radio-immunoassay and gas Chromatography/Mass spectrometry. *Insect Biochemistry and molecular Biology.* 2002; 32, 331-341.
- ALLEN JR, DOUBE BM, KEMP DH. Histology of bovine skin reactions to *Ixodes holocyclus*. *Can J Comp Med.* 1977; 41:27-35.
- ALLEN, J. R. Tick resistance: basophils in skin reactions of resistant guinea-pigs. *Int. J. Parasitol.*, 1973; 3: 195-200.
- ALLEN, J. R. Host resistance to ectoparasites. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 1994; 13, 1287-1303.
- ANDERSON, J. F., MAGNARELLI, L. A. Biology of ticks. *Infectious Disease Clinics of North America.* 2008; June; 22 (2): 195-215.
- ANGUITA J, RAMAMOORTHY N, HOVIUS JW, DAS S, THOMAS V, PERSINSKI R, CONZE D, ASKENASE PW, RINCÓN M, KANTOR FS, FIKRIG E. Salp15, an ixodes scapularis salivary protein, inhibits CD4(+) T cell activation. *Immunity.* 2002; Jun;16(6):849-59.
- ARTHUR D.R. Feeding in ectoparasitic acari with special reference to tick. *Adv Parasitol.* 1965; 3:249-98.
- ARTHUR, D. R. Host and tick relationships: a review. *Journal of Wildlife Disease.* 1973; Jan (9); 74-84.
- ASKENASE, P. W. Immunopathology of parasitic diseases: involvement of basophils and mast cells. *Springer Seminar in Immunopathology.* 1980; 2, 417-22.
- ASKENASE, P. W., BAGNALL, B. G. AND WORMS, W. J. Cutaneous basophils-associated resistance to extoparasites (ticks). I. Transfer with immune serum or immune cells. *Immunology,* 1982; 45:501-511.

- ASKENASE, P. W., DEBERNARDO, R., TAUBEN, D. AND KASHGARIAN, M. Cutaneous basophil anaphylaxis. Immediate vasopermeability increases and anaphylactic degranulation of basophils at delayed hypersensitivity reactions challenged with additional antigen. *Immunology*, 1978; 35, 741.
- ASKENASE PW, ATWOOD JE. Basophils in tuberculin and "Jones-Mote" delayed reactions of humans. *J Clin Invest*. 1976 Nov;58(5):1145-54.
- ASKENASE, P. W. Cutaneous basophil hypersensitivity in contact sensitized guinea pigs. I. transfer with immune sera. *J. exp. Med.* 1973; 138, 1144.
- BALASHOV, IU S. The origin and evolution of parasitism on terrestrial vertebrates in insects, mites, and ticks. *Parazitologiya*. Sep-Oct; 2006; 40 (5): 409-24.
- BALASHOV, Y.S., Bloodsucking ticks (Ixodidae) vectors of disease of man and animals. *Miscellaneous Publications of the Entomological Society of America*. 1972; 8, 161-376.
- BASTOS RG, JOHNSON WC, MWANGI W, BROWN WC, GOFF WL. Bovine NK cells acquire cytotoxic activity and produce IFN-gamma after stimulation by Mycobacterium bovis BCG- or Babesia bovis-exposed splenic dendritic cells. *Vet Immunol Immunopathol*. 2008 Aug 15;124(3-4):302-12.
- BECHARA GH, MORELLI JUNIOR J, SZABÓ MPJ. Skin test and tick immune status in susceptible and resistant cattle in Brazil. *Ann N Y Acad. Sci.* 2000; 916: 570 – 575.
- BELKAID, Y.; VALENZUELA, J. G.; KAMHAWI, S.; ROWTON, E.; SACKS, D. L.; RIBEIRO, J. M. Delayed-type hypersensitivity to *Phlebotomus papatasi* sand fly bite: an adaptive response induced by the fly? *PNAS*, 2000; June (97):6704-6709.
- BENOIST C, MATHIS D. Mast cells in autoimmune disease. *Nature*. 2002 Dec 19-26;420(6917):875-8.
- BINNINGTON, K. C., KEMP, D. H.. Role of tick salivary glands in feeding and disease transmission. *Adv. Parasitol*. 1980; 18: 315-39.
- BIRON CA, GAZZINELLI RT. Effects of IL-12 on immune responses to microbial infections: a key mediator in regulating disease outcome. *Curr Opin Immunol*. 1995 Aug;7(4):485-96.
- BOPANA DK, DHINAKAR RAJ G, JOHN L, WIKEL SK, LATHA BR, GOMATHINAYAGAM S. In vivo immunomodulatory effects of ixodid ticks on ovine circulating T- and B-lymphocytes. *Parasite Immunol*. 26:83-93,2004
- BOWMAN AS, DILLWITH JW, SAUER JR. Tick salivary prostaglandins: Presence, origin and significance. *Parasitol Today*. 1996; Oct;12(10):388-96.

