

CAROLINA MARIA VIANNA DE FREITAS

**RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO NA INFESTAÇÃO ARTIFICIAL DE
Oryctolagus cuniculus (LINNAEUS, 1758) (LAGOMORPHA: OCHOTONIDAE)
POR *Amblyomma cajennense* (FABRICIUS, 1787) (ACARI IXODIDAE)**

Tese apresentada à Escola de Veterinária da
Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito
parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciência
Animal.

Área: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Prof. Dr. Romário Cerqueira Leite

Belo Horizonte

Escola de Veterinária da UFMG

2005

F866r Freitas, Carolina Maria Viana de, 1974-

Relação parasito-hospedeiro na infestação artificial de *Oryctolagus cuniculus* (Linnaeus, 1758) (Lagomorpha: Ochotonidae) por *Amblyomma cajennense* (Fabrícus, 1787) (Acari ixodidae) / Carolina Maria Vianna de Freitas. – 2005.
98 p. : il.

Orientador: Romário Cerqueira Leite

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária

Inclui bibliografia

1. Carrapato – Controle – Teses. 2. Resposta imune – Teses. 3. Imunologia veterinária
Teses. 4. Coelho como animal de laboratório – Teses. I. Leite, Romário Cerqueira.
II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 636.089 696 8

*Nesse louco vagar, nessa marcha perdida,
Tu foste, como o sol, uma fonte de vida:
Cada passada tua era um caminho aberto!
Cada pouso mudado, uma nova conquista!
E enquanto ias, sonhando o teu sonho egoísta,
Teu pé, como o de um deus, fecundava o deserto!*

*Morre! Tu viverás nas estradas que abriste!
Teu nome rolará no largo choro triste
Da água do Guaicuí... Morre, Conquistador!
Viverás quando, feito em seiva o sangue, aos ares
Subires, e, nutrindo uma árvore, cantares
Numa ramada verde entre um ninho e uma flor!*

*Morre! Germinarão as sagradas sementes
Das gotas de suor, das lágrimas ardentes!
Hão de frutificar as fomes e as vigílias!
E um dia, povoada a terra em que te deitas,
Quando, aos beijos do sol, sobrarem as colheitas,
Quando, aos beijos do amor, crescerem as famílias,*

*Tu cantarás na voz dos sinos, nas charruas,
No esto da multidão, no tumultuar das ruas,
No clamor do trabalho e nos hinos da paz!
E, subjugando o olvido, através das idades,
Violador de sertões, plantador de cidades,
Dentro do coração da Pátria viverás!"*

(O Caçador de Esmeraldas, Olavo Brás Martins dos Guimarães Bilac)

DEDICATÓRIA

Ao meu filho Rafael, ao Marcelo, minha mãe e meu pai.

AGRADECIMENTOS

Ao meu Mestre e amigo Professor Romário Cerqueira Leite. Foram ao todo 12 anos de aprendizado e convivência e o que começou como uma relação meramente científica se tornou uma grande amizade. Obrigada por ter aberto a porta da sua sala para mim aquela primeira vez, obrigada por ter me ensinado de forma irrestrita grande parte do que sei, Obrigada por ter acreditado e confiado em mim, obrigada por ter me deixado entrar na sua vida e fazer parte da sua história.

Ao amigo e co-orientador Prof. Andrey Pereira Lage que foi quem me deu a luz no momento de total escuridão. Obrigada pelos ótimos conselhos e correções que muito contribuíram para este trabalho.

Aos meus fiéis escudeiros, Vanessa, Dudu, Chico, Voltinha e Gustavo que a exemplo de Sancho Pança nunca deixaram de acreditar nos meus delírios e nas minhas alucinações. Sem a ajuda e confiança de vocês eu nunca teria enfrentado os moinhos de ventos que cruzaram o nosso caminho. Meus queridos amigos, no final parece que deu certo.

Aos professores Dr. Paulo Roberto (EV-UFMG), Dr. Marcelo Bahia Labruna (USP), Dr. Múcio Flávio Barbosa Ribeiro (ICB-UFMG) e Dr. Antonio Pereira de Souza (UDESC) pelas inúmeras contribuições que com certeza engrandeceram este trabalho. À Dr. Cristina Lisboa Lopes pelas orientações que me foram muito úteis.

Ao meu querido companheiro Ricardo Canesso que além de ter contribuído tecnicamente para a execução deste trabalho, alegrou as minhas tardes passadas no laboratório. Você é uma grande figura e uma companhia insubstituível.

Às amigas Telma e Alcina. Vocês foram incríveis e parte desta conquista eu devo à ajuda incondicional que vocês me prestaram. Obrigada meninas!!!!

À Fundação Ezequiel Dias (FUNED) em especial ao Dr João Guilherme. Aos funcionários da Fazenda São Judas Tadeu (FUNED) em especial ao Dr. Cláudio.

SUMÁRIO

	LISTA DE ABREVIATURAS.....	11
	RESUMO.....	12
	ABSTRACT.....	13
1	INTRODUÇÃO GERAL.....	15
2	JUSTIFICATIVA.....	16

CAPÍTULO I:

	AVALIAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE RESISTÊNCIA IMUNE EM <i>Oryctolagus cuniculus</i> FRENTE A INFESTAÇÕES SUCESSIVAS PELOS DIFERENTES ESTÁDIOS EVOLUTIVOS DE <i>Amblyomma cajennense</i> (FABRICIUS, 1787) (ACARI:IXODIDAE).....	24
1	INTRODUÇÃO.....	25
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	26
2.1	LOCAL DE REALIZAÇÃO DO EXPERIMENTO.....	26
2.2	OBTENÇÃO DOS CARRAPATOS.....	26
2.3	HOSPEDEIROS.....	27
2.4	INFESTAÇÃO DOS ANIMAIS.....	27
2.5	AVALIAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE RESISTÊNCIA IMUNE.....	28
2.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	28
3.	RESULTADOS.....	28
3.1	EFEITO DAS INFESTAÇÕES SUCESSIVAS POR LARVAS DE <i>A. cajennense</i> ..	28
3.2	EFEITO DAS INFESTAÇÕES SUCESSIVAS POR NINFAS DE <i>A. cajennense</i>	29
3.3	EFEITO DAS INFESTAÇÕES SUCESSIVAS POR FÊMEAS E MACHOS DE <i>A. cajennense</i> :	29
4	DISCUSSÃO.....	30
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33

CAPÍTULO II:

	RESPOSTA HUMORAL E CELULAR E DESENVOLVIMENTO DE RESISTÊNCIA EM <i>Oryctolagus cuniculus</i> IMUZINADOS COM EXTRATOS DERIVADOS DE GLÂNDULA SALIVAR (EGS) DE FÊMEAS DE <i>Amblyomma cajennense</i> (FABRICIUS, 1787) (ACARI: IXODIDAE).....	41
1	INTRODUÇÃO.....	42
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	44
2.1	LOCAL DE REALIZAÇÃO DO EXPERIMENTO.....	44
2.2	ANIMAIS UTILIZADOS NO EXPERIMENTO.....	44
2.3	OBTENÇÃO DOS CARRAPATOS.....	44
2.4	PREPARAÇÃO DO EXTRATO DE GLÂNDULA SALIVAR (EGS).....	45
2.5	DELINEAMENTO.....	45
2.5.1	Imunização dos animais.....	46
2.5.2	Infestação artificial dos animais.....	46
2.5.3	Coleta de soro.....	47
2.5.4	Coleta de Material para Histopatologia.....	47
2.6	ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO INDIRETO (ELISA).....	48
2.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	48
3.	RESULTADOS.....	48
3.1	DESEMPENHO DAS FÊMEAS DE <i>A. cajennense</i> RECUPERADAS NAS SUCESSIVAS INFESTAÇÕES DO GRUPO GIA.....	48

3.2	DESEMPENHO DAS FÊMEAS DE <i>A. cajennense</i> RECUPERADAS DOS COELHOS IMUNIZADOS COM EGS.....	49
3.3	ANÁLISE SOROLÓGICA.....	49
3.4	ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA.....	50
4	DISCUSSÃO.....	51
4.1	DESEMPENHO DAS FÊMEAS DE <i>A. cajennense</i> RECUPERADAS NAS SUCESSIVAS INFESTAÇÕES DO GRUPO GIA.....	51
4.2	DESEMPENHO DAS FÊMEAS DE <i>A. cajennense</i> RECUPERADAS DOS COELHOS IMUNIZADOS COM EGS.....	52
4.3	ANÁLISE SOROLÓGICA.....	54
4.4	ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA.....	55
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56

CAPÍTULO III:

RESPOSTA HUMORAL E DESENVOLVIMENTO DE RESISTÊNCIA EM *Oryctolagus cuniculus* IMUNIZADOS COM EXTRATOS DERIVADOS DE GLÂNDULA DE GENÉ (EGG) DE FÊMEAS DE *Amblyomma cajennense* (FABRICIUS, 1787) (ACARI: IXODIDAE).....

1	INTRODUÇÃO.....	70
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	71
2.1	LOCAL DE REALIZAÇÃO DO EXPERIMENTO.....	72
2.2	ANIMAIS UTILIZADOS NO EXPERIMENTO.....	72
2.3	OBTENÇÃO DOS CARRAPATOS.....	72
2.4	PREPARAÇÃO DO EXTRATO DE GLÂNDULA DE GENÉ (EGG).....	73
2.5	DELINEAMENTO	73
2.5.1	Imunização dos animais.....	73
2.5.2	Infestação artificial dos animais.....	75
2.5.3	Coleta de soro.....	75
2.6	ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO INDIRETO (ELISA).....	75
2.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	75
3	RESULTADOS.....	75
3.1	DESEMPENHO DAS FÊMEAS DE <i>A. cajennense</i> RECUPERADAS NAS SUCESSIVAS INFESTAÇÕES DO GRUPO GIA.....	75
3.2	DESEMPENHO DAS FÊMEAS DE <i>A. cajennense</i> RECUPERADAS DOS COELHOS IMUNIZADOS COM EGG.....	76
3.3	ANÁLISE SOROLÓGICA.....	76
4	DISCUSSÃO.....	77
4.1	DESEMPENHO DAS FÊMEAS DE <i>A. cajennense</i> RECUPERADAS NAS SUCESSIVAS INFESTAÇÕES DO GRUPO GIA.....	77
4.2	DESEMPENHO DAS FÊMEAS DE <i>A. cajennense</i> RECUPERADAS DOS COELHOS IMUNIZADOS COM EGG.....	77
4.3	ANÁLISE SOROLÓGICA.....	78
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	90
4	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS.....	91

LISTA DE TABELAS

Capítulo I

Tabela 1	Parâmetros parasitários e reprodutivos (média \pm desvio padrão) das teleóginas de <i>A. cajennense</i> coletadas nos coelhos, nas sucessivas infestações.....	39
----------	--	----

Capítulo II		
Tabela 1	Esquema de infestação, imunização e coleta de material dos animais pertencentes aos grupos GIA, GC e GGS.....	47
Tabela 2	Parâmetros parasitários e reprodutivos (média \pm desvio padrão) das teleóginas de <i>A. cajennense</i> coletadas nos coelhos do grupo GIA, nas sucessivas infestações.....	61
Tabela 3	Parâmetros parasitários e reprodutivos (média \pm desvio padrão) das teleóginas de <i>A. cajennense</i> provenientes da terceira infestação dos coelhos do grupo GIA e da primeira infestação dos animais dos grupos GGS e GC	61
Tabela 4	Resultados da análise histopatológica do sítio de fixação dos ixodídeos nos coelhos do Grupo Infestação Artificial (GIA):.....	68
Tabela 5	Resultados da análise histopatológica do sítio de fixação dos ixodídeos nos coelhos do Grupo Controle (GC).....	68
Tabela 6	Resultados da análise histopatológica do sítio de fixação dos ixodídeos nos coelhos do Grupo Glândula Salivar (GGS).....	68

Capítulo III		
Tabela 1	Esquema de inoculação e infestação dos animais pertencentes aos grupos GGG, GIA e GC.....	74
Tabela 2	Parâmetros parasitários e reprodutivos (média \pm desvio padrão) das teleóginas de <i>A. cajennense</i> coletadas nos coelhos do grupo GIA, nas sucessivas infestações.....	83
Tabela 3	Parâmetros parasitários e reprodutivos (média \pm desvio padrão) das teleóginas de <i>A. cajennense</i> provenientes da terceira infestação dos coelhos do grupo GIA e da primeira infestação dos animais dos grupos GGG e GC.....	83

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I		
Figura 1	Taxa de recuperação de larvas, ninfas e adultos de <i>A. cajennense</i> nas sucessivas infestações do Grupo Larva (GL), Grupo Ninfa (GN) e Grupo Adulto (GA).....	36
Figura 2	Taxa de ecdise das larvas provenientes das sucessivas infestações dos coelhos do grupo larva (GL)	37
Figura 3	Percentual de queda das larvas ingurgitadas nos coelhos do Grupo Larva, por dia de parasitismo.....	37
Figura 4	Percentual de queda de ninfas ingurgitadas de coelhos do Grupo Ninfa, por dia de parasitismo.....	38
Figura 5	Peso médio das ninfas ingurgitadas em coelhos do Grupo Ninfa, nas infestações sucessivas.....	38
Figura 6	Parâmetros parasitários médios (peso corporal e período de parasitismo) reportados nas teleóginas obtidas dos coelhos do Grupo Adulto (GA), durante as sucessivas infestações.....	39
Figura 7	Parâmetros reprodutivos médios (peso postura, eclodibilidade das larvas, IEPO e IEPL) reportados nos carrapatos obtidos dos coelhos do Grupo Adulto (GA), durante as sucessivas infestações.....	40

Capítulo II		
Figura 1	Esquema de infestação, imunização e coleta de material dos animais pertencentes aos grupos GIA, GC e GGS.....	46
Figura 2	Parâmetros parasitários médios (peso corporal, período de parasitismo, taxa de recuperação e Índice de Eficiência na Alimentação-IEAL) reportados nos carrapatos obtidos dos coelhos do Grupo Infestação Artificial (GIA), durante a primeira, segunda e terceira infestação.....	62
Figura 3	Parâmetros reprodutivos médios (peso postura, eclodibilidade das larvas, índice de eficiência na produção de ovos - IEPO e índice de eficiência na produção de larvas - IEPL) reportados nos carrapatos obtidos dos coelhos do Grupo Infestação Artificial (GIA), durante as sucessivas infestações.....	63

Figura 4	Parâmetros parasitários médios (peso corporal, período de parasitismo, taxa de recuperação e Índice de Eficiência na Alimentação-IEAL) reportados nos carrapatos obtidos da terceira infestação dos coelhos do Grupo Infestação Artificial (GIA) e da infestação dos coelhos do Grupo Controle (GC) e do Grupo Glândula Salivar (GGS).....	64
Figura 5	Parâmetros reprodutivos médios (peso postura, eclodibilidade das larvas, Índice de Eficiência na Produção de Ovos -IEPO e Índice de Eficiência na Produção de Larvas -IEPL) reportados nos carrapatos obtidos da terceira infestação dos coelhos do Grupo Infestação Artificial (GIA) e da infestação dos coelhos do Grupo Controle (GC) e do Grupo Glândula de Gené (GGG).....	65
Figura 6	Valores de absorbância de IgG anti-EGS no soro de coelhos pertencentes ao Grupo Infestação Artificial (GIA). As setas correspondem aos dias de infestação.....	66
Figura 7	Valores de absorbância de IgG anti-EGG no soro de coelhos pertencentes ao Grupo Controle (GC).....	66
Figura 8	Valores de absorbância de IgG anti-EGS no soro de coelhos pertencentes ao Grupo Glândula Salivar (GGS). As setas vermelhas correspondem aos dias de imunização e a preta ao dia de infestação.....	67
Figura 9	Valores médios de absorbância de IgG anti-EGS no soro de coelhos pertencentes ao Grupo Infestação Artificial (GIA), Grupo Controle (GC) e Grupo Glândula Salivar (GGS). As setas vermelhas correspondem aos dias de imunização e as pretas aos dias de infestação.....	67

Capítulo III

Figura 1	Esquema de infestação, imunização e coleta de material dos animais pertencentes aos grupos GIA, GC e GGS.....	73
Figura 2	Parâmetros parasitários médios (peso corporal, período de parasitismo, taxa de recuperação e Índice de Eficiência na Alimentação -IEAL) reportados nos carrapatos obtidos dos coelhos do Grupo Infestação Artificial (GIA), durante as sucessivas infestações.....	84
Figura 3	Parâmetros reprodutivos médios (peso postura, eclodibilidade das larvas, índice de eficiência na produção de ovos - IEPO e índice de eficiência na produção de larvas - IEPL) reportados nos carrapatos obtidos dos coelhos do Grupo Infestação Artificial (GIA), durante as sucessivas infestações	85
Figura 4	Parâmetros parasitários médios (peso corporal, período de parasitismo, taxa de recuperação e Índice de Eficiência Alimentar -IEAL) reportados carrapatos obtidos da terceira infestação dos coelhos do Grupo Infestação Artificial (GIA) e da infestação dos coelhos do Grupo Controle (GC) e do Grupo Glândula de Gené (GGG).....	86
Figura 5	Parâmetros reprodutivos médios (peso postura, eclodibilidade das larvas, Índice de Eficiência na Produção de Ovos -IEPO e Índice de Eficiência na Produção de Larvas -IEPL) reportados nos carrapatos obtidos da terceira infestação dos coelhos do Grupo Infestação Artificial (GIA) e da infestação dos coelhos do Grupo Controle (GC) e do Grupo Glândula de Gené (GGG).....	87
Figura 6	Valores de absorbância de IgG anti-EGG no soro de coelhos pertencentes ao grupo GIA.....	88
Figura 7	Valores de absorbância de IgG anti-EGG no soro de coelhos pertencentes ao grupo GC.....	88
Figura 8	Valores de absorbância de IgG anti-EGG no soro de coelhos pertencentes ao grupo GGG.....	89
Figura 9	Valores médios de absorbância de IgG anti-EGG no soro de coelhos pertencentes aos grupos GIA, GC e GGG.....	89

LISTA DE ABREVIATURAS:

Abs	Absorbância
EGG	Extrato de Glândula de Gene
EGS	Extrato de Glândula Salivar
GIA	Grupo Infestação Artificial
GC	Grupo Controle
GGG	Grupo Glândula de Gene
GGS	Grupo Glândula Salivar
GA	Grupo de coelhos infestados por fêmeas e machos de <i>A. cajennense</i>
GL	Grupo de coelhos infestados por larvas de <i>A. cajennense</i>
GN	Grupo de coelhos infestados por ninfas de <i>A. cajennense</i>
IEAL	Índice de Eficiência na Alimentação
IEPO	Índice de Eficiência na Produção de Ovos

RESUMO:

