

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

**Vanessa de Almeida Belo**

**EXPRESSÃO DE GENES DA RESPOSTA IMUNE EM BOVINOS  
INFESTADOS COM CARRAPATOS (*Boophilus microplus*)**

Juiz de Fora  
2008

**VANESSA DE ALMEIDA BELO**

**EXPRESSÃO DE GENES DA RESPOSTA IMUNE EM BOVINOS  
INFESTADOS COM CARRAPATOS (*Boophilus microplus*)**

Dissertação de Mestrado do Curso de  
Ciências Biológicas, para obtenção do  
Título de Mestre em Ciências Biológicas  
na área de Genética e Biotecnologia.

**Orientador: Dr. Marco Antônio Machado**

Juiz de Fora  
2008

Belo, Vanessa de Almeida A.

Expressão de genes da resposta imune em bovinos infestados com carrapatos (*Boophilus microplus*) / Vanessa de Almeida Belo; orientador: prof. Dr. Marco Antônio Machado.

57 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora.

1. Imunologia. 2. Carrapatos. 3. PCR quantitativo. 4. citocinas

CDU 57.083.3

**VANESSA DE ALMEIDA BELO**

**EXPRESSÃO DE GENES DA RESPOSTA IMUNE EM BOVINOS  
INFESTADOS COM CARRAPATOS (*Boophilus microplus*)**

Dissertação de Mestrado apresentada à  
Universidade Federal de Juiz de Fora,  
com parte das exigências do Programa  
de Pós-Graduação em Ciências  
Biológicas na área de Genética e  
Biotecnologia, para obtenção do Título  
de Mestre.

APROVADA: 15 de fevereiro de 2008

-----  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Simone E.Facioni Guimarães  
Universidade Federal de Viçosa

-----  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Ana Paula Ferreira  
Universidade Federal de Juiz de Fora

-----  
Dr. Marco Antônio Machado (Orientador)  
Embrapa Gado de Leite - Juiz de Fora

*Dedico esta dissertação àqueles cujo amor, dedicação, honestidade e ética foram  
e sempre serão minha luz e inspiração, meus pais, Isa e Cláudio.*

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Juiz de Fora, pelo investimento na minha capacitação e ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas – Genética e Biotecnologia, pela oportunidade de realizar o curso de mestrado.

Ao Dr. Marco Antônio Machado, pela orientação, incentivo e confiança.

Ao Dr. Mário Luiz Martinez (*in memoriam*), por tudo que representa para pesquisa agropecuária brasileira e por possibilitar a realização deste trabalho.

Aos amigos Robert e Isabela, pela imprescindível ajuda durante a realização deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Genética Molecular Mário Luiz Martinez, pesquisadora Ana Lúcia Campos, Ana Luísa Sousa Azevedo, Karla e Philipe, pelo convívio tão prazeroso, sentirei saudades.

À Prof<sup>a</sup> Simone Eliza Facioni Guimarães, pela possibilidade de realização das análises biomoleculares do experimento e pela participação como membro da minha banca de dissertação.

A Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Paula Ferreira, pela participação como membro em minha banca de dissertação.

Aos meus queridos pais, pelo exemplo de vida, pela presença, incentivo, carinho e apoio incondicional.

Ao Sandro, Mariana e Claudinho, por cada abraço, olhar, sorriso e a certeza de que sempre teremos uns aos outros.

Agradeço a Deus, as dádivas e a presença constante em minha vida.

## RESUMO

Nos países tropicais, as perdas causadas pela infestação de carrapatos em bovinos acarretam um grande impacto no sistema de produção animal. Recentes estudos têm mostrado a importância de fatores genéticos ligados a resistência a carrapato em *Bos taurus indicus* e *Bos taurus taurus* e que as citocinas têm um papel crítico na prevenção ou progressão de doenças. O objetivo desse trabalho foi avaliar os níveis de expressão dos genes IL-10 e IL-4 relacionados ao perfil imunológico Th2 associado à susceptibilidade ao carrapato e os genes IL-2 e IFN- $\gamma$  relacionados ao perfil imunológico Th1 associado à resistência ao parasito. Além destes genes, analisou-se o perfil de expressão do gene TLR-2, importante no processo de reconhecimento de patógenos e os genes IL-8 e TNF- $\alpha$  importantes no processo inflamatório inicial. Seis animais mais resistentes e seis animais mais susceptíveis de uma população F2 de 332 animais, originária do cruzamento de animais F1(½ Holandês: ½ Gir), foram selecionados baseado na contagem de carrapatos e valor genético. Amostras de tecido foram coletadas de pele no 5° e 12° dias após a infestação para extração de RNA total. As PCRs em tempo real foram realizadas usando o gene GAPDH como controle endógeno. Os animais resistentes e susceptíveis apresentaram aumento de expressão do gene IL-10 no 5° ( $p < 0,01$ ) e 12° dias após a infestação ( $p < 0,05$ ). O gene IL-2, nos animais resistentes e susceptíveis, no 5° dia após a infestação não apresentou alteração da expressão sendo que 12° dia, em ambos os grupos de animais, este gene passou a ser mais expresso em relação ao animal controle sugerindo um perfil de resposta imunológica do tipo de Th2 nos animais resistentes e susceptíveis nos primeiros dias após a infestação. O gene IL-4 apresentou uma tendência ao aumento de expressão nos animais resistentes e susceptíveis em relação ao controle, sendo o perfil Th2 sugerido atribuído a IL-10 produzida por linfócitos T regulatórios ( $p > 0,05$ ). O gene TNF- $\alpha$  apresentou aumento de expressão nos animais susceptíveis no 5° dia após a infestação com posterior diminuição no 12° dia após a infestação ( $p < 0,05$ ). Nos animais resistentes não foi observada alteração da expressão deste gene, isto sugere que ele possa estar mais atuante no início do processo inflamatório, logo após a fixação do carrapato. A mesma observação estende-se para o gene IL-8, em que não foi verificada alteração de expressão nos animais resistentes, embora nos animais susceptíveis este gene apresentou diminuição da expressão no 12° dia após a infestação ( $p < 0,05$ ). Quanto ao gene IFN- $\gamma$ , não houve diferença de expressão entre os animais resistentes e susceptíveis, sendo que este gene parece não estar relacionado ao mecanismo de resistência. O gene TLR-2 apresentou diminuição da expressão em ambos os grupos de animais. Estes resultados sugerem que a resposta imune adquirida avaliada neste trabalho não apresenta papel preponderante no mecanismo de resistência e que resposta imune inata poderia está envolvida no mecanismo de resistência ao carrapato. Portanto, avaliação da resposta imunológica horas após a fixação do carrapato poderia nos fornecer resultados mais conclusivos.

**Palavras-chave:** PCR quantitativo; resistentes; susceptíveis; citocinas; IL-2; IL-10; IL-4; IL-8; TNF- $\alpha$ ; IFN- $\gamma$ ; TLR-2.

## ABSTRACT

In tropical countries losses caused by tick infestation in cattle lead to a major impact on animal production systems. Recent studies have shown the importance of genetic factors linked to tick resistance in *Bos indicus* and *Bos taurus* as well as the critical role in the prevention or progression of diseases mediated by cytokines. The aim of this work was to evaluate gene expression of IL-10 and IL-4 in relation to tick susceptibility associated with the Th2 profile and gene expression of IL-2 and IFN- $\gamma$  in relation to tick resistance associated with the Th1 profile. In addition, the expression of TLR-2, important in the process the recognition of pathogens, and TNF- $\alpha$  and IL-8 genes, important in the initial inflammatory process, were evaluated. Six tick-resistant and six tick-susceptible animals from a F2 population of 332 animals, originated from the cross of F1 animals ( $\frac{1}{2}$  Holstein:  $\frac{1}{2}$  Gir), were selected based on tick count and breeding value for tick resistance. Skin biopsies were collected in the 5<sup>th</sup> and 12<sup>th</sup> days after tick infestation. The GAPDH was used as endogenous control to normalize the amount of starting cDNA target in the real-time PCR assay. Both resistant and susceptible animals showed increased gene expression of IL-10 in the 5<sup>th</sup> and 12<sup>th</sup> days after infestation in relation to control animal ( $p < 0.05$ ). The IL-2 gene showed no change of expression in the 5<sup>th</sup> day after infestation for the resistant and susceptible animals. In the 12<sup>th</sup> post infestation, both resistant and susceptible animals showed increased gene expression in relation to control animal. These results suggest an enhancement of Th2 profile through the increase of IL-10 mRNA levels and a possible inhibition of the Th1 pattern in both groups (resistant and susceptible) starting 5 days after infestation and return to normal by day 12. Despite our results suggest the occurrence of the Th2 profile, the susceptible and resistant animals did not show variation on gene expression for IL-4 in relation to control animal. The susceptible animals showed increased expression of TNF- $\alpha$  in the 5<sup>th</sup> day after infestation. However, in the 12<sup>th</sup> day post infestation it was noted a decrease in the gene expression level. The resistant animals showed no change in the expression of this gene in relation to control animals suggesting that TNF- $\alpha$  could be more actively expressed in the early steps of the inflammatory process. Similarly, the resistant animals showed no variation in the expression of IL-8 while the susceptible animals showed increased expression in the 12<sup>th</sup> day post infestation. There were no differences of expression between resistant and susceptible animals in relation to IFN- $\gamma$  what suggests that this gene might not be involved in the resistance mechanism. The TLR-2 gene showed decreased expression in both resistant and susceptible animals ( $p < 0.05$ ). Finally, there was no difference in expression between susceptible and resistant animals in relation to all selected genes in the 5<sup>th</sup> and 12<sup>th</sup> days after infestation. These results suggest that the acquired immunity evaluated in this work might not have preponderant role in the resistance mechanism. The innate immunity might be playing a major role in the bovine tick resistance/susceptibility mechanism in early hours after infestation.

**Keywords:** quantitative PCR; resistant; susceptible; cytokines; IL-2; IL-10; IL-4; IL-8; TNF- $\alpha$ ; IFN- $\gamma$ ; TLR-2.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: RNA total extraído de biópsia de pele de animais susceptíveis no 5º dia após a infestação	23
Figura 2: Curva de dissociação do gene GAPDH	24
Figura 3: Curva de dissociação do gene IL-2	25
Figura 4: Expressão de IL-10 em animais resistentes e susceptíveis vs animal controle no 5º e 12º dias após a infestação	29
Figura 5: Expressão de IL-2 em animais resistentes e susceptíveis vs animal controle no 5º e 12º dias após a infestação	31
Figura 6: Expressão de IL-4 em animais resistentes e susceptíveis vs animal controle no 5º e 12º dias após a infestação	33
Figura 7: Expressão de TNF- $\alpha$ em animais resistentes e susceptíveis vs animal controle no 5º e 12º dias após a infestação	34
Figura 8: Expressão de IL-8 em animais resistentes e susceptíveis vs animal controle no 5º e 12º dias após a infestação	35
Figura 9: Expressão de TLR-2 em animais resistentes e susceptíveis vs animal controle no 5º e 12º dias após a infestação	37

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Seqüências dos primers forward e reverse de cada gene e suas respectivas referências	18
Tabela 2: Animais resistentes e susceptíveis baseados na contagem absoluta de carrapatos transformada para $\ln(\text{contagem} + 1)$	22
Tabela 3: Concentração de primer e temperatura de dissociação (TD) de cada gene analisado	24
Tabela 4: Eficiência (E), Inclinação da Reta (IR) e coeficiente de correlação ( $R^2$ ) das curvas padrão de cada gene analisado	25
Tabela 5: Média dos Cts (AvgCt) e coeficiente de variação (CV) das duplicatas referentes ao animal controle	26
Tabela 6: Número de animais (n), média dos Cts (AvgCt) e coeficiente de variação (CV) para cada grupo de animais e gene no 5º dia e 12º dia após a infestação	27
Tabela 7: Expressão relativa dos genes IL-2, TNF- $\alpha$ , IL-8, IL-10, IL-4 e TLR-2 em animais resistentes no 5º e 12º dias após a infestação	28
Tabela 8: Expressão relativa dos genes IL-2, TNF- $\alpha$ , IL-8, IL-10, IL-4 e TLR-2 em animais susceptíveis no 5º e 12º dias após a infestação	28
Tabela 9: Expressão relativa dos genes IL-2, TNF- $\alpha$ , IL-8, IL-10, IL-4 e TLR-2 em animais resistentes quando comparados com animais susceptíveis no 5º e 12º dias após a infestação	28

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ig E – Imunoglobulina da classe E

Ig G – Imunoglobulina da classe G

Th2 – Linfócitos T helper 2

Th1 – Linfócitos T helper 1

APC – “Antigen Presenting Cell” Célula Apresentadora de Antígeno

IL-1 – Interleucina 1

IL-2 – Interleucina 2

IL-4 – Interleucina 4

IL-5 – Interleucina 5

IL-6 – Interleucina 6

IL-8 – Interleucina 8

IL-9 – Interleucina 9

IL-10 – Interleucina 10

IL-12 – Interleucina 12

IL-13 – Interleucina 13

IFN- $\gamma$  - Interferon gama

MCP – “Monocyte Chemoattractant Protein” Proteína Quimioatraente de Monócitos

TNF- $\alpha$  - “Tumor Necrose Factor alfa” Fator de Necrose Tumoral alfa

TLR – “Toll-Like Receptor” Receptor Toll-Like

PCR – “Polymerase Chain Reaction” Reação em Cadeia da Polimerase

cDNA – “complementary DNA” DNA complementar

RT – “Reverse Transcription” Transcriptase reversa

BLUP – “Best Linear Unbiased Prediction” Melhor Predição Linear Não-Viesada

GAPDH – “Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase” Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

rRNA – “ribossomal RNA” RNA ribossômico

Ct – “Cycle threshold” Ciclo limite

SGE – “Salivary Glandula Extract” Extrato de Glândula Salivar

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1 Carrapato bovino e seu impacto sobre a pecuária .....	2
1.2 Variabilidade da resistência ao carrapato ( <i>Boophilus microplus</i> ) ..	4
1.3 Resposta imune do hospedeiro e mecanismo de evasão do carrapato .....	6
1.4 Escolha dos genes para estudo de expressão por PCR em tempo Real .....	11
2. OBJETIVOS.....	13
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
3.1 Animais experimentais .....	14
3.2 Avaliação para resistência ao carrapato ( <i>Boophilus microplus</i> ) ..	15
3.3 Extração de RNA total e síntese da primeira fita de cDNA.....	16
3.4 RT-PCR em tempo real dos genes IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-10, IL-8 e TLR-2 .....	17
3.5 Análise dos resultados de expressão gênica .....	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
5. CONCLUSÕES .....	38
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	39

## 1 INTRODUÇÃO

Minas Gerais é um dos principais Estados produtores de leite do Brasil, justificando essa posição mais pela área explorada para esse fim que pela produtividade alcançada. As causas para a baixa produtividade nos rebanhos mineiros são várias e, dentre elas, os aspectos de saúde ocupam grande destaque. Os carrapatos têm importância pelas perdas econômicas que ocasionam aos rebanhos, ao Estado e ao País, pelos altos gastos com produtos carrapaticidas, sem que se consiga efetivamente modificar a realidade dessa parasitose que permanece com alta prevalência e incidência (ROCHA, 1996).

