

PUCRS - PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA  
DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE BIOCIÊNCIAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**RESPOSTA IMUNE HUMORAL DE BOVINOS INFESTADOS  
EXPERIMENTALMENTE CONTRA O CARRAPATO *RHIPICEPHALUS*  
(*BOOPHILUS*) *MICROPLUS***

ANA PAULA ROTTINI CRUZ

Dissertação submetida ao Curso de Pós-Graduação em Biologia Molecular e Celular, pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientador: Dr. Carlos Alexandre Sanchez Ferreira

Porto Alegre (RS)  
2008

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Dr. Carlos Alexandre Sanchez Ferreira pela orientação, disposição e oportunidade.

Ao Laboratório de Imunologia Aplicada a Sanidade Animal do Centro de Biotecnologia da UFRGS, principalmente ao Dr. Itabajara da Silva Vaz Jr. e a Dr. Aoi Masuda pela colaboração direta com o projeto.

Aos meus pais e irmão pelo enorme apoio e incentivo.

Ao meu esposo pela compreensão, paciência e grande incentivo.

A todos os colegas e amigos dos laboratórios de Imunologia e Microbiologia da PUCRS e de Imunologia Aplicada a Sanidade Animal da UFRGS, pela amizade e apoio.

Este trabalho foi realizado com apoio financeiro da CAPES, FAPERGS, CNPq e CNPq/PRONEX-FAPERJ.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	4
ABSTRACT.....	6
1 INTRODUÇÃO.....	8
1.1 O carrapato <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> .....	8
1.1.1 Classificação.....	8
1.1.2 Ciclo de vida.....	9
1.1.3 Importância econômica .....	11
1.2 Controle do carrapato.....	11
1.3.1 Controle químico .....	11
1.3.2 Controle biológico .....	12
1.3.3 Controle imunológico .....	14
1.3.3.1 Antígenos expostos versus ocultos .....	17
1.3 Relação Parasito-hospedeiro .....	18
1.2.1 Resposta imune contra o carrapato.....	18
1.2.2 Imunossupressão .....	22
1.2.3 Resistência dos bovinos ao carrapato .....	25
1.4 Objetivos .....	28
2 ARTIGO CIENTÍFICO .....	29
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	37
4 CONCLUSÕES .....	45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46

## RESUMO

O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é um ectoparasito hematófago de bovinos, amplamente distribuído nos rebanhos da América, Ásia, África e Oceania. O uso de acaricidas é o principal método para o controle do carrapato, porém o custo das drogas e da mão-de-obra requerida para aplicar o tratamento, o aparecimento crescente de carrapatos resistentes a vários acaricidas, a permanência de resíduos químicos nos alimentos e a poluição ambiental decorrente do seu uso tornam importante o desenvolvimento de outras formas de controle. O desenvolvimento de um método de controle imunológico como uma alternativa para o controle químico depende da identificação de moléculas antigênicas que geram uma resposta imune protetora. Como bovinos desenvolvem resistência ao carrapato durante sucessivas infestações, a análise da resposta imune desenvolvida por bovinos infestados pode tornar-se de grande importância na busca por antígenos protetores. ELISA e Western Blot foram utilizados para investigar o padrão de respostas de anticorpos de seis bovinos infestados doze vezes com *R. microplus* (seis infestações pesadas seguidas por seis infestações leves) contra extratos de glândula salivar, intestino e larva. Durante infestações pesadas foram observados níveis maiores de IgGs reconhecendo extratos protéicos de glândula salivar, intestino e larva, e uma diminuição no número e no peso de carrapatos que completam o ciclo parasitário. O padrão mudou iniciando na sétima infestação, mostrando uma diminuição nos níveis de IgG, e um aumento inicial seguido por uma significativa diminuição na proporção de carrapatos que completam o ciclo parasitário. O número de moléculas reconhecidas em Western Blot foi maior pelos soros das infestações pesadas do que das infestações leves, embora uma

grande variação nos perfis detectados pode ser visto entre os bovinos. Esses resultados indicam que níveis de anticorpos contra o carrapato não estão necessariamente relacionados de forma direta com níveis de resistência. Além disso, infestações pesadas e leves parecem modular de forma diferente a magnitude da resposta humoral e possivelmente os mecanismos imunes na aquisição natural de resistência ao carrapato.

## ABSTRACT

The tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* is a hematophagous ectoparasite of bovines, widely distributed in herds from America, Asia, Africa and Oceania. The use of acaricides is the main method for tick control, however it may become unfeasible due to the cost of drugs and labor required to apply the treatment, as well as the increasing appearance of resistant ticks to various acaricides. In addition, chemical residues in food and environmental pollution are major concerns nowadays. The development of an immunological control method as an alternative for the chemical control depends on finding out antigenic molecules that generate a protective immune response. As bovines develop resistance to ticks during successive infestations, the analysis of the immune responses developed by infested bovines may become of great importance in the search for protective antigens. ELISA and Western Blot were used to investigate the pattern of antibody responses of six bovines infested twelve times with *R. microplus* (six heavy infestations followed by six light infestations) against salivary gland, gut and larvae extracts. During heavy infestations, bovine IgG levels were shown to be higher, and a decrease in the number and weight of ticks that completed the parasitic cycle was observed. The pattern changed starting from the seventh infestation, showing a decrease in IgG levels, and an initial increase followed by a significant decrease in the proportion of ticks that completed the parasitic cycle.. The number of molecules recognized by Western Blot was higher from sera collected following heavy infestations than after light infestations, although a great variation in the profiles detected could be seen when the bovines were compared. These results indicate that IgG responses to

different tick antigens may not be generally associated with bovine resistance, and that infestation levels modulate the magnitude of humoral responses and possibly the immune mechanisms in the natural acquisition of tick resistance.

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 O Carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

O carrapato *R. microplus* é um ectoparasita hematófago de mamíferos (família Ixodidae - carrapatos duros) que se constitui em um dos grandes problemas para a criação extensiva de bovinos. Sua distribuição no mundo inclui os grandes rebanhos comerciais da América, África, Ásia e Oceania, entre os paralelos 32 °N e 32 °S (Gonzales, 1995), sendo considerado o carrapato de maior significado econômico e o principal alvo em programas de controle e erradicação nos rebanhos da América do Sul (Nari, 1995). Além do bovino, o *R. microplus* pode eventualmente completar seu ciclo em outros animais, como a ovelha, o cavalo, o búfalo e o veado (Gonzales, 1995), sempre completando o seu desenvolvimento em apenas um hospedeiro.

#### 1.1.1 Classificação do *R. microplus*

De acordo com Flechtmann 1990, o *R. microplus* possui a seguinte sistemática:

Filo – Arthropoda, Von Siebold & Slannius, 1845;

Subfilo – Chelicerata, Heymons, 1901;

Classe – Aracnida, Lamarck, 1802;

Subclasse – Acari, Leach, 1817;

Ordem – Parasitiformes, Renter, 1909;

Subordem – Metastigmata, Canestrini, 1891;

Ixodes, Leach, 1815;

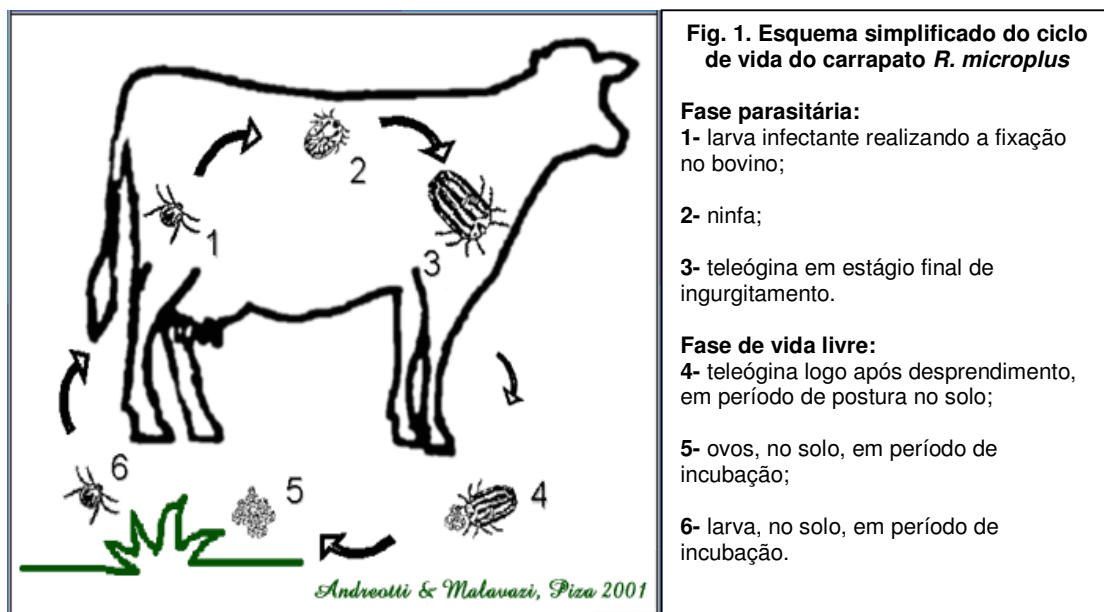


Família – Ixodidae, Murray, 1887;

Gênero – Boophilus, Canestrini, 1887;

### 1.1.2 Ciclo de vida do *R. microplus*

O *R. microplus* é um parasita monoxeno, isto é, depende de apenas um hospedeiro em seu ciclo de vida, preferencialmente os bovinos. Seu ciclo de vida apresenta duas fases complementares (figura 1): a de vida livre e de vida parasitária.



A fase de vida livre sofre interferências climáticas, trazendo alterações nos seus períodos, que são especialmente afetados pela umidade e temperatura. Por outro lado, a fase de vida parasitária é praticamente constante em todas as regiões (Gonzales, 1975).

O ciclo do *R. microplus* é assim descrito por Furlong (1993): na fase de vida livre inicia-se com a queda de fêmeas ingurgitadas (teleóginas) e culmina quando as larvas eclodidas encontram o hospedeiro. A teleógina ao desprender-se do animal parasitado, cai no solo em geral na primeira metade da manhã, procurando locais

abrigados de incidência direta de luz solar para sua ovoposição. O período compreendido entre a queda e o início da postura é chamado de pré-postura. Em condições ideais de temperatura (em torno de 27°C) a pré-postura leva cerca de três dias. Em temperaturas entre 27 e 28°C e com alta umidade (aproximadamente 80%), a postura ocorre em 3 a 6 semanas. A fêmea morre logo após a postura. Normalmente uma teleógina coloca cerca de 3000 a 4000 ovos estando a ovoposição concluída após aproximadamente 12 a 14 dias. De 22 a 30 dias para a eclosão das larvas e de dois a três dias para o fortalecimento de suas cutículas, quando se transformam em larvas infestantes. Na vegetação, as larvas ficam agrupadas, evitando desse modo a perda de umidade e protegendo-se da incidência direta dos raios solares, podendo permanecer nestes locais por mais de 8 meses ou até o encontro com um hospedeiro. O período de atividade das larvas na vegetação, ocorre nas primeiras horas da manhã e no final da tarde, quando a temperatura é mais amena.

A fase parasitária começa com a subida da larva infestante no hospedeiro. Após a fixação são denominadas “larvas parasitárias”. Estas procuram uma área no animal para a fixação, normalmente em locais abrigados das defesas mecânicas do hospedeiro, tais como, base da cauda, barbela, peito e parte posterior das coxas. Junto ao local de fixação aparecem zonas de hiperemia e inflamação. A larva após a troca de cutícula (metalarva), dá origem a ninfa, por volta de 8 a 10 dias (Athanasof, 1953). Esta se alimenta de sangue, sofre uma muda (metaninfa) , ao redor do 15.º dia e transforma-se em adulto imaturo, neandro (macho) e neógina (fêmea) (Athanasof, 1953). A fêmea após o acasalamento, começa a alimentação até o ingurgitamento total, que propicia sua queda ao solo. O ingurgitamento e queda da fêmea do *R. microplus* são bastante rápidos e, em parte, fêmeas ingurgitadas de 4-6

mm (10-30 mg) podem ingurgitar rápido à noite, chegando a 8-11 mm (150-250 mg) e se desprender do animal nas primeiras horas do dia. A fase parasitária de uma fêmea dura em média de 18 a 26 dias (Furlong, 1993).

### 1.1.3 Importância econômica

O *R. microplus* causa, com sua distribuição em regiões tropicais e subtropicais, os maiores impactos econômicos nos rebanhos bovinos da América do Sul, América Central e Oceania (Cobon & Willadsen, 1990). Sua ação expoliativa, que corresponde a perda pelo bovino de 2 a 3 ml de sangue por fêmea do carrapato (Gonzales, 1995), causa queda na produção de leite e carne, com perda média anual de 0,24 kg de peso vivo por carrapato (Sutherst et al, 1983). São também transmissores dos protozoários *Babesia bovis* e *B. bigemina* e de riquetsias do gênero *Anaplasma*, que são os agentes causadores da doença denominada tristeza parasitária bovina (Horn & Arteche, 1985). Além disso, o *R. microplus* causa danos ao couro dos bovinos pelas reações inflamatórias provocadas no local de fixação (Seifert et al, 1968; Horn & Arteche, 1985).

## 1.2 Controle do carrapato

### 1.2.1 Controle químico

O método de controle para o carrapato que mais tem sido utilizado desde a década de 50 é o uso de acaricidas (Pruett, 1999). Apesar de atualmente ser o único método eficaz, é também dispendioso, além de poder causar danos ao meio ambiente e à saúde pública, por meio da contaminação de rios e solos. Ao longo destas décadas, foram utilizados, seqüencialmente, acaricidas baseados em

compostos arsenicais, organoclorados, organofosforados, carbamatos, formamidinas e piretróides (Häuerman et al, 1992). A troca dos princípios ativos tem sido uma necessidade devido ao surgimento de populações resistentes (Crampton et al, 1993). A resistência para organofosforados tem sido reportada desde 1963, quando foi descrito, na Austrália, um caso de resistência para dioxation, carbofenothion, diazinom e carbamil, (Seddon, 1967).

### 1.2.2 Controle biológico

Fatores ambientais não favoráveis, principalmente com relação à temperatura e à umidade relativa do ar, podem reduzir consideravelmente o número de larvas viáveis e, conseqüentemente, os índices de infestação dos bovinos (Gonzales, 1995).