- BRINKMANN V, ZYCHLINSKY A. Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs. *Nat Rev Microbiol.* 2007 Aug;5(8):577-82. Review.
- BRINKMANN V, REICHARD U, GOOSMANN C, FAULER B, UHLEMANN Y, WEISS DS, WEINRAUCH Y, ZYCHLINSKY A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science.* 2004 Mar 5;303(5663):1532-5.
- BROWN SJ, ASKENASE PW. Immune rejection of ectoparasites (ticks) by T cell and IgG1 antibody recruitment of basophils and eosinophils. *Fed Proc.* 1983 Apr;42(6):1744-9.
- BROWN SJ, ASKENASE PW. Rejection of ticks from guinea pigs by antihapten antibody-mediated degranulation of basophils at cutaneous basophil hypersensitivity sites: role of mediators other than histamine. *J. Immunol* 134: 1160-1165, 1985
- BROWN SJ, BARKER RW, ASKENASE PW. Bovine resistance to *Amblyomma americanum* ticks: an acquired immune response characterized by cutaneous basophil infiltrates. *Vet Parasitol.* 1984 Oct;16(1-2):147-65.
- BROWN SJ, KNAPP FW. *Amblyomma americanum*: sequential histological analysis of adult feeding sites on guinea pigs. *Exp Parasitol.*49:303-318, 1980.
- BROWN, S. J. Antibody and cell-mediated resistance by guinea pigs to adult *Amblyomma americanum* ticks. *Am. J. Trp. Med. Hyg.* 1982; 311: 1285-1290.
- BROWN, S. J., GALLI, S. J., GLEICH, G. J. AND ASKENASE, P. W. Ablation of immunity to *Amblyomma americanum* by anti-basophil serum: cooperation between basiphils and eosinophils in expression of immunity to ectoparasitas (ticks) in guinea pigs. *J. Immunol.* 1982; 129, 790.
- BROWN WC, DAVIS WC, TUO W. Human interleukin-12 upregulates proliferation and interferon-gamma production by parasite antigen-stimulated Th cell clones and gamma/delta T cells of cattle. *Ann N Y Acad Sci.* 1996 Oct 31;795:321-4.
- CALVO E, MANS BJ, ANDERSEN JF, RIBEIRO JM. Function and evolution of a mosquito salivary protein family. *J Biol Chem.* 2006 Jan 27;281(4):1935-42.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. LYME DISEASE-UNITED STATES, 1995. *Morbidity Mortality Weekly Report* 1996; 46: 481-484.
- CLAYTON, D.H; LEE, P. L. M., TOMPKINS, D. M., BRODIE, E. D. Reciprocal natural selection on host-parasite phenotypes. *Am. Nat.* 1999; 154, 261-270.
- COOPER MD, ALDER MN. The evolution of adaptive immune systems. *Cell.* 2006 Feb 24;124(4):815-22. Review.
- CHRISTE M, RUTTI 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-gamma monoclonal antibodies. *Parasitol Res.* 1998 May;84(5):388-93.

- CROCKER G, SOPP P, PARSONS K, DAVIS WC, HOWARD CJ. Analysis of the gamma/delta T cell restricted antigen WC1. *Vet Immunol Immunopathol.* 1993 Nov;39(1-3):137-44.
- DE CASTRO, J. Sustainable tick and tick-borne disease control in livestock improvement in developing countries. *Vet. Parasitol,* 1997; 71 (2-3): 77-97.
- DECREM Y, BEAUFAYS J, BLASIOLI V, LAHAYE K, BROSSARD M, VANHAMME L, GODFROID E. A family of putative metalloproteases in the salivary glands of the tick *Ixodes ricinus*. *FEBS J.* 2008 Apr;275(7):1485-99. Epub 2008 Feb 15.
- DEMEURE CE, BRAHIMI K, HACINI F, MARCHAND F, PÉRONET R, HUERRE M, ST.-MEZARD P, NICOLAS J-F, BREY P, DELESPESE G, MÉCHERI S. *Anopheles* mosquito bites activate cutaneous mast cells leading to a local inflammatory response and lymph node hyperplasia. *J Immunol* 174: 3932-3940, 2005.
- DENZEL A, MAUS UA, RODRIGUEZ GOMEZ M, MOLL C, NIEDERMEIER M, WINTER C, MAUS R, HOLLINGSHEAD S, BRILES DE, KUNZ-SCHUGHART LA, TALKE Y, MACK M. Basophils enhance immunological memory responses. *Nat Immunol.* 2008 Jul;9(7):733-42.
- DÉRUAZ M, FRAUENSCHUH A, ALESSANDRI AL, DIAS JM, COELHO FM, RUSSO RC, FERREIRA BR, GRAHAM GJ, SHAW JP, WELLS TN, TEIXEIRA MM, POWER CA, PROUDFOOT AE. Ticks produce highly selective chemokine binding proteins with antiinflammatory activity. *J Exp Med.* Sep, 2008; 1;205(9):2019-31.
- DEVANEY, J. A AND AUGUSTINE, P. C. Correlation of estimated and actual northern fowl mite population with the evolution of specific antibody to a low molecular weight polypeptide in sera of infested hen. *Poultry Sci.* 1988; 67, 549-556.
- DOBSON, S.J., BAKER, S.C. Phylogeny of the hard ticks (Ixodidae) inferred from 18S rRNA indicates that the genus *Aponomma* is paraphyletic. *Molecular Phylogenetics and Evolution.* 1999; 11, 288-295.
- DOOLITTLE, R.E., FENG, D. F.. Reconstructing the evolution of vertebrate blood coagulation from a consideration of the amino acid sequences of clotting proteins. *Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology LII,* 1987; 869-874.
- DVORAK, H. F. SIMPSON, B. S., BAST, R. C. AND LESKOWITZ, S. Cutaneous basophil hypersensitivity III. Participation of the basophil in hypersensitivity to antigen-antibody complex, delayed hypersensitivity and contact allergy. *J. Immunol.* 1971; 107, 138.
- FALCONE FH, PRITCHARD DI, GIBBS BF. Do basophils play a role in immunity against parasites? *Trends Parasitol.* 2001 Mar;17(3):126-9. Review.
- FALCONE FH, HAAS H, GIBBS BF. The human basophil: a new appreciation of its role in immune responses. *Blood* 96: 4028-4038, 2000