Os bovinos estão constantemente ameaçados por lesões e enfermidades causadas por carrapatos que passam um período no animal favorecidas, principalmente, pelo seu ciclo evolutivo. Segundo Honer e Gomes (1990), um bovino infestado com carrapatos, se não for tratado, pode sofrer perdas de 18 a 47 kg de peso/ano, sem considerar os possíveis prejuízos relacionados às doenças por eles transmitidas. Furlong *et al.* (1996) utilizaram fêmeas mestiças Holandês-Zebu e verificaram que a queda da produção de leite por vaca foi de 23%, quando estas estavam com uma média de 105 carrapatos/vaca. O combate a esses parasitas normalmente é feito com produtos químicos que, na grande maioria das vezes, deixam resíduos na carne, no leite e nas fezes, trazendo vários riscos para a saúde humana, além de contaminar o meio-ambiente, causando vários danos à natureza.

Em bovinos, existe variabilidade genética que, se adequadamente identificada, pode contribuir para a sustentabilidade dos sistemas de produção animal. A variação genética existente entre as raças de *Bos taurus* e *Bos indicus*, para as características fenotípicas associadas à resistência ao carrapato, quando analisadas à luz das atuais ferramentas da genética molecular, possibilitam o estudo da expressão de genes que possam ser utilizados para auxiliar a seleção no melhoramento animal que, essencialmente, visa a obtenção de animais economicamente mais produtivos. A identificação dos genes responsáveis por conferir resistência ao carrapato nos animais

e, posterior emprego no melhoramento animal, poderão constituir ferramenta efetiva para o incremento genético da resistência a este parasita, com aumento da produtividade e competitividade da pecuária Nacional. Desta forma, este trabalho propõe o estudo da expressão de genes relacionados à resposta imune em bovinos resistentes e susceptíveis a carrapatos (*Boophilus microplus*).

## 1.1 O CARRAPATO BOVINO E SEU IMPACTO SOBRE A PECUÁRIA

Os carrapatos são aracnídeos hematófagos, sendo divididos em dois grupos principais: os *Argasidae* (pequenos carrapatos) e os *Ixodidae* (grandes carrapatos). Aproximadamente 80% são *Ixodidae* (683 espécies), destacando-se os gêneros *Amblyomma*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Hyalomma*, *Ixodes*, *Rhipicephalus* e *Boophilus* (JONGEJAN, 2004).

A espécie *Boophilus microplus* foi descrita pela primeira vez por Canestrini em 1887, sendo considerada a mais prejudicial para a bovinocultura brasileira (EVANS *et al.*, 2000). *Boophilus microplus* é originário do sudeste da Ásia e têm se espalhado para os trópicos, incluindo a Austrália, leste e sul da África, América Central e América do Sul (JONGEJAN, 2004). No Brasil, sua presença é registrada em todos os Estados devido, principalmente, a condições climáticas ótimas com temperaturas médias anuais superiores a 17°C e índices pluviométricos acima de 500mm (HORN, 1984).

Esta espécie parasita um único hospedeiro levando aproximadamente 3 semanas para completar seu ciclo biológico, preferencialmente no bovino (JONGEJAN, 2004). O ciclo de vida completo é composto por duas fases: parasitária e não parasitária. A fase parasitária ocorre no hospedeiro onde se desenvolvem as larvas, que se transformam em ninfas e estas em adultos, macho ou fêmea. As fêmeas, também chamadas de teleóginas, se alimentam de sangue e, quando bem ingurgitadas, se desprendem do hospedeiro, caindo ao solo, iniciando a fase não parasitária que compreende a postura, de cerca de 2000 a 3000 ovos, embriogênese e, finalmente, a

eclosão das larvas que sobem nas folhas de capim a espera do hospedeiro (VERÍSSIMO, 1996). A larva infectante, ao entrar em contato com o bovino, fixa-se em regiões do corpo do hospedeiro que favorecem seu desenvolvimento, tais como: úbere, mamas, regiões perineal, perianal, vulvar e entrepernas. Essas regiões preferenciais de fixação são determinadas em função da espessura, vascularização e temperatura da pele, bem como pela dificuldade de acesso às lambidas do hospedeiro (WAGLAND, 1978). As larvas de *B. microplus* alimentam-se preferencialmente de plasma, apenas nos momentos que precedem o rápido ingurgitamento das fêmeas, é que o sangue torna-se o principal constituinte alimentar (BENNETT, 1974). Nesta fase, a ingestão de sangue atinge valores em torno de 0,3 a 0,5 mL (SEIFERT, 1970) e a fêmea pode aumentar seu peso em até 200 vezes (KEMP, STONE e BINNINGTON, 1982).

Os problemas causados no bovino pela infestação por carrapatos, como anemia, perda de peso e baixa conversão alimentar (JONSSON, 2004), variam de acordo com a idade do animal, o nível de infestação e se o parasita em questão está atuando como vetor para outras enfermidades (RADOSTIS, GAY e BLODD, 2000). Os carrapatos transmitem uma variedade de microorganismos patogênicos: protozoários, riquetsias, espiroquetas e vírus (JONGEJAN, 2004). O *B. microplus* é o principal vetor do *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* responsáveis por mortes de bezerros ou de animais adultos que não tenham sido expostos ao carrapato (VERÍSSIMO *et al.*, 1996). Essas doenças formam um complexo com o carrapato, conhecido como tristezas parasitárias dos bovinos (TPB).

Devido aos problemas mencionados acima, os carrapatos são responsáveis por perdas econômicas significativas na produção animal, da ordem de bilhões de dólares anualmente (HORN, 1983). Segundo Martinez *et al.* (2004), as infestações por ectoparasitas são responsáveis por perda produtiva da ordem de 26 milhões de arrobas de carne/ano e 4 bilhões de litros de leite/ano. Outro prejuízo causado pelos carrapatos diz respeito à diminuição na qualidade do couro de animais infestados (JONGEJAN, 2004). Vários outros autores descreveram os prejuízos causados pelos carrapatos aos bovinos, podendo ser divididos em biológicos, afetando a produção, ou econômicos, em consequência dos custos das perdas produtivas e do combate a esses parasitos. No Brasil, a sua importância pode ser demonstrada pela afirmação de Leite (1988), de que

“o *B. microplus* está presente em 100% dos rebanhos destinados à produção leiteira da região Sudeste brasileira”.

No Brasil, o combate aos carrapatos é feito principalmente pelo uso de substâncias acaricidas: arsenicais, organofosforados, carbamatos, diamidinase e piretróides. No entanto, verifica-se o aparecimento de cepas resistentes condicionadas principalmente pela intensidade de uso e aplicação incorreta dos produtos (LEITE, 1996). Além disso, essas substâncias são tóxicas, deixam resíduos na carne e no leite, causam poluição ambiental e representam um custo adicional na atividade leiteira (JONGEJAN, 2004).

No mundo inteiro, o interesse por formas alternativas de controle do carrapato vem aumentando, sendo o controle por meio de vacinas um caminho promissor. Atualmente, a imunização é feita utilizando uma proteína de superfície de células do endotélio do estômago de *B. microplus*, a Bm86, que embora ofereça proteção parcial aos bovinos contra futuras infestações pelo parasito, não assegura o grau de proteção desejado, sugerindo a necessidade de mais um antígeno protetor (WILLADSEN *et al.*, 1996). Além disso, há a necessidade de revacinação contínua para manutenção dos níveis séricos efetivos de anticorpos uma vez que estes se mantêm por pelo menos oito semanas (WILLADSEN *et al.*, 1995) e a recomendação atual é aplicar doses de reforços a cada dez ou doze semanas (MARTINEZ *et al.*, 2004).

Assim, novas opções de controle desses parasitos tornam-se imprescindíveis, sendo a seleção de bovinos resistentes integrada à vacinação uma importante alternativa a fim de reduzir os prejuízos causados pelo carrapato bovino.

## **1.2 VARIABILIDADE GENÉTICA DA RESISTÊNCIA AO CARRAPATO (*Boophilus microplus*)**

O mecanismo da resistência aos carrapatos é um fenômeno complexo e ainda pouco compreendido. Riek (1962) descreveu dois tipos de mecanismo: 1) resistência



inata, já presente no animal quando da primeira infestação e 2) resistência adquirida, que começa a ser evidenciado após a exposição do animal a algumas infestações por carrapatos. Vários estudos têm relatado este segundo mecanismo, entre eles os trabalhos de Roberts (1968) e Wagland (1978), cujos resultados de pesquisas mostraram que o nível de resistência dos animais foi maior após repetidas infestações quando comparados com o nível após a primeira infestação.

Em geral, *Bos indicus* é mais resistente às doenças parasitárias do que *Bos taurus*. De acordo com Thiesen (1979) e Lemos (1986), o gado indiano tem convivido há milhares de anos com o carrapato *Boophilus microplus*, ocorrendo provavelmente uma eliminação natural dos animais mais sensíveis, permitindo assim, maiores oportunidades reprodutivas para os animais geneticamente resistentes.

Ao comparar o número de carrapatos encontrados em Zebus com diversas outras raças, Villares (1941) verificou maior resistência dos zebuínos. Apenas 5% do total de carrapatos eram originários de animais Zebus, 7% de raças nacionais ou criolas e 88% de raças européias. Adicionalmente, Utech, Seifert e Wharton (1978) também observaram em rebanhos Zebus grande proporção de animais com alta resistência ao aracnídeo.

Na Austrália, os animais Zebus vêm sendo utilizados intensamente em cruzamentos com raças européias, devido a sua maior resistência aos carrapatos. As diferenças de resistência entre os *Bos taurus* e os animais provenientes do cruzamentos *B. taurus* x *B. indicus* foram demonstrados por Byford, Colditz e Sibbick (1976), com os animais oriundos do cruzamento apresentando, em geral, uma resistência de moderada a alta. Resultados semelhantes foram observados por Utech, Seifert e Wharton (1978), no Australian Milking Zebu (AMZ).

No Brasil, Teodoro *et al.* (1984) estudaram a resistência de touros mestiços (5/8, 3/4 e 7/8 europeu x zebu) sob infestação artificial com carrapatos, e observaram maior proporção de animais 5/8 resistentes ao carrapato, com os 7/8 apresentando menor resistência. Lemos *et al.* (1985) estudando a resistência ao carrapato em novilhas de grupos genéticos variando de 1/4 Holandês x Zebu a Holandês PC, também observaram maior carga parasitária e, conseqüentemente, menor resistência associada ao aumento do grau de sangue europeu.

As estimativas de herdabilidade obtidas por vários autores, variando de 20 a 49% (Hewetson, 1968; Wharton e Utech, 1970; Utech, 1979; Teodoro *et al.*, 1984 e Madalena *et al.*, 1985), sugerem que a seleção para resistência a carrapatos pode ser promissora. Utech e Wharton (1982), em um experimento de seleção na raça Australian Illawarra Shorthorn (AIS), obtiveram ganhos genéticos consideráveis para resistência a carrapatos, demonstrando que a seleção pode ser altamente efetiva.

Rendel (1971) sugeriu a combinação, por meio de cruzamentos, das características de resistência ao carrapato do *Bos indicus* com a alta produtividade de leite e fertilidade do *Bos taurus*. Isto tem ocorrido intensamente nos países tropicais, ficando a Austrália com a maior concentração de trabalhos de seleção nestas populações mestiças.

### **1.3 RESPOSTA IMUNE DO HOSPEDEIRO E MECANISMO DE EVASÃO DO CARRAPATO**

A saliva dos carrapatos contém substâncias anti-coagulantes, anti-plaquetárias e vasodiladoras, sendo responsáveis pela inibição da homeostase do hospedeiro e manutenção do fluxo sanguíneo no local da picada. Além disso, contém fatores que modulam a resposta imune inata e adquirida do hospedeiro (WIKEL, 1997).

Tais respostas são ativadas durante o processo de alimentação dos carrapatos, variando de acordo com a espécie do carrapato e do hospedeiro, e podem ser de três tipos: a) reação de hipersensibilidade tardia: imunidade celular estimulada por alguns antígenos salivares com baixo peso molecular (haptenos) que associam às proteínas da pele do hospedeiro e que, durante exposição subsequente, estimulam uma resposta celular; b) hipersensibilidade cutânea: caracterizada por infiltração de basófilos, mediada por células de Langerhans, com produção de imunoglobulina da classe G (IgG); c) hipersensibilidade do tipo I: ativa a produção de IgE induzindo uma severa inflamação na pele com prurido e dor (SOARES, 2001)

Tais mecanismos imunológicos podem modificar a pele do hospedeiro e, desta forma, o repasto do artrópode é prejudicado. Entretanto, recentes estudos demonstram que moléculas presentes na glândula salivar do carrapato são responsáveis pela modulação ou evasão à resposta imune do hospedeiro. Calreticulina de *Boophilus microplus* foi recentemente clonada e parcialmente caracterizada, sendo expressa em todos tecidos e estágios de desenvolvimento do carrapato (FERREIRA *et al.* 2002). Calreticulinas são proteínas conservadas ligantes de cálcio com uma ampla diversidade de funções biológicas. A presença dessas na saliva de *Amblyoma americanum* induz a produção de anticorpos em humanos expostos à picada desse carrapato (SANDERS *et al.* 1998). Em contraste, bovinos infestados experimentalmente com *Boophilus microplus* não desenvolveram anticorpos contra calreticulina. Imunização de bovino com calreticulina também não induziu resposta IgG (FERREIRA *et al.* 2002).

Adicionalmente, a saliva do carrapato contém altas concentrações de prostaglandinas (BOWMAN, DILLWITH e SAUER, 1996), como E2, detectada nas glândulas salivares de *Boophilus microplus* (DICKINSON *et al.*, 1976). Prostaglandinas E2 e I2 salivares são vasodilatadoras (RIBEIRO, 1995) e inibidoras da agregação plaquetária (CHAMPAGNE e VALENZUELA, 1996). No entanto, a importância destas proteínas na modulação da resposta imune do hospedeiro ao carrapato ainda não está clara. Harris *et al.* (2002) sugerem que prostaglandinas E2 realçam a produção de citocinas pelos Th2 e promovem a diminuição das citocinas características dos linfócitos Th1, além de inibirem a proliferação de linfócitos T.