O presente estudo teve por objetivo, avaliar os aspectos imunológicos da relação parasito-hospedeiro em coelhos artificialmente infestados por *Amblyomma cajennense* e iniciar a busca de antígenos passíveis de serem utilizados no controle deste parasito. Para tanto foram realizados três experimentos distintos: (1) no primeiro experimento estudou-se o desenvolvimento de resistência adquirida em coelhos submetidos às infestações artificiais por larvas, ninfas e adultos de *A. cajennense*. Os coelhos só se tornaram resistentes ao parasitismo por larvas a partir da terceira infestação, quando a taxa média de recuperação foi significativamente reduzida. Não ocorreu nenhum efeito significativo sobre a taxa média de ecdise das larvas recuperadas. O dia modal de queda de larvas ingurgitadas aumentou a partir da terceira infestação. Nos coelhos infestados por ninfas, observou-se desde a primeira infestação, uma queda significativa do peso corporal dos parasitos recuperados, contudo, apenas a partir da terceira infestação pôde-se verificar uma redução significativa na taxa média de recuperação. A resistência observada nos coelhos infestados por adultos, foi significativa a partir da segunda infestação, afetando a maioria dos parâmetros parasitários e reprodutivos que foram observados. Os dados sugerem a ocorrência de resistência em coelhos à infestação por *A. cajennense* que foi mais evidente contra o estagio adulto desse ixodídeo. (2) no segundo experimento avaliou-se a resposta humoral e celular e o desenvolvimento de resistência ao parasitismo em coelhos imunizados com EGS de fêmeas de *A. cajennense* ou submetidos à infestação artificial por machos e fêmeas dessa espécie de ixodídeo. Os coelhos submetidos a três infestações consecutivas tornaram-se resistentes a partir da segunda infestação, observando-se um maior impacto sobre os parâmetros parasitários que foram avaliados. A imunização com EGS não alterou o desempenho parasitário dos ixodídeos alimentados nos animais vacinados, contudo, apresentou efeito deletério em alguns parâmetros reprodutivos que foram avaliados. Anticorpos específicos anti-EGS puderam ser reconhecidos nos soros dos animais infestados e dos animais imunizados. Os valores de absorbância de IgG anti-EGS nos animais infestados aumentaram a partir da segunda infestação e mantiveram-se altos até o 42º de experimento. Nos animais imunizados, esses valores foram consideravelmente mais altos, aumentando a partir do 7º dia após a primeira imunização. Não foi observada nenhuma correlação entre grau de resistência e nível de anticorpo anti-EGS. A análise histopatológica revelou a ocorrência de um infiltrado inflamatório no sítio de fixação dos ixodídeos que foi significativamente mais intenso nos coelhos imunizados com EGS e naqueles submetidos a três infestações consecutivas. A taxa de parasitismo não se correlacionou com o grau de lesão na pele em nenhum dos grupos experimentais avaliados. (3) finalmente, no terceiro experimento, avaliou-se a resposta humoral e o desenvolvimento de resistência em coelhos imunizados com um extrato derivado de glândulas de Gené (EGG) de *A. cajennense* e em coelhos sucessivamente infestados com fêmeas e machos dessa espécie de ixodídeo. Os coelhos infestados tornaram-se resistentes a partir da segunda infestação, sendo os parâmetros parasitários os mais afetados pela resposta imune dos animais. A imunização de coelhos do grupo GGG com o extrato de glândulas de Gené não apresentou nenhum efeito significativo sobre as variáveis parasitárias e reprodutivas que foram observadas nos ixodídeos recuperados. Os valores médios de absorbância de IgG anti-EGG nos coelhos sucessivamente infestados mantiveram-se discretos durante todo o experimento, contudo, apresentaram um pequeno aumento a partir da terceira infestação. A imunização dos animais com o EGG foi eficiente em induzir a produção de anticorpos específicos contra este antígeno. Os valores médios de absorbância de IgG anti-EGG nos animais imunizados aumentaram a partir do 7º dia após a imunização e curiosamente alcançaram índices máximos após a infestação artificial. Contudo, apesar disso, a resposta humoral alcançada pelos animais não foi capaz de protegê-los do desafio parasitário.

Palavras-chave: carrapatos, *Amblyomma cajennense*, resposta imune, imunidade, resistência imune, Glândula Salivar, Glândula de Gené, antígenos expostos, antígenos ocultos.

ABSTRACT:

The present study had as its general objective, the evaluation of the immunological aspects of the parasite-host relationship in rabbits artificially infested by *Amblyomma cajennense* and to begin the search for susceptible antigens to be used in the control of that parasite. For such reason, three different experiments were effected: (1) in the first experiment, the development of acquired resistance in rabbits submitted to the artificial infections by larvae, nymphs and adults of *A. cajennense* were studied. The rabbits only became resistant to parasitism for larvae starting from the third infestation, at which time the medium rate of recovery was significantly reduced. No significant effect on the medium rate of ecdysis of the recovered larvae took place. The modal drop-off day of larvae engorged increased as of the third infestation. In the rabbits infested by nymphs, as of the first infestation, a significant reduction of body weight of the recovered parasites was observed; however, just beginning with the third infestation, a significant reduction could be verified in the medium rate of recovery. In the resistance observed in the rabbits infested by adults, it was significant as of the second infestation, affecting most of the parasitic and reproductive parameters that were observed. The data suggest the resistance occurrence to the infestation for *A. cajennense* in rabbits that was more evident against to the adult stage of that ixodid. (2) in the second experiment, the humoral and cellular response and resistance development to the parasitism in rabbits immunized with EGS of females of *A. cajennense* or submitted to the artificial infestation by males and females of that ixodid species was evaluated. The rabbits submitted to three consecutive infestations became resistant as of the second infestation, there being a larger impact observed on the parasitic parameters that were appraised. The immunization with EGS did not alter the parasitic performance of the ixodids fed in the vaccinated animals; however, it presented deleterious effect in some reproductive parameters that were appraised. Specific anti-EGS antibodies could be recognized in the serums of the infested animals and immunized animals. The values of absorption of IgG anti-EGS in the infested animals increased as of the second infestation and they remained high, up to the 42nd experiment. In the immunized animals, those values were considerably higher, increasing as of the 7th day after the first immunization. No correlation was observed between resistance degree and level of anti-EGS antibodies. The histopathological analysis revealed the occurrence of an infiltrated inflammation in the site of fixation of the ixodids that was significantly more intense in the rabbits immunized with EGS and in those submitted to three consecutive infestations. The rate of parasitism was not correlated with the lesion degree in the skin in any of the appraised experimental groups. (3) finally, in the third experiment, the humoral response and the resistance development were evaluated in rabbits immunized with a derivate extract of Gené's glands (EGG) of *A. cajennense* and in rabbits successively infested with females and males of that ixodideous species. The infested rabbits became resistant as of the second infestation, it being that the parasitic parameters were the most affected for the immune response of the animals. The immunization of rabbits of the GGG group with the extract of Gené's glands did not present any significant effect on the parasitic and reproductive variables that were observed in the recovered ixodids. The medium values of absorbance of the IgG anti-EGG in the rabbits successively infested stayed low during the whole experiment, though, they presented a small increase as of the third infestation. The immunization of the animals with EGG was efficient in inducing the production of specific

antibodies against this antigen. The medium values of absorbance of IgG anti-EGG in the immunized animals increased as of the 7th day following the immunization and surprisingly, they reached maximum indexes after the artificial infestation. However, despite that, the humoral response reached by the animals it was not capable of protecting them from the parasitic challenge.

Keywords: ticks, Cayenne tick, *Amblyomma cajennense*, immune response, immunity, resistance, Salivary glands, Gené's organ, exposed antigens, concealed antigens.

1 INTRODUÇÃO GERAL

Os carrapatos representam o principal grupo de ectoparasitos encontrados nos animais domésticos. Apesar do prejuízo econômico indireto que eles causam resultante da compra de medicamentos para o seu controle, os ixodídeos são ainda os principais vetores de doenças para os animais domésticos e os segundos em importância para o homem, perdendo apenas para os dípteros hematófagos.

No Brasil, *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) merece papel de destaque dentro a fauna ixodológica local. É um parasito de elevada prevalência entre espécies de animais domésticos e silvestres nos quais determina importantes prejuízos biológicos e econômicos, incluindo espoliação sangüínea, reações alérgicas e inflamatórias nos locais de fixação, dano ao couro dos hospedeiros parasitados, queda na produção de leite e carne e transmissão de agentes patogênicos. No território brasileiro, *A. cajennense* é o principal ixodídeo que parasita o homem, fato que o aponta como um potencial transmissor de *Rickettsia rickettsii*, agente etiológico da Febre Maculosa na região neotropical.

A crescente preocupação do homem com os resíduos ambientais e alimentares de produtos químicos, juntamente com o desenvolvimento de resistência aos produtos disponíveis no mercado, têm incentivado pesquisas no sentido de se estabelecer novas alternativas de controle de ectoparasitas, dentre as quais o desenvolvimento de vacinas e a seleção de animais resistentes apresentam perspectivas promissoras.

O desenvolvimento de resistência nos hospedeiros frente a infestações por ixodídeos é um fenômeno que já se encontra bem descrito na literatura científica. Apesar disso, o controle imunológico, ainda está longe de ser considerado como

uma alternativa passível de substituir a utilização de produtos químicos. Primeiramente, os paradigmas culturais fomentados pelos interesses dos grandes laboratórios contribuem para a persistência da utilização incorreta de carrapaticidas. Secundariamente, os aspectos imunológicos que regem as relações parasito-hospedeiro nas infestações por ixodídeos ainda não foram completamente desvendados o que torna claro a necessidade de mais estudos a este respeito.

O desenvolvimento de vacinas contra metazoários é uma tarefa árdua e extremamente complexa. Todavia, está claro que o controle imunológico é uma alternativa promissora que merece ser pesquisada. Se por um lado, depara-se com as dificuldades inerentes ao desenvolvimento de vacinas potencialmente eficazes e com a necessidade de se conhecer os aspectos imunológicos que regem as relações dos ixodídeos com seus hospedeiros. Por outro lado, o desenvolvimento de resistência nos animais parasitados por carrapatos representa a principal alternativa para se superar os inconvenientes relativos ao uso indiscriminado de compostos químicos.

As pesquisas que envolvem o desenvolvimento de vacinas para o controle de carrapatos são fundamentadas na utilização de dois principais tipos de antígenos. Os primeiros são denominados “antígenos expostos” e baseiam-se na utilização de moléculas derivadas das glandulas salivares que são inoculadas pelos ixodídeos nos seus hospedeiros, durante as infestações naturais. Os segundos são originários dos órgãos e tecidos internos dos ixodídeos, sendo denominados “antígenos ocultos”, uma vez que normalmente não participam da resposta imune naturalmente adquirida. Atualmente tem se investigado uma variedade de substâncias produzidas pelos carrapatos que atuam na modulação da

resposta imune dos hospedeiros, sendo estas normalmente associadas à saliva dos parasitos. Os resultados obtidos com os antígenos expostos e ocultos revelam as vantagens e desvantagens associadas à utilização de cada um desses, todavia, apontam para uma grande variedade de moléculas passíveis de serem empregas na produção de vacinas contra carrapatos.

Apesar disso, no Brasil, as pesquisas relacionadas ao controle imunológico restringem-se principalmente à espécie *Boophilis microplus* e poucos são os trabalhos relacionados ao conhecimento da resposta imune de *A. cajennense* (Borges et al., 2002; Mukai et al., 2002; Mukai et al., 2002b; Castagnolli et al. 2003; Hlatshwayo et al., 2004), a despeito da importância deste parasito na Medicina Veterinária e na Saúde Pública.

Aspectos relacionados à biologia e epidemiologia de *A. cajennense*, bem como medidas que propõem o controle estratégico nesse parasito encontram-se descritos na literatura brasileira (Lopes et al., 1998, Freitas et al., 2002, Borges et al. 2002, Labruna et al., 2002, Pinter et al., 2002; Oliveira et al., 2003). Os conhecimentos adquiridos com esses estudos, juntamente com a elucidação dos aspectos imunológicos envolvidos na relação parasito-hospedeiro constituem a base para a implantação de um programa de combate racional desse ixodídeo.

2 JUSTIFICATIVA:

Os ixodídeos são importantes vetores de patógenos para o homem, os animais domésticos e silvestres. Perdas econômicas significativas ocorrem como resultado direto das infestações e da transmissão de hemoparasitoses por esses artrópodes (Balashov, 1972; Wikel e Whelen, 1986).

O desenvolvimento de resistência a acaricidas e inseticidas pelos artrópodes

hematófagos tem fomentado a necessidade de investigação de métodos alternativos de controle desses vetores (Wikel, 1984). Os produtos químicos que são utilizados no controle desses parasitos podem ser encontrados na musculatura, nas vísceras, na gordura e no leite dos animais tratados, podendo provocar efeitos indesejáveis à saúde do consumidor (Lobato et al., 2004).

A despeito de todos os malefícios que os ixodídeos podem causar direta ou indiretamente aos animais domésticos e ao homem, o desenvolvimento de resistência nestes hospedeiros frente às infestações por carrapatos é um fenômeno indiscutível e que apresenta uma base imunológica constituída por mecanismos efetores da resposta humoral e celular e de ativação do sistema de complemento (Wikel e Whelen, 1986; Wikel, 1996; Brossard e Wikel, 2004). Tal resistência é um fenômeno individual e varia significativamente de animal para animal, dentro e entre as diferentes raças e espécies (Allen e Humphrey, 1979).

Essa variação de resistência observada nos diferentes hospedeiros deve-se, principalmente, aos variados graus de adaptação que ocorrem na relação parasito-hospedeiro. Adaptação dos carrapatos aos seus hospedeiros naturais tem resultado da habilidade dos primeiros em utilizar moléculas presentes na sua saliva, para modular as respostas imune e hemostática dos animais parasitados. Ao contrário, nos hospedeiros não naturais ou acidentais, o parasitismo pelos ixodídeos frequentemente resulta em uma resposta imune alérgica contra antígenos protéicos salivares que são injetados no sítio de fixação durante o período de alimentação dos parasitos (Valenzuela, 2004).

Resistência adquirida contra infestações por carrapatos desenvolve-se a partir da primeira exposição e se expressa na infestação subsequente, pela diminuição do número e do peso corporal de fêmeas ingurgitadas,

diminuição do número e viabilidade dos ovos, aumento do período de ingurgitamento e morte dos ixodídeos sobre o hospedeiro durante o período de parasitismo (Brossard & Wikel, 2004). Essas alterações podem ser resultantes de uma resposta imune produzida pelo hospedeiro no local de fixação, que irá interferir diretamente no processo de alimentação dos ixodídeos ou de um aumento no comportamento de auto-limpeza como conseqüência indireta desta resposta inflamatória (Craig et al., 1996). Animais resistentes respondem ao desafio parasitário com uma intensificação do comportamento de auto-limpeza e os sítios de fixação dos carrapatos, tornam-se marcados por uma intensa exudação sérica que parece “afogar” o parasito (Brown, 1988).

O primeiro trabalho a demonstrar a ocorrência de imunidade adaptativa em bovinos infestados por carrapatos foi desenvolvido por Johnston & Brancroft em 1918 (Wikel, 1996). Contudo, foi Trager em 1939 que quantificou através de análise experimental, a resistência adquirida em animais submetidos a sucessivas infestações por ixodídeos. Nesta ocasião esse pesquisador verificou que 100 larvas de *Dermacertor variabilis* foram suficiente para induzir quase que resistência total em cobaias.

A partir de então, muitos outros estudos demonstraram a ocorrência de resistência adquirida frente a infestações por carrapatos: Chabaud (1950), Mustatov (1967), Allen & Humphreys (1979), Brown et al (1984), George et al (1985), Rechav et al. (1992), Sahibi et al (1997) e Jittapalapong et al (2000). Apesar do conhecimento adquirido, uma descrição precisa dos eventos que culminam nesta resposta imunológica é condição necessária para uma melhor compreensão do fenômeno. Uma distinção crítica deve ser feita entre a resposta que leva à proteção e aquela que produz apenas uma reação patológica local e prejudicial ao hospedeiro parasitado.

A duração do período de alimentação e o volume de sangue ingerido variam significativamente entre os artrópodes hematófagos (Wikel, 1996). Os carrapatos da família *Ixodidae* alimentam-se em seus hospedeiros por períodos de tempo relativamente longos, principalmente, quando comparados aos mosquitos e outros insetos hematófagos (Wikel, 1999). Para que o processo de alimentação ocorra é necessário que o parasito introduza as suas peças bucais na pele dos hospedeiros, provocando uma hemorragia local através da ruptura física ou enzimática dos vasos sanguíneos adjacentes (Wikel, 1996). Esse processo é denominado telmofagia e pode ser responsável por parte da lesão tecidual observada nos sítios de fixação desses parasitos.

Para viabilizar a fixação, a ingestão de sangue e, conseqüentemente, a transmissão de patógenos, os artrópodes hematófagos secretam e injetam na pele dos hospedeiros, um coquetel de substâncias bioativas presentes em sua saliva que coíbem os mecanismos hemostáticos destes (Mulenga et al., 2002).

Dentre os produtos secretados pelas glândulas salivares dos ixodídeos destacam-se: (i) moduladores farmacodinâmicos do fluxo sanguíneo que atuam como antagonistas dos componentes presentes na resposta inflamatória e hemostática do hospedeiro; (ii) substâncias anticoagulantes; (iii) moléculas imunossupressoras que modulam a resposta imune dos hospedeiros; (iv) componentes do cone de cimento que viabilizam a fixação do parasito no sítio de alimentação; (v) água e íons em excesso provenientes da dieta do ixodídeo; (vi) solução hipersaturada, importante na manutenção do equilíbrio hidroeletrólítico dos carrapatos durante o período de vida livre e (vii) substância lubrificante que é secretada pelo macho durante a cópula para auxiliar a entrada do espermatóforo no canal

genital da fêmea (Sonenshine, 1991). Desta forma, as secreções das glândulas salivares dos ixodídeos desempenham importante papel na aquisição do alimento, pois são constituídas por moléculas com funções anticoagulante, vasodilatadora e ainda por fatores que modulam a resposta imune do hospedeiro (Wikel e Bergan, 1997), tornando-o exposto a uma lista de substâncias potencialmente imunogênicas durante o período de alimentação dos ixodídeos (Wikel et al., 1994).

As glândulas salivares representam ainda, o sítio primário de transmissão de patógenos pelos ixodídeos. A saliva dos artrópodes hematófagos potencializa a infecção do hospedeiro por uma série de agentes infecciosos transmitidos por esses vetores (Brossard & Wikel, 2004). É suposto que a sobrevivência destes patógenos depende da sua habilidade em explorar as propriedades farmacológicas e imunossupressoras das moléculas presentes em sua saliva (Nuttal & Labuda, 2004).

Kubes et al. (1994) demonstraram um decréscimo que variou de 14 a 69%, na atividade de células “Natural Killer” (NK) humanas que foram incubadas com glândulas salivares de fêmeas de *D. reticulatus*, pré-alimentadas em camundongos por seis dias. Essas células são componentes do sistema imune inato e apresentam papel primordial em reconhecer e destruir algumas células tumorais e aquelas infectadas por vírus (Male et al., 2003).

A supressão dos mecanismos de defesa inata do hospedeiro facilita a transmissão de patógenos pelos carrapatos. Extrato de glândula salivar de fêmeas pré-alimentadas de *Ixodes ricinus* inibiram a atividade *in vitro* de células NK e a produção de óxido nítrico e INF- γ por macrófagos ativados (Kopecký & Kuthejlové, 1998). De forma semelhante, saliva de fêmeas adultas pré-alimentadas de *Rhipicephalus sanguineus*

inibiu de maneira dose-dependente, a habilidade do INF- γ ativar a produção de óxido nítrico e a fagocitose de macrófagos parasitados por *Tripanossoma cruzi*, facilitando a multiplicação e o estabelecimento destes parasitos (Ferreira e Silva, 1998). Uma vez que a saliva dos carrapatos potencializa a infectividade dos patógenos que eles transmitem, o desenvolvimento de imunidade contra moléculas presentes neste pode reduzir a transmissão desses agentes infecciosos (Brossard & Wikel, 2004).