- FERLAZZO G, TSANG ML, MORETTA L, MELIOLI G, STEINMAN RM, MÜNZ C. Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the NKp30 receptor by activated NK cells. *J Exp Med.* 2002 Feb 4;195(3):343-51.
- FERREIRA BR, SZABÓ MPJ, CAVASSANI KA, BECHARA GH E SILVA JS. Antigens from *Rhipicephalus sanguineus* ticks elicit potent cell-mediated immune responses in resistant but not in susceptible animals. *Veterinary Parasitology*, 2003; 115: 35 - 48.
- FERREIRA BR, SILVA JS. Successive tick infestations selectively promote a T-helper 2 cytokine profile in mice. *Immunology.* 1999 Mar;96(3):434-9.
- FERREIRA BR, SILVA JS. Saliva of *Rhipicephalus sanguineus* tick impairs T cell proliferation and IFN-gamma-induced macrophage microbicidal activity. *Vet Immunol Immunopathol.* Jul, 1998; 31;64(3):279-93.
- FUCHS TA, ABED U, GOOSMANN C, HURWITZ R, SCHULZE I, WAHN V, WEINRAUCH Y, BRINKMANN V, ZYCHLINSKY A. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol.* 2007 Jan 15;176(2):231-41.
- FLOATE KD, TAYLOR WG, SPOONER RW. Thin-layer chromatographic detection of ivermectin in cattle dung. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 1997; 694:246-51.
- FRANCICHETTI, I.M., VALENZUELA, J.G., RIBEIRO, J.M. Anophelin: Kinetics and mechanism of thrombin inhibition. *Biochemistry.* 1999; 38:16678-85.
- FRANCIS, J. AND LITTLE, D. A. Resistance of Droughtmaster cattle to tick infestation and babesiosis. *Aust. Vet. J.* 1964; 40, 247-53.
- FRANCISCHETTI, I. M., VALENZUELA, J. G., PHAM, V. M., GARFIELD, M. K., RIBEIRO, J. M. Toward a catalog for the transcripts and proteins (sialome) from the salivary gland of the malaria vector *Anopheles gambiae*. *J. Exp. Biol.* 2002. Aug; 205 (Pt 16): 2429-51.
- GALARIA NA, CHAUDHARY O, MAGRO CM. Tick mouth parts occlusive vasculopathy: a localized cryoglobulinemic vasculitic response. *J Cutan Pathol.* 2003 May;30(5):303-6.
- GALLI SJ, NAKAE S, TSAI M. Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nature Immunology* 6: 135-142, 2005.
- GARG R, JUNCADELLA IJ, RAMAMOORTHY N, ASHISH, ANANTHANARAYANAN SK, THOMAS V, RINCÓN M, KRUEGER JK, FIKRIG E, YENGO CM, ANGUITA J. Cutting edge: CD4 is the receptor for the tick saliva immunosuppressor, Salp15. *J Immunol.* Nov, 2006; 15;177(10):6579-83.
- GEORGE JE, DAVEY RB, POUND JM. Introduced ticks and tick-borne diseases: the threat and approaches to eradication. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 2002 Nov;18(3):401-16, vi. Review.

- GIBBS, B.F., HAAS, H., FALCONE, F.H., ALBRECHT, C., VOLLRATH, I.B., NOLL, T., WOLFF, H.H., AMON, U. Purified human peripheral blood basophils release interleukin-13 and preformed interleukin-4 following immunological activation. *Eur. J. Immunol.* 1996. 26, 2493-2498.
- GILL HS. Kinetics of mast cell, basophil and eosinophil populations at *Hyalomma anatolicum anatolicum* feeding sites on cattle and the acquisition of resistance. *Parasitology.* 1986; 93 (Pt 2):305-315.
- GILLESPIE RD, MBOW ML, TITUS RG. The immunomodulatory factors of bloodfeeding arthropod saliva. *Parasite Immunol.* 2000; Jul;22(7):319-31.
- GLENN KENNEDY D, CANNAVAN A, MCCRACKEN RJ. Regulatory problems caused by contamination, a frequently overlooked cause of veterinary drug residues. *J. Chromat.* 882: 37-52, 2000.
- GOFF WL, STORSET AK, JOHNSON WC, BROWN WC. Bovine splenic NK cells synthesize IFN-gamma in response to IL-12-containing supernatants from *Babesia bovis*-exposed monocyte cultures. *Parasite Immunol.* 2006 May;28(5):221-8.
- GONZÁLES JC. O controle do carrapato do boi. Porto Alegre: Edição do Autor 1995.
- GORB SN, BEUTEL RG. Evolution of locomotory attachment pads of hexapods. *Naturwissenschaften.* 2001 Dec;88(12):530-4.
- GORB, S.2001. Attachment devices of insect cuticle. Kluwer Academic Publishers, London, UK., 305p.
- GRISI L. Prováveis prejuízos causados pelo carrapato. *A Hora Veterinária* 125, 2002.
- GROSS TL, HALLIWELL RE. Lesions of experimental flea bite hypersensitivity in the dog. *Vet Pathol.* 1985 Jan;22(1):78-81.
- GUBLER, D. J. Resurgent vector-borne disease as a global health problem. *Emerg. Inf. Dis;* 1998. 4: 442-50.
- GUGLIELMONE, A. A., ROBBINS, R. G., APANASKEVICH, D. A., PETNEY, T. N., ESTRADA-PÉÑA, A., HORAK, I. G., Comments on controversial tick (Acari: Ixodida) species names and species described or resurrected from 2003 to 2008. *Exp. Appl. Acarol.* 2009. Jan, 24.
- HAYDAY, A., E. THEODORIDIS, E. RAMSBURG, J. SHIRES. Intraepithelial lymphocytes: exploring the Third Way in immunology. *Nat. Immunol.* 2001. 2: 997-1003. : 4914-4919.
- HANNIER S, LIVERSIDGE J, STERNBERG JM, BOWMAN AS. *Ixodes ricinus* tick salivary gland extract inhibits IL-10 secretion and CD69 expression by mitogen-stimulated murine splenocytes and induces hyporesponsiveness in B lymphocytes. *Parasite Immunol.* Jan, 2003; 25(1):27-37.

