Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada

GUSTAVO ROCHA GARCIA

Identificação de antígenos do carrapato *Rhipicephalus* (Boophilus) *microplus* por soros de bovinos geneticamente resistentes e suscetíveis ao parasita

Ribeirão Preto
2009

GUSTAVO ROCHA GARCIA

Identificação de antígenos do carrapato *Rhipicephalus* (Boophilus) *microplus* por soros de bovinos geneticamente resistentes e suscetíveis ao parasita

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

Área de Concentração: Imunologia Básica e Aplicada
Orientadora: Dra. Isabel Kinney Ferreira de Miranda Santos

Ribeirão Preto
2009

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

Garcia, Gustavo Rocha

Identificação de antígenos do carrapato* Rhipicephalus *(Boophilus)* microplus *por soros de bovinos geneticamente resistentes e suscetíveis ao parasita / Gustavo Rocha Garcia – orientadora Isabel Kinney Ferreira de Miranda Santos.

--Ribeirão Preto, 2009.

105 f.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

1. *Rhipicephalus* (Boophilus) *microplus*. 2. Western blot de extrato de larva, saliva e glândulas salivares 3. Resposta imune do hospedeiro.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Gustavo Rocha Garcia

Identificação de antígenos do carrapato *Rhipicephalus* (Boophilus) *microplus* por soros de bovinos geneticamente resistentes e suscetíveis ao parasita.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.
Área de Concentração: Imunologia Básica e Aplicada

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Dra. Isabel Kinney Ferreira de Miranda Santos

Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP/USP

Assinatura: _____

Professora. Dra. Cleni Mara Marzocchi Machado

Instituição: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – FCFRP/USP

Assinatura: _____

Professora. Dra. Ana Patrícia Yatsuda Natsui

Instituição: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – FCFRP/USP

Assinatura: _____

Dedico esse trabalho a toda minha família, principalmente a minha mãe Sônia, ao Henrique que sempre me apoiaram nos meus estudos. E a Todos os que participaram direta ou indiretamente me ajudando e apoiando.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelo dom da vida, também pelo meu pai José Mário, meu irmão Alexandre (*in Memoriam*).

Agradeço a toda minha família, meu irmão Rodrigo, meu sobrinho Pedro Henrique, minha tia Rosilene e meu tio Adauto, meus primos Gabriel e Raíssa, minha tia Sirleide, minha avó Dines e meu tio João; Em especial a minha mãe Sônia, minha avó Iva e Henrique Sales que são pessoas a quem eu devo muito do que eu sou hoje; muito obrigado a todos pelo incentivo e por tudo que fizeram por mim.

A Dra. Isabel por ter me dado a oportunidade de participar do seu grupo de pesquisa; pela orientação e ajuda durante meu Mestrado; pela confiança depositada em mim e por compartilhar o seu conhecimento para com seus alunos.

À Profa. Dra. Beatriz Rossetti Ferreira, pela co-orientação e auxílio indispensável durante meu aprendizado no laboratório e no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. João Santana da Silva, por disponibilizar a estrutura de seu laboratório para realização deste trabalho, pelo profissionalismo, disciplina, pela coordenação, empenho e dedicação com o nosso programa de pós-graduação.

À Profa. Dra. Ana Patrícia e seu grupo de trabalho, por disponibilizar a estrutura do seu laboratório e por proporcionar um ambiente agradável de trabalho.

Aos técnicos Cristiane e Wander, pelo cuidado com o laboratório.

A todos os alunos do laboratório de Imunoparasitologia da FMRP-USP que contribui direta ou indiretamente para este trabalho e sempre proporcionando um ambiente de trabalho descontraído.

À Ana Cristine, pela amizade, ajuda e dedicação ao programa de pós-graduação da Imunologia, pela integração e disposição em ajudar os alunos.

A todos os alunos do Programa de Pós-graduação de Imunologia Básica e Aplicada, pelo bom convívio, por partilhar tantos momentos de estudo e também de amizade.

A todos meus amigos e em destaque: Sandra, pela amizade e orientação e ensinamento durante meu apoio técnico e também por auxiliar nos meus experimentos; Wanessa por todos os ensinamentos e ajuda que com certeza foram cruciais para o desenvolvimento deste trabalho, pelos conselhos, críticas, sugestões e pela amizade; Antônio que é uma pessoa que dispensa comentários e que não tenho palavras para agradecer; Elen pela amizade e incentivo; Carlo pelo conselho, amizade e ensinamento; Paulo, Diego e Djalma pela amizade; Maíra pelo apoio, muita paciência e incentivo, enfim a todos os amigos que eu encontrei e tomaram seus caminhos, que de maneira geral pela paciência, apoio e amizade que foram fundamentais para desenvolvimento deste trabalho; também a Raquel e Zilda pelo carinho, companheirismo, apoio e incentivo na fase final deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e à Vallée S.A., pelo apoio financeiro ao nosso grupo de pesquisa com carrapatos, fundamental para o desenvolvimento deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de Mestrado.

Sucesso é a soma de pequenos

esforços, repetidos o tempo todo.

Robert Collier

RESUMO

GARCIA, G.R. **Identificação de antígenos do carrapato *Rhipicephalus* (Boophilus) *microplus* por soros de bovinos geneticamente resistentes e suscetíveis ao parasita.** 2009. 105f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

Carrapatos da espécie *Rhipicephalus* (Boophilus) *microplus* causam enormes prejuízos à saúde e à produção animal. Sendo um ectoparasita hematófago, o carrapato espolia seu hospedeiro e transmite doenças. Seu parasitismo é mediado por sua saliva, que inibe as reações homeostáticas do hospedeiro à injúria local causada por sua picada. Seus hospedeiros montam respostas imunes contra esse parasita, incluindo a resposta imune mediada por anticorpos, indicando que o controle imunobiológico é possível. Contudo, o complexo farmacológico da saliva do parasita é composto por proteínas solúveis que são sabidamente pouco ou nada imunogênicos se não forem introduzidos no hospedeiro com adjuvante ou na foram agregada. Assim, dificilmente induziriam imunidade nos hospedeiros. Bovinos apresentam fenótipos contrastantes e herdáveis quanto à intensidade de infestações com carrapatos. Carrapatos alimentados em bovinos resistentes não completam a refeição de sangue, apresentando menor eficiência reprodutiva. É possível que esse desfecho seja devido à capacidade do hospedeiro resistente, mas não do suscetível, de produzir anticorpos que neutralizam componentes salivares do carrapato cruciais para realize a hematofagia. É necessário, portanto, examinar essa possibilidade. Os resultados obtidos também podem ajudar a identificar antígenos úteis para formular uma vacina anti-carrapato. Para estabelecer quais componentes salivares são reconhecidos pelos dois fenótipos de hospedeiros

empregamos uma soroteca composta por soros obtidos de bovinos resistentes e suscetíveis ao carrapato em diferentes estágios do ciclo do parasito (larva, ninfa e adulto) e após uma, duas ou três ciclos de infestações. Os soros foram empregados individualmente e em forma de *pools* para imunodetecção por *western blot* de proteínas presentes em extrato de larvas não-alimentadas, saliva e glândulas salivares de fêmeas de *R. microplus* e separadas em uma e duas dimensões. Os resultados obtidos nos *western blots* 1D de saliva e de extrato de larvas não alimentadas mostraram que houve um reconhecimento diferencial dos antígenos parasitários pelos soros dos animais resistentes e suscetíveis. Os soros dos animais resistentes quando ainda eram livres de infestações (i.e., *naïve*) ou quando infestados com a forma larval reconheceram com maior freqüência e/ou exclusivamente certas bandas de proteínas. Resultados semelhantes foram vistos nos *western blots* de géis 2D de saliva e glândulas salivares de fêmeas, onde os soros dos animais resistentes ainda não infestados (i.e., *naïve*) reconheceram vários *spots* presentes nessas amostras e soros de animais resistentes infestados reconhecerem spots de forma exclusiva. Também foi observado que, apesar dos hospedeiros suscetíveis estarem expostos a grande quantidade de saliva, os soros desses animais não reconhecem um número maior de spots que os hospedeiros infestados resistentes. Por outro lado, a maioria das proteínas salivares não é reconhecida pelos hospedeiros infestados, sejam resistentes ou suscetíveis. Esses resultados indicam que os hospedeiros bovinos resistentes reconhecem de forma mais precoce que os bovinos suscetíveis certos componentes parasitários. Essa capacidade pode estar relacionada ao fenótipo de resistência ao carrapato.

Palavras-chave: carrapatos, *Rhipicephalus* (Boophilus) *microplus*, proteoma, *Western Blot* 1D e 2D.

ABSTRACT

GARCIA, G.R. **Identification of antigens from the cattle tick**, ***Rhipicephalus* (Boophilus) *microplus*, by sera from genetically resistant and susceptible bovines.** 2009. 105f. Dissertation (Master's Degree in Basic and Applied Immunology) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

The cattle tick, *Rhipicephalus* (Boophilus) *microplus,* causes enormous losses to animal health and production. Since it is a hematophagous parasite the tick expoliates its hosts and transmits diseases. Parasitism by the tick is mediated by its saliva, which inhibits the host's local homeostatic reactions to its bite. Hosts mount immune responses against this parasite, including antibody-mediated responses, indicating that the immunobiological control of ticks is possible. However, the pharmacological complex of saliva is composed of soluble proteins, which are known to be incapable of eliciting antibody responses if they are not introduced into the host with adjuvant or in aggregated form. Thus, salivary proteins may not be able to induce immunity in hosts. Bovines present contrasting, heritable phenotypes for tick infestations. Ticks fed on resistant hosts are unable to complete a blood meal and present a decrease in reproductive immunity. It is possible that this outcome is caused by an ability of the resistant host to produce antibodies that neutralize salivary components that are crucial to blood feeding. It is necessary, therefore, to examine this possibility. The results will also assist in the identification of protective antigens to formulate an anti-tick vaccine. In order to establish which salivary components are recognized by the two types of host phenotypes, a collection of sera derived from resistant and susceptible bovines infested one, two and three times with

different developmental stages of the parasite (larvae, nymphs and adults) was employed to detect which proteins were recognized in western blots of saliva and extracts of salivary glands and unfed larvae. Western blots of tick proteins (saliva and extracts of unfed larvae) separated in one dimension showed that antigens were differentially recognized by resistant and susceptible bovines. Sera from resistant bovines still naïve or infested with larvae recognized certain protein bands exclusively or more frequently than similar sera from susceptible bovines. Similar results were seen in western blots of proteins from saliva and extracts of salivary glands separated in two dimensions, where sera from naïve, resistant bovines recognized several spots and sera from infested, resistant bovines recognized several spots exclusively. In spite of the fac that susceptible hosts are exposed to greater amounts of tick saliva, sera from these animals did not recognize a greater amount of spots than those from resistant bovines. On the other hand, the great majority of spots is not recognized by any of the different sera, be they from resistant or susceptible hosts. These results indicate that resistant bovines are able to recognize parasitic proteins earlier than susceptible bovines. This ability may, in turn, affect expression of salivary components that are crucial for the tick and may explain the phenotypes of tick infestations in bovines.

Key words: Ticks, *Rhipicephalus* (Boophilus) *microplus*, proteome, *Western blot* 1D e 2D.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema simplificado do ciclo de vida do carrapato *Rhipicephalus* (Boophilus) *microplus*. Fase parasitária e fase de vida livre. 22

Esquema 1- Fluxograma da metodologia 45

Figura 2 - *Western blot* de Extrato de larvas não-alimentadas de *R. microplus* com soros de hospedeiros resistentes e suscetíveis infestados (1°infestação) ou não. 57

Figura 3 - Reconhecimento das principais proteínas do extrato de larvas não-alimentadas de *R microplus* pelos soros de animais resistentes e susceptíveis durante a primeira infestação e em diferentes estágios de vida do carrapato. 58

Figura 4 - *Western blot* de Extrato de larvas não-alimentadas de *R. microplus* com soros de hospedeiros resistentes e suscetíveis infestados (2°infestação) ou não. 59

Figura 5 - Reconhecimento das principais proteínas do extrato de larvas não-alimentadas de *R microplus* pelos soros de animais resistentes e susceptíveis durante a segunda infestação e em diferentes estágios de vida do carrapato. 60

Figura 6 - *Western blot* de Extrato de larvas não-alimentadas de *R. microplus* com soros de hospedeiros resistentes e suscetíveis infestados (3°infestação) ou não. 61

Figura 7 - Reconhecimento das principais proteínas do extrato de larvas não-alimentadas de *R microplus* pelos soros de animais resistentes e susceptíveis durante a terceira infestação e em 62

diferentes estágios de vida do carrapato.

Figura 8- *Western blot* de Saliva de fêmeas de *R. microplus* com soros de hospedeiros resistentes e suscetíveis infestados (1°infestação) ou não. 64

Figura 9- Reconhecimento das principais proteínas da saliva de fêmea de *R microplus* pelos soros de animais resistentes e susceptíveis durante a primeira infestação e em diferentes estágios de vida do carrapato. 65

Figura 10- *Western blot* de Saliva de fêmeas de *R. microplus* com soros de hospedeiros resistentes e suscetíveis infestados (2°infestação) ou não. 66

Figura 11- Reconhecimento das principais proteínas da saliva da fêmea de *R microplus* pelos soros de animais resistentes e susceptíveis durante a segunda infestação e em diferentes estágios de vida do carrapato. 67

Figura 12- *Western blot* de Saliva de fêmeas de *R. microplus* com soros de hospedeiros resistentes e suscetíveis infestados (3°infestação) ou não. 68

Figura 13- Reconhecimento das principais proteínas da saliva de fêmea de *R microplus* pelos soros de animais resistentes e susceptíveis durante a terceira infestação e em diferentes estágios de vida do carrapato. 69

Figura 14- Gel bidimensional de saliva *R. microplus* corado com prata (60μg). 70

Figura 15- *Western blot* de gel bidimensional de saliva de *R. microplus* com 72

pool de soros de animais suscetíveis (HPB) e resistentes (Nelore) *naive*.

Figura 16- *Western blot* de gel bidimensional de saliva de *R. microplus* com *pool* de soros de animais suscetíveis (HPB) e resistentes (Nelore) infestados uma vez. 73

Figura 17- Gel bidimensional de glândulas salivares de fêmeas de *R. microplus* corado com prata (60μg). 75

Figura 18- *Western blot* de gel bidimensional de GSF de *R. microplus* com *pool* de soros de animais suscetíveis (HPB) *naive.* 76

Figura 19- *Western blot* de gel bidimensional de GSF de *R. microplus* com *pool* de soros de animais suscetíveis (HPB) de todas as fases da primeira infestação (larva, ninfa e adulto). 77

Figura 20- *Western blot* de gel bidimensional de GSF de *R. microplus* com *pool* de soros de animais resistentes (Nel) *naive.* 78

Figura 21- *Western blot* de gel bidimensional de GSF de *R. microplus pool* de soros de animais resistentes (Nel) de todas as fases da primeira infestação (larva, ninfa e adulto). 79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Avaliação de imunidade mediada por anticorpos induzidos por infestações contra saliva de artrópodes por meio de western blot de proteínas separadas em uma e/ou duas dimensões. 33

Tabela 2 - Estudos sobre proteomas salivares de parasitas hematófagos e peçonhas. 41

Tabela 3 - Descrição dos soros empregados para as imunodetecções. 47

Tabela 4 - Soros utilizados nos *western blot* de saliva e glândulas salivares de fêmeas. 48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

IgG:	Imunoglobulina G
C1q:	Proteína do sistema complemento
C3:	Proteína do sistema complemento
PLIg:	Proteína Ligante de Imunoglobulina
kDa:	Quilodalton
pI:	Ponto isoelétrico
HPB:	Holandês Preto e Branco
Nel:	Nelore
GSF:	Glândulas salivares de fêmeas
PBS:	Phosphate buffer saline
PVDF:	Membrana polyvinylidene fluoride
BSA:	Albumina de soro bovino
TBS-T:	Tris buffer saline- Tween
NBT/BCIP:	Phosphatase substrate
TCA:	Ácido tricloroacético
RHS:	Solução de reidratação
IEF:	Focalização Isoelétrica
IPG:	***Gradiente*** de pH ***imobilizado***
DTT:	Dithiothreitol
ELNA:	Extrato de Larva não alimentada
IFN-γ:	Interferon gama
IL-10:	Interleucina -10
IL-4:	Interleucina-4
IL-13:	Interleucina-13

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....20

1.1. O carrapato *Rhipicephalus* (Boophilus) *microplus*.....20

1.1.1. Taxonomia, evolução e prejuízos causados por suas infestações.....20

1.1.2. Ciclo de vida do *Rhipicephalus* (Boophilus) *microplus*.....21

1.2. Os Hospedeiros dos Carrapatos.....24

1.2.1. Hospedeiros: diferença entre espécies e influência da raça bovina na resistência ao *Rhipicephalus* (Boophilus) *microplus*.....24

1.3. Bases fisiológicas e moleculares da interface hospedeiro-ectoparasita 27

1.3.1. Papel da saliva do carrapato na modulação da reação homeostática dos hospedeiros às infestações.....27

1.3.2. Resposta imune mediada por anticorpos contra saliva de vetores, inclusive de carrapatos.....28

1.4. Vacinas contra carrapatos.....36

1.4.1. Vacinas comerciais de primeira geração disponíveis e suas limitações.....36

1.4.2. Bases para desenvolvimento de uma vacina de segunda geração anti-carrapato *R. microplus*.....38

2. OBJETIVOS.....44

2.1. Objetivos gerais.....44

2.2. Objetivo específico.....44

3. MATERIAIS E MÉTODOS.....45

3.1. Comitê de ética.....45

3.1. Fluxograma.....45

3.3. Infestações de bovinos com *R. microplus* e obtenção de soros.....46

3.4. Obtenção do extrato de larva não alimentada, saliva e glândulas salivares de fêmeas (GSF).....48

3.4.1. Extrato de larvas não alimentadas.....48

3.4.2. Saliva.....49

3.4.3. Glândulas salivares de fêmeas.....50

3.5. *Western blot* do extrato de larvas não alimentadas e saliva do carrapato *R. microplus*.....50

3.6. Gel bi-dimensional.....52

3.6.1. Saliva e glândulas salivares de *R. microplus* 52

3.6.2. Focalização isoelétrica (IEF).....52

3.6.3. Eletroforese bidimensional 53

3.6.4. Coloração com Nitrato de Prata.....54

3.7. *Western blot* dos géis bidimensionais de saliva e GSF 54

4. RESULTADOS 56

4.1. *Western Blot* de extrato de larvas não alimentadas de *R. microplus* com soros de bovinos resistentes e suscetíveis.....56

4.2. *Western Blot* de saliva de *R. microplus* com soros de bovinos resistentes e suscetíveis 63

4.3. *Western blot* de gel bidimensional (2D) de saliva de *R. microplus* com *pool* de soros de animais resistentes e suscetíveis infestado ou não.....70

4.4. *Western blot* de gel bidimensional (2D) de GSF de *R. microplus* com *pool* de soros de animais resistentes e suscetíveis infestado ou não.....75

5. DISCUSSÃO.....80

5.1. *Western blot* 1D de extrato de larva não alimentada e saliva de *R. microplus*.....81

5.2. *Western blot* de géis 2D de saliva e glândulas salivares de fêmeas de *R. microplus*.....86

6. CONCLUSÃO.....92

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....94

1. INTRODUÇÃO

1.1. O carrapato *Rhipicephalus* (Boophilus) *microplus*

1.1.1. Taxonomia, evolução e prejuízos causados por suas infestações

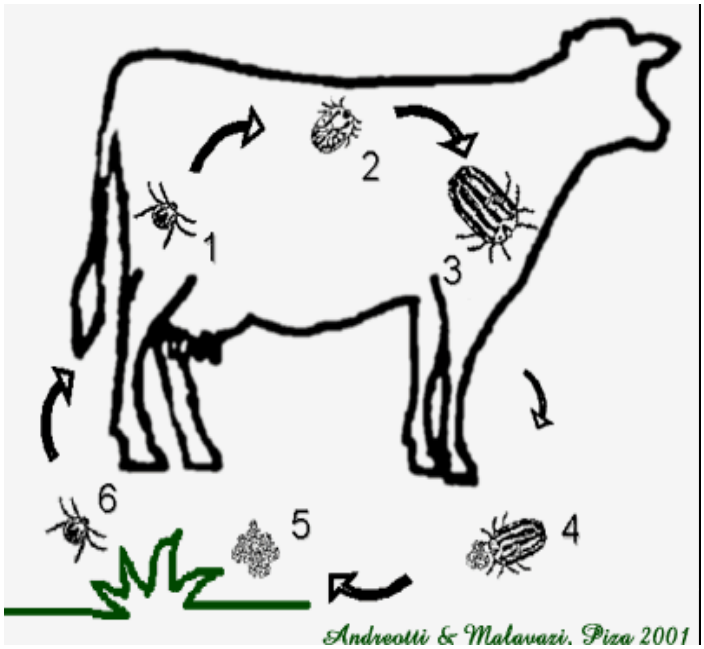
Rhipicephalus (Boophilus) *microplus*, conhecido como carrapato dos bovinos, é um parasito que necessita obrigatoriamente passar um período de sua vida sobre esse hospedeiro ingerindo linfa, substratos teciduais e sangue. Pertence ao filo Arthropoda, classe Arachnida, ordem Acari, subordem Metastigmata e superfamília Ixodidea. Oliver (1989) sugere que os carrapatos possam ter surgido no período Devoniano (350-400 milhões de anos atrás). Supõe-se que quando os répteis se ramificaram em numerosas formas de vida, preenchendo nichos aquáticos e terrestres, os carrapatos mais primitivos que os parasitavam evoluíram em duas principais famílias, Argasidae e Ixodidae. A espécie *R. microplus* originou-se provavelmente na Ásia, quando mamíferos e pássaros substituíram os répteis como vertebrados dominantes, já no período terciário (HOOGSTRAAL; WASSEF, 1985). Adaptou-se perfeitamente ao clima dos países tropicais, onde o calor e a umidade propiciaram condições favoráveis à sobrevivência e manutenção da espécie (POWEL; REID, 1982).

O carrapato dos bovinos é um parasito de grande importância e produz perdas diretas e indiretas pela transmissão de doenças, pelas ações espoliativas e pelo custo de seu combate. Ainda hoje apresenta alta incidência e prevalência no Brasil e mesmo em países desenvolvidos de clima tropical, como a Austrália, pela complexidade dos fatores envolvidos no seu combate e pelo desconhecimento dos produtores sobre informações específicas necessárias à adoção de práticas efetivas de controle em suas propriedades (ROCHA, 1996). No Brasil, os prejuízos causados pelo *R. microplus* são

estimados em mais de US$ 2 bilhões por ano entre perdas diretas e indiretas (Ministério da Agricultura, da Pecuária e do Abastecimento - MAPA, 2000) e ultrapassam US$ 13 bilhões/ano no cenário mundial (FAO, 2002).

1.1.2. Ciclo de vida do *Rhipicephalus* (Boophilus) *microplus*

O ciclo de vida do carrapato *R. microplus* divide-se em uma fase de vida livre e uma fase de vida parasitária (Figura 1). A fase de vida livre inicia-se com o período de pré-postura, após a queda da teleógina ingurgitada e tem, em média, duração de dois a três dias. Passa posteriormente à fase de ovipostura. Essa fase dura em torno de 17 dias e é seguida da fase de eclosão, para a qual são necessários de cinco a dez dias, podendo, no entanto, durar até mais de 100. Após a eclosão das neolarvas, é necessário um período de quatro a 20 dias para que se tornem larvas infestantes. Portanto, o tempo de vida livre do carrapato dos bovinos gira em torno de 28 a 51 dias, podendo se estender a mais de 300 dias, quando as condições ambientais não são favoráveis. Além disso, as larvas podem ficar mais de seis meses sem se alimentar. A fase de vida livre sofre interferências climáticas, trazendo alterações na duração destas que são especialmente afetadas pela umidade e temperatura. Em condições ótimas de temperatura e umidade, a queda/ postura/ eclosão tem em média duração de um mês (GONZALES, 1974).



Fase parasitária:

1- larva infectante realizando a fixação no bovino;

2- ninfa;

3- teleógina em estágio final de ingurgitamento.

Fase de vida livre:

4- teleógina logo após desprendimento, em período de postura no solo;

5- ovos, no solo, em período de incubação;

6- larva, no solo, em período de incubação.

Figura 1. Esquema simplificado do ciclo de vida do carrapato *Rhipicephalus* (Boophilus) *microplus*. Fase parasitária e fase de vida livre. Adaptado de ANDREOTTI e MALAVARI, 2001.

A fase de vida parasitária é praticamente constante em todas as regiões (GONZALES, 1975), e inicia-se quando a larva infestante instala-se no hospedeiro e dura em torno de 21 dias. A larva infestante passa, então, a ser larva parasitária e transforma-se em metalarva, sendo necessários para essa mudança cinco dias em média. São necessárias várias transformações para que o ectoparasita chegue ao estádio adulto. As larvas de *R. microplus* alimentam-se preferencialmente de plasma até que ocorra a primeira muda que dá origem a ninfa, este período dura cerca de sete dias. Dando continuidade à hematofagia, após cerca de sete dias as ninfas sofrerão muda originando ectoparasitas adultos, machos ou fêmeas. De maneira geral, nos momentos que precedem o rápido ingurgitamento das ninfas e das fêmeas é que o sangue torna-se o principal constituinte alimentar (BENNETT, 1974 a; 1974 b). Os adultos vão se acasalar e as fêmeas fecundadas continuam o processo de hematofagia, que dura cerca de sete dias; este processo inicialmente é lento tornando-se rápido ao final deste período. O acasalamento acontece a partir do 17º dia da infestação (LONDT; ARTHUR, 1975) com

rápido ingurgitamento após a cópula, podendo as fêmeas aumentar em até 200 vezes seu peso (KEMP; STONE; BINNINGTON, 1982).

Furlong (1993) afirma que a cada postura uma fêmea produz de 2000 a 3000 ovos. Na fase parasitária são necessários, em média, de 18 a 26 dias para a fixação, alimentação, troca de cutícula, fase adulta e acasalamento, assim como para a alimentação, ingurgitamento e queda das fêmeas. Os machos permanecem mais tempo sobre o bovino e se acasalam com outras fêmeas.

Em relação ao perfil antigênico do carrapato, em especial a composição de sua saliva, diversos trabalhos mostram que mudanças ocorrem ao longo do ciclo parasitário, daí ser importante estudar todas as fases do ciclo parasitário. Narasimham et al. (2007) demonstraram que o transcriptoma e proteoma é dinâmico e muda durante o processo de ingurgitamento. Utilizaram soros de cobaias contra antígenos salivares de *Ixodes scapularis*, onde ocorreu reconhecimentos de proteínas expressas somente nas primeiras 24h ainda na fase de larva e que posteriormente em uma fase mais tardia de "ninfa" essas proteínas não são reconhecidas. Em outro trabalho mostraram a composição e a antigenicidade da saliva do carrapato *Amblyomma hebraeum* com diferentes pesos, consequentemente em diferente fase do ingurgitamento. Soros de coelhos imunizados reconheceram proteínas diferentes em carrapatos com pesos diferentes, mostrando que a composição da saliva modifica durante o processo de ingurgitamento (DHARAMPAUL; KAUFMAN; BELOSEVIC, et al., 1993).

Outros estudos mostram que alguns, mas não todos os componentes parasitários são compartilhados entre carrapatos de diferentes espécies, como mostra o trabalho de Pamar et al. (1996) onde mostraram que os carrapatos *Hyalomma anatolicum* e *R. microplus* possuem proteínas comuns presentes no extrato de glândulas salivares e que outras proteínas são espécie específicas. Ghosh et al. (2005) também realizaram um

estudo com glicoproteinas de 29 e 34 kDa que foram isoladas de larvas dos carrapatos *Hyalomma anatolicum* e do *R. microplus*, sendo que essas proteínas foram utilizadas para imunizações na presença de adjuvantes para conferir proteção, mostrando assim que componentes parasitários são compartilhados entre carrapatos de diferentes espécies.