Outra importante função das glândulas salivares é a osmorregulação dos ixodídeos. Durante a alimentação, 60 a 70% do fluído excedente proveniente da dieta é absorvido no lúmen intestinal e devolvido ao hospedeiro através da secreção de saliva, principalmente pelas células F do ácino granular do tipo III (Wikel, 1996; Sonenshine, 1991). Os ixodídeos não possuem glândulas coxais osmorreguladoras e, nestes parasitos, o papel dos túbulos de Malpighi em eliminar o excesso de água ingerido na dieta é negligenciado (Balashov, 1972).

Em função da sua importância durante o processo alimentar, os extratos salivares aparecem como uma escolha óbvia para induzir imunidade contra os artrópodes hematófagos, uma vez que contêm os principais antígenos que são naturalmente injetados por esses parasitos no corpo do hospedeiro, durante o período de alimentação (Sahibi et al., 1997). Hospedeiros que se tornaram resistentes após múltiplas infestações, frequentemente apresentam resposta imune contra substâncias encontradas na saliva dos carrapatos (Wikel & Whelen, 1986). De acordo com Wikel et al. (1996), os mecanismos efetores da imunidade adaptativa nos animais parasitados, reagem contra os tecidos e saliva dos ixodídeos, interrompendo a sua alimentação, dificultando a transmissão de patógenos,

bloqueando suas atividades fisiológicas e, conseqüentemente, levando o parasito à morte.

A participação da saliva dos ixodídeos na resposta imune dos hospedeiros foi demonstrada primeiramente por Allen et al. (1979) em cobaias infestados por larvas de *D. andersoni*. Antígenos derivados da glândula salivar (SGA) dos ixodídeos, IgG e proteínas do complemento foram detectados na epiderme e na junção dermo-epidermal próximas ao sítio de fixação dos carrapatos.

A utilização de extratos de glândulas salivares de ixodídeos na imunização de hospedeiros encontra-se bem documentada na literatura. Brown et al. (1984) trabalhando com imunização artificial de cobaias contra *A. americanum*, detectaram no soro dos animais resistentes, anticorpos produzidos contra uma proteína de 20 kDa presente da saliva de fêmeas adultas desta espécie de carrapato. Além disso, os cobaias imunizados com doses variando entre 280 a 500 µg de extratos de glândula salivar, quando desafiados apresentaram uma significativa diminuição no número e peso dos carrapatos recuperados. A resistência observada foi quase equivalente à adquirida pela infestação natural.

Bovinos artificialmente imunizados com saliva de *B. microplus*, desenvolveram uma resistência semelhante à observada durante a infestação natural desses animais por esta espécie de ixodídeo. Tal fato sugere que a saliva desses parasitos contém os principais antígenos que são apresentados aos hospedeiros durante a resposta imune (Labarthe, 1985).

A imunização artificial de bezerros sensíveis com duas doses de extrato salivar de *Hyalomma marginatum marginatum*, inibiu a alimentação e resultou em uma significativa redução da eficiência reprodutiva de adultos desta espécie que foram posteriormente inoculados nos

animais imunizados. Estes animais apresentaram resistência semelhante à observada em bezerros que foram artificialmente infestados por adultos de *H. marginatum*, sugerindo que as glândulas salivares e saliva dos ixodídeos parecem conter os principais fatores desencadeantes da imunidade ou resistência adquirida contra esses parasitos (Sahibi et al. 1997).

Proteínas presentes na estrutura das glândulas salivares e na saliva de ixodídeos foram caracterizadas em *R. appendiculatus* por Shapiro et al. (1986), em *A. americanum* por Brown (1988) e Barriga et al. (1991b), *Ixodes scapularis* por Craig et al. (1996) e em *A. americanum* e *D. variabilis* por Sanders et al (1998). As pesquisas mais recentes apontam para a utilização das moléculas derivadas das secreções salivares que são responsáveis pela modulação da resposta imune dos hospedeiros parasitados (Willadsen e Jongejan, 1999).

A despeito da importância das substâncias derivadas das glândulas salivares na indução da resistência, antígenos oriundos dos órgãos internos dos ixodídeos estão sendo sistematicamente pesquisados para serem utilizados em programas de controle imunológico (Willadsen, 2004). Esses antígenos são denominados antígenos ocultos e, provavelmente, não alcançam os hospedeiros nas condições naturais de alimentação desses parasitos (Willadsen e Jongejan, 1999). Apesar disso, a resposta imune direcionada contra os chamados antígenos ocultos é uma idéia atraente e que tem sido testada no controle de uma grande variedade de artrópodes hematófagos (Opdebeek e Daly, 1990).

Trager (1939b) foi o primeiro a verificar que extratos derivados de tecidos internos de *D. variabilis*, incluindo substância presentes no trato digestivo, glândulas cefálicas e em extratos brutos de larvas foram capazes de induzir uma resposta imune nos animais vacinados. A partir de então vários estudos

têm sido conduzidos, utilizando diferentes espécies de ixodídeos, hospedeiros e tecidos internos dos parasitos como fonte de antígenos (Allen & Humphreys, 1979; Bechara et al., 1994; Sahibi et al., 1997; Vaz Jr. et al., 1998, Jittapalapong et al., 2000; Tellam et al., 2002; Pattaroyo et al., 2002; Andreotti et al., 2002, entre outros). Todavia, o desenvolvimento de vacinas passíveis de serem utilizadas no controle de ixodídeos, confronta-se com a necessidade de se conhecer os mecanismos envolvidos na resposta imune dos hospedeiros contra esses parasitos.

Estudos laboratoriais da resposta imunológica dos hospedeiros frente às infestações por ixodídeos têm como resultado a descrição do que parece ser um padrão comum de reação. De maneira geral, essa reação culmina com o desenvolvimento de uma resposta inflamatória local e com a redução do fluxo sanguíneo e, conseqüentemente, da ingestão de alimentos pelos ixodídeos (Sonenshine, 1991). Contudo, comparação entre hospedeiros susceptíveis e resistentes demonstra que a reação cutânea no sítio de fixação dos carrapatos difere grosseiramente entre estas duas categorias (Wikel, 1996).

Hospedeiros resistentes freqüentemente desenvolvem um influxo de células para a derme e epiderme que envolve o sítio de fixação dos ixodídeos. Infiltrados de basófilos e eosinófilos ocorrem em grande quantidade nos locais onde os carrapatos introduzem suas peças bucais, indicando a ocorrência de um tipo de reação de hipersensibilidade tardia denominada “hipersensibilidade basofílica cutânea” (Wikel e Bergan, 1997). Cobaias expressando imunidade adquirida contra *A. americanum* desenvolvem resposta inflamatória cutânea rica em basófilos e eosinófilos e a rejeição dos ixodídeos é associada a uma extensiva degranulação desses basófilos (Brown et al., 1982).

Allen (1973) reportou que sítios de fixação de *D. andersoni* em animais resistentes contêm um intenso acúmulo de basófilos, sugerindo a ocorrência de hipersensibilidade basofílica cutânea. Este estudo foi o primeiro a sugerir a importância dos basófilos na resposta cutânea dos hospedeiros frente às infestações por carrapatos. Hipersensibilidade basofílica cutânea também foi observada nos sítios de fixação de *I. holocyclus*, *A. americanum* (Brown e Knapp, 1980) e *A. variegatum* (Latif et al., 1991).

A cooperação entre basófilos e eosinófilos na expressão da imunidade contra carrapatos foi demonstrada por Brown et al. (1982). O tratamento prévio de cobaias com soro anti-basófilo (SAB) e posterior desafio por *A. americanum*, eliminou este tipo celular dos sítios de fixação dos ixodídeos. Apesar do SAB não ter apresentado nenhum efeito direto na produção de eosinófilos pela medula óssea, os animais tratados demonstraram um número escasso dessas células na reação cutânea. Tal fato sugere a ocorrência de sinergismo entre as respostas destes dois tipos celulares, provavelmente, através da produção de fatores quimiotáticos para eosinófilos que são derivados da degranulação dos basófilos.

Diferentes componentes celulares da resposta cutânea podem ser esperados nos sítios de fixação das diferentes espécies de ixodídeos. Latif et al. (1990) verificaram pela análise histopatológica dos locais de fixação de *A. variegatum* em animais pré-sensibilizados, um infiltrado celular inflamatório com predominância de neutrófilos seguido por eosinófilos e células mononucleares. Por outro lado, hospedeiros sensibilizados por infestações prévias com *R. appendiculatus* e posteriormente desafiados com esta mesma espécie, apresentaram resposta celular cutânea formada basicamente por eosinófilos. Em animais primoinfestados pouca ou nenhuma resposta de eosinófilo foi verificada nos

sítios de fixação de *A. variegatum* e *R. appendiculatus*, sugerindo a importância desse tipo celular na resposta imunológica responsável pela resistência adquirida contra ixodídeos.

De maneira geral, basófilos, eosinófilos, neutrófilos e mononucleares participam ativamente da reação inflamatória cutânea nas infestações por ixodídeos, uma vez que são os principais tipos celulares formadores da resposta do tipo “hipersensibilidade cutânea” (McSwain et al., 1982; Latif et al., 1991; Craig et al., 1996;). Torna-se necessário determinar o quanto que esta resposta inflamatória é importante em produzir a reação imunológica responsável pela resistência adquirida.

Além dessa resposta celular, em hospedeiros resistentes uma marcada deposição de antígenos derivados das glândulas salivares, de imunoglobulinas e de complemento é verificada na junção dermoepidermal dos tecidos próximos aos sítios de alimentação dos carrapatos (Allen et al., 1979). Anticorpos homocitrópicos (IgE) e circulantes e linfócitos Th1 participam ativamente da resposta imunológica local e sistêmica contra os ixodídeos. Os receptores Fc dos basófilos e mastócitos presentes no sítio de fixação dos carrapatos são ocupados por anticorpos específicos que irão induzir a degranulação destes leucócitos. Entre as moléculas ativas derivadas dessas células, a histamina irá agir diretamente como mediadora de uma resposta inflamatória local e indiretamente, inibindo a salivação e o ingurgitamento dos carrapatos (Wikel e Bergan, 1997).

O papel da resposta humoral na expressão da resistência adquirida foi demonstrado por Trager (1939) através da transferência de soro de um animal imune para um suscetível, seguida da redução do número de carrapatos neste último. Estas imunoglobulinas produzidas contra os antígenos dos carrapatos neutralizam

pequenas partículas presentes no tecido, ativam a degranulação das células inflamatórias e a via alternativa do sistema de complemento e ainda opsonizam moléculas que serão destruídas pelas células fagocíticas.

Desde então a importância desse tipo de resposta na imunidade adquirida contra os carrapatos tem sido investigada. Wikel & Allen (1976b) verificaram que a administração de ciclofosfamida bloqueou a aquisição e a expressão de resistência, em cobaias parasitados por larvas de *D. andersoni*. Esta droga produziu uma depressão seletiva no centro germinal e na junção cortical-medular dos linfonodos dos animais tratados, onde as células predominantes são os linfócitos B.

Procyon lotor submetidos à repetidas infestações por larvas e ninfas de *I. scapularis*, evidenciaram um aumento de até dez vezes na produção de anticorpos específicos que reagiam contra moléculas presentes na saliva desses parasitos. Além disso, o padrão de resposta humoral variou entre os diferentes hospedeiros, sugerindo a existência de diferenças individuais nesta resposta imunológica adaptativa (Craig et al., 1997).

Sanders et al. (1998) avaliaram a cinética da resposta humoral contra antígenos salivares de *A. americanum*, em coelhos submetidos a sucessivas infestações. O pico de produção de anticorpos foi observado no quinto dia após a segunda infestação e correlacionou-se diretamente com a carga parasitária dos hospedeiros infestados.

Vários autores quantificaram o nível de anticorpos produzidos pelos hospedeiros que reagiam com substâncias presentes na saliva dos ixodídeos, durante as infestações parasitárias. Alguns deles observaram uma relação entre o grau de resistência dos hospedeiros e o título de IgG anti-EGS (Craig, 1997; Sanders et al., 1998,). Outros demonstraram que o estímulo provocado

pelos diferentes estágios evolutivos dos ixodídeos irá determinar a intensidade da resposta humoral, sendo esta significativamente maior quando promovida pelos estádios adutos (Whelen e Wikel, 1993). Contudo, alguns trabalhos verificaram não haver nenhum tipo de correlação entre a resposta humoral dos hospedeiros e a capacidade desses em controlar as infestações por esses parasitos (Barriga et al., 1991; Rechav et al., 1992; Galbe e Oliver, 1992; Szabó et al., 2003). Esses achados reforçam a idéia de que os diferentes mecanismos da resposta imune atuam em sinergismo para a proteção dos animais contra o parasitismo por ixodídeos.

É provável que a resistência ou susceptibilidade do hospedeiro às infestações por ixodídeo possam estar correlacionadas ao tipo de linfócito T estimulado e conseqüentemente, ao perfil de citocinas produzidas durante o parasitismo. Além disso, o padrão de resposta da maioria das infecções parasitárias, independentemente do grau de resistência do hospedeiro, pode estar relacionado com a ativação de LTh do tipo CD4⁺ (Sher e Coffman, 1992).

Os linfócitos T são elementos-chave nas funções reguladoras e efetoras do sistema imune e estão diretamente envolvidos com a produção de anticorpos, com a resposta celular e citotóxica (Male et al., 2003). A transferência de linfócitos de cobaias resistentes a *D. andersoni*, conferiu imunidade aos receptores suscetíveis que foi significativamente maior à observada através da aplicação passiva de soro hiperimune (Wikel e Allen, 1976a).

Ferreira e Silva (1999) induziram a proliferação em cultura estimulada por concanavalina A, de linfócitos extraídos de animais infestados por *R. sanguineus*. Esses autores verificaram que o padrão de citocinas liberado por essas células, sugeriu o desenvolvimento de uma resposta do tipo

LTh2, uma vez que foi registrado aumento na produção de IL-4 e IL-10 e diminuição do nível de IL-2 e INF- γ durante a infestação dos animais. Em contrapartida, os camundongos C3H/HeJ utilizados como hospedeiros, não desenvolveram resistência contra esta espécie de ixodídeos, mesmo quando submetidos a quatro infestações consecutivas. Desta forma, os autores sugeriram que a resistência a ixodídeos deve-se à reação de hipersensibilidade tardia que ocorre no sítio de fixação dos carrapatos e que se relaciona basicamente com citocinas liberadas a partir da ativação do linfócito Th1.

Os estudos recentes relacionados à imunologia de infestações por ixodídeos dizem respeito à caracterização do perfil de citocinas presentes na resposta adquirida. Mesmo considerando a importância destes estudos aplicados, algumas questões e perguntas básicas ainda encontram-se sem respostas. A determinação de antígenos capazes de incitarem uma resposta protetora, a mensuração da importância das reações humoral e celular na imunidade contra ixodídeos, o conhecimento dos principais tipos celulares presentes na resposta inflamatória protetora de animais resistentes ou na resposta patológica incapaz de incitar proteção, são pontos importantes que necessitam de maior investigação.

A. cajennense é um carrapato trioxeno que ocorre em todas as regiões do Brasil parasitando uma grande variedade de mamíferos e aves, durante os estádios imaturos de desenvolvimento. Contudo, apresenta maior grau de especificidade no estádio adulto quando pode, eventualmente, parasitar algumas espécies de aves, cães, bovinos e até o homem, porém tendo em condições naturais, o equino como hospedeiro preferencial (Lopes et al., 1998).

É um parasito importante no Brasil devido à sua elevada prevalência, vasta área de distribuição e aos prejuízos por ele causados.

Tais prejuízos incluem principalmente espoliação sangüínea, transmissão de patógenos nocivos ao homem e aos animais, gastos com honorários veterinários, medicamentos e demais medidas de controle, que na maioria das vezes se mostram ineficazes (Moreno, 1984; Varma, 1993). Apresenta atualmente um papel indiscutível na saúde pública, uma vez que tem sido apontado como o principal vetor da riquetsia causadora da febre maculosa entre os homens e animais domésticos (Leite et al., 1998).

Em função das atuais restrições e dificuldades de se utilizar métodos químicos no combate de *A. cajennense* (Pinheiro, 1987; Leite et al., 1998; Lobato et al. 2004), o controle imunológico pelo do emprego de vacinas apresenta-se como uma alternativa promissora. Estudos recentes a respeito de *A. cajennense* descrevem os principais aspectos envolvidos na biologia e epidemiologia dessa espécie de ixodídeo e propõe alternativas de controle químico desse parasito (Leite et al. 1998; Lopes et al., 1998; Oliveira et al., 2000; Lopes et al., 2000, Freitas et al., 2002; Labruna et al., 2001; Labruna et al., 2002, Pinter et al., 2002; Labruna et al., 2003). Contudo, poucos são os trabalhos envolvidos na caracterização dos fenômenos envolvidos na resistência imune dos animais frente ao parasitismo por *A. cajennense* (Borges et al., 2002; Castagnolli et al., 2003; Mukai et al., 2002; Szabó et al., 2004; Hlatshwayo et al., 2004; Hlatshwayo et al., 2004b), dentre os quais nenhum se relaciona à pesquisa de antígenos passíveis de serem utilizados no controle desse parasito.

O presente projeto tem por objetivo esclarecer pontos importantes da resposta imune protetora de *Oryctolagus cuniculus* contra o parasitismo por *A. cajennense*, mediante a infestação artificial ou à imunização desses animais com extratos derivados de fêmeas adultas deste ixodídeo. Este procedimento irá permitir a descrição

da resposta humoral e o grau de lesão cutânea nos animais parasitados e a pesquisa de prováveis antígenos para serem utilizados no controle imunológico de *A. cajennense*.

CAPÍTULO 1

PARÂMETROS BIOLÓGICOS DE LARVAS, NINFAS E TELEÓGINAS DE *Amblyomma cajennense* (FABRICIUS, 1787) (ACARI:IXODIDAE) PROVENIENTES DE INFESTAÇÕES ARTIFICIAIS SUCESSIVAS EM *Oryctolagus cuniculus* (LINNAEUS, 1758) (LAGOMORPHA: OCHOTONIDAE)

RESUMO:

O presente experimento teve por objetivo avaliar o desenvolvimento de resistência adquirida frente ao parasitismo por *Amblyomma cajennense*. Para tanto, 18 coelhos foram uniformemente divididos em três grupos denominados GL, GN e GA e submetidos a três infestações consecutivas por, respectivamente, larvas, ninfas ou adultos de *A. cajennense*. Após as infestações, os parâmetros parasitários e reprodutivos dos exemplares recuperados foram observados. As taxas médias de recuperação de larvas ingurgitadas foram de 44,03%, 70,54% e 17,32%, respectivamente, na primeira, segunda e terceira infestação. Com relação as ninfas, essas taxas foram de 80,67%, 81% e 47,67%, respectivamente, nas sucessivas infestações. Apenas a partir da terceira infestação dos animais dos grupos GL e GN, observou-se uma queda significativa na taxa de recuperação dos ixodídeos inoculados ($p \leq 0,01$). O dia modal de queda das larvas e ninfas recuperadas aumentou com o decorrer das infestações. As ninfas ingurgitadas recuperadas apresentaram uma redução significativa ($p \leq 0,01$) no peso médio corporal entre a primeira e terceira infestação. Não houve diferença significativa entre a taxa de recuperação dos exemplares adultos ingurgitados nas duas primeiras infestações. Todavia, a partir da segunda infestação observou-se nas teleóginas recuperadas, uma redução significativa no peso corporal, peso da postura e eclodibilidade das larvas ($p < 0,05$). Observou-se uma queda significativa na taxa média de recuperação das fêmeas ingurgitadas durante a terceira infestação, contudo, os demais parâmetros permaneceram estáveis com alguns valores semelhantes aos observados durante a primeira infestação (período médio de parasitismo e IEPO médio). Os dados sugerem a ocorrência de resistência em

coelhos à infestação por *A. cajennense* que foi mais evidente contra o estágio adulto.