O tipo de vegetação é um dos fatores importantes capazes de influenciar o tamanho das populações de carrapatos. Pastagens nativas com vegetação arbustiva proporcionam abrigo as fêmeas em postura, enquanto que algumas pastagens, por serem tóxicas, repelentes ou por imobilizarem as larvas através de secreções ou estruturas da planta, podem limitar bastante o número de carrapatos. Em especial, o plantio de gramíneas do gênero *Stylosanthes* (Sutherst et al, 1982) e do capim gordura (*Melinis minutiflora*) (Farias et al, 1986) podem contribuir consideravelmente para o controle do carrapato. Uma estratégia que pode ser viável utilizando os conhecimentos sobre o ciclo biológico do carrapato é a rotatividade de pastagens (Norton et al, 1983). Elder et al (1980) concluíram que, apesar deste método ser utilizado principalmente devido à necessidade do manejo do solo para atividades agrícolas, pode também ser empregado com relativo sucesso nas práticas de controle do parasita. Ribeiro et al (2007) mostraram a alta toxicidade de *Hypericum polyanthemum* ao carrapato *R. microplus*.

Os carrapatos são alvos de uma série de predadores, dentre os quais se devem salientar a garça vaqueira (*Egretta ibis*), a qual pode comer até 450 fêmeas por dia (Alves-Branco et al, 1983) e formigas carnívoras que devoram fêmeas no solo (Gonzales, 1995). Pequenos roedores também podem destruir ovos e larvas nas pastagens (Holm & Wallace, 1989).

Espécies parasitas também podem contribuir para a manutenção de baixos níveis populacionais de carrapatos. Bactérias, como *Escherichia coli*, *Cedecea lapagei* e *Enterobacter agglomerans* são naturalmente encontradas no aparelho reprodutor feminino do carrapato. Existem relatos de uma diminuição de até 47% na quantidade de ovos postos quando fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* foram imersas em suspensão de *C. lapagei* (Brum, 1989). A utilização de fungos no controle do carrapato tem sido muito estudada nos últimos anos, como o fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*, altamente patogênico para o carrapato *Ixodes scapularis* (Zhioua et al, 1997). Experimentos *in vitro* com 12 isolados de *M. anisopliae* sobre fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* mostram que, dependendo da concentração de esporos na suspensão utilizada, alguns isolados de *M. anisopliae* podem causar morte de até 100% dos carrapatos infectados (Frazzon et al, 2000). Alonso-Dias et al (2007) testaram a eficácia de *M. anisopliae* no controle do *R. microplus* em bovinos infestados naturalmente no México, resultados demonstram uma alta eficiência no tratamento contra o carrapato. Já foram identificados isolados de *M. anisopliae* ocorrentes no Brasil infestantes naturais de *R. microplus* (Da Costa et al, 2002). Outros parasitos, tais como nematódeos, também têm sido avaliados como ferramentas no controle biológico de carrapatos, já que têm se mostrado eficientes no controle de insetos (Samish & Glazer, 2001).

Uma outra estratégia envolvendo controle biológico do carrapato é a utilização

de compostos naturais como pesticidas. Davey et al (2001) testaram em bovinos diferentes concentrações de “spinosad”, um acaricida natural de *Sacharopolyspora spinosa* (actinomiceto), advindo da mistura de dois metabólitos deste organismo, espinosina A e D, obtidos sob condições de fermentação. Os resultados mostram uma queda drástica no número de fêmeas ingurgitadas, na massa de ovos e no índice de fecundidade.

### 1.2.3 Controle imunológico

O controle de ectoparasitas pela vacinação tem sido estudado nas últimas cinco décadas. O desenvolvimento de vacinas anti-carrapato representa uma das alternativas mais promissoras para o controle químico e possui vantagens como a especificidade à espécie, segurança ambiental e para a saúde humana, fácil administração e um custo menor. Para o desenvolvimento de uma vacina é necessário, além da identificação de proteínas capazes de induzir uma resposta imune protetora, o conhecimento dos mecanismos de resposta imunológica do animal (Wikel, 1996).

A teoria dos “antígenos ocultos”, aqueles não expostos ao sistema imune do hospedeiro durante uma infestação natural, e a descoberta de uma proteína de intestino (Bm86) com essa característica significaram um grande avanço no desenvolvimento de vacinas contra *R. microplus*. A Bm86 induz resposta imunológica em bovinos imunizados e é a base de duas vacinas comerciais presentes no mercado: a TickGard, desenvolvida na Austrália pela Divisão de Ciências Animais Tropicais do CSIRO, e a Gavac, desenvolvida no Centro de Engenharia Genética e Biotecnologia de Cuba. A proteína da TickGard é obtida em *E. coli* e a da Gavac em *Pichia pastoris*. Embora essas vacinas estejam

comercialmente disponíveis, elas não asseguram o grau de proteção necessário para suprimir o uso de acaricidas (Willadsen et al, 1996).

Outro antígeno protetor isolado de *R. microplus* é a proteína Bm91. Esta proteína é glicosilada e possui uma massa molecular aparente de 86 kDa sendo encontrada em baixa concentração nas glândulas salivares e intestino de fêmeas adultas. Seqüências parciais da proteína mostram uma similaridade considerável com enzimas conversoras de angiotensina de mamíferos, sugerindo que ela tenha função enzimática. Esta proteína não é reconhecida por soros de animais cuja resistência foi adquirida por infestações sucessivas de carrapatos em condições naturais, sugerindo que ela representa outro exemplo de “antígeno oculto” (Riding et al, 1994). Willadsen et al (1996) demonstraram a capacidade da Bm91 recombinante de aumentar a proteção induzida pela vacinação com a Bm86 recombinante. Apesar deste aumento ter sido pequeno, observou-se que a resposta produzida contra a Bm91 não interfere na resposta contra a Bm86, indicando a possibilidade do uso de uma vacina poliantigênica.

Foi demonstrado que o nível de anticorpos contra antígenos de intestino, induzidos por imunização artificial, era significativamente maior em animais protegidos que os encontrados em animais não protegidos (Opdebeeck et al, 1988). Entretanto, Johnston et al (1986) não conseguiram correlacionar, por radioimunoensaios, as respostas humorais com proteção e Jackson & Opdebeeck (1995), estudando o efeito de vários adjuvantes nas respostas imunes humorais contra antígenos de membrana de intestino, concluíram que a relação entre os níveis de anticorpos contra o carrapato e a proteção induzida não parece ser de causa e efeito. Imunizações com antígenos de membrana de ovos de *R. microplus* não resultaram em proteção significativa de bovinos ao desafio, apesar de induzirem

altos níveis de anticorpos nos animais vacinados e destes reconhecerem antígenos de membrana do intestino (Kimaro & Opdebeeck, 1994).

Inoculações com antígenos de membrana extraídos do intestino de *R. microplus* induziram uma proteção média de 91 %, calculada pelo peso médio dos ovos dos carrapatos de animais vacinados e o peso médio dos ovos dos carrapatos de animais controles (Opdebeeck et al, 1988). Porém, a imunização de gado Hereford com antígenos de carrapatos adultos e larvas de *R. microplus*, purificados por cromatografia de imunoafinidade utilizando como ligantes de imunoglobulinas geradas por imunização de bovinos com antígenos de intestino, resultou em uma proteção menor, correspondente a 83 % e 85 %, respectivamente (Opdebeeck et al, 1989). A partir destes resultados Opdebeeck et al (1989) sugerem que os antígenos protetores podem estar presentes no carrapato em vários estágios de desenvolvimento e/ou que haja epitopos comuns entre proteínas larvais e de carrapatos adultos.

Antígenos de glândula salivar de *Dermacentor andersoni* foram utilizados para imunizar cobaias por diferentes vias, com ou sem adjuvantes, induzindo um considerável grau de resistência, o qual foi expresso com uma diminuição do número e peso dos carrapatos ingurgitados (Wikel, 1981). Cobaias imunizadas com glândula salivar e cemento de *Amblyomma americanum* apresentaram um grau de resistência, quando desafiadas, similar à obtida por cobaias infestados repetidamente. Foi sugerido que uma proteína de 20 kDa presente na glândula salivar seria a responsável pela maior parte desta proteção (Brown et al, 1984).

Outros antígenos têm sido estudados, identificados e caracterizados quanto a suas potencialidades de induzirem proteção, já tendo sido descritos uma provável aspartato-endopeptidase (BYC-“*Boophilus* Yolk Cathepsin”); Logullo et al, 1998; Da



Silva Vaz et al, 1998); uma cisteína –endopeptidase (Renard et al, 2000); uma proteína semelhante a mucina de vertebrados (Mckenna et al, 1998); a vitelina, uma proteína de reserva do ovo (Tellam et al, 2002); a 64P, proteína componente de cemento (Trimmel et al, 2002; Trimmel et al, 2005); a p29, uma proteína de matriz extracelular da glândula salivar (Mulenga et al, 1999); um inibidor de serina protease (Serpina, Imamura et al, 2005); uma nucleotidase (4F8), a proteína subolesina e a proteína 4E6, de função desconhecida (Almazán et al, 2003; Almazán et al, 2005); a proteína Voraxina, um fator de ingurgitamento de machos (Weiss & Kaufman, 2004); e uma metaloprotease (Metis 1, Decrem et al, 2008) .

#### 1.2.3.1 Antígenos expostos versus antígenos ocultos

Em geral, dois tipos distintos de alvos antigênicos têm sido explorados para o desenvolvimento de vacinas. O primeiro é o convencional antígeno secretado na saliva durante a fixação e alimentação do carrapato no hospedeiro, o então chamado antígeno exposto. Usualmente eles são proteínas ou peptídeos sintetizados na glândula salivar (Nuttall et al, 2006). Antígenos expostos são levados do sítio de alimentação do carrapato pelas células dendríticas (CDs), que processam e apresentam esses antígenos para os linfócitos T, iniciando uma resposta imune celular ou mediada por anticorpos (Allen et al, 1979; Larregina & Falo, 2005). Por outro lado, antígenos ocultos normalmente não estão em contato com os mecanismos imunes do hospedeiro (Willadsen & Kemp, 1988). Antígenos ocultos típicos são aqueles encontrados na parede do intestino e interagem com imunoglobulinas específicas levados na refeição de sangue (Nuttall et al, 2006). Os candidatos em potencial para compor uma vacina são os antígenos que: (1) encontram imunoglobulinas na hemolinfa ou no intestino e (2) estão associados com

alguma função vital do carrapato (De La Fuente & Kocan, 2006).

Os resultados da vacinação com antígenos expostos ou ocultos são similares, incluindo números reduzidos de carrapatos ingurgitados, aumento de mortalidade e redução no peso de fêmeas ingurgitadas, que reduz o número de ovos (Nuttall et al, 2006). No entanto, o modo de ação das vacinas baseadas em antígenos ocultos difere das vacinas baseadas em antígenos expostos (Willadsen, 2006). Embora antígenos ocultos não sejam capazes de induzir uma resposta imune durante a fixação e alimentação do carrapato, eles são imunogênicos quando preparados como extratos de tecidos do carrapato ou como proteínas recombinantes e, então, inoculados artificialmente para dentro do animal (De La Fuente & Kocan, 2006). Já vacinas baseadas em antígenos expostos normalmente não induzem uma resposta imune suficiente para induzir proteção ao hospedeiro, especialmente quando somente um antígeno é utilizado. Este fato é decorrente da farmacopéia de moléculas que são secretadas na saliva pelo carrapato e que atuam de forma redundante na modulação dos mecanismos hemostático, inflamatório e imune do hospedeiro (Nuttall et al, 2006).

### **1.3 Relação parasita-hospedeiro**

#### **1.3.1 Resposta imune contra o carrapato**

A alimentação do carrapato induz uma ordem complexa de respostas imunes nos hospedeiros envolvendo a apresentação de antígenos via células apresentadoras de antígenos (APCs), células-T, células-B, anticorpos, citocinas, sistema complemento, basófilos, eosinófilos e uma variedade grande de moléculas bioativas (revisada em Wikel, 1996; Brossard & Wikel, 2004). Essas interações

complexas podem ser consideradas como uma balança entre defesas do hospedeiro contra estratégias de invasão do carrapato, facilitando a alimentação e a transmissão de patógenos.

Os carrapatos possivelmente sofreram pressão evolutiva para que a sua composição pudesse inibir a resposta imune cutânea de seus muitos hospedeiros comuns (Ribeiro, 1987). Como as respostas imunes cutâneas, incluindo a produção de anticorpos, diferem entre espécies, existe a possibilidade de que, quando um carrapato se alimenta em hospedeiros não usuais, poderá ser gerada uma resposta imune cutânea que pode incluir anticorpos, histamina, serotonina, complemento e/ou linfocinas, levando a rejeição do carrapato (Steen et al, 2006). Em alguns casos a primeira exposição do hospedeiro a um carrapato pode não levar a rejeição, mas sim após exposições subseqüentes, constituindo-se na resistência adquirida ao carrapato (Wikel, 1996). Um estudo comparando reações imunológicas entre cobaias e cães infestados com *R. sanguineus*, mostrou que cobaias, que não são os hospedeiros usuais, podem adquirir resistência ao carrapato, com uma resposta de hipersensibilidade mediada por células tardia (DTH) envolvendo basófilos e células Th1. Por outro lado, cães, seus hospedeiros usuais, apresentaram uma imunossupressão durante o período de fixação do carrapato, prejudicando, assim, respostas mediadas por células T e reações DTH contra antígenos do carrapato (Ferreira et al, 2003). Em bovinos e outros animais de laboratório, já foi mostrado que a reação de hipersensibilidade tardia mediada por células Th1 cutâneas no sítio de fixação do carrapato induziu imunidade adquirida contendo infiltrados de basófilos e eosinófilos (Allen, 1973; Allen et al, 1977; Brossard & Fivaz, 1982). Vários estudos têm revelado que linfócitos T e citocinas fazem um papel crucial na determinação do resultado de infecções parasitárias em termos de imunidade protetora (Ferreira &

Silva, 1999). Citocinas medeiam a diferenciação ou a ativação de linfócitos e outras células, montando assim, respostas imunes adaptativas e inatas. Por exemplo, células Th1 produzem interleucina-2 (IL-2) e interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), enquanto células Th2 produzem IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 (Mosmann & Sad, 1996). Células Th1 conduzem a ativação de macrófagos e têm sido associadas com hipersensibilidade do tipo tardio. Por outro lado, células Th2 aumentam a eosinofilia e número de mastócitos, e melhoram a síntese de anticorpos. Macrófagos também participam produzindo IL-12, o fator de crescimento transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), e prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) (Mosmann & Moore, 1991). Infestações repetidas com *R. sanguineus* promoveu um perfil de citocinas Th2 em camundongos C3H/HeJ (Ferreira & Silva, 1999). Também em infestações repetidas com ninfas de *I. scapularis* livre de patógenos em camundongos BALB/C and C3H/HeJ, resultaram na polarização da resposta imune do hospedeiro para um padrão Th2 com a supressão de respostas Th1 (Schoeler et al, 1999).