1.2. Os Hospedeiros dos Carrapatos

1.2.1. Hospedeiros: diferença entre espécies e influência da raça bovina na resistência ao *Rhipicephalus* (Boophilus) *microplus*

O hospedeiro preferencial do *R. microplus* é o bovino, sendo que as infestações mais intensas ocorrem em *Bos taurus taurus* (taurinos) e as menos intensas em *Bos taurus indicus* (zebuínos). Ovelha, cavalo, veado, cão, cabra, homem e outros também podem ser hospedeiros, mas apenas em épocas de grande infestação nas pastagens (GONZALEZ, 1974).

Alguns fatores como sexo e idade, dentre outros, afetam a resistência dos bovinos aos carrapatos, porém a raça é um dos fatores de maior importância sendo amplamente discutido na literatura (da ROCHA, on-line). Vários autores demonstraram haver maior resistência dos zebuínos ao carrapato *R. microplus* quando comparados aos taurinos (GONZALES, 1975; UTECH et al., 1978; MADALENA et al., 1985; OLIVEIRA e ALENCAR, 1989 e 1990; VILLARES, 1941; MATTIOLI, 1998; MATTIOLI e CASSAMA, 1995; MATTIOLI et al., 2000; WAMBURA et al., 1998; MELTZER, 1996). Segundo Gonzales (1975), os primeiros a relatarem tal fato foram

Wharton et al. (1970). Esta diferença foi demonstrada inclusive nos bovinos cruzados, sendo que, quanto maior a contribuição genética zebuína, maior a resistência ao carrapato (UTECH et al., 1978; OLIVEIRA e ALENCAR, 1989 e 1990; LEE, 1979).

Outros carrapatos da família Ixodidae, por exemplo, o *R. sanguineus* que é heteroxeno e infesta hospedeiros de diferentes espécies, são utilizados para estudo da interação entre carrapato e hospedeiro. Camundongos são utilizados como modelo de hospedeiro suscetível para *R. sanguineus*, pois são semelhantes ao cão que não desenvolve resistência ao carrapato mesmo em repetidas infestações; a vantagem de se empregar os camundongos é o fato de existirem muitos reagentes imunológicos disponíveis contra componentes do sistema imune dessa espécies (FERREIRA e SILVA, 1998; FERREIRA et al., 2003). Em contraste aos camundongos e aos cães, as cobaias desenvolvem uma resposta imunológica mais eficaz com as repetidas infestações com *R. sanguineus*, conferindo à resistência (SHAPIRO; VOIGT; FUJISAKI, 1986; GARIN e GRABAREV, 1972; SZABÓ et al., 1995). Apesar do modelo do camundongo e da cobaia ser bastante útil, no contexto de elucidar os mecanismos de resistência aos carrapatos, os bovinos constituem o único modelo no qual é possível examinar, numa mesma espécie, os desfechos distintos de resistência e susceptibilidade das infestações com *R. microplus*. Apesar disso, a maioria dos estudos sobre aquisição de resistência ao carrapato em bovinos avalia o fenômeno em raças taurinas que, embora desenvolvam imunidade, não controlam as infestações com a mesma eficiência das raças zebuínas. Poucos estudos examinam, de forma ao mesmo tempo comparativa e abrangente, os perfis dos diferentes mecanismos efetores imunes anti-carrapatos nas diferentes raças de bovinos.

Há diferentes explicações para a diferença de resistência entre taurinos e zebuínos ao carrapato. Segundo Gonzales (1975) muitos pesquisadores tentaram explicar

tal característica pelo fato dos zebuínos possuírem mais glândulas sebáceas na pele, produzindo odores que afastariam o carrapato, assim como maior mobilidade geral do animal e elasticidade de sua pele, o que possivelmente faz com que se defenda melhor da infestação. Veríssimo (1991) explicou que o sistema de alimentação da larva de *R. microplus* depende de uma reação inflamatória que se inicia no momento da fixação da mesma. No entanto, os zebuínos apresentam uma reação inflamatória mais intensa que o gado europeu levando-os a procederem a uma autolimpeza com lambeduras mais eficientes, o que contribuiria para um melhor equilíbrio entre carrapato e hospedeiro, sendo a infestação mínima nesses animais. Segundo a autora, não é interessante para o parasita matar o seu hospedeiro uma vez que isso afetaria sua própria sobrevivência: o *R. microplus* está bem adaptado ao seu hospedeiro natural, o *Bos indicus,* mas o *Bos taurus* foi introduzido em área enzoótica de *R. microplus* e desenvolveu um problema agudo por causa da sua incapacidade para controlar o número de parasitas. Essa autora informa que animais suscetíveis podem morrer caso não sejam banhados por acaricidas. Moraes et al. (1986) também responsabilizam essa diferença de resistência à maior eficiência no ato de autolimpeza.

A resistência não é refletida apenas pelo número de carrapatos que se alimentam sobre um hospedeiro. As fêmeas 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 e GONZALES, 1984). Comparando-se a resistência das raças Canchim e Nelore, através de infestação artificial e infestação natural, Oliveira et al. (1989, 1990) demonstraram que a resistência é raça dependente em qualquer época do ano e que ocorre uma diminuição significativa no número de carrapato encontrado em ambas as raças quando a época do ano é desfavorável. Guaragna et al. (1992) também observaram os efeitos da estação do

ano e raça, estudando infestações artificiais em touros holandeses e mantiqueiros, de 1 e 2 anos, sendo os primeiros menos resistentes, apesar das duas raças serem taurinas, consideradas suscetíveis. Neste estudo, não houve diferença significativa no nível de infestação entre animais de idades diferentes.

Ainda existem dúvidas sobre quais seriam os mecanismos responsáveis por esses desfechos distintos em bovinos, mas a composição da saliva dos carrapatos indica que a resposta imune é um deles porque contém inúmeros componentes imunomoduladores.

1.3. Bases fisiológicas e moleculares da interface hospedeiro-ectoparasita

1.3.1. Papel da saliva do carrapato na modulação da reação homeostática dos hospedeiros às infestações

Os componentes da saliva e glândulas salivares são intensamente estudados com o objetivo de elucidar a interação entre parasita e hospedeiro. É consenso que a permanência do carrapato em seu hospedeiro reside na sua capacidade de escapar das reações inflamatórias e hemostáticas do hospedeiro. Como todos os sistemas fisiológicos importantes, os sistemas imune, inflamatório e de coagulação dos vertebrados são extremamente redundantes. Para conseguir se manter no hospedeiro, alimentando-se de seu sangue, os carrapatos e outros artrópodes hematófagos desenvolveram sistemas também redundantes que envolvem um grande número de substâncias farmacologicamente ativas e relevantes (RIBEIRO, 1995; FRANCISCHETTI et al., 2009).

Estudos sobre a saliva de diferentes espécies de artrópodes hematófagos mostram a diversidade de substâncias inoculadas no hospedeiro. Entre as moléculas descritas estão anticoagulantes como os inibidores de trombina (HORN et al., 2000); imunossupressores como as prostaglandinas (RIBEIRO et al., 1985; INOKUMA et al., 1994; BOWMAN et al., 1995) e proteínas ligantes de imunoglobulinas (WANG et al., 1994), encontradas também na hemolinfa; anti-inflamatórios como os ligantes de histamina (PAESEN et al., 2000); inibidores da via clássica do sistema complemento como a calreticulina que se liga a C1q (SANDERS et al., 1999); inibidores da C3 convertase do complemento (VALENZUELA et al., 2000); inibidores de agregação plaquetária como as apirases (RIBEIRO, 1995; WIKEL, 1996); e inibidoras de bradicinina (RIBEIRO e MATHER, 1998).

1.3.2. Resposta imune mediada por anticorpos contra saliva de vetores, inclusive de carrapatos

A resposta imune dos hospedeiros aos ectoparasitas envolve vias efetoras como anticorpos, complemento, citocinas, células apresentadoras de antígenos e linfócitos T, sendo que esses componentes efetores agem limitando a hematofagia (ACKERMAN et al., 1981; BROWN et al., 1982 e BROWN, 1982 e 1985). No caso do carrapato, o número de carrapatos alimentando-se de forma eficaz em um hospedeiro resistente é reduzido e as fêmeas têm o peso e a capacidade reprodutiva diminuídos (ACKERMAN et al., 1981; BROWN e ASKENASE, 1983; BROWN; SHAPIRO; ASKENASE, 1984).

As vias efetoras correlacionadas não somente com a resposta imune anti-carrapato, mas com resistência a este são descritas como reações de hipersensibilidade imediata, envolvendo imunoglobulina E, mastócitos e histamina, e de hipersensibilidade tardia, envolvendo basófilos e histamina (BROWN, 1985). A relevância dos basófilos na resistência foi comprovada pelo comprometimento desta quando há ablação experimental dessas células (BROWN, ASKENASE, 1983). Nos animais geneticamente resistentes os componentes da imunidade celular parecem atuar como mecanismo de controle e/ou rejeição ao carrapato (BECHARA et al., 2000).

Muitos estudos são focados sobre a resposta imune humoral frente a antígenos solúveis ou excretados por patógenos e peçonhas (Tabela 1), correlacionando essa resposta com efeito protetor. Anticorpos são utilizados como estratégia terapêutica para neutralizar toxinas e venenos, como o que ocorre em casos de acidentes com picadas de cobras e aranhas e com ferrões de peixes venenosos, neutralizando essas toxinas evitando desenvolvimento das manifestações clínicas como edema, necrose, falência renal e outras manifestações. Stephano et al., (2005) mostraram que anticorpos anti- *Lachesis muta* neutralizam toxinas do veneno dessa cobra desde que um componente imunossupressor seja previamente removido antes de proceder à produção do soro anti-ofídico. Pescadores ferroados repetidamente pelo peixe *Thalassophryne nattereri* desenvolvem anticorpos anti-peçonha e acabam ficando resistentes às manifestações clínicas desse tipo de envenenamento (PIRAN-SOARES et al., 2007). Tal situação pode ser alcançada por uma vacina que alveje componentes salivares do *R. microplus* e, portanto, uma estudo do proteoma da glândula salivar é necessário.

Antígenos salivares do flebotomíneo transmissor da leishmaniose também induzem resposta imune mediada por anticorpos. Tal como a saliva dos carrapatos, a saliva desse vetor também possui substâncias que são capazes de interferir na hemostasia,

na inflamação e na resposta imune do hospedeiro (RIBEIRO, 1985; CHARLAB et al., 1999). Quando *Leishmania major* é co-inoculada com homogenato de glândula salivar do mosquito *Lutzomia langipalpis* induz uma doença mais severa quando comparada com aquela induzida pelo parasita inoculado sem saliva (TITUS; RIBEIRO, 1988). Camundongos expostos ao vetor não infectado com *Leishmania* desenvolvem uma reposta de anticorpos anti-saliva e uma resposta de hipersensibilidade do tipo tardia, e quando infectados com *L. major* esses mesmos camundongos têm uma redução da gravidade da lesão sugerindo que as respostas anti-saliva promovem um efeito protetor contra o parasita que o vetor transmite (BELKAID et al., 1998; VALENZUELA et al., 2001). Os componentes salivares responsáveis por este fenômeno já foram identificados (GOMES et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2008), mas função biológica ainda não foi descrita. Esses dados indicam que a resposta contra componentes salivares do carrapato também poderá proteger hospedeiros vacinados contra os parasitas transmitidos pelo carrapato.

Trabalhos envolvendo carrapatos mostram que a resistência pode ser adquirida através de uma resposta imune mediada por anticorpos e por uma resposta de hipersensibilidade cutânea (TRAGER, 1939; SHAPIRO; VOIGT; FUJISAKI, 1986; ALLEN et al., 1973), contra alguns antígenos secretados por carrapatos (WIKEL, 1982). Shapiro et al. (1986) infestaram cobaias repetidas vezes e os animais desenvolveram resistência ao carrapato. Esses pesquisadores utilizaram soros desses animais para caracterizar antígenos presentes no carrapato *R. appendiculatus*. Diversos antígenos estão presentes em todos os tecidos do carrapato incluindo saliva, sugerindo que a resistência ao carrapato é muito complexa e envolve reconhecimento de vários antígenos (Tabela 1).

Outros trabalhos envolvendo carrapato, demonstraram que anticorpos de bovinos imunes, específicos para tecidos de carrapatos, estão presentes na hemolinfa de

fêmeas de *R. microplus* ingurgitadas, com atividade preservada por até 48 horas após o ciclo de vida parasitária ser concluído (GUDDERRA et al., 2002; VAZ Jr. et al., 1996). A análise da hemolinfa de *Dermacentor variabilis,* que é um carrapato de cães, comprovou a presença de imunoglobulina G (IgG) com especificidade para as proteínas alvo em órgãos como glândula salivar e ovário (ACKERMAN et al., 1981). Em *R. appendiculatus,* um carrapato ixodideo como o *R. microplus,* as IgGs presentes na hemolinfa, no extrato de glândula salivar e na saliva mantêm 35-42% da atividade biológica até o sexto dia de alimentação do parasita (WANG e NUTTALL, 1994). Essas observações comprovam o desenvolvimento de resposta imune pelo hospedeiro capaz de reconhecer estruturas internas do parasita. A presença de anticorpos contra esses componentes parasitários no soro dos hospedeiros possibilitaria resposta imune contra o parasita ao longo da fase de vida parasitária (VAZ Jr. et al., 1996).

Embora não exista degradação das imunoglobulinas (Igs) encontradas na hemolinfa de artrópodes hematófagos (VAZ Jr. et al., 1996), sugere-se que as proteínas que a elas se ligam estejam envolvidas na excreção, pela saliva, das Igs ingeridas com o sangue do hospedeiro (WANG; NUTTALL, 1994). Esses fenômenos podem ser mediados pelas Proteínas ligantes de Imunoglobulinas (PLIGs) da saliva do carrapato (WANG; NUTTALL, 1995). Transcritos de PLIGs putativas estão presentes no transcriptoma de glândulas salivares de carrapatos machos de *R. microplus* em processo de alimentação, sendo um dos grupos de genes mais abundantemente expressos (3% do total de clones, dados não publicados do grupo). Muitos outros patógenos possuem PLIGs (De MIRANDA SANTOS; CAMPOS NETO, 1981). Os alótipos de IgGs dos bovinos afetam a capacidade de ligação da IgG2 a PLIGs de *Haemophilus somnus*, de proteína G de estreptococos e de proteína A de estafilococos (BASTIDA-CORCUERA et al., 1999). As PLIGs indicam que se os anticorpos não fossem neutralizados pelos carrapatos seria um mecanismo efetor eficiente

de controle do parasita. Kashino et al. (2005) relatam que os níveis de anticorpos IgG específicos para saliva de *R. microplus* diminuem nos hospedeiros bovinos suscetíveis quando estão infestados com altos números de carrapatos, mas não quando sofrem infestações menos intensas. Esses dados sugerem que as PLIGs do *R. microplus* não têm efeito sobre IgGs de bovinos resistentes. Em resumo, a presença de PLIGs abundantes na saliva de *R. microplus* aponta para um papel importante dos anticorpos na mediação da resistência a esse parasita.

A resposta imune mediada por anticorpos é, portanto, eficiente para neutralizar antígenos solúveis, incluindo saliva de vetores e parasitas e a identificação de antígenos que podem posteriormente ser utilizados no desenvolvimento de vacina tem de ser empreendida.

TABELA 1 – Avaliação de imunidade mediada por anticorpos induzidos por infestações contra saliva de artrópodes por meio de *western blot* de proteínas separadas em uma e/ou duas dimensões

Espécies	Testes	Proteínas Identificadas e Origem dos Soros	Comentários	Referências
Ectoparasitas				
Sarcoptes scabiei	Eletroforese 1D; Western Blot	30 proteínas reconhecidas nos soros de suínos hipersensíveis e 21 proteínas reconhecidas por suínos infestados cronicamente	Soros de suínos infestados com *Sarcoptes scabiei* reagiram diferencialmente contra antígenos desse parasita.	(Rambozzi et al, 2007)
Ixodes scapularis	Eletroforese 2D; Western Blot 2D; Dot Blot;	Os soros de cobaias reconhecem antígenos salivares de *I. scapularis*, onde ocorre reconhecimento de proteínas expressas somente nas primeiras 24h ainda na fase de larva e que posteriormente em uma fase mais tardia de "ninfa" essas proteínas não são reconhecidas	Mostra que transcriptoma e proteoma são dinâmicos e mudam durante o processo de ingurgitamento.	(Narasimhan et al, 2007)
Amblyomma hebraeum	Western Blot	Soros de coelhos infestados e imunizados reconhecem proteínas diferencialmente, sendo que os pesos moleculares variam entre de 14 a 200 kDa.	Soros de coelhos imunizados reconheceram proteínas diferentes dos carrapatos com pesos diferentes, mostrando que a composição da saliva modifica durante o processo de ingurgitamento	(Dharampaul., Kaufman, W. R.; Belosevic, M., 1993)
Hyalomma anatolicum e Rhipicephalus microplus	Western Blot	Soros de camundongos reconhecem proteínas em ambas as amostras dos carrapatos: 60, 66, 148, 264, 300 e > 300 kDa, sendo que as bandas 56, 64, 120 e 220 kDa estão sendo reconhecidas nas amostras do *H. anatolicum* e não no *R. microplus*	Componentes parasitários (Salivares) são compartilhados entre carrapatos de diferentes espécies, mas outros são espécies específicas.	(Parmar., Grewal, A. S.; Dhillon, P., 1996)
Rhipicephalus microplus	ELISA; Eletroforese 1D; Western Blot	Soro de bovinos infestados reconhecem proteína de 10kDa presentes em diversos tecidos do carrapato	Mostra que anticorpos de bovinos imunes, específicos para tecidos de carrapatos (salivares), estão presentes na hemolinfa com atividade preservada por até 48 horas após o ciclo de vida parasitária ser concluído; Mostra também que antígenos comuns estão presentes em diversos tecidos do carrapato	(Vaz, I et al, 1996; Vaz, I., Ozaki, L. S.; Masuda, A., 1994)

TABELA 1 – Continuação Tabela 1

Rhipicephalus microplus	Eletroforese 1D; Western Blot	Soro de bovino resistente infestado reage contra proteínas da glândula salivar do *Rhipicephalus microplus*	Soro de bovino resistente infestado reage contra proteínas salivares do *Rhipicephalus microplus*	(Brossard, 1976)
Rhipicephalus appendiculatus	Eletroforese 1D; Western Blot	Soros de cobaias infestadas reconheceram proteínas com os pesos moleculares de 120, 94, 88, 77, 58, 46, 35, 31, 28, 25, 20 e16 kDa	Diversos antígenos estão presentes em todos os tecidos do carrapato incluindo saliva, sugerindo que a resistência ao carrapato é muito complexa e envolve reconhecimento de vários antígenos	(Shapiro., Voigt, W. P.; Fujisaki, K., 1986)
Ornithodoros moubata e Ornithodoros erraticus	Eletroforese 2D; Western Blot; Bioinformática	Soros de porcos infestados foram utilizados para identificão de proteínas presentes na amostras desses carrapatos, sendo que esses soros reconheceram várias proteinas dentre elas: 18 isoformas proteínas similares TSGP1 de O. *savignyi*; 6 proteínas similares precursor DS-1 de *O. erraticus*; 5 subunidades NADPH de-hidrogenase; 5 subunidades ATP sintase F0; Lipocaina; Tubulina alpha; subunidade alpha do proteassoma.	Busca de antígenos imunogênicos com intuito de identificação de antígenos que possam ser utilizados no desenvolvimento de vacina	(Oleaga et al, 2007)
Rhipicephalus sanguineus	Eletroforese 1D; Western Blot;	Soros de cobaias e cão reconhecem várias proteínas do *Rhipicephalus sanguineus*	Identificação do padrão de reconhecimento de antígenos do *Rhipicephalus sanguineus* por soro de hospedeiros resistentes e suscetíveis	(Ferreira., Machado, R. Z.; Bechara, G. H., 1996)
Amblyomma americanum	Eletroforese 1D; Western Blot;	Soros de coelhos infestados reagem contra aproximadamente 25 proteínas presente nas glândulas salivares	Caracterização de antígenos salivares reconhecidos por coelhos infestados.	(Brown, 1988)
Amblyomma americanum	Eletroforese 1D; Western Blot;	Soros de coelhos infestados reagem contra proteínas 15, 50, 18 e 160 kDa presente nas glândulas salivares do carrapato macho	Soros de coelhos infestados reagem contra proteínas presentes nas glândulas salivares do carrapato macho	(Sanders et al, 1996; Wheeler et al, 1989)
Ixodes dammini	Eletroforese 1D; Western Blot;	Soros de coelhos infestados reagem contra proteínas de 8, 24, 36 e 41 kDa de glândulas salivares de fêmeas do carrapato	Mostram que soros de coelhos infestados com carrapato reagem contra proteínas salivares	(Wheeler et al, 1989)
Ixodes scapularis	Eletroforese 1D; Western Blot;	Soros de animais carnívoros "raccoons"reagem contra proteínas salivares do carrapato *Ixodes scapularis*	Sugere que a resistência ao carrapato pode ser devida a presença desses anticorpos contra antígenos salivares do carrapato, prevenindo contra transmissão de doença.	(Craig et al, 1996; Wheeler et al, 1989)

TABELA 1 – Continuação Tabela 1

Dípteros:				
Aedes communis e *Aedes aegypti*	Eletroforese 1D; Western Blot;	Soros de crianças expostas aos mosquitos possui prevalência de anticorpos das classes IgE e IgG4 que reconhecem alguns antígenos presentes na saliva desses mosquitos.	Essas proteínas podem estar envolvidas na resposta imune imediata no local da picada do mosquito.	(Remoue et al, 2007; Reunala et al, 1994)
Glossina species	Eletroforese 1D; Western Blot;	Soros de humanos de áreas endêmicas para *Trypanosoma brucei gambiense* reagem com proteínas presentes na saliva de *Glossina species*	Mostra uma comparação de soros de humanos de áreas endêmicas para *Trypanosoma brucei gambiense*, onde a resposta de anticorpos dessas pessoas podem facilitar desenvolvimento de uma infecção.	(Poinsignon et al, 2007)
Anopheles	Eletroforese 1D; Western Blot;	Soro de paciente com malária (*Plasmodium falciparum* ou *P. vivax*) reage contra proteínas salivares do mosquito *Anopheles*	Resposta imune humoral natural reage contra proteínas salivares do mosquito *Anopheles*	(Waitayakul et al, 2006)
Lutzomyia longipalpis	Eletroforese 1D; Western Blot;	Soro de raposas de áreas endêmicas de leishmaniose possui altos níveis de anticorpos contra proteínas salivares do *Lutzomyia longipalpis*	Soro de raposas reage contra proteínas salivares do *Lutzomyia longipalpis*	(Gomes et al, 2007)
Triatoma infestans	Eletroforese 1D; Western Blot;	Soros de pacientes chagásicos reagem contra proteínas presente nas glândulas salivares do *Triatoma infestans*	Soros de pacientes chagasicos reagem contra proteínas salivares do vetor	(Nascimento et al, 2001)

1.4. Vacinas contra carrapatos

Os achados de Trager (1939) levaram vários pesquisadores a estudarem as bases moleculares e imunológicas envolvidas na interface hospedeiro-ectoparasita (revisto em RIBEIRO, 1995). O acúmulo desses conhecimentos tem gerado dados que contribuem para o desenvolvimento de vacinas anti-carrapato baseadas em extratos de glândulas salivares dos ectoparasitas, os chamados antígenos expostos (BROWN, SHAPIRO E ASKENASE, 1984), ou antígenos de outros tecidos parasitários como o intestino, os chamados antígenos ocultos (WILLADSEN e KEMP, 1988; De La FUENTE et al., 1999). O interesse especial nos produtos de glândula salivar explica-se pelo fato deste órgão atuar diretamente na interface entre parasita e hospedeiro, sendo então alvo importante de vacinas na tentativa de limitar a alimentação do parasita. Sabe-se que a distribuição de uma população de parasitas em uma população de hospedeiros não é uma distribuição normal e acredita-se que a imunidade inata e a resistência adquirida contribuam para isso. Desta forma, a aplicação de uma vacina eficaz permitiria o aumento da população de hospedeiros resistentes possibilitando a redução da infestação e o controle da população de parasitas (PRUETT, 1999).

1.4.1. Vacinas comerciais de primeira geração disponíveis e suas limitações

A co-evolução das espécies de parasitas e hospedeiros ao longo do tempo contribuiu para uma compatibilidade seletiva responsável pela coexistência de ambas. Então é razoável supor que a imunidade do hospedeiro decorrente de uma infestação natural por ectoparasitas não seja suficiente para o controle. Sugeriu-se que o controle de

ectoparasitas seria mais eficaz se a imunidade do hospedeiro fosse capaz de neutralizar moléculas envolvidas no desenvolvimento do parasita como os antígenos ocultos (PRUETT, 1999; WILLADSEN e KEMP, 1988). Por não serem expostos ao hospedeiro em uma infestação natural os antígenos ocultos não devem gerar mecanismos de escape do parasita por pressão seletiva.

Atualmente existem duas vacinas existentes no mercado baseadas neste conceito, a TickGARD (Biotech Australia Pty. Ltd., Austrália) e a GAVAC (Heber Biotec S.A., Havana, Cuba). Ambas utilizam um único antígeno, a Bm86, uma glicoproteína de membrana de células intestinais de *R. microplus,* expresso em *Escherichia coli* e *Pichia pastoris,* respectivamente. O desenvolvimento de imunidade adquirida pelo gado exposto repetidamente ao *R. microplus* é um fato conhecido, contudo a proteção é apenas parcial (PRUETT, 1999; DALTON e MULCAHY, 2001). Experimentos utilizando homogenatos de fêmeas adultas semi-ingurgitadas de *R. microplus* como antígenos mostraram que a resposta imune dos animais vacinados causou danos nas células intestinais do ectoparasita (PRUETT, 1999). Este efeito revelou resposta diferente da imunidade desencadeada por infestação natural. Como conseqüência, existe, de fato, redução da infestação e da capacidade reprodutiva dos carrapatos. Porém, a eficácia das vacinas baseadas na Bm86 são muito variáveis e suas principais limitações são os fatos de não induzir imunidade duradoura e não dispensar o uso combinado de acaricidas (DALTON e MULCAHY, 2001). Embora este aspecto seja pouco explorado em publicações, várias comunicações pessoais relatam que as vacinas são de difícil manejo e requerem aplicações repetidas para a manutenção dos níveis de anticorpos necessários e conseqüente redução da população de carrapatos infestando o hospedeiro. Este talvez seja o principal aspecto negativo do uso de antígenos ocultos, pois, não havendo exposição freqüente do hospedeiro ao antígeno, como acontece com antígenos salivares,

torna-se difícil a preservação de imunidade eficiente. Todavia, estas vacinas reforçam a ideia de que a imunoprofilaxia adotada com antígenos melhor selecionados possa ser uma maneira eficiente de se fazer o controle da infestação por carrapatos.

As limitações dessas vacinas decorrem das seguintes lacunas na estratégia de seu desenvolvimento: **1)** A escolha dos antígenos, embora fundamentada, não levou em consideração todo o universo antigênico do parasita. Há uma desproporção entre o repertório antigênico e o número de antígenos de carrapatos, parasitas complexos, ora sob avaliação ou presentes nas vacinas comerciais; **2)** Os mecanismos efetores que controlam, de fato, o carrapato, embora devam ser obrigatoriamente induzidos pela vacina, não foram levados em consideração, mesmo porque não são bem conhecidos. Além disso, o carrapato causa imunossupressão e os componentes responsáveis por esse efeito devem ser contornados; **3)** A preferência por antígenos ocultos desconsidera a memória imunológica cujo requisito fundamental para conferir imunidade protetora é a re-estimulação com antígeno (ZINKERNAGEL, 2002). Como os antígenos dessas vacinas não são expostos ao hospedeiro durante infestações, como o são antígenos salivares, tal requisito não é atendido senão pela re-vacinação freqüente, o que é indesejável para a logística do manejo.