Palavras-chave: *Amblyomma cajennense*, ixodídeo, *Oryctolagus cuniculus*, resistência, imunidade, infestação.

1 INTRODUÇÃO:

Conhecido popularmente por micuim, carrapatinho pólvora, carrapato estrela ou rodoleiro (Guimarães et al., 2001), *Amblyomma cajennense* foi primeiramente descrito em 1787 na cidade de Cayenna, Guiana Francesa. É encontrado parasitando animais na América do Sul, América Central, Sul da América do Norte e Antilhas, sendo um ixodídeo comum nas zonas quentes e temperadas (Aragão, 1936).

É um ixodídeo trioxeno que parasita primariamente os eqüinos (Borges et al., 2002). Contudo, apresenta baixa especificidade parasitária, principalmente nas fases imaturas de desenvolvimento, sendo também encontrado parasitando algumas espécies de répteis, aves e uma grande variedade de mamíferos, incluindo o homem.

Tendo provavelmente aparecido no final da era Mesozóica (Cupp, 1991), essa maior variabilidade por hospedeiros possivelmente garantiu a sua sobrevivência até os dias atuais. Contudo colocou o *A. cajennense* como um dos principais elos de ligação entre os animais domésticos, silvestres e o homem e, conseqüentemente, como potencial vetor dos patógenos que são transmitidos entre esses hospedeiros. Esse ixodídeo é o principal vetor de *Rickettsia rickettsii*, agente causador da Febre Maculosa no Homem, na região neotropical (Guimarães, 2001; Sangioni et al., 2005). Além disso, *A. cajennense* é ainda incriminado como vetor do vírus

causador da Encefalomielite Equina Venezuelana (Linthicum et al., 1991).

Lopes et al. (1998) verificando a especificidade parasitária de *A. cajennense*, observaram que roedores e lagomorfos apresentaram-se como hospedeiros eficientes dos estádios larval e ninfal desse carrapato e sugeriram que tal fato poderia contribuir com a manutenção e dispersão desses ínstares no ambiente. Entretanto, o papel desses hospedeiros secundários como disseminadores de carrapatos, pode ser significativamente comprometido pelo desenvolvimento de resistência nos animais parasitados (Mulenga et al., 2000).

Resistência adquirida em infestações por ixodídeos é um fenômeno indiscutível e que se encontra bem documentado na literatura (Trager, 1939; Balashov, 1972; Kemp et al., 1976; Latif et al., 1990; Whelen e Wikel, 1993; Sahibi et al., 1997; Jittapalapong et al., 2000, entre outros). Carrapatos que se alimentam em hospedeiros resistentes apresentam uma menor taxa de fixação, menor peso após o ingurgitamento com períodos de alimentação relativamente maiores, menor porcentagem de ecdise, menor produção de ovos e redução na viabilidade da postura e na eclodibilidade das larvas (Sonenshine, 1993; Wikel et al., 1994; Wikel, 1996; Andreotti et al., 2002; Brossard e Wikel, 2004). Além disso, uma vez que a resposta imune do hospedeiro inibe a alimentação dos ixodídeos, essa também irá coibir a sua capacidade de atuar como vetor de patógenos (Valenzuela, 2004; Nuttal e Labuda, 2004).

Alguns hospedeiros falham em desenvolver resposta imune protetora contra os ixodídeos (McSwain et al., 1982; Bechara et al., 1994; Craig et al., 1996; Ferreira e Silva, 1998; Castagnolli et al., 2003), demonstrando que o desenvolvimento de resistência é algo bastante complexo e que

varia entre os diferentes sistemas já estabelecidos na natureza.

O conhecimento do estado imunitário de hospedeiros infestados por *A. cajennense*, pode auxiliar o desenvolvimento de medidas de controle alternativo desse ixodídeo, como por exemplo, através do uso de vacinas ou da seleção de animais resistentes. Secundariamente, irá ajudar na compreensão do seu papel como vetor de patógenos ao homem e aos animais.

O presente trabalho teve por objetivo avaliar o desenvolvimento de resistência em *Oryzomys cuniculus* contra os diferentes estádios evolutivos de *Amblyomma cajennense*, utilizando-se como indicadores os principais parâmetros biológicos observados nas larvas, ninfas e teleóginas recuperadas de sucessivas infestações artificiais.

2 MATERIAL E MÉTODOS:

2.1 LOCAL E DATA DE REALIZAÇÃO DO EXPERIMENTO:

O experimento foi realizado no período de Março de 2004 a Janeiro de 2005, na Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais. Foram utilizadas as instalações do Hospital Veterinário, do Infectório e do laboratório de Endo-ectoparasitoses do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva.

Antes da realização do experimento o projeto piloto (protocolo nº 045/04) foi submetido ao Comitê de Ética em Experimentação animal, tendo sido aprovada e autorizada a sua realização.

2.2 OBTENÇÃO DOS CARRAPATOS:

Os ixodídeos foram provenientes de uma colônia mantida pelo laboratório de ectoparasitoses do DMVP-UFGM. Os parasitos foram obtidos por catação manual

de exemplares ingurgitados sobre o corpo de um equino SRD, artificialmente infestado e mantido confinado em uma baia no Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da Escola de Veterinária da UFMG.

2.3 HOSPEDEIROS:

Foram utilizados 18 coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) fêmeas da raça Nova Zelândia com aproximadamente 2,0 Kg de peso e que nunca tiveram contato prévio com carrapatos. Esses animais eram provenientes de uma criação comercial localizada no município de Igarapé, Minas Gerais. Os coelhos foram mantidos em gaiolas individuais suspensas a um metro de altura, recebendo água e ração comercial à vontade. Os coelhos foram divididos em três grupos e identificados pelas siglas GL (grupo larva), GN (grupo ninfa) e GA (grupo adulto).

2.4 INFESTAÇÃO DOS ANIMAIS:

Os coelhos foram submetidos a três infestações consecutivas por larvas, ninfas ou adultos de *A. cajennense*, em intervalos de quinze dias.

Nos animais do grupo GL foram inoculadas por infestação, uma média de 740 larvas com idade variando de 15 a 20 dias. Essas larvas foram obtidas de lotes de 50mg de ovos/seringa de *A. cajennense*. As infestações foram alternadamente realizadas no pavilhão auricular dos animais, iniciando-se na orelha direita. Para inibir a dispersão dos ixodídeos, um saco de tecido de algodão, com 16 cm de comprimento e 7 cm de largura, foi colocado cobrindo a orelha do animal e fixado à sua base através da utilização de cola Brascoplast e fita adesiva, segundo modificação de metodologia descrita por Neitz et al. (1971). Além disso, foi colocado no animal um colar de plástico rígido, com a circunferência interna

ajustável à largura do pescoço deste e, com circunferência externa de aproximadamente o dobro da interna – Colar Elizabetano (Labruna e Leite, 1997).

Seguindo esta mesma metodologia, os animais do grupo GN receberam em cada infestação um total de 50 ninfas de aproximadamente 20 dias de idade que foram aplicadas alternadamente no pavilhão auricular externo.

Os coelhos pertencentes ao grupo GA foram infestados com adultos virgens e não alimentados de *A. cajennense* e que apresentavam em média 30 dias de idade. De acordo com modificação da técnica descrita por Pinter et al. (2002), os animais tiveram a região lombo-sacra tricotomizada e uma câmara de alimentação de formato retangular (7 x 8 cm) foi fixada à pele do local, utilizando-se adesivo colante (Brascoplast). Um total de dez fêmeas e sete machos foi inoculado por animal em cada infestação, no interior da câmara de alimentação. Para coibir a retirada da câmara pelos animais e impedir que o comportamento de autolimpeza interferisse nos resultados do experimento, foram utilizados os “Colares Elizabetanos” respeitando-se a mesma metodologia empregada nas infestações por larvas e ninfas.

Após a inoculação nos hospedeiros, os carrapatos foram examinados diariamente por inspeção visual do interior das câmaras de alimentação. Durante o período de parasitismo foi registrado o tempo de alimentação dos ixodídeos que se fixaram e o número de parasitas que foram recuperados em cada animal, conforme Sahibi et. al. (1997). As ninfas e teleóginas que se desprenderam foram encaminhadas ao laboratório onde foram individualmente pesadas, colocadas em placas de Petri e acondicionadas em estufa bioclimatizada do tipo BOD a 27°C e umidade relativa superior a 80%. Em relação às larvas o

mesmo procedimento de acondicionamento foi adotado, contudo elas não tiveram seu peso registrado após o ingurgitamento.

2.5 AVALIAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE RESISTÊNCIA IMUNE:

A resistência dos hospedeiros foi aferida pela análise dos parâmetros parasitários e reprodutivos dos carrapatos recuperados. Dentre os parâmetros parasitários analisados, incluem-se: período de parasitismo, peso corporal de ninfas e fêmeas ingurgitadas, percentagem de ecdise de larvas, peso da postura das teleóginas recuperadas e eclodibilidade das larvas provenientes destas posturas. Além desses, o índice de eficiência na produção de ovos (IEPO)¹ e o índice de eficiência na produção de larvas (IEPL)² foram calculados segundo Bechara et al., (1994).

2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA:

As taxas de recuperação de cada infestação dentro de cada grupo foram comparadas pelo teste estatístico do qui-quadrado, utilizando-se um nível de significância de 95%. Calculou-se o dia modal de queda de larvas e ninfas ingurgitadas. Realizou-se análise de correlação entre o peso corporal das ninfas e adultos e o período de parasitismo. Os demais parâmetros parasitários foram submetidos à análise de variância e as médias entre infestações dentro dos grupos, foram confrontadas utilizando-se o teste T de Student ($p \leq 0,05$).

3 RESULTADOS:

3.1 EFEITO DAS INFESTAÇÕES SUCESSIVAS POR LARVAS DE *A. cajennense*:

¹ IEPO = peso postura / peso corporal da fêmea ingurgitada x 100

² IEPL = peso postura / peso corporal da fêmea ingurgitada x eclodibilidade larvas

Os dados referentes aos exemplares obtidos dos animais do grupo GL estão demonstrados nas Figuras 1, 2 e 3. O desenvolvimento de resistência ao parasitismo por larvas de *A. cajennense*, só pode ser detectado a partir da terceira infestação. Os parâmetros avaliados foram estatisticamente semelhantes entre os ixodídeos recuperados dos animais primoinfectados em relação àqueles obtidos na segunda infestação. A partir a terceira exposição, a taxa de recuperação de larvas ingurgitadas e o dia modal de queda foram consideravelmente afetados pelo desenvolvimento de resistência nos coelhos.

Conforme demonstrado pela taxa média de recuperação, as larvas ingurgitadas provenientes da segunda infestação foram significativamente mais eficientes em se alimentarem em relação àquelas coletadas na terceira e estatisticamente semelhantes às obtidas na primeira infestação ($p < 0,05$). Observou-se um aumento na taxa de recuperação entre as duas infestações iniciais, mas esta diferença não foi significativa.

O período de parasitismo também foi influenciado pelas exposições sucessivas ao carrapato, refletindo em um aumento no dia modal de queda na terceira infestação. Durante a primeira e segunda infestação, 43,33 e 38,54% das larvas, respectivamente, se desprenderam dos animais no quarto dia de parasitismo. Em contrapartida, a maior percentagem de queda de larvas ingurgitadas na terceira exposição ocorreu no sétimo dia de alimentação, quando 35,31% dos parasitos se desprenderam dos hospedeiros.

Não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre as taxas médias de ecdise que formam reportadas para as larvas recuperadas nas três infestações dos animais do grupo GL (Figura 2).

3.2. EFEITO DAS INFESTAÇÕES SUCESSIVAS POR NINFAS DE *A. cajennense*:

As Figuras 1, 4 e 5 apresentam as taxas médias de recuperação, a percentagem de ninfas desprendidas por dia de parasitismo e o peso médio corporal das ninfas recuperadas dos animais do grupo GN, durante as sucessivas infestações.

As taxas médias de recuperação das ninfas ingurgitadas foram de 80,67%, 81% e 47,67%, respectivamente, na primeira, segunda e terceira infestações. Nenhuma diferença estatística significativa foi observada entre os ixodídeos oriundos dos animais primoinfestados em relação aos obtidos no segundo desafio parasitário. A partir da terceira infestação, verificou-se uma queda significativa na taxa de recuperação das ninfas alimentadas em relação à observada nas duas infestações precedentes.

Os dias modais de queda de ninfas ingurgitadas aumentaram em função da exposição parasitária dos animais. Ao longo da primeira infestação 60,33% dos parasitos foram recuperados no quarto dia de parasitismo. Todavia, neste mesmo período durante a segunda infestação, apenas 22,04% das ninfas se desprenderam e a maior porcentagem de queda foi registrada no 5º dia de alimentação, quando 47,71% dos espécimes inoculados foram recuperados. Na terceira infestação o dia modal de queda foi o 6º dia de parasitismo, quando se verificou uma taxa de recuperação de 52,34%.

O peso médio das ninfas ingurgitadas reduziu significativamente com o desenvolvimento de resistência nos animais. Os valores observados na primeira, segunda e terceira infestação foram de, respectivamente, 0,021mg, 0,013mg e 0,009 mg, sendo verificadas diferenças estatisticamente significativas entre todos eles ($P < 0,05$). Não se

observou durante as três infestações nenhuma correlação significativa entre o peso das ninfas ingurgitadas e o período de alimentação destas ($p < 0,05$).

3.3 EFEITO DAS INFESTAÇÕES SUCESSIVAS POR FÊMEAS E MACHOS DE *A. cajennense*:

As infestações sucessivas não afetaram negativamente a taxa média de recuperação das teleóginas alimentadas nos coelhos do grupo GA durante a segunda infestação. Ao contrário, os carrapatos foram significativamente mais eficientes em se alimentarem. Os valores médios reportados foram de 33,33%, 56,67% e 31,67%, respectivamente, na primeira, segunda e terceira infestações. Observou-se diferença significativa entre os valores dos ixodídeos obtidos durante a segunda infestação em relação aos provenientes dos animais primoinfestados ou submetidos ao terceiro desafio parasitário.

Apesar da taxa de parasitismo dos carrapatos recuperados não ter sido prejudicada pela exposição sucessiva dos animais a esses parasitos, a partir da segunda infestação, os parâmetros parasitários foram significativamente reduzidos. O peso médio corporal das fêmeas ingurgitadas decaiu de 783,75 mg na primeira infestação para 454,09 mg na exposição subsequente, sendo significativa esta diferença ($p < 0,05$). Na terceira infestação esse valor aumentou para 529,16 mg, mantendo-se diferente do observado nos carrapatos obtidos durante o primeiro desafio e semelhante ao reportado para aqueles provenientes da segunda infestação.

Conforme demonstrado na Tabela 1, o período médio de parasitismo das teleóginas recuperadas na segunda infestação aumentou significativamente ($p < 0,05$) em relação ao primeiro desafio parasitário, porém a partir da terceira

infestação, essa variável apresentou valor semelhante ao inicialmente observado.

Com exceção da eclodibilidade média das larvas, todas as variáveis reprodutivas observadas foram significativamente reduzidas na segunda infestação, contudo, apresentaram tendência crescente a partir da exposição subsequente, podendo-se observar valores semelhantes aos obtidos no primeiro desafio.

4 DISCUSSÃO:

De acordo com Wikel (1996), o grau de resistência dos hospedeiros às infestações pelos ixodídeos pode ser medido pelos seguintes indicadores: diminuição do peso corporal após o ingurgitamento com conseqüente redução de postura, aumento do período de alimentação, queda na eclodibilidade das larvas e nas taxas de ecdise. A reação inflamatória no sítio de fixação dos parasitos é responsável por parte desta resistência. Mecanismos mais sofisticados atuam sobre os ixodídeos, de forma sistêmica ou local, dificultando a aquisição de alimento por esses parasitos e conseqüentemente, impedindo a transmissão de patógenos (Valenzuela, 2004; Nuttal e Labuda, 2004).

O parasitismo por carrapatos induz uma complexa variedade de respostas imunes, envolvendo células apresentadoras de antígenos, linfócitos T, linfócitos B, anticorpos, citocinas, sistema de complemento, basófilos, mastócitos, eosinófilo e um número de moléculas bioativas (Brossard e Wikel, 2004). Indubitavelmente, a ativação desses mecanismos efetores da resposta imune em um hospedeiro resistente é consideravelmente mais rápida e vigorosa (Wikel et al., 1994).

Os resultados do presente experimento demonstram que a resistência ao parasitismo por larvas de *A. cajennense* nos

coelhos do grupo GL, tornou-se significativa apenas a partir da terceira infestação. Neste período o número de larvas ingurgitadas foi significativamente reduzido pelo desenvolvimento de resposta imune nos animais desafiados. Sanavria e Prata (1997) observaram que após infestações artificiais com aproximadamente 123.840 larvas de *A. cajennense*, as orelhas dos coelhos apresentaram-se com petéquias, edema e pequenos abscessos nos pontos de fixação das larvas, sendo estas lesões significativamente mais severas após as reinfestações. No presente experimento foi utilizado um número menor de parasitos (aproximadamente 740 larvas) e apenas a partir da terceira infestação pôde-se observar algum tipo de lesão macroscópica no pavilhão auditivo dos animais (dados não apresentados) que coincidiu com o início do desenvolvimento de resistência imune. De acordo com Kempt et al. (1976), larvas de *Boophilus microplus* que tentam se alimentar em animais resistentes, tornam-se estressadas e frequentemente morrem pelo desgaste sofrido devido a necessidade de se fixarem várias vezes no mesmo hospedeiro.

O dia modal de queda de larvas ingurgitadas dos coelhos do grupo GL aumentou consideravelmente a partir da terceira infestação. Essa alteração parece ser resultante da resposta imune produzida pelo hospedeiro no local de fixação, que irá interferir diretamente no processo de alimentação dos ixodídeos (Craig et al., 1996). Anafilatoxinas produzidas pela ativação do sistema de complemento e a histamina proveniente da degranulação de leucócitos no sítio de fixação dos carrapatos, são responsáveis pelo aumento da permeabilidade do endotélio vascular e conseqüentemente, pela formação de edema local e exudação sérica (Andreotti et al., 2002). Nessas condições a fixação e o ingurgitamento dos carrapatos ficam seriamente comprometidos. É possível que

no presente experimento, a redução da taxa de recuperação das larvas e o aumento do período de parasitismo dessas na terceira infestação tenham ocorrido como consequência direta desses fenômenos. A principal desvantagem para os ixodídeos é que permanecendo fixados por um tempo maior, eles se tornam mais vulneráveis ao ataque de predadores e ao comportamento de auto-limpeza dos seus hospedeiros.