- HARTNELL A, HEINEMANN A, CONROY DM, WAIT R. Identification of selective basophil chemoattractants in human nasal polyps as insulin-like growth factor-1 and insulin-like growth factor-2. *J Immunol* 173: 6448-6457, 2004.
- HEDGES JF, GRAFF JC, JUTILA MA. Transcriptional profiling of gamma delta T cells. *J Immunol*. 2003 Nov 15;171(10):4959-64. Review.
- HEIN WR, DUDLER L. TCR gamma delta+ cells are prominent in normal bovine skin and express a diverse repertoire of antigen receptors. *Immunology*. 1997 May;91(1):58-64.
- HEINEMANN A, HARTNELL A, STUBBS VEL, ET AL. Basophil Responses to Chemokines Are Regulated by Both Sequential and Cooperative Receptor Signaling. *J Immunol*, 2000; 165: 7224-7233.
- HONER MR, GOMES A. O manejo integrado de mosca-dos-chifres, berne e carrapato em gado de corte. *Circular Técnica EMBRAPA-CNPGC* 22:1-60, 1990.
- HOOGSTRAAL H. WASSEF HY. Dermacentor (Indocentor) arosignatus (Acari; Ixodoidea: Ixodidae): hosts and distribution in the Malay Peninsula, Indonesia, Borneo and Southern Philippines. *J Med Entomol*. 1985.22(6): 644-7.
- HOOVER, W. A., BISHOPP, F. C., WOOD, H. P. The life history and bionomics of some North America ticks. *U. S. Dept. Agric. Bur. Entom. Bull.* 1912; 106: 1-239.
- HORAK, I. G., CAMICAS, J. L., KEIRANS, J. E.. The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida): a world list of valid tick names. *Exp. Appl. Acarol*; 2002; 28 (1-4): 27-54.
- HOVIUS JW, RAMAMOORTHY N, VAN'T VEER C, DE GROOT KA, NIJHOF AM, JONGEJAN F, VAN DAM AP, FIKRIG E. Identification of Salp15 homologues in Ixodes ricinus ticks. *Vector Borne Zoonotic Dis*. Fall, 2007.;7(3):296-303.
- INOKUMA, H., KEMP, D.H., WILLADSEN, P. Comparison of prostaglandins E2 (PGE2) in salivary gland of *Boophilus microplus*, *Haemophysalis longicornis* and *Ixodes holocyclus*, and quantification of PGE2 in saliva, hemolymph, ovary and gut of *B. microplus*. *Journal of Veterinary Medical Science*, 1994; 56 (6), 1217-1218.
- JONGEJAN, F AND UILENBERG, G.. The global importance of ticks. 2004; 129,S3-S14.
- JUNQUEIRA, L. C., CARNEIRO, J. *Histologia básica*. Guanabara Koogan,; 2004; p 18.
- KASHINO SS, RESENDE JJ, SACCO AMS, ET AL. *BOOPHILUS MICROPLUS*: The pattern of bovine immunoglobulin isotype responses to high and low tick infestations. *Exp Parasit*, 2005; 110: 12-21.
- KEIRANS, J. E., DURDEN, L. A. Ticks systematics and identification. In: J. L. Goodman, D. T. Dennis and D. E. Sonenshine, Editors, *Tick-borne diseases of humans*, ASM Press, Washington, DC, 2005; p. 401.

- KELLEY, R. B. Zebu cross cattle in northern Australia. Bull. Coun. Scient. Ind. Res., Melb. No. 172, 1943; pp. 1-96.
- KIM S, SHEN T, MIN B. Basophils Can Directly Present or Cross-Present Antigen to CD8 Lymphocytes and Alter CD8 T Cell Differentiation into IL-10-Producing Phenotypes. J Immunol. 2009 Aug 10.
- KIRKHAM PA, TAKAMATSU HH, PARKHOUSE RM. Growth arrest of gammadelta T cells induced by monoclonal antibody against WC1 correlates with activation of multiple tyrosine phosphatases and dephosphorylation of MAP kinase erk2. Eur J Immunol. Mar,1997; 27(3):717-25.
- KLOMPEN, J.S.H., BLACK IV W.C., KEIRANS, J.E. AND OLIVER, J.H.JR. Evolution of ticks. Annu. Rev. Entomol. 1996; 41: 141-161.
- KLOMPEN, J.S.H., BLACK, W.C. IV, KEIRANS, J.E., NORRIS, D.E. Systematics and biogeography of hard ticks, a total evidence approach. Cladistics. 2000; 16, 79-102.
- KLOMPEN, J.S.H., GRIMALD, D. First Mesozoic record of a parasiteform mite: a larval argasid tick in Cretaceous amber (Acari: Ixodida: Argasidae). Annal of the Entomological Society of America, 2001; 94, 10-15.
- KRINSKY, W. L., BROWN, S. J. AND ASKENASE, P. W. Ixodes dammini: induced skin lesion in guinea pigs and rabbits compared to Erythema Chronicum Migrans in patients with Lyme Arthritis. Exp. Parasitol., 1982; 53; 381-395.
- KUBES M, KOCÁKOVÁ P, SLOVÁK M, SLÁVIKOVÁ M, FUCHSBERGER N, NUTTALL PA. Heterogeneity in the effect of different ixodid tick species on human natural killer cell activity. Parasite Immunol. 2002, Jan;24(1):23-8.
- KUNZ SE, KEMP DH. Insecticides and acaricides: resistance and environmental impact. Rev Sci Tech. 13:1249-86, 1994.
- KUPPER T. S. AND FUHLBRIGGE, R. C. Immune surveillance in the skin: mechanisms and clinical consequences. Nat. Rev. Immunol. 2004; March (4): 211-222.
- KÝCKOVÁ K, KOPECKÝ J. Effect of tick saliva on mechanisms of innate immune response against *Borrelia afzelii*. J Med Entomol. 2006; Nov;43(6):1208-14.
- LAHMERS KK, HEDGES JF, JUTILA MA, DENG M, ABRAHAMSEN MS, BROWN WC. Comparative gene expression by WC1+ gammadelta and CD4+ alphabeta T lymphocytes, which respond to *Anaplasma marginale*, demonstrates higher expression of chemokines and other myeloid cell-associated genes by WC1+ gammadelta T cells. J Leukoc Biol. 2006 Oct;80(4):939-52.