1.4.2. Bases para desenvolvimento de uma vacina de segunda geração anti-carrapato *R. microplus*

Acredita-se que uma vacina baseada em um conjunto de antígenos, ocultos e não ocultos, possa produzir uma resposta mais satisfatória para a redução da infestação (TRIMNELL et al., 2002). Para que uma vacina seja de fato eficaz, necessita-se de alvos de importância fundamental para viabilidade e capacidade reprodutiva do parasita e que

sejam imunogênicos. Também é necessário que mecanismos imunes protetores sejam desencadeados e estejam ativos durante o parasitismo, mesmo na presença da atividade imunomoduladora da saliva, e que o sistema de entrega da vacina seja, além de conveniente, eficaz para manter uma resposta imune de longa duração. Para tanto, é de extrema importância para as especificações de delineamento de uma vacina, além da seleção de antígenos, o conhecimento da natureza dos mecanismos de resposta imune desencadeados pelo parasita em hospedeiros resistentes e susceptíveis.

Atualmente vários pesquisadores empregam estratégias proteômicas para a busca de antígenos vacinais, inclusive em carrapatos (Tabela 2) (OLEAGA et al., 2007; MADDEN; SAUER; DILLWITH, 2002 e 2004). Porém nenhum trabalho emprega um modelo experimental semelhante ao desenvolvido aqui, onde os bovinos constituem o único modelo no qual é possível examinar, numa mesma espécie, os desfechos distintos de resistência e suscetibilidade das infestações com carrapatos. Ainda não se sabe se os bovinos apresentando os diferentes fenótipos de infestação reconhecem proteínas distintas na saliva do carrapato.

As técnicas de eletroforese em uma e duas dimensões seguidas por análises de *western blots* com soros de hospedeiros imunes apresentando diferentes níveis de imunidade contra parasitas e outros patógenos, podem ajudar na identificação de novos candidatos para vacinas (Tabela 2). Por exemplo, vários trabalhos empregaram essa abordagem para realizar um mapeamento antigênico de diversos parasitas como *Fasciola hepatica* (JEFFERIES et al., 2000), *T. cruzi* (PABA et al., 2004), *T.gondii* (COHEN et al., 2002; GEISSLER, et al., 1999; DLUGONSKA, et al., 2001), *Neospora caninum* (LEE et al., 2003), *Candida albicance* (FERNANDEZ-ARENAS et al., 2004), *Mycobacterium tuberculosis* (SINHA et al., 2002 e 2005) e *Leishmania* (FORGBER et al., 2006) (Tabela 2).

Nesse contexto, o presente estudo teve como principal objetivo elucidar os mecanismos de resposta imune humoral desenvolvido pelos hospedeiros susceptíveis e resistentes ao *R. microplus*, uma vez que a resposta mediada por anticorpos pode ser importante na resistência ao carrapato (TRAGER, 1939). Saber quais proteínas do carrapato, principalmente salivares, são imunogênicas para animais resistentes e suscetíveis e saber quais proteínas que não são reconhecidas durante infestações tem grande relevância para a escolha de antígenos vacinais e adjuvantes que desencadeiem o padrão de resposta imune desenvolvido por bovinos resistentes.

TABELA 2 – Estudos sobre proteomas salivares de parasitas hematófagos e peçonhas

Espécies	Testes	Proteínas Identificadas	Comentários	Referências
Ixodes scapularis	Eletroforese 2D; Western Blot 2D; Dot Blot;	Os soros de cobaias reconhecem antígenos salivares de *I. scapularis*, onde ocorre reconhecimento de proteínas expressas somente nas primeiras 24h ainda na fase de larva e que posteriormente em uma fase mais tardia de "ninfa" essas proteínas não são reconhecidas	Mostra que transcriptoma e proteoma são dinâmicos e mudam durante o processo de ingurgitamento.	(Narasimhan et al, 2007)
Ornithodoros moubata e Ornithodoros erraticus	Seqüenciamento; Eletroforese 1D e 2D; Western Blot; Bioinformática	18 Isoformas proteínas similares TSGP1 de O. *savignyi*; 6 proteínas similares precursor DS-1 de *O. erraticus*; 5 subunidade NADPH de-hidrogenase; 5 subunidade ATP sintase F0; Lipocaina; Tubulina alpha; subunidade alpha do proteassoma.	Busca de antígenos imunogênicos com intuito de identificação de antígenos que possam ser utilizados no desenvolvimento de vacina	(Astigarraga et al, 1997; Francischetti et al, 2008; Oleaga et al, 2007)
Amblyomma mericanum e Amblyvomma maculatum	Seqüenciamento; Eletroforese 1D e 2D; Western Blot; Bioinformática	Observaram que a maioria das proteínas antigênicas presentes de forma abundante na saliva de *A. americanum* e *A. maculatum* era derivada do hospedeiro. Em não se tratando de um artefato técnico, provavelmente foram modificadas pelo carrapato passando a serem reconhecidas como estranhos pelo próprio hospedeiro.	Busca de antígenos imunogênicos com intuito de identificação de antígenos que possam ser utilizados no desenvolvimento de vacina	(Madden., Sauer, J. R.; Dillwith, J. W., 2002; Madden., Sauer, J. R.; Dillwith, J. W., 2004)
Ornithodoros coriaceus	Seqüenciamento; Eletroforese 1D e 2D; Western Blot; Bioinformática	Identificação de várias proteínas presente nas glândulas salivares desse carrapato	Busca de antígenos imunogênicos	(Francischetti et al, 2008)
Lutzomyia longipalpis	Eletroforese 2D; Espectrometria de massa	6.5-kD- Maxadilan	Potente vasodilatador e imunosupressor presente na saliva desse vetor	(Lerner et al, 1991; Qureshi et al, 1996)
Aedes albopictus	Proteoma	Identificação de proteínas de três categorias: housekeeping, secretada ou não conhecidas	Busca de proteínas imunogênicas	(Arca et al, 2007; Gutierrez et al, 2009))
Aedes aegypti	Eletroforese 2D; Espectrometria de massa	Identificação de proteínas relacionadas com resposta imune do hospedeiro	Mostra proteínas que podem prejudicar a defesa dos hospedeiros frente à infecção	(Biron et al, 2005)
Anopheles gambiae	Eletroforese 1 D e 2D; Espectrometria de massa	Identificou 5 proteínas na saliva e mais de 122 proteínas na glândulas salivares do mosquito	Busca de proteínas imunogênicas	(Choumet et al, 2007; Gutierrez et al, 2009)

TABELA 2 – continuação

Anopheles gambiae	MudPIT; Seqüenciamento	209 proteínas identificadas	Busca de antígenos imunogênicos	(Dinglasan et al, 2009)
Leishmania donovani	Seqüenciamento; Eletroforese 2D; Western Blot; Bioinformática	Frações de 68 a 97,4 kDa (HSP-70; p45; aldolase; enolase; isomerase; calreticulina)	Busca de antígenos imunogênicos com intuito de imunoprofilaxia	(Gupta et al, 2007)
Leishmania donovani	Seqüenciamento; Eletroforese 2D; Western Blot; Bioinformática	330 antígenos.	Busca de antígenos imunogênicos	(Forgber et al, 2006)
Fasciola hepatica	Eletroforese 2D;	Identificação de várias proteínas	Busca de antígenos imunogênicos	(Jefferies., Brophy, P. M.; Barrett, J., 2000)
Trypanosoma cruzi	Seqüenciamento; Eletroforese 2D; Bioinformática	19 proteínas diferentes identificadas (HSP; chaperones, HSP 60, HSP 70 e HSP 90), elongation factors, enzimas de via glicolítica (enolase, piruvato Kinase e 2,3 bifosfogliceril mutase) e proteínas estruturais (KMP 11, tubulina).	Busca de antígenos imunogênicos	(Paba et al, 2004)
Toxoplasma gondii	Seqüenciamento; Eletroforese 2D; Bioinformática; Western Blot	GRA1-GRA8, S16/ ácido fosfatase, hidrolase triofosfato nuclear e H4; Dentre outras	Busca de antígenos imunogênicos	(Cohen et al, 2002; Dlugonska et al, 2001; Geissler et al, 1999)
Neospora caninum	Seqüenciamento; Eletroforese 2D; Bioinformática; Western Blot	20 proteínas diferentes foram identificadas	Busca de antígenos imunogênicos	(Lee et al, 2003)
Candida albicans	Seqüenciamento; Eletroforese 2D; Bioinformática; Western Blot	Identificação de várias proteínas	Busca de antígenos imunogênicos	(Fernandez-Arenas et al, 2004)
Mycobacterium tuberculosis	Seqüenciamento; Eletroforese 2D; Bioinformática;	Identificação de várias proteínas	Busca de antígenos imunogênicos	(Sinha et al, 2002; Sinha et al, 2005)
Plasmodium falciparum	Microarray	18 proteínas recombinantes derivadas de proteína de superfície de merozoita MSP1, MSP2, MSP3, e antígeno de membrana apical AMA -1	Busca de antígenos imunogênicos com intuito de identificar antígenos que podem estar relacionados com proteção	(Gray et al, 2007)

TABELA 2 – continuação

Trichostrongylus colubriformis	Seqüenciamento; Eletroforese 2D; Western Blot	Soros de ovelhas reconheceram aproximadamente 28 proteínas alvos	Busca de antígenos imunogênicos	(Kiel et al, 2007)
Loxosceles genus	Seqüenciamento; Eletroforese 2D;	Identificaram proteínas presentes no venenos das aranhas *L. gaucho, L. intermedia, e L. laeta* de 30-35 kDa, pI 3-10	Busca de antígenos para desenvolvimento de um antiveneno	(Astigarraga et al, 1997; Machado et al, 2005)
Phoneutria nigriventer, Phoneutria reidyi, e Phoneutria keyserlingi	Seqüenciamento; Eletroforese 2D;	Identificaram algumas proteínas importantes no veneno dessas aranhas	Busca de antígenos para desenvolvimento de um antiveneno	(Richardson et al, 2006)
Leech Hirudo	Seqüenciamento; Eletroforese 2D;	Identificaram algumas proteínas presentes SNC sanguessugas importantes na resposta imune	Busca de proteínas medicinais	(Vergote et al, 2006)

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

1) Identificar antígenos de carrapatos *R. microplus* que induzem resposta humoral protetora em bovinos.

2) Descobrir antígenos de carrapatos *R. microplus* para desenvolvimento de vacina anti-carrapato multicomponente e multiefetora .

2.2. Objetivo específico

1) Identificar e caracterizar parcialmente componentes protéicos do extrato de larvas não alimentadas, da saliva e das glândulas salivares de fêmeas de *R. microplus* reconhecidos por soros de bovinos geneticamente resistentes e suscetíveis ao carrapato, submetidos a infestações primárias, secundárias, terciárias com larvas, ninfas e adultos.

2) Verificar se o padrão de reconhecimento por anticorpos se modifica ao longo do ciclo parasitário ou de acordo com o número de infestações.

3) Verificar se ocorre um padrão de reconhecimento diferencial entre os fenótipos de infestações.

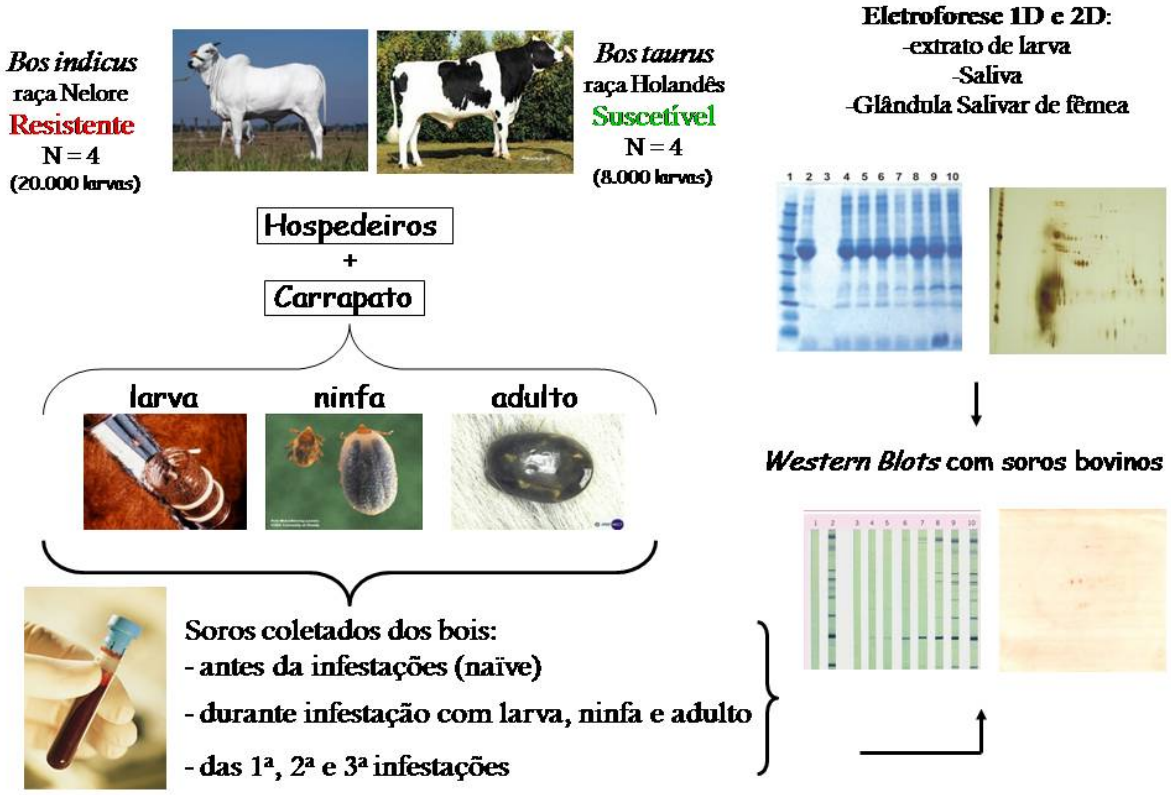
3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Comitê de ética

Este projeto está de acordo com os princípios éticos na experimentação animal adotado pelo colégio brasileiro de experimentação animal (COBEA) e foi aprovado pela comissão de ética em experimentação animal (CETEA) em reunião de 28 de maio de 2007.

3.2. Fluxograma

O Esquema 1, representa a metodologia utilizada para o desenvolvimento desse trabalho.



Esquema 1. Fluxograma da metodologia utilizada neste trabalho.

3.3. Infestações de bovinos com *R. microplus* e obtenção de soros

Os soros empregados neste trabalho foram coletados desde o ano de 2005, no campus de Pirassununga da Universidade de São Paulo, com colaboração do Prof. Dr. Antonio Augusto Mendes Maia. Os animais utilizados foram quatro machos da raça *B. taurus taurus*, Holandês Preto e Branco - HPB e quatro machos da raça *Bos taurus indicus*, Nelore – Nel. No início dos experimentos os animais estavam com quatro meses de idade e livres de infestação por carrapatos. Os bovinos foram mantidos em manejo intensivo (estabulados) com suplementação protéica e mineral, sendo expostos a infestações artificiais com carrapatos *R. microplus*. Os animais da raça Nelore foram infestados no pescoço com 20.000 larvas e os animais da raça HPB com 10.000 larvas por animal a cada infestação. Durante a infestação os carrapatos foram contados com a técnica descrita por Oliveira e Alencar (1990) e preconizada pelo Ministério da Agricultura, da Pecuária e do Abastecimento e os dados acumulados foram correlacionados com os padrões de reconhecimento de antígenos parasitários encontrados durante o desenvolvimento deste trabalho. Os animais foram infestados 3 vezes com larvas, com intervalo de 2 meses e as coletas de sangue para obtenção de soro foram feitas antes da exposição e durante as três infestações nos diversos estágios do ciclo de vida (larva, ninfa e adulto). Sendo assim, cada animal forneceu diversas amostras de soro durante as infestações, conforme pode ser observado na Tabela 3. Os soros foram extraídos do sangue periférico coletado em tubos Vaccutainer® sem anticoagulantes, incubados a 37ºC para retração do coágulo. Desta separação os soros foram aliquotados e guardados a -20ºC até uso. O controle dos carrapatos em animais suscetíveis foi feito por meio de pulverizações ocasionais com carrapaticidas tópicos, somente quando a saúde do animal estava comprometida devida à alta infestação. Os

grupos experimentais foram vacinados a cada seis meses contra febre aftosa e raiva (Bovicel®, Vallée).

Tabela 3. Descrição dos soros empregados para as imunodetecções.

Hospedeiro e número de infestações	Forma parasitária presente durante a coleta (n = número de soros obtidos)			
	não infestados	larvas	ninfas	adultos
HPB 1 vez infestado com 10.000 larvas	n=4	n=4	n=4	n=4
HPB 2 vezes infestados com 10.000 larvas		n=4	n=4	n=4
HPB 3 vezes infestados com 10.000 larvas		n=4	n=3†	n=3†
Nelore 1 vez infestado com 20.000 larvas	n=4	n=4	n=0*	n=0*
Nelore 2 vezes infestados com 20.000 larvas		n=4	n=4	n=4
Nelore 3 vezes infestados com 20.000 larvas		n=3#	n=4	n=4

†Na 3ºinfestação dos HPB houve morte de um dos animais por timpanismo.
*Na 1ºinfestação dos nelores não foram encontrados carrapatos nos estágios ninfa e adulto, portanto não foram coletados os soros.
#Não houve coleta do soro de um dos animais.

Nos experimentos de *western blots* de géis 1D de extrato de larvas não alimentadas e saliva do carrapato *R. microplus*, as amostras foram separadas por eletroforese e executados em sistema de *manifold* de 20 calhas com soros individuais dos bovinos resistentes e suscetíveis, num total de 69 soros de bovinos HPB e Nelore (Tabela 3). Já nos experimentos de *western blots* de géis 2D de GSF e saliva do carrapato *R. microplus*, as amostras foram separadas por eletroforese e blotadas com soros em forma de *pool* (Tabela 4), devido a dificuldade de obtenção das amostras.

Tabela 4. Soros utilizados nos *western blot* de saliva e glândulas salivares de fêmeas.

Hospedeiro	**Soros em *pool***	**Forma parasitária (n = numero de animais)**			
		Não infestado	**larva**	**ninfa**	**adulto**
Suscetível	*Pool* de soros de animais *naive*	n=4			
Suscetíveis	*Pool* de soros de animais infestados		n=4	n=4	n=4
Resistentes	*Pool* de soros de animais *naive*	n=4			
Resistentes	*Pool* de soros de animais infestados		n=4	n=4	n=4

Total de 4 *pools* de soros testados.

3.4. Obtenção do extrato de larva não alimentada, saliva e glândulas salivares de fêmeas

Os animais utilizados para obtenção das amostras encontravam-se no campus da USP de Ribeirão Preto-SP, e foram utilizados dois animais da raça HPB, que foram infestados artificialmente com larvas do carrapato *R. microplus.* No início dos experimentos os animais estavam com quatro meses de idade e livres de infestação por carrapatos.

Fêmeas ingurgitadas foram coletadas, sendo que parte delas foi utilizada para a manutenção da colônia de carrapatos (oviposição/eclosão das larvas) e para obter o extrato de larvas. A outra parte foi utilizada para obtenção de saliva. Durante as infestações, fêmeas adultas foram coletadas para extração das glândulas salivares (GSF).

3.4.1. Extrato de larvas não alimentadas

Para obtenção de larvas não alimentadas, fêmeas alimentadas em bovinos HPB com peso aproximado de 0,130g foram coletadas e mantidas a 28°C com umidade

relativa 70-80% (BOD[2]) para oviposição. Sete dias após a eclosão, as larvas foram acondicionadas em criotubos e congeladas a –70°C. Posteriormente estas larvas congeladas foram ressuspendidas em PBS (Phosphate buffer saline) pH 7.4 e trituradas com homogeneizador e sonicadas para obtenção do extrato, que foi centrifugado a 14.000*g* por 30 minutos. O sobrenadante foi coletado e a concentração protéica foi determinada com kit Coomassie assay (Pierce, Rockford, IL) e posteriormente armazenado a -20° C. A concentração do extrato de larva foi de 1,9 mg/ml.

3.4.2. Saliva

Fêmeas ingurgitadas em bovinos HPB foram coletadas para obtenção da saliva. O procedimento consistiu em lavar as fêmeas em PBS, secá-las em papel de filtro e em seguida foram fixadas com fita adesiva em placas e a parte ventral do corpo voltado para cima. Posteriormente foi aplicada com uma seringa de 10 ml, uma solução a 0,2% de dopamina (Revivan®) diluída em PBS. A administração de dopamina induz a contração dos acinos das glândulas salivares, estimulando a salivação. A saliva é coletada em tubo e mantida em gelo. Após a coleta da saliva foi acrescentado inibidor de protease com volume final de 20% (Complete, Mini EDTA-free – Roche). A concentração protéica foi determinada com kit Coomassie assay (Pierce, Rockford, IL), obtendo uma concentração de 200 µg/ml e posteriormente armazenada a -20° C.

3.4.3. Glândulas salivares de fêmeas

Fêmeas menores que 4 mm foram coletadas para dissecação e extração das glândulas salivares sob lupa em PBS estéril. Um total de 90 pares de glândulas salivares de fêmeas (GSF) alimentadas em HPB foram obtidas e mantidas em água com inibidor de protease a 20%. O material extraído foi armazenado a – 70ºC.

Para utilização no *western blot* e gel bi-dimensional as amostras de glândulas salivares foram lisadas submetendo-as 7 sessões de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido e banho maria a 56ºC e posteriormente sonicadas (FS60H da Fisher Scientific) por 10 min. O lisado foi centrifugado a 14.000*g* por 30 minutos e o sobrenadante coletado para dosagem de proteínas cuja concentração foi de 4mg/ml a partir de um total de 90 pares de glândulas. O material foi armazenado a -20ºC.

3.5. *Western blot* do extrato de larvas não alimentadas e saliva do carrapato *R. microplus*

A identificação e caracterização parcial dos componentes protéicos presentes nas amostras de extrato de larvas não alimentadas e saliva de *R. microplus*, reconhecidos por anticorpos de bovinos infestados foram determinados pela técnica de *western blot*. Os componentes protéicos foram separados através de eletroforese a 100V e 66mA por 2 horas e 45 minutos em gel pequeno (8x8cm) de poliacrilamida 12,5% na cuba vertical Biorad. O marcador de peso molecular (Bench Mark Protein ladder-Invitrogen) foi corrido junto às proteínas do parasita. Após a eletroforese, os componentes protéicos foram transferidos para membranas de PVDF - polyvinylidene fluoride (GE Healthcare) a 10V, 400 mA por 25 minutos em tampão de transferência

(Tris 38mM, Glicina 39mM, Metanol 20% e SDS 0,375%) na cuba de transferência semi-seco (TE 70- ECL semi-dry transfer unit -GE Healthcare). As membranas foram bloqueadas por 1 hora com 10% de leite desnatado Molico diluído em TBS-T (Tris 50mM, NaCl 0,1M, Tween 0,05%, pH7,2) para evitar reconhecimento inespecífico. Posteriormente foram lavadas 2x por 5 minutos com TBS-T e em seguida as membranas acomodadas em *manifold* de 20 calhas (Mini-Protein®II, Multi Screen- Biorad) que receberam os soros descritos na Tabela 3. As diluições dos soros foram de 1:100 diluído em TBS-T e 2,5% BSA (albumina de soro bovino), sendo as membranas incubadas com estes soros sob agitação por 14 horas a 4°C, seguida de lavagem (3x) por 5 minutos com TBS-T. Para verificação das reações antígeno-anticorpo foi utilizado um conjugado de Proteína G marcado com fosfatase alcalina (Invitrogen), diluído 1:1250 sob agitação por 6 horas a 4°C. Para revelação, as membranas foram novamente lavadas 3x por 5 minutos com TBS-T e incubadas com substrato NBT/BCIP (Phosphatase substrate-Kierkegaard Perry Labs, Gaithersburg, MD) e para interromper a revelação as membranas foram colocadas em água por 15 minutos.

As análises dos pesos moleculares das bandas protéicas presentes nos blots de extrato de larvas não alimentadas e na saliva de *R. microplus* foram realizadas com programa Alpha EaseFC Stand Alone program (Alpha Innotech, San Leandro, CA).

3.6. Gel Bi-dimensional

3.6.1. Saliva e glândulas salivares de *R. microplus*

A saliva coletada (conforme descrito acima) foi precipitada com ácido tricloroacético (TCA) no mesmo dia em que as tiras foram rehidratadas (tira pH3-10NL não linear de 13 cm, GE Healthcare). A saliva foi descongelada e colocada em tubo de vidro e centrifugada em 14.000*g* a 4°C por 30 segundos e foi desprezado o precipitado. Foi acrescentado TCA 100% na amostra, obtendo uma concentração final 10%, e deixado por 1h a 4°C. Posteriormente foi centrifugado em 14.000*g* a 4°C por 15 minutos, desprezando o sobrenadante e o precipitado foi lavado 3 vezes com acetona (500µl de acetona para cada 1 ml de saliva) e centrifugado a 14.000*g* por 10 minutos. Após a lavagem com acetona, o precipitado foi ressuspendido com solução de reidratação (7M de uréia, 2M tiouréia, 4% CHAPS, 20mM Dithiothreitol) e armazenado a -20°C.

As proteínas das glândulas salivares de fêmea após precipitação foram ressuspendidas diretamente em tampão de reidratação para posteriormente fazer a focalização isoelétrica.

3.6.2. Focalização isoelétrica (IEF)

O tampão de corrida para a IEF é a solução de reidratação (7M de uréia, 2M tiouréia, 4% CHAPS, 20mM Dithiothreitol) e 2% de mistura de anfólitos carreadores (pH 3-10NL, não linear), onde as amostras de saliva e glândulas salivares de fêmeas (GSF) foram previamente ressuspendidas. A corrida de primeira dimensão foi feita em tiras de gradiente imobilizado (IPG) em pH 3-10NL de 13 cm. A quantidade de proteína

das amostras aplicada em cada tira foi de 200 μg. As tiras foram reidratadas em uma bandeja de reidratação durante a noite usando de 10-14 horas. No dia seguinte, as tiras foram transferidas para o suporte de cerâmica do aparelho (Manifold) e acoplada ao equipamento IPGPhor (GE Healthcare) e submetidas às seguintes etapas de voltagem: 1hora a 500V, 1h a 1000V seguida de 8000V até um total de 35-45 kVh ser atingido para tiras de 13 cm. Após a corrida de IEF, as tiras foram congeladas a -80ºC ou submetidas à eletroforese bidimensional.

3.6.3. Eletroforese bidimensional

O procedimento para obtenção de géis bidimensionais em géis de poliacrilamida (gel 2D) foram realizados de acordo com Yatsuda (2003). As tiras foram equilibradas em solução contendo SDS e uréia (solução de equilíbrio contendo 50 mM Tris, 6M uréia, 2% SDS, 30% glicerol, pH 8,8) contendo primeiramente DTT (100 mg /10ml) por 15minutos sob leve agitação, e posteriormente, iodoacetamida (250 mg /10ml) por outros 15 minutos sob leve agitação.

A segunda dimensão foi feita em géis SDS de poliacrilamida (12,5%) em equipamentos SE600 (GE Healthcare) em amperagem inicial de 15mA/gel por 15 minutos seguido de 30mA/gel. Um gel de saliva e um gel de glândula salivar de fêmea foram corados com nitrato de prata, sendo que os demais géis foram transferidos para membrana de PVDF para posteriormente fazer *western blot* com soros de animais resistentes e suscetíveis.

3.6.4. Coloração com Nitrato de Prata

Géis de saliva e glândulas salivares de fêmeas foram corados com nitrato de prata. Os géis foram colocados na solução fixadora (50% metanol e 10% ácido acético) por 1 hora à temperatura ambiente sob agitação. Posteriormente, por 15 minutos em metanol 5% e foram lavados 3 vezes durante 5 minutos com água deionizada. Após essas lavagens, tiossulfato de sódio ($Na_2S_2O_3$. $5H_2O$ – 0,2g/l) foi acrescentado por 1 minuto a temperatura ambiente e lavados por 3 vezes durante 20 segundos com água deionizada. Em seguida foram incubados na solução de nitrato de prata (2g /l de Ag NO_3) por 25 minutos em temperatura ambiente sob agitação. Após a incubação com nitrato de prata, os géis foram lavados 3 vezes durante 20 segundos com água deionizada.

