

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO**

**NÍVEIS DE CITOCINAS EM BOVINOS (*Bos indicus*) DESAFIADOS COM O**  
**CARRAPATO *Boophilus microplus* (Cannestrini, 1887)**

**LILIANE CRISTINA NAKATA**

SÃO CARLOS – SP

2006

**LILIANE CRISTINA NAKATA**  
(Bióloga)

**NÍVEIS DE CITOCINAS EM BOVINOS (*Bos indicus*) DESAFIADOS COM O  
CARRAPATO *Boophilus microplus* (Cannestrini, 1887)**

**ORIENTADORA:**

**Dra. LUCIANA CORREIA ALMEIDA REGITANO**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Genética e Evolução, área de concentração: Genética e Evolução.

SÃO CARLOS – SP

2006

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

N163nc

Nakata, Liliane Cristina.

Níveis de citocinas em bovinos (*Bos indicus*) desafiados com o carrapato *Boophilus microplus* (Cannestrini, 1887) / Liliane Cristina Nakata. -- São Carlos : UFSCar, 2007.  
77 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2006.

1. Genética animal. 2. Imunologia. 3. Bovino. 4. Citocina.  
5. Reação em cadeia de polimerase em tempo real (PCR). I.  
Título.

CDD: 591.15 (20ª)

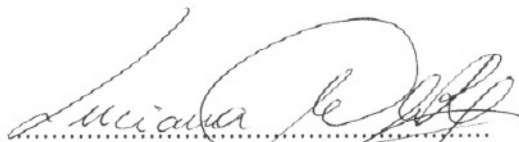
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO

**“NÍVEIS DE CITOCINAS EM BOVINOS (*Bos indicus*) DESAFIADOS COM  
O CARRAPATO *Boophilus microplus* (CANNESTRINI, 1887)”**

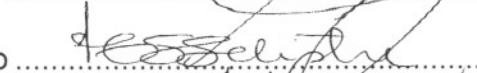
Dissertação de Mestrado de Liliane Cristina Nakata

Banca Examinadora

Profa. Dra. Luciana C. Almeida Regitano



Profa. Dra. Heloísa Sobreiro Selistre de Araújo



Profa. Dra. Maria Elizabete Jorge Amaral



Aos meus pais, **Ricardo e Elisabete**

irmãs **Lucia e Luciana**

Por todo amor dedicado, sempre...

Renúncias, distância, apoio, incentivo, exemplos ...

Por serem tudo que tenho de mais valioso e importante.

Com todo amor,

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha orientadora, **Profa. Dra. Luciana Correia Almeida Regitano**, pela orientação, paciência, confiança, atenção, e principalmente pela amizade.

Ao **Prof. Dr. Luiz L. Coutinho**, que abriu as portas de seu laboratório, possibilitando assim a execução de grande parte deste trabalho. Pela confiança, pelos ensinamentos, pela disposição.

À **doutoranda Lilian G. Zaros**, por me receber de braços abertos no laboratório em Piracicaba, pelos ensinamentos, pela paciência, pelas discussões científicas, e pela amizade.

Ao **mestrando Fabio Carvalho**, e ao **Prof. Dr. Waldomiro Barioni Junior**, pela paciência e enorme ajuda para realização nas análises estatísticas, pelas conversas, incentivo e amizade.

A **Prof. Márcia C. S. Oliveira**, pelas sugestões, auxílio nas correções, e informações oferecidas.

À todos do Laboratório de Biotecnologia Animal da Embrapa Pecuária Sudeste. Em especial aqueles que ficarão para sempre, pois estamos unidos por uma forte amizade, **Marcelo, Gisele, Adriana, João José, Sarah, Gustavo e Rogério**. A todos vocês agradeço pela amizade, pelos churrascos, pelas discussões científicas e pessoais. Valeu muito, porque de tudo, o que importa mesmo é a amizade que vamos sempre poder contar!

Ao **Marcos**, que estive ao meu lado durante essa fase tão importante, pelo incentivo, pela companhia e pelo amor dedicado.

À todos aqueles que não estão citados, mas que de alguma maneira estiveram presente e colaboraram para esta conquista.

## SUMARIO

RESUMO .....	8
SUMMARY .....	9
LISTA DE ABREVIATURAS .....	10
LISTA DE FIGURAS .....	12
LISTA DE TABELAS .....	13
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA .....	14
2. HIPÓTESE .....	15
3. OBJETIVOS .....	15
3.1. Objetivos Gerais .....	15
3.2. Objetivos Específicos .....	15
4. REVISÃO DE LITERATURA .....	16
4.1. Biologia do carrapato <i>Boophilus microplus</i> .....	16
4.2. Resistência do hospedeiro .....	17
4.3. Resposta imunológica .....	20
4.4. Citocinas .....	22
4.4.1. Interleucina - 2 .....	24
4.4.2. Interleucina - 4 .....	24
4.4.3. Interleucina - 12 .....	25
4.4.4. Fator de necrose tumoral – $\alpha$ .....	26
4.4.5. Quimiocinas: Proteína quimioatraente de monócitos (MCP-1) e Interleucina – 8 .....	27
4.5. Interação parasita-hospedeiro .....	28
4.6. Influência de fatores não genéticos .....	33
4.7. PCR em tempo real .....	35
4.8. Métodos de quantificação .....	36
5. MATERIAL E METODOS .....	37
5.1. Animais .....	37
5.2. Infestações .....	38
5.3. Coleta dos tecidos .....	38
5.4. Extração de RNA total .....	39
5.5. Síntese de cDNA .....	39
5.6. Desenho dos primers .....	40
5.7. Confirmação da especificidade dos primers .....	40
5.8. Eficiência de Amplificação .....	41
5.9. Reação de qRT-PCR em tempo real .....	43



5.10. Quantificação relativa da expressão gênica .....	44
5.11. Análise Estatística .....	45
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	45
6.1. Extração de RNA total .....	45
6.2. Confirmação de especificidade dos primers .....	46
6.3. Verificação do gene referência .....	48
6.4. Quantificação relativa da expressão gênica .....	50
7. CONCLUSÃO .....	57
8. PERSPECTIVAS FUTURAS .....	57
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS .....	58

## RESUMO

O carrapato *Boophilus microplus* afeta a produtividade bovina causando perdas econômicas na ordem de bilhões de dólares anualmente. Sabe-se que a saliva do carrapato exerce efeitos imunomodulatórios, uma adaptação evolutiva à resposta do hospedeiro que pode prejudicar a alimentação do carrapato. Tem sido sugerido que o resultado de muitas infecções parasitárias, com relação a resistência ou suscetibilidade, é determinada pelo padrão de resposta das células T<sub>H</sub>1 e T<sub>H</sub>2, as quais produzem citocinas específicas que podem direcionar a resposta imune para diferentes mecanismos. As informações relacionadas à resposta do hospedeiro ao *B. microplus* ainda é bastante limitada. Na tentativa de ampliar os conhecimentos sobre a resposta imune dos bovinos ao carrapato, este trabalho determinou os níveis de mRNA de algumas citocinas em dois grupos de bezerros da raça Nelore (*Bos indicus*): um grupo controle e um grupo desafiado por infestação de carrapatos. Nossos resultados demonstraram uma redução dos níveis de mRNA de IL-2 ( $P < 0.03$ ) nos animais desafiados, enquanto nenhum efeito foi observado para IL-4, IL-8, IL-12p35, TNF- $\alpha$  and MCP-1. A redução na expressão de uma importante citocina T<sub>H</sub>1 sugere uma tendência para o padrão de resposta T<sub>H</sub>2, o que está de acordo com estudos similares conduzidos em outros modelos carrapato-hospedeiro.

## SUMMARY

*Boophilus microplus* tick affects cattle productivity causing economic losses in the order of billions of dollars annually. It is known that tick saliva exerts immunomodulatory effects, an evolutionary adaptation to the immune response of the host that can counteract tick feeding. It has been suggested that the outcome of many parasitic infections with regard to resistance or susceptibility is determined by the pattern of response involving Th1 and Th2 cells, which produce specific cytokines that may direct the immune response towards different mechanisms. Limited information is available regarding the host response to *B. microplus* tick infestation. In an attempt to improve our knowledge about cattle immune-response to ticks, this work determined the expression levels of cytokines mRNAs in two groups of Nelore (*Bos indicus*) calves: one control and other challenged by tick infestation. Our results demonstrated a down-regulation of IL-2 ( $P < 0.03$ ) mRNA levels in challenged animals, while no effect of tick challenge was observed for IL-4, IL-8, IL-12p35, TNF- $\alpha$  and MCP-1. The down regulation of an important Th1 cytokine suggests a tendency towards a Th2 response pattern, which is in agreement with similar studies conducted with other tick-host models.

## LISTA DE ABREVIATURAS

APC – célula apresentadora de antígeno

BCR – receptor de célula B

cDNA – DNA complementar

Con A – concanavalina A

C<sub>T</sub> – ciclo de amplificação basal

DEPC – dietil pirocarbonato

DMSO – dimetil sulfóxido

DTH – hipersensibilidade do tipo retardada

E – eficiência de amplificação

G-CSF – Fator estimulante de colônias de granulócitos

GM-CSF – Fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos

IFN- $\gamma$  – interferon gama

IgE – imunoglobulina E

IL – interleucina

LPS - lipopolissacarídeo

MCP-1 – proteína quimioatraente de monócitos

M-CSF – Fator estimulante de colônias de macrófagos

MHC – complexo de histocompatibilidade

MIP – proteínas inflamatórias de macrófagos

mRNA – RNA mensageiro

NK – células assassinas naturais

PCR – reação em cadeia da polimerase

qRT-PCR – transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase quantitativa.

QTL – locu de caracter quantitativo

RNA – Ácido ribonucleico

RT-qPCR – transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase

SGE – extrato de glândula salivar

TCR – receptor de célula T

TGF- $\beta$  – fator  $\beta$  de crescimento e transformação

T<sub>H</sub> – célula T auxiliar

TNF- $\alpha$  – fator de necrose tumoral alfa

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Amostras de RNA após eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio..... 46
- Figura 2 - Análise da especificidade dos produtos da qRT-PCR. Eletroforese em gel de agarose, corado com brometo de etídio. 47
- Figura 3 - Curva de desnaturação para o gene MCP-1. No eixo Y está representada a fluorescência emitida durante o aumento da temperatura e no eixo X a variação de temperatura..... 48
- Figura 4 - Razão de expressão de citocinas na pele entre o grupo desafiado e o grupo controle, normalizado para um gene referencia (RPL-19)..... 51
- Figura 5 - Razão de expressão de citocinas no linfonodo entre o grupo desafiado e o grupo controle, normalizado para um gene referencia (RPL-19)..... 52

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Seqüência dos primers .....	41
Tabela 2 - Valores obtidos a partir da análise de regressão linear, para cálculo da eficiência de amplificação (E).....	42
Tabela 3 - Condições da reação de PCR .....	43
Tabela 4 - Temperaturas de desnaturação.....	47
Tabela 5 - Análise de variância para o gene controle RPL-19 entre os grupos, para cada tecido .....	49
Tabela 6 - Número de carrapatos ingurgitados observados entre os 19° e 21° dias após infestação.....	55

## 1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O carrapato *Boophilus microplus* e as doenças por ele transmitidas se constituem numa das principais causas de prejuízos para os rebanhos criados em áreas tropicais e subtropicais do mundo. Os prejuízos anuais, em levantamento realizado no território brasileiro, atingem cerca de 2 bilhões de dólares (Grisi et al., 2002). Entre os fatores responsáveis por essas perdas destacam-se: desvalorização do couro pelo ataque direto do parasita, desgaste do animal pelo hematofagismo, irritação no local da picada, estresse a que são submetidos para o controle da parasitose, redução da taxa de natalidade, aumento dos custos de produção pelo uso de insumos, construções e manutenção de instalações e, principalmente, transmissão da tristeza parasitária (*Babesia spp* e *Anaplasma marginale*). Os danos causados ao couro reduzem o valor desse produto no mercado, impossibilitando que o Brasil desenvolva todo o seu potencial como produtor de couros de alta qualidade.

Correntemente a única alternativa para o controle do carrapato são os caros e trabalhosos tratamentos acaricidas (Wikel et al., 1994; Wikel, 1996). Deste modo, têm sido realizadas pesquisas em busca de alternativas de controle, por meio de estudos dos mecanismos imunológicos de resistência, identificação de genes que influenciam a resistência adquirida ou inata a parasitas e criação de hospedeiros resistentes para reduzir a infestação em rebanhos de bovinos.

A compreensão da base molecular das estratégias utilizadas pelos carrapatos para evadir a resistência do hospedeiro, e os mecanismos imunológicos que levam a proteção do hospedeiro devem abrir novas



possibilidades para o desenvolvimento de vacinas e outros produtos alternativos para o controle de ectoparasitas (Ferreira e Silva, 1999).

Deste modo, o estudo do perfil de expressão de genes do sistema imunológico é de fundamental importância para o entendimento da resposta imune bovina durante a infestação por carrapatos. Tal perfil pode ser determinado por meio de técnicas de quantificação de mRNA, como a técnica de RT-PCR em tempo real. Esta técnica foi desenvolvida nos últimos anos e torna a quantificação da expressão de mRNA fácil, rápida e muito sensível. Uma vez que todos os parâmetros estejam padronizados e todos os fatores de variação cuidadosamente controlados, o método permite resultados altamente precisos (Giulietti et al, 2001).

## **2. HIPÓTESE**

A comparação do perfil de expressão de genes do sistema imunológico de animais expostos ou não ao carrapato deve possibilitar a identificação de genes alvos, envolvidos na modulação da resistência dos bovinos a este ectoparasita.

## **3. OBJETIVOS**

### **3.1. Objetivos Gerais**

Contribuir para o aumento da quantidade e qualidade das informações referentes resposta imune do hospedeiro bovino a infestações com carrapatos.