Verificou-se que o desenvolvimento de resistência imune não comprometeu a taxa média de ecdise das larvas recuperadas nos animais do grupo GL. De acordo com Balashov (1972), o peso mínimo requerido para que os ixodídeos semi-alimentados realizem ecdise, corresponde a 20% do seu peso normal após o ingurgitamento. Neste sentido, provavelmente quase todas as larvas que foram recuperadas no presente experimento, conseguiram se alimentar a ponto de atingir esse peso mínimo e realizaram a ecdise para o estágio seguinte, mesmo em condições adversas de parasitismo.

O parasitismo por ninfas de *A. cajennense* nos coelhos do grupo GN determinou um padrão de resistência semelhante ao observado nos animais sensibilizados pelas larvas. Contudo, o nível da resposta avaliada foi intermediário entre o observado no parasitismo por larvas e por adultos.

Apesar da taxa média de recuperação de ninfas ingurgitadas ter se mantido alta e inalterada nas duas primeiras infestações, o peso médio dessas ninfas foi significativamente reduzido a partir do segundo desafio parasitário e manteve tendência decrescente até a última infestação. Além disso, os dias modais de queda de ninfas ingurgitadas aumentaram com as sucessivas exposições dos coelhos aos parasitos. Considerando que as duas primeiras infestações foram realizadas em pavilhões auriculares alternados, a resposta inflamatória que pode ter ocorrido durante

a segunda infestação parece não ter alterado a capacidade das ninfas de se alimentarem, todavia, comprometeu o pleno ingurgitamento desses parasitos. O efeito primário da rejeição imune é inundar o sítio de fixação dos ixodídeos com um fluido aquoso, dificultando a ingestão de sangue por esses parasitos (Sonenshine, 1993). Carrapatos que se ingurgitam em animais resistentes, frequentemente apresentam coloração mais clara, sugerindo uma menor quantidade de hemoglobina no fluido ingerido.

Durante a segunda exposição do grupo GA, um número maior de fêmeas de *A. cajennense* conseguiu se fixar e se alimentar em relação às demais infestações, sugerindo a influência de possíveis fatores exógenos sobre essa variável. Contudo o peso médio corporal das teleóginas recuperadas foi o menor observado entre os três desafios parasitários, juntamente com o peso médio da postura e com os índices médios de eficiência na produção de ovos (IEPO) e de larvas (IEPL). Jittapalapong et al. (2000) também observaram em cães repetidamente infestados por *Rhipicephalus sanguineus*, uma maior taxa média de recuperação dos parasitos durante a terceira infestação aliada a um decréscimo significativo dos parâmetros parasitários e reprodutivos nesses ixodídeos recuperados. Isso demonstra que a resposta imune do hospedeiro não atua apenas no sítio de alimentação e que alguns mecanismos de defesa produzidos por esses podem atravessar o epitélio intestinal dos ixodídeos e atingir órgãos e tecidos internos, prejudicando suas funções biológicas e reprodutivas. Segundo Wang e Nuttal (1994), a parede intestinal dos ixodídeos é permeável às imunoglobulinas produzidas pelos hospedeiros e uma vez que esses anticorpos atingem a hemolinfa, podem se ligar a antígenos associados aos órgãos internos desses parasitos. Além disso, a resposta imune do hospedeiro parece afetar a fisiologia dos ixodídeos de

forma permanente que persiste mesmo após a sua queda (Sahibi et al., 1997). Vaz Jr. et al. (1996) observaram que anticorpos funcionais estão presentes na hemolinfa de teleóginas de *B. microplus* por pelo menos 48 horas após o final do período parasitário e que a quantidade de imunoglobulinas encontrada correspondeu a 2% do conteúdo presente no soro dos animais infestados.

A taxa média de recuperação das teleóginas obtidas na terceira infestação do presente experimento foi significativamente inferior à reportada durante o segundo desafio parasitário, mas foi semelhante à obtida durante a primoinfestação. É provável que a resposta inflamatória que se desenvolveu no sítio de fixação dos parasitos durante o período experimental, seja o principal mecanismo responsável por essa queda no número de teleóginas recuperadas. Todavia, observou-se uma tendência crescente nos demais parâmetros observados a partir da terceira infestação, com exceção do período médio de parasitismo e da eclodibilidade média das larvas (tabela 1, figura 1). Já está bem demonstrado na literatura que os ixodídeos produzem substâncias capazes de modular a resposta imune dos hospedeiros (Nuttal e Labuda, 2004). De acordo com Wikel (1996), essa modulação pode atuar sobre os diferentes mecanismos da resposta imune, inibindo a ativação do sistema de complemento, a produção de anticorpos durante a resposta humoral, a proliferação de linfócitos T e a produção de citocinas. Postula-se que esses mecanismos de modulação sejam mais evidentes nos hospedeiros naturais com os quais os ixodídeos convivem por mais tempo (Sonenshine, 1993; Mulenga, 2000). No entanto, a pressão imposta pelos desafios parasitários consecutivos nos coelhos do presente experimento, fato que não ocorre em suas condições naturais de infestação por *A. cajennense*, pode ter precipitado o desenvolvimento da modulação da resposta imune.

Além disso, evidências indicam que a sobrevivência dos patógenos transmitidos pelos ixodídeos depende da habilidade desses em explorar as propriedades farmacológicas e imunossupressoras das moléculas de saliva dos parasitos (Nuttal & Labuda, 2004). Ferreira e Silva (1998) verificaram que moléculas presentes na saliva de fêmeas adultas pré-alimentadas de *R. sanguineus* favoreceram a transmissão de *Trypanosoma cruzi* por esses ixodídeos. Esses achados reforçam a importância do *A. cajennense* em atuar na transmissão da *R. rickettsii* para os reservatórios silvestres e em contribuir para manutenção da Febre Maculosa nos ambientes endêmicos. Uma vez que as teleóginas de *A. cajennense* foram eficientes em modular a resposta imune dos coelhos a partir da terceira infestação, provavelmente elas também estariam aptas em potencializar a transmissão e o estabelecimento de *R. rickettsii* nos reservatórios silvestres que porventura sofram infestação por essa espécie de ixodídeo.

Os dados obtidos no presente experimento sugerem que a infestação dos animais pelo estágio adulto produziu uma resposta imune mais rápida e intensa que pôde ser verificada a partir da segunda exposição. Por outro lado, os coelhos mostraram-se mais sensíveis ao parasitismo pelos estágios imaturos. Apesar do número médio de larvas recuperadas ter sido significativamente reduzido a partir da terceira infestação, nenhum efeito foi verificado na taxa de ecdise desses parasitos recuperados. Com relação às ninfas, a resistência imune dos coelhos afetou o ganho de peso dos parasitos a partir da segunda exposição, contudo seu impacto sobre a taxa de recuperação só pôde ser detectado no terceiro desafio parasitário dos animais.

Lopes et al. (1998) verificaram uma menor especificidade parasitária dos estágios larval e ninfal de *A. cajennense* em relação

aos parasitos adultos. Essa especificidade parasitária relaciona-se, entre outras coisas, com a ocorrência de resistência imune durante as infestações. Uma vez que as fêmeas adultas se alimentam por mais tempos e que liberam uma maior quantidade de saliva no sítio de alimentação durante o parasitismo (Balashov, 1972), é provável que sejam mais eficientes em induzir ou modular uma resposta imune nos hospedeiro quando comparadas aos demais estádios. Whelen e Wikel (1993) verificaram que ninfas de *Dermacentor andersoni*, não foram tão capazes quanto os adultos, em estimular a produção de anticorpos específicos nos animais parasitados. Segundo Brossard e Wikel (2004), variações intra-espécie e inter-espécie na composição da saliva dos ixodídeos podem ser esperadas, determinando diferentes estímulos antigênicos nos animais parasitados.

Além disso, as fêmeas de *A. cajennense* inserem profundamente as peças bucais nos sítios de alimentação, alcançando áreas mais vascularizadas e conseqüentemente, causam um dano maior aos tecidos dos hospedeiros. Contudo, a magnitude da resposta inflamatória parece depender mais da quantidade de substâncias antigênicas que são introduzidas do que do tamanho e inserção do aparelho bucal dos ixodídeos (Latif et al., 1990).

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- ANDREOTTI, R.A., GOMES, A., MALAVAZI-PIZA, K.C., TANAKA, A.S. Controle do carrapato por meio de vacina – situação atual e perspectivas. EMBRAPA, v. 134, Campo Grande, 2002.
- ARAGÃO, H.B. Ixodidas brasileiros e de alguns países limítrofes. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.31, n.4, p.759-843, 1936.
- BALASHOV, Y.S. Bloodsucking ticks (Ixodoidea) Vectors of diseases of man and animals. *Miscellaneous Publications of the Entomological Society of America*, v.8, n.5, p.337, 1972.
- BECHARA, G.H., SZABÓ, M.P.J., MUKAI, L.S., ROSA, P.C.S. Immunization of dogs, hamsters and guinea pigs against *Rhipicephalus sanguineus* using crude unfed adult tick extracts. *Veterinary Parasitology*, v.52, p.79-90, 1994.
- BORGES, L.M.F., OLIVEIRA, P.R., LISBOA, C.L.M., RIBEIRO, M.F.B. Horse resistance to natural infestations of *Anocentor nitens* and *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology*, v.104, p.265-273, 2002.
- BROSSARD, M., WIKEL, S.K., Tick immunobiology. *Parasitology*, v.129, p. s161-s176, 2004.
- CASTAGNOLLI, K.C., FIGUEIREDO, L.B., SANTANA, D., CASTRO, M.B., ROMANO, M.A., SZABÓ, M.P.J. Acquired resistance of horses to *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) ticks. *Veterinary Parasitology*, v.117, p.271-283, 2003.
- CRAIG, L.E., NORRIS, D.E., SANDERS, M.L., GLASS, G.E., SCHWARTZ, B.S. Acquired resistance and antibody response of raccons (*Procyon lotor*) to sequential feedings of *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology*, v.63, p.291-301, 1996.
- CUPP, E.W. Biology of tick. In: *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, v.21, n.1, p. 1-26, 1991.
- FERREIRA, B.R., SILVA, J.S. Saliva of *Rhipicephalus sanguineus* tick impairs T cell proliferation and INF- γ induced macrophage microbicidal activity.

- Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.64, p.279-293, 1998.
- GUIMARÃES, J.H., TUCCI, C.E., BARROS-BATTESTI, D.M. Ectoparasitos de importância veterinária. Editoras Plêiades/FAPESP, São Paulo, SP., 218p., 2001.
- JITTAPALAPONG, S., STICH, R., GORDON, J.C., WITTUM, T.E., BARRIGA, O.O. Performance of female *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) fed on dogs exposed to multiple infestations or immunizations with tick salivary gland or midgut tissues. *Journal of Medical Entomology*, v.37, n.4, p. 601-611, 2000.
- KEMP, D.H., KOUDSTAAL, D., ROBERTS, J.A., KEER, J.D. *Boophilus microplus*: the effect of host resistance on larval attachments and growth. *Parasitology*, v.73, p. 123-136, 1976.
- LABRUNA, M.B., LEITE, R.C. Reproductive aspects of *Haemaphysalis leporispalustris*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.92, n.3, p.373-376, 1997.
- LABRUNA, M.B., KASAI, N., FERREIRA, F., FACCINI, J.L.H., GENNARI, S.M. Seasonal dynamics of ticks (Acari: Ixodidae) on horses in the state of São Paulo, Brazil. *Veterinary Parasitology*, v.105, p. 65-77, 2002.
- LATIF, A.A., MAINE, J.N., DHADIALLA, T.S., NOKOE, S. Histological reactions to bites of *Amblyomma variagatum* and *Rhipicephalus appendiculatus* (Acari: Ixodidae) fed simultaneously on naive or sensitized rabbits. *Journal of Medical Entomology*, v.27, n.3, p.316-323, 1990.
- LOPES C. M. L., LEITE R. C., LABRUNA, M. B., OLIVEIRA, P. R., BORGES L. M. F., RODRÍGUEZ, B. Z., CARVALHO H. A., FREITAS C. M. V., VIEIRA JÚNIOR C. R. Host specificity of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) with comments on the drop-off rhythm. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 93, n.3, p.347-351, 1998.
- McSWAIN, J.L., ESSENBERG, R.C., SAUER, J.R. Absence of acquired resistance to nymphal *Ixodes ricinus* ticks in Balb/c mice developing cutaneous reactions. *The Journal of Parasitology*, v.68, p.100, 1982.
- MULENGA, A., SUGIMOTO, C., ONUMA, M. Issues in tick vaccine development: identification and characterization of potential candidate vaccine antigens. *Microbes and Infections*, v.2, p.1353-1361, 2000.
- NEITZ, W.O., BOUGHTON, F., WALTERS, H.S. Laboratory investigations on the life-cycle of the karoo paralysis tick (*Ixodes rubicundus* Neumann, 1904). *Onderstepoort Journal Veterinary Research*, v.38, n.3, p.215-224, 1971.
- NUTTAL, P.A., LABUDA, M. Tick-host interactions: saliva-activated transmission. *Parasitology*, v.129, p.s177-s189, 2004.
- PINTER, A., LABRUNA, M.B., FACCINI, J.L.H. The sex ratio of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) with notes on the male feeding period in the laboratory. *Veterinary Parasitology*, v.105, p.79-88, 2002.
- SAHIBI, H., RHALEM, A., BARRIGA, O.O. Comparative immunizing power of infectious salivary extracts, and intestinal extracts of *Hyalomma marginatum marginatum* in cattle. *Veterinary Parasitology*, v.68, p.359-366, 1997.
- SANAVRIA A., PRATA, M.C.A. Alterações determinadas por larvas e ninfas de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) em orelhas de

coelhos. *Revista brasileira de Medicina Veterinária*, v.19, n.3, p.119-122, 1997.

SONESHINE, D.E., *Biology of Tick*. Vol.2. Oxford University Press, New York. 410 p., 1993.

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

VALENZUELA, J.G. Exploring tick saliva: from biochemistry to 'sialomes' and functional genomics. *Parasitology*, v.129, p.s83-s94, 2004.

VAZ Jr., I.S., MARTINEZ, R.H.M., OLIVEIRA, A., HECK, A., LOGULLO, C., GONZALES, J.C., DEWES, H., MASUDA, A. Functional bovine immunoglobulins in *Boophilus microplus* hemolymph. *Veterinary Parasitology*, v.62, p.155-160, 1996.

WANG, H., NUTTAL, P.A. Excretion of host immunoglobulin in tick saliva and detection of IgG-binding proteins in tick haemolymph and salivary glands. *Parasitology*, v.109, p.525-530, 1994.

WHELEN A.C., WIKEL, S.K. Acquired resistance of guinea pigs to *Dermacentor andersoni* mediated by humoral factors. *Journal of Parasitology*, v.79, n.6, p.908-912, 1993.

WIKEL, S.K., RAMACHANDRA, R.N., BERGMAN, D. Tick-induced modulation of the host immune response. *International Journal for Parasitology*, v.24, n.1, p.59-66, 1994.

WIKEL, S.K. *The Immunology of Host-Ectoparasitic Arthropod relationships*. 1 ed. Wallingford: Cab International, 1996. 331 p.

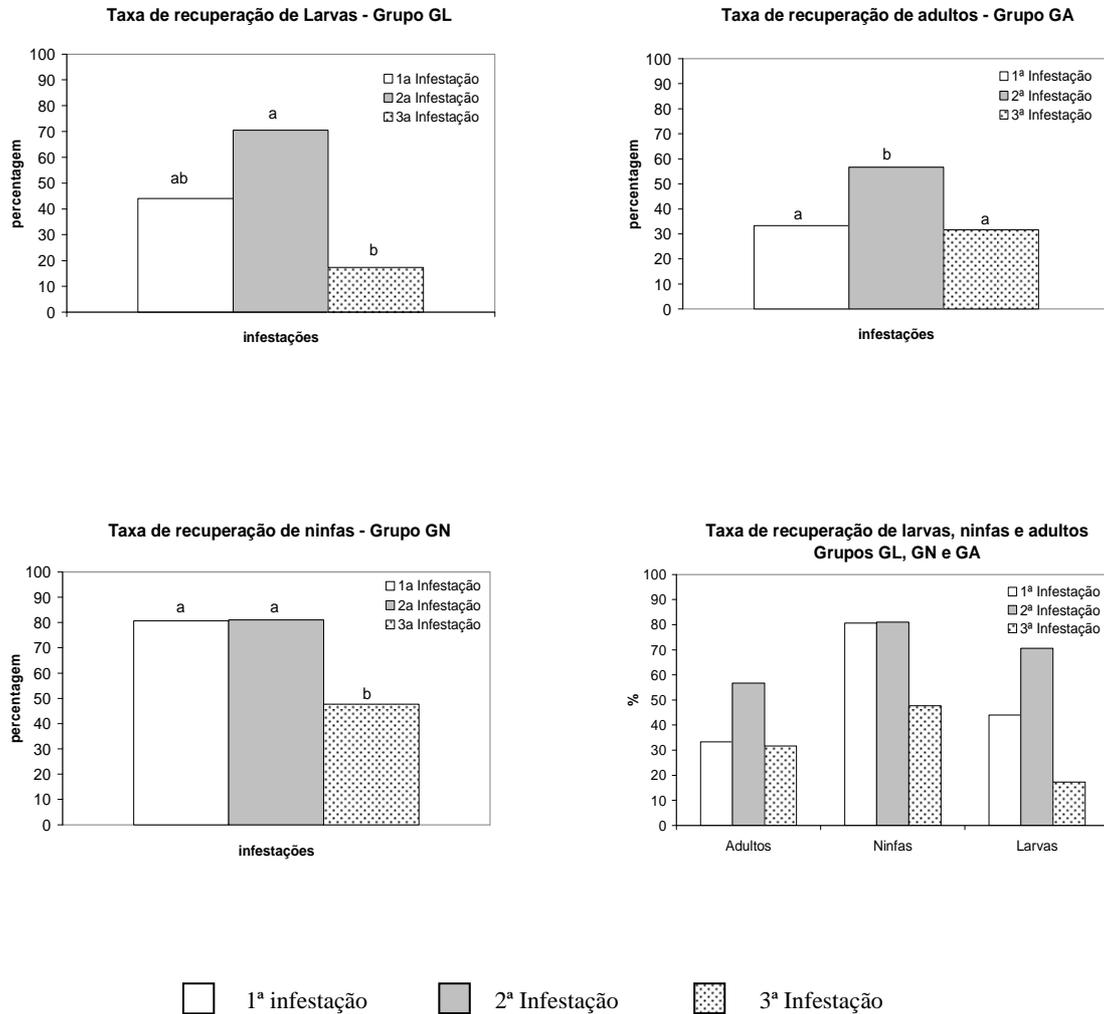


Figura 1-Taxa de recuperação de larvas, ninfas e adultos de *A. cajennense* nas sucessivas infestações do Grupo Larva (GL), Grupo Ninfa (GN) e Grupo Adulto (GA). ^{a,b}Letras diferentes em cima das barras indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