Para a revelação foi acrescentado solução de carbonato de sódio (30g/l de Na_2CO_3, 37% de formaldeído e 20ml de $Na_2S_2O_3$. $5H_2O$) até que os *spots* fossem visualizados. Para bloquear a revelação foi acrescentada solução fixadora (7g/500ml de Na_2-EDTA).

3.7. *Western blot* dos géis bidimensionais de saliva e GSF

Após a eletroforese dos géis bidimensionais, os componentes protéicos de saliva e GSF foram transferidos para membranas 18x18 cm de PVDF (GE Healthcare) a 10V, 400 mA por 25 minutos em tampão de transferência (Tris 38mM, Glicina 39mM, Metanol 20% e SDS 0,375%) no aparelho de transferência semi-seco (ECL semi-dry transfer unit -GE Healthcare). As membranas foram bloqueadas por 14 horas com 5% de leite desnatado diluído em TBS-T (Tris 50mM, NaCl 0,1M, Tween 0,05%, pH7,2) para

evitar reconhecimento inespecífico. Posteriormente foram lavadas 2x por 5 minutos com TBS-T e em seguida receberam os soros descritos na Tabela 4. Os soros foram empregados em forma de *pools* devido à dificuldade de obtenção dessas amostras. As diluições dos soros foram de 1: 40 diluído em TBS-T 0,01% Azida e 2,5% BSA, sendo que as membranas foram incubadas com estes soros sob agitação durante 14 horas a 4°C, seguidas de lavagem (3x) por 5 minutos com TBS-T. Para verificação das reações antígeno-anticorpo foi utilizado um conjugado de Proteína G marcado com fosfatase alcalina (Invitrogen), diluído 1:1250, sob agitação por 6 horas a 4°C. Para revelação, as membranas foram novamente lavadas 3x por 5 minutos com TBS-T e incubadas com substrato NBT/BCIP (Phosphatase substrate-Kierkegaard Perry Labs, Gaithersburg) e para interromper a revelação as membranas foram colocadas em água por 15 minutos.

4. RESULTADOS

4.1. *Western Blot* de extrato de larvas não alimentadas de *R. microplus* com soros de bovinos resistentes e suscetíveis

Os perfis de reconhecimento das bandas protéicas de extrato de larvas não alimentadas (ELNA) de *R. microplus* pelos soros dos bovinos resistentes (Nelores) e suscetíveis (HPB) ao carrapato foram avaliados por *western blots*, sendo os soros provenientes de bovinos submetidos a diferentes números de infestações e diferentes fases do ciclo de vida do carrapato (larva, ninfa e adulto). Os resultados obtidos podem ser observados nas figuras abaixo.

Na Figura 2, o reconhecimento de algumas bandas protéicas do extrato de larva por soros da primeira infestação foi mais intenso e freqüente em Nelores infestados na fase inicial (larva), quando comparado com resultados obtidos para HPBs infestados.

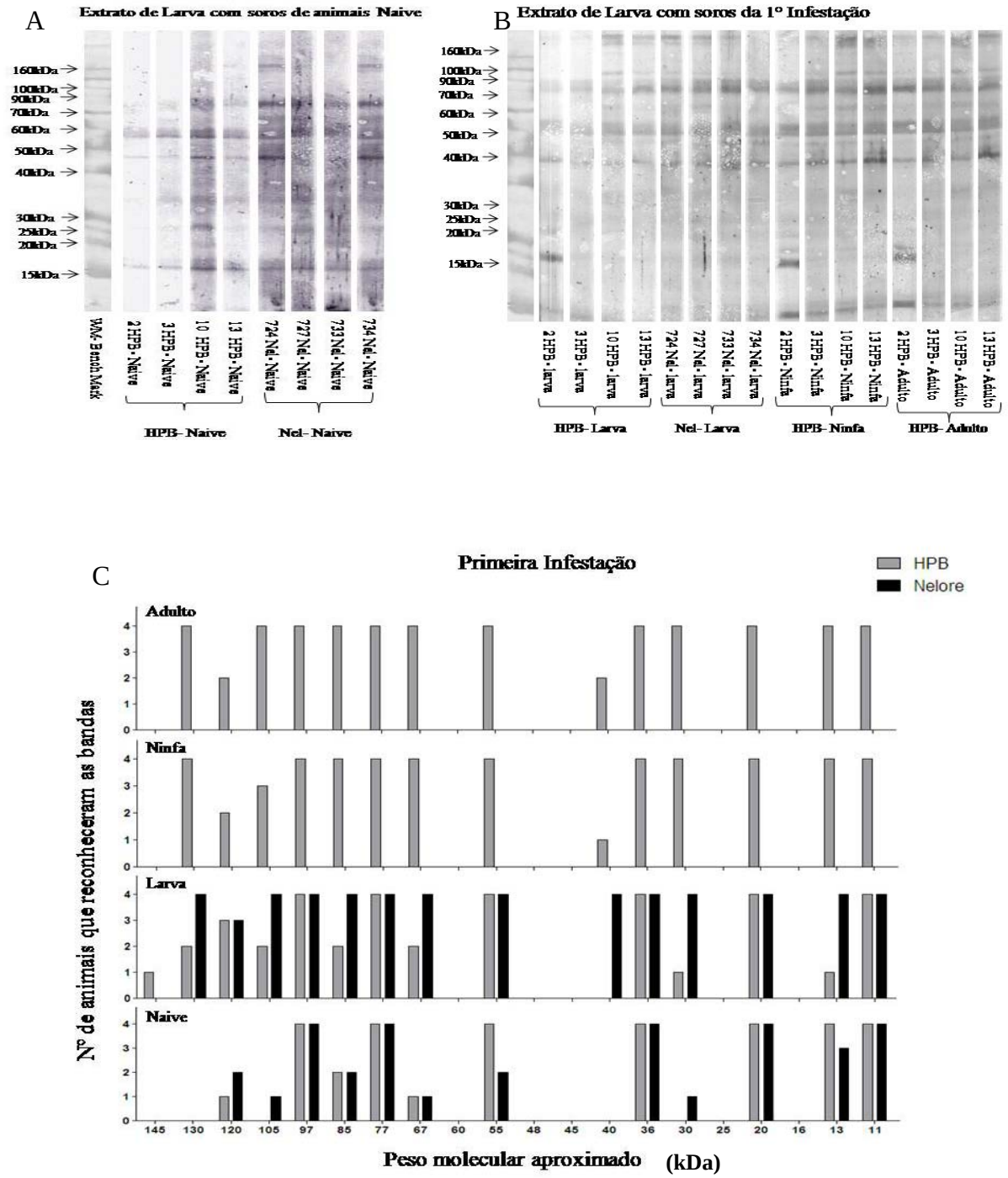


Figura 2. ***Western blot*** **de Extrato de larvas não-alimentadas de** ***R. microplus.*** Foram utilizados 270 µg de proteínas de ELNA por gel. O fenótipo do hospedeiro está indicado na figura seguido do estágio de vida do carrapato. A) *western blot* com soros de animais *naïve* e geneticamente suscetíveis (HPB) ou resistentes (Nel); B) *western blot* com soros de animais resistentes (Nel) e suscetíveis (HPB) obtidos na primeira infestação; C) Representação gráfica das bandas protéicas observadas no *Western blot* de ELNA com soros de bovinos. Na primeira infestação não foram coletados soros na fase de ninfas e adultos nos animais resistentes (Nelores), pois não foram encontrados carrapatos nessas fases.

Como visualizado na Figura 3, os soros de bovinos resistentes infestados 1 vez com larva reconhecem as bandas protéicas de 130, 105, 85, 67, 40, 30 e 13 kDa com maior freqüência e intensidade quando comparado com o reconhecimento pelo soro de HPBs infestados. Com o passar do ciclo de vida, nos estágios de ninfa e adulto, o reconhecimento das bandas pelos soros de ambas as raças tornam-se muito semelhante. As demais bandas, conforme visto na figura 2, são reconhecidas pelos soros de ambas as raças de maneira similar.

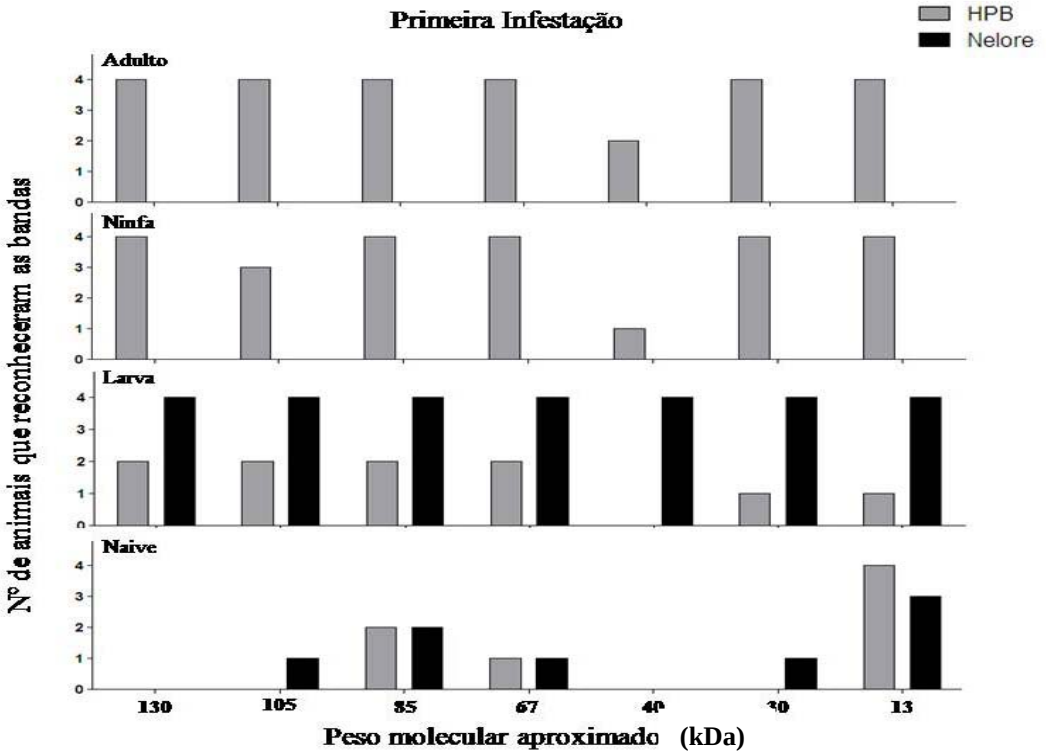


Figura 3. Reconhecimento das principais proteínas do extrato de larvas não-alimentadas de *R microplus* pelos soros de animais resistentes (Nelore) e susceptíveis (HPB) durante a primeira infestação e em diferentes estágios de vida do carrapato. Na primeira infestação não foram coletados soros na fase de ninfas e adultos nos animais resistentes (Nelores), pois não foram encontrados carrapatos nessas fases.

Resultado semelhante ao da primeira infestação foi observado com os soros da segunda infestação (Figura 4 e 5), onde os soros dos Nelores infestados reconhecem algumas bandas com maior freqüência e intensidade quando comparado ao resultado obtido com soros dos HPBs infestados.

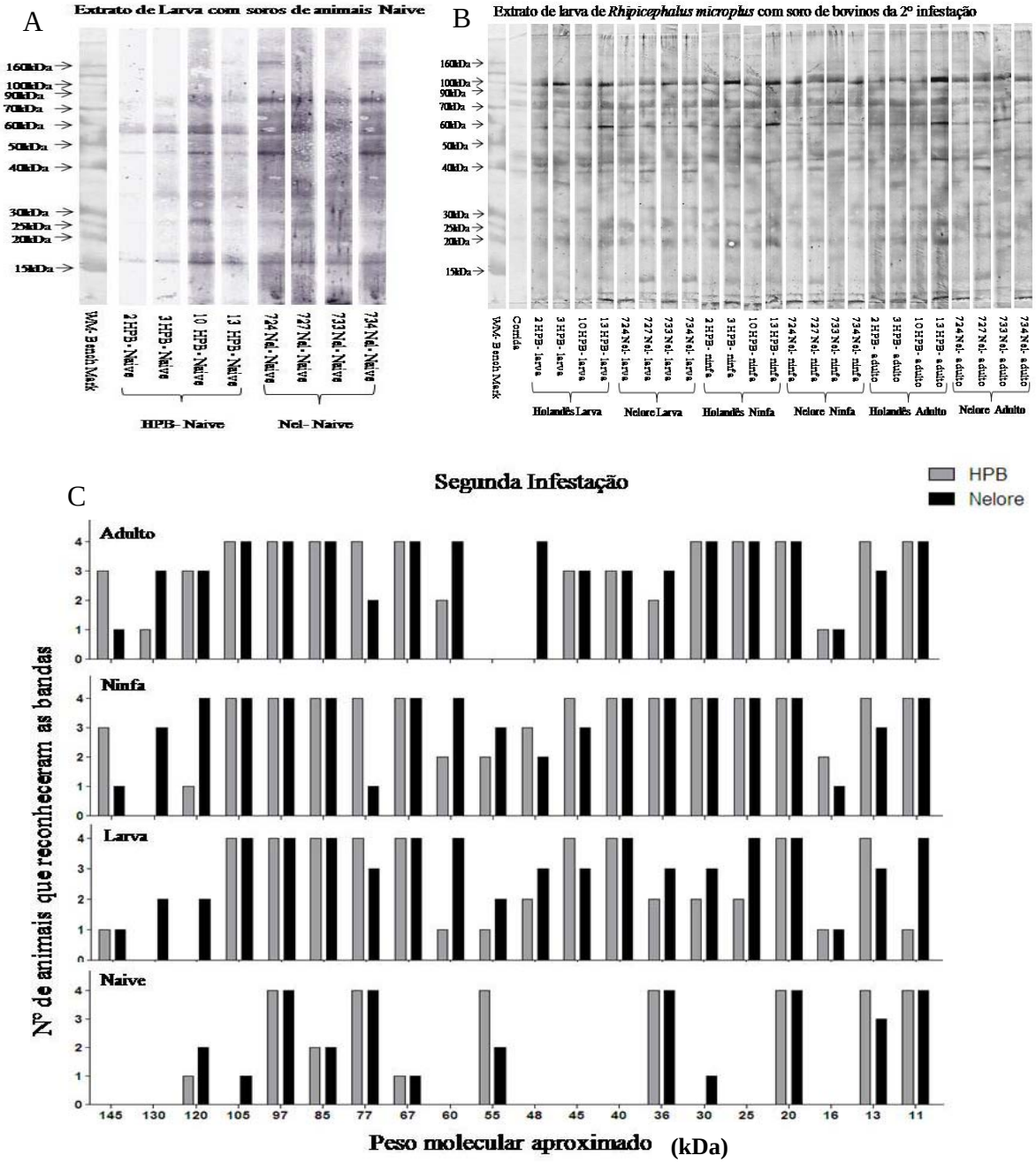


Figura 4. ***Western blot*** **de Extrato de larvas não-alimentadas de** ***R. microplus.*** Foram utilizados 270 µg de proteínas de ELNA por gel. O fenótipo do hospedeiro está indicado na figura seguido do estágio de vida do carrapato. A) *western blot* com soros de animais *naïve* e geneticamente suscetíveis (HPB) ou resistentes (Nel); B) *western blot* com soros de animais resistentes (Nel) e suscetíveis (HPB) obtidos na segunda infestação; C) Representação gráfica das bandas protéicas observadas no *Western blot* de ELNA com soros de bovinos.

Como observado na Figura 5, Nelores infestados reconhecem no estágio inicial do ciclo de vida carrapato, as bandas 130, 120, 60, 25 e 11 kDa com maior freqüência e intensidade, enquanto que o reconhecimento dessas bandas pelo soro dos HPBs infestados se dá mais tardiamente, ao decorrer da infestação. As demais bandas são reconhecidas de forma similar por ambas as raças.

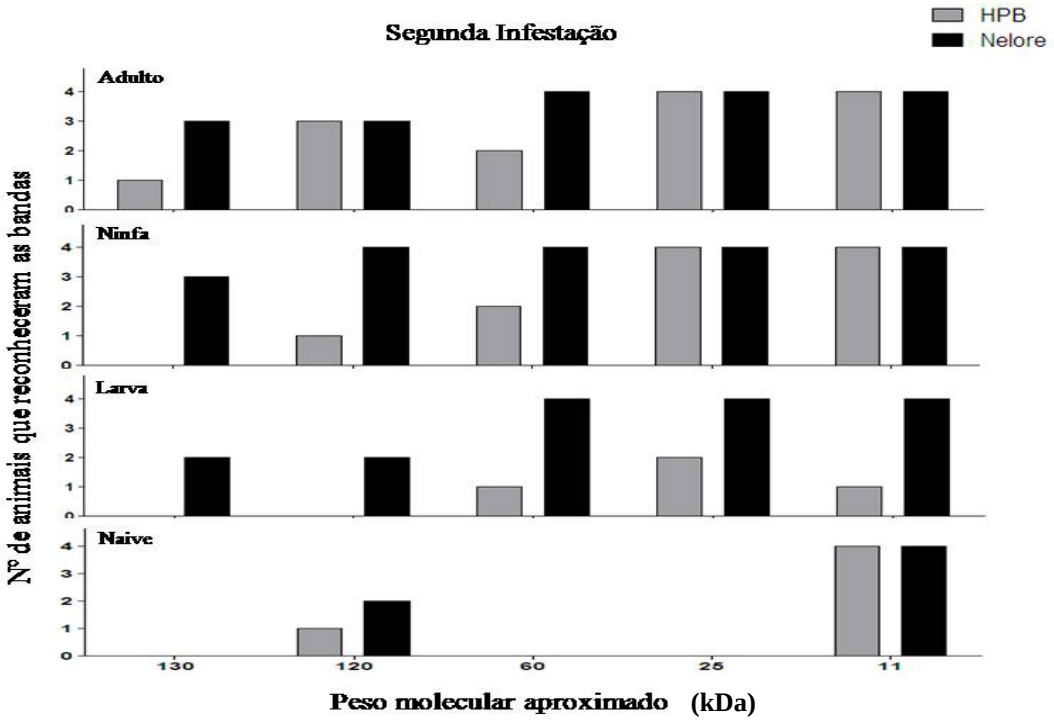


Figura 5. Reconhecimento das principais proteínas doextrato de larvas não-alimentadas de *R microplus* pelos soros de animais resistentes (Nelore) e susceptíveis (HPB) durante a segunda infestação e em diferentes estágios de vida do carrapato.

Na terceira infestação, o reconhecimento de proteínas parasitárias tornou-se muito semelhante entre ambas as raças e algumas bandas são reconhecidas com maior freqüência nos soros dos Nelores e outras nos soros dos HPBs (Figura 6).

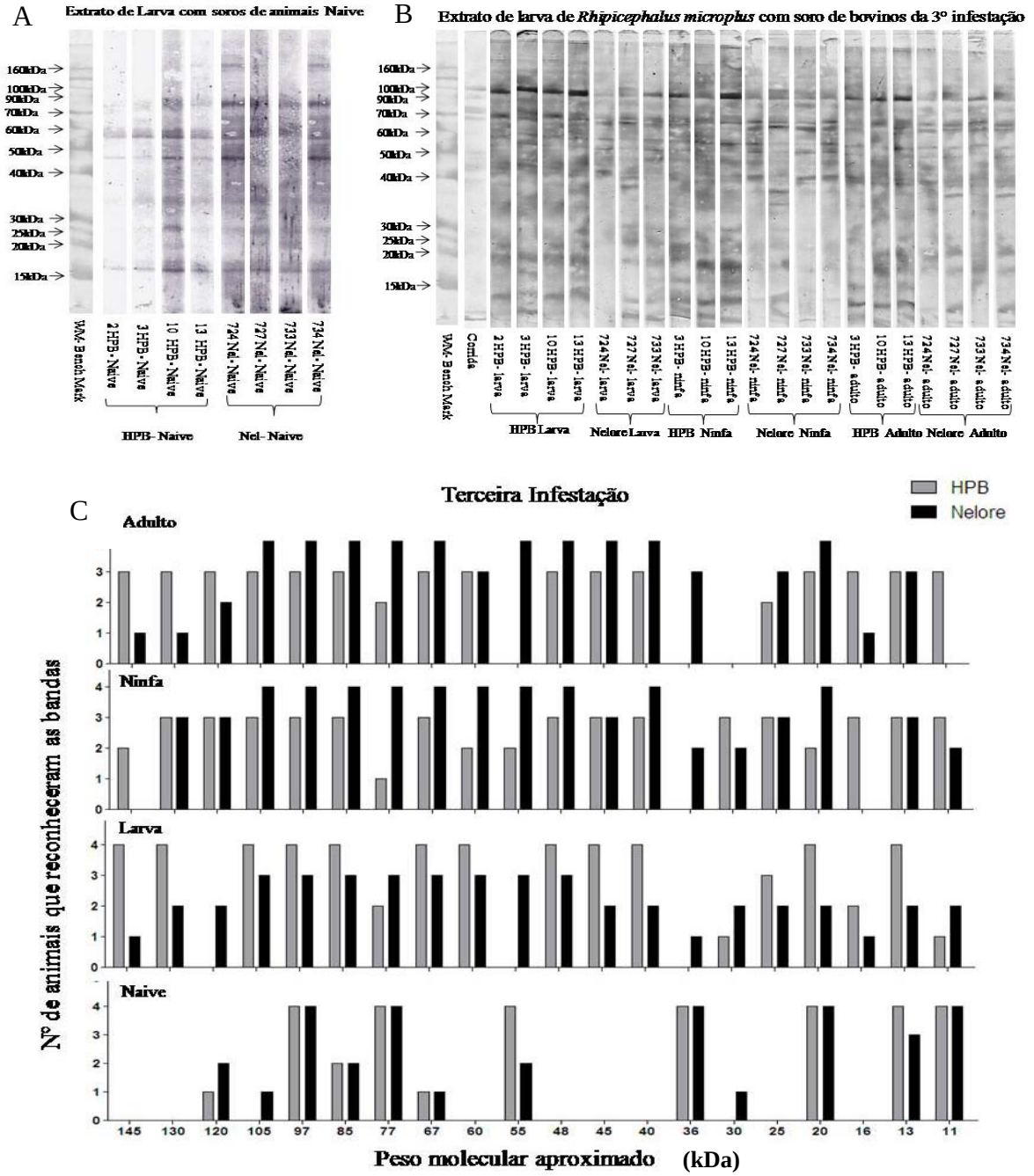


Figura 6. ***Western blot*** **de Extrato de larvas não-alimentadas de** ***R. microplus.*** Foram utilizados 270 µg de proteínas de ELNA por gel. O fenótipo do hospedeiro está indicado na figura seguido do estágio de vida do carrapato. A) *western blot* com soros de animais *naïve* e geneticamente suscetíveis (HPB) ou resistentes (Nel); B) *western blot* com soros de animais resistentes (Nel) e suscetíveis (HPB) obtidos na terceira infestação; C) Representação gráfica das bandas protéicas observadas no *Western blot* de ELNA com soros de bovinos.

Como pode ser visto na Figura 7, as bandas de 120, 55 e 36 kDa são reconhecidas pelo soro de Nelores infestados, mas não pelo soro de HPB infestados. Contudo, as bandas de 45, 40, 20 e 13 kDa são reconhecidas com maior freqüência pelo soro de HPBs, sendo que o reconhecimento dessas bandas torna-se similares com o decorres da infestação, com exceção das bandas de 55 e 36 kDa que continuam sendo reconhecidas com maior freqüência por soro dos Nelores infestados.

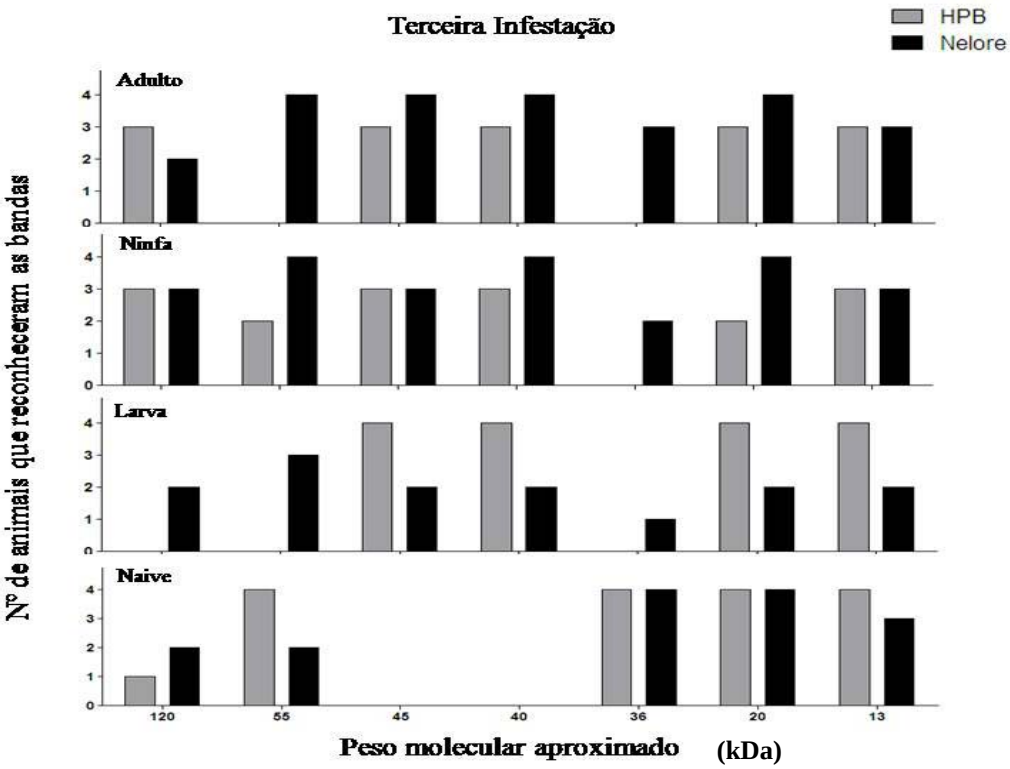


Figura 7: Reconhecimento principais proteínas do extrato de larvas não-alimentadas de *R microplus* pelos soros de animais resistentes (Nelore) e susceptíveis (Nelore) durante a terceira infestação e em diferentes estágios de vida do carrapato.

Conforme observados nos resultados acima, algumas bandas são reconhecidas com maior freqüência e intensidade por animais resistentes infestados durante os estágios iniciais do ciclo de vida do parasita.

4.2. *Western Blot* de saliva de *R. microplus* com soros de bovinos resistentes e suscetíveis

Os perfis de reconhecimento das bandas protéicas de saliva de *R. microplus* pelos soros dos bovinos resistentes e suscetíveis ao carrapato foram avaliados por *western blots*, sendo os soros provenientes de diferentes infestações e diferentes fases do ciclo de vida do carrapato (larva, ninfa e adulto). Os resultados obtidos podem ser observados nas figuras abaixo.

No *western blot* de saliva com os soros *naïve* os animais resistentes observa-se reconhecimento da maioria das bandas protéicas com maior freqüência e intensidade e mantido com os soros da primeira infestação (Figura 8), sendo que as demais bandas estão sendo reconhecidas de maneira muito semelhante em ambas as raças.