Células T são elementos chaves nas funções reguladoras e efetoras do sistema imune, incluindo produção de anticorpos e imunidade mediada por células (Brossard & Wikel, 2004). O papel de linfócitos na expressão de resistência adquirida a larvas de *D. andersoni* foi demonstrada por transferência de células dos linfonodos de cobaias resistentes para animais suscetíveis (Wikel & Allen, 1976a). O envolvimento de células T foi também estabelecido por aplicar o imunossupressor ciclosporina A em coelhos infestados com *I. ricinus* (Girardin & Brossard, 1990). Linfócitos de bovinos infestados em laboratório realizaram blastogênese *in vitro* quando cultivados na presença de extrato da glândula salivar de carrapato. A reatividade é geralmente mais intensa com células obtidas depois de repetidas infestações (George et al, 1985). Em camundongos BALB/c infestados

repetidamente com ninfas de *I. ricinus*, linfócitos drenados ao sítio de fixação do carrapato produziram níveis significativamente maiores de TNF- $\alpha$  e monócitos e aumentaram a produção do fator estimulador de colônias de granulócitos e monócitos (GM-CSF), quando induzidos *in vitro* com concanavalina A (ConA) ou anticorpos anti-CD3 (Guanapano et al, 1996). GM-CSF induz a maturação de células de Langerhans (LCs) *in vitro* por manter sua viabilidade (Berthier et al, 2000). Células de Langerhans são uma das primeiras células a serem expostas a imunógenos do carrapato na pele, da qual essas células migram para os linfonodos (Allen et al, 1979). Na área paracortical dos linfonodos as LCs se transformam em DCs e é onde elas funcionam como APCs para os linfócitos T (Nithiuthai & Allen, 1984). LCs funcionais são necessárias para imunidade adaptativa inicial e para estimular uma resposta imune secundária a carrapatos (revisado por Brossard & Wikel, 2004).

Os hospedeiros produzem anticorpos contra elementos de carrapatos e estes estão relacionados com a resistência ao parasito que é transmitida, mesmo que fracamente, de forma passiva pelas vacas aos seus terneiros (Brossard & Giardin, 1979; Roberts & Kerr, 1976). Anticorpos não são os únicos elementos efetores do sistema imune contribuindo para a resistência adquirida (Brossard & Wikel, 2004). Infestações induzem a síntese de anticorpos reativos ao carrapato que se ligam a receptores Fc em mastócitos e basófilos. Essas células são ativadas e liberam moléculas bioativas, incluindo histamina, prostaglandinas e enzimas no local de fixação do carrapato, o que contribui para o desenvolvimento da imunidade adquirida (revisado por Wikel, 1996). Uma correlação positiva foi estabelecida entre a concentração de histamina na pele e o grau de resistência adquirida por bovinos contra *R. microplus* (Willadsen et al, 1979).

O sistema complemento também está envolvido na resposta contra carrapatos. A resistência adquirida contra larvas do carrapato *D. andersoni* em cobaias foi inibida dramaticamente pela depleção de C3 com fatores presentes em veneno de cobra (Wikel & Allen, 1977). O extrato de glândula salivar de *I. ricinus* é capaz de inibir a via alternativa do complemento (Lawrie et al, 1999) e o *I. scapularis* possui um inibidor de C3 convertase, o que demonstra que a ativação do sistema complemento é importante na aquisição de resistência pelo hospedeiro. A ativação da cascata do complemento no local da fixação do parasito gera mediadores inflamatórios, quimiotáticos e opsoninas que resultam na atração de leucócitos (Allen, 1973; Brossard & Fivaz, 1982; Steeves & Allen, 1991).

### 1.3.2 Imunossupressão

Um tema comum em toda a relação parasito-hospedeiro parece ser a habilidade do agente infeccioso em alterar as defesas imunes do hospedeiro modulando várias vias reguladoras e/ou efectoras (Steen, 2006). Considerando-se o tempo evolutivo, artrópodes que se alimentam de sangue provavelmente desenvolveram estratégias de supressão das defesas do hospedeiro que afetam diretamente a sobrevivência dos artrópodes. Moléculas imunossupressoras da glândula salivar não estão limitadas a organismos que se alimentam de sangue por longos períodos. Por exemplo, fatores capazes de modular a resposta imune do hospedeiro aparecem nas glândulas salivares de *Simulium vittatum* (Cross et al, 1993) e *Aedes aegypti* (Bissonnette et al, 1993). A imunossupressão mediada pelo vetor ajuda na aquisição da refeição de sangue, assim como, em uma transmissão efetiva de patógenos. Além disso, as respostas a artrópodes e patógenos envolvem

elementos comuns do sistema imune (Wikel, 1996). Algumas das estratégias imunomodulatórias empregadas incluem: inibir a função das células apresentadoras de antígenos; reduzir a função dos linfócitos T; suprimir e desviar a produção e ação das citocinas; diminuir as respostas de anticorpos; diminuir a clivagem enzimática de imunoglobulinas; e bloquear a ativação do sistema complemento (revisado por Wikel, 1999). Para poder alimentar-se por dias a até semanas o carrapato possui em sua saliva componentes que suprimem estas respostas hemostáticas, inflamatórias e imunes do hospedeiro. Estes componentes são encontrados em numerosas formas incluindo enzimas, inibidores de enzimas, proteínas ligantes de imunoglobulinas, lipocalinas (proteínas ligantes de histamina) e inibidores de integrinas (revisado por Steen et al, 2006).

A supressão da função das APCs e linfócitos T reduz a habilidade de gerar e expressar imunidade efetiva para qualquer tipo de imunógeno, incluindo aqueles associados aos patógenos transmitidos pelo carrapato (Wikel, 1996).

A infestação por carrapatos é frequentemente caracterizada por uma redução na resposta de linfócitos do hospedeiro à estimulação por Con A e fitoemaglutinina (PHA), o que é geralmente interpretado como um fenômeno imunossupressivo (Brossard & Wikel, 1977; Turni et al, 2007). Essa resposta reduzida poderia ser resultado da produção diminuída da IL-2 causada por componentes da saliva do carrapato como a PGE<sub>2</sub> (Ribeiro et al, 1985; Inokuma et al, 1994) ou proteínas ligantes de IL-2 (Gillespie et al, 2001).

Infestações por *D. andersoni* reduzem a proliferação de linfócitos T *in vitro* induzida por ConA (Wikel, 1982) e o desenvolvimento de uma resposta primária humoral (Wikel, 1985). Uma proteína imunossupressora, Da-p36, massa molecular de 36 kDa, presente na saliva e glândula salivar de *D. andersoni*, com atividades de

supressão na proliferação de linfócitos T e com propriedade de se ligar em imunoglobulinas, foi encontrada em larvas logo após a sua fixação ao hospedeiro aumentando sua quantidade de uma forma acentuada entre o 2º e o 4º dia de alimentação (Bergman et al, 2000). Raças *B. taurus* e *B. indicus* não-infestados apresentaram uma redução de linfócitos em resposta a ConA quando cultivados na presença de extrato de glândula salivar (SGE) de *D. andersoni* (Ramachandra & Wikel, 1995). Também quando estimulados com ConA, SGE e saliva de fêmeas de *I. ricinus* inibiram a proliferação e a produção *in vitro* de IL-2 por linfócitos do baço de camundongos BALB/c sem exposição prévia ao carrapato (Ganapano et al, 1996a; Mejri et al, 2002).

A alimentação de carrapatos reduz a habilidade de cobaios de gerar resposta de anticorpos a um imunógeno administrado durante o curso da infestação ou inoculado vários dias depois do término da alimentação (Wikel, 1985). A imunização de coelhos infestados com *R. appendiculatus* resulta em uma diminuída resposta de anticorpos quando comparado com o grupo controle (Fivaz, 1989). Infestações repetidas por ninfas de *I. ricinus* em camundongos BALB/c resultaram em supressão de mitógenos (LPS e PWN), anticorpos totais e número de basófilos no local da picada (Dusbábek, 1995).

Estudos *in vitro* mostraram que a saliva do carrapato *R. sanguineus* inibe a quimiotaxia de DCs pela diminuição da expressão do receptor de quimiocina CCR5, reduzindo a função quimiotática da proteína inflamatória de macrófagos MIP-1 $\alpha$ . DCs cultivadas com saliva do carrapato revelaram-se pobres estimuladores na produção de citocinas por células T específicas (Oliveira et al, 2008). Além disso, foram identificadas na saliva dessa espécie de carrapato, proteínas ligantes de quimiocinas que apresentaram atividade antiinflamatória (Déruaz et al, 2008).



Peterková et al (2008) descreveram um arsenal de moléculas salivares imunomodulatórias com atividade anti-quimiocinas presentes em ninfas de *D. reticulatus*, *I. ricinus* e *A. variegatum*.

A saliva de *I. dammini* inibiu a ligação de componentes do complemento C3b e C5b em superfícies onde C3b poderia contribuir para a iniciação e ativação seqüencial dos componentes da via alternativa da ativação do complemento, assim como melhorar a fagocitose de substâncias ligadas a essas moléculas (Ribeiro, 1987). Uma proteína salivar, a Salp20 identificada em *I. scapularis*, inibiu a via alternativa do complemento dissociando os componentes da C3 convertase (Tyson et al, 2007). Além disso, a saliva desta espécie de ixodídeo inibiu a produção da anafilatoxina C3a, que é importante na liberação de mediadores de mastócitos e basófilos (Ribeiro, 1987).

### 1.3.3 Resistência dos bovinos ao carrapato

Os bovinos são hospedeiros naturais do carrapato *R. microplus* e constituem o único modelo no qual é possível examinar, numa mesma espécie, os desfechos distintos de resistência e susceptibilidade das infestações com esse parasita. Ainda existem dúvidas sobre quais seriam os mecanismos responsáveis por esses desfechos distintos, mas a composição da saliva dos carrapatos indica que a resposta imune é um deles. Ainda em relação a bovinos, a maioria dos estudos sobre aquisição de resistência avalia o fenômeno em raças taurinas que, embora desenvolvam imunidade, não controlam as infestações com a mesma eficiência das raças zebuínas (Mattioli & Cassma, 1995; Wambura et al, 1998; Mattioli et al, 2000).

É conhecido que a resistência ao carrapato em bovinos é adquirida durante as sucessivas infestações pelo parasito (Allen, 1994). Uma das diferenças entre os

animais quanto à resistência ao carrapato é, portanto, ao nível da resposta imune, a qual é mais eficaz no *B. indicus* do que no *Bos taurus*, sendo que componentes da saliva são os prováveis alvos desta resposta. Níveis e sub-classes de IgG anti-glândula salivar correlacionam-se com a resistência naturalmente adquirida (Kashino et al, 2005). Grande parte desta resistência se manifesta durante as primeiras 24 horas de fixação das larvas no hospedeiro (Roberts, 1968). Animais muito resistentes rejeitam 99% das larvas (Allen, 1994), enquanto que animais suscetíveis rejeitam somente entre 80% e 85% (Tatchell, 1987).

A resistência adquirida ao carrapato normalmente é expressa pela redução do volume da refeição de sangue, redução do peso final do carrapato ingurgitado, diminuição no número de ovos na postura, redução da viabilidade dos ovos e a morte de carrapatos ingurgitados (Wikel, 1996).

Essa resistência dita “natural” foi inicialmente especulada como decorrente de um mecanismo fisiológico inato, como secreções sebáceas repelentes, tipos de pele e pelos e/ou substratos não compatíveis com enzimas digestivas dos carrapatos (Roberts, 1968a). Entretanto vários experimentos comprovaram que esta resistência envolve reações imunológicas. Foi observado por Trager (1939) que cobaias e coelhos infestados com o carrapato *D. variabilis* adquiriram resistência, e que esta era parcialmente transferível com a inoculação do soro de animais resistentes em animais suscetíveis. Já a transferência de células de linfonodos de cobaias, tornadas resistentes por repetidas infestações com *D. andersoni*, para cobaias suscetíveis, produziu uma resistência significativamente maior do que a inoculação do soro, levando a conclusão que, além da resposta humoral, a resposta celular também está presente e aparentemente é mais eficiente (Wikel & Allen, 1976a). Também foi demonstrado que a resistência pode ser eliminada com o uso do imunossupressor

ciclofosfamida (Wikel & Allen, 1976b). Parte desta resistência também é perdida em cobaios utilizando-se o fator de veneno de cobra, indicando novamente o envolvimento do sistema complemento na resposta contra o carrapato (Wikel & Allen, 1977). Com relação a bovinos, a resistência ao *R. microplus* foi inicialmente indicada como decorrente de reações imunológicas por Roberts (1968b). Posteriormente foi comprovado que tanto o *B. taurus* como o *B. indicus*, não previamente expostos ao carrapato, eram igualmente suscetíveis na primeira infestação (Wagland, 1975). Uma das diferenças entre estes animais quanto à resistência ao carrapato é, portanto, ao nível da resposta imunológica, a qual é mais eficaz no *B. indicus* do que no *B. taurus*.

Estudos sobre a diferença de resistência das raças bovinas européias, nacionais e zebuínas ao *R. microplus* demonstraram que o primeiro grupo é mais susceptível que os demais, inclusive havendo diferença entre a susceptibilidade de cada raça dentro dos grupos, assim como diferenças individuais dentro da mesma raça. Os critérios de comparação utilizados foram o número e tamanho dos carrapatos, acima de 4,0 mm, ou seja, contaram-se apenas as fêmeas totalmente ingurgitadas (Villares, 1941).

A resistência não afeta apenas a contagem de carrapatos. As fêmeas totalmente ingurgitadas produzidas por bovinos da raça Santa Gertrudis apresentavam dimensões (comprimento, largura e altura) e peso menores que aquelas produzidas em animais da raça Aberdeen Angus (Maraday & Gonzales, 1984).

Comparando-se a resistência das raças Canchim e Nelore, através de infestação artificial e infestação natural, Oliveira et al (1990) demonstraram que há efeito significativo na interação entre a raça e a estação. Guaragna et al (1992)

também observaram os efeitos de ano, estação e raça, estudando infestações artificiais em touros holandeses e mantiqueiros, de 1 e 2 anos, sendo os primeiros considerados menos resistentes, apesar das duas raças serem consideradas suscetíveis.

#### **1.4 Objetivos**

Este trabalho teve como objetivo geral descrever a análise da resposta imune humoral de bovinos repetidamente infestados com *R. microplus*, e a possível correlação com resistência desenvolvida pelos bovinos sob infestações pesadas e leves. Os objetivos específicos constituíram-se em:

1. Comparação da resposta imune humoral de bovinos infestados com carrapatos ao longo de infestações sucessivas;
2. Comparação do perfil de reconhecimento de moléculas antigênicas após as infestações;
3. Avaliar os índices de número e peso médio de carrapatos que completam o ciclo parasitário durante infestações pesadas e leves;
4. Análise da resposta imune humoral contra extratos protéicos de glândula salivar, intestino e larva do carrapato;
5. Analisar o reconhecimento de moléculas ao longo das infestações.