- LAHMERS KK, NORIMINE J, ABRAHAMSEN MS, PALMER GH, BROWN WC. The CD4+ T cell immunodominant *Anaplasma marginale* major surface protein 2 stimulates gamma delta T cell clones that express unique T cell receptors. *J Leukoc Biol.* 2005 Feb;77(2):199-208.
- LAVOPIERRE MMJ. Feeding mechanisms of blood-sucking arthropods. *Nature (London)*; 1964; 208:302-3.
- LEE JJ, LEE NA. Eosinophil degranulation: an evolutionary vestige or a universally destructive effector function? *Clin Exp Allergy.* 2005 Aug;35(8):986-94. Review.
- LEMOIS, A.M. A Resistência Genética de Bovinos e o Controle do Carrapato. Documento Embrapa/CNPGL, Coronel Pacheco, 1986; 6: 42.
- LEONARD, E. J., LETT-BROWN, M AND ASKENASE, P. W. Simultaneous generation of tuberculin-type and basophilic hypersensitivity at separate sites in the guinea pig. *Int. Arch. Allergy appl. Immunol.* 1979; 58, 460.
- LETT-BROWN, M. A., BOETCHER, D. A. AND LEONARD, E. J. Chemotactic responses of normal human basophils to C5a and to lymphocyte derived chemotactic factor. *J. Immunol.* 1976; 117, 246.
- LEVERKUS, M.; JOCHIM, R. C.; SCHÄL, S.; BRÖCKER, E. B.; ANDERSEN, J. F.; VALENZUELA, J. G.; TRAUTMANN, A. Bullous allergic hypersensitivity to bed bug bites mediated by IgE against salivary nitrophorin. *The Society for Investigative Dermatology.* 2006; 126:91-96.
- LEWIS, J.H.. Comparison Hemostasis in Vertebrates. Plenum Press, New York, 1996.
- MACHUGH ND, MBURU JK, CAROL MJ, WYATT CR, ORDEN JA, DAVIS WC. Identification of two distinct subsets of bovine gamma delta T cells with unique cell surface phenotype and tissue distribution. *Immunology.* Nov, 1997;92(3):340-5.
- MACHUGH ND, WIJNGAARD PL, CLEVERS HC, DAVIS WC. Clustering of monoclonal antibodies recognizing different members of the WC1 gene family. *Vet Immunol Immunopathol.* 1993 Nov;39(1-3):155-60.
- MANS BJ, LOUW AI, NEITZ AW. Evolution of hematophagy in ticks: common origins for blood coagulation and platelet aggregation inhibitors from soft ticks of the genus *Ornithodoros*. *Mol Biol Evol* Oct, 2002a; 19(10):1695-705.
- MANS BJ, NEITZ AW. Adaptation of ticks to a blood-feeding environment: evolution from a functional perspective. *Insect Biochem Mol Biol.* Jan, 2004 ;34(1):1-17.
- MARSHALL JS. Mast-cell responses to pathogens. *Nature Reviews Immunol*, 2004; 4: 787-799.
- MARONE G, GALLI SJ, KITAMURA Y. Probing the roles of mast cells and basophils in natural and acquired immunity, physiology and disease. *Trends in Immunology.* 2002; 23: 425-427.

- MARTINS AB, RAFFEL S. cellular activities in hypersensitive reactions. i. comparative cytology of delayed, "jones-mote" and arthus reactions. *J Immunol.* 1964 dec;93:937-47.
- MATTIOLI RC. Comment on "A possible explanation of the apparent breed-related resistance in cattle to bont tick (*Amblyomma hebraeum*) infestations" by M.I. Meltzer, *Veterinary Parasitology* 67 (1996) 275-279. *Vet Parasitol.* 1998; 16;79(3):263-6.
- MCLAREN DJ, WORMS MJ, ASKENASE PW. Cutaneous basophil associated resistance to ectoparasites (ticks). Electron microscopy of *Rhipicephalus appendiculatus* larval feeding sites in actively sensitised guinea pigs and recipients of immune serum. *J Pathol.* 1983 Mar;139(3):291-308.
- MCTIER, T. L., GEORGE, J. E. AND BENNETT, S. N. Resistance and cross-resistance of guinea-pigs to *Dermacentor andersoni* Stiles, *D. variabilis* (Say), *Amblyomma americanum* (Linnaeus), and *Ixodes scapularis* Say. *J. Parasitol.*, 1981; 67: 813-822.
- MEJRI N, FRANSCINI N, RUTTI B, BROSSARD M. Th2 polarization of the immune response of BALB/c mice to *Ixodes ricinus* instars, importance of several antigens in activation of specific Th2 subpopulations. *Parasite Immunol.* Feb, 2001; 23(2):61-9.
- MELLANBY, K. Man's reaction to mosquito bites. *Nature.* 1946; 158:554751-53.
- MELTZER MI. A possible explanation of the apparent breed-related resistance in cattle to bont tick (*Amblyomma hebraeum*) infestations. *Vet Parasitol.* 31; 67(3-4): 275-9, 1996.
- METZ M, SIEBENHAAR F, MAURER M. Mast cell functions in the innate skin immune system. *Immunobiology.* 2008 ;213(3-4):251-60.
- MITCHELL, E. B. AND ASKENASE, P. W.. Suppression of T-cell mediated cutaneous basophil hypersensitivity by serum from guinea pigs immunized with bacterial adjuvant. *J exp. Med.* 1982; 156, 159.
- MITCHELL, E. B., BROWN, S. J. AND ASKENASE, P. W. IgG1 antibody-dependent mediator release after passive sensitization of basophils arriving at cutaneous hypersensitivity reactions. *J. Immunol.* 1982; 129, 1663.
- MITRE, E., TAYLOR, R.T., KUBOFCIK, J., NUTMAN, T.B. Parasite antigen-driven basophils are a major source of IL-4 in human filarial infections. *J. Immunol.* 2004. 172, 2439-2445.
- MOLYNEUX, D. H. Vector-borne parasitic disease-an overview of recent changes. *Int. J. Parasitol;* 1998; 28: 927-34.
- MOORE, J. Parasites and the behavior of biting flies. *J. Parasitol,* 1993; 79: 1-16.
- MORETTA A.. Natural killer cells and dendritic cells: rendezvous in abused tissues. *Nat Rev Immunol.* 2002 Dec;2(12):957-64. Review.