### **3.2. Objetivos Específicos**

Avaliar o nível de mRNA de 6 genes (IL-2, IL-4, IL-8, IL-12, TNF- $\alpha$  e MCP-1) envolvidos na resposta imune, em pele e linfonodo de bovinos submetidos a infestação artificial com o carrapato *Boophilus microplus*, utilizando a metodologia de qRT-PCR em tempo real.

## **4. REVISÃO DE LITERATURA**

### **4.1. Biologia do carrapato *Boophilus microplus***

O *Boophilus microplus* é um carrapato originário da Ásia e foi introduzido no Brasil juntamente com os bovinos trazidos pelos colonizadores portugueses, ainda no século XVI (Labruna et al., 1997). Atualmente ele se distribui amplamente entre os paralelos 32° N e 32° S onde o clima é mais apropriado ao seu desenvolvimento (Gonzales, 1993).

Praticamente todo o território brasileiro está dentro da zona de ocorrência desse parasita e, de acordo com as informações disponíveis sobre a dinâmica das populações desse ácaro na Região Sudeste do Brasil, o parasitismo ocorre ao longo de todo o ano (Fonseca et al., 1997).

O carrapato *B. microplus* é um artrópode da classe Arachnida, ordem Acarina, família Ixodidae. Esses ácaros são hematófagos obrigatórios e o ciclo de vida é composto de uma fase de vida livre e outra parasitária (Marcondes, 2001).

A fase de vida livre se inicia quando a fêmea ingurgitada ou teleógina se desprende do bovino e cai no solo, onde procura um local adequado para postura com temperatura ao redor dos 27°C e com pouca luz. O número de ovos produzidos por fêmea varia entre 2 e 3 mil e a eclosão das larvas se inicia ao redor do 7° dia após o final da postura e se completa em mais sete dias,

quando se tornam infestantes sob condições ideais de temperatura e umidade (27-28° C e umidade superior a 70%). Em condições desfavoráveis, mais de 100 dias podem transcorrer entre o final da postura e a eclosão das larvas. A fase de vida parasitária se inicia com a fixação da larva infestante ao hospedeiro. As larvas tornam-se ninfas, em torno do oitavo dia após a fixação, se alimentam e sofrem novas mudas, originando indivíduos machos ou fêmeas. Os machos tornam-se adultos por volta do 15° dia após a fixação e permanecem no hospedeiro por cerca de 30 dias, percorrendo o corpo do animal, se alimentando de sangue e fecundando as fêmeas. A fêmea fecundada ingurgitada passa a ser denominada teleógina (ao redor do 21° dia) e cai no solo, iniciando novo ciclo (Gonzales, 1993). O carrapato *B. microplus* ao longo de toda sua vida parasitária ingere um volume de sangue que varia entre 300 e 350 µl (Mahoney e Ross, 1972).

O prejuízo causado pelo hematofagismo é agravado pela irritação provocada pela picada do ácaro e pela transmissão de vários agentes de doenças. Os carrapatos produzem componentes biologicamente ativos que facilitam a fixação e ingurgitamento (Ribeiro et al, 1985; Ribeiro, 1989a), entre esses estão várias peptidases secretadas para dissolver o tecido do hospedeiro, permitindo a criação de um sulco de alimentação onde o sangue do hospedeiro se acumula (Ribeiro, 1989b). Outros componentes têm por finalidade modular a resposta do hospedeiro inibindo vias reguladoras e efetoras envolvidas na aquisição e expressão da resistência adquirida (Wikel, 1996).

#### **4.2. Resistência do hospedeiro**

Diferentes níveis de resistência dos bovinos ao carrapato são observados, tanto entre raças como dentro de raças (Wharton et al., 1970; Moraes et al., 1986; Oliveira et al., 1989; Gomes, 1992; Allen, 1994; Veríssimo et al., 1997; Andrade et al., 1998; Frisch et al., 2000; Andrade et al., 2001). Tem sido reconhecido que raças que evoluem na presença de carrapatos possuem uma média alta de resistência (Frisch, 1999). Bovinos de origem zebuína são menos suscetíveis a infestações por carrapatos *Boophilus microplus* quando comparados a animais cruzados com raças taurinas (Wambura et al., 1998). Evidências históricas explicam a menor sensibilidade dos zebuínos ao carrapato, entre elas, a maior convivência desses bovinos com esse ácaro desde os primórdios de seu processo evolutivo. Por outro lado, o gado europeu veio estabelecer contato com o carrapato somente no momento de sua introdução nos trópicos. Vários autores verificaram diferenças entre raças ou grupos genéticos quanto à resistência ao carrapato, sendo que animais zebuínos apresentaram maior resistência, seguidos de animais cruzados de zebu, crioulos e europeus (Villares, 1941; Riek, 1962; Oliveira e Alencar, 1987; Oliveira et al., 1989; Wambura et al., 1998; Frisch et al., 2000). Em estudo comparativo do desempenho de novilhas quanto à resistência ao *Boophilus microplus*, Lemos et al. (1985), trabalhando com mestiços Holandês x Guzerá de diversas proporções, verificaram que maior proporção da raça Holandesa estava associada a maior número de carrapatos. Resultados semelhantes foram alcançados por Oliveira e Alencar (1990), em estudo com bovinos de seis graus de sangue Holandês Vermelho e Branco x Guzerá, naturalmente infestados, no qual verificaram que a intensidade parasitária de *B. microplus* aumenta na proporção de aumento do grau de sangue europeu.

Infestações com *B. microplus* em raças puras de *Bos taurus* causam uma diminuição marginal no número de linfócitos T, começando com a segunda infestação e persistindo até o final da quarta exposição (Inokuma et al., 1993).

O sistema imune do hospedeiro parece ser o fator mais importante que regula esta resistência (Mattioli et al., 2000). A capacidade de resposta mediada por citocinas, mais vigorosa em *Bos indicus* do que em *Bos taurus*, na presença de moléculas da saliva do carrapato, parece ser um fator que contribui para a resistência dos primeiros (Ramachandra e Wikel, 1995). A existência de genes principais de resistência a esse ácaro foi sugerida por Frish (1999), indicando que uma melhora significativa na resistência ao carrapato pode ser conseguida pela introdução desses genes, representando uma solução permanente para o controle desse parasita. Estudos posteriores refutaram a existência de tais genes principais (Henshall, 2004) entretanto, vários QTLs (do inglês, *Quantitative Trait Loci*) de razoável magnitude têm sido descritos para essa característica (Gasparin et al., 2006, Regitano et al., 2006).

Genes envolvidos na determinação da cor da pelagem, e no tipo de pelo também podem ser considerados como candidatos em potencial. Alguns autores encontraram dados que suportam a hipótese de que a coloração do pêlo pode afetar a permanência ou sobrevivência de carrapatos na superfície da pele de bovinos. Oliveira e Alencar (1987) em bovinos da raça Canchim, Andrade et al. (1998) em animais da raça Gir e Veríssimo et al. (1997) em mestiços leiteiros, verificaram que os animais mais claros eram mais resistentes em relação aos mais escuros. A maior suscetibilidade ao carrapato verificada em animais de pelos mais escuros, segundo os últimos autores,

pode ser atribuída à queda da resistência provocada pelo maior estresse térmico observado nesses animais. No entanto, ao estudar a relação entre cor do pêlo, teor de ácidos graxos poliinsaturados de 18 carbonos e número de carrapatos em bovinos de vários graus de sangue Holandês x Zebu, GRANADO *et al.* (1987) concluíram que os animais mais escuros (5/8 Holandês x 3/8 Zebu) possuíam maior teor desses ácidos graxos na pele e por isso apresentavam maior resistência ao carrapato. Outros fatores como comprimento do pêlo, espessura e dureza da pele podem influenciar na resistência dos bovinos aos carrapatos.

#### **4.3. Resposta imunológica**

O sistema imune dos vertebrados tem evoluído para defender o hospedeiro contra um espectro de patógenos infecciosos (Liew, 2002). Nos bovinos a resistência ao carrapato pode ser classificada em inata e adquirida (Riek, 1962).

A resistência inata manifesta-se já na primeira infestação sem necessidade de contato prévio do bovino com o carrapato, enquanto a resistência adquirida surge após sucessivas exposições dos animais à infestação e envolve vias reguladoras e efetoras da resposta humoral e celular, estando associada a reações de hipersensibilidade a antígenos inoculados no hospedeiro junto com a saliva do carrapato (Riek, 1962; Wikel, 1996; Wikel e Bergman, 1997).

Evidência inicial da base imunológica da resistência adquirida do hospedeiro contra carrapatos é o desenvolvimento de infiltrados celulares, principalmente basófilos e eosinófilos, nos sítios de ligação do carrapato ao

hospedeiro (Allen, 1973; Brossard e Fivaz, 1982). Envolve componentes reguladores e efetores do sistema imune, tais como células apresentadoras de antígenos (APCs), particularmente as células de Langerhans que detectam imunógenos na epiderme e migram aos linfonodos (Nithiuthai e Allen, 1985), complemento, linfócitos B e T, citocinas, anticorpos, granulócitos e mediadores bio-ativos derivados desses últimos (Wikel, 1996; Brossard et al., 1991; Brossard e Wikel, 1997).

Os linfócitos T são considerados importantes reguladores e efetores da resposta imune do hospedeiro ao carrapato (Wikel, 1999), sendo que o resultado de muitas infecções parasitárias com relação à resistência ou suscetibilidade pode ser determinado por uma resposta padrão envolvendo um subconjunto de células CD4<sup>+</sup>T-Helper (T<sub>H</sub>). As células T CD4<sup>+</sup> são subdivididas em T<sub>H</sub>1, que produzem interleucina-1 (IL-1), IL-2, IL-8, IL-12, fator de necrose tumoral alfa (TNF-α), interferon-gama (IFN-γ) e proteína quimioatrativa de monócitos - 1 (MCP-1) e T<sub>H</sub>2 que produzem IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 (Mosmann e Sad, 1996; Seder e Paul, 1994, Else e Finkelman, 1998, Liew, 2002).

Gajewski e Fitch (1988) relataram que os produtos das células T poderiam agir como fatores de crescimento autócrinos para posterior expansão dessas células, bem como agentes inibidores recíprocos para o tipo celular oposto. De modo que IL-4 promovia a expansão clonal de células T<sub>H</sub>2 e limitava a proliferação de células T<sub>H</sub>1. De maneira oposta, IFN-γ aumentava o crescimento de células T<sub>H</sub>1, mas diminuía o desenvolvimento de T<sub>H</sub>2. Tais estudos mostraram o mecanismo pelo qual células T<sub>H</sub>1 e T<sub>H</sub>2 eficientemente regulam a atividade umas das outras (Liew, 2002).

No entanto, esses estudos não foram suficientes para demonstrar o que inicia o desenvolvimento de uma célula  $T_H1$  ao invés de uma  $T_H2$  ou quais seriam os precursores celulares dessas células. Em 1990, foi descoberto que IL-4 era essencial para o desenvolvimento de células  $T_H2$  a partir de precursores específicos. Em 1993, Hsieh e Seder mostraram que IL-12 e a ativação do receptor da célula T (TCR) eram necessárias para a indução das células  $T_H1$  (Else & Finkelman, 1998; Liew, 2002). Esses resultados estabeleceram que células  $T_H1$  e  $T_H2$  têm um precursor em comum e que as citocinas presentes no meio no momento da apresentação do antígeno são os determinantes para o desenvolvimento das linhagens das células  $T_H$  (Liew, 2002; Else et al, 1994).

As células  $T_H1$  levam à ativação de macrófagos e têm sido associadas com hipersensibilidade retardada (DTH). De maneira oposta, células  $T_H2$  aumentam o número de mastócitos e eosinófilos, e acentuam a síntese de anticorpos. Além disso, os produtos das células  $T_H1$  e  $T_H2$  podem regular negativamente a produção ou atividade uma da outra (Mosmann e Moore, 1991). Neste contexto, a resistência ou suscetibilidade do hospedeiro a infestações com carrapatos podem provavelmente ser explicadas pela modulação da rede de citocinas induzidas pelos carrapatos (Wikel, 1999).

#### **4.4. Citocinas**

As células do sistema imune secretam uma grande variedade de glicoproteínas que regulam as respostas imunes por meio de sinalização entre as células. Essas proteínas são conhecidas pelo termo genérico citocinas. Elas são secretadas por várias células do organismo frente a um estímulo ativador,



afetam o comportamento de outras células, induzindo uma resposta imune por meio da ligação a receptores específicos (Tizard, 2002; Janeway et al, 2002).

A produção de citocinas é estimulada por uma variedade de sinais, tais como antígenos ou antígenos complexados às moléculas de MHC, atuando sobre o receptor de células T (TCR) ou o de células B (BCR). Elas atuam em muitos alvos celulares diferentes, podendo se ligar a receptores na própria célula que a produziu, apresentando um efeito autócrino, ou em receptores nas células adjacentes, efeito parácrino. Algumas citocinas podem atuar de maneira endócrina, se espalhando por todo o corpo e afetando o comportamento de células distantes, embora isso dependa de sua capacidade de entrar na circulação e de seu tempo de vida (Tizard, 2002; Janeway et al, 2002).

Dentre as atividades exercidas pelas citocinas, quando essas se ligam a receptores de vários tipos celulares, estão a capacidade de induzir a célula alvo a se dividir ou diferenciar, ou ainda, podem estimular a produção de novos receptores ou outras proteínas, mas alternativamente, podem inibir tais efeitos (Tizard, 2002). As citocinas podem ser agrupadas de acordo com sua estrutura, constituindo 4 grupos: (Grupo 1) é grupo das hematopietinas que inclui as interleucinas: IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-10, IL-11, IL-13; os fatores estimuladores de colônia: G-CSF, M-CSF, GM-CSF e os interferons, (Grupo 2) inclui a família dos fatores de necrose tumoral (TNF), família da IL-1 e TGF- $\beta$ , (Grupo 3) inclui a família das quimiocinas (IL-8, MIP, proteínas quimioatraentes para monócitos (MCP)), (Grupo 4) é uma família onde as citocinas possuem diferentes motivos estruturais, e inclui a IL-12. Algumas citocinas, que exercem importante função na resposta imune serão detalhadas abaixo.