## 2 ARTIGO CIENTÍFICO

Artigo aceito para publicação no periódico Veterinary Parasitology.

**“Comparative IgG recognition of tick extracts by sera of experimentally infested bovines”.**

Cruz, A.P.R.<sup>(1,2) +</sup>; Silva, S.S.<sup>(3) +</sup>; Mattos, R.T.<sup>(1,2)</sup>; Da Silva Vaz Jr., I.<sup>(2)</sup>; Masuda, A.<sup>(2)</sup>;  
Ferreira, C.A.S.<sup>(1) \*</sup>.

<sup>1</sup>Laboratório de Imunologia e Microbiologia, Faculdade de Biociências, PUCRS;

<sup>2</sup>Laboratório de Imunologia Aplicada a Sanidade Animal, Centro de Biotecnologia,

UFRGS. <sup>3</sup>Departamento de Veterinária Preventiva, UFPel.

# **Comparative IgG recognition of tick extracts by sera of experimentally infested bovines**

Cruz, A.P.R.<sup>(1,2)+</sup>; Silva, S.S.<sup>(3)+</sup>; Mattos, R.T.<sup>(1,2)</sup>; Da Silva Vaz Jr., I.<sup>(2)</sup>; Masuda, A.<sup>(2)</sup>;  
Ferreira, C.A.S.<sup>(1)\*</sup>.

<sup>1</sup>Laboratório de Imunologia e Microbiologia, Faculdade de Biociências, PUCRS;

<sup>2</sup>Laboratório de Imunologia Aplicada a Sanidade Animal, Centro de Biotecnologia, UFRGS.

<sup>3</sup>Departamento de Veterinária Preventiva, UFPel.

+ Both authors contributed equally to this work.

\*Corresponding author: Carlos Alexandre Sanchez Ferreira

Av. Ipiranga, 6681 – prédio 12- CEP 90619900 – Porto Alegre- RS – Brazil

Phone: 55 51 3320-3545 – Fax: 55 51 3320-3612

e-mail: cferreira@puers.br

## **Abstract**

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and Western Blot were used to investigate the pattern of antibody responses of six bovines infested twelve times with *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) (six heavy infestations followed by six light infestations) against salivary gland, gut and larvae extracts. During heavy infestations, bovine IgG levels were shown to be higher, and a decrease in the number and weight of ticks that completed the parasitic cycle was observed. The pattern changed starting from the seventh infestation, showing a decrease in IgG levels. An initial increase followed by a significant decrease in the proportion of ticks that completed the parasitic cycle was also observed from the seventh infestation. The number of molecules

recognized by Western Blot was higher from sera collected following heavy infestations than after light infestations, although a great variation in the profiles detected could be seen when the bovines were compared. These results indicate that IgG responses to different tick antigens may not be generally associated with bovine resistance, and that infestation levels modulate the magnitude of humoral responses and possibly the immune mechanisms in the natural acquisition of tick resistance.

**Keywords:** *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*; IgG; Naturally acquired tick resistance

## 1. Introduction

The tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* is a hematophagous ectoparasite of bovines, and constitutes a major health concern as a debilitating parasite and vector of a great variety of diseases, such as bovine babesiosis and anaplasmosis (Ribeiro et al., 2007).

Currently, the control strategies against tick infestation are almost exclusively focused on synthetic chemicals applied during its parasitic phase. Control of ticks by vaccination offers a number of advantages, like cost-effectiveness, reduced environmental contamination, and the prevention of the selection of drug-resistant ticks that result from repeated acaricide application (Barros and Evans, 1989; Gomes et al., 1999; Willadsen, 2006). But the development of an immunological control strategy depends on the identification of tick immunogenic molecules able to induce a host's protective immune response. Concerning potential antigens, two kinds of molecules are described: (i) "exposed" antigens, which are naturally in contact with the host immune system during tick infestation, such as those secreted in the saliva during attachment and feeding on a host; (ii) and "concealed" antigens, which are not naturally exposed (or recognized by) to the host's immune system (Nuttall et al., 2006; de la Fuente and Kocan, 2006). In addition, development of vaccines using multiple

antigens that could target a broad range of tick species and further prevent or reduce transmission of pathogens would become a great advancement in veterinary sanitation (da Silva Vaz et al., 2004; de la Fuente et al., 2007).

Cattle acquire resistance to a variety of tick species with repeated exposure (Wikel and Whelen, 1986). The host's immune response causes premature detachment, reduced engorgement size, increased mortality, decreased fecundity and diminished hatching of ticks (Barriga et al., 1993). Therefore the analysis of the immune responses developed by infested bovines may become of great importance in the identification of the characteristics of this resistance. Here we reported the analysis of the IgG response of bovines repeatedly infested with *R. microplus* and the development of resistance by hosts under heavy and light infestations.

## **2. Material and methods**

### *2.1. Infestation*

Six male *Bos taurus taurus* Hereford calves of about 6 months of age were purchased from an area free of *R. microplus*. Heavy infestations were performed with each calf being infested once a month for 6 months with 18000 *R. microplus* larvae along the back. Light infestation ensued, with each calf being infested once a month for more 6 months with 800 *R. microplus* larvae. The ticks used were of the Bagé strain (Barriga et al., 1995), and the proportion of females was considered as 50% (da Silva et al., 2007).

### *2.2. Antigen preparation*



Antigens were obtained from twelve-day old larvae, partially- and fully-engorged female ticks according to da Silva Vaz et al. (1994). Briefly, the dorsal surface was dissected and gut and salivary glands were separated and washed in PBS. The tissues were sonicated and solubilized in a medium containing 0.5% sodium deoxycolate, 0.1% pepstatin A, 0.1% leupeptin and 0.1 mM N-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone (TPCK) in 10 mM tris buffer (pH 8.2). The material was centrifuged and the supernatants were stored at  $-70^{\circ}\text{C}$ . The protein concentration was measured according to Bradford (1976).

### 2.3. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Microtitration plates were coated with 3  $\mu\text{g}$  per well of antigen in 20 mM carbonate buffer (pH 9.6) by incubation overnight (Harlow and Lane, 1988). Plates were blocked with 5% nonfat dry cow milk-PBS (blotto), and incubated with sera diluted 1:50. Rabbit anti-bovine IgG-peroxidase conjugate (diluted 1:6000 in blotto 5%) was then used, and chromogen and substrate were added (3.4 mg o-phenylenediamine, 5  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  in 0.1 M citrate-phosphate buffer, pH 5.0). The reaction was stopped with 12.5%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  and the optical density (OD) was determined at 492 nm. Sera from the six bovines collected after each infestation were tested six times against *R. microplus* tissue on three different microplates.

### 2.4 Western blot

For the Western-blot analysis, tissue extracts were separated by SDS-PAGE 10% gel electrophoresis under denaturing conditions and transferred to nitrocellulose in 12 mM carbonate buffer pH 9.9 (Dunn, 1986). The strips were blocked with 5% blotto and the test sera were diluted 1/50 in 5% blotto and incubated overnight. Membranes were incubated with

rabbit anti-bovine IgG antibody conjugated to alkaline phosphatase (Sigma) diluted 1/10000 in blotto and stained with 5-bromo-4-chloro-3-indolyphosphate (BCIP) and nitroblue tetrazolium (NBT). All Western-blot analyses were performed using the pre-immune bovine sera or incubations with secondary antibody alone as negative controls.

### *2.5. Statistical analyses*

The variance analysis was used to compare the percentile of tick recovery, after transformation in logarithmic scale, in function of the successive infestations. The Tukey's test was used to reveal the significance order (Statistix®.v8.0, 2003. Tallahassee, FL: Analytical Software). For the comparison of the mean weights of detached engorged females the test used was of Kruskal-Wallis. The values were considered different to the level of  $P < 0.05$ .

## **3. Results**

### *3.1 Total numbers and mean weights of detached female ticks during infestations*

The mean percentiles of detached adult female ticks throughout infestations are shown in figure 1 (Table 1, available online as additional information, shows the total numbers of detached female ticks after each infestation in the six bovines). The percentile of recovered ticks after infestation 7 was higher, which was significantly different from most of the other infestations, except for infestations 1, 8 and 9 ( $P < 0.05$ ). Infestation 12 presented the smallest recovery of ticks, significantly different from the recovery rate observed for infestations 1 to 9.

The mean weights of detached females (Fig. 2) produced during infestation 6 were significantly lower than those of all other infestations. Also, the values obtained in infestation 1 decreased following the remaining heavy infestations, but they were shown to be similar of those from infestations 7 and 8, within the beginning of light infestations.

### *3.2. Variations in the IgG levels and profiles of antigen recognition during infestations and between bovines*

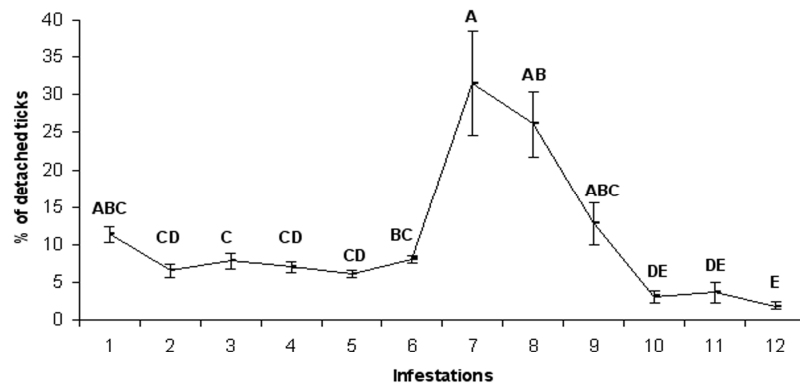
ELISA was used to compare the IgG levels developed against *R. microplus* salivary gland, gut and larvae protein extracts of sera from six bovines submitted to heavy and light infestations (Fig. 3). Figure 3A shows that the means of salivary gland antigens recognition presented a major increase in infestation 2, after which a decrease was seen. A major increase in IgG levels against gut antigens (Fig. 3B) could be detected in the sera collected after infestations 3 and 6, which then decreased and stabilized until the last infestation. Similarly, anti-larvae IgG levels (Fig. 3C) presented a peak in sera from infestation 3, after which a decrease occurred, with stabilization in infestations 9 to 12.

The antigen recognition profiles of salivary gland, gut and larvae protein extracts by sera of the infested bovines are shown in Fig. 4. A considerable variation was observed between individuals. Fig. 4A shows that greater numbers of salivary antigens were recognized by the sera from infestations 2 to 8, though this recognition diminished from infestations 10 to 12. Bands of 130 kDa, 97.6 kDa and 86 kDa were recognized by all bovine sera in all infestations. Two bands of 20 kDa and 35 kDa were detected in sera from bovines 1, 5 and 6 in the last infestations.

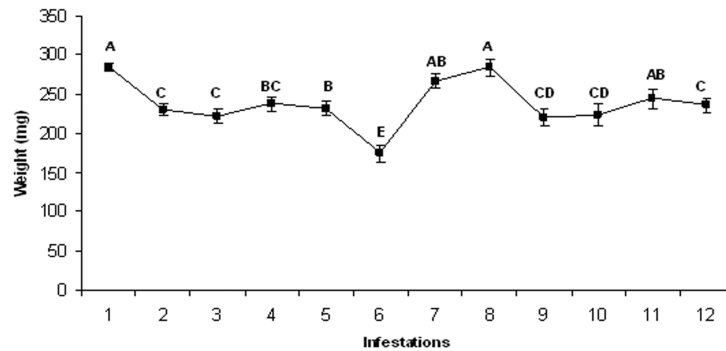
The recognition of gut antigens was shown to be greater from infestations 2 to 8, as compared to sera collected in the last infestations (Fig. 4B). A 103.6-kDa antigen was

recognized by bovines 1 and 5, mainly in the sera from the last infestations, and bovine 6 recognized this antigen only in infestation 12. All bovines recognized a 125.6-kDa antigen in the first infestations. Bovine 1 generated a profile with the highest number of recognized molecules, some of which were recognized exclusively by this individual, such as antigens of 85.4, 69.8, 25 and 19.3 kDa.

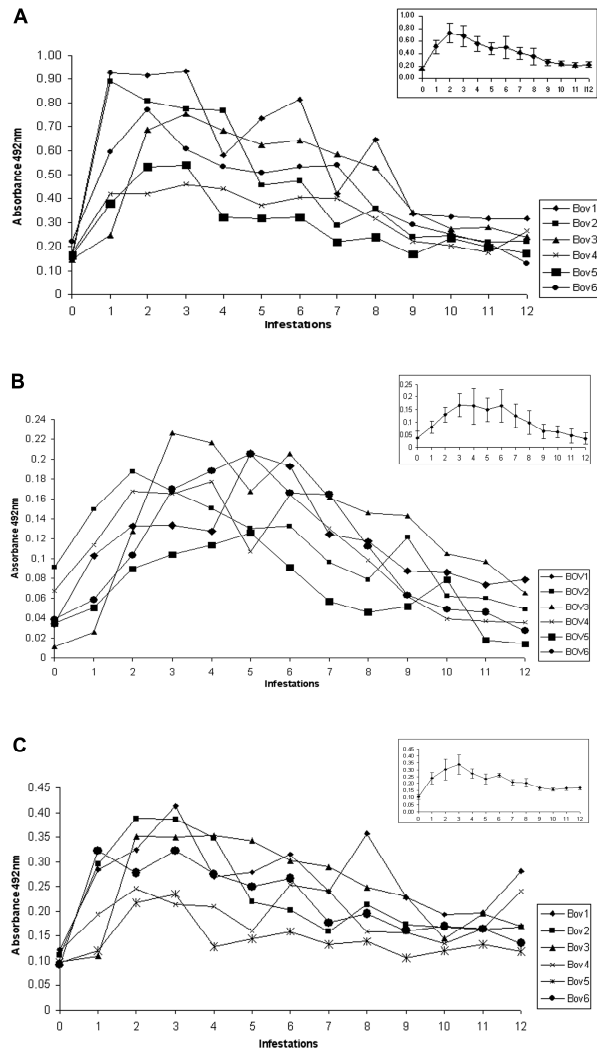
The recognition profiles against the larvae extract (Fig. 4C) showed a considerable number of antigens recognized in the sera collected from infestations 2 to 6, which decreased in the following infestations. Low-molecular mass antigens presented higher reactivity mainly against the sera from the first infestations: 33.6 kDa and 25.1 kDa were detected by sera from infestations 2 to 6 of bovines 1, 3 and 5; bovine 2 recognized a 25.1-kDa antigen only in the serum from infestation 4; bovines 2 and 6 recognized a 15.5 kDa in sera obtained after infestations 2 to 6.