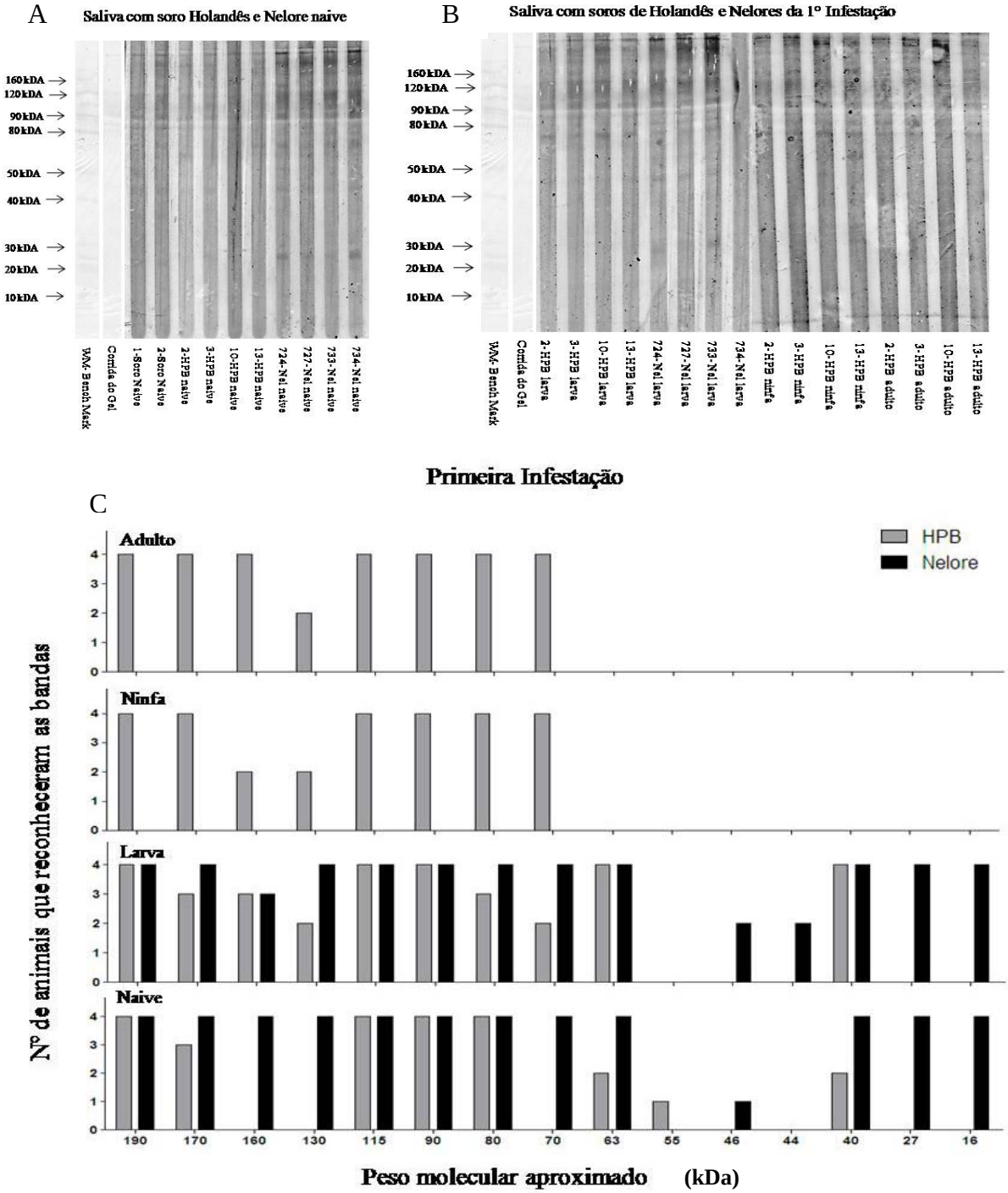


Figura 8. ***Western blot*** **de saliva de** ***R. microplus*** **(primeira infestação)**. Foram utilizados 270 µg de proteínas de saliva por gel. O fenótipo do hospedeiro está indicado na figura seguido do estágio de vida do carrapato. A) *western blot* com soros de animais *naïve* e geneticamente suscetíveis (HPB) ou resistentes (Nel); B) *western blot* com soros de animais resistentes (Nel) e suscetíveis (HPB) obtidos na primeira infestação; C) Representação gráfica das bandas protéicas observadas no *Western blot* de saliva com soros de bovinos. Na primeira infestação não foram coletados soros na fase de ninfas e adultos nos animais resistentes (Nelores), pois não foram encontrados carrapatos nessas fases.

Na Figura 9, melhor evidenciado o perfil diferencial do reconhecimento das bandas protéicas pelos soros dos animais, sendo que as bandas de 130, 70, 46, 44, 27 e 16 kDa são reconhecidas exclusivamente por animais resistentes *naive* e infestados e mesmo com o progresso da infestação, os soros dos animais suscetíveis não conseguem reconhecer essas bandas protéicas, com exceção das bandas 130 e 70 kDa.

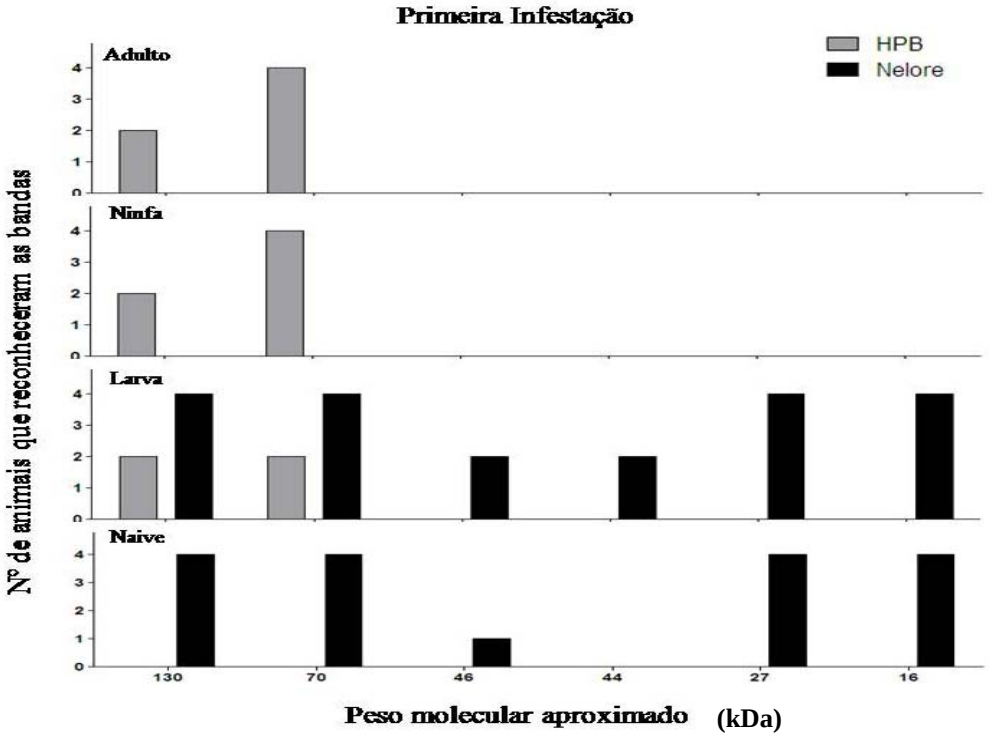


Figura 9. Reconhecimento das pricipais proteínas da saliva de *R microplus* pelos soros de animais resistentes (Nelore) e suscetíveis (HPB) durante a primeira infestação e em diferentes estágios de vida do carrapato. Na primeira infestação não foram coletados soros na fase de ninfas e adultos nos animais resistentes (Nelores), pois não foram encontrados carrapatos nessas fases.

No resultado do *western blot* de saliva com os soros da segunda infestação, as bandas que foram reconhecidas com maior freqüência pelos soros dos animais resistentes *naive*, são reconhecidas na fase de larva pelos soros dos animais suscetíveis com maior freqüência. As bandas de 190, 115, 90, 55, 40 kDa são reconhecidas de maneira muito semelhante entre ambas as raças.

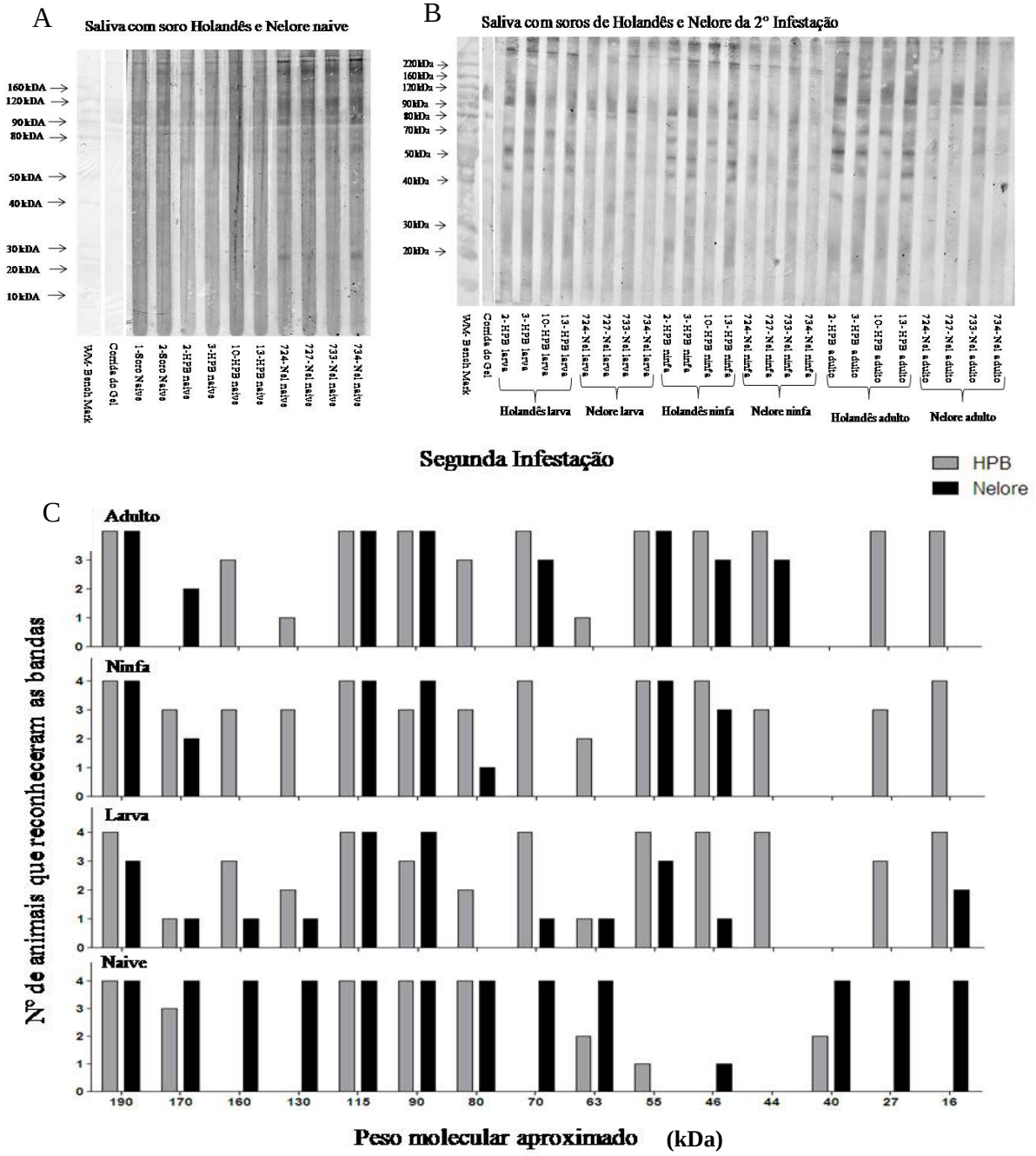


Figura 10. ***Western blot*** **de saliva de** ***R. microplus*** **(segunda infestação)**. Foram utilizados 270 µg de proteínas de saliva por gel. O fenótipo do hospedeiro está indicado na figura seguido do estágio de vida do carrapato. A) *western blot* com soros de animais *naïve* e geneticamente suscetíveis (HPB) ou resistentes (Nel); B) *western blot* com soros de animais resistentes (Nel) e suscetíveis (HPB) obtidos na segunda infestação; C) Representação gráfica das bandas protéicas observadas no *Western blot* de saliva com soros de bovinos.

Na Figura 11, observamos que as bandas de 160, 80, 70, 46, 27 e 16 kDa são reconhecidas com maior freqüência pelos soros de animais resistentes *naive*. Com os soros da segunda infestação esse reconhecimento é invertido tornando-se mais freqüente nos animais suscetíveis e em todas as fases do ciclo de vida do carrapato.

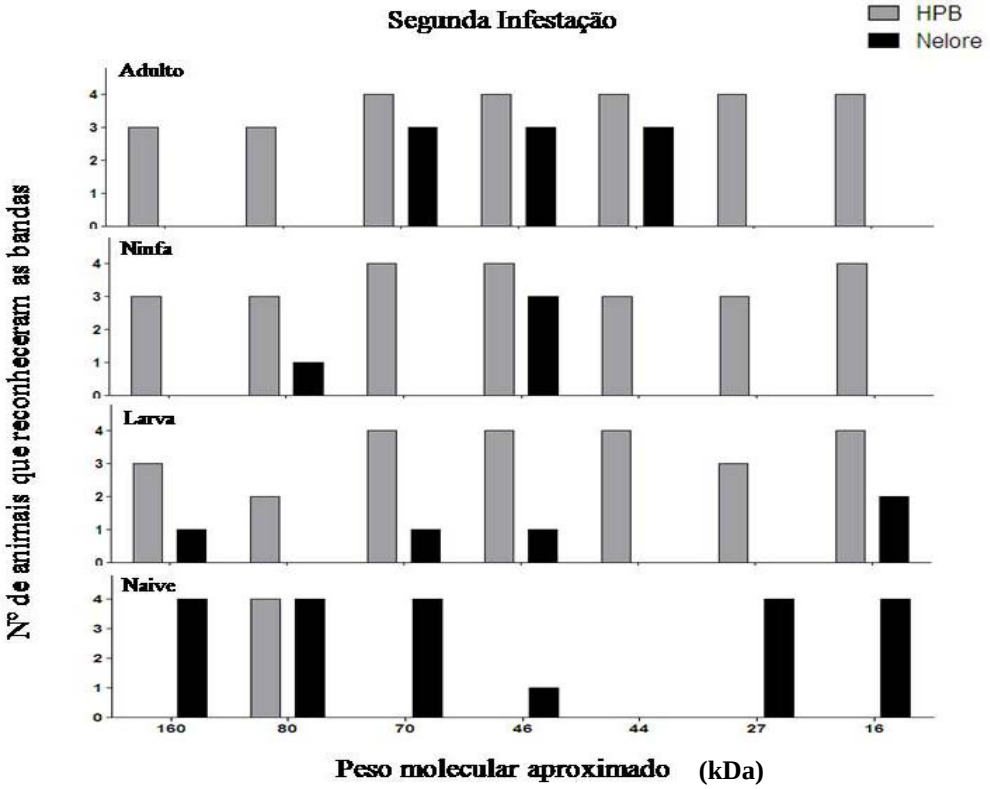


Figura 11. Reconhecimento das principais proteínas da saliva de R microplus pelos soros de animais resistentes (Nelore) e suscetíveis (HPB) durante a segunda infestação e em diferentes estágios de vida do carrapato.

Os resultados obtidos com soros da terceira infestação são semelhantes aos resultados obtidos com soros da segunda infestação (Figura 12).

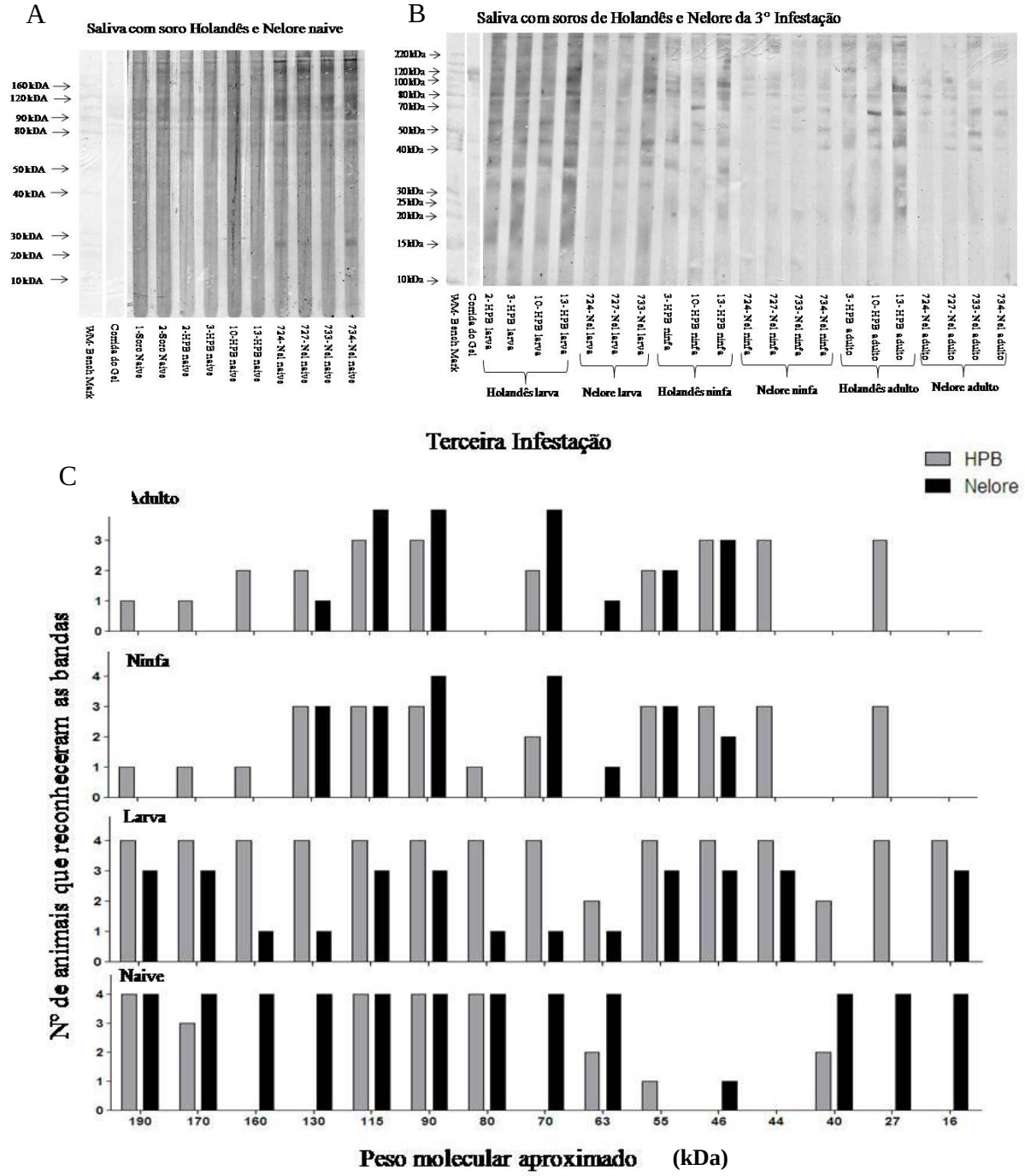


Figura 12. ***Western blot* de saliva de *R. microplus* (terceira infesta*ção)***. Foram utilizados 270 µg de proteínas de saliva por gel. O fenótipo do hospedeiro está indicado na figura seguido do estágio de vida do carrapato. A) *western blot* com soros de animais *naïve* e geneticamente suscetíveis (HPB) ou resistentes (Nel); B) *western blot* com soros de animais resistentes (Nel) e suscetíveis (HPB) obtidos na terceira infestação; C) Representação gráfica das bandas protéicas observadas no *Western blot* de saliva com soros de bovinos.

As bandas de 160, 130, 80, 70, 40 e 27 kDa são reconhecidas com maior freqüência pelos soros dos animais resistentes *naïve*, isso se inverte com os soros da terceira infestação, pois os soros dos animais suscetíveis reconhecem essas bandas com maior freqüência durante todo o ciclo de vida do carrapato (Figura 13).

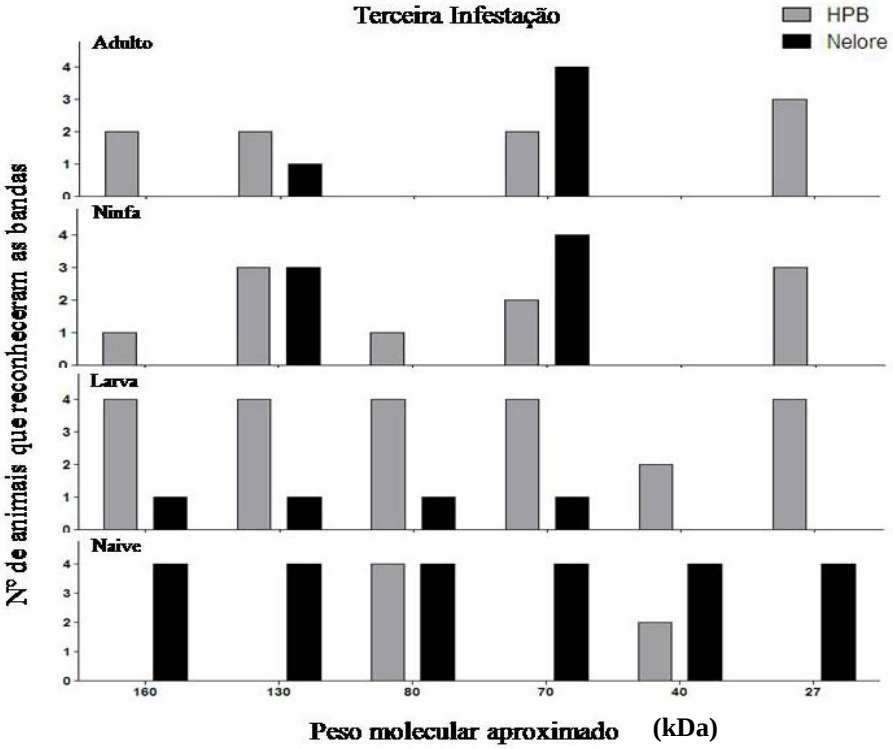


Figura 13. Reconhecimento das principais proteínas da saliva de *R microplus* pelos soros de animais resistentes (Nelore) e suscetíveis (HPB) durante a terceira infestação e em diferentes estágios de vida do carrapato.

Resultados obtidos nos *western blots* de saliva corroboram os resultados obtidos com os *western blots* de extrato de larvas não alimentadas. Sugerimos que o reconhecimento diferencial de proteínas pelo soro de Nelores infestados logo no início do contato com o parasita (estágio larval da primeira infestação) pode ser resultante de uma resposta protetora do hospedeiro resistente e que esteja prejudicando a fixação do carrapato ainda na fase de larva.

4.3. *Western blot* de gel bidimensional (2D) de saliva de *R. microplus* com *pool* de soros de animais resistentes e suscetíveis infestados ou não

Para melhor identificação dos reconhecimentos das proteínas presentes na saliva, foram realizados *western blots* de géis bidimensionais com *pool* de soros de animais resistentes e suscetíveis infestados ou não com *R. microplus* (conforme descrito na Tabela 4).

Para alcançar o objetivo da identificação dessas proteínas presentes na saliva foi realizado gel bidimensional de saliva e corado com prata.

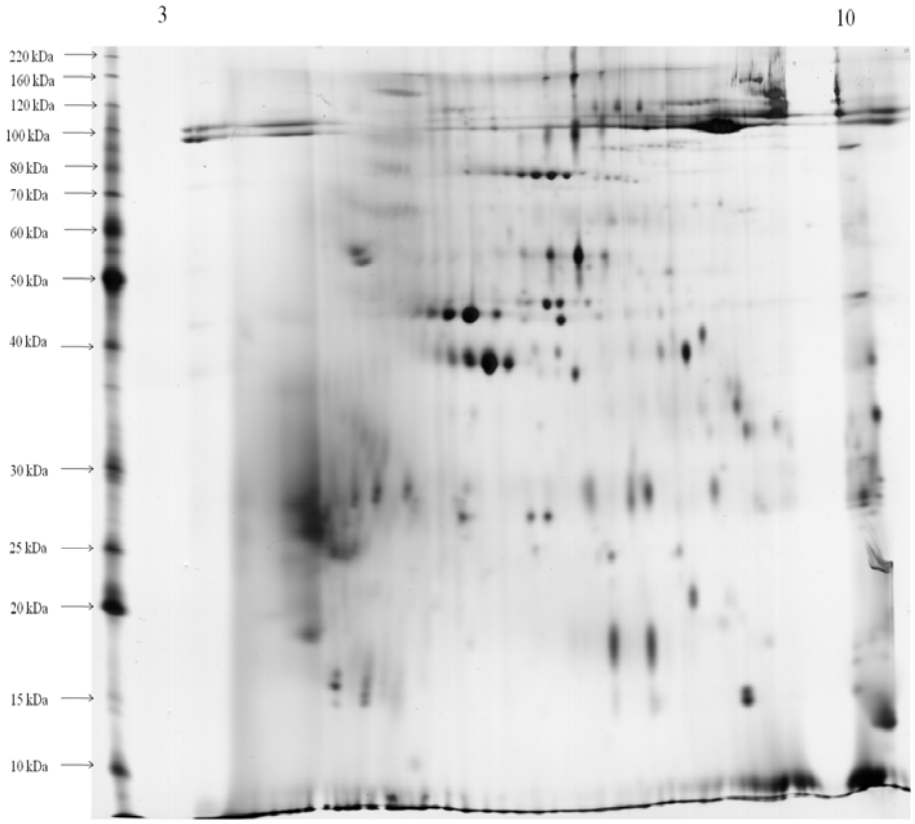


Figura 14. Gel bidimensional de saliva *R. microplus* corado com prata (60µg). Gel SDS-PAGE 12,5%, tira pH 3-10NL, 13cm (GE Healthcare) com marcador de peso molecular Bench Mark (Invitrogen).

A saliva em gel 2D corado com prata (Figura 14), apresentou cerca de 180 *spots* entre o pI 3-10 e peso molecular 9-180 kDa aproximadamente. A maioria dos *spots*

estão localizados entre pI 5-8 e peso molecular 15-160 kDa aproximadamente. Posteriormente foram realizados *western blot* de saliva com *pools* de soros de animais resistentes e suscetíveis (Figuras 15 e 16).

Como demonstrado na Figura 15A, *western blot* de saliva com *pool* de soros de animais suscetíveis *naive* revelou 2 *spots* antigênicos, sendo que um dos *spots* está demonstrado pelo número 1 cujo pI localiza entre 7-8 e peso molecular entre 100-120kDa aproximadamente e o segundo *spot* é o de número 10 cujo pI localiza entre 8-9 e peso molecular entre 30-35 kDa aproximadamente. O *spot* 10 foi reconhecido apenas pelo *pool* de soros dos animais suscetíveis *naive*.

Já no *western blot* de saliva com *pool* de soros dos animais resistentes *naive* (Figura15B) reconheceram um total de 10 *spots* antigênicos. Os *spots* de números 1, 2, 3, 4, 5 e 6 estão localizados entre os pI 5-9 e entre os pesos moleculares de 90-130 kDa aproximadamente. O *spot* de número 7 está localizado entre os pI 5-6 e entre os pesos moleculares de 50-60 kDa, já os *spots* de números 11, 12 e 21 estão localizados entre os pI 3-7 e entre os pesos moleculares de 25-30 kDa aproximadamente. Interessante que apenas o *spot* de número 1 foi reconhecido por ambos os soros *naive* e os *spots* 2, 3, 4, 5 e 6 foram reconhecidos somente pelos soros dos animais resistentes *naive*.