#### **4.4.1. Interleucina - 2**

Interleucina 2 (IL-2) é uma citocina secretada pelas células  $T_H1$ , e seus alvos são as células T, células B, células NK e macrófagos. Para uma célula T ser responsiva a IL-2 ela deve primeiro ser ativada por um antígeno e pela IL-12, resultando na secreção de IL-2 e expressão de receptores de IL-2 (IL-2R). Por estimular a proliferação das células T, a IL-2 é um componente chave na resposta imune celular, onde sua produção determina se uma célula T irá se proliferar tornando-se uma célula efetora (Janeway et al., 2002; Tizard, 2002)

Nas células  $T_H1$  e NK, a IL-2 estimula a proliferação e a citotoxicidade. Ela também induz a produção de IFN- $\gamma$  e IL-5 e regula a expressão do receptor do TNF- $\alpha$ . A IL-2 pode ainda ativar os macrófagos, estimular sua secreção de citocinas e potencializar a atividade citotóxica contra as células cancerosas e as bactérias intracelulares (Tizard, 2002).

Portanto, na ausência de IL-2 ocorre inibição da proliferação e diferenciação das células T ao encontrarem um antígeno, mesmo que este seja subsequentemente apresentado por APCs. Entretanto, uma vez ativadas, podem sintetizar todas as moléculas efectoras necessárias às suas funções especializadas como células T citotóxicas ou células T auxiliares ( $T_H$ ) (Janeway et al, 2002).

#### **4.4.2. Interleucina - 4**

Interleucina-4 é produzida pelas células  $T_H2$ , basófilos e macrófagos ativados e age nas células B, células T, macrófagos, células endoteliais,

fibroblastos e mastócitos. Estimula o crescimento e diferenciação das células B e reprime a resposta tipo  $T_H1$ , além de estimular o crescimento e diferenciação de eosinófilos (Janeway et al, 2002; Tizard, 2002; Waldvogel et al, 2004).

IL-4 também pode agir como uma molécula efetora, e não só direcionar e amplificar a resposta das células  $T_H$  através das células  $T_H2$ . Dentre as funções efectoras, destacam-se a ativação das células B, a atuação sobre as células T em repouso, potencializando o desenvolvimento de células T citotóxicas, além de fazer com que células  $T_H$  cresçam na ausência de IL-2. Ela induz a proliferação de mastócitos e a produção de IgE pelas células B, reduz a produção de IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$ , mas aumenta a expressão de moléculas do MHC de classe II e, dessa maneira, sua capacidade de apresentação de antígenos e atividade citotóxica (Tizard, 2002).

#### **4.4.3. Interleucina - 12**

IL-12 é uma citocina heterodimérica produzida pelas células apresentadoras de antígenos, incluindo monócitos e macrófagos, células dendríticas, células B e queratinócitos . É uma citocina que exerce efeitos imunoregulatórios sobre as células T e *natural killer* (NK) e, promove a diferenciação de células T CD4+ em  $T_H1$ , induzindo a secreção de IFN- $\gamma$  pelas células NK e  $T_H$ , o que também induz proliferação dessas mesmas células. Um efeito secundário é a inibição da resposta  $T_H2$ , suprimindo a produção de IgE, devido a supressão que exerce sobre a síntese de IL-4 (Janeway et al, 2002; Tizard, 2002).

Os efeitos de IL-12 *in vivo* e *in vitro* são mediados por sua capacidade indutora de IFN- $\gamma$ . Todavia, alguns estudos têm sugerido que IL-12 pode ter funções que são, em parte, independentes de IFN- $\gamma$ .

Em relação as citocinas, a administração de IL-12 reduziu a secreção de IL-4, IL-13 e IL-10; quando o tratamento com IL-12 foi suspenso, a secreção de todas as citocinas foi aumentada. Em contrapartida, a administração de IL-12 aumentou os níveis de IFN- $\gamma$ . Quando camundongos com *knockout* para o gene do IFN- $\gamma$  foram tratados com IL-12, houve uma diminuição de IL-4 e IL-10, e aumento de IL-13. Assim, esses resultados demonstram que IL-12 pode inibir certas citocinas T<sub>H</sub>2, tais como IL-4 e IL-10 na ausência de IFN- $\gamma$ . Intrigantemente, IL-12 pode estimular a produção de certas citocinas T<sub>H</sub>2, tais como IL-13, na ausência de IFN- $\gamma$ . IL-12 também atua no aumento de MCP-1, sem a interferência de IFN- $\gamma$  (Helmbly & Grecis, 2003).

Desta maneira, o aumento ou supressão da resposta T<sub>H</sub>2 pela IL-12 pode depender do local da resposta imune, das citocinas presentes e do estado de maturação das células T.

#### **4.4.4. Fator de necrose tumoral - $\alpha$**

TNF- $\alpha$  é uma importante citocina inflamatória, que desempenha papel na resposta imune e inflamatória, além de atuar na proliferação e diferenciação celular, bem como na patogênese de muitas doenças humanas e animais. Apresenta também funções relacionadas à modulação da produção e ativação funcional de diversas outras citocinas (Gupta et al, 2004). É secretada por macrófagos, células T<sub>H</sub>1 e algumas células T<sub>H</sub>2, células B e fibroblastos, agindo

sobre quase todas as células nucleadas, podendo atuar na resposta imune celular e humoral.

#### **4.4.5. Quimiocinas: Proteína quimioatraente de monócitos (MCP-1) e Interleucina - 8**

As quimiocinas são proteínas pertencentes à classe de citocinas que apresentam propriedades quimiotáticas, ou seja, promovem o tráfego diferenciado de leucócitos e os induzem a participar da resposta imune (Janeway et al, 2002).

A função principal das quimiocinas é atrair leucócitos, monócitos, neutrófilos e outras células efectoras do sangue para os locais da infecção e atuarem como guias para as células envolvidas na imunidade inata e para os leucócitos da imunidade adaptativa, podendo ainda participar do desenvolvimento de linfócitos, migração e angiogênese (Janeway et al, 2002).

#### **MCP-1**

A MCP-1 é produzida pelos macrófagos, células T, fibroblastos, queratinócitos e células endoteliais. Ela é quimiotática e ativa os monócitos, estimulando seu aumento respiratório e a sua liberação de enzimas lisossomais (Tizard, 2002).

Os primeiros estudos sobre esta quimiocina foram realizados por Wenpe et al. (1994), que caracterizaram o gene da MCP-1 de bovinos, e constataram ser formado por 3 exons e 2 íntrons. Introns e exons são similares em comprimento e ambos introns são achados em posições idênticas da região

codificadora dos mRNAs de MCP-1 e MCP-2. Além disso, compararam as seqüências homólogas localizadas na extremidade 5' à 400 pb à montante do início da transcrição do gene MCP-1 de ratos, camundongos, humanos e bovinos, e observaram 6 seqüências conservadas entre as espécies

Há indícios de duplo papel de MCP-1 na polarização da resposta imune: MCP-1 pode promover a imunidade T<sub>H</sub>2 em certas circunstâncias, enquanto facilita a resposta T<sub>H</sub>1 em outras.

## **IL-8**

IL-8 também é uma quimiocina, produzida e secretada por fibroblastos, macrófagos, linfócitos, granulócitos, células endoteliais, hepatócitos e queratinócitos. Está envolvida na resposta inflamatória local, auxiliando o recrutamento de neutrófilos, basófilos e células T para o local da infecção (Janeway et al, 2002; Tizard, 2002).

Apresenta um duplo papel no recrutamento de tais células: (1) atuam no rolamento dos leucócitos nas células endoteliais presentes no local da inflamação, o que conseqüentemente muda a conformação dos receptores de adesão chamadas integrinas. Esse fato permite que os leucócitos atravessem a parede dos vasos, infiltrando-se nas células endoteliais; (2) dirigem a migração dos leucócitos por um gradiente de quimiocina, que aumenta a concentração na direção do local da infecção (Janeway, 2002).

## **4.5. Interação parasita-hospedeiro**

As interações imunológicas, na interface carrapato-hospedeiro envolvem mecanismos de defesa imune inata e adquirida nos hospedeiros, e mecanismos imunomodulatórios pelos carrapatos, que visam escapar da resposta do hospedeiro (Riek, 1962; Wikel e Bergman, 1997).

Algumas dessas estratégias imunomodulatórias incluem: variação antigênica, inibição de moléculas que eliminam microorganismos, redução da expressão das moléculas de MHC e danos na função das células apresentadoras de antígeno, bloqueio na ativação do sistema complemento, redução na função dos linfócitos T, alteração na ação e produção de citocinas, clivagem enzimática de imunoglobulinas e reduzida resposta de anticorpos (Wikel e Alarcon- Chaidez, 2001; Wikel, 1999).

Devido ao longo período em que os carrapatos ficam se alimentando, são evidentes as vantagens em serem capazes de deprimir a resposta do hospedeiro, reduzindo a habilidade deste em produzir anticorpos ou outros efetores imunes contra moléculas da saliva, o que é essencial para a alimentação e têm grande valor de sobrevivência para o ectoparasita (Wikel, 1999).

No entanto, a habilidade dos ectoparasitas suprimirem as defesas imunes do hospedeiro, conseqüentemente aumenta o grau de complexidade da relação vetores transmissores/agentes causadores de doenças com seus hospedeiros mamíferos. Pois os mesmos elementos imunes efetores suprimidos pelo ectoparasita, parecem ser aqueles envolvidos na resposta do hospedeiro contra os agentes infecciosos transmitidos pelo vetor (Dessaint e Capron, 1993; Kotwal, 1996; Wikel e Bergman, 1997).

Vários modelos biológicos são utilizados para estudar as interações parasita-hospedeiro e, alguns deles serão citados para exemplificar as respostas imunes dos hospedeiros bem como as estratégias utilizadas pelos parasitas para modular estas respostas.

Na pele bovina, altas concentrações de histamina têm sido encontradas em bovinos resistentes (Willadsen, 1980). Em estudo *in vitro*, quantidades de histamina similar àsquelas encontradas nos sítios de ligação de animais resistentes, inibiram a salivação e ingurgitamento do *Dermacentor andersoni* (Paine et al., 1983). A intensidade da reação de inflamação induzida pela picada é um fator importante na indução de uma resposta efetiva do hospedeiro (Kaufman, 1989).

A irritação local pode ser causada por vários fatores incluindo elementos do sistema imune (Alexander, 1986), e leva a uma atividade de autolimpeza, um fator importante na redução de infestações por carrapatos (Bennett, 1969). A saliva de *I. scapularis* contém um inibidor da bradiquinina, que é um mediador de dor e coceira e aumenta a permeabilidade vascular (Ribeiro *et al.*, 1985; Ribeiro e Mather, 1998).

A ativação do sistema do complemento tanto pela via alternativa como pela via clássica, pode contribuir para a formação de lesão no sítio de alimentação por meio da geração de anafilatoxinas e atividades quimiotáticas, que levam a formação de um complexo de ataque à membrana, que provocam a lise do organismo invasor (Wikel, 1996; Hugli e Muller-Eberhard, 1978; Damerou, 1987). Moléculas bio-reativas liberadas por basófilos, eosinófilos e mastócitos podem influenciar respostas fisiológicas do carrapato, causando



injúria celular e mudanças comportamentais (Voss-McCowan, 1991 *apud* Wikel, 1996).

A saliva de *Ixodes dammini* (= *I. scapularis*) inibe a deposição de componentes do complemento que poderiam contribuir para iniciação e ativação seqüencial de componentes da via alternativa do complemento (Ribeiro, 1987). Valenzuela et al. (2000) purificaram e obtiveram a seqüência aminoterminal de uma nova proteína anti-complemento da saliva de *I. scapularis* (Isac), que comporta-se como um regulador da ativação do complemento.

DAS et al. (2000) clonaram e caracterizaram o primeiro gene induzido durante o repasto em *Ixodes scapularis*, *SALP 16*. A síntese da proteína SALP 16 é específica para ninfas e adultos ingurgitantes, pois não foi detectado em ínstares não ingurgitados e larvas ingurgitadas indicando que, nestas últimas, as necessidades biológicas para o repasto podem ser completamente diferentes.

Outra proteína imunossupressora, Íris, é uma proteína induzida em glândulas salivares em carrapatos ingurgitados. Caracterizada por Leboulle et al. (2002), ela suprime a proliferação de linfócitos T e induz uma resposta do tipo Th2, que é caracterizada pela inibição na produção de IFN- $\gamma$  sem afetar a expressão de IL-5 e IL-10 pelos linfócitos T e células APC. Íris ainda modula os mecanismos de imunidade inata pela inibição de citocinas pró- inflamatórias.

Kopecký et al. (1999) observaram um efeito estimulatório dos extratos de glândula salivar (SGE) sobre a produção de IL-10 por esplenócitos de camundongos tratados com lipopolissacarídeo (LPS), contrastando com a inibição da elaboração de IFN- $\gamma$  nas mesmas culturas. A estimulação da

produção de IL-10 pode explicar a maioria dos efeitos imunomodulatórios da saliva do carrapato. Inicialmente nomeada fator inibitório da síntese de citocina, IL-10 tem demonstrado inibir funções das células NK (Barral-Netto et al., 1995), a produção de IL-1 e TNF- $\alpha$  pelos macrófagos (Fiorentino et al., 1991), e IFN- $\gamma$  e IL-2 pelas células T<sub>H</sub>1 (Mosmann e Moore, 1991).