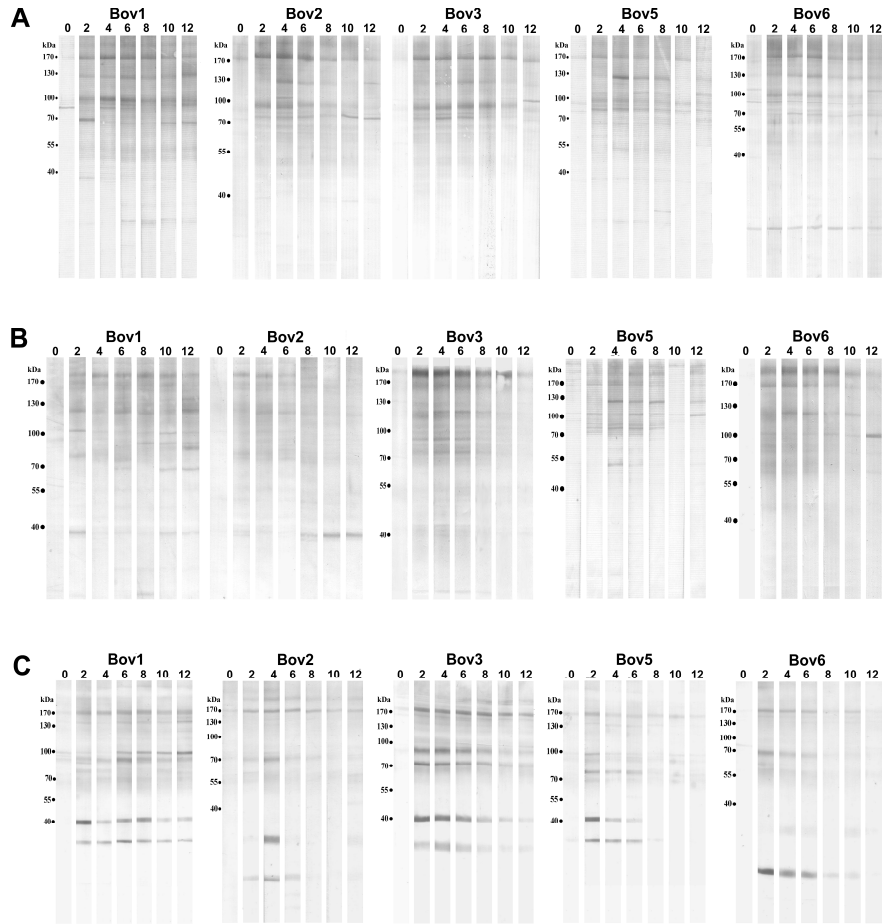
**Figure 1:** Mean ( $\pm$  SE) percentiles of number of detached adult female ticks of 6 bovines infested successively for 12 months with *R. microplus* larvae (infestations from 1 to 6 with 18000 larvae and from 7 to 12 with 800 larvae).



**Figure 2:** Mean ( $\pm$  SE) of individual weight of detached engorged females (mg) of 6 bovines infested successively for 12 months.



**Figure 3:** IgG levels of infested bovine to *R. microplus* antigens measured by ELISA. Extract of salivary gland (A), gut (B) and larvae (C) were used as antigens. The upper box represents the means ( $\pm$  SE) of the sera for six infested bovine.



**Figure 4:** Western blot analyses of *R. microplus* antigens recognized by pre-infestation (0) and post-infestation (2 to 12) sera collected after experimental infestations. Extracts from (A) salivary glands, (B) guts, and (C) larvae were used as antigen.

#### 4. Discussion

The main purpose of the current investigation was to evaluate the profiles of humoral antigenic recognition from salivary gland, larvae and gut extracts of *R. microplus*, as a result of repeated exposure under high and low tick densities. The reactivity degrees detected by ELISA and the profiles of molecules recognized by western blot observed indicate the presence of individual variations between bovines, suggesting that humoral immune responses against different molecules may account, if related, for the resistance to tick infestations. End-point titration assays (Figs. 3A, 3B, and 3C) determined that the animals presented higher levels of IgG against different antigens of *R. microplus* during heavy infestations as compared to light infestations, suggesting that the variations in the IgG levels and profiles of antigenic recognition may be modulated by tick infestation levels. These results are in agreement with observations from sheep naturally exposed to the tick *Ixodes ricinus*, as the IgG responses to salivary gland extract varied between seasons, which were higher in spring (heavy infestation period) than in autumn of 1999 (low infestation period) (Ogden et al., 2002a).

Heavy infestations seem to have caused a decrease in the number and the mean weight of ticks that completed the parasitic cycle (Fig. 1 and 2), and induced a higher level of IgG response against all the extracts analyzed. Furthermore, infestation 6 showed a significant decrease in the mean weight of recovered ticks, in comparison to all other infestations. This reduction is consistent, at least partially, if taken as a consequence of the high levels of anti-tick IgG developed. However, this effect was shown to be comparatively ineffective against the first light infestations, showing an increase in the tick recovery index and in mean weight of these ticks (infestations 7 and 8). This pattern was more similar to that seen in infestation 1, when the bovines presumably did not possess any anti-tick adaptative immune response, as compared to the patterns of any other infestation. The variation in the patterns of resistance



may indicate that the immune response developed against the tick after the six first heavy infestations were not protective against the first light infestations.

On the other hand, the last infestations (10, 11 and 12) showed a significant decrease in the proportion of ticks that completed the parasitic cycle, presenting simultaneously very low levels of anti-tick IgG, although the mean weight of the recovered ticks did not reach the values obtained in infestation 6. These results indicate two important points. First, light and heavy consecutive infestations present differences in the expression of resistance. Similarly, sheep infested with *I. ricinus* exhibit density-dependent intraspecific facilitation at different infestation levels (Ogden et al., 2002b). As the lowest number of recovered ticks was obtained after infestation 10, the second important point is that a different protective immune response was developed against less intense infestations, with a different contribution of the IgG response. Ogden et al., (2002a) observed similar results in sheep naturally exposed to *I. ricinus*, as IgG levels against salivary gland extract vary inversely with resistance in the low infestation period. It is well established that *R. microplus* infestation levels are intensively influenced by seasonal factors (Brum et al., 1987; Furlong, 1993). Therefore, it may be assumed that cattle herds also alter levels and/or mechanisms of anti-tick immune responses during the year in response to different seasonal tick densities, as seen on the experimentally infested bovines.

Higher anti-tick IgG levels and a major number of tick molecules were detected by bovine sera when the salivary gland extract was analyzed by ELISA and Western blot. In Western blot, a greater number of salivary gland antigens was recognized by the sera collected after the first infestations of all bovines, corroborating the higher IgG levels detected by ELISA. The profiles of the sera from the last infestations predominantly showed a lower number of bands, in comparison to the higher infestation sera, but it could also be seen that new molecules were recognized. For example, two bands, of 20 kDa and 35 kDa, were

detected from sera of bovines 1, 5 and 6 after the last infestations. A 20-kDa salivary protein was identified by Brown et al. (1984) from *Amblyomma americanum*, which was thought to be a component of tick cement and was immunogenic in guinea pigs and elicited protective immunity in vaccine/challenge experiments (Brown and Askenase, 1986). A larval *R. microplus* 19.1-kDa protein, possibly the same described by Willadsen and Ridding (1979) as 18.5 kDa, was shown to be recognized by infested cattle, and induced immediate-type hypersensitivity responses (Pruett et al., 2006). Another 36-kDa salivary protein, identified from *Dermacentor andersoni*, has been shown to inhibit T lymphocyte proliferation (Bergman et al., 1995).

Using gut extract (Fig.4) as the antigenic source, the responses of the bovines showed that the heavy molecules, of 125.6 kDa and 103.6 kDa, were recognized by most of the bovines and in almost all infestations. These antigens are components most likely shared with the salivary glands, although some controversy may arise concerning the possible regurgitation of gut contents (Kemp et al., 1982; Brown, 1988). The low mass larvae antigens, of 15.5 kDa, 25.1 kDa and 33.6 kDa, were detected with more intensity in the sera from the first infestations, in most bovines. Future identification and cloning of these antigens may contribute to the development of an anti-tick vaccine.

### **Acknowledgements**

The authors are grateful to CAPES, FAPERGS, CNPq, and CNPq/PRONEX-FAPERJ for their financial support to the present work, and Paula R.M. De Lisa who provided excellent technical assistance.

### **References**

- Barriga, O.O., da Silva S.S., Azevedo, J.S.C., 1993. Inhibition and recovery of tick function in cattle repeatedly infested with *Boophilus microplus*. *J. Parasitol.* 79, 710-715.
- Barriga, O.O., da Silva S.S., Azevedo, J.S.C., 1995. Relationships and influences between *Boophilus microplus* characteristics in tick-naïve or repeatedly infested cattle. *Vet. Parasitol.* 56, 225-238.
- Barros, A.T.M., Evans, D.E., 1989. Ação de gramíneas forrageiras em larvas infestantes do carrapato dos bovinos, *B. microplus*. *Pesqui. Vet. Bras.* 9, 17-21.
- Bergman, D.K., Ramachandra, R.N., Wikel, S.K., 1995. *Dermacentor andersoni*: Salivary gland proteins suppressing T-lymphocyte responses to Concanavalin A in vitro. *Exp. Parasitol.* 81, 262-271.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Brown, S.J., 1988. Evidence for regurgitation by *Amblyomma americanum*. *Vet. Parasitol.* 28, 335-342.
- Brown, S.J., Askenase, P.W., 1986. *Amblyomma americanum*: physiochemical isolation of a protein derived from the tick salivary gland that is capable of inducing immune resistance in guinea pigs. *Exp. Parasitol.* 62, 40-50.
- Brown, S.J., Shapiro, S.Z., Askenase, P.W., 1984. Characterization of tick antigens inducing host immune resistance. Immunization of guinea pigs with *Amblyomma americanum*-derived salivary gland extracts and identification of an important salivary gland protein antigen with guinea pig anti-tick antibodies. *J. Immunol.* 133, 3319-3325.

- Brum, J.G.W., Costa, P.R.P., Ribeiro, P.B., Gonzales, J.C., 1987. Flutuação sazonal do *B. microplus* (Canestrini, 1887) no município de Pelotas, RS. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, Belo Horizonte 39, 891-896.
- Da Silva, A.M., de Alencar, M.M., Reginato, L.C.A., Oliveira, M.C.S., Barioni, W.Jr., 2007. Artificial infestation of *Boophilus microplus* in beef cattle heifers of four genetic groups. Genet. Mol. Biol. 4, 1150-1155.
- Da Silva Vaz Jr., I., Ozaki, L.S., Masuda, A., 1994. Serum of *Boophilus microplus* infested cattle reacts with different tick tissue. Vet. Parasitol. 52, 71-78.
- Da Silva Vaz Jr., I., Torino, L.T., Michelon, A. Ferreira, C.A.S., Freitas, D.R., Termignoni, C., Masuda, A., 2004. Effect of acaricides on the activity of a *Boophilus microplus* glutathione S-transferase. Vet Parasitol. 119, 237-45.
- De la Fuente, J., Almazán, C., Canales, M., de la Lastra, J.M.P., Kocan, K.M., Willadsen, P., 2007. A ten-year review of commercial vaccine performance for control of tick infestations on cattle. Anim. Health Res. Rev. 8, 23-28.
- De la Fuente, J., Kocan, K.M., 2006. Strategies for development of vaccines for control of ixodid tick species. Parasite Immunol. 28, 275-283
- Dunn, S.D., 1986. Effects of the modification of transfer buffer composition and the renaturation of proteins in gels on the recognition of proteins on Western-blot by monoclonal antibodies. Anal. Biochem. 157, 144-153.
- Furlong, J., 1993. Controle do carrapato dos bovinos na região Sudeste do Brasil. Caderno Técnico da Escola Veterinária UFMG 8, 49-61.
- Gomes, A., Koller, W.W., Furlong, J., 1999. Diagnóstico da resistência a carrapaticidas do *Boophilus microplus* em bovinos de corte e leite no Estado de Mato Grosso do Sul. Seminário Brasileiro De Parasitologia Veterinária, 11. Anais Ilhéus: CBPV/Universidade Estadual de Santa Cruz, Salvador, pp. 74-75.

- Harlow, E., Lane, D., 1988. *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harb. Labor. New York, pp. 726.
- Kemp, D.H., Stone, B.F., Binnington, K.C., 1982. Tick attachment and feeding: role of the mouthparts, feeding apparatus, salivary gland secretions and host response. In: Obenchain, F.D., Galun, R. (Eds.) *Physiology of Ticks*. Pergamon Press, Oxford, UK, pp. 119-168.
- Nuttall, P.A., Trimmell, A.R., Kazimirova, M, Labuda, M., 2006. Exposed and concealed antigens as vaccine targets for controlling ticks and tick-borne diseases. *Parasite immunol.* 28, 155-163.
- Ogden, N.H., Casey, A.N.J., Lawrie, C.H., French, N.P., Woldehiwet, Z., Carter, S.D., 2002a. IgG responses to salivary gland extract of *Ixodes ricinus* ticks vary inversely with resistance in naturally exposed sheep. *Med. Vet. Entomol.* 16, 186-192.
- Ogden, N.H., Casey, A.N., French, N.P., Adams, J.D., Woldehiwet, Z. 2002b. Field evidence for density-dependent facilitation amongst *Ixodes ricinus* ticks feeding on sheep. *Parasitology* 124, 117-125.
- Pruett, J.H., Untalan, P.M., Davey, R.B., 2006. Identification and partial purification of serologically defined *Boophilus microplus* larval antigens by natural ectoparasite exposure. *Vet. Parasitol.* 140, 148-157.
- Ribeiro, V.L.S., Toigo, E., Bordignon, S.A.L., Gonçalves, K., Poser, G.V., 2007. Acaricidal properties of extracts from the aerial parts of *Hypericum polyanthemum* on the cattle tick *Boophilus microplus*. *Vet. Parasitol.* 147, 199-203.
- Wikel, S.K., Whelen, A.C., 1986. Ixodid-host immune interaction. Identification and characterization of relevant antigens and tick-induced host immunosuppression. *Vet. Parasitol.* 20, 149-174.
- Willadsen, P., 2006. Tick control: Thoughts on a research agenda. *Vet. Parasitol.* 138, 161-168.

Willadsen, P., Riding, G.A., 1979. Characterization of a proteolytic-enzyme inhibitor with allergenic activity. Multiple functions of a parasite-derived protein. *Biochem. J.* 177, 41-47.