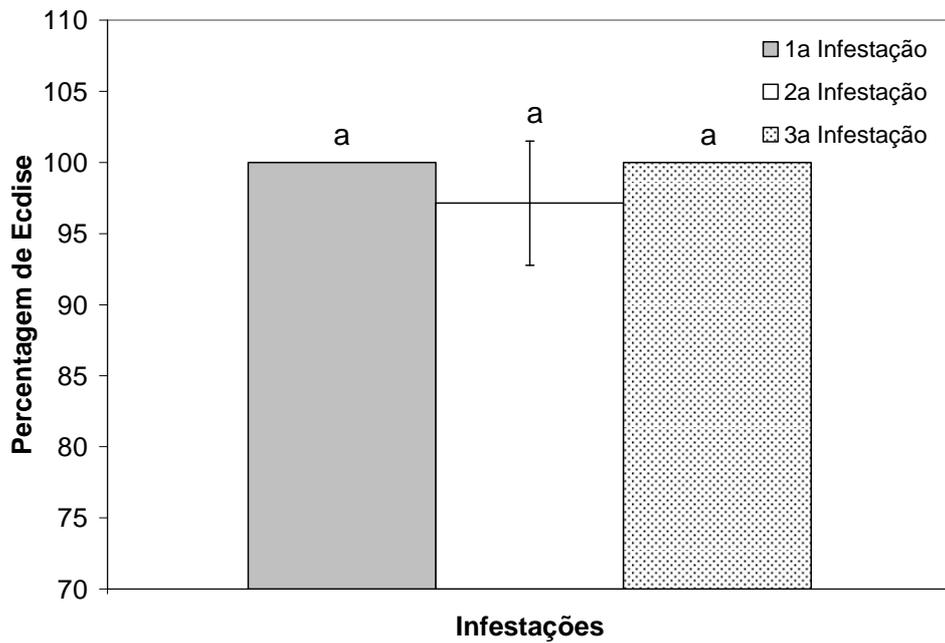


Figura 2-Taxa de ecdise das larvas provenientes das sucessivas infestações dos coelhos do Grupo Larva (GL). ^{a,b} Letras diferentes em cima das barras indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

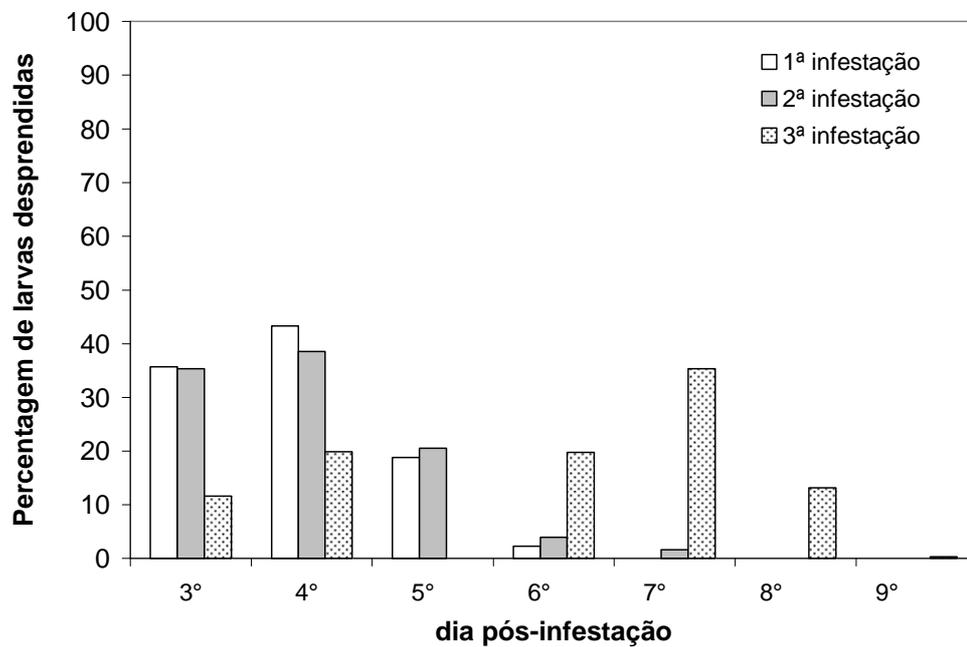


Figura 3-Percentual de queda das larvas ingurgitadas nos coelhos do Grupo Larva, por dia de parasitismo.

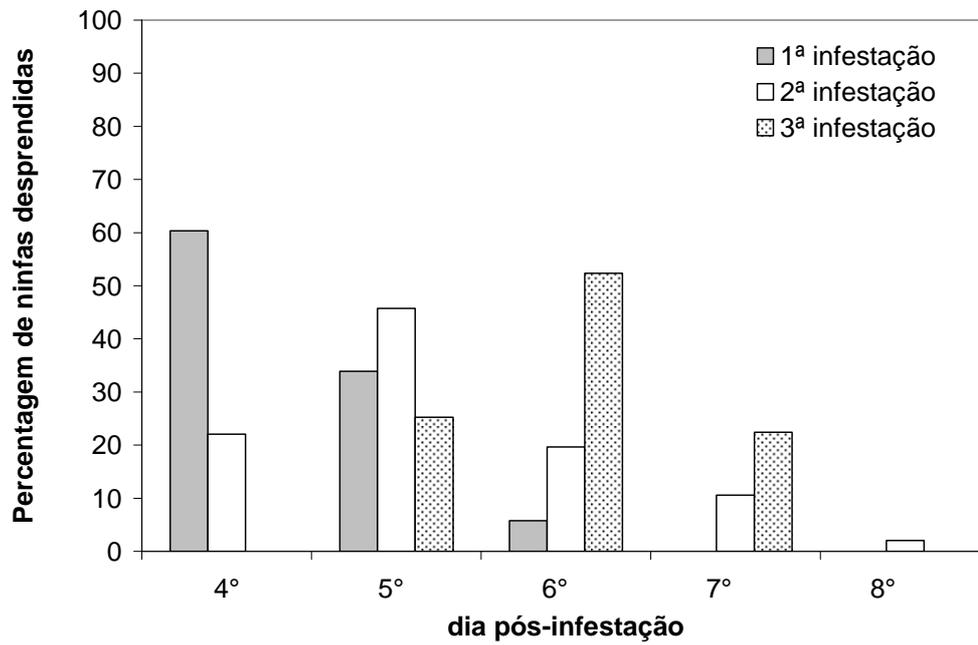


Figura 4-Percentual de queda de ninfas ingurgitadas de coelhos do Grupo Ninfa, por dia de parasitismo.

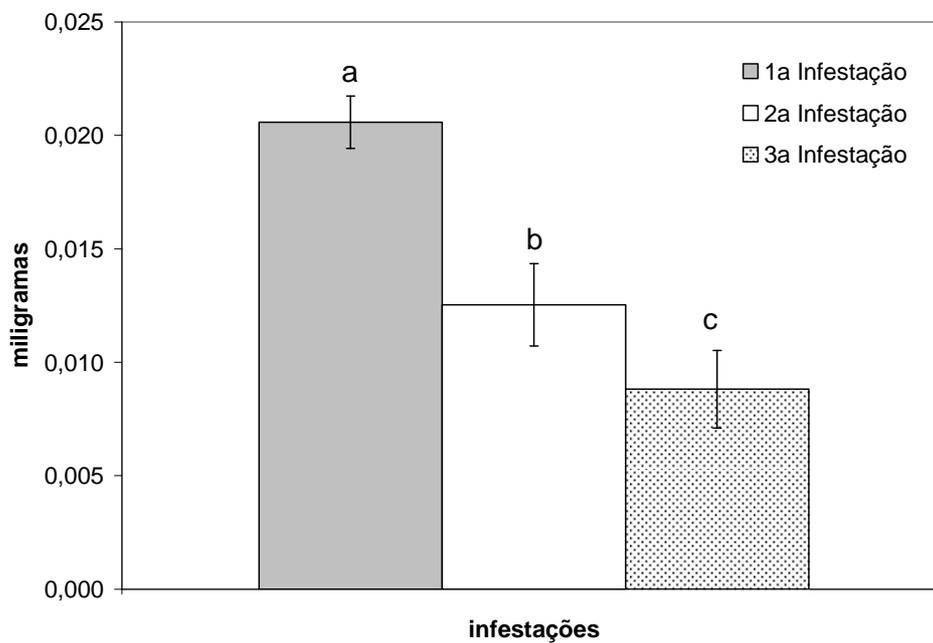


Figura 5-Peso médio das ninfas ingurgitadas em coelhos do Grupo Ninfa, nas infestações sucessivas.
^{a,b} Letras diferentes em cima das barras indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

Tabela 1 - Parâmetros parasitários e reprodutivos (média ± desvio padrão) de teleóginas de *A. cajennense* coletadas nos coelhos, nas sucessivas infestações.

Parâmetros	Infestações		
	Primeira	Segunda	Terceira
Taxa de Recuperação (%)	33,33 ^a	56,67 ^b	31,67 ^a
Parasitários			
Peso Corporal (mg)	783,75 ± 172,25 ^a	454,09 ± 180,68 ^b	529,16 ± 211,20 ^b
Período de Parasitismo (dias)	10,65 ± 0,88 ^a	11,14 ± 1,06 ^b	10,53 ± 1,07 ^a
Reprodutivos			
Peso da Postura (mg)	385,45 ± 108,86 ^a	191,71 ± 121,16 ^b	244,16 ± 132,15 ^b
Eclodibilidade (%)	93,50 ± 11,52 ^a	87,86 ± 11,00 ^{ab}	81,32 ± 22,41 ^b
IEPO [†]	48,62 ± 7,58 ^a	39,33 ± 13,54 ^b	42,45 ± 13,81 ^{ab}
IEPL [‡]	45,93 ± 10,03 ^a	35,23 ± 14,02 ^b	36,47 ± 14,91 ^b

[†] Índice de Eficiência de Produção de ovos: peso postura (mg) / peso corporal (mg) x 100

[‡] Índice de Eficiência de Produção de Larvas: peso postura (mg) / peso corporal (mg) x eclodibilidade (%)

^{a,b} Letras diferentes em uma mesma linha indicam diferença significativa (p<0,05) – Teste T de Student

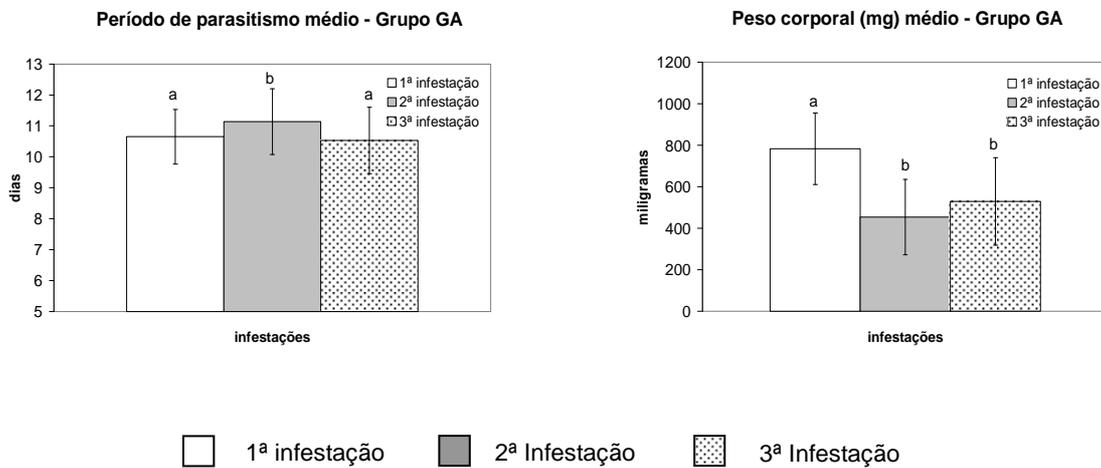


Figura 6-Parâmetros parasitários médios (peso corporal e período de parasitismo) reportados nas teleóginas obtidas dos coelhos do Grupo Adulto (GA), durante as sucessivas infestações. ^{a,b} Letras diferentes em cima das barras indicam diferença estatística significativa (p<0,05).

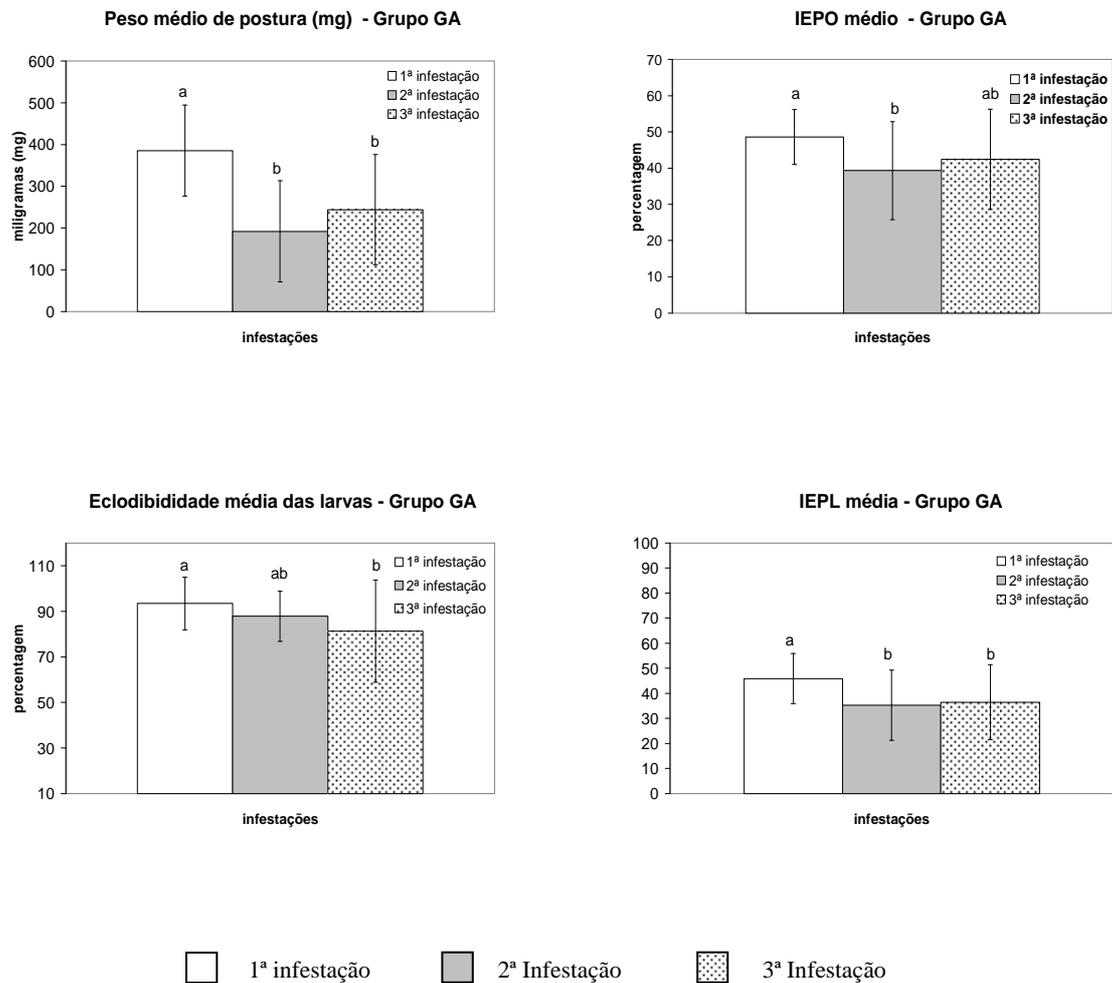


Figura 7-Parâmetros reprodutivos médios (peso postura, eclodibilidade das larvas, IEPO e IEPL) reportados nos carrapatos obtidos dos coelhos do Grupo Adulto (GA), durante as sucessivas infestações. ^{a,b}Letras diferentes em cima das barras indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

CAPÍTULO 2:

RESPOSTA HUMORAL E INFLAMATÓRIA E SUA CONSEQUÊNCIA NO DESENVOLVIMENTO DE RESISTÊNCIA EM *Oryctolagus cuniculus* IMUNIZADOS COM EXTRATOS DERIVADOS DE GLÂNDULA SALIVAR (EGS) DE FÊMEAS DE *Amblyomma cajennense* (FABRICIUS, 1787) (ACARI: IXODIDAE).

RESUMO:

O presente experimento foi realizado com o objetivo de avaliar as respostas humoral e inflamatória de coelhos imunizados com Extrato de Glândula Salivar (EGS) de *Amblyomma cajennense* (Grupo GGS) e de coelhos artificialmente infestados sem imunização prévia (Grupos GIA e GC) e suas conseqüências no desenvolvimento de resistência imune contra essa espécie de ixodídeo. Os coelhos submetidos a três infestações consecutivas por adultos de *A. cajennense* tornaram-se resistentes a partir da segunda infestação. Os parâmetros parasitários foram os mais influenciados pela resposta imune dos animais reinfestados. A imunização de coelhos com extrato derivado de glândula salivar (EGS) de *A. cajennense* não alterou o desempenho parasitários dos ixodídeos alimentados nos animais vacinados, mas apresentou efeito deletério em alguns parâmetros reprodutivos que foram avaliados. Resultados obtidos no exame sorológico demonstraram que os valores de absorbância de IgG anti-EGS nos animais infestados três vezes consecutivas, aumentaram a partir da segunda infestação (dia +14) e atingiram valores máximos no 42º, quando começaram a decair ou se mantiveram estáveis. Os valores de absorbância de IgG anti-EGS nos animais imunizados foram consideravelmente mais altos, aumentando a partir do 7º dia após a primeira imunização. Os animais do Grupo Controle (GC) apresentaram baixos valores de absorbâncias de IgG anti-EGS durante quase todo o experimento, aumentando discretamente a partir de uma semana após o desafio parasitário (35º dia). Não foi observada nenhuma correlação entre grau de resistência e nível de anticorpo anti-EGS. A análise histopatológica revelou a ocorrência de um infiltrado inflamatório no sítio de fixação dos ixodídeos que variou em intensidade nos diferentes grupos e entre os indivíduos do mesmo grupo

experimental. As células predominantes nas lesões foram eosinófilos, neutrófilos e mononucleares. Observou-se a ocorrência de fibroplasia, necrose e miosite em alguns indivíduos. As lesões observadas nos coelhos dos grupos GIA e GGS foram mais pronunciadas do que as observadas nos indivíduos pertencentes ao grupo GC. A taxa de parasitismo não se correlacionou com o grau de lesão na pele em nenhum dos grupos experimentais avaliados.

Palavras-chave: *Amblyomma cajennense*, resistência imune, vacina, glândula salivar, antígeno exposto.

1 INTRODUÇÃO:

O fenômeno de resistência a carrapatos tem sido reportado em muitas espécies de animais, incluindo cobaias (Trager, 1939; Brown et al., 1982), coelhos (Brown, 1988; Latif et al., 1991), camundongos (Ushio et al., 1995), bovinos (Opdebeeck e Daly, 1990; Rechav et al., 1992; Sahibi et al., 1997), ovinos (Barriga et al., 1991), cães (Inokuma et al., 1997; Jittapalpong, 2000), eqüinos (Borges et al., 2002) e animais silvestres (Craig, 1996). Essa resistência se expressa pela redução do número de carrapatos ingurgitados, queda no peso corporal e na produção de ovos, diminuição na eclodibilidade de larvas e na taxa de ecdise para ninfas e adulto (Brossard e Wikel, 2004). Indiscutivelmente, a resposta inflamatória celular no sítio de alimentação é o principal mecanismo responsável pela rejeição aos ixodídeos, uma vez que compromete a fixação e conseqüentemente a alimentação desses parasitos. Secundariamente, a resposta imune parece causar danos diretos aos tecidos e processos fisiológicos dos carrapatos.