Boppana et al. (2004), estudando o impacto de *Hyalomma anatolicum anatolicum* e *Haemaphysalis bispinosa* em linfócitos no sangue circulante e, resposta proliferativa à Con A em ovinos, encontraram que as porcentagens do total de linfócitos B e T (CD4 e CD8 e células T  $\gamma/\delta^+$ ) mudam durante repetidas infestações. Os ovinos infestados apresentaram aumento na razão CD4/CD8 e diminuição na razão de linfócitos T/B durante exposição a ambas espécies de carrapatos (Boppana et al., 2004). A análise imunofenotípica dos infiltrados de linfócitos presentes nos sítios de ligação do carrapato revelou uma predominância das células do tipo CD4 sobre as CD8, sendo que essa relação aumentou durante a segunda e terceira infestações e, linfócitos B não foram encontrados na pele de animais infestados ou controle (MBow et al., 1994).

A infestação por carrapatos reduz a habilidade do hospedeiro de desenvolver uma resposta de anticorpos primária contra imunógenos heterólogos administrados durante o curso da alimentação do carrapato ou por vários dias após a infestação (Wikel, 1985). Possivelmente o efeito seja devido à modulação das células T e/ou células apresentadoras de antígenos (Wikel e Alarcon-Chaidez, 2001). A resistência adquirida a infestações por carrapatos pode resultar na redução do volume de sangue ingurgitado, diminuição do peso final da fase adulta, duração prolongada da alimentação, diminuição na

produção e viabilidade dos ovos, inibição de muda e morte dos carrapatos (Wikel, 1996).

#### **4.6. Influência de fatores não genéticos**

A ocorrência de efeito significativo da idade dos animais sobre a resistência ao carrapato tem sido observada por vários autores. Em geral, verifica-se que à medida que a idade aumenta, ocorre incremento do número de carrapatos infestantes, o qual se estabiliza na faixa etária aproximada dos 5 aos 10 anos, quando então volta a decrescer. Avaliando a resistência de animais Australian Illawarra Shorthorn e Brahman por meio de infestação artificial, Utech et al. (1978) verificaram que as vacas mais jovens (3 a 4 anos) eram mais resistentes do que as mais velhas (5 a 6 anos). Oliveira (2002) trabalhando com animais mestiços leiteiros, também encontrou número significativamente menor de teleóginas parasitando bezerros na faixa etária de um a quatro meses, em comparação a um grupo de vacas em lactação. Por outro lado, Madalena et al. (1985) e Seifert (1971) não encontraram efeito da idade sobre a infestação por carrapatos.

O efeito do sexo do hospedeiro sobre as infestações por carrapatos foi verificado em vários trabalhos de pesquisa, onde de modo geral, pode ser observado que as fêmeas são mais resistentes, quando comparadas aos machos. Esses resultados foram obtidos tanto em trabalhos onde se utilizaram infestações artificiais (Wharton et al., 1970; Oliveira e Alencar, 1987), como naqueles em que foram utilizadas as infestações naturais (Seifert, 1971; Burrow et al., 1991). De acordo com Seifert (1971) a diferença na resistência ao carrapato verificada entre os sexos pode ser atribuída à influência dos

hormônios sexuais. No entanto, discordando desses achados, Wharton et al. (1970) e Gomes et al. (1989) não encontraram efeito significativo do sexo sobre a resistência ao carrapato em infestações naturais. Utech et al. (1978) verificaram interação entre sexo e estação do ano, ao encontrarem diferenças na resistência ao carrapato entre os sexos no verão, mas não no inverno. O efeito da estação do ano sobre a taxa de infestação dos bovinos pelo carrapato *Boophilus microplus* pode ser interpretado como resultante de fatores climáticos sobre o desenvolvimento desse parasita e sobre o hospedeiro. Os fatores climáticos agem indiretamente na expressão do nível de resistência do bovino ao carrapato, devido a alterações fisiológicas determinadas pela disponibilidade e qualidade das forrageiras.

Na Austrália, Wharton et al. (1970) verificaram que a suscetibilidade dos bovinos aumentava na época da seca. No Brasil, Brum et al. (1987), trabalhando com a raça Holandesa, Souza et al. (1988), com a raça Flamenga e Alves-Branco et al. (1989), com as raças Hereford e Ibagé, apontaram o outono como a estação que apresenta as maiores médias de infestação por carrapatos. Na raça Canchim, Oliveira et al. (1989) verificaram que o outono e o inverno foram as estações de maior infestação.

Wharton et al. (1970), O'Kelly e Spiers (1976) e Oliveira et al. (1989) atribuíram a baixa resistência dos bovinos no período seco à deficiências alimentares próprias de bovinos criados extensivamente. No entanto, segundo Doube e Wharton (1980) o ciclo sazonal na expressão da resistência ao carrapato em bovinos independe do estado nutricional do animal. Corroborando esse ponto de vista, Sutherst et al. (1983) observaram que, administrando-se boa alimentação nos períodos de menor disponibilidade de forragem os

animais ainda apresentavam baixos níveis de resistência. De acordo com Guaragna et al. (1988), os efeitos climáticos são mais desfavoráveis à população de carrapatos nos pastos, do que aos animais pelo estresse nutricional.

Outro possível fator associado à queda da resistência dos bovinos aos carrapatos observada no outono estaria ligado à redução do fotoperíodo (Sutherst et al., 1983; Oliveira et al., 1989; Veríssimo et al., 1997).

Alguns autores verificaram que altas precipitações precedem as infestações mais altas (Sutherst et al., 1978; Rawlins, 1979; Guaragna et al., 1988). Segundo Andrade et al. (1998) a queda da infestação no verão pode estar associada à concentração de chuvas que prejudicam o desenvolvimento das formas de vida livre, nos pastos.

#### **4.7. PCR em tempo real**

Uma variedade de métodos são utilizados para quantificar a expressão de mRNA, tais como *Nothern blotting*, hibridização *in situ*, arranjos de cDNA e a transcrição reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) (Giulietti et al, 2001).

RT-PCR vem sendo amplamente utilizado em estudos de expressão gênica, tais como na expressão de citocinas, freqüentemente expressas em baixos níveis. É considerado o método mais sensível e preciso para tal procedimento pois, além de permitir a quantificação de transcritos raros, também possibilita a detecção de pequenas mudanças na expressão gênica (Giulietti et al, 2001; Pfaffl, 2001), sendo capaz de determinar eventos iniciais

em sua cinética de expressão e diferenciação da resposta  $T_{H1}/T_{H2}$  (Leutenegger et al, 1999).

Desde a descoberta da PCR, numerosas aplicações vêm sendo descritas para quantificação da expressão gênica, tais como o método semiquantitativo, quantitativo competitivo e mais recentemente, PCR em tempo real. A introdução dessa nova metodologia, baseada na cinética de fluorescência, possibilita a quantificação do produto de PCR em tempo real, processo que combina amplificação e detecção em um só passo (Giulietti et al., 2001). É de fácil execução, oferece a precisão necessária e produz resultados confiáveis, possíveis de serem reproduzidos em período de tempo relativamente curto (Pfaffl, 2001).

#### **4.8. Métodos de quantificação**

A escolha do método de quantificação depende da seqüência alvo, da quantidade de mRNA presente no tecido, do grau de precisão desejado e do tipo de quantificação (relativa ou absoluta) (Pfaffl, 2001).

Há dois tipos de quantificações em PCR em tempo real: (1) quantificação relativa baseada na expressão relativa do gene de interesse versus um gene referência, (2) quantificação absoluta, baseada tanto numa curva de calibração interna como externa. Essa quantificação determina o número de cópias do transcrito de interesse, por relacionar o sinal de PCR a uma curva padrão (Livak & Schmittgen, 2001). Quantificação relativa deve ser utilizada quando o objetivo é comparar diferenças de expressão gênica entre tratamentos (Livak & Schmittgen, 2001).

Para quantificar mudanças relativas na expressão de um gene usando PCR em tempo real, é necessário levar em consideração as variáveis que podem influenciar tais expressões. Pfaffl (2001) desenvolveu um modelo matemático para determinar a quantificação relativa de um gene de interesse em comparação com um gene referência. A expressão relativa ( $R$ ) do gene de interesse é calculada baseada na eficiência de amplificação ( $E$ ) e no ciclo onde é detectado o início do aumento da fluorescência ( $C_t$ ) (ponto onde inicia-se a detecção da amplificação do produto desejado) de uma amostra desconhecida versus uma amostra controle, ambos expressos em relação ao gene referência:

$$Raz\tilde{a}o = \frac{\left(E_{gene\ alvo}\right)^{C_t\ gene\ alvo\ (Media\ do\ grupo\ controle - Media\ do\ grupo\ desafiado)}}{\left(E_{gene\ refer\tilde{e}ncia}\right)^{C_t\ gene\ refer\tilde{e}ncia\ (Media\ do\ grupo\ controle - Media\ do\ grupo\ desafiado)}}$$

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1. Animais

Com a finalidade de obtermos 10 bezerros com diferença mínima de idade, 12 fêmeas da raça Nelore foram estabuladas por ocasião do terço final da gestação. Estas vacas foram pulverizadas com carrapaticida a base de formamidinas (amitraz). Após o nascimento, os bezerros foram mantidos com suas mães em baias projetadas para abrigar uma fêmea com seu bezerro e ambos foram mantidos livres de ectoparasitos por meio de banhos intensivos.

O experimento foi conduzido na Embrapa Pecuária Sudeste, localizada no município de São Carlos, São Paulo (22°01'S e 47°53'W).

Quando os bezerros completaram 4 meses de idade, foram divididos aleatoriamente em 2 grupos: Controle e Desafiado.

## **5.2. Infestações**

Fêmeas ingurgitadas de *B. microplus* foram coletadas e mantidas em uma incubadora do tipo Demanda Biológica de Oxigênio (BOD) a  $27 \pm 1^\circ\text{C}$ . Alíquotas de 1g de ovos (aproximadamente 20.000 ovos) foram pesadas e utilizadas para produzir larvas. Apenas alíquotas com mais de 90% de larvas produzidas foram utilizadas.

Animais do grupo desafiado (5 bezerros) permaneceram 30 dias sem banho carrapaticida antes de serem submetidos a infestação artificial com as larvas de *B. microplus*, a fim de evitar interferência com a viabilidade dos carrapatos. Alíquotas de larvas foram então espalhadas no dorso do animal. Nas manhãs do 19º e 23º dia do ciclo do parasita foram realizadas contagens de carrapatos, e todas as fêmeas adultas com tamanho superior a 4,5 mm presentes no corpo do animal foram recolhidas.

## **5.3. Coleta dos tecidos**

No 9º dia após a infestação com carrapatos (dia modal de ninfa), foram coletadas amostras de pele e do linfonodo inguinal, por meio de procedimento cirúrgico, após anestesia local. As amostras eram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e foram mantidas a  $-80^\circ\text{C}$  até o momento da sua



utilização para extração de RNA. Para 1 animal do grupo controle a amostra de linfonodo foi insuficiente para a análise.

#### **5.4. Extração de RNA total**

RNA total foi isolado utilizando o reagente TRIzol® (Invitrogen) seguindo instruções do fabricante. De modo que 1 ml de TRIzol foi utilizado para cada 0,1 grama de tecido e 200 µl de clorofórmio foi adicionado a essa mistura que ficou incubada 5 minutos a temperatura ambiente (25 °C) antes de ser centrifugada a 11.000 rpm por 15 minutos, a 4 °C. Após centrifugação a fase aquosa foi recuperada, 500 µl de isopropanol foram adicionados, e as amostras foram novamente incubadas por 10 minutos a temperatura ambiente antes de serem centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos, a 4 °C. O RNA precipitado foi lavado com 1 ml de etanol 75%, e uma nova centrifugação foi realizada, a 10.000 rpm por 5 minutos, a 4°C. O RNA precipitado foi seco a temperatura ambiente e ressuspenso em 20 µl de água tratada com dietil pirocarbonato (DEPC). Todo material utilizado durante o procedimento para extração do RNA foi devidamente tratado, ficando livre de RNAses, por meio de tratamento com DEPC 0,1%, e esterilização à 180° C.

A concentração de RNA foi determinada em espectrofotômetro a OD<sub>260nm</sub>, a qualidade e integridade foram verificadas pela razão OD<sub>260</sub>:OD<sub>280</sub> e em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

#### **5.5. Síntese de cDNA**

A síntese de DNA complementar (cDNA) foi realizada a partir de RNA total, utilizando o *Kit SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen). Para 5 µg de RNA total obtidos das amostras de tecidos foi adicionado 1 µl de *primer* oligo (dT) (0.5µg/µl) e 1µl de dNTP mix (10 mM) e essa mistura foi incubada a 65° por 5 minutos, após a qual foi resfriada em gelo por 1 minuto. A essa reação foram adicionados 2 µl de *Buffer RT 10X*, 4 µl de MgCl<sub>2</sub> (25mM), 2 µl de DTT (0,1 M) e 1 µl de *Rnase OUT* (40u/µl) em um volume final de 20 µl, e foi incubada a 42°C por 2 minutos. Após esse tempo, foram adicionadas 50 unidades da enzima *SuperScript II RT* (Invitrogen). A transcrição reversa foi feita a 42°C por 50 minutos, procedendo-se a inativação da enzima a 70°C por 15 minutos. Para remoção do RNA molde da molécula híbrida cDNA:RNA adicionou-se 2 unidades de *Rnase H* por 20 minutos a 37°C, para digestão da molécula.

## **5.6. Desenho dos primers**

Os primers utilizados nesse trabalho foram desenhados por Zaros et al. (in press) using Primer3 primer design software (Rozen & Skaletsky, 2000 – [www.frodo.wi.mit.edu/cgi-bi/primer3/primer3\\_www.cgi](http://www.frodo.wi.mit.edu/cgi-bi/primer3/primer3_www.cgi)) utilizando seqüências específicas de bovino disponíveis no GenBank. Na Tabela 1 estão listados os primers utilizados. Os primers foram desenhados de modo a hibridizarem a dois exons adjacentes, com a finalidade de distinguir a amplificação a partir de moldes de DNA.