### 3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O carrapato *R. microplus* passa 19-26 dias fixado no seu hospedeiro bovino (Stewart & de Vos, 1984). Esse período de alimentação prolongado induz respostas do hospedeiro, incluindo imunidade mediada por células e humoral (Wang et al, 2001). Esta resposta imune do hospedeiro pode causar desprendimento prematuro, ingurgitamento reduzido, aumento da mortalidade e fecundidade diminuída dos carrapatos (Barriga et al, 1993). Ainda durante o período de alimentação os carrapatos ingerem uma grande quantidade de sangue do hospedeiro, tornando os anticorpos candidatos lógicos para mediar a expressão de fenótipos distintos da resistência a carrapatos (Kashino et al, 2005). Anticorpos podem conferir resistência neutralizando a farmacopéia salivar que os carrapatos injetam dentro de seus hospedeiros e, uma vez que o sangue do hospedeiro é ingerido, os sistemas hemostático e imune seriam capazes de danificar os tecidos do parasito (Wikel, 1996; Casadevall & Profski, 2003).

A resistência de bovinos aos carrapatos consiste de componentes inatos e adquiridos (de Castro & Newson, 1993). A resistência inata, a qual reflete-se parcialmente na habilidade de montar uma resposta imune mais intensa às infestações, parece estar relacionada a diferenças raciais na capacidade de modulação de respostas imunes (Rechav, 1987). Raças de *B. indicus* são menos suscetíveis e adquirem resistência a carrapatos mais eficazmente do que *B. taurus* (Utech et al, 1978). Bovinos *B. indicus* exibem uma forte resistência inata (de Castro & Newson, 1993; Strother et al, 1974). Em relação a resistência adquirida, medida pela proliferação *in vitro* de linfócitos T e B a mitógenos, *B. indicus* teve uma resposta imune intensificada a antígenos da glândula salivar quando comparada

com *B. taurus* (Ramachandra & Wikel, 1995). Além disso, está bem estabelecido que bovinos adquirem resistência a uma variedade de espécies de carrapatos com repetidas exposições (Wikel & Whelen, 1986; Allen, 1994).

Os níveis naturais de infestações com *R. microplus* são intensivamente influenciados por fatores sazonais (Brum et al., 1987; Furlong, 1993). Desta forma, as infestações neste trabalho assemelham-se a situação que bovinos sofrem naturalmente durante o ano, pois os animais foram expostos a infestações sucessivas com carrapatos, sendo as primeiras infestações pesadas seguidas de infestações leves. A análise da resposta imune humoral dos bovinos após as infestações foi realizada contra extratos protéicos de glândula salivar, intestino e larva do carrapato *R. microplus*.

Soros de pré-exposição dos bovinos apresentaram anticorpos que ligaram a moléculas de glândula salivar, intestino e larva do *R. microplus*. Isto poderia ser indicativo de exposição anterior a outras espécies de ectoparasitas, ou organismos que induziriam o desenvolvimento de anticorpos com reatividade cruzada, porém, como os bovinos utilizados nos experimentos vieram de uma área livre do *R. microplus* e as infestações foram realizadas com larvas livres de patógenos, todas as respostas do hospedeiro geradas são indicativas de interações bovino-*R. microplus*.

As glândulas salivares são as maiores glândulas e realizam várias funções importantes na fisiologia do carrapato, tais como: absorção de vapor de água da atmosfera; secreção do cimento para a fixação; secreção de citolisinas, anticoagulantes e substâncias vasoativas; e excreção do excesso de fluído durante a alimentação (Sonenshine, 1991; Kaufman, 1989; Sauer et al, 2000). Em carrapatos ixodídeos, as glândulas salivares aumentam muito no tamanho total e no



conteúdo de proteínas durante o seu prolongado período de alimentação (Ribeiro, 1987). Neste trabalho, níveis maiores de IgG e um número maior de moléculas foram observados quando o extrato de glândula salivar foi usado como antígeno. Um grande número de antígenos da glândula salivar foi reconhecido pelo soro de infestações iniciais de todos os bovinos, corroborando os níveis maiores de IgG detectados por ELISA. Os soros das infestações finais mostraram predominantemente níveis de IgG menores, assim como bandas menos intensas comparando com soros de infestações mais densas. Entretanto pode ser visto o reconhecimento de moléculas de baixo peso molecular diferentes pelo soro de bovinos após as infestações finais. Várias proteínas salivares de carrapato foram identificadas e caracterizadas apresentando funções importantes na fisiologia do carrapato, sendo que algumas conferiram certo grau de imunidade aos hospedeiros quando utilizadas como imunógenos. Por exemplo, uma proteína de *A. americanum*, com peso molecular de 20 kDa, foi identificada por Brown et al (1984), a qual possivelmente corresponda a um componente do cemento do carrapato e que conferiu imunidade protetora em experimentos de desafio/vacinação (Brown & Askenase, 1986). A imunização com Salp 16, proteína identificada em *I. scapularis*, induziu altos níveis de anticorpos em cobaias ( Das et al, 2000). Outra proteína de *I. scapularis*, a Salp 15, foi mostrada como inibidora de células T CD4+ (Anguita et al, 2002). Além disso, uma proteína de 36 kDa na glândula salivar de fêmeas de *D. andersoni* mostrou possuir função na inibição da proliferação de linfócitos T (Bergman et al, 1998).

Proteínas de intestino de massa molecular maior foram reconhecidas pela maioria dos bovinos e pelos soros de quase todas as infestações. Algumas destas proteínas também estão presentes em glândula salivar ou apresentaram reatividade

cruzada com proteínas salivares (Almeida et al, 1994; Parmar et al, 1995). A identificação de proteínas intestinais que possuem reatividade cruzada com proteínas salivares seria de grande importância na composição de uma vacina anti-carrapato eficiente, pois a resposta imune a estes antígenos salivares 'expostos' reagiria cruzadamente com antígenos intestinais 'ocultos' do carrapato, portanto proveriam uma ação dupla como vacina, combinando as vantagens de antígenos expostos e ocultos (Trimmel et al, 2002; Trimmel et al, 2005). Antígenos protetores foram localizados na membrana do intestino do carrapato e a vacinação dos bovinos com estes antígenos diminuiu significativamente o número de carrapatos coletados comparado com o grupo controle (Opdebeeck et al, 1988). Antígenos parcialmente purificados do intestino e extratos protéicos do carrapato *R. microplus* adulto obtiveram antígenos protetores (Wong & Opdebeeck, 1989; Willadsen et al, 1988).

Informações sobre proteínas específicas do estágio de larva de carrapatos ixodídeos que induzam uma resposta imune no hospedeiro são bastante limitadas. Willadsen e Riding (1979) isolaram uma proteína de massa molecular de 18,5 kDa de extrato de larva do *R. microplus* que foi imunogênica e inibiu a atividade de tripsina. Pruett et al (2006) identificaram uma proteína de 19,1 kDa de larvas de *R. microplus* que apareceu ser alergênica por desenvolver resposta de hipersensibilidade imediata em bovinos previamente expostos ao *R. microplus*. Neste estudo, na maioria dos bovinos, antígenos larvais de massa molecular pequena foram detectados com maior intensidade nos soros das primeiras infestações. A clonagem, expressão e caracterização destas proteínas poderiam ajudar no estudo de sua imunogenicidade e de seu potencial como antígeno protetor para a possível composição de uma vacina anti-carrapato.

Os índices de carrapatos desprendidos e o peso médio dos carrapatos foram observados para avaliar os possíveis efeitos da resistência induzida nos bovinos a partir das infestações do carrapato. Com base nestes índices foi observado que os bovinos desenvolveram respostas imunes diferentes comparando infestações pesadas e leves. As respostas imunes geradas pelas infestações pesadas não foram protetoras suficientemente para controlar as primeiras infestações leves, que desta maneira, apresentaram uma recuperação significativa no número e no peso de carrapatos que completaram o ciclo parasitário. Portanto, pode ser assumido que a exposição dos bovinos a infestações pesadas e leves, ou seja, a inoculação nos bovinos de quantidades grande ou pequena de saliva, tende a modificar níveis e/ou mecanismos de resposta imune contra o carrapato.

Como revisado por Schoeler e Wikel (2001), um padrão geral que tem surgido nas relações parasito-hospedeiro é a supressão de respostas Th1 e a polarização para respostas Th2. Esta modulação ou alteração no padrão de citocinas produzidas pelos linfócitos T pode reduzir as respostas imunes contra o carrapato e então facilitar a transmissão ou o estabelecimento de microorganismos (Brossard & Wikel, 2004). Respostas Th1 a antígenos do carrapato são consideradas como aquelas que frequentemente resultam no desenvolvimento da resistência anti-carrapato no hospedeiro, com efeitos mais profundos na sua sobrevivência (Wikel, 1996). A supressão da reatividade dos linfócitos Th1, mediada pelo carrapato, pode inibir a expansão de clones de linfócitos T específicos ao antígeno, diferenciação de linfócitos B, ativação de macrófagos, aumento da atividade das NKs, além de inibir respostas de hipersensibilidade tardia (Brossard & Wikel, 2004). É possível que alguns antígenos induzam respostas tipo Th1 e outros induzam respostas tipo Th2 no mesmo hospedeiro resistente e que a resposta humoral possa em parte ser

responsável pela resistência (Willadsen & Jongejan, 1999). Kashino et al (2005) mostraram que bovinos de uma raça suscetível sofrendo infestações pesadas com *R. microplus* apresentaram um perfil de resposta de isotipo IgG1, que é usualmente associada com resposta tipo Th2 em bovinos. Sendo assim, uma possível hipótese para a diferença no grau de expressão de resistência desenvolvida em infestações pesadas e leves neste trabalho é que bovinos infestados com altos números de *R. microplus* são capazes de montar respostas polarizadas Th2, resultando em níveis menos protetores de resistência. Sob infestações com baixos números de carrapatos, o que presumivelmente indica que uma menor dose de moléculas de antígenos/imunossupressores são inoculados no bovino, as respostas são polarizadas para um perfil Th1, resultando em uma resistência mais efetiva contra o carrapato.

A saliva de carrapatos é um coquetel de potentes componentes farmacologicamente ativos capazes de desarmar o sistema hemostático (Ribeiro, 1987, 1995) e alterar as respostas imunes do hospedeiro (Wikel, 1999; Gillespie et al, 2000). Neste contexto, os carrapatos obtêm sua refeição diante de mecanismos de vasoconstrição (redução do fluxo de sangue), agregação plaquetária (formação de um tampão de plaquetas) e da cascata de coagulação do sangue (formação de um coágulo). Para driblar todo este repertório do sistema hemostático o carrapato possui moléculas salivares bioativas com atividades vasodilatatória, anti-plaquetária e anti-coagulante (Valenzuela, 2004). Além disso, após danificar e injetar componentes salivares na pele do hospedeiro, uma resposta inflamatória iniciará, podendo prejudicar a alimentação e levar a rejeição do carrapato (Ribeiro, 1989). A resposta inflamatória envolve neutrófilos, macrófagos, mastócitos, basófilos, eosinófilos e linfócitos assim como, quimiocinas, enzimas do plasma, mediadores

inflamatórios lipídicos e citocinas (revisado por Valenzuela, 2004). Vários estudos têm identificado inibidores chave da atividade inflamatória na saliva de várias espécies de carrapato, (Ribeiro et al, 1985; Ribeiro, 1987b; Ribeiro et al, 1990; Paesen et al, 1999; Valenzuela et al, 2000; Hajnicka et al, 2001; Sangamnatdej et al, 2002). Sendo assim, anticorpos que neutralizem a atividade destas moléculas podem constituir-se em parte da resistência dos hospedeiros.

Anticorpos IgG contra antígenos salivares induzidos pela infestação de carrapatos são detectados em diferentes hospedeiros (Brossard, 1976; Brossard et al, 1991; Wikel, 1996). Por transferência passiva de soro imune a animais de laboratório não previamente infestados, mostrou-se que fatores humorais estão envolvidos na aquisição de imunidade contra carrapatos (Brossard & Girardin, 1979). Imunidade contra o *R. microplus* foi também transmitida passivamente, embora de forma menos intensa, a bovinos (Roberts & Kerr, 1976). Anticorpos são parte da expressão da resistência anti-carrapato. Entretanto, muitos anticorpos provavelmente não reagem com moléculas envolvidas em processos que influenciam de forma decisiva na fisiologia do parasito (Wikel, 1996). Desta forma, a atenção deve ser também focalizada em imunógenos de origem na glândula salivar que estimulem linfócitos T durante as infestações. A importância da modulação das respostas imunes durante a aquisição e expressão da resistência, assim como a sua relação com a quantidade de saliva inoculada, permanecem e necessitam ser determinados.

## 4 CONCLUSÕES

1. Foram caracterizadas variações individuais entre os bovinos, nos níveis de IgG e no perfil de reconhecimento de antígenos do *R. microplus* após as infestações pesadas e leves;
2. Níveis maiores de IgG e números maiores de moléculas reconhecidas foram observadas quando o extrato de glândula salivar foi usado como antígeno, comparado com outros antígenos testados;
3. Níveis de IgG contra diferentes antígenos do carrapato foram maiores durante infestações pesadas comparando-se com infestações leves;
4. Infestações pesadas causaram uma diminuição no peso médio de carrapatos que completam o ciclo parasitário;
5. Nas primeiras infestações leves (infestações 7 e 8) observou-se número e peso médio de carrapatos semelhantes aos da primeira infestação, portanto a resposta imune desenvolvida após as infestações pesadas não foi protetora contra as primeiras infestações leves;
6. As infestações 10, 11 e 12 apresentaram números significativamente menores de carrapatos que completam o ciclo parasitário concomitantemente com os menores níveis de IgG contra os extratos de carrapato testados.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allen JR. Tick resistance: basophils in skin reactions of resistance guinea pigs. *Int J Parasitol.* 1973;3:195-200.
- Allen JR. Host resistance to ectoparasites. *Rev Sci Tech Off Int Epiz.* 1994;13:1287-303.
- Allen JR, Doube RM, Kemp DH. Histology of bovine skin reaction to *Ixodes holocyclus*. *Can J Comp Med.* 1977;41:26-35.
- Allen JR, Hhalil HM, Wikel SK. Langerhans cells trap tick salivary gland antigens in tick-resistant guinea pigs. *J Immunol.* 1979;122:563-5.
- Almazán C, Kocan KM, Bergman DK, Garcia-Garcia JC, Blouin EF & de la Fuente J. Identification of protective antigens for the control of *Ixodes scapularis* infestations using cDNA expression library immunization. *Vaccine.* 2003;21:1492–501.
- Almazán C, Kocan KM, Blouin EF & de la Fuente J. Vaccination with recombinant tick antigens for the control of *Ixodes scapularis* adult infestations. *Vaccine* 2005;23:5294-8.
- Almeida APG, Bechara GH, Varma RMG. Cross-reactivity between hard tick antigens. *Brazilian J Med Biol Res.* 1994;27:697-707.
- Alonso-Díaz MA, García L, Galindo-Velasco E, Lezama-Gutierrez E, Angel-Sahagúm SA, Rodriguez-Vivas RI, Fragoso-Sánchez H. Evaluation of *Metarhizium anisopliae* for the control of *Boophilus microplus* on naturally infested cattle in Mexican tropics. *Vet Parasitol.* 2007;147:336-40.
- Alves-Branco FP, Echevarria FAM, Siqueira AS. Garça vaqueira *Egretta ibis* e o controle biológico do carrapato *Boophilus microplus*. *Comunicado Técnico da EMBRAPA, Brasília, D.F.* 1983;1:1-4.
- Anguita J, Ramamoorthi N, Hovius JWR, Das S, Thomas V, Persinski R, Conze D, Askenase PW, Rincon M, Kantor FS, Fikrig E. Salp15, an *Ixodes scapularis* salivary protein, inhibits CD4CT Cell activation. *Immunity.* 2002;16:849-59.
- Athanassof N. “Manual do Criador de Bovinos” 5 ed. São Paulo. Edições Melhoramentos. 1953.
- Barriga OO, da Silva SS, Azevedo JSC. Inhibition and recovery of tick function in cattle repeatedly infested with *Boophilus microplus*. *J Parasitol.* 1993;79:710-5.