Proteínas ligantes de Imunoglobulina G estão presentes em extratos de glândula salivar de *Amblyomma variegatum*, *Ixodes hexagonus* e *Rhipicephalus appendiculatus* (WANG e NUTTALL, 1995) e, recentemente, foi observado que glândulas salivares de *Boophilus microplus* expressam um gene similar (DE MIRANDA SANTOS *et al.*, 2004).

Paesen *et al.* (1999) isolaram e clonaram proteínas ligantes de histamina da saliva de carrapato da espécie *Rhipicephalus appendiculatus*. Proteínas ligantes de histamina são, provavelmente, encontradas em todas as espécies de carrapatos (BROSSARD e WIKEL, 2004). Ribeiro (1989) verificou que em animais resistentes, ocorre afluxo de basófilos seguido da liberação de histamina e de outros mediadores da resposta imune promovendo a rejeição do parasito. Outro mecanismo de rejeição foi

citado por Ribeiro e Mather (1998), que observaram uma quinase que cliva bradicidina na saliva de *Ixodes scapularis*, este mediador da resposta imune estimula o processo da dor e prurido podendo induzir a rejeição do parasito pelo hospedeiro.

Todas essas substâncias observadas na saliva do carrapato estão envolvidas na evasão e na modulação da resposta imune pelo parasito a fim de prevenir ou reduzir a resposta do hospedeiro a fatores anti-hemostáticos e outras moléculas essenciais para o sucesso da alimentação (WIKEL e ALARCON-CHAIDEZ, 2001). A alimentação do carrapato induz a resposta do hospedeiro envolvendo células apresentadoras de antígenos (APC), células T, células B, anticorpos, citocinas, sistema complemento, basófilos, mastócitos, eosinófilos e moléculas biorreativas (WIKEL, 1997).

Algumas relações carrapato-hospedeiro são caracterizadas pela aquisição de resistência após repetidas infestações. Essa resistência é caracterizada pela redução na quantidade e no tempo da alimentação, diminuição do número e viabilidade de ovas, além da morte dos carrapatos engurgitados (WIKEL, 1997). Em bovinos, o nível de infestação pode variar, também, de acordo com a raça, sendo que os hospedeiros susceptíveis apresentam uma quantidade maior de parasitas do que hospedeiros de raças resistentes (MATTIOLI *et al.*, 2000). A resistência e a susceptibilidade ao carrapato são características de herdabilidade moderadamente elevadas, no entanto, os genes envolvidos do hospedeiro não estão ainda identificados (KASHINO *et al.*, 2005). Alguns pesquisadores acreditam que a resistência poderia, também, ser mediada por fatores imunes não adaptativos tais como cor da pele, área disponível para infestação ou espessura da pele do animal, entre outros (MATTIOLI, 1998; MELTZER, 1996).

A comparação de hospedeiros susceptíveis e resistentes mostrou que reações cutâneas diferem significativamente no local de injúria. A resposta imune freqüentemente desenvolve com influxo de basófilos e eosinófilos para derme e epiderme, que cerca o local da picada. Tal fato promove hipersensibilidade basófilo cutânea caracterizada pela degranulação destas células com a liberação de histamina (ALLEN, KHALIL e WIKEL 1979), inibindo a salivação e alimentação do carrapato (PAINE, KEMP e ALLEN 1983).

Células de Langerhans fagocitam moléculas salivares do carrapato na epiderme e migram para os linfonodos apresentando estas moléculas para linfócitos do hospedeiro (ALLEN, KHALIL e WIKEL, 1979). Assim, anticorpos são produzidos e, juntamente, com o sistema complemento contribuem para resistência adquirida (WIKEL, 1997). Kashino *et al.* (2005) avaliaram os níveis de anticorpos contra antígenos salivares em bovinos susceptíveis (Holandês) e resistentes (Nelore) e verificaram que após pesadas infestações os níveis de anticorpos IgG1 e IgG2 diminuam nos animais Holandeses, permanecendo inalterados nos animais Nelore, indicando que as infestações com carrapato suprimem a resposta humoral mediada por anticorpos IgG em animais susceptíveis.

Outro grupo de células importantes na resposta imune contra os carrapatos são os linfócitos, considerados elementos chave na regulação e na função efetora do sistema imune, incluindo produção de anticorpos e imunidade mediada por células (BROSSARD e WIKEL, 2004). A ativação de células T antígeno-específicas dispara vias de sinalização para produção de citocinas, diferenciação e proliferação celular (JANEWAY *et al.* 2002), podendo diferenciar-se em células Th1 e Th2 de acordo com as citocinas secretadas. Células Th1 secretam interleucinas (IL)-1, IL-2, IL-8, IL-12, interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) e proteína quimioatraente de monócitos (MCP-1), enquanto células Th2 secretam, preferencialmente, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13 (CHER e MOSMANN, 1987; ELSE e FINKELMAN, 1998). Estas citocinas Th1 e Th2 atuam como sinais imunorregulatórios para geração de resposta imune mediada por células e anticorpos, respectivamente (WIKEL, 1996). Infestação com carrapatos é caracterizada pela redução da resposta de linfócitos do hospedeiro ao estímulo pela concavalina (ConA) resultando em um fenômeno imunossupressivo (BROSSARD e WIKEL, 1997). Em estudos com bovinos, Ramachandra e Wikel (1995) constataram que linfócitos de sangue periférico de *Bos indicus* e *Bos taurus* não infestados apresentaram redução na resposta à ConA quando cultivados com extrato de glândula salivar de *Dermacentor andersoni*.

A análise de citocinas constitui-se em uma poderosa ferramenta para caracterização da resposta imune aos parasitos e outros agentes infecciosos. Os níveis de expressão de IL-4 e IFN- $\gamma$  na pele, linfonodos e baço foram avaliados em

camundongos infestados com carrapatos, demonstrando aumento significativo de IL-4 nestes tecidos enquanto os níveis de IFN- $\gamma$  permaneceram baixos (BROSSARD e WIKEL, 1997). Em estudo com bovinos, Nakata *et al.* (2006) analisaram a concentração de mRNA de citocinas em gado Nelore infestados com *Boophilus microplus* e não infestados. A análise mostrou diminuição da expressão de IL-2 e MCP-1 nos animais Nelore infestados quando comparado com o grupo controle (animais não infestados). Estes estudos sugerem um perfil de resposta imune Th2 com supressão de citocinas pro-inflamatórias características do perfil Th1. Scholer e Wikel (2001) observaram que carrapatos modulam a resposta de linfócitos T resultando diminuição de citocinas Th1 e aumento de citocinas Th2. Brossard e Wikel (2004) sugerem que resposta imune Th2 determina a susceptibilidade do hospedeiro ao carrapato. Esta capacidade de imunomodulação não só facilita alimentação pelo carrapato, mas também torna o hospedeiro menos capaz de responder a agentes infecciosos transmitidos pelo parasito (WIKEL e CHAIDEZ, 2001).

Estudos sugerem que carrapatos possam modular também a produção de citocinas por macrófagos, uma vez que Ramanchandra e Wikel (1992) demonstraram que extrato de glândula salivar de *Dermacentor andersoni* promoveu a diminuição de produção de citocinas TNF- $\alpha$  e IL-1.

Sendo a resposta imune, mediada por células, essencial no mecanismo de resistência, os macrófagos e células dendríticas possuem papel importante no mesmo. Estas células são fundamentais para imunidade natural, mas também se adaptaram a desempenhar um papel central na imunidade adquirida específica. Estes fagócitos apresentam em suas membranas, receptores que reconhecem classes genéricas de moléculas produzidas por vários patógenos, sendo denominados receptores Toll-Like (TLRs) (O' NEIL, 2005). Após o reconhecimento, ocorre a indução de expressão de citocinas pró-inflamatórias que regulam as imunidades inata e adquirida (DOYLE e O' NEIL, 2006). Se os TLRs são pouco ativos, o sistema imune se enfraquece, em contraste, se são superativos, podem levar a doenças como artrite reumatóide e doenças cardiovasculares (O' NEIL, 2005).

Existem 10 tipos de TLRs na espécie humana. O TLR4 reconhece lipopolissacarídeo de bactérias gram-negativas, enquanto TLR1, TLR2 e TLR6

reconhecem lipopeptídeos de bactérias. Os TLRs anti-virais são TLR3 que reconhecem dupla fita de RNA, TLR7 e TLR8 que reconhecem fita simples de RNA e TLR9 que reconhecem motivos CpG presentes em vírus e bactérias. Produtos de fungos e protozoários são reconhecidos pelo TLR2 (DOYLE e O' NEIL, 2006). Cada TLR dispara uma via de sinalização específica, levando a ativação de uma resposta imune específica a um patógeno particular (O' NEIL, 2005). McGuire *et al.* (2005) identificaram e mapearam 10 TLRs em bovinos que ajudarão a elucidar a base genética e os mecanismos imunológicos envolvidos na resistência a doenças.

#### **1.4 ESCOLHA DOS GENES PARA ESTUDOS DE EXPRESSÃO POR PCR EM TEMPO REAL**

Recentes estudos têm mostrado a importância de fatores genéticos ligados a resistência a carrapato em *B. indicus* e *B. taurus* (MATTIOLI *et al.*, 2000) e que as citocinas têm papel crítico na prevenção e na progressão de doenças (KONNAI *et al.*, 2003). Estudos que analisam o seu padrão de expressão e dos genes que elas influenciam são críticos para a compreensão de resistência e desenvolvimento de vacinas contra muitos patógenos.

Como mencionado anteriormente, estudos sugerem que a resistência a carrapatos esteja relacionada à resposta imune mediada por linfócitos Th1 e a susceptibilidade por linfócitos Th2. Portanto, o estudo de genes que codificam citocinas produzidas por estes linfócitos que determinam a imunidade celular ou humoral são importantes no entendimento dos mecanismos de resistência. Deste modo, o nível de expressão de IL-2, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , relacionados à resposta do tipo Th1, foram avaliados, assim como IL-4 e IL-10 que apresentam perfil Th2. Além destas, a IL-8, importante no recrutamento de neutrófilos, foi avaliada.

Outro aspecto importante nos estudos de resistência e susceptibilidade a doenças diz respeito aos mecanismos relacionados à imunidade inata. Esta constitui a

primeira linha de defesa contra organismos invasores, reconhecendo-os e produzindo citocinas, que não apenas induzem inflamação, mas também ativam as células B e T. Os macrófagos são células efetoras da imunidade inata que reconhecem e respondem moléculas associadas a patógenos via TLRs (O'NEIL, 2005).

Em vista da importância da resposta imune inata, estudos que analisam o padrão de expressão de TLRs tornam-se fundamentais, visto que estes são os responsáveis pelo reconhecimento dos antígenos disparando vias de sinalização para produção de citocinas. Dentre os TLRs conhecidos, o TLR-2 reconhece produtos provenientes de fungos e protozoários (DOYLE e O' NEIL, 2006), sendo o protozoário do gênero *Babesia* responsável por uma das principais enfermidades que acometem os bovinos denominada babesiose, na qual os carrapatos atuam como vetores. Desse modo, o estudo da expressão de TLR-2 pode ajudar a elucidar os mecanismos imunes relacionados à resistência a carrapatos.



## 2 OBJETIVOS

**Geral:** Estudar a expressão de genes relacionados à resposta imune em bovinos resistentes e susceptíveis submetidos à infestação com carrapatos (*Boophilus microplus*).

**Específicos:**

- 1) Estudar a expressão de genes relacionados à resposta imune (IL-2, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-10, IL-8 e TLR-2) em animais susceptíveis e resistentes ao carrapato provenientes da população F2 oriunda do cruzamento entre touros da raça Holandesa e vacas Gir;
- 2) Avaliar o perfil de expressão dos genes selecionados nos animais F2 em relação ao animal controle, não submetido à infestação;
- 3) Avaliar o perfil de expressão dos genes em estudo no 5º e 12º dia após a infestação nos grupos de animais resistentes e susceptíveis;

## **3 MATERIAS E MÉTODOS**

### **3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS**

Os animais experimentais, da geração F2, são provenientes dos cruzamentos entre animais F1 (Holandês x Gir). Os animais F1 foram produzidos por meio do cruzamento de Holandês com Gir. Para tanto, foram utilizadas 28 fêmeas Gir (em trabalho de superovulação e transferência de embriões) inseminadas com sêmen de quatro touros da raça Holandesa, produzindo um total de 150 animais F1. Destes 150 indivíduos F1 (machos e fêmeas), apenas 4 machos foram escolhidos baseados no vigor para serem pais da geração F2. Sessenta e oito fêmeas F1 foram acasaladas com quatro touros F1, constituindo quatro famílias, evitando-se o parentesco entre o reprodutor e as fêmeas a ele designadas. Cada uma das famílias de touro produziu, por meio da superovulação e transferência de embriões, cerca de 85 animais F2. No total foram obtidos 332 indivíduos F2.

Os 332 animais da população F2 foram avaliados quanto à resistência aos carrapatos, onde foram selecionados seis animais mais resistentes e seis animais mais suscetíveis ao carrapato com base na contagem do número total de carrapatos (valor fenotípico) e valor genético. Este foi estimado a partir da metodologia denominada BLUP desenvolvida por Henderson (1963) na qual é baseia-se na combinação de informações disponíveis do próprio animal, dos ancestrais e colaterais e da progênie do mesmo. Agregando-se informações de parentes aos dados de cada animal, pode-se melhorar a confiabilidade da avaliação.

Durante coleta das amostras de tecido de pele, foi realizada tricotomia de aproximadamente 10 cm de diâmetro na região caudal lateral dos animais. Após este procedimento, a área foi limpa com água e biópsias de cerca de 8 mm foram retiradas no 5º e 12º dias após infestação, etiquetadas, imersas em RNAlater e armazenadas a

temperatura de -20 C° até o momento da extração do RNA. Os animais permaneceram em avaliação até o 21° dia, quando foram contadas as fêmeas semi-ingurgitadas, de 4,5 a 8,0 mm de diâmetro.

O animal utilizado como controle, foi um recém-nascido da geração F2. Para impedir o contato natural com o parasita este foi mantido em local reservado com piso de cimento. Amostra de tecido de pele do mesmo foi coletada de acordo com os procedimentos mencionados acima.