## **5.7. Confirmação da especificidade dos primers**

A especificidade dos produtos de qRT-PCR foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 2% e por análise das curvas de desnaturação (*melting*), que possibilita a verificação da temperatura de desnaturação do produto amplificado, o que permite diferenciar produtos inespecíficos dos produtos esperados.

A reação de amplificação e a análise das curvas de desnaturação foram realizadas em um equipamento LightCycler™ (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany).

**Tabela 1.** Seqüência dos *primers*

Gene	Seqüência dos <i>Primers</i> Direto e reverso (5'- 3')	Tamanho do produto (bp) <sup>a</sup>	Numero de acesso <sup>b</sup>
IL-2	F- TCCAAGCAAAAACCTGAACC R- CAGCGTTTACTGTTGCATCATC	151	AF535144
IL-4	F- TGCATTGTTAGCGTCTCCTG R- AGGTCTTTCAGCGTACTTGT	450	M77120
IL-8	F- TGGGCCACACTGTGAAAAT R- TCATGGATCTTGCTTCTCAGC	203	AF061521
IL-12p35	F- GAGGCCTGTTTACCACTGGA R- CTCATAGATACTTCTAAGGCACAG	143	AJ271034
MCP-1	F- CAAGTCGCCTGCTGCCTATAC R- AGAGGGCAGTTAGGGAAAGC	278	L32659
TNF- $\alpha$	F- TAACAAGCCGGTAGCCACG R- TCTTGATGGCAGACAGGATG	279	AF011926
RPL-19	F- GAAATCGCCAATGCCAAC R- GAGCCTTGCTGCCTTCA	410	BC102223

<sup>a</sup>bp: pares de base

<sup>b</sup> Seqüências bovinas obtidas do banco de dados EMBL/ GenBank, a partir das quais os primers foram desenhados.

## 5.8. Eficiência de Amplificação

A eficiência de amplificação de cada gene, foi calculada por Zaros et al. (in press) por meio da construção de uma curva de diluição em série de cDNA. A partir dos dados obtidos, um gráfico do Ct (*threshold cycle* = ciclo de início da detecção do produto amplificado) versus o  $\log_{10}$  do número relativo de cópias da diluição em série foi produzido. Uma regressão linear foi realizada para determinação do coeficiente angular da reta, o qual é utilizado para determinar a eficiência de amplificação usando a fórmula desenvolvida por Pfaffl (2001): Eficiência (E) =  $10^{(-1/\text{slope})}$ .

Os valores de (E) obtidos para cada gene, foram utilizados para o cálculo da expressão relativa e podem ser visualizados na Tabela 2. As análises de regressão revelaram valores acima de 0.96 para  $R^2$  demonstrando a existência de uma relação linear entre a quantidade de amostra utilizada e os valores de Ct. Segundo Wilkening & Bader (2004) a máxima eficiência possível na PCR é 2, ou seja, a cada ciclo da reação o produto de PCR é duplicado e, um valor mínimo de 1 corresponde a nenhuma amplificação.

**Tabela 2.** Valores obtidos a partir da análise de regressão linear, para cálculo da eficiência de amplificação (E). S: Coeficiente angular da reta;  $R^2$ : Coeficiente de determinação da regressão.

Gene	Slope	$R^2$	E
IL-2	-3,77	0,98	1,8
IL-4	-3,53	0,97	1,9
IL-8	-3,34	0,98	1,9
IL-12	-3,77	0,98	1,8
TNF- $\alpha$	-2,81	0,97	2,2
MCP-1	-3,08	0,99	2,1

RPL-19	-3,24	0,99	2,0
--------	-------	------	-----

### 5.9. Reação de qRT-PCR em tempo real

As reações de qRT-PCR em tempo real foram realizadas utilizando equipamento *LightCycler*<sup>TM</sup> (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) e corante SYBR Green I. As reações foram compostas por: MgCl<sub>2</sub> em concentrações ótimas para cada primer (Tabela 2), 2-2.5 pmol/μl de cada primer, 0.4 μl de dNTP (10 mM), 0.3 μl de Taq Platinun DNA polimerase (Invitrogen, 5 U/μl), 0.25 μl BSA (20 mg/ml), 0.04 μl de Syber Green, 2 μl de tampão 1X (50mM de KCl, 10mM Tris-HCl pH 9,0), 0.5 μl de Dimetil Sulfóxido(DMSO) e água ultra-pura até o volume de 19 μl. Um volume de 19 μl da mistura de reação foi adicionado a cada capilar seguido de 1 μl de cDNA. A reação foi incubada no equipamento *LightCycler*<sup>TM</sup> seguindo condições específicas para cada gene (Tabela 3)

**Tabela 3.** Condições da reação de PCR.

Genes	Concentração dos primers (pmol)	MgCl <sub>2</sub> (mM)	Condições da Reação de PCR	
			Anelamento (°C/sec)	Extensão (°C /sec)
IL-2	2.5	2.0	57/ 7 sec	72/ 6 sec
IL-4	2	3.0	56/ 6 sec	72/ 17 sec
IL-8	2.5	3.0	53/ 5sec	72/ 9 sec
IL-12p35	2	3.0	58/ 7 sec	72/ 7 sec
MCP-1	2.5	2.5	56/ 5 sec	72/ 12 sec
TNF-α	2	2.5	57°C / 7 sec	72°C/ 12 sec
RPL-19	2.5	2.5	60/ 7 sec	72/ 16 sec

Um passo de desnaturação inicial foi realizado, para assegurar a completa desnaturação do cDNA. Tanto o passo da desnaturação inicial, como os passos de desnaturação a cada ciclo foram os mesmos para todos os *primers*, ou seja, 95°C por 5 minutos e 95°C por 10 segundos respectivamente. A temperatura de aquisição de fluorescência foi de 72°C para todos os genes.

### 5.10. Quantificação relativa da expressão gênica

A fim de revelar diferenças de expressão entre 2 grupos estudados (Controle e Desafiado), optou-se pelo método de quantificação relativa (Pfaffl, 2001). Este método é baseado na quantificação do gene de interesse em relação a um gene constitutivo denominado referência, de modo a minimizar as possíveis variações quanto à quantidade de RNA total inicial e a eficiência na transcrição reversa.

A razão de expressão relativa é baseada na eficiência de amplificação e na variação do  $C_t$  do grupo desafiado em relação ao grupo controle. A equação abaixo ilustra o método de quantificação relativa:

$$Razão = \frac{\left(E_{gene\ alvo}\right)^{C_t\ gene\ alvo (Media\ do\ grupo\ controle - Media\ do\ grupo\ desafiado)}}{\left(E_{gene\ referência}\right)^{C_t\ gene\ referência (Media\ do\ grupo\ controle - Media\ do\ grupo\ desafiado)}}$$

Onde:

$E_{gene\ alvo}$  = eficiência de amplificação do gene alvo

$E_{gene\ referência}$  = eficiência de amplificação do gene referência

$C_t$  = Ciclo de início da detecção do produto amplificado

Para o cálculo dessa razão para cada gene, foi utilizado um software desenvolvido por Pfaffl et al. (2002), denominado *Relative Expression Software Tool* (REST)©.

### **5.11. Análise Estatística**

O coeficiente de variação das quantificações realizadas para os genes alvo foi estimado por uma análise de variância (ANOVA), utilizando o procedimento GLM do SAS (SAS, 2003). A mesma análise foi empregada para validar o gene constitutivo RPL-19, que foi utilizado como gene referencia

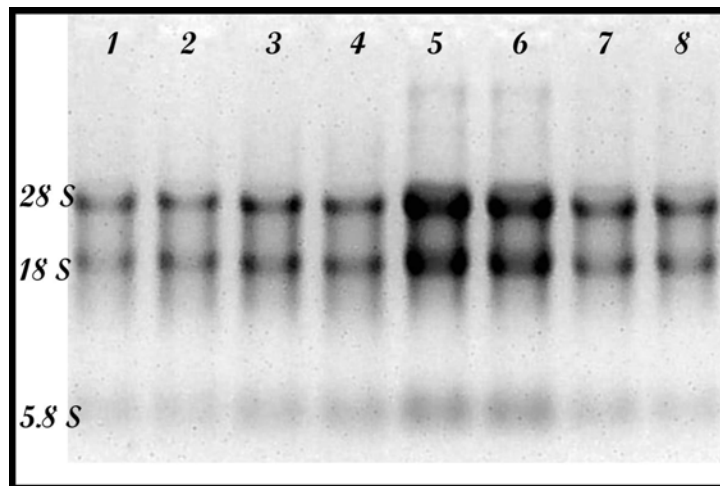
, por meio de um teste T.

A significância das diferenças existentes entre os grupos experimentais, em relação à quantificação do mRNA dos genes estudados, foi avaliada em uma análise não-paramétrica, utilizando o REST©, que testa a significância das diferenças de  $C_t$  por um teste denominado Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test©. Em todas as análises estatísticas, a significância considerada foi  $P < 0.1$ , devido ao reduzido número amostral.

## **6. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **6.1. Extração de RNA total**

RNA total foi extraído a partir de amostras dos tecidos de pele e linfonodo inguinal de 5 animais do grupo desafiado e 5 do grupo controle, e estão ilustrados na Figura 1.



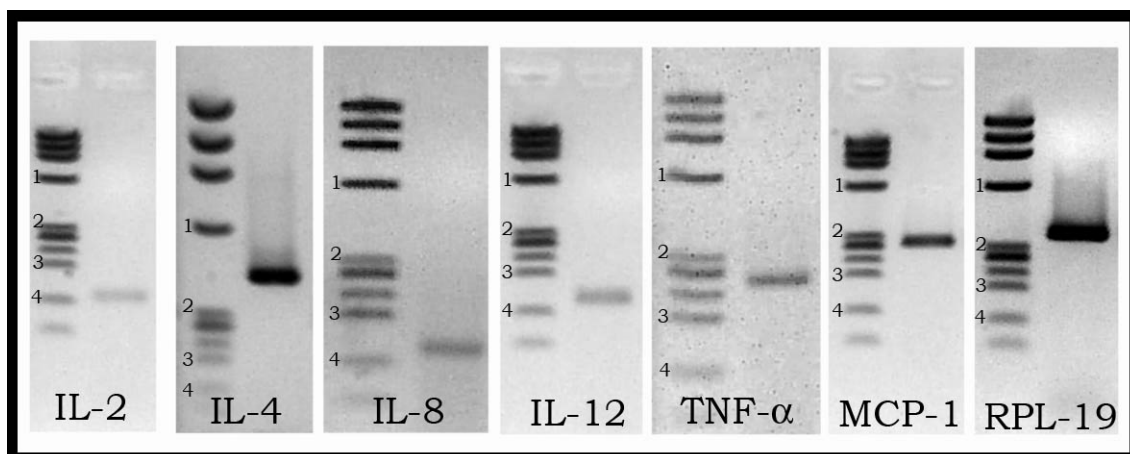
**Figura 1.** Amostras de RNA após eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio. Linhas 1 a 4 correspondem a RNA extraído a partir de amostras de pele. Linhas 5 a 8 correspondem a RNA extraído a partir de amostras de linfonodos.

A eletroforese em gel de agarose 1% permitiu verificar a integridade das amostras de RNA total, avaliada pelas bandas estruturais do RNA ribossômico (28S, 18S e 5,8S) e a quantificação em espectrofotômetro permitiu verificar a qualidade e concentração das amostras de RNA.

## **6.2. Confirmação de especificidade dos primers**

O cDNA sintetizado a partir do RNA total extraído das amostras de tecidos foi empregado nas reações de PCR em tempo real com o objetivo de estabelecer as condições de amplificação para cada um dos genes estudados por meio da verificação da especificidade dos primers, que foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 2% (Figura 2).



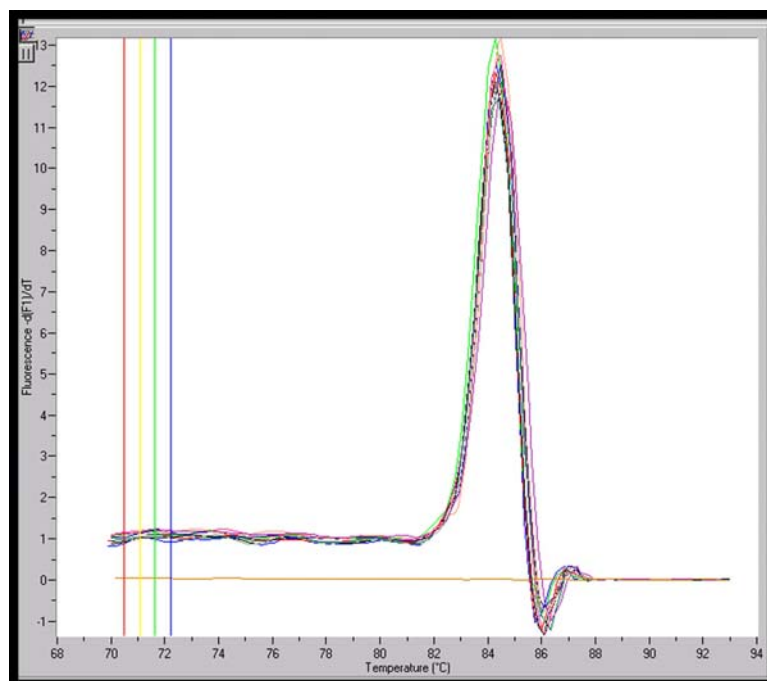


**Figura 2.** Análise da especificidade dos produtos da qRT-PCR. Eletroforese em gel de agarose, corado com brometo de etídio. A primeira linha de cada gel corresponde ao padrão de peso molecular, Phi-X174 *Hae*III. 1: 603bp; 2: 310bp; 3: 194bp; 4: 118bp.

A especificidade pode ser também confirmada pela análise das curvas de desnaturação, que foram realizadas de 70 °C a 95°C a 0.1°C/s para todos os genes estudados, os quais mostraram somente o produto esperado, como ilustrado na Figura 3, e cujas temperaturas de desnaturação foram obtidas e podem ser visualizadas na Tabela 4.