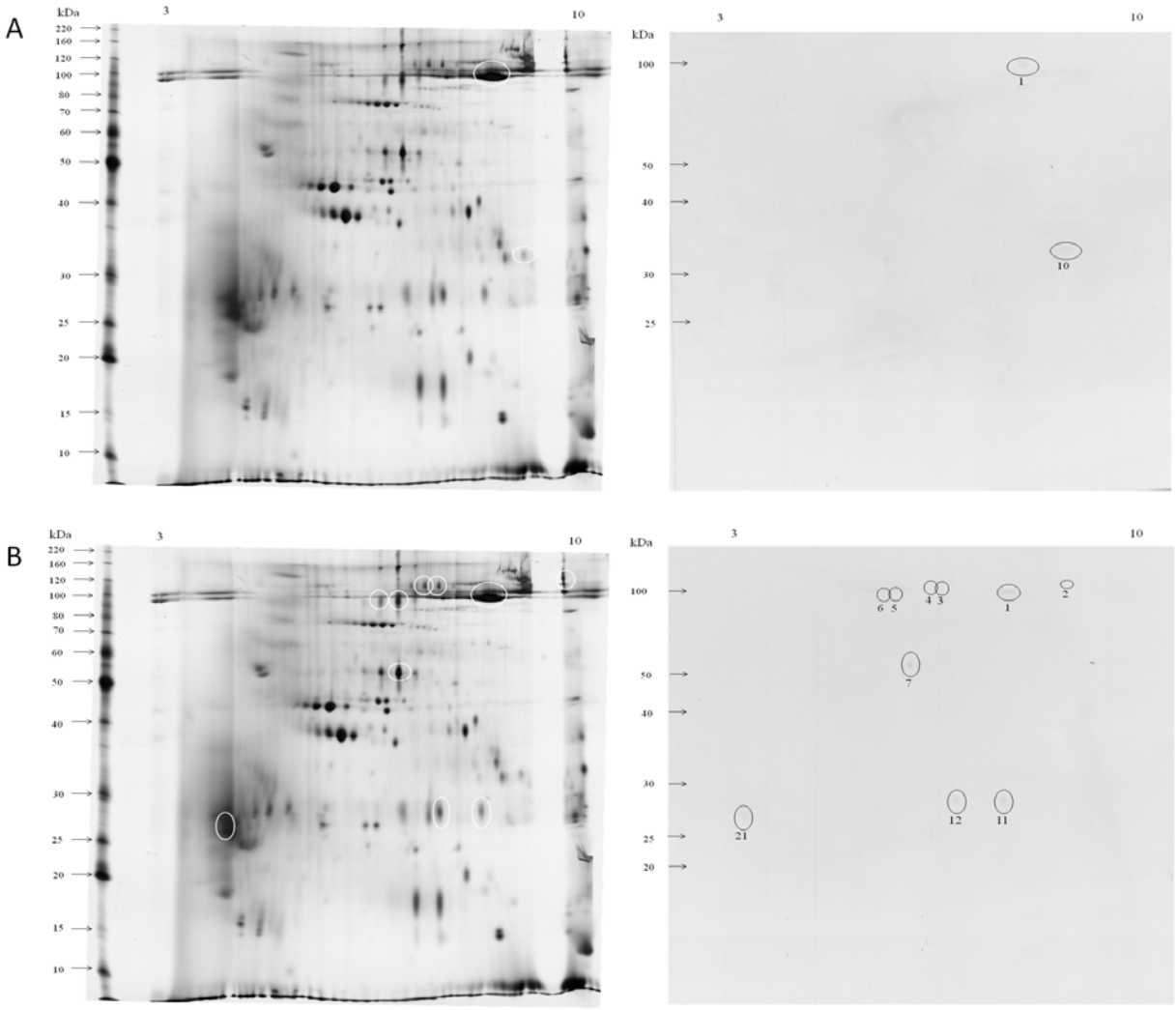


Figura 15. ***Western blot*** **de gel bidimensional de saliva de** ***R. microplus.*** Todos os géis nessa figura foram corridos em tiras pH 3-10 NL em gel poliacrilamida 12,5 %. A) Gel bidimensional de saliva corado com prata (esquerda) e *western blot* (direita) de saliva com *pool* de soros de animais suscetíveis (HPB) *naive*. B) Gel bidimensional de saliva corado com prata (esquerda) e *western blot* (direita) de saliva com *pool* de soros de animais resistentes (Nelore) *naive*.

O *western blot* de saliva com *pool* de soros de animais suscetíveis infestados (Figura 16A) revelou 15 *spots* antigênicos. Os *spots* numerados 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 21 e 22 estão localizados entre os pI 3-10 e entre os pesos moleculares de 20-30 kDa aproximadamente, já o *spot* numero 9 está localizado entre os pI 9-10 e entre os pesos moleculares de 35-45 kDa aproximadamente e os *spots* de número 1, 7 e 8 estão

localizados entre os pI 5-8 e entre os pesos moleculares de 40-120 kDa aproximadamente.

Os *spots* 1, 7, 11, 12 e 21 que foram reconhecidos pelos soros dos animais suscetíveis infestados, estes já tinham sidos reconhecidos pelos soros dos animais resistentes *naive* (Figura 15B e 16A).

O *spot* 1 foi reconhecido por todos os soros testados e os *spots* 15, 16, 17, 18, 19 e 22 foram reconhecidos somente pelos soros dos animais suscetíveis infestados (Figura 16A).

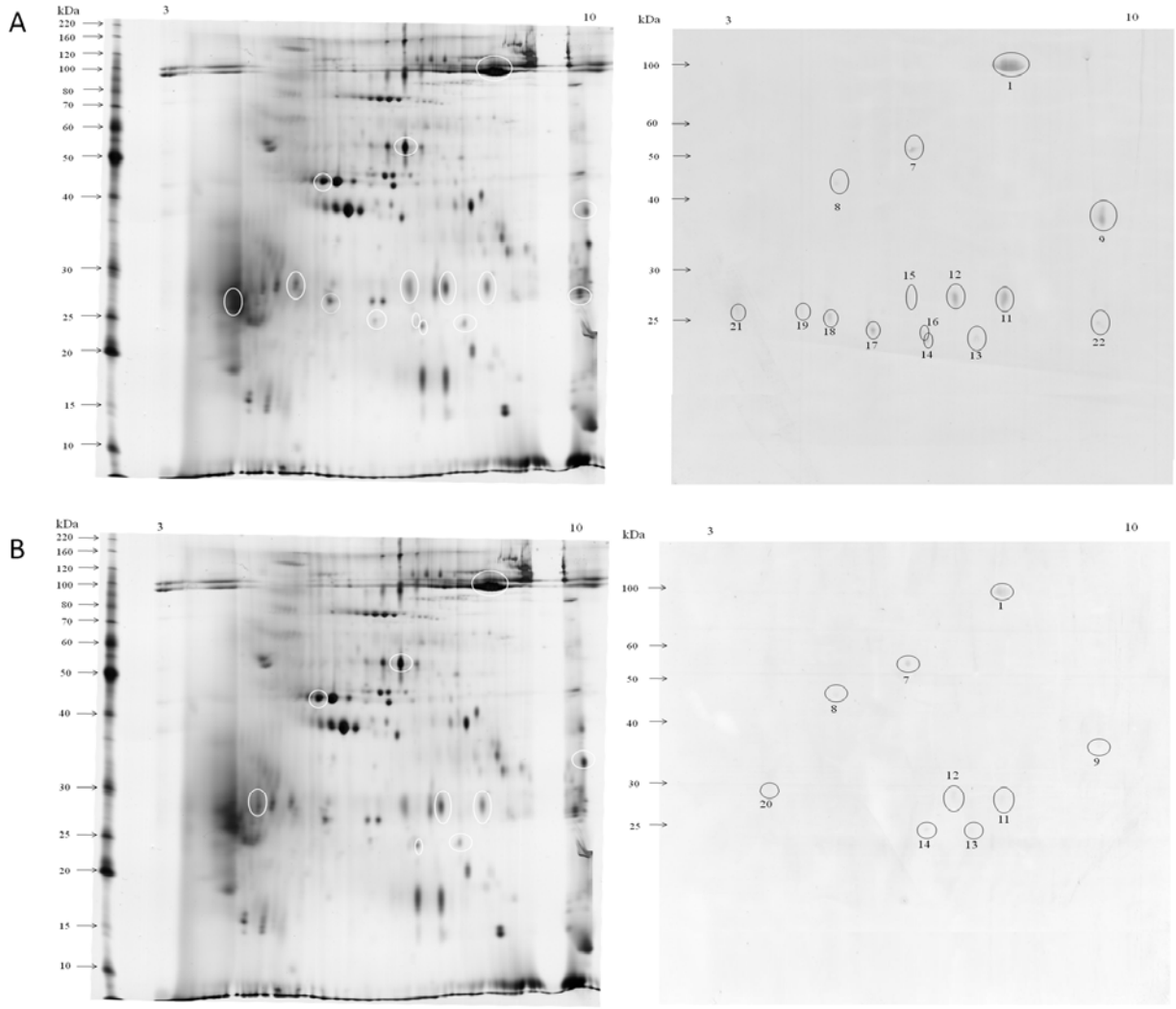


Figura 16. ***Western blot*** **de gel bidimensional de saliva de** ***R. microplus.***Todos os géis nessa figura foram corridos em tiras pH 3-10 NL em gel poliacrilamida 12%. A) Gel bidimensional de saliva corado com prata (esquerda) e *western blot* (direita) de saliva com *pool* de soros de animais

suscetíveis (HPB) de todas as fases da primeira infestação (larva, ninfa e adulto). B) Gel bidimensional de saliva corado com prata (esquerda) e *western blot* (direita) de saliva com *pool* de soros de animais resistentes (Nelore) de todas as fases da primeira infestação (larva, ninfa e adulto).

Como pode ser visualizado no *western blot* de saliva com *pool* de soros dos animais resistentes infestados (Figura 16B), houve reconhecimento de 9 *spots* antigênicos. Desses 9, os *spots* 1, 7, 11 e 12 já tinham sidos reconhecidos pelos soros dos animais resistentes *naive* (Figura 15B e 16B), e os *spots* 1, 7, 8, 9, 11, 12, 13 e 14 foram reconhecidos também pelo soros dos animais suscetíveis infestados (Figura 16). O *spot* 20 foi reconhecido somente por soros dos animais resistentes infestados (Fig. 16B).

4.4. *Western blot* de gel bidimensional (2D) de GSF de *R. microplus* com *pool* de soros de animais resistentes e suscetíveis infestado ou não

Um gel de GSF foi corado com prata que posteriormente possa identificar os *spots* reconhecidos nos *western blots* com soros de animais resistentes e suscetíveis.

Na Figura 17, existem inúmeros *spots* que variam entre os pI 3 a 10 e entre os pesos moleculares de 10 kDa até os 220 kDa aproximadamente.

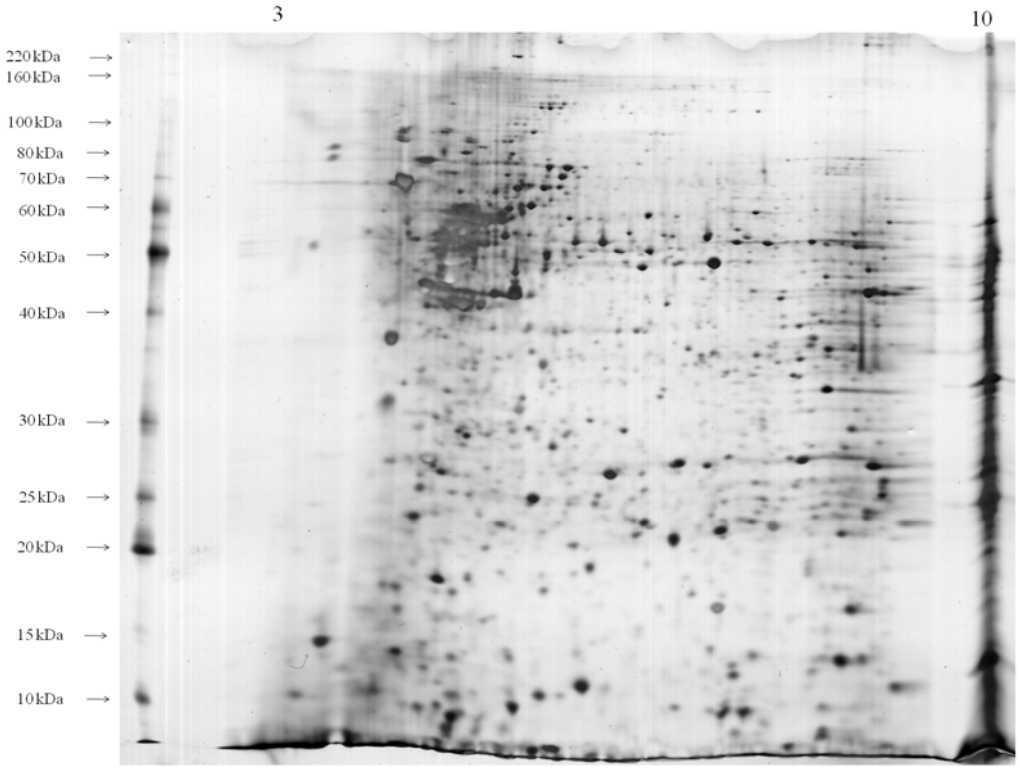


Figura 17. Gel bidimensional de glândulas salivares de fêmeas de *R. microplus* corado com prata (60μg). Gel SDS-PAGE 12,5%, tira utilizada foi pH 3-10NL, 13cm (GE Healthcare) com marcador de peso molecular Bench Mark (Invitrogen).

No *western blot* com *pool* de soros de animais suscetíveis *naive* (Figura 18 B), 8 *spots* são reconhecidos, sendo que esses *spots* são de baixo peso molecular variando entre os pesos moleculares de 10-30 kDa e pI entre 6- 10 aproximadamente.

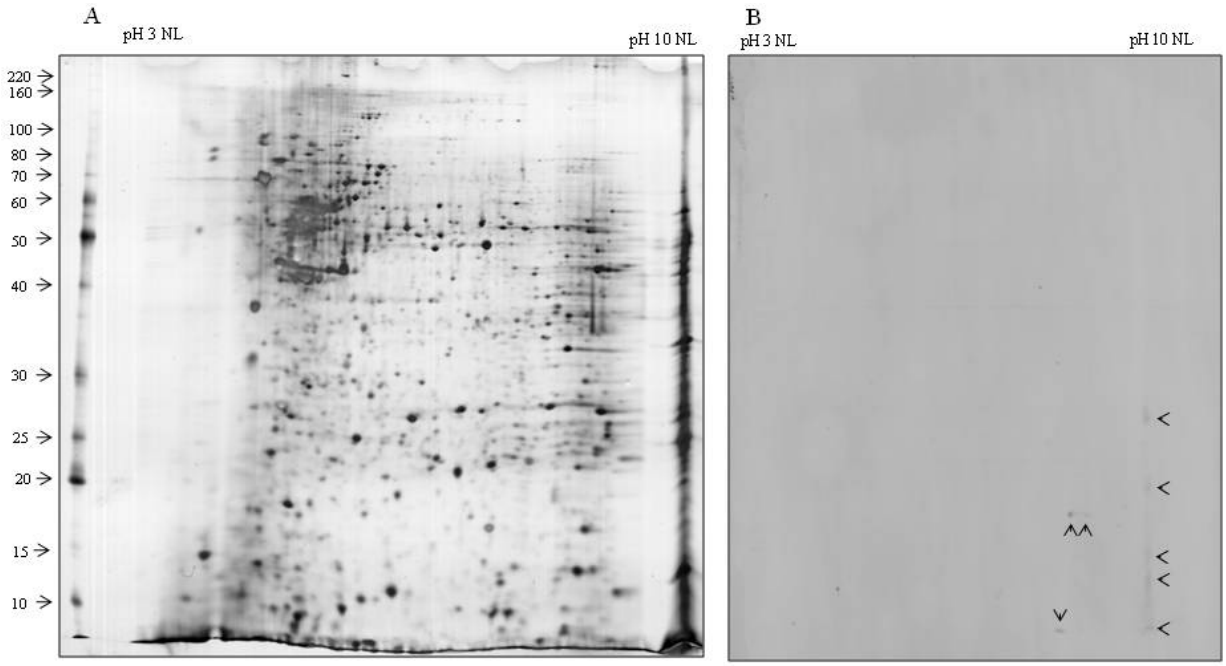


Figura 18. ***Western blot* de gel bidimensional de GSF de *R. microplus*.** A) Gel bidimensional de GSF corado com prata. B) *western blot* do gel bidimensional de GSF com *pool* de soros de animais suscetíveis (HPB) *naive.*

Já no *western blot* com *pool* de soros de animais suscetíveis infestados (Figura 19 B), por volta de 20 *spots* foram reconhecidos, sendo que alguns desses *spots* também foram reconhecidos pelo *pool* de soros dos animais suscetíveis *naive*, cuja localização desses *spots* estão entre os pesos moleculares de 10 a 35 kDa e PI de 4-10 aproximadamente, sendo que a grande maioria dos *spots* não estão sendo reconhecidos, como pode ser visto ao comparar com a gel corado com prata (Figura 19 A).

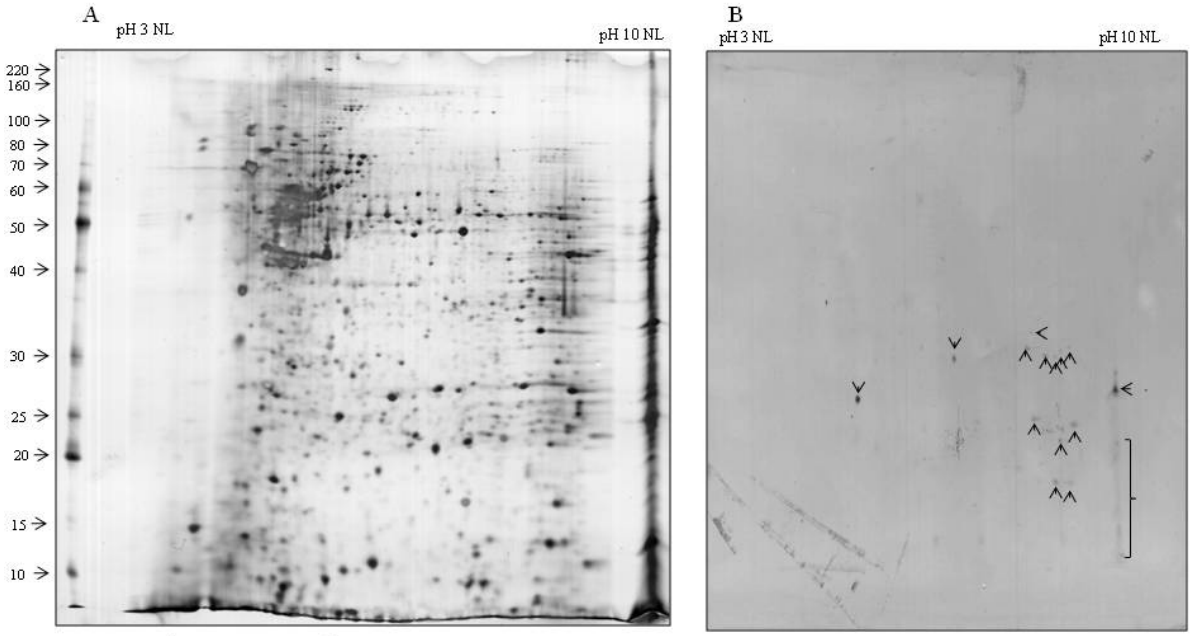


Figura 19. ***Western blot* de gel bidimensional de GSF de *R. microplus*.** A) Gel bidimensional de GSF corado com prata. B) *western blot* do gel bidimensional de GSF com *pool* de soros de animais suscetíveis (HPB) de todas as fases da primeira infestação (larva, ninfa e adulto).

No *western blot* de GSF com *pool* de soros de animais resistentes *naive* (Figura 20 B), somente 18 *spots* são reconhecidos entre os pesos moleculares de 20 a 70 kDa e pI de 5 a 9 aproximadamente, diferenciando dos *spots* que foram reconhecidos pelos *pools* de soros dos animais suscetíveis infestados ou não.

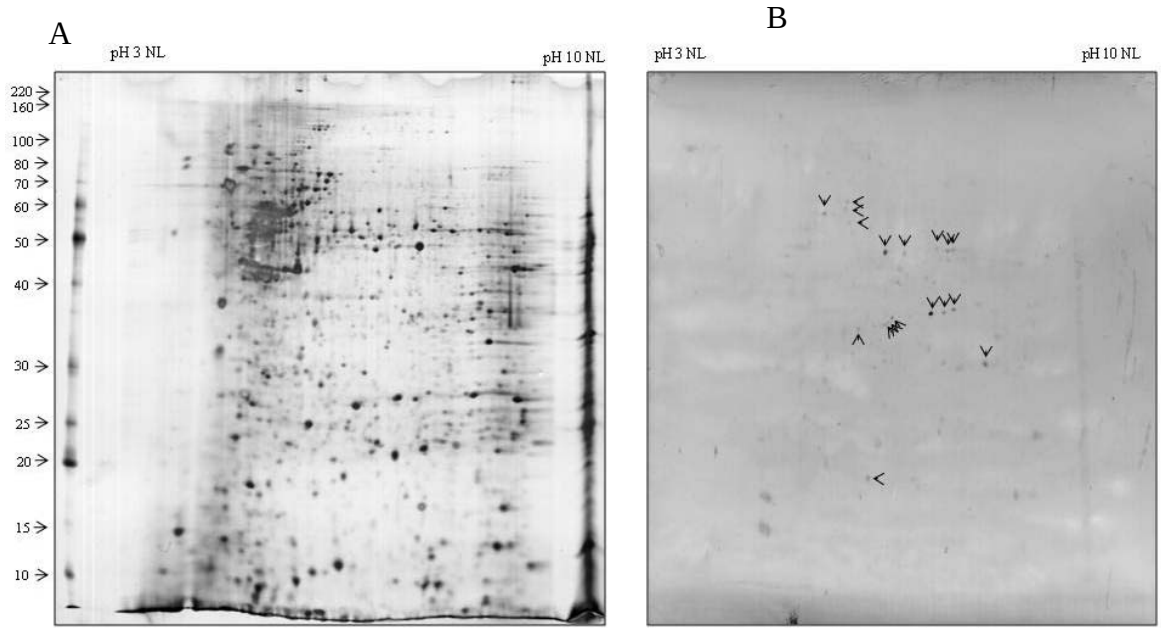


Figura 20. ***Western blot* de gel bidimensional de GSF de *R. microplus*.** A) Gel bidimensional de GSF corado com prata. B) *western blot* do gel bidimensional de GSF com *pool* de soros de animais resistentes (Nel) *naive.*

Por último, no *western blot* GSF com *pool* de soros de animais resistentes infestados (Figura 21 B), mostrou que houve reconhecimento de inúmeros *spots* protéicos cujos pesos moleculares estende-se entre 10 kDa ao de 60 kDa e com pI entre 3 a 10 aproximadamente, também diferenciando dos *spots* reconhecidos pelos animais suscetíveis infestados ou não com *R. microplus*. Pode ser visto também que proteínas de alto peso molecular 60 a 220 kDa e proteínas entre os pesos moleculares de 30 a 60 kDa entre os pI de 5 a 10 aproximadamente não foram reconhecidas mesmo com soro de animais resistentes infestados.

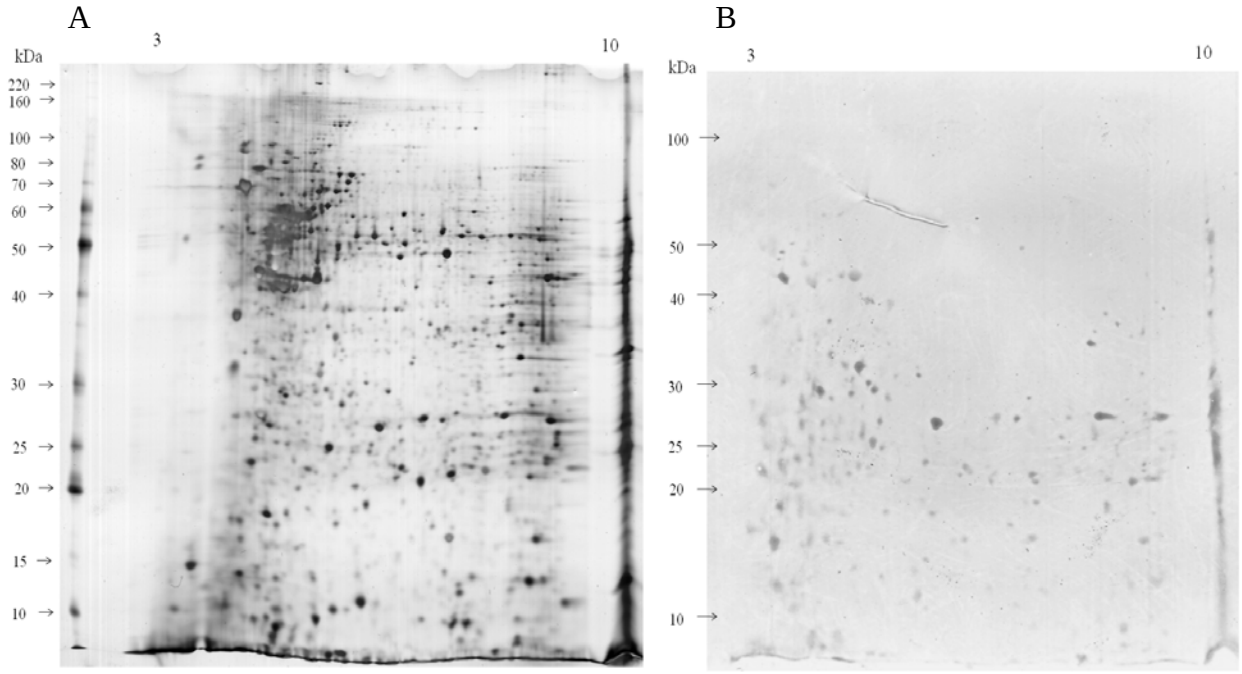


Figura 21. *Western blot* de gel bidimensional de GSF de *R. microplus*. A) Gel bidimensional de GSF corado com prata. B) *western blot* do gel bidimensional de GSF com *pool* de soros de animais resistentes (Nel) de todas as fases da primeira infestação (larva, ninfa e adulto).

5. DISCUSSÃO

A grande importância da saliva do carrapato para sucesso da infestação pelos carrapatos a torna um alvo importante da resposta imune a ser induzida por uma vacina. O presente trabalho tinha como objetivo verificar o padrão de reconhecimento de proteínas salivares por anticorpos de hospedeiros imunes ao carrapato por meio de infestações e que apresentam diferentes níveis de resistência a esse parasita. Essa abordagem permite determinar se os hospedeiros resistentes reconhecem determinadas proteínas salivares com exclusividade, fato que os tornaria antígenos candidatos mais fortes a comporem uma vacina. Como as proteínas solúveis normalmente não são imunogênicas (HIRATA e SUSSDORF, 1966; MORGAN e WEIGLE, 1980; NELSON-RAMPY; PARKS; WEIGLE, 1981; CHIRINO; ARY; MARSHALL, 2004), que pode ser o caso das proteínas salivares, este estudo também permite verificar se e quais proteínas salivares são naturalmente imunogênicas para hospedeiros suscetíveis, fato que os enfraquece como antígenos candidatos, porque tal resposta imune é, aparentemente, de pouca valia para impedir a hematofagia do carrapato. Permite, por outro lado, focar os esforços na identificação das proteínas salivares silenciosas (isto é, que não induzem resposta imune durante infestações) que podem constituir os melhores antígenos vacinais. Para isso foram necessários estudos proteômicos das glândulas salivares e saliva do carrapato baseando-se na eletroforese e nos *western blots* de géis de separação de proteínas em uma e duas dimensões.

Diversos trabalhos demonstram, no entanto que hospedeiros picados por artrópodes hematófagos induzem anticorpos específicos para vários componentes salivares, evidências de que pelo menos alguns componentes salivares são naturalmente imunogênicos apesar de serem solúveis (Tabela 1).

Os resultados obtidos nos *western blots* de saliva mostraram que ocorre um reconhecimento diferencial de proteínas solúveis pelos soros das raças suscetíveis e resistentes. Dessa forma, os resultados sobre os padrões de reconhecimento dessas proteínas solúveis do carrapato podem ser importantes para a identificação de proteínas imunogênicas, principalmente daquelas proteínas reconhecidas pelos soros dos hospedeiros resistentes e também daquelas proteínas que não foram reconhecidas por nenhum hospedeiro. Essas proteínas podem ser úteis para compor uma vacina multicomponente, que pode ser administrada com adjuvantes para induzir proteção contra carrapatos.