### **3.2 AVALIAÇÃO PARA A RESISTÊNCIA AO CARRAPATO (*Boophilus microplus*)**

A avaliação absoluta foi utilizada para determinar o nível de resistência de cada animal. Esta avaliação foi feita pela contagem das teleóginas que completaram seu ciclo após a infestação artificial com um número conhecido de larvas. Dada a importância da precisão na avaliação dessa resistência, foram feitas infestações artificiais por animal com 20.000 larvas cada, e as contagens sendo feitas no dia modal de queda dos carrapatos, que, de acordo com a literatura, ocorre no 21° dia após a infestação (WHARTON E UTECH, 1970).

As larvas foram preparadas no Laboratório de Parasitologia da Embrapa Gado de Leite, incubando-se um grama de ovos por frasco (equivalente a 10.000 larvas). Dois frascos contendo as larvas infectantes foram inseridos em um colar adaptado colocado na região cervical do animal, de modo que as larvas atingissem ambos os lados do corpo. Rapidamente as larvas se deslocaram e o colar foi removido em duas horas.

Os animais foram avaliados em grupos contemporâneos, na idade de 10 a 14 meses, em torno de 20 a 30 animais por grupo e mantidos a pasto, desde a infestação até a contagem, totalizando 21 dias. As infestações foram feitas preferencialmente durante a primavera, verão e outono, épocas em que a confiabilidade e a repetibilidade das contagens são maiores (UTECH *et al.*, 1978).

Foram contadas as fêmeas semi-ingurgitadas, de 4,5 a 8,0 mm de diâmetro, de um lado do animal, multiplicando-se o resultado por dois para se obter o número total de carrapatos por animal. As contagens foram realizadas pela manhã, até aproximadamente 9 horas, quando a maioria dos carrapatos se desprendem dos animais.

### 3.3 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL E SÍNTESE DA PRIMEIRA FITA DE cDNA

A amostra de tecido (pele) foi removida do RNAlater e o excesso de líquido drenado usando uma pinça. A seguir, foi pesada a quantidade de tecido a ser utilizada, aproximadamente 160 mg. O tecido foi rompido e homogeneizado utilizando o aparelho TissueRuptor (Qiagen Hilden, Germany) na presença de tampão de lise durante 15-90 segundos. Após o preparo da amostra, o RNA total foi extraído utilizando RNeasy Fibrous Tissue Midi Kit (Qiagen Hilden, Germany) respeitando as instruções do fabricante. O RNA total foi quantificado em espectrofotômetro a 260 nm e sua integridade verificada em gel de agarose 2% (v/v). Para verificar a presença de contaminação, principalmente por proteínas, observou-se a relação  $A_{260}/A_{280}$ , que deve estar entre 1,8 e 2.

A primeira fita de cDNA foi sintetizada utilizando o kit SuperScript® III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), em que foram adicionados 1 µL oligo(dT)<sub>20</sub> (50 µM) e 1 µL de *Anneling Buffer* à 5 µL de RNA total, obtendo um volume final de 8 µL. A reação foi incubada a 65°C durante 5 minutos e, posteriormente, em gelo por 1 minuto.

Em seguida, foram adicionados 10 µL de *2X First-Strand Reaction Mix* e 2 µL de *SuperScript III/RNaseOUT Enzyme Mix* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). A reação foi incubada à temperatura de 50°C durante 50 minutos e a 85°C por 5 minutos para inativação enzimática, sendo, então, resfriada no gelo.

O cDNA produzido foi quantificado e armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento da reação de PCR em Tempo Real.

### **3.4 RT-PCR EM TEMPO REAL DOS GENES IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-8, IL-10 E TLR-2**

Os *primers* utilizados neste estudo foram sintetizados pela Integrated DNA Technologies (Coralville, IA, USA) (Tabela 1).

Tabela 1. Sequências dos *primers forward* e *reverse* de cada gene e suas respectivas referências.

Gene	Primer	Sequência (5' - 3')	Referência
IL-2	F	GGATTTACAGTTGCTTTTGGAGAAA	Leutenegger <i>et al.</i> , 2000
	R	GCACTTCCTCTAGAAGTTTGAGTTCTT	
IFN-gama	F	TGGATACATCAAGCAAGACATGTT	Leutenegger <i>et al.</i> , 2000
	R	ACGTCATTCATCACTTTCATGAGTTC	
TNF-alfa	F	TCTTCTCAAGCCTCAAGTAACAAGT	Leutenegger <i>et al.</i> , 2000
	R	CCATGAGGGCATTGGCATAAC	
IL-10	F	CCAAGCCTTGTCGGAAATGA	Moussay <i>et al.</i> , 2006
	R	GTTCACGTGCTCCTTGATGTCA	
IL-4	F	CATGCATGGAGCTGCCTGTA	Waldvogel <i>et al.</i> 2000
	R	AATTCCAACCCTGCAGAAGGT	
TLR-2	F	GGCAACAGAGACCTGCAGAG	Mc Guire <i>et al.</i> , 2005
	R	ACTTTCATCGGTGAATTGCAC	
GAPDH	F	GGCGTGAACCACGAGAAGTATAA	Leutenegger <i>et al.</i> , 2000
	R	CCCTCCACGATGCCAAAGT	
$\beta$ -actina	F	AGCAAGCAGGAGTACGATGAGT	Robinson <i>et al.</i> , 2007
	R	ATCCAACCGACTGCTGTCA	
18S rRNA	F	GTAACCCGTTGAACCCCAT	Robinson <i>et al.</i> , 2007
18S rRNA	R	CCATCCAATCGGTAGTAGCG	

Os genes gliceraldeído 6-fosfato desidrogenase (GAPDH),  $\beta$ -actina e 18S rRNA foram testados a fim de avaliar o melhor controle endógeno, sendo que este deve apresentar níveis de expressão inalterados com o tratamento e expressos em todos os tecidos.

As reações de PCR em tempo real foram realizadas utilizando o kit iTaq SYBR Green Supermix With ROX (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) seguindo as instruções do fabricante. Neste Kit estão incluídos todos os componentes para realização das reações de PCR: 2X reaction buffer, 0,4 mM dATP, 0,4 mM dGTP, 0,8 mM dUTP, iTaq DNA

polymerase (50 units/mL), 6 mM Mg<sup>+2</sup>, SYBR Green I dye, 1 μM ROX, exceto o par de *primers* e cDNA. As reações constaram de 12,5 μL desse mix, 5 μL de cDNA, 100, 200 ou 400 nM de *primer* e água, totalizando um volume final de 25 μL. Antes da quantificação em tempo real, as reações de PCR foram otimizadas para todos os genes. Para tanto, foram testadas três quantidades de cDNA (50, 100 e 200 ng) e três diluições de *primer* (100, 200 e 400 nM). As condições de amplificação para todos os sistemas foram: 95°C durante 3 minutos para ativação da *Taq* polimerase; 40 ciclos de desnaturação a 95 °C durante 15 segundos; e anelamento e extensão a 60°C durante 60 segundos. Após 40 ciclos de amplificação todas as amostras foram submetidas à análise da curva de dissociação, a fim de validar a ausência de produtos não específicos e dímeros de *primers*. As amostras foram aquecidas com incremento de 1°C durante 30 segundos, partindo de 60°C até atingir o limite de 94°C.

Após a determinação das melhores condições para a reação de PCR, obteve-se a curva padrão para cada gene, em que diluições seriadas de cDNA (10, 20, 40 ng/μL) foram plotadas contra seus respectivos Ct para cálculo da eficiência de PCR, já que na quantificação relativa é necessário que a eficiência de amplificação do alvo e do controle endógeno seja aproximadamente igual. A inclinação da reta foi calculada a partir de regressão linear simples e posteriormente foi calculado o coeficiente de correlação de Pearson. O valor de inclinação da reta foi empregado na fórmula:  $E = 10^{-1/\text{slope}}$ , E = 1, não houve replicação e E = 2, replicação máxima.

Cada amostra foi feita em duplicata em placas ópticas de reação de 96 poços (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), seladas com filme adesivo óptico (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e amplificadas no *ABI Prism 7300 Sequence Detection Systems* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Cada gene alvo foi amplificado em poços diferentes, uma vez que o corante utilizado foi o SBYR Green.

### 3.5 ANÁLISE DOS RESULTADOS DE EXPRESSÃO GÊNICA

Os dados de expressão gênica foram expressos como valores de Ct (*cycle threshold*), que corresponde ao ciclo em que cada curva de amplificação atravessa o limiar de detecção, servindo como base para comparação entre amostras. O limiar de detecção (*threshold*) é estabelecido pelo usuário ao analisar uma corrida em tempo real. Serve como ponto de referência, em que todas as amostras possuem a mesma intensidade fluorescente, teoricamente correspondente à mesma quantidade de produto de PCR. O *threshold* deve ser posicionado na região de amplificação exponencial ou geométrica das curvas de amplificação onde a eficiência de PCR é maior.

A quantificação relativa foi baseada no método descrito por Pfaffl, Horgan e Dempfle (2002), que utiliza o seguinte modelo matemático que inclui correção da eficiência de PCR:

$$\text{Quantidade Relativa} = \frac{(E_{\text{alvo}})^{\Delta CT_{\text{alvo}} (\text{controle} - \text{amostra})}}{(E_{\text{Ref}})^{\Delta CT_{\text{Ref}} (\text{controle} - \text{amostra})}}$$

Onde:

$E_{\text{alvo}}$  = Eficiência da reação de PCR dos genes alvo (IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-10 e TLR-2).

Controle = animal naive.

Amostra = animais resistentes.

$E_{\text{Ref}}$  = Eficiência da reação de PCR do gene controle endógeno.

Após a obtenção dos resultados foi usado o software REST<sup>®</sup> disponível em <http://www.wzw.tum.de/gene-quantification/> que utiliza o modelo estatístico *Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test*<sup>®</sup> para comparar a diferença de expressão entre o animal controle (*naive*) e o grupo dos animais expostos à infestação.



Este modelo estatístico tem a vantagem de não assumir nenhum tipo de distribuição e de se adequar a dados cuja variância pode ser grande, não sendo possível aplicar nenhum tipo de teste paramétrico. Este programa foi desenvolvido com base em testes de permutação, os quais consideram os resultados obtidos a partir de permutações aleatórias dos dados do experimento, sendo realizado da seguinte maneira: uma estatística de teste é calculada para os dados experimentais, então os dados são permutados (rearranjados) repetidamente e a estatística de teste é calculada para cada uma das permutações resultantes. Observa-se que o número de permutações necessárias para a realização deste teste cresce rapidamente com o aumento do tamanho da amostra impossibilitando a obtenção de todas elas, portanto no presente trabalho, foram consideradas 2000 permutações, o mínimo recomendado de acordo com Pfaffl *et al.* (2002), suficiente para obtenção de boa estimativa do valor de  $p$  ( $EP < 0,005$  quando  $p = 0,05$ ). A proporção desses dados permutados que têm o diferencial da taxa de expressão com valores maiores ao valor dos resultados obtidos experimentalmente fornece o valor de  $p$ . Se essa proporção for pequena, então há evidência de que o efeito observado no tratamento não é simplesmente resultado do acaso, resultando em valores de  $p$  menores, ou seja, mais significativos.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram avaliados 332 animais da população F2 para resistência ao carrapato por meio da contagem do número de parasitos após 21 dias da infestação, sendo esta contagem transformada em Ln (contagem +1). Dos 332 animais avaliados foram selecionados seis animais mais susceptíveis e seis animais mais resistentes baseados nos valores do Ln (contagem + 1) (Tabela 2) e valor genético.

Tabela 2. Animais resistentes e susceptíveis baseados na contagem absoluta de carrapatos transformada para Ln (contagem + 1). ID – identificação do animal; F – feminino; M – masculino.

<b>Grupo</b>	<b>ID</b>	<b>Sexo</b>	<b>Contagem absoluta</b>	<b>Ln (Contagem + 1)</b>
Resistente	00604	F	1	0,69
	00606	F	9	2,30
	00800	F	8	2,19
	01802	F	2	1,10
	02716	F	9	2,30
	02813	F	14	2,71
Susceptível	01639	F	75	4,33
	01728	F	27	3,26
	02635	F	104	4,65
	02668	F	92	4,53
	02748	F	132	4,89
	02752	M	132	4,89

O RNA total extraído de biópsias de pele dos animais selecionados para o estudo apresentou concentração média de 126 ng/ $\mu$ L e relação 260/280 entre 1,8 e 2,0. O RNA total após extração manteve-se íntegro uma vez que foi possível observar

as bandas referentes ao RNA 18S e 28S (Figura 1). O cDNA obtido apresentou concentração média de 943 ng/ $\mu$ L.

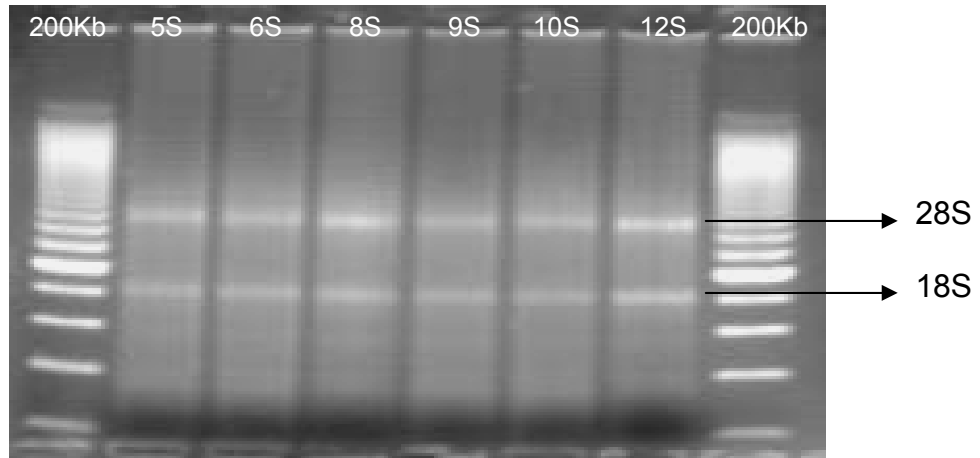


Figura 1. RNA total extraído de pele de animais susceptíveis no 5º dia após a infestação. Setas indicam os ribossomos 28S e 18S.