**Tabela 4.** Temperaturas de desnaturação.

Gene	Temperatura de desnaturação
IL-2	82.5
IL-4	86
IL-8	82
IL-12p35	82.5
TNF- $\alpha$	88.5
MCP-1 $\alpha$	85
RPL19	87.5



**Figura 3.** Curva de desnaturalização para o gene MCP-1. No eixo Y está representada a fluorescência emitida durante o aumento da temperatura e no eixo X a variação de temperatura. Cada linha da curva representa uma amostra submetida a qRT-PCR.

A análise da curva de desnaturalização é um método preciso e rápido para verificar a especificidade dos produtos de PCR, mas não deve ser utilizado como única fonte de confirmação de especificidade, uma vez que em alguns casos, produtos de diferentes comprimentos podem ter a mesma temperatura de desnaturalização, sendo indistinguíveis por essa análise.

### 6.3. Verificação do gene referência

Para se obter resultados confiáveis a partir de qRT-PCR em tempo real, é necessário corrigir variações experimentais tais como, diferenças na quantidade e qualidade do material inicial, na extração de RNA e na síntese de cDNA. A quantificação de um gene constitutivo na mesma amostra em que se

pretende quantificar o gene alvo possibilita a normalização dessas diferenças (Al-Bader & Al-Sarraf, 2005) e é o método mais aceitável (Giulietti et al. 2001; Bustin et al. 2005).

Diferenças na transcrição reversa podem resultar em quantidades de cDNA que não correspondem à quantidade de RNA inicial e, sendo a PCR de natureza exponencial, pequenas diferenças na amplificação podem resultar em maiores diferenças no produto final (Giulietti et al. 2001).

Um gene constitutivo ideal deve apresentar expressão constante entre diferentes tecidos e sob diferentes tratamentos. Neste trabalho utilizou-se o gene RPL-19 (ribossomal protein large subunit – 19) como gene referência, uma vez que os níveis de mRNA deste gene não diferiram ( $P>0.1$ ) entre os grupos dentro de cada tecido (Tabela 5).

Apesar da diferença entre tecidos ter sido significativa ( $P<0,05$ ), esse resultado não afeta nosso experimento já que nenhuma comparação entre tecidos foi realizada para os genes alvos.

**Tabela 5.** Análise de variância para o gene controle RPL-19 entre os grupos, para cada tecido.

Tecido	Grupo	Média±DP	N	CV(%)	P
P	C	18.40 ± 0.89	5	4.82	0.45
	D	18.01 ± 0.62	5	3.45	
LN	C	20.94 ± 1.19	4	5.69	0.96
	D	20.99 ± 1.14	5	5.45	

P: pele, LN: linfonodo, C: grupo controle, D: grupo desafiado, DP: desvio padrão, CV: coeficiente de variação, P: probabilidade associada ao teste T.

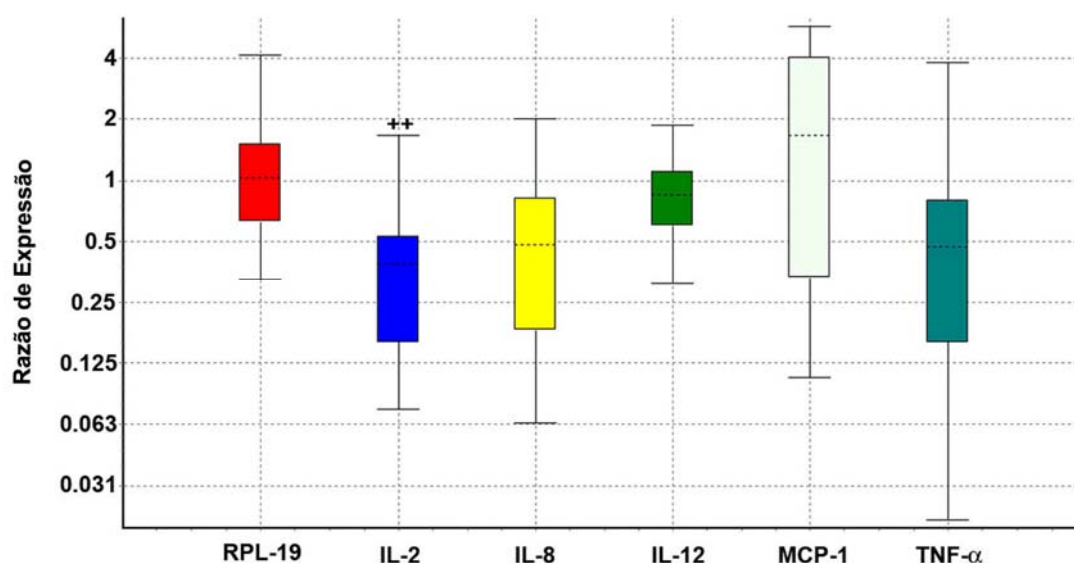
#### 6.4. Quantificação relativa da expressão gênica

As citocinas são proteínas que desempenham papel central na regulação da resposta imune, de modo que muitos parasitas têm desenvolvido a habilidade de modular a rede de citocinas para facilitar sua sobrevivência na presença de defesas imunes do hospedeiro (Wikel, 1996). Neste contexto, tem sido sugerido que o resultado de muitas infecções parasitárias, com relação à resistência ou suscetibilidade, é determinado pelo padrão de resposta, envolvendo subconjuntos de células T CD4<sup>+</sup> (T<sub>H</sub>1 e T<sub>H</sub>2), as quais produzem citocinas capazes de direcionar a resposta imune para diferentes mecanismos (Mosmann and Sad, 1996).

Vários trabalhos demonstraram que os carrapatos modulam as respostas de citocinas, resultando em um padrão geral de redução de citocinas T<sub>H</sub>1 e aumento nas citocinas T<sub>H</sub>2 (Ferreira and Silva, 1999; Schoeler et al., 2000; Mejri et al., 2001). Kovář et al. (2002a,b), em estudo sobre o impacto dos SGE de carrapatos *Ixodes ricinus* sobre a proliferação de linfócitos T em camundongos e humanos, encontraram uma redução sobre a proliferação desses linfócitos e uma clara modulação da resposta imune para o padrão T<sub>H</sub>2. Eles verificaram que SGE resultou em um aumento nos níveis de IL-4 e redução nos níveis de IL-2, o principal fator de crescimento autócrino dos linfócitos T<sub>H</sub>1, tanto no nível protéico como nos níveis de mRNAs, similar a outros dados obtidos a partir de experimentos com células de camundongos (Guanapamo et al, 1995; Ferreira and Silva 1999; Schoeler et al. 1999, 2000). Nos estágios iniciais da infecção, os níveis de IL-4 e IL-12 determinam qual tipo

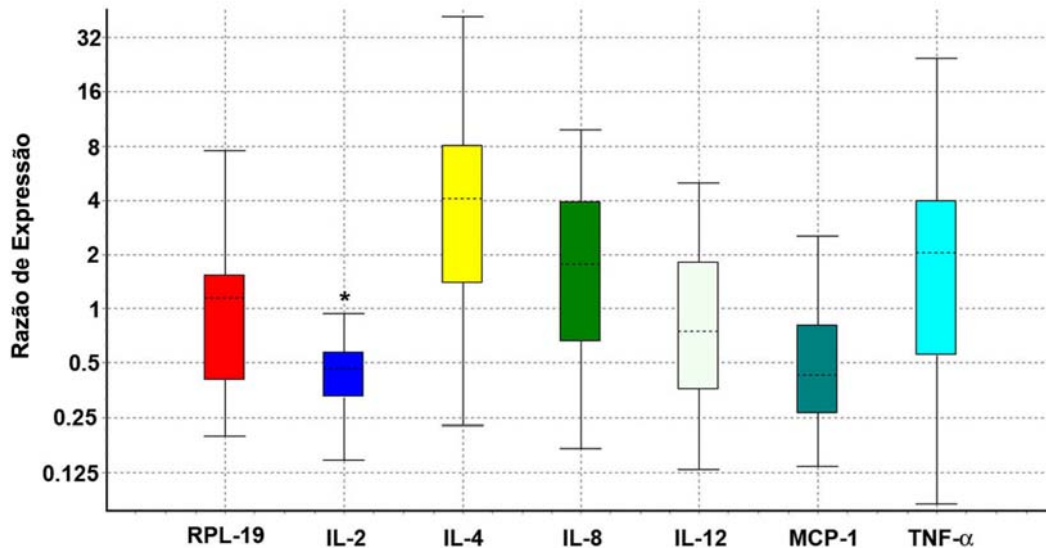
de resposta imune será ativada: celular ( $T_H1$ ) ou humoral ( $T_H2$ ) (Wang et al., 1999).

Neste trabalho, os dados dos Cts obtidos a partir da qRT-PCR em tempo real para quantificação de algumas citocinas, foram utilizados para cálculo da expressão relativa segundo método descrito por Pfaffl (2001), no software REST (Pfaffl et al., 2002). A partir desta análise que utiliza a (E) encontrada para cada gene bem como um gene constitutivo como referência, para normalizar diferenças acumuladas durante os procedimentos preliminares, foram gerados os gráficos de expressão relativa para pele (Figura 4) e linfonodo (Figura 5). De acordo com as figuras podemos observar que existem algumas diferenças entre os animais controle e aqueles submetidos à infestação.



**Figura 4.** Razão de expressão de citocinas na pele entre o grupo desafiado e o grupo controle, normalizado para um gene referência (RPL-19). As barras representam o intervalo interquartil, ou 50% das observações, expressas como n-vezes a diferença entre os grupos (C e D). As

linhas pontilhadas representam a média de expressão gênica. As linhas representam as observações máxima e mínima. ++:  $P < 0.10$ .



**Figura 5.** Razão de expressão de citocinas no linfonodo entre o grupo desafiado e o grupo controle, normalizado para um gene referencia (RPL-19). As barras representam o intervalo interquartil, ou 50% das observações, expressas como n-vezes a diferença entre os grupos (C e D). As linhas pontilhadas representam a média de expressão gênica. As linhas representam as observações máxima e mínima. \*:  $P < 0.05$ .

Na pele e nos linfonodos, a quantificação relativa demonstrou baixos níveis de mRNA de IL-2, menos da metade, no grupo desafiado em relação ao grupo controle, apresentando nível de significância de  $P \leq 0.06$  na pele e  $P \leq 0.03$  nos linfonodos. Em estudo com células de linfonodos de camundongos infestados com *R. sanguineus*, Ferreira e Silva (1999) verificaram prejuízos na

produção de IL-2 e reduzida resposta proliferativa à concanavalina A (Con A) desde a primeira infestação.

IL-2 é um fator de crescimento que guia a proliferação e diferenciação das células T, e é produzida pelas próprias células T ativadas (Janeway, 2002), portanto, prejuízos na produção de IL-2 podem afetar a ativação de células CD4<sup>+</sup> T virgens e sua diferenciação em células efetoras, levando a uma redução nas reações DTH, nas respostas das células T citotóxicas, bem como na produção de anticorpos. Tal estado imunossupressivo pode impedir a resistência do hospedeiro contra carrapatos e patógenos transmitidos por este (Wikel, 1996).

Ramachandra and Wikel (1992) estudando os efeitos de SGE de carrapatos *Dermacentor andersoni* sobre os linfócitos T, também verificaram uma supressão na proliferação de linfócitos, devido à redução nos níveis de IL-2 e outras citocinas de resposta T<sub>H1</sub> (IL-1, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ). Concluíram que a redução nos níveis de citocinas pode suprimir as respostas imunes direcionadas para os imunógenos introduzidos pelo carrapato durante o repasto, indicando atividade imunomodulatória dos carrapatos sobre o hospedeiro a fim de facilitar a alimentação e, conseqüentemente, facilitando também a transmissão de patógenos.

Os baixos níveis de mRNA de IL-2 encontrados em nosso estudo, tanto na pele como nos linfonodos, sugere a ocorrência de um mecanismo de modulação da transcrição, em *B. microplus*, direcionada para esta citocina.

Gillespie et al. (2001), atribuiu os níveis reduzidos de IL-2 a sua neutralização por uma proteína que se liga a IL-2, presente na saliva do carrapato *Ixodes scapularis*. Anguita et al. (2002) também identificaram uma

proteína presente na saliva em *I. scapularis*, denominada Salp15, que inibe a ativação de células T CD4<sup>+</sup>. O efeito inibitório da Salp15 é devido a sua atuação sobre a transcrição de IL-2, uma vez que esta citocina atua como um fator autócrino de crescimento de células T, e que células T CD4<sup>+</sup> efectoras não foram inibidas quando incubadas com Salp 15, provavelmente porque essas células são menos dependentes de IL-2 e não, ou não grandemente, produzem essa citocina em resposta a estimulação antigênica.

Guanapano et al. (1995, 1996), estudando linfócitos obtidos a partir de linfonodos de camundongos infestados de 1 a 3 vezes com ninfas de *I. ricinus*, verificaram que 9 dias após a primeira infestação os linfonodos que drenam o sítio de infestação produziram altos níveis de IL-4 e baixos níveis de IFN- $\gamma$ , e que a quantidade de IL-4 produzida por esses mesmos linfonodos 9 dias após a terceira infestação permaneceu elevada, enquanto os níveis de IFN-  $\gamma$  aumentaram durante a terceira infestação.

No presente estudo, não foi detectado mRNA de IL-4 na pele de ambos grupos estudados enquanto nos linfonodos, embora não estatisticamente significativo ( $P \leq 0.19$ ), as amostras apresentaram altos níveis de mRNA para IL-4, sendo quase 4 vezes mais abundante no grupo desafiado em relação ao grupo controle. Este resultado indica uma possível polarização da resposta imune para linfócitos T<sub>H</sub>2, desde que uma citocina do perfil T<sub>H</sub>1 (IL-2) apresentou níveis reduzidos em animais submetidos à infestação, e uma citocina do perfil T<sub>H</sub>2 (IL-4) foi possivelmente estimulada.