Carrapatos da família Ixodidae normalmente se alimentam por um longo período de tempo, durante o qual inoculam quantidades consideráveis de secreções

salivares no sítio de alimentação. Esses produtos representam os principais alvos de resposta do sistema imune dos hospedeiros, funcionando como verdadeiros antígenos. Hospedeiros que se tornam resistentes após múltiplas infestações, freqüentemente desenvolvem resposta imune contra as substâncias encontradas na saliva dos carrapatos (Wikel e Bergman, 1997; Jittapalpong et al., 2000).

As secreções salivares desempenham um papel fundamental no processo de alimentação e conseqüentemente na sobrevivência desses parasitos (Ribeiro, 1989; Valenzuela, 2004). Na saliva dos carrapatos estão presentes moléculas vasoativas e com propriedades anticoagulantes que garantem o fluxo contínuo de sangue para dentro de sua cavidade oral (Mulenga et al., 2002). As glândulas salivares ainda são responsáveis pela secreção do cone de cimento que viabiliza a fixação do parasito, pela eliminação do excesso de água e sais provenientes da dieta, pela manutenção do equilíbrio hídrico nos estádios não parasitários e pela produção de substâncias que auxiliam o macho durante a cópula (Sonenshine, 1991). Além de estarem envolvidos no estabelecimento e regulação da alimentação dos ixodídeos, os componentes salivares são igualmente importantes em modular a resposta imune do hospedeiro e conseqüentemente, facilitarem a transmissão de patógenos por esses ectoparasitos (Ribeiro, 1989; Mulenga et al., 2000; Valenzuela, 2004; Nuttal e Labuda, 2004).

Considerando que os hospedeiros desenvolvem resposta imune contra os produtos que os ixodídeos secretam durante a alimentação, diversos autores já demonstraram a ocorrência de anticorpos no soro que se ligam especificamente aos tecidos e moléculas derivadas das glândulas salivares dos ixodídeos (Labarthe, 1985; Whelen e Wikel, 1993; Craig et al., 1996;

Sanders et al., 1998). Todavia, o desenvolvimento de resistência nos hospedeiros nem sempre coincide com o aumento no título de anticorpos específicos (Barriga et al., 1991; Rechav et al., 1992; Galbe e Oliver, 1992; Szabó, 2003), indicando a importância de outros mecanismos de imunidade em adição à resposta humoral.

Mastócitos, eosinófilos e basófilos têm sido observados em exames histológicos, circundando o hipostômio de carrapatos nos sítios de fixação de hospedeiros resistentes (Latif et al., 1990; Latif et al., 1991; Craig et al., 1996). Nos bovinos, enzimas liberadas a partir da degranulação dos eosinófilos, participam da formação de vesículas epidérmicas que são freqüentemente envolvidas na rejeição dos parasitos pelos hospedeiros resistentes. Contudo, camundongos falham em adquirir resistência contra ninfas de *Ixodes ricinus*, apesar da presença de basófilos, mastócitos degranulados e eosinófilo nos sítios de fixação desses parasitos (McSwain et al., 1982). O tipo celular que predomina na resposta imune celular contra ixodídeos, parece variar em função da espécie de parasitos e hospedeiros envolvidos (Brown, 1988).

Uma vez que a imunidade protetora dos animais contra infestação por carrapatos constitui-se de mecanismos efetores da resposta humoral e mediada por células (Rechav et al., 1992), um imunógeno eficiente deve estimular ambos os tipos de resposta, interferindo com os eventos relacionados à alimentação dos carrapatos bem como com a transmissão de patógenos (Mulenga et al., 2000). Desta forma, a utilização de extratos salivares de carrapatos para produção de vacinas representa uma alternativa de controle imunológico promissora. Tais extratos além de impedirem a fixação dos ixodídeos são igualmente eficientes em coibir a transmissão de patógenos por esses

parasitos (Sahibi et al., 1997). Imunização com extrato de glândula salivar pode induzir resistência aos ixodídeos que se assemelha à proteção imune alcançada após sucessivas infestações (Jittapalapong et al., 2000).

Amblyomma cajennense, é um parasito importante no Brasil devido a sua elevada prevalência, vasta área de distribuição e, aos prejuízos por ele causados, tanto na saúde pública como na saúde animal. Apesar disso, o controle deste parasito é feito na maioria das vezes de forma empírica, baseado na aplicação de produtos químicos nos animais parasitados. Considerando as atuais restrições e dificuldades em se utilizar métodos químicos no combate de ectoparasitas (Lobato, 2004), o controle imunológico através do emprego de vacinas apresenta-se como uma alternativa promissora. Para tanto, faz-se necessário o conhecimento dos principais aspectos envolvidos na resposta imunológica, responsável pela resistência dos hospedeiros a esta espécie de ixodídeo.

Este experimento foi realizado com os objetivos de: (I) avaliar as respostas humoral e inflamatória de *Oryctolagus cuniculus* imunizados com Extrato de Glândula Salivar (EGS) de *A. cajennense* e a consequência destas respostas no desenvolvimento de resistência imune contra essa espécie de ixodídeo; (II) avaliar as respostas humoral e inflamatória de *Oryctolagus cuniculus* submetidos a repetidas infestações por adultos de *A. cajennense* e a consequência destas respostas no desenvolvimento de resistência imune contra essa espécie de ixodídeo; (III) correlacionar o grau de resposta humoral e inflamaória dos coelhos imunizados e infestados com o nível de resistência desses animais.

2 MATERIAL E MÉTODOS:

2.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO DO EXPERIMENTO:

O experimento foi realizado no período de Março de 2004 a Julho de 2005, na Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais e no Laboratório de Imunologia da Fundação Ezequiel Dias (FUNED). Foram utilizadas as instalações do Hospital Veterinário e do Laboratório de Histopatologia do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária e o Infectório e o laboratório de Endo-ectoparasitoses do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva.

Antes da realização do experimento o projeto piloto (protocolo nº 045/04) foi submetido ao Comitê de Ética em Experimentação animal, tendo sido aprovada e autorizada a sua realização.

2.2 ANIMAIS UTILIZADOS NO EXPERIMENTO:

Foram utilizados 18 coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) fêmeas da raça Nova Zelândia com aproximadamente 2,0 Kg de peso e que nunca tiveram contato prévio com carrapatos. Esses animais eram provenientes de uma criação comercial localizada na Fazenda Experimental Professor Hélio Barbosa no município de Igarapé, Minas Gerais.

Os coelhos foram mantidos em gaiolas individuais recebendo água e ração comercial a vontade. Essas gaiolas foram suspensas a um metro de altura para impedir o contato dos animais com os dejetos e permitir a limpeza diária do local.

2.3 OBTENÇÃO DOS CARRAPATOS:

Durante os meses de março a outubro de 2004, 18 equinos naturalmente infestados foram raspados na cabeça, cernelha e tábua do pescoço em intervalos quinzenais, utilizando-se raspadeira manual conforme técnica descrita por Oliveira (1998). Os

exemplares ingurgitados que se desprenderam do corpo dos animais, foram coletados, colocados em placas de Petri e acondicionados em estufa bioclimatizada (27° C e 80% UR), sendo observados diariamente até completada a ecdise.

Foram utilizados no presente experimento apenas adultos de *A. cajennense* com idade média de 30 dias. Algumas fêmeas foram alimentadas em coelhos por cinco dias, quando então foram removidas do corpo desses animais para a extração das glândulas salivares.

2.4 PREPARAÇÃO DO EXTRATO DE GLÂNDULA SALIVAR (EGS):

Para a produção do extrato de glândula salivar foi utilizado um total de 1000 fêmeas pré-alimentadas. O período de alimentação de cinco dias foi determinado levando em consideração que as glândulas salivares dos ixodídeos aumentam o seu tamanho e conteúdo protéico à medida que esses parasitos se alimentam e ao final do período de parasitismo, tais glândulas começam a se degenerar (McSwain et al., 1982).

Utilizou-se a metodologia descrita por Brown et al. (1984), para a obtenção das glândulas salivares dos ixodídeos. As fêmeas de *A. cajennense* semi-ingurgitadas foram acomodadas em uma placa de Petri e dissecadas sob microscópio estereoscópio. A superfície dorsal dos ixodídeos foi removida do corpo através do corte da superfície lateral com bisturi número 11. Os órgãos expostos foram imersos em PBS (0,7 mM NH₂PO₄, 4 mM K₂HPO₄, 0,15 M NaCl) para facilitar a observação e evitar dessecação do material coletado. Foram utilizadas glândulas salivares de 980 fêmeas semi-ingurgitadas que após a remoção completa foram acondicionadas em PBS (pH 7,4) e estocadas a -4°C.

Para a produção do extrato, as glândulas coletadas foram homogeneizadas e sonicadas a 40MHz por seis ciclos de 10 segundos com intervalo de um minuto em gelo, conforme modificação da técnica descrita por Jittapalapong et al. (2000). O material obtido foi centrifugado a 15.000 rpm durante 15 minutos, sendo o sobrenadante coletado e estocado a -4°C. A dosagem protéica do extrato de glândula salivar produzido foi feita de acordo com método descrito por Lowry et al. (1951)

2.5 DELINEAMENTO:

Os 18 coelhos foram divididos em três grupos homogêneos composto por seis animais que foram denominados Grupo Extrato de Glândula Salivar (EGS), Grupo Infestação Artificial (GIA) e Grupo Controle (GC).

O grupo GGS foi composto por animais imunizados com o extrato obtido das glândulas salivares (EGS) de *A. cajennense* e desafiados após 15 dias por uma infestação artificial com adultos desta espécie de ixodídeo. Os animais do grupo GIA não receberam nenhuma imunização prévia, contudo, foram submetidos a três infestações consecutivas por adultos de *A. cajennense*, durante o período experimental. Nos coelhos do grupo GC nenhum procedimento experimental foi realizado inicialmente, contudo, esses animais foram submetidos a uma infestação concomitante ao primeiro desafio parasitário do grupo GGS e à terceira infestação do grupo GIA.

Foram procedidas coletas de sangue em intervalos semanais que se iniciou no dia anterior a primeira imunização (GGS) ou infestação (GIA) dos animais. No último dia do experimento, todos os animais foram sacrificados e fragmentos de pele nos sítios de fixação dos ixodídeos foram coletados e encaminhados para exame histopatológico (figura 1).

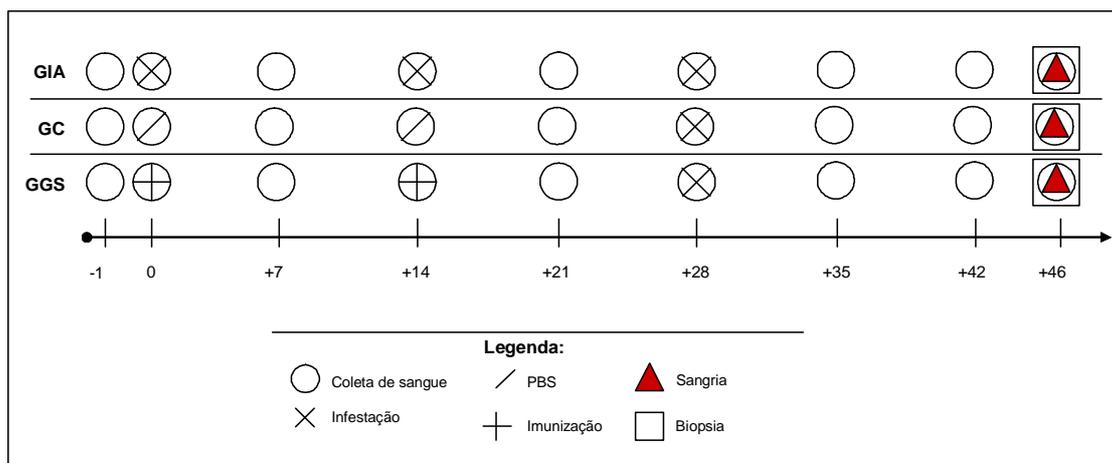


Figura 1-Esquema de infestação, imunização e coleta de material dos animais pertencentes aos grupos GIA, GC e GGS.

2.5.1 Imunização dos animais:

Os animais pertencentes ao grupo GGS receberam no dia zero a partir do início do experimento, 280µg de EGS diluído em PBS e emulsionado em adjuvante incompleto de Freund, perfazendo um volume final de 0,2 mL de inóculo por animal. O imunógeno foi aplicado no flanco direito do corpo do animal e no dia 14, uma nova aplicação foi realizada utilizando-se a mesma dose de antígeno e mesma metodologia de imunização (Brown et al., 1984 e Sahibi et. Al, 1997).

No momento da primeira imunização e reforço, os coelhos pertencentes aos grupos GIA e GC receberam uma dose de 0,2 mL de PBS correspondente ao volume de imunógeno aplicado nos coelhos do grupo GGS.

2.5.2 Infestação artificial dos animais:

Nos animais pertencentes ao grupo GIA foram realizadas três infestações consecutivas em intervalos quinzenais, nos dias 0, 14 e 28 a partir do início do experimento.

Os animais tiveram a região lombo-sacra tricotomizada e uma câmara de alimentação

de formato retangular (7 x 8 cm) foi fixada à pele do local segundo Pinter et al. (2002) modificada, utilizando-se adesivo colante da marca Brascoplast (Castagnoli et al., 2003). Um total de dez fêmeas e sete machos foi inoculado por animal em cada infestação, no interior da câmara de alimentação. Para coibir a retirada da câmara pelos animais foi utilizado um colar de plástico rígido, com a circunferência interna ajustável à largura do pescoço dos coelhos e com circunferência externa de aproximadamente o dobro da interna, seguindo metodologia descrita por Labruna e Leite (1997).

A partir de duas semanas após a segunda imunização (28° dia), os coelhos pertencentes aos grupos experimentais GGS e GC foram infestados com adultos virgens e não alimentados de *A. cajenense*, utilizando-se a mesma metodologia empregada no grupo GIA. Desta forma, as três infestações dos coelhos do grupo GIA coincidiram, respectivamente, com a imunização, o booster e a primeira infestação dos animais pertencentes aos grupos GGS e GC. A tabela 1 demonstra os esquemas de infestação e imunização dos diferentes grupos experimentais.

Tabela 1. Esquema de inoculação e infestação dos animais pertencentes ao Grupo Glândula Salivar (GGS), Grupo Infestação Artificial (GIA) e Grupo Controle (GC).

GRUPO	DIA 0	DIA 14	DIA 28
GGS	1ª Imunização	Booster	1ª Infestação
GIA	1ª Infestação	2ª Infestação	3ª Infestação
GC	-----	-----	1ª Infestação

Após a inoculação nos hospedeiros, os carrapatos foram examinados diariamente por inspeção visual do interior das câmaras de alimentação. Durante o período de parasitismo foi registrado o período de alimentação dos ixodídeos que se fixaram e o número de fêmeas que se ingurgitaram em cada animal, conforme Sahibi et al. (1997). Após 3 dias da infestação, os carrapatos que não se fixaram foram retirados das câmaras de alimentação e considerados como rejeitados pelo hospedeiro. As fêmeas ingurgitadas que se desprenderam foram encaminhadas ao laboratório onde foram pesadas individualmente, colocadas em placas de Petri e acondicionadas em estufa bioclimatizada do tipo B.O.D. a 27°C e umidade relativa superior a 80%.

Durante o período de postura e eclodibilidade dos ovos, as teleóginas recuperadas foram avaliadas diariamente e as massas de ovos produzidas foram individualmente pesadas, colocadas em seringas plásticas esterilizadas e acondicionadas na mesma estufa B.O.D. Os seguintes parâmetros parasitários foram avaliados: período de parasitismo, peso corporal e o índice de eficiência na alimentação (IEAL), que é calculado dividindo-se o peso total após o ingurgitamento pelo período total de parasitismo (Barriga et al., 1991). Esse índice permite a comparação entre infestações de quão eficiente o parasito foi em obter o alimento.

Entre os parâmetros reprodutivos registrados, incluem-se o peso da massa de ovos e eclodibilidade das larvas. Além

desses, o índice de eficiência na produção de ovos (IEPO)³ e o índice de eficiência na produção de larvas (IEPL)⁴ foram calculados de acordo com a metodologia descrita por Bechara et al. (1994).

2.5.3 Coleta de soro:

Para o acompanhamento da cinética da resposta humoral contra o EGS, amostras de sangue foram coletadas dos coelhos pertencentes a todos os grupos, mediante a punção venosa do pavilhão auditivo. As coletas foram feitas nos dias -1, 7, 14, 21, 28, 35, 42 e 46. Após a coagulação do sangue coletado, o soro foi separado e estocado a -70°C até sua utilização.

2.5.4 Coleta de Material para Histopatologia:

No 46º dia de experimento todos os animais foram sacrificados por concussão cerebral e foram coletados fragmentos de pele dos sítios de fixação dos carrapatos. Retiraram-se em média dois fragmentos por animal, priorizando as áreas de maior lesão aparente. O material coletado de cada coelho foi individualmente acondicionado em frasco contendo solução de formaldeído a 10% e enviado ao laboratório de Patologia Veterinária (DCCV – EV/UFMG) para a confecção das lâminas.

³ IEPO = peso postura / peso corporal da fêmea ingurgitada x 100

⁴ IEPL = peso postura / peso corporal da fêmea ingurgitada x eclodibilidade larvas

2.6 ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO INDIRETO (ELISA):

Empregou-se como antígeno o extrato derivado da glândula salivar (EGS) que foi utilizado na imunização dos coelhos do grupo GGS. Os soros coletados de todos os animais dos grupos GGS, GIA e GC foram avaliados para a detecção de anticorpo específico anti-EGS.

Microplacas de poliestireno (Maxisorp™, Nunc, Danmark) foram sensibilizadas com 100µL/poço de EGS na concentração de 1ng/µL, diluído em tampão carbonato/bicarbonato (Sigma, USA) 0,05M pH 9,6 e incubadas durante a noite a 4°C. Em seguida, as placas foram lavadas por duas vezes com solução de lavagem (Salina + 0,05% de Tween 20) e foram bloqueadas por adição de 100µl/well de solução de bloqueio – 0,01M PBS pH 7,4 + 3% de Soro-Albumina Bovina (BSA) a 37°C por uma hora. As placas foram novamente lavadas como previamente descrito.

Os soros testados foram diluídos em PBST 0,05% (1:64.000) e em seguida adicionados à microplaca (100µL/poço) que foi novamente incubada a 37°C por uma hora. As placas foram lavadas como previamente descrito por seis vezes e 100µL/poço do conjugado (IgG Anti-coelho conjugada com peroxidase, Sigma, USA) diluído a 1:40.000 em tampão de incubação (0,1M PBS + 0,1% de Tween 20). Incubação a 37° por uma hora.

Após a lavagem da placa por seis vezes conforme descrito anteriormente, adicionou-se 100µL/poço do substrato dicloridrato de ortofenilenodiamina (OPD – Sigma, USA) em tampão citrato (0,15M pH 5,0) e peróxido de hidrogênio. As microplacas foram novamente incubadas a 37° por uma hora. A reação foi interrompida pela adição de 50µl/poço da solução de 0,37 mM de ácido sulfúrico

(Vetec, Brasil) com realização imediata da leitura de absorbância em comprimento de onda de 492nm em um leitor de ELISA (Labsystems, Multiskan, Unisciense, Brasil).

2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA:

Em todos os testes realizados empregou-se um nível de significância de $p < 0,05$. As taxas de recuperação de cada infestação dentro de cada grupo foram comparadas pelo teste estatístico do qui-quadrado, utilizando-se um nível de significância de 95%. Os demais parâmetros parasitários foram submetidos à análise de variância e as médias entre infestações dentro do grupo GIA, GGS e GC foram confrontadas utilizando-se o teste T de Student.