A quantidade de cDNA para amplificação foi otimizada em 200 ng para todos os genes, a concentração ideal de *primer* e temperatura de dissociação para cada gene estão descritas na Tabela 3. O controle endógeno escolhido para normalização das amostras foi o GAPDH, pois apresentou menor variação de Ct entre as amostras submetidas à infestação e o animal controle. É importante que a expressão do gene controle endógeno não seja influenciada pelo tratamento, no caso, infestação artificial com carrapatos. As análises das curvas de dissociação dos genes alvo e do controle endógeno mostraram não haver picos referentes a dímeros de *primers* ou produtos inespecíficos. A ausência destes constitui-se condição para estudos de expressão quando se utiliza o corante Sybr Green, pois este se liga a qualquer dupla fita de DNA podendo ocasionar valores superestimados de expressão. Exemplos destas curvas de dissociação podem ser vistos nas Figuras 2 e 3.

Tabela 3. Concentração de *primer* e temperatura de dissociação (TD) de cada gene analisado.

Gene	Primer (nM)	TD (°C)
IL-2	100	77,1°C
TNF- $\alpha$	200	82,8°C
IL-8	200	77,1°C
IL-10	200	80,4°C
IL-4	100	79,4°C
TLR-2	200	78,4°C
IFN- $\gamma$	400	72,7°C
GAPDH	100	82,5°C

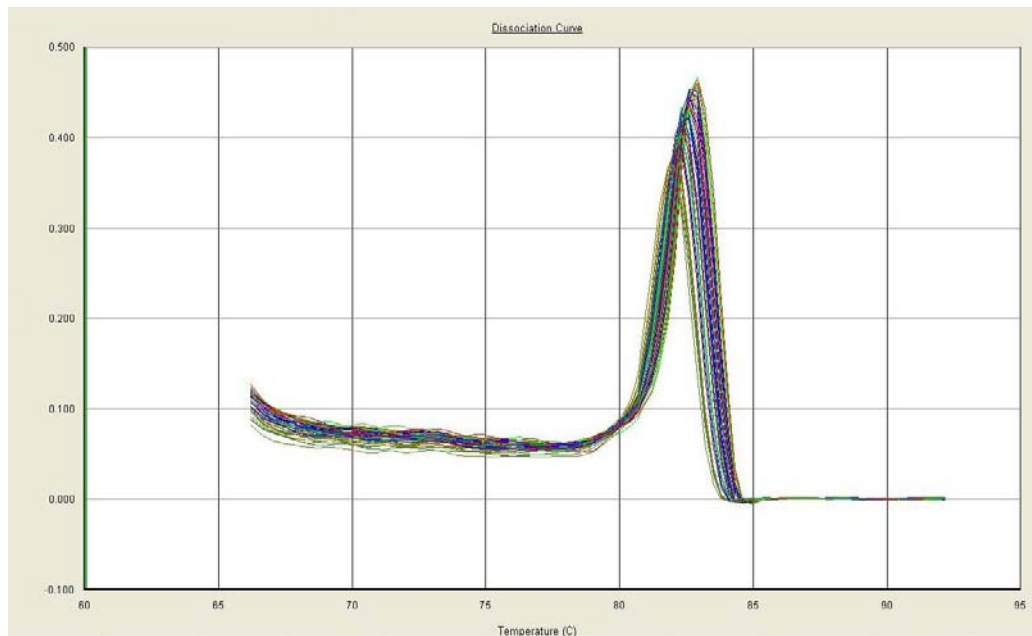


Figura 2. Curva de dissociação do gene GAPDH.



Figura 3. Curva de Dissociação do gene IL-2.

A curva padrão construída utilizando as condições definidas após a otimização permitiu o cálculo da eficiência de PCR de cada gene. Nenhuma das reações de PCR alcançou eficiência máxima, os genes IL-10 e IFN- $\gamma$  apresentaram a maior (1,79) e menor (1,23) eficiência de PCR, respectivamente. A Tabela 4 mostra a eficiência de PCR de cada gene, assim como o valor de inclinação da reta e coeficiente de correlação de cada regressão linear obtida da curva padrão.

Tabela 4. Eficiência (E), Inclinação da reta (IR) e coeficiente de correlação (r) das curvas padrão de cada gene analisado.

<b>Gene</b>	<b>E</b>	<b>IR</b>	<b>r</b>
IL-2	1,31	-8,42	0,99
TNF- $\alpha$	1,47	-6,01	0,96
IL-8	1,70	-4,36	1,00
IL-10	1,79	-3,94	0,75
IL-4	1,42	-6,62	1,00
TLR-2	1,60	-4,91	0,99
IFN- $\gamma$	1,23	-11,09	0,98
GAPDH	1,37	-7,33	0,98

O coeficiente de variação das médias de Ct das duplicatas de cada amostra não ultrapassou 5%. Entretanto, valores maiores que 5% foram observados em relação às médias obtidas entre as amostras de cada grupo (resistentes e susceptíveis) no 5° e 12° dias após a infestação, sendo os maiores coeficientes de variação atribuídos ao gene TLR2 em animais expostos à infestação (Tabelas 5 e 6).

Tabela 5. Média dos Cts (AvgCt) e coeficiente de variação (CV) das duplicatas referentes ao animal controle.

<b>Gene</b>	<b>AvgCt</b>	<b>CV%</b>
IL-2	33,8	4,1
IL-10	31,3	0,3
IL-4	35,1	2,9
IL-8	28,2	1,3
TNF- $\alpha$	30,3	0,4
IFN- $\gamma$	-	-
TLR-2	29,6	0,1
GAPDH	19,0	0,9

(-) não houve amplificação.

Tabela 6 Número de animais (n), média dos Cts (AvgCt) e coeficiente de variação (CV) para cada grupo de animais e gene no 5º dia e 12º dia após a infestação.

Gene	Grupo de Animais	n	AvgCt		CV(%)	
			5ºdia	12ºdia	5ºdia	12ºdia
IL-2	Resistentes	6	35,5	33,0	5,7	4,0
	Susceptíveis	6	34,1	33,4	3,1	4,2
IL-10	Resistentes	6	29,7	29,5	4,0	3,5
	Susceptíveis	6	29,0	30,3	2,9	4,6
IL-4	Resistentes	6	34,8	34,5	3,1	3,2
	Susceptíveis	6	33,9	34,1	2,7	3,6
IL-8	Resistentes	6	29,8	4,0	30,2	3,4
	Susceptíveis	6	28,7	7,7	31,3	4,0
TNF- $\alpha$	Resistentes	6	29,9	5,0	29,2	3,7
	Susceptíveis	6	29,0	3,3	29,6	5,0
IFN- $\gamma$	Resistentes	6	34,1	3,3	33,6	4,1
	Susceptíveis	6	33,0	3,0	33,3	4,2
TLR-2	Resistentes	6	36,6	33,4	12,2	6,3
	Susceptíveis	6	33,2	35,2	7,3	7,8
GAPDH	Resistentes	6	20,0	5,1	19,7	4,5
	Susceptíveis	6	19,4	1,7	20,2	5,0

Foram realizados seis tipos de comparações: I) Animais Resistentes - 5º dia após infestação vs Controle; II) Animais Susceptíveis - 5º dia após infestação vs Controle; III) Animais Resistentes - 12º dia após infestação vs Controle; IV) Animais Susceptíveis - 5º dia após infestação vs Controle; V) Animais Resistentes vs Animais Susceptíveis - 5º dia após infestação; VI) Animais Resistentes vs Animais Susceptíveis - 12º dia após infestação.

As Tabelas 7, 8 e 9 apresentam as expressões relativas de todos genes avaliados nos animais resistentes e susceptíveis no 5º dia e 12º dia após a infestação com carrapatos.

Tabela 7 Expressão relativa dos genes IL-2, TNF- $\alpha$ , IL-8, IL-10, IL-4 e TLR-2 em animais resistentes no 5º e 12º dias após a infestação comparados ao animal controle.

Genes	Expressão Relativa	
	5º dia	12º dia
IL-2	0,852	1,571
TNF- $\alpha$	1,564	1,927
IL-8	0,577	0,428
IL-10	3,214	3,489
IL-4	1,46	1,502
TLR-2	0,048	0,204

Tabela 8 Expressão relativa dos genes IL-2, TNF- $\alpha$ , IL-8, IL-10, IL-4 e TLR-2 em animais susceptíveis no 5º e 12º dias após a infestação comparados ao animal controle.

Genes	Expressão Relativa	
	5º dia	12º dia
IL-2	1,043	1,648
TNF- $\alpha$	1,911	1,901
IL-8	0,844	0,280
IL-10	4,231	2,511
IL-4	1,648	2,037
TLR-2	0,208	0,103

Tabela 9 Expressão relativa dos genes IL-2, TNF- $\alpha$ , IL-8, IL-10, IL-4 e TLR-2 em animais resistentes quando comparados com animais susceptíveis no 5º e 12º dias após a infestação

Genes	Expressão Relativa	
	5º dia	12º dia
IL-2	0,817	0,953
TNF- $\alpha$	0,819	1,014
IL-8	0,684	1,530
IL-10	0,760	1,389
IL-4	0,870	0,738
TLR-2	0,233	1,980
IFN- $\gamma$	0,937	0,809

Analisando a expressão relativa do gene IL-10 no 5º dia após a infestação, observa-se que os animais resistentes e susceptíveis expressaram 3,214 e 4,231 mais este gene quando comparados ao animal controle ( $p < 0,01$ ). A expressão aumentada



manteve-se no 12º dia após a infestação quando os animais resistentes apresentaram expressão 3,489 vezes maior e os animais susceptíveis 2,511 vezes maior quando comparados ao animal controle ( $p < 0,05$ ). Não houve diferença de expressão entre os grupos de animais (resistentes e susceptíveis) no 5º e no 12º dias após infestação ( $p > 0,05$ ).

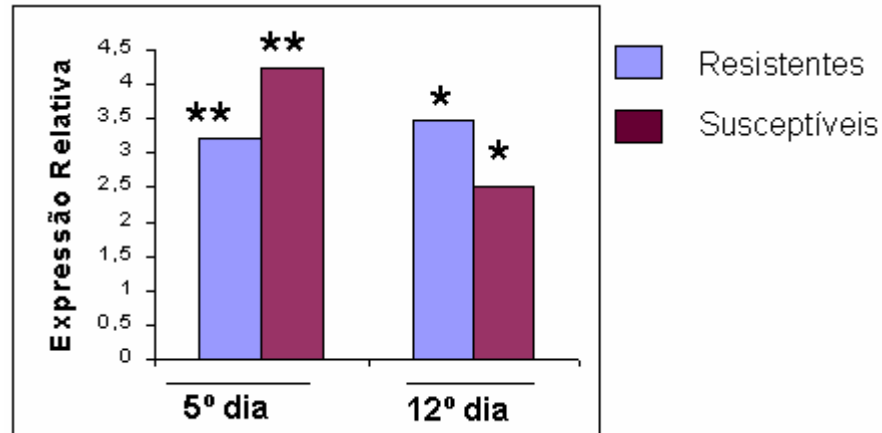


Figura 4 Expressão de IL-10 em animais resistentes e susceptíveis vs animal controle no 5º e 12º dias após a infestação (\*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$ ).

Estudos recentes têm demonstrado que a IL-10 é produzida, principalmente, por linfócitos T regulatórios (TAYLOR *et al.*, 2006) e apresenta características inibitórias e modulatórias nas respostas alérgicas mediadas por linfócitos Th2 assim como nas respostas celulares mediadas por linfócitos Th1 (AKDIS *et al.*, 2004). Estudos relatam que esta citocina é capaz de inibir células *Natural Killer* (BARRAL-NETO *et al.*, 1995), produção de IL-1 e TNF- $\alpha$  por macrófagos (FIORENTINO, ZLOTNIK e VIEIRA, 1991) e IFN- $\gamma$  e IL-2 por linfócitos Th1 (MOSMANN e MOORE, 1991). Além disso, muitos estudos têm demonstrado que os carrapatos modulam a resposta imune do hospedeiro favorecendo a resposta do tipo Th2, com produção, preferencialmente, de citocinas IL-4 e IL-10, em detrimento da resposta do tipo Th1, com produção de citocinas IL-2 e IFN- $\gamma$ , preferencialmente (WIKEL, 1997; WIKEL e ALARCON-CHAIDEZ, 2001 e BROSSARD e WIKEL, 2004). Portanto, nossos achados sugerem que o aumento de expressão de IL-10 possa ser atribuído à capacidade dos carrapatos em modular a resposta imune dos hospedeiros.

Em um estudo *in vitro*, Kopecky, Kuthejlova e Pechová (1999) verificaram aumento da produção de IL-10 em esplenócitos de camundongos tratados com extrato de glândula salivar de *Ixodes ricinus*, sendo este aumento responsável pela inibição da produção de IFN- $\gamma$ . Em nosso trabalho, não foi possível fazer tal associação, uma vez que houve expressão de IFN- $\gamma$  nos animais expostos ao carrapato, não sendo detectada expressão do mesmo no animal controle. Embora as espécies de carrapato e hospedeiro sejam diferentes, os trabalhos concordam que os ectoparasitos promovem o aumento de IL-10 nos hospedeiros.

Neste estudo, observou-se que os animais resistentes e susceptíveis, no 5º dia após a infestação, não apresentaram aumento na expressão de IL-2 ( $p>0,05$ ) (Figura 5). Isto sugere que os altos níveis de IL-10 possam ter suprimido a expressão de IL-2 nos primeiros dias de infestação. A diminuição de IL-2 é observada no desenvolvimento de anergia na qual verifica-se ausência de resposta imune a um antígeno em particular, este estado “hiporesponsivo” pode ser atribuído a IL-10 que afeta a capacidade de células apresentadoras de antígeno em estimular clones de linfócitos T (LAMB *et al.*, 1983). No entanto, no 12º dia após a infestação, observou-se aumento na expressão de IL-2 nos animais resistentes e susceptíveis, 1,9 vezes mais em relação ao animal controle, ( $p<0,05$ ) (Figura 5), embora a expressão de IL-10 permanecesse alta. Não houve diferença de expressão entre os grupos de animais (resistentes e susceptíveis) no 5º e 12º dias após infestação ( $p>0,05$ ). Estes resultados corroboram os achados de Zeidner (1997), que observou supressão de IL-2 em camundongos nos primeiros quatro dias após a infestação com carrapatos com retorno ao normal com 12 dias de infestação. No mesmo estudo foi observado que IL-10, no 10º dia após a infestação, apresentou aumento de 450% em relação aos camundongos controle.