- Bergman DK, Ramachandra RN, Wikel SK. Characterisation of an immunosuppressant protein from *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) salivary glands. *J Med Entomol.* 1998;35:505–9.
- Bergman KD, Palmer MJ, Caimano MJ, Radolf JD, Wikel SK. 2000. Isolation and molecular cloning of a secreted immunosuppressant protein from *Dermacentor andersoni* salivary gland. *J Parasitol.* 2000;516-25.
- Berthier R, Martinon-Ego C, Laharie AM, Marche PN. A two-step culture method starting with early growth factors permits enhanced production of functional dendritic cells from murine splenocytes. *J Immunol Meth.* 2000;239:95-107.
- Bissonnette EY, Rossignol PA, Befus AD. Extracts of mosquito salivary gland inhibit tumor necrosis factor  $\alpha$  release from mast cells. *Parasite Immunol.* 1993;15:27-33.
- Brossard M. Immunologic relations between cattle and ticks, specifically between cattle and *Boophilus microplus*. *Acta Trop.* 1976;33:15-36.
- Brossard M, Fivaz V. *Ixodes ricinus* .: mast cells, basophils and eosinophils in the sequence of cellular events in the skin of infested or reinfested rabbits. *Parasitology* 1982; 85:583-92.
- Brossard M, Girardin P. Passive transfer of resistance in rabbits infested with adult *Ixodes ricinus* L: Humoral factors influence feeding and egg laying. *Exp Parasitol.* 1979;35:1395–6.
- Brossard M, Rutti B, Haug T. Immunological relationships between hosts and ixodid ticks. In: Toft, C.A., Aeschlimann, A., Bolis, L. (Eds.), *Parasite–Host Association: Coexistence or Conflict?* Oxford, University Press, New York, 1991; p. 177–200.
- Brossard M, Wikel SK. Immunology of interactions between ticks and hosts. *Med Vet Entomol.* 1997;11:270–6.
- Brossard M, Wikel SK. Tick immunobiology. *Parasitology.* 2004;129:161-76.
- Brown SJ, Shapiro SZ, Askenase PW. Characterization of tick antigens inducing host immune resistance. Immunization of Guinea pigs with *Amblyomma americanum*-derived salivary gland extracts and identification of an important salivary gland protein antigen with Guinea pig anti-tick antibodies. *J Immunol.* 1984;133:3319-25.
- Brown SJ, Askenase PW. *Amblyomma americanum*: physiochemical isolation of a protein derived from the tick salivary gland that is capable of inducing immune resistance in guinea pigs. *Exp Parasitol.* 1986;62:40–50.



- Brown SJ. Evidence for regurgitation by *Amblyomma americanum*. *Vet Parasitol.* 1988;28:335-42.
- Brum JGW, Costa PRP, Ribeiro PB, Gonzales JC. Flutuação sazonal do *B. microplus* (Canestrini, 1887) no município de Pelotas, RS. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte. 1987;39:891-6.
- Brum JGW. Infecção em teleóginas de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) por *Cedecea lapagei*: etiopatogenia e sazonalidade. *Tese* (Doutor em Ciências). Instituto de Biologia. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, R.J. 1988.
- Cobon GS, Willadsen P. Vaccines to prevent cattle tick infestations. *New Gener Vaccine.* 1990;50:901-17.
- Crampton AL, Baxter GD, Barker SC. Identification and characterisation of a cytochrome P450 gene and processed pseudogene from an arachnid: the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Insect Biochem Mol Biol.* 1999;29:377-84.
- Cross MC, Cupp MS, Galloway AL, Enriquez FJ. Modulation of murine immunological responses by salivary gland extract of *Simulium vittatum* (Diptera: Simuliidae). *J Med Entomol.* 1993;30:928-35.
- Da Costa GL, Sarquis MI, De Moraes AM, Bittencourt VR. Isolation of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* from *Boophilus microplus* tick (Canestrini, 1887), in Rio de Janeiro State, Brazil. *Mycopathologia* 2002;154:207-9.
- Das S, Marcantonio N, Deponte K, Telford SR, Anderson JF, Kantor FS, Fikrig E. SALP 16, a gene induced in *Ixodes scapularis* salivary glands during tick feeding. *Am J Trop Med Hyg.* 2000;62:99-105.
- Da Silva Vaz Jr I, Logullo C, Sorgine M, Velloso FF, Rosa de Lima MF, Gonzales JC, Masuda H, Oliveira PL, Masuda A. Immunization of bovines with an aspartic proteinase precursor isolated from *Boophilus microplus* eggs. *Vet Immunol Immunopathol.* 1998;66:331-41.
- Davey RB, George JE, Snyder DE. Efficacy of a single whole-body spray treatment of spinosad, against *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) on cattle. *Vet Parasitol.* 2001;99:41-52.
- De Castro JJ, Newson, RM. Host resistance in cattle tick control. *Parasitol Today.* 1993;9:13-17.
- Decrem Y, Beaufays J, Blasioli V, Lahaye K, Brossard M, Vanhamme L, Godfroid E. A family of putative metalloproteases in the salivary gland of the tick *Ixodes ricinus*. *FEBS J.* 2008;275:1485-99.

- De la Fuente J, Kocan KM. Strategies for development of vaccines for control of ixodid tick species. *Parasite Immunol.* 2006;28:275-83.
- Déruaz M, Frauenschuh A, Alessandri AL, Dias JM, Coelho FM, Russo RC, Ferreira BR. *J Exp Med.* 2008. In Press.
- Dusbábek F, Borský I, Jelínek F, Uhlír J. Immunossuppression and feeding success of *Ixodes ricinus* nymphs on BALB/c mice. *Med Vet Entomol.* 1995;9:133-40.
- Elder JK, Kearnan JF, Waters KS, Dunwell GH, Emmerson FR, Knott SG, Morris RS. A survey concerning cattle tick control in Queensland. Use of resistant cattle and pasture spelling. *Aust Vet J.* 1980;56:219-23.
- Farias NAR, Gonzales JC, Saibro JC. Antibiose e antixenose entre forrageiras e larvas de carrapato-de-boi. *Pesquisa Agropecuária Brasileira,* 1986;21:1313-20.
- Ferreira BR, Silva JS. Successive tick infestations selectively promote a T-helper 2 cytokine profile in mice. *Immunology.* 1999;96:434-39.
- Ferreira BR, Szabó MJP, Cavassani KA, Bechara GH, Silva JS. Antigens from *Rhipicephalus sanguineus* ticks elicit potent cell-mediated immune responses in resistant but not in susceptible animal. *Vet Parasitol.* 2003;115:35-48.
- Fivaz BH. Immune suppression induced by the brown ear tick *Rhipicephalus appendiculatus* Neumann 1901. *J. Parasitol.* 1989;75:946–52.
- Flechtmann CHW. *Ácaros de importância Médico Veterinária.* 2 ed. São Paulo: Nobel. 1990.
- Frazzon AP, Vaz Junior IS, Masuda A, Schrank A, Vainstein MH. In vitro assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus.* *Vet Parasitol.* 2000;94:117-25.
- Furlong J. Controle do carrapato dos bovinos na região Sudeste do Brasil. *Caderno Técnico da Esc. Veterinária UFMG.* 1993;8:49-61.
- George JE, Osburns RL, Wikel SK. Acquisition and expression of resistance by *Bos indicus* and *Bos indicus* X *Bos taurus* calves to *Amblyomma americanum* infestation. *J Parasitol.* 1985;71:174-82.
- Gillespie RD, Dolan MC, Piesman J, Titus RG. Identification of an IL-2 binding protein in the saliva of the Lyme disease vector tick, *Ixodes scapularis* . *J Immunol.* 2001;166:4319-27.
- Gillespie RD, Mbow ML, Titus RG. The immunomodulatory factors of bloodfeeding arthropod saliva. *Parasite Immunol.* 2000;22:319-31.

- Girardin P, Brossard M. Rabbits infested with *Ixodes ricinus* adults: effects of a treatment with cyclosporin A on the biology of ticks fed on naïve and immune hosts. *Ann Parasitol Hum Comp.* 1990;65:262-6.
- Guaragna GP, Carvalho JBP, Gambinil LB, Barbosa MIA. Efeito dos fatores genéticos e ambientes na infestação natural de carrapatos (*R. (B.) microplus*, Canestrini) em bovinos leiteiros. *Boletim de Indústria Animal, São Paulo* 1992;49:73-82.
- Gonzales JC. O controle do carrapato bovino. Porto Alegre: Sulina, 1975;p.104 .
- Gonzales JC. O controle do carrapato do boi. 2ed. Porto Alegre. Edição do Autor, 1995.
- Hajnická V, Kocáková P, Sláviková M, Slovák M, Gašperík, J, Fuchsberger N, Nuttall PA. Anti-interleukin-8 activity of tick salivary gland extracts. *Parasite Immunol.* 2001;23:483-9 .
- Häuserman W, Friedel T, Hess EA, Strong MB. A new active ingredient for a new approach to protect cattle against ticks. In: Proceedings of XIX International Congress of Entomology. Beijing, China, 1992.
- Holm E, Wallace MMH. Distribution of some anystid mites (Acari: Anystidae) in Australia and Indonesia and their role as possible predators of the cattle tick, *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Exp App Acarol.* 1989;6:77-83.
- Horn F, dos Santos PC, Termignoni C. *Boophilus microplus* anticoagulant protein: an antithrombin inhibitor isolated from the cattle tick saliva. *Arch Biochem Bioph.* 2000;384:68-73.
- Horn SC, Arteche CCP. Situação parasitária da pecuária no Brasil. *A Hora Veterinária.* 1995;23:12-32.
- Imamura S, da Silva Vaz Jr I, Sugino M, Ohashi K, Onuma M. A serine protease inhibitor (serpin) from *Haemaphysalis longicornis* as an anti-tick vaccine. *Vaccine.* 2005;23:1301-11.
- Inokuma H, Kemp DH, Willadsen P. Comparison of prostaglandin E2 (PGE2) in salivary gland of *Boophilus microplus*, *Haemaphysalis longicornis* and *Ixodes holocyclus*, and quantification of PGE2 in saliva, hemolymph, ovary and gut of *B. microplus*. *J Vet Med Sc.* 1994;56:1217-8.
- Jackson LA, Opdebeeck JP. The effect of various adjuvants on the humoral immune response os sheep and cattle to soluble and membrane midgut antigens of *Boophilus microplus*. *Vet Parasitol.* 1995;58:129-41.

- Johnston LAY, Kemp DH, Pearson RD. Immunization of cattle against *Boophilus microplus* using extracts derived from adult female ticks: effects induced immunity on tick populations. *Int J Parasitol.* 1986;16:27-34.
- Kashino SS, Resende J, Sacco AMS, Rocha C, Proença L, Carvalho WA, Firmino AA, Queiroz R, Benavides M, Gershwin LJ, Santos IKFM. *Boophilus microplus*: The pattern of bovine immunoglobulin isotype responses to high and low tick infestation. *Exp Parasitol.* 2005;110:12-21.
- Kaufman WR. Tick–host interactions: a synthesis of current concepts. *Parasitol Today* 1989;52:47–56.
- Kemp DH, Stone BF, Binnington KC. Tick attachment and feeding: role of the mouthparts, feeding apparatus, salivary gland secretions and host response. In: Obenchain, F.D., Galun, R. (Eds.) *Physiology of Ticks*. Pergamon Press, Oxford, UK, 1982;119-68.
- Kimaro EE, Opdebeeck JP. Tick infestations on cattle vaccinated with extracts from the eggs and the gut of *Boophilus microplus*. *Vet Parasitol.* 1994;52:61-70.
- Lawrie CH, Randolph SE, Nuttal PA. *Ixodes* ticks: serum species sensitivity of anti-complement activity. *Exp Parasitol.* 1999;93:207-14.
- Logullo C, Da Silva Vaz I, Sorgine MHF, Paiva-Silva GO, Faria FS, Zingali RB, De Lima MFR, Abreu L, Fialho Oliveira E, Alves EW, Masuda H, Gonzales JC, Masuda A, Oliveira PL. Isolation of an aspartic proteinase precursor from the egg of hard tick, *Boophilus microplus*. *Parasitology.* 1998;116: 525-32.
- Marday JAO, Gonzales JC. Efeitos das raças Santa Gertrudis e Aberdeen Angus em infestações de *B. microplus* (Canestrini, 1887): Dimensões e peso das fêmeas ingurgitadas. *Arquivos da Faculdade de Veterinária. UFRGS, Porto Alegre.* 1984;12:127-38.
- Mattioli RC, Cassma M. Comparison of characteristics of life cycle in female ticks collected on N'Dama and Zebu cattle. *Trop An Health Prod.* 1995;27:150–4.
- Mattioli RC, Pandey VS, Murray M, Fitzpatrick J.L. Immunogenetic in Xuences on tick resistance in African cattle with particular reference to trypanotolerant N'Dama (*Bos taurus*) and trypanosusceptible Gobra zebu (*Bos indicus*) cattle. *Acta Trop.* 2000;75:263–77.
- McKenna RV, Riding GA, Jarmey JM, Pearson RD, Willadsen P. Vaccination of cattle against the *Boophilus microplus* using a mucin-like membrane glycoprotein. *Parasite Immunol.* 1998;20:325-36.