5.1. *Western blot* 1D de extrato de larva não alimentada e saliva de *R. microplus*

Cruz et al. (2008) realizaram um estudo no qual investigaram o padrão de resposta de anticorpos específicos para antígenos de extratos de glândulas salivares, de intestino e de larvas de *R. microplus* produzidos por bovinos suscetíveis "*B. t. taurus*" 12 vezes infestados, sendo que as seis primeiras infestações foram mais intensas e seguidas de seis infestações mais leves. Os resultados mostraram que durante as infestações mais intensas os níveis de IgG específica foram maiores do que os níveis presentes durante infestações mais leves. Os níveis também foram inversamente correlacionados com o peso e quantidade de carrapatos no final do ciclo parasitário. O padrão modificou com as infestações leves, ocorrendo uma diminuição nos níveis de IgG, provavelmente graças a uma menor exposição a antígenos do carrapato. Em relação ao reconhecimento dos diferentes componentes antigênicos dos extratos de tecidos pelos soros dos bovinos, esses pesquisadores verificaram que soros obtidos durante as infestações pesadas reconheceram

um número maior de antígenos quando comparados com soros obtidos durante as infestações leves. Porém, esse estudo for feito apenas com bovinos de uma raça suscetível (Hereford) e não foi possível comparar o padrão de reconhecimento entre soros de animais resistentes e suscetíveis frente às amostras testadas.

Com os resultados obtidos aqui acrescentamos informação ao trabalho realizado por Cruz et al. (2008). Analisamos o padrão de reconhecimento entre os hospedeiros resistentes e suscetíveis em diversas fases do ciclo parasitário (larva, ninfa e adulto). Os resultados dos *western blots* de extrato de larvas não alimentadas demonstraram que os soros dos animais das raças suscetível (HPB) e resistente (Nelore) reconheceram perfis diferentes de antígenos sendo que soros dos animais resistentes reconhecem algumas bandas de extrato de larva com uma maior freqüência e intensidade em uma fase inicial, no estágio de larva (Figuras 2 e 3) e os soros dos animais suscetíveis só passam a apresentar esse padrão de reconhecimento em uma fase mais tardia da infestação no estágio de ninfa e adulto. Resultado semelhante repete-se na segunda infestação (Figuras 4 e 5), sendo que novamente os soros dos animais resistentes, reconhecem com exclusividade algumas bandas ou com maior freqüência e intensidade em uma fase inicial da infestação, no estágio de larva quando comparados com os soros dos animais suscetíveis, que posteriormente o reconhecimento torna-se similar em uma fase mais tardia da infestação, no estágio de ninfa e adulto. Já na terceira infestação consecutiva (Figuras 6 e 7), o padrão de reconhecimento é semelhante entre as raças durante todo período, embora as bandas de 120, 85 e 36 kDa são reconhecidas exclusivamente por soros dos animais resistentes na fase inicial da infestação, no estágio de larva.

Os resultados obtidos com o estudo de saliva foram muito interessantes e corroboraram os resultados obtidos nos *western blots* de extrato de larvas não alimentadas. Soros de animais resistentes obtidos no período pré infestação (animais "*naive*") e quando infestados pela primeira vez com o estágio de larva reconhecem as bandas de 130, 70, 46, 44, 27 e 16 kDa quase que exclusivamente (Figuras 8 e 9).

Já na segunda (Figuras 10 e 11) e terceira (Figuras 12 e 13) infestações o padrão de reconhecimento é invertido quando comparado com o padrão observado na primeira infestação: os soros dos animais suscetíveis passaram a reconhecer bandas com maior freqüência e intensidade. Essas modificações dos padrões de reconhecimento das proteínas do carrapato durante a infestação e com as repetidas infestações, já tinha sido visto por Vaz Jr. et al. (1994), que mostraram que soros de bovinos infestados reconheceram várias proteínas das amostras do *R. microplus* e que algumas bandas protéicas deixam de ser reconhecidas e outras passam a ser reconhecidas durante a infestação. Essas modificações podem estar ocorrendo porque o carrapato modula o repertório de sua saliva para garantir o repasto sanguíneo, assim evadindo da resposta imune do hospedeiro. No hospedeiro suscetível essa modulação parece ser muito mais importante. Kashino et al. (2005) demonstraram que ocorre uma diminuição significativa nos níveis de anticorpos dos animais suscetíveis intensamente infestados, sugerindo que a partir de determinado limiar de infestação há uma modulação na atividade dos linfócitos B e/ou maior depuração nos níveis séricos das imunoglobulinas com diminuição de sua meia vida, coisa que não ocorreria nos hospedeiros resistentes. Por outro lado, nesse mesmo trabalho foi mostrado que o nível de anticorpos de subclasse IgG1 anti-saliva do carrapato é diretamente proporcional ao nível de infestação e, consequentemente, às quantidades de saliva inoculadas nos hospedeiros; já o nível de exposição à saliva não afeta a quantidade de anticorpos IgG2 específicos. Essas observações foram feitas em soros coletados ao término de um ano, período

durante o qual os animais foram manejados em pastos infestados, embora com níveis diferentes de larvas infestantes conforme a estação. Um trabalho recente mostrou que o padrão de imunidade apresentado por apicultores imunes a veneno de abelha iniciava-se com produção de IL-4, IL-13 e IFN-γ que diminuía rapidamente após a exposição continuada ao veneno mudando para produção de IL-10. Com a interrupção da exposição dos apicultores ao veneno, o padrão de citocinas retornava ao inicial (MEILER et al., 2008).

Essa modulação no padrão de resposta pode ocorrer nos hospedeiros infestados com carrapato devido à saliva do carrapato possuir proteínas ligantes de imunoglobulinas PLIGs (WANG; NUTTALL, 1995), uma vez que as PLIGs podem afetar a ligação das IgGs ao receptor neonatal. Esses receptores promovem a recirculação das IgGs e aumentam sua meia vida. Modificações das IgGs que inibem essa interação causam uma rápida diminuição dos níveis plasmáticos das IgGs (VACCARO et al., 2005; HINTON et al., 2003), permitindo assim a saliva do carrapato modular o padrão de resposta, modificando de um padrão de resposta do tipo TH1 pro-inflamatório para um padrão de resposta do tipo TH2 anti-inflamatório. Podendo também modificar o padrão de reconhecimento das proteínas, como parece ocorrer nos western blots acima (itens 4.1 e 4.2).

Hannier et al. (2003 e 2004) mostraram também que componentes presentes na saliva do carrapato *Ixodes ricinus* inibem os linfócitos B. Esses hospedeiros resistentes, além de não apresentarem modulação na resposta de anticorpos, conseguem de alguma maneira reconhecer várias proteínas exclusivamente ou com maior freqüência nos períodos de maior importância que é no período de pré infestação "*naive*" e no período inicial das infestações, no estágio de larva (item 4.1 e 4.2).

Com esses resultados, podemos sugerir que as proteínas que estão sendo reconhecidas por soros dos hospedeiros resistentes no período de pré-infestação *naive* e no período inicial da infestação, no estágio de larva, podem ser importantes na resistência ao carrapato. Os animais resistentes *naïve* podem apresentar anticorpos induzidos por outros parasitas e patógenos que fazem reação cruzada com antígenos importantes de carrapatos. Sabemos que a fase parasitária do ciclo de vida de *R. microplus* se inicia quando a larva está no solo e sobe no hospedeiro em busca de um sítio para se fixar e, então, a larva infestante dá início à hematofagia (GONZALES, 1974 e 1975). Essa fase inicial do ciclo é de extrema importância para a continuidade do parasitismo exercido por esses ectoparasitas e, por conseqüência, para o sucesso reprodutivo do carrapato. Com base nos resultados aqui obtidos, sugerimos que o reconhecimento diferencial de proteínas pelo soro de Nelores infestados resistentes logo no início do contato com o parasita (estágio larval da primeira infestação), pode ser resultante de uma resposta protetora do hospedeiro resistente e que esteja prejudicando a fixação do carrapato ainda na fase de larva.

Segundo Veríssimo (1991) é durante a hematofagia principalmente no momento da fixação, que ocorre uma reação inflamatória, a qual é mais intensa nos animais resistentes. Também Carvalho et al. (2008) demonstraram que proteínas relacionadas com atividades anti-inflamatórias estão mais expressa em hospedeiros suscetíveis, enquanto que proteínas relacionadas com atividades pró-inflamatórias estão mais expressas em hospedeiros resistentes, mostrando que a inflamação é prejudicial ao carrapato e que essas proteínas reconhecidas pelos hospedeiros resistentes no inicio da infestação podem estar auxiliando na resposta inflamatória, portanto os hospedeiros resistentes conseguem interferir principalmente no início da hematofagia, como mostram os resultados obtidos nos *western blots* de extrato de larva não alimentadas e de saliva

(item 4.1 e 4.2), assim esses animais apresentariam uma menor carga parasitaria o que é de fato observado experimentalmente com esses animais a campo. Salvo a influência de outros fatores inerentes à raça, que também podem contribuir para a resistência ao carrapato, vale ressaltar que a identificação dessas proteínas é de extrema importância para o entendimento dos mecanismos de resposta imune do hospedeiro que levam a uma maior resistência a esses ectoparasitas e, conseqüentemente, para o desenvolvimento de vacinas anticarrapato.

5.2. *Western blot* de géis 2D de saliva e glândulas salivares de fêmeas de *R. microplus*

Devido à grande complexidade de vários parasitas e aos mecanismos de escapes que eles desenvolveram em relação às defesas de seus hospedeiros, torna-se necessário o mapeamento antigênico das proteínas desses parasitas para desenvolvimento de alternativas de controle. Para possibilitar uma melhor identificação das proteínas imunogênicas, técnicas de eletroforese de géis bidimensionais seguido de *western blots* com soros de hospedeiros imunes frente a antígenos parasitários vêm sendo utilizados para identificação dessas proteínas imunogênicas que podem posteriormente ser utilizadas para desenvolvimento de vacinas multicomponentes.

Trabalho com leishmaniose, aonde abordagens proteômicas para o mapeamento antigênico da *Leishmania donovani* vêm sendo desenvolvidos com auxilio da técnica de eletroforese de géis bidimensionais seguido de *western blots*. Soros de pacientes imunes foram utilizados para analisar a imunogenicidade frente aos antígenos da *Leishmania* e vários spots imunogênicos foram evidenciados entre os soros dos pacientes

promovendo informações que podem ser importantes para desenvolvimento de vacinas (FORGBER et al., 2006; GUPTA et al., 2007).

Trabalhos envolvendo ectoparasitas, inclusive carrapatos, também estão utilizando essa metodologia de identificação de novos antígenos. Madden et al. (2002 e 2004) identificaram e caracterizaram antígenos salivares de *Amblyomma americanum* e *Amblyvomma maculatum.* Observaram que a maioria das proteínas antigênicas presentes de forma abundante na saliva de *A. americanum* e *A. maculatum* eram derivados do hospedeiro. Em não se tratando de um artefato técnico, provavelmente foram modificadas pelo carrapato passando a serem reconhecidas como estranhos pelo próprio hospedeiro. Oleaga et al. (2007) estudaram extratos de glândulas salivares de carrapatos da família Argasidae, *Ornithodoros moubata* e *Ornithodoros erraticus*, que são de corpo mole e alimentam-se por apenas horas (versus dias para os carrapatos de corpo duro). Observaram que das cerca de 70 proteínas do extrato de glândulas salivares de *O. moubata*, apenas 25% eram antigênicas, sendo a maioria aquelas presentes em maior abundância. De grande interesse era o fato de todos serem isoformas da mesma proteína, a TSGP1 (AAN76828) que é uma lipocalina. O significado dessa redundância é desconhecido. Por outro lado, o *spot* identificado como sendo da moubatina, uma outra lipocalina de função anti-plaquetária, não era antigênico para o hospedeiro suíno imune a saliva por meio de infestação. Entre as proteínas salivares naturalmente imunogênicas de *O. erraticus*, esse autores verificaram que uma era uma lipocalina, também presente em grandes quantidades no extrato, e as outras estão envolvidas em funções ditas *housekeeping*. Como foram reconhecidos por soros de suínos infestados os autores postulam que, mesmo tendo função *housekeeping*, devem ser secretados na saliva.

Em relação à resposta humoral contra antígenos de outros ectoparasitas, um estudo realizado em modelo de sarna, os soros de suínos infestados com *Sarcoptes*

scabiei reagiram diferencialmente contra antígenos desse parasita conforme a manifestação clínica da infestação, se de cronicidade ou hipersensiblidade (RAMBOZZI et al., 2007).

A resposta humoral também vem sendo estudado em malária para identificação de novos antígenos para desenvolvimento de vacina. Um estudo foi realizado com crianças apresentando diferentes desfechos clínicos após infecções com *Plasmodium falciparum*. Os soros desses pacientes foram utilizados para analisar o perfil de reconhecimento de antígenos do *P. falciparum* com intuito de identificar antígenos que podem estar relacionados com proteção. A análise da resposta humoral demonstrou que há um reconhecimento diferencial de antígenos em nível de especificidade e afinidade e que o padrão de reconhecimento correlaciona-se com os desfecho clínico. Os antígenos reconhecidos por indivíduos mais resistentes posteriormente podem ser utilizados no desenvolvimento de vacina (GRAY et al., 2007).

Nenhum estudo envolvendo o carrapato *R. microplus* com soros de bovinos resistentes e suscetíveis e imunes por meio de infestações foi realizado. Como os resultados de *western blots* de géis 1D demonstraram ser muito interessantes, assim continuamos com o objetivo de identificar novos antígenos imunogênicos, agora com auxílio das técnicas dos trabalhos acima citados. Os resultados do mapeamento antigênico das proteínas salivares do *R. microplus* mostram que foi possível identificar proteínas salivares que estão sendo reconhecidas diferencialmente por soros de hospedeiros resistentes e suscetíveis, resultando em informações mais detalhada sobre a relação parasita/hospedeiro para serem utilizadas posteriormente em trabalhos relacionados com o desenvolvimento de vacina multicomponente. Prevemos que a maioria das proteínas salivares secretadas na saliva não seriam imunogênicas por serem solúveis (HIRATA e SUSSDORF, 1966; MORGAN e WEIGLE, 1980; NELSON-

RAMPY et al, 1981; CHIRINO; ARY; MARSHALL, 2004). De fato, foi o constatado, mesmo quando empregamos soros de bovinos geneticamente resistentes. Resta agora identificar as funções biológicas daquelas que são, ou não, reconhecidas durante infestações para deduzir quais entre elas serão os melhores antígenos vacinais. As proteínas naturalmente não-imunogênicas podem ir a sê-los por meio de agregação (MORGAN e WEIGLE, 1980; NELSON-RAMPY et al., 1981) e/ou adjuvantes.

Nos resultados obtidos nos *western blots* de géis bidimensionais de saliva (item 4.3), os soros dos animais suscetíveis infestados reconheceram um número maior de *spots* do que os soros dos animais resistentes infestados (Figura 16), porém soros coletados no período antes da infestação reconheceram número maior de *spots* quando comparado com os soros similares dos animais suscetíveis (Figura 15). Essas proteínas reconhecidas precocemente pelos bovinos resistentes ainda *naïve* podem, então, ser alvos importantes para conferir a resistência ao carrapato. As especificidades dos anticorpos dos animais ainda não expostos a carrapatos (*naïves*) podem derivar de reatividade cruzada entre antígenos salivares de diferentes artrópodes hematófagos e ácaros, porém essa reatividade cruzada ainda não foi descrita, mas a anotação do transcriptoma gerado pelo nosso grupo de pesquisa indica que as glândulas salivares de *R. microplus* contém vários genes similares a outros de *Anopheles*, *Aedes*, e *Dermatophagoides*. Esse fato pode explicar o reconhecimento de antígenos salivares por soros de animais naïve.

Os resultados com géis 2D de glândulas salivares de fêmeas (item 4.4) mostram que esse material possui maior complexidade protéica do que a saliva, o que é de se esperar. Já os resultados de *western blots* de GSF com soros de bovinos resistentes e suscetíveis demonstraram uma inversão no padrão de reconhecimento obtido com saliva: os soros dos animais resistentes, infestados ou não, reconhecem um número maior de

spots do que os soros dos animais suscetíveis. Além desse achado, verificou-se que os soros de animais resistentes reconheceram diversas proteínas que não estão presentes em saliva. Cabe perguntar de que forma ocorreu a sensibilização dos bovinos resistentes com proteínas que não são encontradas na saliva secretada. Uma explicação é que as amostras de saliva e das glândulas salivares são de fêmeas que se alimentaram em hospedeiros suscetíveis e não em hospedeiros resistentes. Através de trabalhos anteriores do nosso grupo (MARUYAMA dissertação de mestrado) sabemos que as glândulas salivares que vêm de carrapatos alimentados nesses dois tipos de hospedeiros apresentam padrões bastante diferentes de expressão gênica e, muito possivelmente, essa diferença se estende à composição protéica da saliva. Portanto, a composição protéica da saliva varia dependendo do hospedeiro em que o carrapato está se alimentando e o animal resistente pode ter sido sensibilizado com proteínas diferentes que o animal suscetível.

Com o presente trabalho pôde-se entender com mais profundidade a relação parasita/hospedeiro por meio do reconhecimento diferencial de várias proteínas em diversas fases do parasitismo. Também foi possível mostrar que diversas proteínas podem ser importantes no contexto da resistência e até mesmo da composição de uma vacina multicomponente. Esses resultados confirmaram a hipótese de trabalho de que hospedeiros resistentes reconhecem proteínas parasitárias distintas daquelas reconhecidas por hospedeiros suscetíveis. Também confirma que várias proteínas não estão sendo reconhecidas por nenhum hospedeiro, proteínas essas que podem ser muito úteis para desenvolvimento de uma vacina, uma vez que essas proteínas "silenciosas" estão sendo secretadas pelo carrapato durante a hematofagia por razões biológicas importantes. Agora é necessário um estudo proteômico mais aprofundado tanto das proteínas naturalmente imunogênicas quanto das proteínas "silenciosas" ou não imunogênicas, uma vez que foi demonstrando em trabalho com cobaias vacinadas contra antígenos

salivares de *I. scapularis*, mostrando um aumento na taxa de rejeição, prolongando o tempo da hematofagia e mostrando sinais de inflamação, assim indicando uma resposta imune protetora (KOTSYFAKIS et al., 2008). Com proteoma das amostras do *R. microplus*, podemos identificar com exatidão as proteínas que foram reconhecidas por cada raça de animal e em cada fase, para sabermos suas funções e posteriormente utilizá-las em um estudo similar ao desenvolvido com *I. scapularis*, para desenvolvimento de uma vacina multicomponente que proteja contra carrapato.

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos com os *western blots* de proteínas de saliva e larvas não alimentadas de *R. microplus* separadas em uma dimensão mostram que o reconhecimento das proteínas varia conforme:

1) O fenótipo de infestação apresentado pelo hospedeiro bovino se de resistência ou suscetibilidade;

2) A fase de desenvolvimento do carrapato durante a qual os soros dos bovinos foram coletados, se larva, ninfa ou adulto;

3) O número de vezes que o hospedeiro foi infestado, se uma, duas ou três vezes.

Esses resultados sugerem que o padrão de anticorpo ao qual o hospedeiro é exposto varia, mas também a meia vida dos anticorpos parece estar sendo afetada pela infestação.

Também mostram que o hospedeiro bovino, tanto do fenótipo suscetível quanto do resistente, possui anticorpos específicos para várias proteínas parasitárias antes de serem expostos ao carrapato. Esse reconhecimento pode representar reatividade cruzada com proteínas de outros endoparasitas e ectoparasitas aos quais possa ter tido contato.

Os resultados obtidos com os *western blots* de proteínas de saliva e extrato de glândulas salivares de fêmea de *R. microplus* separadas em duas dimensões mostram:

1) Que o reconhecimento de proteínas varia conforme o fenótipo de infestação, havendo *spots* reconhecidos pelos dois tipos de hospedeiros e outros reconhecidos exclusivamente por um ou outro fenótipo;

2) Que a maioria do conteúdo protéico da saliva e da glândula salivar não são reconhecidos por anticorpos dos hospedeiros, mesmo aqueles que são suscetíveis;

3) Os soros dos animais resistentes infestados reconhecem um número maior de componentes presentes na glândula salivar.

Sugerindo que a saliva de carrapato alimentado em bovinos resistentes possui proteínas que estão presentes nas glândulas salivares do carrapato alimentado nos bovinos suscetíveis, mas que não são secretados ou são secretados em pequenas quantidades.

Assim podemos sugerir que algumas dessas proteínas identificadas podem estar relacionadas com fenótipo de resistência e podem ser úteis para uma vacina multicomponente. Também sugerimos que as proteínas não imunogênicas podem constituir bons antígenos vacinais.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACKERMAN S, CLARE FB, MCGILL TW, SONENSHINE DE. Passage of host serum components, including antibody, across the digestive tract of Dermacentor variabilis **J Parasitol.** Oct; 67(5):737-40. 1981.

ALLEN, J. R. Tick resistance : basophils in skin reactions of resistant guinea pigs. **International Journal for Parasitology** 3, 195–200. 1973.

ARCA, B.; LOMBARDO, F.; FRANCISCHETTI, I. M.; PHAM, V. M.; MESTRES-SIMON, M.; ANDERSEN, J. F.; RIBEIRO, J. M. An insight into the sialome of the adult female mosquito Aedes albopictus. **Insect Biochem.Mol.Biol.** 37: 107-127, 2007.

ASTIGARRAGA, A.; OLEAGA-PEREZ, A.; PEREZ-SANCHEZ, R.; BARANDA, J. A.; ENCINAS-GRANDES, A. Host immune response evasion strategies in Ornithodoros erraticus and O. moubata and their relationship to the development of an antiargasid vaccine. **Parasite Immunol.** 19: 401-410, 1997.

BASTIDA-CORCUERA FD, NIELSEN KH, CORBEIL LB. Binding of bovine IgG2a and IgG2b allotypes to protein A, protein G, and Haemophilus somnus IgBPs. **Vet Immunol Immunopathol**.. 71:143-9; 1999.

BASTIDA-CORCUERA FD, BUTLER JE, YAHIRO S, CORBEIL LB. Differential complement activation by bovine IgG2 allotypes. **Vet Immunol Immunopathol.** 71:115-23; 1999.

BECHARA, G.H.; MORELLI JUNIOR, J.; SZABÓ, M.P.J. Skin test and tick immune status in susceptible and resistant cattle in Brazil. **Ann NY Acad Sci** 916: 570-575. 2000.

BELKAID Y, KAMHAWI S, MODI G, VALENZUELA J, NOBEN-TRAUTH N, ROWTON E, RIBEIRO J, SACKS DL.Development of a natural model of cutaneous leishmaniasis: powerful effects of vector saliva and saliva preexposure on the long-term outcome of Leishmania major infection in the mouse ear dermis. **J Exp Med.** Nov 16;188(10):1941-53, 1998.

BENNETT, G.F. Oviposition of *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acarida: Ixodidae). I. Influence of tick size on egg production**. Acarologia**, v. 16, n. 1, p. 52-61, 1974 a.

BENNETT, G.F. Oviposition of *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acarida: Ixodidae). II. Influence of temperature, humidity and light. **Acarologia**, v. 16, n. 2, p. 251-7, 1974 b.

BIRON, D. G.; AGNEW, P.; MARCHE, L.; RENAULT, L.; SIDOBRE, C.; MICHALAKIS, Y. Proteome of Aedes aegypti larvae in response to infection by the intracellular parasite Vavraia culicis. **Int.J.Parasitol.** 35: 1385-1397, 2005.

BOWMAN AS, SAUER JR, ZHU K, DILLWITH JW. Biosynthesis of salivary prostaglandins in the lone star tick, Amblyomma americanum. **Insect Biochem Mol Biol.** Jun;25(6):735-41. 1995.

BROSSARD, M. [Immunologic relations between cattle and ticks, specifically between cattle and Boophilus microplus]. **Acta Trop.** 33: 15-36, 1976.

BROWN, S.J. Immunology of acquired resistance to ticks. **Parasitol Today** 1: 165-171. 1985.

BROWN, S. J. Characterization of tick antigens inducing host immune resistance. II. Description of rabbit-acquired immunity to Amblyomma americanum ticks and identification of potential tick antigens by Western blot analysis. **Vet.Parasitol.** 28: 245-259, 1988

BROWN, S.J.; ASKENASE, P.W. Immune rejection of ectoparasites (ticks) by T cell and IgG-1 antibody recruitment of basophils and eosinophils. **Feder Proc** 42(6): 1744-1749. 1983.

BROWN, S.J.; GALLI, S.J.; GLEICH, G.J.; ASKENASE, P.W. Ablation of immunity to *Amblyomma americanum* by anti-basophil serum: cooperation between basophils and eosinophils in expression of immunity to ectoparasites (ticks) in guinea pigs. **J Immunol** 129: 790- 796. 1982.

BROWN, S.J.; SHAPIRO, S.Z.; ASKENASE, P.W.. Characterization of tick antigens inducing host immune resistance. **J Immun** 133(6): 3319-3325. 1984.

CARVALHO WA, BECHARA GH, MORÉ DD, FERREIRA BR, DA SILVA JS, DE MIRANDA SANTOS IK. Rhipicephalus (Boophilus) microplus: distinct acute phase proteins vary during infestations according to the genetic composition of the bovine hosts, Bos taurus and Bos indicus. **Exp Parasitol.** Apr;118(4):587-91, 2008.

CHARLAB R, VALENZUELA JG, ROWTON ED, RIBEIRO JM. Toward an understanding of the biochemical and pharmacological complexity of the saliva of a hematophagous sand fly Lutzomyia longipalpis. **Proc Natl Acad Sci U S A.** Dec 21;96(26):15155-60, 1999.

CHIRINO, AJ., ARY, ML., MARSHALL, SA. Minimizing the immunogenicity of protein herapeutics. **Drug discovery today** 9, 2004.

CHOUMET, V.; CARMI-LEROY, A.; LAURENT, C.; LENORMAND, P.; ROUSSELLE, J. C.; NAMANE, A.; ROTH, C.; BREY, P. T. The salivary glands and saliva of Anopheles gambiae as an essential step in the Plasmodium life cycle: a global proteomic study. **Proteomics.** 7: 3384-3394, 2007.

COHEN, A. M., RUMPEL, K., COOMBS, G. H.,WASTLING, J. M. Characterisation of global protein expression by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry: proteomics of *Toxoplasma gondii.***Int. J. Parasitol***. 32*, 39–51, 2002.

CRAIG, L. E.; NORRIS, D. E.; SANDERS, M. L.; GLASS, G. E.; SCHWARTZ, B. S. Acquired resistance and antibody response of raccoons (Procyon lotor) to sequential feedings of Ixodes scapularis (Acari: Ixodidae). **Vet.Parasitol.** 63: 291-301, 1996.

CROSS ML, CUPP MS, CUPP EW, RAMBERG FB, ENRIQUEZ FJ. Antibody responses of BALB/c mice to salivary antigens of hematophagous black flies (Diptera: Simuliidae). **J Med Entomol.** Jul;30(4):725-34, 1993.

CRUZ, A.P.R; SILVA, S.S; MATTOS, R.T; VAZ Jr., I.S; Masuda, A; Ferreira, C.A.S. Comparative IgG recognition of tick extracts by sera of experimentally infested bovines. **Veterinary Parasitology**. 2008.

DA ROCHA, C.M.B.M. Aspectos relevantes da biologia do *Boophilus microplus* (Cannestrini, 1887). **Boletim da Universidade Federal de Lavras** (on-line). http://www.editora.ufla.br/Boletim/pdf/bol_32.pdf.

DALTON JP, MULCAHY G. Parasite vaccines--a reality? **Vet Parasitol.** Jul 12;98(1-3):149-67. 2001.

DE LA FUENTES; RODRÍGUEZ M, MONTERO C, REDONDO M, GARCÍA-GARCÍA JC, MÉNDEZ L, SERRANO E, VALDÉS M, ENRÍQUEZ A, CANALES M, RAMOS E, BOUÉ O, MACHADO H, LLEONART R. VACCINATION AGAINST ticks (Boophilus spp.): the experience with the Bm86-based vaccine Gavac. **Genet Anal**. Nov;15(3-5):143-8, 1999.