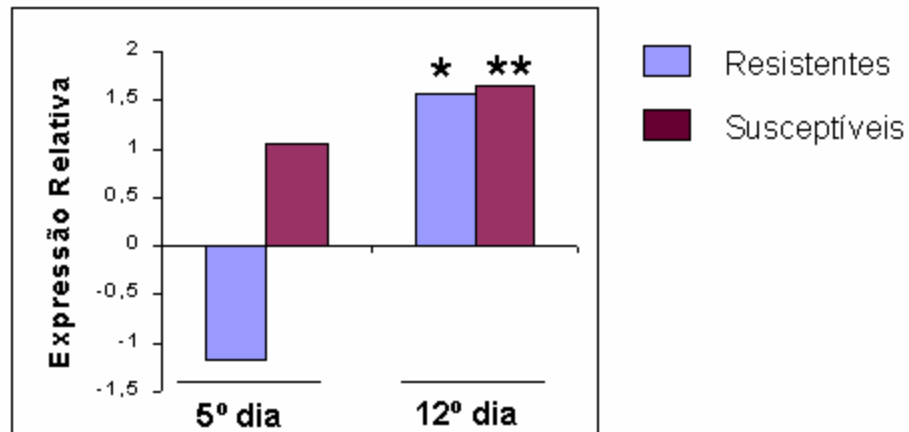


Figura 5 Expressão de IL-2 em animais resistentes e susceptíveis vs animal controle no 5º e 12º dias após a infestação (\*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$ ).

A supressão de IL-2 pode ser motivada, também, por componentes na saliva do carrapato tais como as prostaglandinas  $E_2$ , que inibem a produção desta citocina por linfócitos T (HARRIS *et al.*, 2002). Um estudo demonstrou que saliva de *Boophilus microplus* suprimiu, *in vitro*, a proliferação induzida de monócitos de bovinos, sendo esta supressão atribuída a prostaglandina  $E_2$  (INOKUMA, KEMP e WILLADSEN, 1994). Estes eventos sugerem um perfil de resposta imunológica do tipo Th2, tanto em animais resistentes quanto nos animais susceptíveis, uma vez que o aumento de IL-10 promove, indiretamente, a inibição da diferenciação dos linfócitos T em linfócitos Th1. Isto resulta em diminuição da IL-2, visto que esta citocina é produzida, principalmente, por linfócitos Th1.

Linfócitos Th1 são responsáveis por favorecer resposta imune denominada hipersensibilidade basófilo cutânea, um tipo de hipersensibilidade tardia, freqüentemente observada em animais expostos ao carrapato (BROSSARD e WIKEL, 2004). Os resultados aqui apresentados sugerem que esta resposta imune possa estar sendo suprimida em animais resistentes e susceptíveis e que apesar de importante para rejeição do parasito, ela pode não estar relacionada ao mecanismo de resistência. Wambura *et al.* (1998) demonstraram que a reação de hipersensibilidade cutânea tardia não variou entre *Bos indicus* e *Bos taurus*.

Além da IL-10, o perfil de resposta imunológica Th2 proposto apresenta outra citocina característica, a IL-4. No presente trabalho, observou-se tendência de expressão aumentada desta citocina nos grupos de animais infestados (susceptíveis e

resistentes) quando comparados ao animal controle, no entanto, este aumento não foi estatisticamente significativo (Figura 6). Não houve diferença de expressão entre resistentes e susceptíveis. Em vista da tendência de resposta imune do tipo Th2, era de se esperar que o aumento de IL-10 viesse acompanhado do aumento de IL-4, o que não foi observado neste trabalho. Uma explicação reside no fato que a IL-10, apesar de ser produzida por linfócitos Th2, é expressa, principalmente, por linfócitos T regulatórios. (TAYLOR *et al.*, 2006). Um estudo demonstrou ausência de produção de IL-4 e IL-2 por estes linfócitos em humanos e camundongos (GROUX *et al.*, 1997). Para confirmar esta observação, sugere-se o estudo da expressão de TGF- $\beta$  produzido por estas células e FoxP3, fator de transcrição associado à indução da diferenciação de linfócitos T em linfócitos T regulatórios (FONTENOT, GAVIN e RUDENSKY, 2003).

Mbow, Rutti e Brossard (1994) demonstraram haver presença de mRNA de IL-4 no tecido de pele de camundongos (BALB/c) infestados com ninfas de *Ixodes ricinus*, embora em menor quantidade que outras citocinas. Um estudo com bovinos demonstrou haver tendência de aumento de expressão desta citocina em animais Nelore infestados quando comparados aos animais não infestados (NAKATA *et al.*, 2006). Outro trabalho mostrou que camundongos C3H/HeJ apresentaram níveis elevados de IL-4 quando infestados com ninfas de *Ixodes scapularis* (ZEIDNER *et al.*, 1997). Independente da espécie de hospedeiro e carrapato, todos os trabalhos mostram que a resposta imune contra este parasito desenvolve-se com a participação da IL-4, sugerindo um perfil de resposta Th2. No presente trabalho, não houve aumento significativo desta citocina nos animais expostos à infestação, sendo o perfil Th2 sugerido, atribuído principalmente a IL-10.

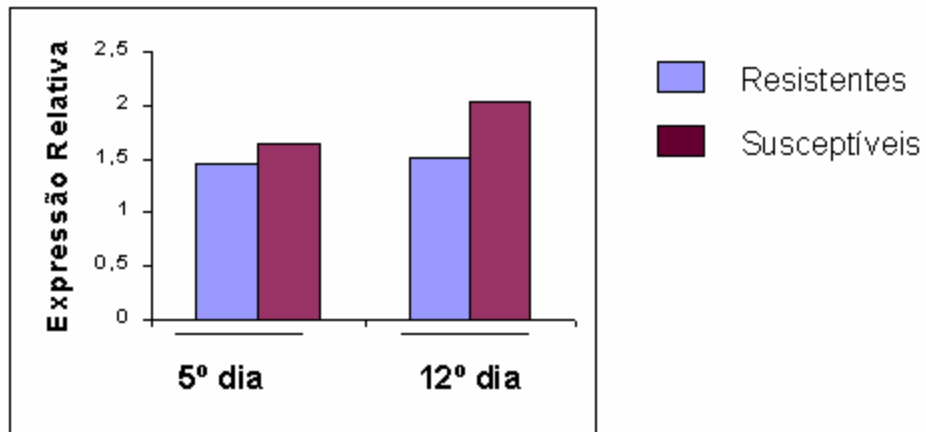


Figura 6 Expressão de IL-4 em animais resistentes e susceptíveis vs animal controle no 5º e 12º dias após a infestação.

O IFN- $\gamma$  está associado à conversão de linfócitos Th0 em linfócitos Th1, ativação de macrófagos e neutrófilos e potencialização da ação do TNF- $\alpha$  (JANEWAY *et al.*, 2002). Portanto, esta citocina está relacionada ao perfil de resposta imunológica Th1. Conforme aqui apresentado, não houve diferença de expressão entre os animais resistentes e susceptíveis no 5º e 12º dias após a infestação ( $p > 0,05$ ), sugerindo que esta citocina não está relacionada aos mecanismos de resistência aos carrapatos. Não foi possível detectar a expressão do IFN- $\gamma$  no animal controle, isto pode ter sido ocasionado por falha da PCR nesta amostra em particular, uma vez que a eficiência da PCR deste gene foi a menor verificada dentre todos os genes estudados neste trabalho, ou, de fato, o IFN- $\gamma$  não é expresso no animal controle. Se esta citocina não for realmente expressa no animal controle, nosso resultado indica que não ocorreu supressão da expressão de IFN- $\gamma$  mediada por IL-10. Ao contrário, o trabalho de Zeidner (1997) observou que camundongos infestados com ninfas de *Ixodes scapularis* apresentaram supressão da produção de IFN- $\gamma$  atribuída ao aumento de IL-10.

Estudos sugerem, ainda, que os carrapatos modulam a produção de citocinas por macrófagos (RAMACHANDRA e WIKEL, 1992) e dentre os mediadores da resposta inflamatória produzidos por estas células podemos citar o Fator de Necrose Tumoral (TNF- $\alpha$ ). O TNF- $\alpha$  é uma citocina pró-inflamatória responsável pela ativação de linfócitos T e B (WIKEL, 1996), aumento da expressão de moléculas de adesão, ocasionando o acúmulo de leucócitos nos locais de inflamação, e favorece o aumento de proteínas de fase aguda (JANEWAY *et al.*, 2002), sendo, portanto, importante no

processo inflamatório inicial. O presente estudo mostrou que os animais susceptíveis expressaram 1,911 vezes mais TNF- $\alpha$  no 5º dia após a infestação ( $p < 0,05$ ) e os animais resistentes expressaram 1,927 vezes mais este gene no 12º dia ( $p < 0,001$ ) quando comparados ao animal controle (Figura 7). Não houve diferença de expressão entre os animais resistentes e susceptíveis no 5º e 12º dias após a infestação ( $p > 0,05$ ). Estes achados não são conclusivos, talvez resultados mais consistentes fossem observados se a avaliação da expressão fosse realizada nas primeiras horas após a infestação já que esta citocina é, particularmente, importante na fase inicial do processo inflamatório e a resposta imunológica contra o carrapato pode ser observada após 3 horas de fixação do mesmo (RIBEIRO, 1989).

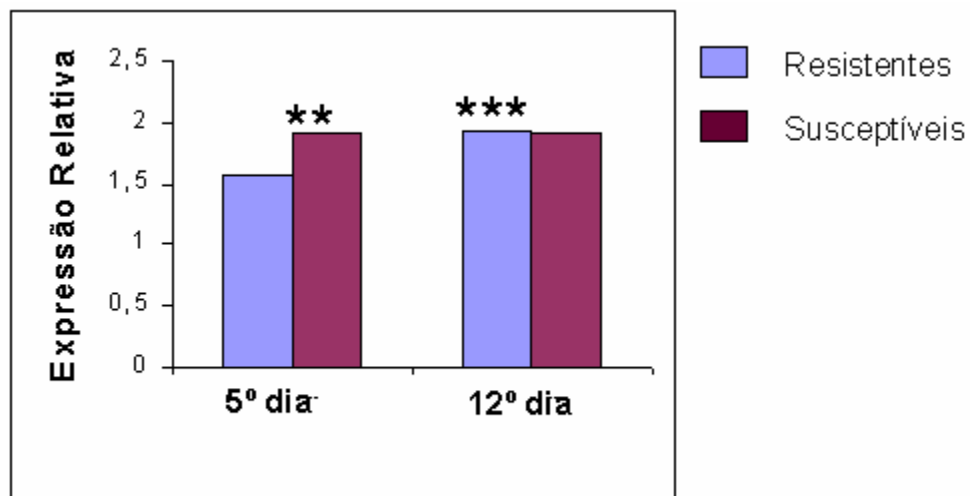


Figura 7 Expressão de TNF- $\alpha$  em animais resistentes e susceptíveis vs animal controle no 5º e 12º dias após a infestação (\*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ ).

Um estudo *in vitro* demonstrou que a produção de TNF- $\alpha$  por macrófagos, derivados de *Bos indicus* e *Bos taurus* induzidos por LPS, foi suprimida na presença de extrato de glândula salivar de *Dermacentor andersoni*, esta supressão foi observada no dia 0 após a exposição (RAMACHANDRA E WIKEL, 1995). Este estudo reforça a idéia de que esta citocina poderia ser mais bem observada horas após a infestação. Isto é bastante relevante, pois durante a coleta de tecidos para análise de expressão, observou-se que os animais resistentes não apresentavam mais os carrapatos fixados em seu couro enquanto nos animais susceptíveis podia-se observar a presença do

parasito, sugerindo que os fatores imunológicos responsáveis pela resistência aos carrapatos estão presentes na fase inicial da infestação.

Ribeiro (1989) demonstrou que a inflamação local inicial contra os carrapatos se desenvolve com a infiltração de neutrófilos e aumento gradativo de eosinófilos e basófilos, sendo a quimiocina IL-8 responsável pelo movimento e pela atividade dos neutrófilos. No presente trabalho, observou-se que a IL-8 não apresentou aumento de expressão nos animais resistentes no 5º e 12º dias após a infestação, nos animais susceptíveis no 12º dia após a infestação houve diminuição da expressão, 3,57 vezes menos ( $p < 0,001$ ) em relação ao animal controle (Figura 8), mas não observou diferença de expressão entre os animais resistentes e susceptíveis. Três possíveis explicações podem ser sugeridas: 1º) esta quimiocina não é importante no mecanismo de resistência aos carrapatos; 2º) como está presente no início do processo inflamatório, sua avaliação no 5º e 12º dias após a infestação não corresponde a sua fase mais atuante, portanto, níveis aumentados não seriam detectados ou 3º) como não houve aumento de expressão nos animais expostos a infestação, isto poderia sugerir uma supressão mediada por substâncias presentes na saliva do carrapato.

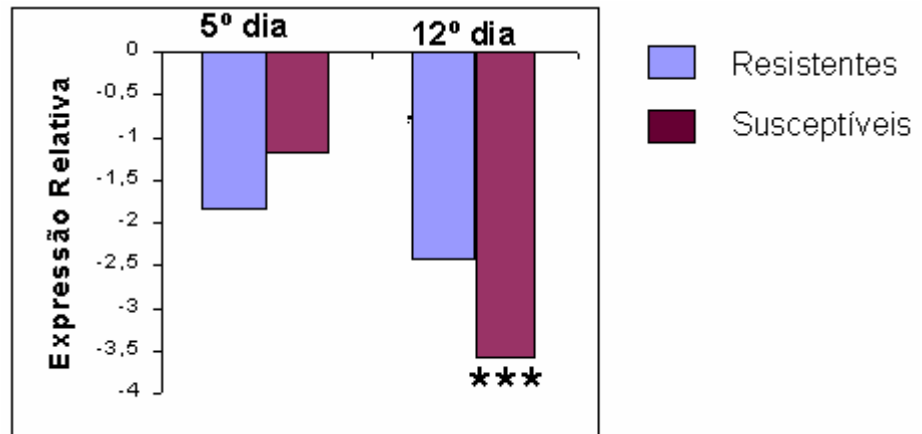


Figura 8 Expressão de IL-8 em animais resistentes e susceptíveis vs animal controle no 5º e 12º dias após a infestação (\*\*\*)  $p < 0,001$ ).