O fato da IL-4 não apresentar diferença significativa pode ser em parte explicado pela variação existente entre os bezerros, pois, embora os animais estudados sejam de uma raça resistente (Nelore), algum grau de variação para



a resistência ao carrapato foi observado entre eles, como pode ser visto pela contagem de carrapatos (Tabela 6). Esta variação pode ter ocultado respostas relevantes.

As diferenças das quantificações dos níveis de mRNA de IL-8, IL-12p35, TNF- $\alpha$  e MCP-1, tanto na pele como nos linfonodos, não foram significativas ( $P > 0.10$ ) entre os grupos, embora tenham sido descritas importantes atuações desses genes na resposta imune, sendo alvos de modulação pelo o carrapato.

**Tabela 6.** Número de carrapatos ingurgitados observados entre os 19º e 21º dias após infestação.

<b>Animais</b>	<b>Número de carrapatos</b>
1	34
2	27
3	13
4	9
5	0
Média (EP)	16.6 (13.76)

EP: Erro padrão.

IL-8 desempenha função crítica no processo inflamatório, devido sua importante atividade quimioatraente e ativadora de neutrófilos. Kocáková et al (2003) estudaram a atividade anti-IL-8 de 3 espécies de carrapatos ixodídeos, e atribuíram esta atividade à moléculas presentes na glândula salivar que se ligam a IL-8 prevenindo a ligação dessa quimiocina ao seu receptor específico. Eles encontraram, nas espécies de carrapatos estudados, que os SGE

possuem atividade anti-IL-8 o que indica a importante função desempenhada pelos neutrófilos na resposta imune do hospedeiro. MCP-1 também é uma quimiocina importante no processo inflamatório devido a sua atividade quimioatraente para monócitos e basófilos, Hajnicka et al. (2005), estudando saliva e SGE de três espécies de carrapatos, encontraram uma atividade anti-MCP1 na saliva dos carrapatos *Dermacentor reticulatus* e *Amblyomma variegatum*.

IL-12, uma citocina que atua junto com IFN- $\gamma$  para promover a diferenciação de linfócitos T<sub>H</sub>1 (Coffman et al., 1991; Seder and Paul, 1994), a secreção reduzida por células de camundongos infestados com o carrapato *Rhipicephalus sanguineos* (Ferreira and Silva, 1999), e produção reduzida pelas células dendríticas cultivadas em meio lipopolissacarídeo em presença da saliva deste carrapato (Cavassani et al., 2005).

Alguns trabalhos descreveram que danos na pele, como aquele causado pela fixação do carrapato, estimulam a infiltração de células T e podem resultar na produção de TNF- $\alpha$  (Wood et al., 1992; Mbow et al., 1994). Gwakisa et al. (2001) estudando o impacto do SGE do carrapato *Rhipicephalus appendiculatus* sobre uma linhagem celular semelhante a macrófagos, demonstraram um efeito supressor sobre a secreção, bem como sobre a transcrição de mRNA de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  e IL-10.

Tais mecanismos imunomodulatórios não podem ser deduzidos a partir de nossos resultados sobre um hospedeiro bovino (*Bos indicus*) em resposta ao carrapato *Boophilus microplus*.

Mas o que já foi verificado nos diversos trabalhos citados é que as funções reguladoras e efetoras dos linfócitos T são chaves para as defesas do

hospedeiro contra os carrapatos (Wikel, 1999), pois influenciam a produção de anticorpos e respostas DTH, sendo que ambas são importantes componentes da resposta imune adquirida a infestações (Wikel e Bergman, 1997). Deste modo, são alvos dos carrapatos, os quais têm apresentado uma tendência para modular a resposta do hospedeiro para o padrão T<sub>H</sub>2, sendo que a supressão das células T<sub>H</sub>1 pode inibir a expansão clonal de linfócitos T específicos, a diferenciação de linfócitos B, a ativação de macrófagos e a atividade das células NK (Ramachandra and Wikel, 1992; Wikel, 1996), retardando uma resposta efetiva do hospedeiro contra o carrapato.

## **7. CONCLUSÃO**

Verificamos que o estudo para comparação do perfil de expressão de genes do sistema imunológico entre animais expostos e não ao carrapato tem grande potencial para identificação de genes alvos, envolvidos na modulação da resistência dos bovinos ao carrapato.

Os resultados obtidos neste trabalho indicaram uma redução nos níveis de IL-2, demonstrando uma possível tendência para resposta T<sub>H</sub>2 por meio do aumento nos níveis de IL-4.

## **8. PERSPECTIVAS FUTURAS**

A partir dos resultados encontrados neste trabalho ainda é difícil afirmar se existe um padrão geral de resposta T<sub>H</sub>2 estimulado pelo carrapato *B. microplus* em bovinos, desde que foram verificadas variações em relação à resistência entre os animais estudados. Neste sentido, estudos adicionais

devem ser realizados na tentativa de entender o padrão de resposta em animais resistentes e sensíveis.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-BADER, M.D.; AL-SARRAF, H. A. Housekeeping gene expression during fetal brain development in the rat—validation by semi-quantitative RT-PCR. *Brain Res Dev Brain Res.*, v.156, p.38- 45, 2005.

ALEXANDER, JO'D. The physiology of itch. **Parasitol. Today**, v. 2, p. 345-351, 1986.

ALLEN, J. R. Host resistance to ectoparasites. **Ver. Sci. Tech. Off. Epiz.**, v. 13, p. 1287-1303, 1994.

ALLEN, J. R. Tick resistance: basophils in skin reactions of guinea pigs. **Int. J. Parasitol.**, v. 3, p. 195-200, 1973.

ALVES-BRANCO, F. P. J.; PINHEIRO, A. C.; SAPPER, M. F. M. Controle do *Boophilus microplus* com esquemas de banhos estratégicos em bovinos Hereford. In: CURSO DE PARASITOLOGIA ANIMAL 2, Bagé, 1989, p. 109-124.

ANDRADE, A. B. F.; et al. Parâmetros genéticos e fenotípicos de medidas da infestação de fêmeas bovinas da raça Caracu por carrapatos (*Boophilus*

microplus) In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA 38º, 2001, Piracicaba. **Anais...**Piracicaba: SBZ., 2001, p. 575-577.

ANDRADE, A. B. F.; et al. Genetic and Environmental aspects of the resistance of zebu cattle to the tick *Boophilus microplus*. In: WORLD CONGRESS ON GENETICS APPLIED TO LIVESTOCK PRODUCTION, 6., 1998, Armidale, NSW, Austrália. **Proceedings...**Armidale, v. 27, 1998, p. 339-342.

ANGUITA, J., et al. Salp15, an *Ixodes scapularis* Salivary Protein, inhibits CD4<sup>+</sup> T cell activation. **Immunity**, v. 16, p. 849-859, 2002.

BARRAL-NETTO, M.; et al.. Cytotoxicity in human mucosal and cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunol.**, v. 17, p. 21-28, 1995.

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

BOPPANA, D. K. V.; et al. In vivo immunomodulatory effects of ixodid ticks on ovine circulating T- and B-lymphocytes. **Parasite Immunol**, v. 26, p. 83-93, 2004.

BROSSARD M.; RUTTI B.; HAUG, T. **Immunological relationships between host and ixodid ticks**. In: Toft CA, Aeschliman A, Bolic L, editors. Parasite-

host associations: coexistence or conflict. Oxford: Oxford Science Publications, p. 177-200, 1991.

BROSSARD, M.; FIVAZ, V. *Ixodes ricinus* L.: mast cells, basophils and eosinophils in the sequence of cellular events in the skin of infested and reinfested rabbits. **Parasitology**, v. 85, p. 583-592, 1982.

BROSSARD, M.; WIKEL, S. K. Immunology of interactions between ticks and hosts. **Med. Vet. Entomol.**, v. 11, p. 270-276, 1997.

BRUM, J. G. W.; et al.. Flutuação sazonal de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) no município de Pelotas, RS. **Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.**, v. 39, p. 891-896, 1987.

BURROW, H. M.; SEIFERT, G. W., HETZEL, D. J. S. Consequences of selection for weaning weight in zebu, *Bos taurus* and Zebu x *Bos taurus* cattle in the tropics. **Aust. J. Res.**, v. 42, p. 295-307, 1991.

BUSTIN, S.A.; et al. Quantitative real-time RT-PCR- a perspective. **J. Mol. Endocrinol**, v. 34, p. 597-601, 2005.

CAVASSANI, K.A.; et al.. Tick saliva inhibits differentiation, maturation and function of murine bone-marrow-derived dendritic cells. **Immunology**, v. 114, p. 235-45, 2005.

COFFMAN, R.L.; et al. Role of cytokines in the differentiation of CD4<sup>+</sup> T-cell subsets in vivo. **Immunol. Rev.**, v. 123, p. 189, 1991.

DAMERAU, B. Biological activities of complement-derived peptides. **Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.**, v. 108, p. 151-206, 1987.

DAS, S., et al. Salp 16, a gene induced in *Ixodes scapularis* salivary glands during tick feeding. **Am. J. Trop. Med. Hyg**, v. 62, p. 99-105, 2000.

DESSAINT, J. P.; CAPRON, A. R. **Survival strategies of parasites in their immunocompetent hosts**. In: Immunology and molecular biology of parasitic infections, editor: K. S. Warren, p. 87-99. Oxford: Blackwell scientific Publications, 1993.

DOUBE, B. M.; WHARTON, R. H. The effect of locality, breed and previous tick experience on seasonal change in the resistance of cattle to *Boophilus microplus* (Ixodoidea: Ixodidae). **Parientia**, v. 36, p. 1178-1179, 1980.

ELSE, K.J., FINKELMAN, F.D. Intestinal nematode parasites, cytokines and effector mechanisms. **Int. J. Parasitol.**, v. 28, p. 1145-1158, 1998.

ELSE, K.J.; FINKELMAN, F.D.; MALISZEWSKI, C.R. Cytokine-mediated regulation of chronic intestinal helminth infection. **J. Exp. Med.**, v.179, p.347-351, 1994.

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

FIORENTINO, D. F.; et al. IL-10 act on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. **J. Immunol.**, v. 146, p. 3444-3451, 1991.

FONSECA, A. H.; PEREIRA, M. J. S.; MAFRA, C. L. Dinâmica populacional do carrapato *Boophilus microplus* em São Miguel do Anta-MG, BRASIL. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 6, n. 2, supl. 1, p. 121, 1997.

FRISCH, J. E. Towards a permanent solution for controlling cattle ticks. **Int. J. Parasitol.**, v. 29, p. 57-71, 1999.

FRISCH, J. E.; O'NEILL, C. J.; KELLY, M. J. Using genetics to control cattle parasites- the Rockhampton experience. **Int. J. Parasitol.**, v. 30, p. 253-264, 2000.

GAJEWSKI, T.F.; FITCH, F.W. Anti-proliferative effect of IFN-gamma in immune regulation. I. IFN-gamma inhibits the proliferation of Th2 but not Th1 murine helper T lymphocyte clones. **J. Immunol.**, v. 140, p. 4245-52, 1988.

GANAPAMO, F.; RUTTI, B; BROSSARD, M. Cytokine production by lymph node cells from mice infested with *Ixodes ricinus* ticks and the effect of tick salivary gland extracts on IL-2 production. **Scand. J. Immunol.**, v. 44, p. 388-93, 1996.



GANAPAMO, F.; RUTTI, B.; BROSSARD, M. In vitro production of interleukin-4 and interferon- $\gamma$  by lymph node cells from BALB/c mice infested with nymphal Ixodes ricinus ticks. **Immunology**, v. 85, p. 120, 1995.

GASPARIN, G.; et al. **Detection of a QTL associated with tick resistance/susceptibility on bovine chromosome 7 (BTA7) using a F<sub>2</sub> experimental population.** In: 8<sup>th</sup> WORLD CONGRESS ON GENETICS APPLIED TO LIVESTOCK PRODUCTION, 2006, Belo Horizonte, MG, Brasil. Proceedings...CD-ROOM. Belo Horizonte, 4 pp, 2006.

GILLESPIE, R.D.; et al. Identification of an IL-2 binding protein in the saliva of the Lyme disease vector tick, Ixodes scapularis. **J. Immunol.** v. 166, p. 4319-4326, 2001.

GIULIETTI, A.; et al. An overview of real time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. **Methods**, v.25. p.386-401, 2001.

GOMES, A. **Resistência a infestação natural por larvas, ninfas e adultos de Boophilus microplus em vacas zebuínas da raça Gir, em função de sua idade, da gestação, da lactação e da seleção para produção leiteira, com e sem tratamento carrapaticida, ao longo de 12 estações consecutivas de um triênio**, 1992. 90 p. Tese (Doutorado em Ciência) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 1992.

GOMES, A.; et al. Populations of cattle tick (*Boophilus microplus*) on purebred Nellore, Ibage and Nellore x European crossbreds in the Brazilian savanna.

**Trop. Anim. Health Prod.**, v. 21, p. 20-24, 1989.

GONZALES, J. C. **O controle do carrapato do boi**. Porto Alegre: Ed Sulina, 1993.

GRISI, L.; et al. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. **A Hora Veterinária**, Porto Alegre, v.125, p.8-10, 2002

GUANAPAMO, F.; RUTTI, B.; BROSSARD, M. In vitro production of interleukin-4 and interferon- $\gamma$  by lymph node cells from BALB/c mice infested with nymphal *Ixodes ricinus* ticks. **Immunology**, v. 85, p. 120, 1995.

GUARAGNA, G. P; et al. Eficiência reprodutiva do rebanho Antiqueira de Pindamonhagaba. I. Efeito de fatores de meio. **B. Ind. Anim.**, v. 4, p. 33-72, 1988.