- NATHAN C. Neutrophils and immunity: Challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol* 2006. 6:173–182.
- NEITZ, A.W., VERMEULEN, N.M. Biochemical studies on the salivary glands and haemolymph of *Amblyomma hebraeum*. Onderstepoort Journal of Veterinary Research, 1987; 54, 443-450.
- NUÑES JL, MUÑOZ COBENAS ME, MOLTEDO HL. *Boophilus microplus*, la garrapata comun del ganado vacuno. 1a ed. Buenos Aires: Hemisfério Sur; 1982.
- OLIVEIRA CJ, CAVASSANI KA, MORÉ DD, GARLET GP, ALIBERTI JC, SILVA JS, FERREIRA BR. Tick saliva inhibits the chemotactic function of MIP-1alpha and selectively impairs chemotaxis of immature dendritic cells by down-regulating cell-surface CCR5. *Int J Parasitol*. 2008. May;38(6):705-16.
- OLIVEIRA, G.P, ALENCAR, M.M., FREITAS, A.R. Resistência de bovinos ao carrapato *B. microplus* II. Infestação Natural. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, 1989; 24: 10, 1267-71.
- OLIVER, J.H. Biology and systematics of ticks (Acari: Ixodida). *Annual review of Ecology and Systematics*, 1989; 20, 397-430.
- PAESEN, G.C., ADAMS, P. L., HARLOS, K., NUTTALL, P. A., STUART, D. I. Tick Histamine-Binding proteins: isolation, cloning and three-dimensional structure. *Molecular Cell*, 1999; 3, 661-671.
- PANG L, NIE M, CORBETT L, SUTCLIFFE A, KNOX AJ. Mast cell beta-tryptase selectively cleaves eotaxin and RANTES and abrogates their eosinophil chemotactic activities. *J Immunol*. 2006 Mar 15;176(6):3788-95.
- PERRIGOU JG, SAENZ SA, SIRACUSA MC, ALLENSPACH EJ, TAYLOR BC, GIACOMIN PR, NAIR MG, DU Y, ZAPH C, VAN ROOIJEN N, COMEAU MR, PEARCE EJ, LAUFER TM, ARTIS D. MHC class II-dependent basophil-CD4+ T cell interactions promote T(H)2 cytokine-dependent immunity. *Nat Immunol*. 2009 Jul;10(7):697-705.
- POCHANKE, V.; HATAK, S.; HENGARTNER, H.; ZINKERNAGEL, R. M.; MCCOY, K. D. Induction of IgE and allergic-type responses in fur mite-infested mice. *Eur. J. Immunol*, 2006; 36: 2434-2445.
- PRICE, P. W. *Evolutionary biology of parasites*. Princeton University Press, 1980.
- QIAN Y, ESSENBERG RC, DILLWITH JW, BOWMAN AS, SAUER JR. A specific prostaglandin E2 receptor and its role in modulating salivary secretion in the female tick, *Amblyomma americanum* (L.). *Insect Biochem Mol Biol*, 1997; May;27(5):387-95.
- RAJAN TV. The Gell-Coombs classification of hypersensitivity reactions: a re-interpretation. *Trends Immunol*, 2003; 24: 376-379.

- RAMACHANDRA RN, WIKEL SK. Modulation of host-immune responses by ticks (Acari: Ixodidae): effect of salivary gland extracts on host macrophages and lymphocyte cytokine production. *J Med Entomol.* 1992; Sep;29(5):818-26.
- RANDOLPH, S. E. Density-dependent acquired resistance to ticks in natural host, independent of concurrent infection with *Babesia microt.* *Parasitology*, 1994; 108, 413-419.
- RAULET DH, VANCE RE, MCMAHON CW. Regulation of the natural killer cell receptor repertoire. *Annu Rev Immunol.* 2001;19:291-330. Review.
- REESE, T.A., LIANG, H.E., TAGER, A.M., LUSTER, A.D., VAN, R.N., VOEHRINGER, D., LOCKSLEY, R.M. Chitin induces accumulation in tissue of innate immune cells associated with allergy. *Nature.* 2007. 447, 92-96.
- REIK, R. F. Studies on the reactions of animals to infestations with ticks. VI. Resistance of cattle to infestation with the tick *Boophilus microplus* (Canestrini). *Aust. J. agric. Res*, 1962; 13, 532-50.
- RIBEIRO J. M. The antiserotonin and antihistamine activities of salivary secretion of *Rhodnius prolixus*. *J. Insect Physiol*, 1982; 28:69-75.
- RIBEIRO JM, FRANCISCHETTI IM. Role of arthropod saliva in blood feeding: sialome and post-sialome perspectives. *Annu Rev Entomol*, 2003 ;48:73-88.
- RIBEIRO JM. Role of saliva in blood-feeding by arthropods. *Annu Rev Entomol.*; 1987. 32:463-78.
- RIBEIRO JM. Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists? *Infect Agents Dis.* 1995; Sep;4(3):143-52.
- RIBEIRO JMC. 1988. How mosquitoes find blood. *Misc Pub Ent Soc Am*; 165:61-71.
- RIBEIRO, J. M., MATHER, T. N. *Ixodes scapularis*: salivary kininase activity is a metallo dipeptidyl carboxypeptidase. *Exp. Parasitol*, 1998; 89: 213-21.
- RICHARDS MH, NELSON JL. The evolution of vertebrate antigen receptors: a phylogenetic approach. *Mol Biol Evol.* 2000 Jan;17(1):146-55.
- ROGERS AN, VANBUREN DG, HEDBLUM EE, TILAHUN ME, TELFER JC, BALDWIN CL. Gammadelta T cell function varies with the expressed WC1 coreceptor. *J Immunol*, 2005; Mar 15;174(6):3386-93.
- ROLSTAD B, NAPER C, LØVIK G, VAAGE JT, RYAN JC, BÄCKMAN-PETERSSON E, KIRSCH RD, BUTCHER GW. Rat natural killer cell receptor systems and recognition of MHC class I molecules. *Immunol Rev.* 2001 Jun;181:149-57.
- ROT A, VON ANDRIAN UH. Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokines grammar for immune cells. *Annu Rev Immunol.* 2004;22:891-928.