Um estudo demonstrou que extrato de glândula salivar de várias espécies de carrapato inibia *in vitro* a ligação da IL-8 aos seus receptores em neutrófilos humanos (HAJNICKÁ *et al.*, 2001), desta maneira, a saliva de carrapato poderia controlar, em parte, infiltração e ativação de neutrófilos no sítio de picada do ectoparasito. Isto

demonstra a importância da IL-8 no mecanismo de resposta imune ao parasito, não necessariamente, no mecanismo de resistência ao mesmo. Esta questão poderia ser mais bem avaliada se o estudo da expressão desta quimiocina fosse realizado com tecido de pele retirado horas após a infestação nos animais resistentes e susceptíveis. Além disso, Gil (1986) demonstrou haver intensa presença de neutrófilos, eosinófilos e basófilos no sítio de ataque de carrapatos em gados e as consequências patológicas deste infiltrado celular são caracterizadas por edema e exsudação plasmática sugerindo uma hipersensibilidade cutânea que estaria envolvida negativamente no ingurgitamento dos carrapatos. Estudos indicam que a intensidade da reação inflamatória induzida pelo carrapato é um importante fator na indução de uma resposta imune efetiva (KAUFMAN, 1989).

Outro gene avaliado neste trabalho foi o receptor Toll-Like 2 (TLR-2), presente em membranas de macrófagos e células dendríticas, muito importante no mecanismo de resposta inata e, particularmente, envolvido no reconhecimento de produtos provenientes de fungos e protozoários (O' NEIL, 2005). A escolha deste gene partiu do pressuposto de que como os carrapatos são vetores de protozoários como *Babesia bovis* responsável pela TBP (Tristeza Parasitária dos Bovinos) que acomete freqüentemente estes animais, a resposta imunológica contra este protozoário poderia afetar, também, os carrapatos. Em vista da importância destes receptores no mecanismo de resposta imune, principalmente, disparando vias de sinalização para produção de citocinas, especulou-se que este gene poderia estar relacionado ao mecanismo de resistência aos carrapatos. No presente trabalho, observou-se que o TLR-2 apresentou diminuição em sua expressão tanto nos animais resistentes quanto nos animais susceptíveis, embora para estes a diminuição tenha sido verificada no 12º dia após a infestação, com expressão 9,683 vezes menor quando comparado ao animal controle ( $p < 0,05$ ) (Figura 9). Para os animais resistentes, a expressão diminuiu no 5º dia após a infestação, 20,666 vezes menos expresso ( $p < 0,001$ ) (Figura 9). Não houve diferença de expressão entre os animais resistentes e susceptíveis no 5º e 12º dias após a infestação ( $p > 0,05$ ). Estes resultados indicam que o TLR-2 pode não estar relacionado ao mecanismo de resistência. A diminuição da expressão observada nos animais expostos ao carrapato comparado ao animal controle poderia sugerir a



participação de eventos imunossupressores mediados por moléculas presentes na saliva do carrapato embora nenhum trabalho, até o presente momento, possa subsidiar esta afirmação.

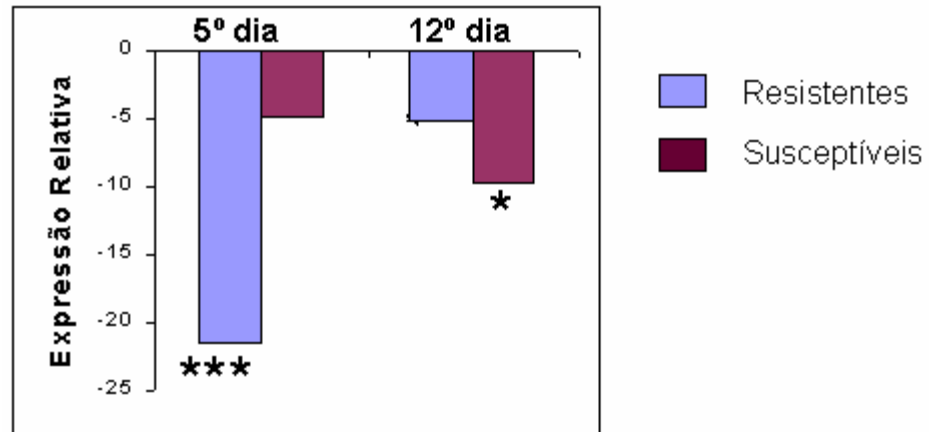


Figura 8 Expressão de TLR-2 em animais resistentes e susceptíveis vs animal controle no 5º e 12º dias após a infestação (\*  $p < 0,05$  e \*\*\*  $p < 0,001$ ).

Vale ressaltar que os animais avaliados não se encontram em ambientes controlados, ao contrário, vivem no campo expostos a outros patógenos que podem interferir nos resultados desta pesquisa. Apesar disto, os resultados expostos no presente trabalho são relevantes em termos práticos, já que diante da aplicabilidade desta e de futuras pesquisas no controle ou quem sabe na erradicação do carrapato, é importante que se conheça o mecanismo de resistência em condições reais. Vale ressaltar também que resistência ao carrapato é afetada por muitos genes, portanto são necessários mais estudos que incluam mais genes e um número maior de animais em diferentes fases de infestação, de modo que o mecanismo de resposta imune seja mais bem compreendido e venha gerar estratégias mais eficientes de controle e erradicação deste parasito. Além disso, seria interessante a realização de estudos proteômicos para a confirmação destes resultados, além de mais estudos de transcriptoma, já que existem poucos estudos de caracterização da expressão gênica em animais resistentes e susceptíveis ao carrapato.

## 5 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos na presente pesquisa foi possível concluir que:

- 1) os carrapatos possam direcionar a resposta imunológica para um perfil Th2 e uma possível inibição da resposta Th1 no 5º dia após a infestação devido ao aumento da expressão de IL-10 sem o aumento concomitante de IL-2, com retorno ao normal após 12 dias de infestação em ambos os animais (resistentes e susceptíveis);
- 2) houve tendência ao aumento de expressão de IL-4 em animais resistentes e susceptíveis embora não tenha sido estatisticamente significativa, sugere-se que o perfil Th2 sugerido seja atribuído a IL -10 produzida, principalmente, por LT regulatórios;
- 2) IFN- $\gamma$  não é importante no mecanismo de resistência aos carrapatos uma vez animais resistentes e susceptíveis não apresentaram diferenças quanto a sua expressão;
- 3) TNF- $\alpha$  apresentou aumento de expressão nos animais resistentes e susceptíveis, embora para estes o aumento tenha sido verificado no 5º dia após infestação e para aqueles no 12º dia, sugerindo que resultados mais consistentes seriam adquiridos se avaliação desta citocina fosse feita horas após a infestação uma vez que ela é importante no processo inflamatório inicial;
- 4) IL-8 e TLR-2 apresentaram diminuição da expressão em ambos os grupos de animais, sugere-se a participação de mecanismos imunossupressores atribuídos a saliva do carrapato ou avaliação da expressão destes genes logo após a infestação, já que são importantes na resposta inflamatória inicial e talvez a avaliação no 5º e 12º dias não corresponderia a fase mais atuante destes;
- 5) como a resposta imunológica avaliada corresponde à imunidade adquirida e nossos achados não encontraram diferenças entre os animais resistentes e susceptíveis, sugere-se que a resistência ao carrapato seja mediada pela imunidade inata expressa logo após a fixação do parasito.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. **Celular and Molecular Immunology**. 2<sup>o</sup> edition. W. B. Saunders, Philadelphia, 1994, 457 p.

AKDIS, M.; VERHAGEN, J.; TAYLOR, A. Immune responses in healthy and allergic individuals are characterized by fine balance between allergen-specific T regulatory 1 and T helper 2 cells. **Journal Experimental Medical**, **199**: 1567-1575, 2004.

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

ARAUJO, R. N.; PADILHA, T., ZARLENGA, D.; SONSTEGARD, T.; LIMA, W. S.; NASCIMENTO, E.; GASBARRE, L. Use of a Candidate Gene Array to Delineate Gene Expression Patterns in Cattle Selected for Resistance or Susceptibility to Gastrointestinal Nematodes. In: American Association of Veterinary Parasitologists Proceedings. p. 47, 2002..

BARRAL-NETO, M.; BARRAL, A; BRODSKY, C.; CARVALHO, E.M. e REED, S.B. Cytotoxicity in human mucosal and cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunology**, **17**: 21-28, 1995.

BENNET, G. F. Oviposition of *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acarina: Ixodidae). II. Influences of temperature, humidity and light. **Acarologia**, **16**: 250-257, 1974.

BOWMAN, A. S., DILLWITH, J.W. e SAUER, J. R. Tick salivary prostaglandins: presence, origin and significance. **Parasitology Today**, **12**: 388-396, 1996.

BROSSARD, M. e WIKEL, S.K. Immunology of interactions between ticks and hosts. **Medical and Veterinary Entomology**, **11**: 270-276, 1997.

BROSSARD, M. e WIKEL, S.K. Tick immunology. **Parasitology**, **129**: 161-176, 2004.

BUSTIN, S. A. Absolute Quantification of mRNA Using Real-Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction Assays. **Journal of Molecular Endocrinology**, **25**: 169-193, 2000.

BYFORD, I; COLDITZ, P.; SIBBICK, R. A Tick Resistant Dairy Breed. **Queensland Agricultural Journal**, **102**: 11-15, 1976.

CHAMPAGNE, D.E. e VALENZUELA, J.G. Pharmacology of haemathophagous arthropod saliva. **The Immunology of Host-Ectoparasitic Arthropod Relationships**, p.85-106, 1996.

CHER, D.J. e MOSMANN, T.R. Two types of murine helper T cell clone. II. Delayed-type hypersensitivity is mediated by TH1 clones. **Journal Immunology**, **138**: 3688 - 3694, 1987.

CONCEIÇÃO, J.R. **Estudo das relações entre resistência genética a carrapatos e características produtivas na espécie bovina**. Belo Horizonte, MG, 1997, 97p. Tese (Doutorado em Ciência Animal). Escola de Veterinária, UFMG.

DE MIRANDA SANTOS, I.K.; VALENZUELA, J.G.; RIBEIRO, J.M.; DE CASTRO, M.; COSTA, J.N.; COSTA, A.M.; DA SILVA, E.R.; NETO, O.B.; ROCHA, C.; DAFFRE, S.; FERREIRA, B.R.; DA SILVA, J.S.; SZABO, M.P.; BECHARA, G.H. Gene discovery in *Boophilus microplus*, the cattle tick: the transcriptomes of ovaries, salivary glands, and hemocytes. **Annals of the New York Academy of Sciences**, **1026**: 242-246, 2004.

DICKINSON, R. G., O'HAGAN, J. E., SHOTZ, M., BINNINGTON, K. C. e HEGARTY, M. P. Prostaglandin in saliva of the cattle tick *Boophilus microplus*. **Australian Journal of Experimental Biology and Medical Sciences**, **54**: 475-486, 1976.

DOYLE, S.L. e O'NEIL L. A. J. Toll-like receptors: From the discovery of NFκB to new insights into transcriptional regulations in innate immunity. **Biochemical Pharmacology**, **XXX**: XXX-XXX, 2006.

ELSE, K.J. e FINKELMAN, F.D. Intestinal nematode parasites\ cytokines and effector mechanisms. **International Journal Parasitology**, **28**: 1145-1158, 1998.

EVANS, D.E; MARTINS J.R.; GUGLIELMONE, A.A. A review of the ticks (Acari, Ixodida) of Brazil, their hosts and geographic distribution – 1. The state of Rio Grande do Sul, Southern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **95**: 453-470, 2000.

FERREIRA, C. A. S., VAZ, I. D. S. Jr., DA SILVA, S. S., HAAG, K. L., VALENZUELA, J. G. e MASUDA, A. Cloning and partial characterization of a *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) calreticulin. **Experimental Parasitology**, p. 25-34, 2002.

FIORENTINO, D.F.; ZLOTNIK, A; VIEIRA, P. Il-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. **Journal of Immunology**, **146**,. 3444-3451, 1991.

FONTENOT, J.D.; GAVIN, M. A.; RUDENSKY, A.Y. FoxP3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. **Nature Immunology**, **4**: 330-336, 2003.

FURLONG, J.; DERESZ, F.; MATOS, L.L. de; BALBI, M.V. **The Effect of Cattle Tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) Infestation on Feed Intake And Milk Yield of Holstein x Zebu Crossbred Cows**. In: Congresso Panamericano de Veterinária, XV, 1996, Campo Grande. p. 340, 1996.

GILL, H. S. Kinetics of mast cell, basophil and eosinophil populations at *Hyalomma anatolicum anatolicum* feeding sites on cattle and the acquisition of resistance. **Parasitology**, **93**: 305-315, 1986.

GROUX, H.; O' GARRA, A.; BIGLER, M.; ROULEAU, M.; ANTONENKO, S.; de VRIES, J. E.; RONCAROLO, M. G. A CD4+ T-cell subset inhibits antigens-specific T-cell responses and prevents colitis. **Nature**, **389**: 737-742, 1997.

HAJNICKÁ, V.; KOCÁKOVÁ, P.; SLÁVIKOVÁ, M.; SLOVÁK, M.; GASPERÍK, J.; FUCHSBERGER, N. e NUTTAL, P.A. Anti-interleikin-8 activity of tick salivary gland extracts. **Parasite Immunology**, **23**, 483-489, 2001.

HARRIS, S. G., PADILLA, J., KOUMAS, L., RAY, D. e PHIPPS, R. Prostaglandins as modulators of immunity. **Trends in Immunology**, **23**, 144-150, 2002.

HENDERSON, C. R. Selection index and expected genetic advance. In: National Academy of Science/ National Research Council - NAS/ NRC. Statistical genetics and plant breeding. Washington DC: 1963. p. 141-163.

HEWETSON, R.W. Resistance of Cattle to Cattle Tick *Boophilus microplus*. II. The Inheritance of Resistance to Experimental Infestation. **Australian Journal Agricultural Research**, **19**, 495-505, 1968.

HONER, M.R.; GOMES, A. O Manejo Integrado de Mosca dos Chifres, Berne e Carrapatos em Gado de Corte. Circular Técnica nº 22, Coop. Embrapa Gado de Corte. 1990.

HORN, S.C. Prováveis prejuízos causados pelos carrapatos no Brasil. Ministério da Agricultura, SDSA. Brasília, 1984.153p.

INOKUMA, H.; KEMP, D.H; WILLADSEN, P. Prostaglandin E<sub>2</sub> production by the cattle tick (*Boophilus microplus*) into feeding sites and its effect on the response of bovine mononuclear cells to mitogen. **Veterinary Parasitology**, **53**, 293-299, 1994.

JANEWAY, C.A. TAVERS,P.; WALPORT, M. e SHOLMCHIK. **Imunologia: O Sistema Imune na saúde e na doença**, 2002, Artmed, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

JONGEJAN, F; UILENBERG G. The global importance of ticks. **Parasitology**, **129**: s3-s14, 2004.

JONSSON, N.N. The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattle and their crosses. **Veterinary Parasitology**, **137**: 1-10, 2006.