GUPTA, P.K.; et al. High nucleotide and amino acid sequence similarities in tumor necrosis factor- $\alpha$  amongst Indian buffalo (*Bubalis bubalis*), Indian cattle (*Bos indicus*) and other ruminants. **Eur. J. Immunogenet.**, v.31, p.89-193, 2004.

GWAKISA, P.; et al. Salivary gland extract of *Rhipicephalus appendiculatus* ticks inhibits in vitro transcription and secretion of cytokines and production of nitric oxide by LPS-stimulated JA-4 cells. **Vet. Parasitol.**, v. 99, p. 53-61, 2001.

HAJNICKÁ, V.; et. al. Manipulation of host cytokine network by ticks: a potential gateway for pathogen transmission. **Parasitol.**, v. 130, p. 333-342, 2005.

HELMBY, H.; GRENCIS, R.K. IFN- $\gamma$ -independent effects of IL-12 during intestinal nematode infection. **J. Immunol.**, v.171, p.3691-3696, 2003.

HENSHALL, J.M. A genetic analysis of parasite resistance traits in a tropically adapted line of *Bos taurus*. **Aust. J. Agric. Res.** V. 55: 1109-1116, 2004.

HUGLI, T. E.; MULLER-EBERHARD, H. J. Anaphylatoxins: C3a and C5a. **Adv. Immunol.**, v. 26, p. 1-53, 1978.

INOKUMA, H.; et al. Effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on the bovine immune system. **Vet. Parasitol.**, v. 47, p. 107-118, 1993.

JANEWAY, C.A.; et al. **Imunobiologia: o sistema imune na saúde e na doença**. 5. ed. Porto Alegre: Artemed. 2002.

KAUFMAN, W. R. Tick-host interactions: a synthesis of current concepts. **Parasitol. Today**, v. 4, p. 47-56, 1989.

KOCÁKOVÁ, P.; et al. Effect of fast protein liquid chromatography fractionated salivary gland extracts from different ixodid tick species on interleukin-8 binding to its cell receptors. **Folia Parasitol.**, v. 50, p. 79-84, 2003.

KOPECKÝ, J.; KUTHEJOLAVA, M.; PECHOVA, J. Salivary gland extract from *Ixodes ricinus* ticks inhibits production of interferon- $\gamma$  by the upregulation of interleukin-10. **Parasite Immunol.**, v. 21, p. 351-356, 1999.

KOTWAL, G. L. The great escape. Immune evasion by pathogens. **The Immunologist**, v. 4, p. 157-164, 1996.

KOVÁŘ, L.; KOPECKÝ, J.; ŘIHOVÁ, B. Salivary gland extract from *Ixodes ricinus* tick polarizes the cytokine profile toward Th2 and suppresses proliferation of T-lymphocytes in human PBMC culture. **J. Parasitol.** v. 87, p. 1342-1348. 2002a.

KOVÁŘ, L.; KOPECKÝ, J.; ŘIHOVÁ, B. Salivary gland extract from *Ixodes ricinus* tick modulates the host immune response towards the Th2 cytokine profile. **Parasitol. Res.** v. 88, p. 1066-1072, 2002b.

LABRUNA, M. B.; LEITE, R. C.; OLIVEIRA, P. R. Study of the weight of eggs from six ixodid species from Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.92, n.2, p.205-7, 1997.

LEBOULLE, G.; et al. Characterization of a novel salivary immunosuppressive protein from *Ixodes ricinus* ticks. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 10083-10089, 2002.

LEMOS, A. M.; et al.. Comparative performance of six Holstein-Friesian x Guzerá grades in Brazil. 3. Burdens of *Boophilus microplus* under field conditions. **Anim. Prod.**, v. 41, n. 2, p. 187-91, 1985.

LEUTENEGGER, C.M; et al. Quantitative real-time PCR for measurement of feline cytokine mRNA. **Vet. Immunol. Immunopathol.** v.71, p.291-305, 1999.

LIEW, F.Y. Th1 and Th2 cells: a historical perspective. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 2, p. 55-60, 2002.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. **Methods**, v.25, p.402-408, 2001.

MADALENA, F. E.; et al. Causes of variation of field burdens of cattle ticks (*B. microplus*). **Rev. Bras. Genet.**, v. 8, p. 361-375, 1985.

MAHONEY, D. F.; ROSS, D. R. Epizootiological factors in the control of bovine babesiosis. **Aust. Vet. J.**, v. 48, p. 292-8, 1972.

MARCONDES, C. B. **Entomologia médica e veterinária**. São Paulo: Ateneu, 2001. p. 263-315, 2001.

MATTIOLI, R. C.; et al. Immunogenetic influences on tick resistance in African cattle with particular reference to trypanotolerant N'Dama (*Bos Taurus*) and trypanosusceptible Gobra zebu (*Bos indicus*) cattle. **Acta Trop**, v. 75, p. 263-277, 2000.

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

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

MEJRI, N.; et al. 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.**, v. 23, p. 61-69, 2001.

MORAES, F. R.; et al. Ecologia de carrapatos XV: suscetibilidade natural comparativa entre taurinos e zebuínos a *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acari, Ixodidae). **Ars Veterinária**, v. 2, p. 45-52, 1986.

MOSMANN, T. R.; MOORE, K. W. The role of IL-10 in crossregulation of Th1 and Th2 responses. **Immunol. Today**, v. 12, p. 49-53, 1991.

MOSMANN, T. R.; SAD, S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. **Immunol. Today**, v. 17, p. 138, 1996.

NITHIUTHAI, S.; ALLEN, J. R. Langerhans cells present tick antigens to lymph node cells from tick sensitized guinea-pigs. **Immunology**, v. 55, p.157-163, 1985.

O'KELLY, J. C.; SPIRES, W. C. Resistance to *Boophilus microplus* (Canestrini) in genetically different types of calves in early life. **J. Parasitol.**, v. 62, p. 312-317, 1976.

OLIVEIRA, G. P.; ALENCAR, M. M. Resistência de bovinos ao carrapato *Boophilus microplus*. I. infestação Artificial. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 22, p. 433-438, 1987.

OLIVEIRA, G. P.; ALENCAR, M. M. Resistência de bovinos de seis graus de sangue Holandes-Guzerá ao carrapato (*Boophilus microplus*) e ao berne

(*Dermatobia hominis*). **Arq Bras. Med. Vet. Zoot.**, v. 42, n. 2, p. 127-135, 1990.

OLIVEIRA, G. P.; ALENCAR, M. M.; FREITAS, A. R. Resistência de bovinos ao carrapato *Boophilus microplus*. II. Infestação Natural. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 24, n. 10, p. 1267- 1271, 1989.

OLIVEIRA, M. C. S. **Avaliação da taxa de infecção por *Babesia bigemina* em bovinos mestiços e em fêmeas e ovos de *Boophilus microplus* provenientes de área endêmica do Estado de São Paulo.** Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootenia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, 2002.

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

PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res.** v.29, n.9, p.2002-2007, 2001.

PFAFFL, M.W.; HORGAN, G.W.; DEMPFLER, L. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Res.**, v. 30, p. 1-10, 2002.



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

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

RAWLINS, S. L. Seasonal variation in the population density of larvae of *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acari: Ixodidae) in Jamaican pastures. **Bull. Entomol. Res.**, v. 69, p. 87-14, 1979.

REGITANO, L. C. A.; et al.. **A QTL for resistance to *Boophilus microplus* maps to bovine chromosome 14**. In: 8<sup>th</sup> WORLD CONGRESS ON GENETICS APPLIED TO LIVESTOCK PRODUCTION, 2006, Belo Horizonte, MG, Brasil. Proceedings... (CD-ROOM), Belo Horizonte, 4 pp, 2006.

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

RIBEIRO, J. M. C. Role of saliva in tick/host interactions. **Exp. Appl. Acarol.**, v. 7, p. 15-20, 1989a.

RIBEIRO, J. M. C. Vector saliva and its role in parasite transmission. **Exp. Parasitol.**, v. 69, p. 104-106, 1989b.

RIBEIRO, J. M. C.; et al. Antihemostatic, antiinflammatory and immunosuppressive properties of the saliva of a tick, *Ixodes dammini*. **J. Exp. Med.**, v. 161, p. 332-344, 1985.

RIBEIRO, J. M. C.; MATHER, T. N. *Ixodes scapularis*: salivary kininase is a metallo dipeptidyl carboxypeptidase. **Exp. Parasitol.**, v. 89, p. 213-221, 1998.

RIEK, R. F. Studies on the reactions of animals to infestation with the tick *Boophilus microplus* (Canestrini). **Aust. J. Agric. Res.**, v. 13, p. 532-50, 1962.

ROZEN, S.; SKALETZKY, H.J. Primer 3 on the WWW for general users and for biologist programmers. **Methods Mol. Biol.** , v. 132, p. 365-86, 2000.

SAS INSTITUTE INC., System for Microsoft Windows, Release 9.1, Cary, NC, USA, 2003 - CD Room.

SCHOELER, G.B.; MANWEILER, S.A.; WIKEL, S.K. *Ixodes scapularis*: effects of repeated infections with pathogen-free nymphs on macrophage and T lymphocyte cytokine responses of Balb/c and C3H/HeN mice. **Exp. Parasitol.**, v. 92, p. 239-248, 1999.

SCHOELER, G.B.; MANWEILER, S.A.; WIKEL, S.K. Cytokine responses of C3H/HeN mice infested with *Ixodes scapularis* or *Ixodes pacificus* nymphs. **Parasite Immunol.**, v. 22, p. 31-40, 2000.

SEDER, R. A.; PAUL, W. E. Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4<sup>+</sup>T cells. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 12, p. 635, 1994.

SEDER, R.A.; PAUL, W.W. Acquisition of lymphokine-producing phenotypes by CD4<sup>+</sup> T cells. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 12, p. 635, 1994.

SEIFERT, G. W. Variations between and within breeds of cattle in resistance to field infestations of cattle tick (*Boophilus microplus*). **Aust. J. Agric. Res.**, v. 22, p. 159-168, 1971.

SOUZA, A. P.; GONZALES; et al. Variação sazonal de *Boophilus microplus* no planalto Catarinense. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 23, p. 627-630, 1988.

SUTHERST, R. W.; et al. The effect of season and nutrition on the resistance of cattle to tick *Boophilus microplus*. **Aust. J. Agric. Res.**, v. 34, p. 329-339, 1983.

SUTHERST, R.W.; WHARTON, R.H.; UTECH, K.B.W. **Guide to studies on tick ecology**. Melbourne: CSIRO, **Aust. Div. Entomol.**, 1978. 59p. Tech. Paper, 14.

TIZARD, I.R. *Imunologia veterinária – uma introdução*. 6 ed. São Paulo: Roca, 2002.

UTECH, K. B. W.; SEIFERT, G. W.; WHARTON, R. H. Breeding Australian illawarra shorthorn cattle for resistance to *Boophilus microplus*. I. Factors affecting resistance. **Aust. J. Agric. Res.**, v. 29, p. 411-422, 1978.

VALENZUELA, J. G.; et al. Purification, cloning, and expression of a novel salivary anticomplement protein from the tick, *Ixodes scapularis*. **J. Biol. Chem.**, v. 275, p. 18717-18723, 2000.

VERÍSSIMO, C. J.; et al. Resistência e suscetibilidade de bovinos leiteiros mestiços ao carrapato *B. microplus*. **B. Ind. Anim.**, v. 54. n. 2, p. 1-10, 1997.

VILLARES, J. B. *Climatologia zootécnica*. III Contribuição ao estudo da resistência e susceptibilidade genética dos bovinos ao *Boophilus microplus*. **Bol. Ind. Anim.**, v. 4, p. 60-86, 1941.

WALDVOGEL, A.S.; et al. Expression of interleukin 4, interleukin 4 splice variants and interferon gamma mRNA in calves experimentally infected with *Fasciola hepatica*. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.97, p.53-63., 2004.

WAMBURA, P. N.; et al. Breed-associated resistance to tick infestation in *Bos indicus* and their crosses with *Bos taurus*. **Vet. parasitol.**, v. 77, p. 63-70, 1998.

WANG, X.; et al. Characterization of mouse interleukin-12 p40 homodimer binding to the interleukin 12 receptor subunits. **Eur. J. Immunol.**, v. 29, p. 2007-2013, 1999.

WENPE, F.; KLEINE, K.; SCHEIT, K.H. Characterization of bovine monocyte chemoattractant protein-1 gene. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 202, n.3, p.1272-1279, 1994.

WHARTON, R. H.; UTECH, K. B. W.; TURNER, H. G. Resistance to the cattle tick, *Boophilus microplus* in a Herd of Australian Illawarra Shorthorn cattle: its assement and heritability. **Aust. J. Agric. Res.**, v. 21, p. 163-181, 1970.

WIKEL, S. K. Effects of tick infestation on the plaque-forming cell response to a thymic dependent antigen. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 79, p. 195-198, 1985.

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

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

WIKEL, S. K.; ALARCON-CHAIDEZ, F. J. Progress toward molecular characterization of ectoparasite modulation of host immunity. **Vet. Parasitol.**, v. 101, p. 275-287, 2001.

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

WIKEL, S. K.; RAMACHANDRA, R. N.; BERGMAN, D. K. Tick induced modulation of the host immune response. **Int. J. Parasitol.**, v. 24, p. 59-66, 1994.

WILKENING, S.; BADER, A. Quantitative real-time polymerase chain reaction: Methodical analysis and mathematical model. **Journal of Biomolecular Techniques**, v.15, p.107-11, 2004.

WILLADSEN, P. Immunity to ticks. **Adv. Parasitol.**, v. 18, p. 293-313, 1980.

WOOD, L.C.; et al. Cutaneous barrier perturbation stimulates cytokine production in the epidermis of mice. **J. Clin. Invest.**, 90, 482-487, 1992.

ZAROS, L. G.; et al. Quantification of bovine cytokine gene expression using real-time rt-pcr methodology. *Genetics and Molecular Biology (IN PRESS)*