- Mejri N, Franscini N, Rutti B, Brossard M. Th2 polarization of the immune response of BALB/c mice to *Ixodes ricinus* instars, importance of several antigens in activation of specific Th2 subpopulations. *Parasitol Res.* 2002;88:192-7
- Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today.* 1996;17:138-46.
- Mosmann TR, Moore KW. The role of IL-10 in crossregulation of Th1 and Th2 responses. *Immunol Today.* 1991;12:49-53.
- Mulenga A, Sugimoto C, Sako Y *et al.* Molecular characterization of a *Haemaphysalis longicornis* tick salivary gland-associated 29-kilodalton protein and its effect as a vaccine against tick infestation in rabbits. *Infect Immun.* 1999;67:1652-8.
- Nari A. Strategies for the control of one-host ticks and relationship with tick-borne diseases in South America. *Vet Parasitol.* 1995;57:153-65.
- Nithiuthai S, Allen JR. Significant changes in epidermal Langerhans cells of guinea-pigs infested with ticks (*Dermacentor andersoni*). *Immunology.* 1984;51:133-41.
- Norton GA, Sutherst RW, Maywald GF. A framework for integrating control methods against the cattle tick, *Boophilus microplus*, in Australia. *J App Ecol.* 1983;20:489-505.
- Nuttall PA, Trimnell AR, Kazimirova M, Labuda M. Exposed and concealed antigens as vaccine targets for controlling ticks and tick-borne diseases. *Parasite immunol.* 2006;28:155-63.
- Oliveira CJF, Cavassani KA, More DD, Garlet GP, Aliberti JC, Silva SJ, Ferreira B. Tick saliva inhibits the chemotactic function of MIP- $\alpha$  and selectively impairs chemotaxis of immature dendritic cells by down-regulating cell-surface CCR5. *Int J Parasitol.* 2008;46:2459-65.
- Oliveira GP, Alencar MM, Freitas AR. Resistência de bovinos ao carrapato *B. microplus* II. Infestação natural. *Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília,* 1989;24:1267-71.
- Opdebeeck MK, Wong JYM, Jackson LA, Dobson C. Hereford cattle immunized and protected against *Boophilus microplus* with soluble and membrane-associated antigens from the midguts of ticks. *Parasite Immunol.* 1988;10:405-10.
- Opdebeeck JP, Wong JYM, Dobson, C. Hereford cattle protected against *Boophilus microplus* with antigens purified by immunoaffinity chromatography from larval and adult ticks. *Immunology.* 1989;67:388-93.

- Paesen GC, Adams PL, Harlos K, Nuttall PA, Stuart DI. Tick Histamine-Binding proteins: isolation, cloning and three-dimensional structure. *Molecular Cell* 3, 1999; p.661–671.
- Parmar A, Grewal AS, Dhillon P. Immunological cross-reactivity between salivary gland proteins of *Hyalomma anatolicum anatolicum* and *Boophilus microplus* ticks. *Vet Immunol Parasitol.* 1996;51:345-52.
- Peterková K, Vancová I, Hajnická V, Slovák M, Simo L, Nuttall PA. Immunomodulatory arsenal of nymphal ticks. *Med Vet Entomol.* 2008;22:167-71.
- Pruett JH. Immunological control of arthropods ectoparasites - a review. *International J Parasitol.* 1999;29:25-32.
- Pruett JH, Utalan PM, Davey RB. Identification and partial purification of serologically defined *Boophilus microplus* larval antigens by natural ectoparasite exposure. *Vet Parasitol.* 2006;140:148-57.
- Ramachandra RN, Wikel SK. Effects of *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) salivary gland extracts on *Bos indicus* and *B. taurus* lymphocytes and macrophages: in vitro cytokine elaboration and lymphocyte blastogenesis. *J Med Entomol.* 1995;32:338–45.
- Rechav Y. Resistance of Brahman and Hereford cattle to African ticks with reference to serum gammaglobulin levels and blood composition. *Exp Appl Acarol.* 1987;3:219–32.
- Renard G, Garcia JF, Cardoso FC, Richter MF, Sakanari JA, Ozaki LS, Termignoni C, Masuda A. Cloning and functional expression of a *Boophilus microplus* cathepsin L-like enzyme. *Insect Biochem Mol Biol.* 2000;30:1017-26.
- Ribeiro JMC. *Ixodes dammini*: salivary anti-complement activity. *Exp Parasitol.* 1987a;64:347-53.
- Ribeiro JMC. Role of saliva in blood-feeding by arthropods. *Annu Rev Entomol.* 1987b;32:463–78.
- Ribeiro JMC. Role saliva in tick/host interactions. *Exp App Acarol.* 1989;7:15-20.
- Ribeiro JMC, Makoul GT, Robinson DR, Spielman A. Antihemostatic, antiinflammatory and immunosuppressive properties of the saliva of a tick, *Ixodes dammini*. *J Exp Med.* 1985;161:332-44.
- Ribeiro JMC, Weiss JJ, Telford SR. Saliva of the tick *Ixodes dammini* inhibits neutrophil function. *Exp Parasitol.* 1990;70:382-8.

- Ribeiro VLS, Toigo E, Bordignon SAL, Gonçalves K, Poser GV. Acaricidal properties of extracts from the aerial parts of *Hypericum polyanthemum* on the cattle tick *Boophilus microplus*. *Vet Parasitol.* 2007;147:199-203.
- Roberts JA. Acquisition by the host of resistance to the cattle tick, *Boophilus microplus* (CANESTRINI). *J Parasitol.* 1968a;54:657-62.
- Roberts, J.A. Resistance of cattle to the tick *Boophilus microplus* (CANESTRINI). II. Stages of the life cycle of the parasite against which resistance is manifest. *J Parasitol.* 1968b;54:667-73.
- Roberts JA, Kerr JD. *Boophilus microplus*: passive transfer of resistance in cattle. *J Parasitol.* 1976;62:485–88.
- Riding GA, Jarmey J, McKenna RV, Pearson R, Cobon GS, Willadsen PA. Protective “concealed” antigen from *Boophilus microplus*. Purification, localization, and possible function. *J Immunol.* 1994;153:5158-66.
- Sangamnetdej S, Paesen GC, Slovak M, Nuttall PA. A high affinity serotonin-and Histamine-Binding lipocalin from tick saliva. *Insect Mol Biol.* 2002;11:79–86.
- Samish M, Glazer I. Entomopathogenic nematodes for the biocontrol of ticks. *Trend Parasitol.* 2001;17:368-71.
- Sauer JR, Essenberg RC, Bowman AS. Salivary glands in ixodid ticks: control and mechanism of secretion. *J Insect Physiol.* 2000;46:1069-78.
- Seddon HR. In: *Diseases of Domestic Animals in Australia, Part 3, Arthropod Infestations, Ticks and Mites*. Ed. and revised: H.E. Albiston, Commonwealth of Australia, Dept. Health, Canberra.1967 p.40.
- Seifert GW, Springell PH, Tatchell RJ. Radioactive studies on the feeding of larvae, nymphs, and adult of the cattle tick, *Boophilus microplus* (Canestrini). *Parasitology.* 1968;58:415-30.
- Schoeler GB, Manweiler SA, Wikel SK. *Ixodes scapularis*: Effects of repeated infestations with pathogen-free nymphs on macrophage and T lymphocyte cytokine responses of BALB/c and C3H/HeN mice. *Exp Parasitol.* 1999;92:239-48.
- Schoeler GB, Wikel SK. Modulation of host immunity by hematophagous arthropods. *Ann tropica Med Parasitol.* 2001;95:755-71.
- Sonenshine DE. *Biology of ticks*. Vol.1. Oxford University Press, New York.1991 p. 447.

- Steen NA, Barker SC, Alewood PF. Proteins in the saliva of the Ixodida ticks: Pharmacological features and biological significance. *Toxicon*. 2006;47:1-20.
- Steeves EB, Allen JR. Tick resistance in mast cell-deficient mice: histological studies. *Int J Parasitol*. 1991;21:265-68.
- Stewart NP, de Vos AJ. Ticks and the diseases they carry. *Queens Agric J*. 1984;110:295-99.
- Strother GR, Burns EC, Smart LI. Resistance of purebred Brahman Hereford, and Brahman times Hereford crossbred cattle to the lone star tick *Amblyomma americanum*. *J Med Entomol*. 1974;11:559-63.
- Sutherst RW, Jones RJ, Schnitzerling HJ. Tropical legumes of the genus *Stylosanthes* immobilize and kill cattle ticks. *Nature*. 1982;295:320-1.
- Sutherst RW, Maywald GF, Kerr JD, Siegeman DA. The effect of the cattle tick (*Boophilus microplus*) on the growth of *Bos indicus* x *Bos taurus* steers. *Aust J Agr Res*. 1983;34:317-27.
- Tatchell RJ. Interactions between ticks and hosts. *Int J Parasitol*. 1987;17:597-606.
- Tellam RL, Kemp D, Riding G, Briscoe S, Smith D, Sharp P, Irving D, Willadsen P. Reduced oviposition of *Boophilus microplus* feeding on sheep vaccinated with vitellin. *Vet Parasitol*. 2002;103:141-56.
- Trager W. Acquired immunity to ticks. *J Parasitol*. 1939;25:57-81.
- Trimnell AR, Hails RS, Nuttall PA. Dual action ectoparasite vaccine targeting 'exposed' and 'concealed' antigens. *Vaccine*. 2002;20:3560-68.
- Trimnell AR, Davies GM, Lissina O, Hails RS, Nuttall PA. A cross-reactive tick cement antigen is a candidate broad-spectrum tick vaccine. *Vaccine*. 2005;23:4329-41.
- Turni C, Lee RP, Jackson LA. The effect of Salivary gland extracts from *Boophilus microplus* on mitogen-stimulated bovine lymphocytes. *Vet Res Commun*. 2007;31:545-52.
- Tyson K, Elkins C, Patterson H, Fikrig E, de Silva A. Biochemical and functional characterization of Salp20, an *Ixodes scapularis* salivary protein that inhibits the complement pathway. *Insect Mol Biol*. 2007;16:469-79.
- Utech KBW, Wharton RH, Kerr JD. Resistance to *Boophilus microplus* (Canestrini) in diVerent breeds of cattle. *Aust J Agric Res*. 1978;29:885-95.



- Valenzuela JG. Chapter 28: blood-feeding arthropod salivary glands and saliva. In: Marquardt, W.C. (Ed.), *Biology of Disease Vectors*. Elsevier, Amsterdam. 2004; p. 377-86.
- Valenzuela JG, Charlab R, Mather TN, Ribeiro JMC. Purification, cloning and expression of a novel salivary anticomplement protein from the tick *Ixodes scapularis*. *J Biol Chem*. 2000;275:18717–23.
- Villares JB. *Climatologia Zootécnica*. III. Contribuição ao estudo da resistência e susceptibilidade genética dos bovinos ao *B. microplus*. *Boletim de Indústria Animal*, São Paulo. 1941;4:60-79.
- Wagland BM. Host resistance to cattle tick (*Boophilus microplus*) in Brahm ( *Bos indicus*) cattle. I. Responses of previously unexposed cattle to four infestations with 20,000 larvae. *Aust J Agric Res*. 1975;26:1073-80.
- Wambura PN, Gwakisa, PS, Silayo RS, Rugaimukamu EA. Breed-associated resistance to tick infestations in *Bos indicus* and their crosses with *Bos taurus*. *Vet Parasitol*. 1998;77:63-70.
- Wang H, Hails RS, Cui WW, Nuttall, PA. Feeding aggregation of the tick *Rhipicephalus appendiculatus* (Ixodidae): benefits and costs in the contest with host responses. *Parasitology*. 2001;123:447-53.
- Weiss BL, Kaufman WR. Two feeding-induced proteins from the male gonad trigger engorgement of the female tick *Amblyomma hebraeum*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:5874–9.
- Wikel SK. The induction of host resistance to tick infestation with a salivary gland antigen. *Am J Trop Med Hyg*. 1981;31:284-8.
- Wikel SK. Immune responses to arthropods and their products. *Ann Rev Entomol*. 1982;27:21-48.
- Wikel SK. Resistance to ixodid tick infestation induced by administration of tick-tissue culture cells. *Ann Trop Med Parasitol*. 1985;79:513–8.
- Wikel SK, Whelen AC. Ixodid-host immune interaction. Identification and characterization of relevant antigens and tick-induced host immunosuppression. *Vet Parasitol*. 1986;20:149-74.
- Wikel SK. Host immunity to ticks. *Ann Rev Entomol*. 1996;41:1-22.
- Wikel SK. Modulation of the host immune system by ectoparasitic arthropods. *BioScience*. 1999;49:311-20.

- Wikel SK, Allen JR.. Acquired resistance to ticks. I. Passive transfer of resistance. *Immunology*. 1976a;30:311-6.
- Wikel SK, Allen JR. Acquired resistance to ticks. II. Effects of cyclophosphamide on resistance. *Immunology*. 1976b;30:479-84.
- Wikel SK, Bergman D. Tick-host immunology: Significant advances and challenging opportunities. *Parasitol Today*. 1997;13:383-89.
- Wong JY, Opdebeeck JP. Larval membrane antigens protect Hereford cattle against infestation with *Boophilus microplus*. *Parasite Immunol*. 1989; 12:75-83.
- Willadsen P, Wood GM, Riding GA. The relation between skin histamine concentration, histamine sensitivity, and resistance of cattle to the tick, *Boophilus microplus*. *Zeitsch Parasit*. 1979;59:87-93.
- Willadsen P, Kemp DH. Vaccination with “concealed” antigens for tick control. *Parasitol Today*. 1988;4:196-8.
- Willadsen P, Riding GA, McKenna RV, Kemp DH, Tellam RL, Nielsen JN, Lahstein J, Cobon GS, Gough JM. Immunological control of a parasitic arthropod: identification of a protective antigen from *Boophilus microplus*. *J Immunol*. 1989;143:1346–51.
- Willadsen P, Cobon G, McKenna RV. Comparative vaccination of cattle against *Boophilus microplus* with recombinant antigen Bm86 or in combination with recombinant Bm91. *Parasite Immunol*. 1996;18:241-46.
- Willadsen P, Jongejan F. Immunology of the Tick-Host Interaction and the Control of Ticks and Tick-borne Diseases. *Parasitol Today*. 1999;15:258-62.
- Willadsen P. Tick control: Thoughts on a research agenda. *Vet Parasitol*. 2006;138:161-8.
- Zhioua E, Browning M, Johnson PW, Ginsberg HS, Lebrun RA. Pathogenicity of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) to *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *J Parasitol*. 1997;83:815-18.