KASHINO, S.S.; RESENDE, J.; SACCO, A.M.S.; ROCHA, C.; PROENÇA, L.; CARVALHO, W.A.; FIRMINO, A.A.; QUEIROZ, R.; BENAVIDES, M.; GERSHWIN, L.J.; DE MIRANDA SANTOS, I.K.F. *Boophilus microplus*: The pattern of bovine

immunoglobulin isotype responses to high and low tick infestation. **Experimental Parasitology**, **110**: 12-21, 2005.

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

KEMP, DH, STONE BF, BINNINGTON KC. Tick attachment and feeding: Role of the mouthparts, feeding apparatus, salivary gland secretions, and the host response. In: Obechain & Galun. Physiology of ticks. Oxford: Pergamon Press Ltd; 1982 119-167.

KONNAI, S.; USUI, T.; OHASHI, K.; ONUMA, M. The Rapid Quantitative Analysis of Bovine Cytokinegenes by Real-Time RT-PCR. **Veterinary Microbiology**, **94**: 283–294, 2003.

KOPECKY, J.; KUTHEJLOVÁ, M.; PECHOVÁ, J. Salivary gland extract from *ixodes ricinus* ticks inhibits production of interferon- $\gamma$  by the upregulation of interleukin-10. **Parasite Immunology**, **21**: 351-356, 1999.

LAMB, J. R.; SKIDMORE, B. J.; GREEN, N.; CHILLER, J. M.; FELDMANN, M. Induction of tolerance in influenza virus-immune T lymphocyte clones with synthetic peptides of influenza hemagglutinin. **Journal Experimental Medical**, **157**: 1434-1447, 1983.

LEITE, R.C. Carrapaticidas. **1º Simpósio sobre controles de carrapatos**, p. 17-36, 1996.

LEITE, R. C. ***B. microplus* (canestrini, 1887) susceptibilidade, uso atual e restropectivo de carrapaticidas em propriedades das regiões fisiográficas da Baixada de Grande Rio e Rio de Janeiro: uma abordagem epidemiológica**. Rio de Janeiro: UFRJ, p. 151, 1988. (Tese – Doutorado em Parasitologia Veterinária).

LEMONS, A.M. **A Resistência Genética dos Bovinos e o Controle do Carrapato**. Documento EMBRAPA/CNPGL, Coronel Pacheco, v. 6, p. 42, 1986.

LEUTENEGGER, C. M.; ALLUWAIMI A. M.; SMITH, W. L.; PERANI, L. e CULLOR, J. S. Quantitation of bovine cytokine mRNA in milk cells of healthy cattle by real-time TaqMan polymerase chain reaction. **Veterinary Immunology and Immunopathology**: **97**, 275-287, 2000.

MADALENA, F. E.; TEODORO, R. L.; LEMOS, A. M.; OLIVEIRA, G. P. Causes of Variation of Field Burdens of Cattle Ticks (*B. microplus*). **Revista Brasileira Genética**, **8**:361-375, 1985.

MARTINEZ, M.L.; SILVA, M.V.G.B.; MACHADO, M.A. TEODORO, R.L. e VERNEQUE, R.S. A biologia molecular como aliada no combate aos carrapatos. In: SIMPÓSIO NACIONAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MELHORAMENTO ANIMAL., 5., Pirassununga, 2004. **Anais**. Campo Grande: SBMA, 2004.

MATTIOLI, R. C.; PANDEY, V. S.; MURRAY, M; FITZPATRICK, J. L. 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 Tropica**, **75**: 263–277, 2000.

MATTIOLI, R. C. Comment on “A possible explanation of apparent breed-related resistance in cattle to bont tick (*Amblyomma hebraeum*) infestations. **Veterinary Parasitology**, **79**: p. 263-264, 1998.

MBOW, M.L.; RUTTI, B.; BROSSARD, M. IFN- $\gamma$ , IL-2, and IL-4 mRNA Expression in the Skin and Draining Lymph Nodes of BALB/c Mice Repeatedly Infested with Nymphal *Ixodes ricinus* Ticks. **Cellular Immunology**, **156**: 254-261, 1994.

MCGUIRE, K.; JONES, M.; WERLING, D.; WILLIAMS, J.L.; GLASS, E.J.; JANN, O. Radiation hybrid mapping of all 10 characterized bovine Toll-like receptors. **International Society for Animal Genetics**, **37**: 47-50.

MELTZER, M.I. A possible explanation of the apparent breed-related resistance in cattle to bont tick (*Amblyomma hebraeum*) infestations. **Veterinary Parasitology**, **67**: 275-279.

MOSMANN T.R. e MOORE, K.W. The role of IL-10 in crossregulation of Th1 and Th2 responses. **Immunology Today**, **12**, A49-A53, 1991.

MOUSSAY E.; STAMM I.; TAUBERT A.; BALJER G. e MENGE C. *Escherichia coli* Shiga toxin 1 enhances il-4 transcripts in bovine ileal intraepithelial lymphocytes. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, **113**: 367-382, 2006.

NAKATA, L.G.; ZAROS, L.G.; OLIVEIRA, M.C.S.; COUTINHO, L.C.A.; REGITANO, L.C. Quantitative analysis of bovine cytokine mRNA levels in response to tick infestation. In: 8th WORLD CONGRESS ON GENETICS APPLIED TO LIVESTOCK PRODUCTION, C1530, 2006, Belo Horizonte , Anais..., p.136, 2006.

O' NEILL, L. A. J. Estopim imunológico. **Scientific American Brasil**, 68-75, 2005.

PAESEN, G. C., ADAMS, P. L., HARLOS, K., NUTTALL, P. A. e STUART, D. I. Tick histamine-binding proteins: isolation, cloning, and three-dimensional structure. **Molecular Cell**, **3**: 661-671.

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

PFAFFL, M. W.; HORGAN, G. W.; DEMPFLER, L. Relative expression software tool (REST<sup>®</sup>) for group-wise comparison and statistical analyses of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Research**, **30**: 1-10, 2002.

RADOSTIS, O.M.; GAY, C.C.; BLODD, D.C. **Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, sheeps, pigs, goats and horses**, 9.ed. Londres: Saunders, 1877p 2000.

RAMACHANDRA, R. N., WIKEL, S. K. Modulation of host immune responses by ticks (Acari: Ixodidae): effect of salivary gland extracts on hosts macrophages and lymphocyte cytokine production. **Journal Medical Entomology**, **29**: 818-826, 1992.

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

RENDEL, J. **Breeding for Milk Products in the Tropics**, In: INTERNATIONAL DAIRY CONGRESS. v. 2, 1971. Proceed., 1971. 452 p.

RIBEIRO, J. M. Role of saliva in tick/host interactions. **Experimental Applied Acarology**, **7**: 15–20, 1989.

RIBEIRO, J.M.C. Blood-feeding arthropods: Live syringes or invertebrate pharmacologists? **Infectious Agent and Disease**, v. 4, p. 143-152. 1995.

RIBEIRO, J. M. C., MATHER, T. N. *Ixodes scapularis*: salivary kininase activity is a metallo dipeptidylcarboxypeptidase. **Experimental Parasitology**, **89**: 213-221, 1998.

RIEK, R. F. Studies on the reactions of animals to infestation with the tick *Boophilus microplus* (Canestrini). **Australian Journal Agriculture Research**, **13**: 532-552, 1962.

ROBERTS, J. A. Resistance of cattle to the cattle tick *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). Development of ticks on *Bos Taurus*. **Journal of Parasitology**, **54**: 663-666, 1968.

ROBINSON T. L.; SUTHERLAND I.A. e SUTHERLAND J. Validation of candidate bovine reference genes for use with real-time PCR. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, **115**: 160-165, 2007.

ROCHA, C.M.B.M. Importância do Carrapato *Boophilus microplus*, Canestrini, 1887 (Acarina, Ixodidae) no Processo Produtivo do Leite. **Revisão**. UFLA, 1996.

SANDERS, M. L., JAWORSKI, D. C., SANCHEZ, J. L., DEFRAITES, R. F., GLASS, G. E., SCOTT, A. L., RAHA, S., RITCHIE, B. C., NEEDHAM, G. R.; SCHWARTZ, B. S. Antibody to a cDNA-derived calreticulin protein de *Amblyomma americanum* as a biomarker of tick exposure in humans. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **59**: 31-40, 1998.

SCHOELER, G. B.; WIKEL, S.K. Modulation of hosts immunity by haematophagous arthropods. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, **95**: 755-771, 2001.



SEIFERT, G. B. Ecto and endoparasitic effects on the growth rates of Zebu crossbred and British cattle in the field. **Australian Journal of Agricultural Research**, **22**: 839-850, 1970.

SOARES, C.O. Imunidade contra artrópodes parasitas. **Imunodiagnóstico em medicina veterinária**, p. 111-141, 2001.

TAYLOR, A; VERHAGEN, J.; BLASER, K.; AKDIS, M.; AKDIS, A. Mechanisms of immune suppression by interleukin-10 and transforming growth factor- $\beta$ : the role of T regulatory cells. **Immunology**, **117**: 433-442, 2006.

TEODORO, R. L.; LEMOS, A. M.; MADALENA, F. E. **Effects of Ticks *Boophilus microplus* Infestations on Milk Yield of *Bos taurus/Bos indicus* crosses**. In Proceeding of the 6th World Congress Genetics Applied to Livestock Production, **27**: 137-180, 1998.

TEODORO, R. L.; LEMOS, A. M.; MOREIRA, D. P.; MADALENA, F. E. **Resistência Genética dos Bovinos ao Carrapato (*Boophilus microplus*)**. VII. Resistência de Touros Mestiços sob Infestação Artificial. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 21, Belo Horizonte, MG, Anais... Belo Horizonte, 1984. p. 54.

THIESEN, W. L. **Biologia do Carrapato *Boophilus microplus***. In: Seminario Nacional sobre Parasitose dos Bovinos, I. Campo grande, 1979, p. 207-215.

UTECH, K. B. W.; WHARTON, R. H. Breeding fo Resistance to *Boophilus microplus* in Australian Illawarra Shorthorn and Brahman x Australian Illawarra Shorthorn Cattle. **Australian Veterinary Journal**, **58**: 41-46, 1982.

UTECH, K. B. W. Prospects of Selection for Tick Resistance in British Breeds of Cattle. The Future of the British Breeds in Tick Areas. s. 1., **Queensland Agricultural College**, p. 30-38, 1979.

UTECH, K. B. W.; SEIFERT, G. W.; WHARTON, R. H. Breeding Australian Illawarra Shorthorn Cattle for Resistance to *Boophiplus microplus*. I. Factors Affecting Resistance. **Australian Journal Agricultural Research**, **29 (2)**: 411-422, 1978.

VERISSIMO, C. J.; NICOLAU. C.V.J.; CARDOSO, V. L.; PINHEIRO, M.G. Características do pelame e infestação por carrapatos em bovinos GirGyr e mestiços (Holandês x GirGyr). **Proceeding of the 33<sup>th</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, **1**: 379-380, 1996.

VERÍSSIMO, C.J. Fatores a serem considerados em um programa de controle estratégico (Experiência de São Paulo). **1° Simpósio sobre controles de carrapatos**, p. 1-16, 1996.

VILLARES, J. B. Climatologia Zootécnica. III. Contribuição ao Estudo da Resistência e Susceptibilidade Genética dos Bovinos ao *Boophilus microplus*. **Boletim Industry Animal (4)**: 60-86, 1941.

ZEIDNER, N.; MBOWN, M.L.; DOLAN, M., MASSUNG, R., BACA, E. e PIESMAN, J. Effects of *Ixodes scapularis* and *Borrelia burgdorferi* on the modulation of the host immune response: induction of a Th2 cytokine response in Lyme disease susceptible (C3H/HeJ) but not in disease-resistant (BALB/c) mice. **Infectology Immunology**, **65**: 3100-3106, 1997.

WAGLAND, B. M. Host resistance to cattle tick (*Boophilus microplus*) in Brahman *Bos indicus* cattle. I. Response of previously unexposed cattle to four infestations with 20000 larvae. **Australian Journal Agriculture Research**, **4(2)**: 60-86, 1941.

WAGLAND, B. M. Host resistance to cattle tick (*Boophilus microplus*) in Brahman (*Bos indicus*) cattle. III. Growth on previously unexposed animal. **Australian Journal Agricultural Research**, **29**: 401-409, 1978.

WALDVOGEL A.S.; HEDIGER-WEITHALER B.M.; EICHER R.; ZAKHER A.; ZARLENGA D.S.; GASBARRE L.C. e HEUSSLER V.T. Interferon-gama and Interleukin-4 mRNA expression by peripheral blood mononuclear cells from pregnant and non-pregnant cattle seropositive for bovine viral diarrhoea virus. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, **77**: 201-212, 2000.

WAMBURA, P.N.; GWAKISA, P.S.; SILAYO, R.S. e RUGAIMUKAMU, E. A. Breed-associated resistance to tick infestation in *Bos indicus* and their crosses with *Bos Taurus*. **Veterinary Parasitology**, **77**: 63-70, 1998.

WANG, H. e NUTTAL, P.A. Immunoglobulin-G binding proteins in the ixodid ticks, *Rhipicephalus appendiculatus*, *Amblyoma variegatum* and *Ixodes hexagonus*. **Parasitology**, **111**: 161-165, 1995.

WHARTON, R. H.; UTECH, K. B. W. The Relation between Engorgement and Dropping of *Boophilus microplus* (canestrini) (Ixodidae) to the Assessment of Tick Numbers on Cattle. **Journal of the Australian Entomological Society**, **9**: 171-182, 1970.

WIKEL, S. K; ALARCON-CHAIDEZ, J. F. Progress toward molecular characterization of ectoparasite modulation of host immunity. **Veterinary Parasitology**, **101**: 275-287, 2001.

WIKEL, S. K. Histamine content of tick attachment sites and the effects of H1 and H2 histamine antagonists on the expression of resistance. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, **76**: 179-185, 1982.

WIKEL, S.K. Tick host immunology: significance advances and challenging opportunities. **Parasitology Today**, **13**: 383-389, 1997.

WILLADSEN, P.; BIRD, P.; COBON, G.S.; HUNGERFORD, J. Commercialisation of a recombinant vaccine against *Boophilus microplus*. **Parasitology**, **110**: 43–50, 1995.

WILLADSEN, P.; SMITH, D.; COBON, G.; MCKENNA, R.V. Comparative vaccination of cattle against *B. microplus* with recombinant antigen Bm86 alone or in combination with recombinant Bm91. **Parasite Immunology**, **18**: 241-246, 1996.