- ROTHENBERG ME, HOGAN SP. The eosinophil. *Annu Rev Immunol.* 2006;24:147-74. Review.
- SÁ-NUNES A, BAFICA A, LUCAS DA, CONRADS TP, VEENSTRA TD, ANDERSEN JF, MATHER TN, RIBEIRO JM, FRANCISCHETTI IM. Prostaglandin E2 is a major inhibitor of dendritic cell maturation and function in *Ixodes scapularis* saliva. *J Immunol.* Aug, 2007; 1;179(3):1497-505.
- SAUER, J. R., ESSENBERG, R. C., BOWMAN, A. S. Salivary gland ixodid ticks: control and mechanism of secretion. *Journal Insect Physiology*; 2000; 46: 1069-1078.
- SCHLEGER AV, LINCOLN DT, KEMP DH. A putative role for eosinophils in tick rejection. *Experientia.* 1981 Jan 15;37(1):49-50.
- SCHROEDER, J.T; DONALD, W. M, JR.; LICHTENSTEIN, L. M. Human basophil: mediator release and cytokine production. Johns Hopkins Asthma and Allergy Center. Maryland. 2001, 93p.
- SHARP LL, JANESON JM, CAUVI G, HAVRAN WL. Dendritic epidermal T cells regulate skin homeostasis through local production of insulin-like growth factor 1. *Nature Immunology* 6: 73-79, 2005.
- SICHERER SH, LEUNG DY. Advances in allergic skin disease, anaphylaxis, and hypersensitivity reactions to foods, drugs, and insects in 2008. *J Allergy Clin Immunol.* 2009 Feb;123(2):319-27. Review.
- SKALLOVÁ A, IEZZI G, AMPENBERGER F, KOPF M, KOPECKY J. Tick saliva inhibits dendritic cell migration, maturation, and function while promoting development of Th2 responses. *J Immunol.* May, 2008; 1;180(9):6186-92.
- SOKOL CL, CHU NQ, YU S, NISH SA, LAUFER TM, MEDZHITOV R. Basophils function as antigen-presenting cells for an allergen-induced T helper type 2 response. *Nat Immunol.* 2009 Jul;10(7):713-20.
- SOKOL CL, BARTON GM, FARR AG, MEDZHITOV R. A mechanism for the initiation of allergen-induced T helper type 2 responses. *Nat Immunol.* 2007 Dec 21.
- SONENSHINE, D. E. *Biology of ticks*, First edn. New York, Oxford. Oxford University Press; 1991.
- SPAGGIARI GM, CAROSIO R, PENDE D, MARCENARO S, RIVERA P, ZOCCHI MR, MORETTA L, POGGI A. NK cell-mediated lysis of autologous antigen-presenting cells is triggered by the engagement of the phosphatidylinositol 3-kinase upon ligation of the natural cytotoxicity receptors NKp30 and NKp46. *Eur J Immunol.* 2001 Jun;31(6):1656-65.

- SPIELMAN, A., WILSON, M. L., LEVINE, J. F., PIESMAN, J. Ecology of *Ixodes dammini*-borne human babesiosis and Lyme disease. *Ann Rev Entomol.* 1985., 30:439-60.
- STARK, K.R., JAMES, A.A. Isolation and characterization of the gene encoding a novel factor Xa-directed anticoagulant from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *J. Biol. Chem.* 1998; 273:20802-9.
- STEEN N.A., BARKER S.C., ALEWOOD, P. F. Proteins in the saliva of the Ixodida (ticks): pharmacological features and biological significance. *Toxicon.* 2006; Jan; 47 (1) 1-20.
- STORSET AK, KULBERG S, BERG I, BOYSEN P, HOPE JC, DISSEN E. NKp46 defines a subset of bovine leucocytes with natural killer characteristics. *Eur J Immunol*, 2004; 34: 669-676.
- STRAND MR, PECH LL. IMMUNOLOGICAL BASIS FOR COMPATIBILITY IN PARASITOID-HOST RELATIONSHIPS. *Annu Rev Entomol.* 1995;40:31-56. Review.
- STUKE K, VON SAMSON-HIMMELSTJERNA G, DREESMAN J, MENCKE N, SCHNIEDER T, LEIBOLD W. Monitoring of basophil sensitization to antigens of the cat flea (*Ctenocephalides felis felis*): a new tool for the diagnosis of feline flea bite hypersensitivity? *Parasitol Res.* 2008 Sep;103(4):807-20.
- SZABÓ MP, MORELLI J JR, BECHARA GH. Cutaneous hypersensitivity induced in dogs and guinea-pigs by extracts of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). *Exp Appl Acarol.* 1995 Dec;19(12):723-30.
- SZABÓ MPJ, BECHARA GH. Sequential histopathology at the *Rhipicephalus sanguineus* tick feeding site on dogs and guinea pigs. *Exp Appl Acarol.* 1999, 23: 915-928.
- TANAKA AS, ANDREOTTI R, GOMES A, TORQUATO RJ, SAMPAIO MU, SAMPAIO CA. A double headed serine proteinase inhibitor--human plasma kallikrein and elastase inhibitor--from *Boophilus microplus* larvae. *Immunopharmacology.* 1999 Dec;45(1-3):171-7.
- TATCHELL RJ, MOORHOUSE DE. Neutrophils: their role in the formation of a tick feeding lesion. *Science.* 1970 Feb 13;167(920):1002-3.
- TATCHELL RJ, MOORHOUSE DE. The feeding processes of the cattle tick *Boophilus microplus* (Canestrini). II. The sequence of host-tissue changes. *Parasitol*, 1968; 58:441-459.
- TITUS RG, RIBEIRO JM. The role of vector saliva in transmission of arthropod-borne disease. *Parasitol Today*, 1990; May;6(5):157-60.
- TITUS, R. G AND RIBEIRO, J. M. Salivary gland lysates from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity. *Science*, 1988; 239,1306-1308.
- TITUS, R. G., BISHOP, J. V., MEJIA, J. S. The immunomodulatory factors of arthropod saliva and the potential for these factors to serve as vaccine targets to prevent pathogen transmission. *Parasite Immunology*, 2006; 28: 131-141.