DE MIRANDA-SANTOS IK, CAMPOS-NETO A. Receptor for immunoglobulin Fc on pathogenic but not on nonpathogenic protozoa of the Trypanosomatidae. **J Exp Med**.. 154:1732-42, 1981.

DHARAMPAUL, S; KAUFMAN, WR; BELOSEVIC, M. Differential recognition of saliva antigens from the ixodid tick Amblyomma hebraeum (Acari: Ixodidae) by sera from infested and immunized rabbits**. J Med Entomol.** Jan;30(1):262-6. 1993.

DINGLASAN, R. R.; DEVENPORT, M.; FLORENS, L.; JOHNSON, J. R.; MCHUGH, C. A.; DONNELLY-DOMAN, M.; CARUCCI, D. J.; YATES, J. R., III; JACOBS-LORENA, M. The Anopheles gambiae adult midgut peritrophic matrix proteome. **Insect Biochem.Mol.Biol.** 39: 125-134, 2009.

DLUGONSKA, H., DYTNERSKA, K., REICHMANN, G., STACHELHAUS, S., FISCHER, W., Towards the *Toxoplasma gondii* proteome: position of 13 parasite excretory antigens on a standardized map of two-dimensionally separated tachyzoite proteins. **Parasitol. Res**. 87, 634–637 2001.

FAO (2002) Disponível on-line no site:
http://www.fao.org/docrep/004/x6538e/x6538e01.htm.

FERNÁNDEZ-ARENAS, E., MOLERO, G., NOMBELA, C., DIEZ-OREJAS, R. *et al.*, Low virulent strains of *Candida albicans*: unravelling the antigens for a future vaccine. **Proteomics,** *4*, 3007–3020, 2004.

FERREIRA, B. R.; MACHADO, R. Z.; BECHARA, G. H. Western blot analysis of tick antigens from a Rhipicephalus sanguineus unfed larval extract and identification of antigenic sites in tick sections using immunohistochemistry. A comparative study between resistant and susceptible host species. **Vet.Parasitol.** 62: 161-174, 1996.

FERREIRA, B.R., SILVA, J.S. Saliva of Rhipicephalus sanguineus tick impairs T-cell proliferation and IFN-gamma-induced macrophage microbicidal activity. **Vet. Immunol. Immunopathol.** 64, 267–293,1998.

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 animals. **Veterinary Parasitology** 115, 35–48, 2003.

FORGBER, M; BASU, R; ROYCHOUDHURY, K; THEINERT, S; ROY, S; SUNDAR, S; WALDEN, P. Mapping the antigenicity of the parasites in Leishmania donovani infection by proteome serology. **Plos one**. Dec 20, 1:e40, 2006.

FRANCISCHETTI, I. M.; MENG, Z.; MANS, B. J.; GUDDERRA, N.; HALL, M.; VEENSTRA, T. D.; PHAM, V. M.; KOTSYFAKIS, M.; RIBEIRO, J. M. An insight into the salivary transcriptome and proteome of the soft tick and vector of epizootic bovine abortion, Ornithodoros coriaceus. **J.Proteomics.** 71: 493-512, 2008.

FRANCISCHETTI IM, SA-NUNES A, MANS BJ, SANTOS IM, RIBEIRO JM. The role of saliva in tick feeding. **Front Biosci.** Jan 1;14:2051-88, 2009.

FURLONG, J. Controle dos carrapatos dos bovinos na região sudeste do Brasil. **Caderno técnico da Escola de Veterinária-UFMG**, n. 8, p. 49-61, 1993.

GARIN, N.S., GRABAREV, P.A., Protective reactions in rabbits and guinea-pigs upon repeated feeding on them of ixodid ticks Rhipicephalus sanguineus (Latr, 1806).**Meditsinskaia Parazitologiia I Parazitarnye Bolezni** 41,274–279,1972.

GEISSLER, S.; SOKOLOWSKA-KOHLER, W.; BOLLMANN, R.; JUNGBLUT, P. R.; PRESBER, W. Toxoplasma gondii infection: analysis of serological response by 2-DE immunoblotting. **FEMS Immunol.Med.Microbiol.** 25: 299-311, 1999.

GHOSH S; SINGH, NK; DAS, G. Assessment of duration of immunity in crossbred cattle immunized with glycoproteins isolated from Hyalomma anatolicum anatolicum and Boophilus microplus. **Parasitol Res**. Mar;95(5):319-26,2005.

GOMES, R. B.; MENDONCA, I. L.; SILVA, V. C.; RUAS, J.; SILVA, M. B.; CRUZ, M. S.; BARRAL, A.; COSTA, C. H. Antibodies against Lutzomyia longipalpis saliva in the fox Cerdocyon thous and the sylvatic cycle of Leishmania chagasi. **Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.** 101: 127-133, 2007.

GOMES R, TEIXEIRA C, TEIXEIRA MJ, OLIVEIRA F, MENEZES MJ, SILVA C, DE OLIVEIRA CI, MIRANDA JC, ELNAIEM DE, KAMHAWI S, VALENZUELA JG, BRODSKYN CI.Immunity to a salivary protein of a sand fly vector protects against the fatal outcome of visceral leishmaniasis in a hamster model. **Proc Natl Acad Sci U S A.** Jun 3;105(22):7845-50, 2008.

GONZALES, J.C. O carrapato do boi: vida, resistência e controle. São Paulo: **Mestre Jou**, 101p., 1974.

GONZALES, J.C., O controle dos carrapatos dos bovinos. Porto Alegre: **Sulina**, 1975.

GRAY JC, CORRAN PH, MANGIA E, GAUNT MW, LI Q, TETTEH KK, POLLEY SD, CONWAY DJ, HOLDER AA, BACARESE-HAMILTON T, RILEY EM, CRISANTI A. Profiling the antibody immune response against blood stage malaria vaccine candidates. **Clin Chem.** Jul;53(7):1244-53, 2007.

GUARAGNA, G.P., CARVALHO, J.B.P., GAMBINI, L.B. E BARBOSA, M.I.A Efeito dos fatores genéticos e ambientes na nfestação natural de carrapatos (*R. (B.) microplus*, Canestrini) em bovinos leiteiros. **Boletim de Indústria Animal**, São Paulo, v.49, n.2, p.73-82, jul./dez. 1992.

GUDDERRA NP, SONENSHINE DE, APPERSON CS, ROE RM. Hemolymph proteins in ticks. **J Insect Physiol**. Mar;48(3):269-278. 2002.

GUPTA, SK., SISODIA, BS., SINHA, S., HAJELA, K., NAIK, S., SHASANY, AK., DUBE, A. Proteomic approach for identification and characterization of novel immunostimulatory proteins from soluble antigens of *Leishmania donovani* promastigotes. **Proteomics** 7, 816-823. 2007.

GUTIERREZ, J. M.; LOMONTE, B.; LEON, G.; APE-GIRON, A.; FLORES-DIAZ, M.; SANZ, L.; ANGULO, Y.; CALVETE, J. J. Snake venomics and antivenomics: Proteomic tools in the design and control of antivenoms for the treatment of snakebite envenoming. **J.Proteomics.** 2009.

HANNIER S, LIVERSIDGE J, STERNBERG JM, BOWMAN AS.Ixodes ricinus tick salivary gland extract inhibits IL-10 secretion and CD69 expression by mitogen-stimulated murine splenocytes and induces hyporesponsiveness in B lymphocytes.**Parasite Immunol.** Jan;25(1):27-37,2003.

HANNIER S, LIVERSIDGE J, STERNBERG JM, BOWMAN AS.Characterization of the B-cell inhibitory protein factor in Ixodes ricinus tick saliva: a potential role in enhanced Borrelia burgdoferi transmission.**Immunology**. Nov;113(3):401-8, 2004.

HINTON PR, JOHLFS MG, XIONG JM, HANESTAD K, ONG KC, BULLOCK C, KELLER S, TANG MT, TSO JY, VÁSQUEZ M, TSURUSHITA N. Engineered human IgG antibodies with longer serum half-lives in primates. **Biol Chem**. 20;279(8):6213-6, 2004.

HOOGSTRAAL H, WASSEF HY. Dermacentor (Indocentor) atrosignatus (Acari: Ixodoidea: Ixodidae): hosts and distribution in the Malay Peninsula, Indonesia, Borneo, and southern Philippines. **J Med Entomol**. Nov 27;22(6):644-7. 1985.

HORN, F; SANTOS, P.C.; TERMIGNONI, C. Boophilus microplus anticoagulant protein: antithrombin inhibitor isolated from the tick saliva. **Arch Biochem Biophysics** 384:68-73. 2000

HIRATA AA, SUSSDORF DH. Immunogenicity of insolubilized bovine serum albumin. **J Immunol. Apr**;96(4):611-3,1966.

INOKUMA, H.; KEMP, D.H.; 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 Sci** 56: 1217-1218. 1994.

JEFFERIES, J. R., BROPHY, P. M., BARRETT, J., Investigation of *Fasciola hepatica* sample preparation for two-dimensional electrophoresis. **Electrophoresi***s 21*, 3724–3729, 2000.

KASHINO SS, RESENDE J, SACCO AM, ROCHA C, PROENCA L, CARVALHO WA, FIRMINO AA, QUEIROZ R, BENAVIDES M, GERSHWIN LJ, DE MIRANDA SANTOS IK. *Boophilus microplus*: the pattern of bovine immunoglobulin isotype responses to high and low tick infestations. **Exp Parasitol**. May;110(1):12-21. 2005.

KEMP, D.H., STONE, B.F., BINNINGTON, K.C. Tick attachment and feeding: Role of the mouthparts, feedings apparatus, salivary gland secretions and the host response. In: Obechain, F.D., Galun, R. **Physiology of ticks**. Oxford, Pergamon Press, p.119-167, 1982.

KIEL, M.; JOSH, P.; JONES, A.; WINDON, R.; HUNT, P.; KONGSUWAN, K. Identification of immuno-reactive proteins from a sheep gastrointestinal nematode, Trichostrongylus colubriformis, using two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. **Int.J.Parasitol.** 37: 1419-1429, 2007.

KOTSYFAKIS M, ANDERSON JM, ANDERSEN JF, CALVO E, FRANCISCHETTI IM, MATHER TN, VALENZUELA JG, RIBEIRO JM. Immunity against a "silent" salivary antigen of the Lyme vector *Ixodes scapularis* impairs its ability to feed. **J Immunol.** 15;181(8):5209-12, 2008.

LEE, B. Resistance cattle for tick control. **Rural Research**, Melbourne, v. 105, n. 12, p. 4-7, 1979.

LEE, E. G., KIM, J. H., SHIN, Y. S., SHIN, G. W. *et al.*, Establishment of a two-dimensional electrophoresis map for *Neospora caninum* tachyzoites by proteomics **Proteomics** *3,* 2339–2350, 2003.

LERNER, E. A.; RIBEIRO, J. M.; NELSON, R. J.; LERNER, M. R. Isolation of maxadilan, a potent vasodilatory peptide from the salivary glands of the sand fly Lutzomyia longipalpis. **J.Biol.Chem.** 266: 11234-11236, 1991.

LONDT, J.G.H.; ARHUR, D.R. The structure and parasitic life cycle of *Boophillus microplus* (Canestrine, 1888) in South Africa (Acarina: Ixodidae). **J. Entomol. Soc. South Africa**, v. 38, p. 321-40, 1975.

MACHADO, L. F.; LAUGESEN, S.; BOTELHO, E. D.; RICART, C. A.; FONTES, W.; BARBARO, K. C.; ROEPSTORFF, P.; SOUSA, M. V. Proteome analysis of brown spider venom: identification of loxnecrogin isoforms in Loxosceles gaucho venom. **Proteomics.** 5: 2167-2176, 2005.

MADALENA, F.E.; TEODORO, R.H.; LEMOS, A.M.; OLIVEIRA, G.P. Causes of variation of field burdens of cattle ticks (B. microplus). **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v.VIII, n.2, p.361-75.1985.

MADDEN RD, SAUER JR, DILLWITH JW. A proteomics approach to characterizing tick salivary secretions. **Exp Appl Acarol.**;28(1-4):77-87. 2002.

MADDEN RD, SAUER JR, DILLWITH JW. A proteomics approach to characterizing tick salivary secretions. **Exp Appl Acarol.**32(1-2):77-87, 2004.

MATTIOLI RC. Comment on "A possible explanation of the apparent breed-related resistance in cattle to bont tick (*Amblyomma hebraeum*) infestations" by M.I. Meltzer, Veterinary Parasitology 67 (1996) 275-279. **Vet Parasitol.** 16;79(3):263-6, 1998.

MATTIOLI RC, CASSAMA M. Comparison of characteristics of life cycle in female ticks collected on N'Dama and zebu cattle. **Trop Anim Health Prod**. 27(3):150-4, 1995.

MATTIOLI RC, PANDEY VS, MURRAY M, FITZPATRICK JL. Immunogenetic influences on tick resistance in African cattle with particular reference to trypanotolerant N'Dama (*Bos taurus*) and trypanosusceptible Gobra zebu (*Bos indicus*) cattle. **Acta Trop**. 31;75(3):263-77, 2000.

MARADAY, J.A.O.; GONZALEZ, J.C. Efeitos das raças Santa Gertrudes e Aberdeen Angus em infestações de *B.microplus* (Canestrini, 1887): I Dimensões e peso das fêmeas ingurgitadas. **Arquivos da Faculdade de Veterinária-UFRGS**, v. 12, n. 12, p. 127-38, 1984.

MEILER F, ZUMKEHR J, KLUNKER S, RÜCKERT B, AKDIS CA, AKDIS M**.** In vivo switch to IL-10–secreting T regulatory cells in high dose allergen exposure. **J Exp Med**. 205: 2887 – 98, 2008.

MELTZER MI. A possible explanation of the apparent breed-related resistance in cattle to bont tick (*Amblyomma hebraeum*) infestations. **Vet Parasitol.** 31;67(3-4):275-9, 1996.

MORAES, F.R. et al. Ecologia de carrapato XV: Suceptibilidade natural comparativa entre taurinos e zebuinos a *B. microplus* (Canestrini) (Acari: Ixodidae). **Ars Veterinária**, Jaboticabal, v. 2, n. 1, p. 45-53, 1986.

MORGAN EL, WEIGLE WO.Aggregated human gamma-globulin-induced proliferation and polyclonal activation of murine B lymphocytes. **J Immunol.** Jul;125(1):226-31, 1980.

NARASIMHAN, S; DePONTE, K; MARCONTONIO, N; LIANG, X; ROYCE, TE; NELSON, KF; BOOTH, CJ; KOSHI, B; ANDERSON, JF; FILKRIG, E. Immunity against ixodes scapularis Salivary Proteins expressed within 24 hours of attachment thwarts tick feeding and impairs Borrelia transmission. **Plos one.** 2007 May 16;2(5):e451

NASCIMENTO, R. J.; SANTANA, J. M.; LOZZI, S. P.; ARAUJO, C. N.; TEIXEIRA, A. R. Human IgG1 and IgG4: the main antibodies against Triatoma infestans (Hemiptera: Reduviidae) salivary gland proteins. **Am.J.Trop.Med.Hyg.** 65: 219-226, 2001.

NELSON-RAMPY PA, PARKS DE, WEIGLE WO. Establishment of unresponsiveness in primed B lymphocytes in vivo.**J Immunol.** Oct;127(4):1415-9, 1981.

OLEAGA A, ESCUDERO-POBLACIÓN A, CAMAFEITA E, PÉREZ-SÁNCHEZ R. A proteomic approach to the identification of salivary proteins from the argasid ticks Ornithodoros moubata and Ornithodoros erraticus. **Insect Biochem Mol Biol.**;37(11):1149-59, Nov. 2007.

OLIVEIRA F, LAWYER PG, KAMHAWI S, VALENZUELA JG. Immunity to Distinct Sand Fly Salivary Proteins Primes the Anti-Leishmania Immune Response towards Protection or Exacerbation of Disease. **PLoS Negl Trop Dis**. Apr 16;2(4):e226, 2008.

OLIVEIRA, G.P.; ALENCAR, M.M., FREITAS, A.R. Resistência de bovinos ao carrapato *B.microlus* II. Infestação natural. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 24, n. 10, p. 1267-71, 1989.

OLIVEIRA, G.P.; ALENCAR, M.M. Resistência de bovinos de seis graus de sangue Holandês-Guzerá ao carrapato (*Boophilus microplu*s) e ao berne (*D. hominis*). Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia, Belo Horizonte, v.42, n.2, p.127-35. 1990.

OLIVER, J.H. Biology and systematic of ticks (Acari:nIxodica). **Ann. Rev. Ecol. Syst**, v. 20, p. 97-430, 1989.

PABA, J., SANTANA, J. M., TEIXEIRA, A. R. L., FONTES, W., Sousa, MV, Ricart CA. Proteomic analysis of the human pathogen Trypanosoma cruzi. **Proteomic**s *4,* 1052–1059, 2004.

PAESEN, G.C.; ADAMS, P.L.; NUTTAJ, P;A.; STUART, D.L. Tick histamine-binding proteins: lipocalins with a second binding cavity. **BBA** 1482: 92-101. 2000.

PARMAR, A; GREWAL, AS; DHILLON, P. Immunological cross-reactivity between salivary gland proteins of Hyalomma anatolicum anatolicum and Boophilus microplus ticks. **Vet Immunol Immunopathol.** Jun 1;51(3-4):345-52, 1996.

PIRAN-SOARES, AA; HOMEGAE, EN; SOUZA, VMO; FONSECA, LA; LIMA,C; LOPES-FERREIRA, M. Neutralizing antibodies obtained in a persistent immune response are effective against deleterious effects induced by the *Thalassophryne nattereri* fish venom. **Toxicon** 49.920-930, 2007.

POINSIGNON, A.; CORNELIE, S.; REMOUE, F.; GREBAUT, P.; COURTIN, D.; GARCIA, A.; SIMONDON, F. Human/vector relationships during human African trypanosomiasis: initial screening of immunogenic salivary proteins of Glossina species. **Am.J.Trop.Med.Hyg.** 76: 327-333, 2007.

POWELL, R.T.; REID, T.J. Project tick control. **Queensland Agricultural Journal, Brisbane**, v. 108, n. 6, p. 279-300, 1982.

PRUETT, J.H. Immunological control of arthropod ectoparasites -a review. **Int J Parasitol** 29: 25-32. 1999

QURESHI, A. A.; ASAHINA, A.; OHNUMA, M.; TAJIMA, M.; GRANSTEIN, R. D.; LERNER, E. A. Immunomodulatory properties of maxadilan, the vasodilator peptide from sand fly salivary gland extracts. **Am.J.Trop.Med.Hyg.** 54: 665-671, 1996

RAMBOZZI L, MENZANO A, MOLINAR MIN AR, ROSSI L. Immunoblot analysis of IgG antibody response to Sarcoptes scabiei in swine. **Vet Immunol Immunopathol.** Jan 15;115(1-2):179-83, 2007.

REMOUE, F.; ALIX, E.; CORNELIE, S.; SOKHNA, C.; CISSE, B.; DOUCOURE, S.; MOUCHET, F.; BOULANGER, D.; SIMONDON, F. IgE and IgG4 antibody responses to Aedes saliva in African children. **Acta Trop.** 104: 108-115, 2007.

RENATO ANDREOTTI. Disponivel em:
http://www.cnpgc.embrapa.br/publicacoes/tese/carrapato/, acesso 24 de Abril 2009.

REUNALA, T.; BRUMMER-KORVENKONTIO, H.; PALOSUO, K.; MIYANIJ, M.; RUIZ-MALDONADO, R.; LOVE, A.; FRANCOIS, G.; PALOSUO, T. Frequent occurrence of IgE and IgG4 antibodies against saliva of Aedes communis and Aedes aegypti mosquitoes in children. **Int.Arch.Allergy Immunol.** 104: 366-371, 1994.

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

RIBEIRO, J.M.C.. How ticks make a living**. Parasitology Today** 11, 91–93. 1995.

RIBEIRO, J.M. C., MAKOUL, G. T., LEVINE, J., ROBINSON, D. R. & SPIELMAN, A. Antihemostatic, antiinflammatory, and immunosuppressive properties of the saliva of a tick, Ixodes dammini. **Journal of Experimental Medicine** 161, 332–344. 1985.

RIBEIRO JM, MATHER TN. *Ixodes scapularis*: salivary kininase activity is a metallo dipeptidyl carboxypeptidase. **Exp Parasitol.** 89(2):213-21, 1998.

RICHARDSON, M.; PIMENTA, A. M.; BEMQUERER, M. P.; SANTORO, M. M.; BEIRAO, P. S.; LIMA, M. E.; FIGUEIREDO, S. G.; BLOCH, C., JR.; VASCONCELOS, E. A.; CAMPOS, F. A.; GOMES, P. C.; CORDEIRO, M. N. Comparison of the partial proteomes of the venoms of Brazilian spiders of the genus Phoneutria. **Comp Biochem.Physiol C.Toxicol.Pharmacol.** 142: 173-187, 2006.

ROCHA, C.M.B.M. Caracterização da percepção dos produtores de leite do município de Divinópolis/MG sobre a importância do carrapato *Boophillus microplus* e fatores determinantes das formas de combate utilizadas. Belo Horizonte. **Escola de Veterinária-UFMG** (Dissertação de mestrado), p. 205, 1996.

SANDERS, M. L.; SCOTT, A. L.; GLASS, G. E.; SCHWARTZ, B. S. Salivary gland changes and host antibody responses associated with feeding of male lone star ticks (Acari:Ixodidae). **J.Med.Entomol.** 33: 628-634, 1996.

SANDERS, M.L.; GLASS, G.E.; NADELMAN, R.B.; WORMSER, G.P.; SCOTT, A.L.; RAHA, S.; RITCHIE, B.C.; JAWORSKI, D.C.; SCHWARTZ, B.S. Antibody levels to recombinant tick calreticulin increase in humans after exposure to Ixodes scapularis and are correlated with tick engorgement indices. **Am J Epidemiol** 149: 777-784. 1999.

SHAPIRO SZ, VOIGT WP, FUJISAKI K.Tick antigens recognized by serum from a guinea pig resistant to infestation with the tick Rhipicephalus appendiculatus. **J Parasitol.** Jun;72(3):454-63,1986.

SINHA, S., ARORA, S., KOSALAI, K., NAMANE, A. et al., Proteome analysis of the plasma membrane of *Mycobacterium tuberculosis.* **Comp.Funct. Genomics** 3, 470–483, 2002.

SINHA, S., KOSALAI, K., ARORA, S., NAMANE, A. *et al.* Immunogenic membrane-associated proteins of *Mycobacterium tuberculosis* revealed by proteomics. **Microbiology** *151*, 2411–2419, 2005.

STEPHANO, MA; GUIDOLIN, R; HIGASHI, HG; TAMBOURGI, DV; SANT'ANNA, OA. The improvement of the therapeutic anti-Lachesis muta serum production in horses. **Toxicon** 45, 467-473, 2005.

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

TITUS RG, RIBEIRO JM. Salivary gland lysates from the sand fly Lutzomyia longipalpis enhance Leishmania infectivity. **Science**. Mar 11;239(4845):1306-8, 1988.

TRAGER, W.. Acquired immunity to ticks. **Journal of Parasitology** 25, 57–81. 1939.

TRIMNELL AR, HAILS RS, NUTTALL PA. Dual action ectoparasite vaccine targeting 'exposed' and 'concealed' antigens. **Vaccine.** Oct 4;20(29-30):3560-8. 2002.

UTECH, K.B.W; WHARTON, R.H.; KERR, D.J. Resistence to *B.microplus* (Canestrini) in different breeds of cattle. **Australian Journal Agricultural Research, East Melbourne**, v. 29, p. 885-95, 1978.

VACCARO C, ZHOU J, OBER RJ, WARD ES. Engineering the Fc region of immunoglobulin G to modulate in vivo antibody levels. **Nat Biotechnol**. 23(10):1283-8, 2005.

VALENZUELA, J. G., CHARLAB, R., MATHER, T. N. & RIBEIRO, J.M. C. Purification, cloning, and expression of a novel salivary anticomplement protein from the tick, Ixodes scapularis. **Journal of Biological Chemistry** 275, 18717–18723. 2000.

VALENZUELA JG, BELKAID Y, GARFIELD MK, MENDEZ S, KAMHAWI S, ROWTON ED, SACKS DL, RIBEIRO JM.Toward a defined anti-Leishmania vaccine targeting vector antigens: characterization of a protective salivary protein. **J Exp Med**. Aug 6;194(3):331-42, 2001.

VAZ JR.,OZAKI, LS; MASUDA, A. Serum of Boophilus microplus infested cattle reacts with different tick tissues. **Veterinary Parasitology**. 52, 71-78, 1994

VAZ JR., I.S.; MARTINEZ, R.H.; OLIVEIRA, A.; HECK, A.; LOOGULLO, C.; GONZALES, J.C.; DEWES, H.; MASUDA, A. Functional bovine immunoglobulins in Boophilus microplus hemolyrnph. **Vet Parasitology** 62: 155-60. 1996.

VERGOTE, D.; MACAGNO, E. R.; SALZET, M.; SAUTIERE, P. E. Proteome modifications of the medicinal leech nervous system under bacterial challenge. **Proteomics.** 6: 4817-4825, 2006.

VERÍSSIMO, C.J. Resistência e suceptibilidade de bovinos leiteiros mestiços ao carrapato *Boophillus microplus*. **Jaboticabal: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias-UEP** (Dissertação de mestrado) p. 170, 1991.

VILLARES, J.B. Climatologia Zootécnica III. Contribuição ao estudo da resistência e suceptibilidade genética dos bovinos ao *B. microplus*. **Boletin de Indústria Animal, São Paulo**, v. 4, p. 60-79, 1941.

WAITAYAKUL A, SOMSRI S, SATTABONGKOT J, LOOAREESUWAN S, CUI L, UDOMSANGPETCH R. Natural human humoral response to salivary gland proteins of Anopheles mosquitoes in Thailand. **Acta Trop.** 2006 Apr;98(1):66-73, 2006.

WAMBURA PN, GWAKISA PS, SILAYO RS, RUGAIMUKAMU EA. Breed-associated resistance to tick infestation in *Bos indicus* and their crosses with *Bos taurus*. **Vet Parasitol.** 77(1):63-70, 1998.

WANG, H.; NUTTALL, P. A. Excretion of host immunoglobulin in tick sa1iva and detection of IgG-binding proteins in tick haemolymph and salivary glands. **Parasitology** 109: 525-530. 1994.

WANG H, NUTTALL PA. Immunoglobulin-G binding proteins in the ixodid ticks, *Rhipicephalus appendiculatus*, *Amblyomma variegatum* and *Ixodes hexagonus*. **Parasitology**. 111:161-5, 1995.

WHEELER, C. M.; COLEMAN, J. L.; HABICHT, G. S.; BENACH, J. L. Adult Ixodes dammini on rabbits: development of acute inflammation in the skin and immune responses to salivary gland, midgut, and spirochetal components. **J.Infect.Dis.** 159: 265-273, 1989.

WHARTON, R.H.; UTECH, K.B.W.; TURNER, H.G. Resistence to the cattle tick, *B.microplus*, in a herd of Australian Illawarra Shorthorn cattle: its assessment and herdability. **Australian Journal Agriculture Research, East Melbourne**, v. 21, p. 163-81, 1970.

WIKEL, S. K. Immune responses to arthropods and their products. **Annu Rev Entomol.** 27:21-48, 1982.

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

WILLADSEN P, KEMP DH. Vaccination with 'concealed' antigens for tick control. **Parasitol Today**. Jul;4(7):196-8. 1988.

YATSUDA AP, KRIJGSVELD J, CORNELISSEN AW, HECK AJ, DE VRIES E. Comprehensive analysis of the secreted proteins of the parasite *Haemonchus contortus* reveals extensive sequence variation and differential immune recognition. **Biol Chem**. 278(19):16941-51, 2003.

ZINKERNAGEL RM. On differences between immunity and immunological memory. **Curr Opin Immunol**. 14: 523-536, 2002.