- TRAGER, W. Acquired immunity to ticks. *J Parasitol*, 1939;25: 57-81.
- URBAN C, ZYCHLINSKY A. Netting bacteria in sepsis. *Nat Med*. 2007 Apr;13(4):403-4.
- URBAN CF, REICHARD U, BRINKMANN V, ZYCHLINSKY A. Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. *Cell Microbiol*. 2006 Apr;8(4):668-76.
- URIOSTE S, HALL LR, TELFORD SR 3RD, TITUS RG. Saliva of the Lyme disease vector, *Ixodes dammini*, blocks cell activation by a nonprostaglandin E2-dependent mechanism. *J Exp Med*, 1994; Sep 1;180(3):1077-85.
- UTECH KBW, WHARTON RH, KERR JD. Resistance to *Boophilus microplus* (Canestrini) in different breeds of cattle. *Aust J Agric Res*, 1978; 29: 885-895.
- VALENZUELA, J. G., CHARLAB, R., GALPERIN, M. Y., RIBEIRO, J.M. Purification, cloning, and expression of a naphthylphosphenylase from the bed bug *Cimex lectularius*. A new type of nucleotide-binding enzyme. *J. Biol. Chem*. Nov, 1998;13; 273 (46): 30583-90.
- VALENZUELA, J.G. Exploring tick saliva: from biochemistry to 'sialoma' and functional genomics. *Parasitology*. 2004; 129 Suppl: S83-94.
- VALENZUELA, J.G., PHAM, V.M., FRANCICCHETTI, I. M., RIBEIRO, J.M. Purification, cloning, and synthesis of a novel salivary anti-thrombin from the mosquito *Anopheles albimanus*. *Biochemistry*, 1999; 38:11209-15.
- VAN DEN BROEK AH, HUNTLEY JF, MACKELLAR A, ET AL. Characterisation of lesional infiltrates of dendritic cells and T cell subtypes during primary infestation of sheep with *Psoroptes ovis*, the sheep scab mite. *Vet Immunol Immunopathol*, 2005; 105:141-150.
- VANCOVÁ I, SLOVÁK M, HAJNICKÁ V, LABUDA M, SIMO L, PETERKOVÁ K, HAILS RS, NUTTALL PA. Differential anti-chemokine activity of *Amblyomma variegatum* adult ticks during blood-feeding. *Parasite Immunol*. 2007; Apr;29(4):169-77.
- VON RUEDORFFER U, FISCH R, PEEL J, ROOSJE P, GRIOT-WENK M, WELLE M. Flea bite hypersensitivity: new aspects on the involvement of mast cells. *Vet J*. 2003 Mar;165(2):149-56.
- YOSHIMOTO T, YASUDA K, TANAKA H, NAKAHIRA M, IMAI Y, FUJIMORI Y, NAKANISHI K. Basophils contribute to T(H)2-IgE responses in vivo via IL-4 production and presentation of peptide-MHC class II complexes to CD4+ T cells. *Nat Immunol*. 2009 Jul;10(7):706-12.
- WAAGE, J. K. The evolution of insect/vertebrate associations. *Biological Journal of the Linnean Society*, 1979;12:3.
- WALTER, D.E., PROCTOR, H. C. Feeding behaviour and phylogeny: observations on early derivative Acari. *Experimental and Applied Acarology*, 1998; 22, 39-50.

- WANG H, NUTTALL PA. Immunoglobulin-binding proteins in ticks: new target for vaccine development against a blood-feeding parasite. *CMLS Cell Mol Life Sciences* , 1999; 56: 286-295.
- WARD, P. A., DVORAK, H. F., COHEN, S., YOSHIDA, T., DATA, R. AND SELVAGGIO, S. S. Chemotaxis of basophils by lymphocyte-dependent and lymphocyte-independent mechanisms. *J. Immunol*, 1975; 114, 1523.
- WEATHINGTON NM, VAN HOUWELINGEN AH, NOERAGER BD, JACKSON PL, KRANEVELD AD, GALIN FS, FOLKERTS G, NIJKAMP FP, BLALOCK JE. A novel peptide CXCR ligand derived from extracellular matrix degradation during airway inflammation. *Nat Med*. 2006 Mar;12(3):317-23.
- WIJNGAARD PL, METZELAAR MJ, MACHUGH ND, MORRISON WI, CLEVERS HC. Molecular characterization of the WC1 antigen expressed specifically on bovine CD4-CD8-gamma delta T lymphocytes. *J Immunol*. Nov, 1992;15;149(10):3273-7.
- WIKEL SK. Immune responses to arthropods and their products. *Annu Rev Entomol*. 1982;27:21-48. Review.
- WIKEL, S. K. AND ALLEN, J. R. Acquired resistance to ticks I. Passive transfer of resistance. *Immunology*, 1976; 30: 311-316.
- WIKEL, S. K. Host immunity to ticks. *Annu Rev. Entomol*, 1996; 41: 1-22.
- WILLADSEN P, WOOD GM, RIDING GA. The relation between skin histamine concentration, histamine sensitivity, and the resistance of cattle to the tick, *Boophilus microplus*. *Z Parasitenkd*, 1979; 59:87-93.
- WILSON, E., M. K. AYDINTUG, M. A. JUTILA. A circulating bovine $\gamma\delta$ T cell subset, which is found in large numbers in the spleen, accumulates inefficiently in an artificial site of inflammation: correlation with lack of expression of E-selectin ligands and L-selectin. *J. Immunol*. 1999.162WWW.PORTAL.SAUDE.GOV.BR

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](#)