Realizou-se análise de correlação entre os valores médios de absorbância de IgG anti-EGS e a taxa média de recuperação de carrapatos nos animais dos diferentes grupos.

A análise estatística do grau de lesão das amostras enviadas para análise histopatológica foi realizada através do teste estatístico não paramétrico de Kruskal-Wallis. As ordenações médias obtidas nos diferentes grupos foram comparadas através do teste T de Student. Realizou-se análise de correlação entre o grau de lesão no exame histopatológico e a taxa média de recuperação de carrapatos nos animais dos diferentes grupos.

3 RESULTADOS:

3.1 DESEMPENHO DAS FÊMEAS DE *A. cajennense* RECUPERADAS NAS SUCESSIVAS INFESTAÇÕES DO GRUPO GIA:

Conforme demonstrado nas tabelas 2 e 3 e nas figuras 2 e 3, nos carrapatos alimentados no grupo GIA, tanto os parâmetros parasitários como reprodutivos

foram significativamente alterados a partir da segunda infestação.

A taxa de recuperação por infestação caiu significativamente de 38,33% na primeira infestação para 21,67 ($\chi^2 = 3,97$; $p \leq 0,05$) e 15,00% ($\chi^2 = 8,35$; $p \leq 0,05$) na segunda e terceira infestação, respectivamente.

Em relação aos parâmetros parasitários, todas as variáveis avaliadas foram significativamente diferentes entre a primeira infestação em relação às subseqüentes ($p < 0,05$), com exceção do período de parasitismo que se manteve inalterado. Contudo, nenhuma diferença significativa foi observada entre a segunda e terceira infestação, para os parâmetros reportados. O peso médio corporal das teleóginas ingurgitadas reduziu em 26,78 e 28,82%, respectivamente, na segunda e terceira infestação. O IEAL também apresentou um decréscimo significativo na segunda infestação e se manteve estável na infestação subseqüente.

Os parâmetros reprodutivos foram menos influenciados pelas sucessivas infestações. Com exceção do peso médio de postura, todas as variáveis observadas foram significativamente reduzidas na segunda infestação, contudo, na infestação subseqüente, apresentaram valores semelhantes aos observados na primo-infestação.

3.2 DESEMPENHO DAS FÊMEAS DE *A. cajennense* RECUPERADAS DOS COELHOS IMUNIZADOS COM EGS:

Os parâmetros parasitários e reprodutivos das teleóginas provenientes dos animais dos grupos GGS e GC, bem como daquelas recuperadas na terceira infestação do grupo GIA, estão demonstrados na tabela 3 e nas figuras 4 e 5.

Com exceção do período de parasitismo que foi semelhante, todas as variáveis

parasitárias foram significativamente menores nos carrapatos oriundos dos coelhos que foram submetidos a três infestações consecutivas (Grupo GIA).

A imunização com glândula salivar não afetou nenhum dos parâmetros parasitários avaliados. Nenhuma diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) foi observada entre a taxa de recuperação, o período médio de parasitismo, o peso médio corporal e o índice médio de eficiência alimentar (IEAL) dos exemplares obtidos dos coelhos imunizados em relação àqueles provenientes dos animais do grupo controle.

Contudo, observou-se um decréscimo significativo na eficiência reprodutiva dos carrapatos oriundos dos coelhos imunizados com o EGS. O peso médio da postura e eclodibilidade média das larvas desses ixodídeos foram significativamente semelhantes aos observados nos exemplares provenientes da terceira infestação do grupo GIA e inferiores aos reportados para os carrapatos alimentados nos coelhos primoinfestados (GC).

Os índices reprodutivos médios, IEPO e IEPL, foram os mais afetados pela imunização dos animais no grupo GGS. Tais índices foram significativamente inferiores (IEPO, $p < 0,05$ e IEPL, $p < 0,10$) aos observados nos carrapatos provenientes do grupo controle e semelhantes aos reportados para as teleóginas alimentadas nos animais resistentes (Grupo GIA).

3.3 ANÁLISE SOROLÓGICA:

A cinética da produção de anticorpos nos animais pertencentes aos grupos GIA, GC e GGS está demonstrada nas figuras 5, 6, 7 e 8. Antes do início do experimento todos os animais avaliados, apresentavam baixos níveis de anticorpos anti-EGS de *A. cajennense*.

Nos coelhos do grupo GIA os valores de absorbância de IgG anti-EGS aumentaram a partir da segunda infestação (dia 14) e apresentaram uma ligeira queda após a terceira infestação (dia 28). Os valores máximos foram alcançados no dia 42. A partir de então, começaram a decair ou se mantiveram estáveis, com exceção do animal 1E no qual o pico de produção anticorpos anti-EGS ocorreu no 46º dia de observação. Não foi observada nenhuma correlação entre o número total de carrapatos recuperados nos animais por infestação e a produção de imunoglobulinas anti-EGS ($r = 0,140$).

Os animais do grupo GC apresentaram baixos valores de absorbâncias de IgG anti-EGS durante quase todo o experimento, aumentando discretamente a partir de uma semana após o desafio parasitário (dia 35). Os coelhos 2A e 2D foram os que apresentaram maior produção de anticorpos que se manteve em ascensão até o dia 46. A produção de anticorpos anti-EGS no animal 2E, oscilou durante do o período experimental. Observou-se a ocorrência de variações individuais na resposta humoral dos coelhos avaliados, que não se correlacionou com ou nível de infestação desses animais ($r = -0,585$).

Os valores de absorbância de IgG anti-EGS nos animais imunizados foram os mais altos entre os três grupo experimentais. A partir do 7º dia de experimento o nível de anticorpo no soro desses animais aumentou consideravelmente até o momento do desafio parasitário (28º dia), seguindo de uma discreta queda e retornando à tendência crescente a partir do 35º dia. A dinâmica da resposta variou entre os diferentes indivíduos e não foi observada nenhuma correlação entre o número total de carrapatos recuperados e nível de anticorpo anti-EGS.

3.4 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA:

Os resultados obtidos nos exames histopatológico são mostrados nas tabelas 4, 5 e 6.

De maneira geral a lesão se caracterizou por um infiltrado inflamatório no sítio de fixação dos ixodídeos na pele dos animais que variou em intensidade nos diferentes grupos e algumas vezes, entre os indivíduos do mesmo grupo experimental. Em todos os coelhos analisados a lesão inflamatória se estendeu para a derme adjacente e verificou-se sistematicamente a ocorrência de ulceração na epiderme que coincidiu com o local de inserção do aparelho bucal dos ixodídeos. As células predominantes nas lesões foram eosinófilos, neutrófilos e mononucleares. Observou-se uma marcada presença de macrófagos epitelióides que normalmente circundavam áreas de necrose celular, lesão característica de inflamação granulomatosa. Com exceção do animal 1C do grupo GIA e dos animais 2C, 2D e 2E do grupo GC, todos os demais coelhos apresentavam áreas de necrose celular na epiderme e derme subjacentes ao infiltrado inflamatório. Em alguns indivíduos, observou-se miosite caracterizada pelo acúmulo de eosinófilos na camada muscular abaixo da lesão.

Uma característica comum a todos os fragmentos analisados foi a presença de áreas de fibroplasia, devido à proliferação de tecido conjuntivo fibroso, confirmando a cronicidade do processo inflamatório.

As lesões observadas nos coelhos dos grupos GIA e GGS foram mais pronunciadas do que as reportadas nos indivíduos pertencentes ao grupo controle (GC). Desta forma, observou-se uma diferença estatisticamente significativa entre o grau de lesão inflamatória nos fragmentos de pele obtidos dos indivíduos pertencentes aos grupos GIA e GGS, em relação aos provenientes dos coelhos do grupo GC ($p < 0,05$). Todavia nenhuma diferença significativa foi reportada entre as

lesões observadas dos coelhos dos grupos GIA e GGS. A taxa de recuperação média não se correlacionou com o grau de lesão na pele em nenhum dos grupos experimentais avaliados (GIA, $r= 0,4907$; CG, $r= 0,7348$ e GGS, $r= -0,6696$).

4 DISCUSSÃO:

4.1 DESEMPENHO DAS FÊMEAS DE *A. cajennense* RECUPERADAS NAS SUCESSIVAS INFESTAÇÕES DO GRUPO GIA:

Animais de laboratório têm sido rotineiramente utilizados para avaliar o desenvolvimento de resistência adquirida contra carrapatos e a eficácia de imunógenos empregados no controle desses parasitos (Trager, 1939; Brown et al., 1984; Rechav et al., 1992; Bechara, 1994; Whelen e Wikel, 1993; Sanders, 1998; Szabó et al., 2003). A relação parasito-hospedeiro de cobaias e outros animais de laboratório infestados com os carrapatos caracteriza-se normalmente pela ocorrência de uma resposta imune mais intensa do que a observada nos hospedeiros naturais (Ribeiro, 1989). Contudo, os resultados obtidos no laboratório podem ser utilizados para o conhecimento dos mecanismos de resposta imune dos hospedeiros naturais e para o desenvolvimento de estratégias de controle imunológico nesses animais (Wikel, 1996).

A maioria dos trabalhos aponta que os parâmetros parasitários são os mais afetados em ixodídeos que se alimentam em animais resistentes, incluindo a taxa de recuperação, peso corporal após o ingurgitamento e período de parasitismo (Rechav et al., 1992; Bechara et al., 1992; Craig et al., 1996). Jittapalpong et al. (2000) verificaram que fêmeas ingurgitadas de *R. sanguineus* recuperadas de cães sucessivamente infestados, apresentaram uma queda significativa de todos os parâmetros parasitários, contudo nenhum

efeito foi verificado sobre a performance reprodutiva dos parasitos. Entretanto, coelhos parasitados por *A. americanum* apresentaram um alto grau de imunidade às infestações subseqüentes que resultou em um decréscimo significativo no desempenho parasitário e reprodutivo dos carrapatos. (Brown, 1988). Desta forma, a maneira pela qual a resposta imune do animal parasitado afeta os ixodídeos irá depender da espécie de parasito, da espécie de hospedeiro e do grau de associação entre elas.

No presente experimento, a infestação artificial dos coelhos do grupo GIA afetou, a partir da segunda infestação, os parâmetros parasitários e reprodutivos dos ixodídeos recuperados nesses animais. Segundo Craig et al. (1996), queda na taxa de recuperação de carrapatos alimentados em hospedeiros resistentes pode ser devido à resposta imune inflamatória no local de parasitismo ou ao aumento do comportamento de auto-limpeza, em consequência dessa resposta. Ambos os mecanismos coíbem a alimentação dos parasitos e previnem o completo ingurgitamento. Supondo que as condições de infestação dos coelhos do grupo GIA no presente experimento, limitavam os seus acessos à câmara de alimentação dos parasitos, é provável que o principal mecanismo responsável pelo decréscimo da taxa média de recuperação e dos demais parâmetros parasitários dos carrapatos tenha sido a resposta imune local.

Além disso, os dados deste trabalho demonstram que a partir da segunda infestação, a resistência imune dos animais infestados afetou de alguma forma a viabilidades dos ovos produzidos pelos carrapatos recuperados, fato comprovado pela queda significativa da taxa média de eclodibilidade das larvas. Durante a infestação natural ou artificial, componentes séricos do hospedeiro incluindo as imunoglobulinas e proteínas

do sistema de complemento, podem atravessar a parede intestinal dos carrapatos em direção à hemolinfa e se ligarem aos tecidos internos dos parasitos, comprometendo sua função (Ackerman et al., 1981, Whelen e Wikel, 1993, Vaughan et al., 2002). Desta forma sugere-se que os mecanismos de defesa dos hospedeiros incriminados pela rejeição dos ixodídeos, podem ser igualmente responsáveis por eventos internos que comprometem o desempenho reprodutivo dos parasitos e a qualidade dos ovos produzidos por esses.

Neste trabalho observou-se que na terceira infestação, os parâmetros afetados pela resposta imune do hospedeiro, voltaram a apresentar tendência crescente ou de se manterem estáveis. Esse fenômeno pode ser explicado pela habilidade dos carrapatos de manipularem o sistema imune dos hospedeiros (Wikel, 1996). A literatura comprova que enquanto se alimentam, os carrapatos produzem em sua saliva algumas substâncias que modulam a resistência imune dos animais parasitados (Mulenga et al., 2002, Valenzuela, 2004). Esse fenômeno é mais evidente nos hospedeiros naturais, sendo um dos elementos responsáveis pela adaptação na relação parasito/hospedeiro (Barriga et al., 1991; Rechav et al., 1992; Brossard e Wikel, 2004). Além disso, essa modulação também afeta a capacidade dos hospedeiros reagirem contra os patógenos transmitidos pelos carrapatos. Esse fato deve ser considerado quando discutimos a importância do *A. cajennense* na epidemiologia da Febre Maculosa, como elo de ligação entre os reservatórios silvestres e os animais domésticos e o homem. É possível que o desenvolvimento de uma vacina baseada nessas moléculas imuno-moduladoras que estão presentes nas salivas dos carrapatos, represente uma das alternativas mais promissoras de controle imunológico desses parasitos e dos microorganismos dos quais eles são vetores.

4.2 DESEMPENHO DAS FÊMEAS DE *A. cajennense* RECUPERADAS DOS COELHOS IMUNIZADOS COM EGS:

De acordo com Sahibi et al. (1997), a utilização de extratos salivares de carrapatos para produção de vacinas representa uma alternativa de controle imunológico promissora. Tais extratos além de impedirem a fixação dos ixodídeos e reduzirem o dano direto causado na pele do hospedeiro, são igualmente eficientes em coibir a transmissão de patógenos por esses parasitos (Mulenga et al, 2000).

A maneira pela qual a resposta humoral produzida contra EGS dos ixodídeos, compromete a alimentação desses parasitos já está bem definida. Durante a infestação de animais, sensíveis ou não, previamente expostos aos ixodídeos, ocorre uma rápida infiltração de neutrófilos na pele do hospedeiro, aumentando gradativamente a presença de eosinófilos, basófilos e mastócitos (Andreotti et al., 2002). Simultaneamente, anticorpos específicos anti-EGS, incluindo os da classe IgE e IgG, irão se ligar aos antígenos salivares no sítio de alimentação. As imunoglobulinas complexadas aos antígenos unem-se aos receptores Fc de mastócitos e basófilos presentes na pele e promovem a degranulação dessas células, resultando na liberação de moléculas bioativas, entre elas a histamina, a serotonina e os derivados do ácido aracdônico (Wikel, 1996; Andreotti, 2002; Brossard e Wikel, 2004). A histamina e serotonina são mediadores da resposta alérgica e inflamatória, responsáveis pelo aumento da permeabilidade vascular e formação de edema local (Mulenga, 2002). Essas manifestações alérgicas e inflamatórias que são produzidas na pele do hospedeiro comprometem a fixação, a ingestão de sangue e a salivação dos carrapatos (Wikel, 1996).

Entretanto, no presente experimento, a resposta imune produzida pela imunização dos animais com EGS, não afetou a alimentação dos ixodídeos recuperados, apesar de ter reduzido significativamente alguns dos parâmetros reprodutivos avaliados (IEPO e IEPL). Esses achados sugerem a ocorrência de algum tipo de lesão interna nos carrapatos alimentados nos animais imunizados e que pode ter comprometido as funções reprodutivas e fisiológicas normais desses parasitos. Uma vez que o epitélio intestinal dos carrapatos é permeável às imunoglobulinas presentes no soro dos hospedeiros (Vaz Jr et al., 1998; Vaughan et al., 2002), os anticorpos anti-EGS presentes na hemocele dos ixodídeos, podem ter se ligado aos antígenos presentes nos órgãos internos dos parasitos (Wang e Nuttall, 1994; Jittapalpong, 2000). Além disso, alguns determinantes antigênicos podem ser compartilhados entre diferentes tecidos e espécies de carrapatos (Wikel, 1996). VanVuuren et al. (1992) verificaram que anticorpos produzidos contra um antígeno de 70 kDa detectado na glândula salivar de *Hyalomma truncatum* reagiram contra epítomos do trato digestivo de adultos de *A. variegatum*. Desta forma, é possível que no presente experimento os anticorpos produzidos pelos coelhos contra o EGS, possam ter atravessado o epitélio intestinal dos carrapatos e se ligado em epítomos semelhantes localizados nos órgão reprodutivos desses parasitos. Tal fato pode explicar porque a imunização com EGS reduziu significativamente os índices médios de produção de ovos (IEPO) e larvas (IEPL) nos carrapatos provenientes dos animais vacinados (Grupo GGS). Contudo, seriam necessários mais estudos e o emprego de técnicas mais avançadas de imunistoquímica, utilizando anticorpos marcados, para se comprovar essa teoria.

Apesar da imunização dos coelhos do grupo GGS ter produzido efeito deletério sobre alguns parâmetros reprodutivos dos ixodídeos recuperados, indiscutivelmente a

imunidade adquirida pelos animais submetidos às sucessivas infestações (grupo GIA) foi mais evidente. Resultados semelhantes foram observados por Bechara et al. (1994) na produção de um EGS para imunização de cobaias contra *R. sanguineus*. Segundo esses autores, resistência adquirida em roedores pela vacinação contra carrapatos, parece ser menos eficiente do que aquela que se manifesta após a infestação natural por esse parasito. É provável que a forma pela qual os antígenos sejam apresentados ao sistema imune dos animais durante a infestação natural, independente da espécie de hospedeiro envolvida, é que irá determinar essa diferença na resposta. Carrapatos da família Ixodidae permanecem fixados por um longo período de tempo na pele dos hospedeiros, durante o qual inoculam uma gama de substâncias potencialmente antigênicas no sítio de alimentação. A quantidade e qualidade das substâncias inoculadas variam consideravelmente no decorrer do período parasitário, sendo significativamente maior nos momentos que antecedem o ingurgitamento total (Wikel, 1996; Brossar e Wikel, 2004). Desta maneira, os hospedeiros infestados entram em contato com todos os potenciais antígenos que são produzidos e inoculados diariamente pelos carrapatos, enquanto que na imunização artificial, apenas as moléculas contidas nas glândulas salivares dos parasitos no momento de sua coleta é que serão processadas pelo sistema imune dos hospedeiros. Possivelmente o processamento laboratorial das glândulas salivares durante a produção do EGS utilizado no presente experimento, pode ter produzido algum efeito deletério nesse material, comprometendo a sua eficácia.

Considerando os resultados obtidos pela imunização dos animais do grupo GGS, próximo passo a ser seguido é a identificação dos antígenos presentes no EGS e que foram responsáveis pela

diminuição dos índices reprodutivos dos ixodídeos recuperados.

4.3 ANÁLISE SOROLÓGICA:

Os resultados obtidos no ELISA demonstraram que o soro coletado dos animais de todos os grupos experimentais (GIA, GC e GGS) antes da imunização ou da infestação parasitária, já continha anticorpos que reagiram com o EGS. Labarthe (1985) verificou que o soro de bovinos imunizados com saliva de *Boophilus microplus*, apresentava reação cruzada contra antígenos derivados de *Stomoxys calcitrans*. É possível que esses artrópodes possam produzir secreções salivares com determinantes antigênicos comuns. Anticorpos produzidos contra ácaros também podem reagir inespecificamente com antígenos derivados de carrapatos (denHollander e Allen, 1985; citado por Craig et al., 1996). As condições de manutenção dos animais dos grupos GIA, GC e GGS durante o período experimental, dificultavam o acesso de carrapatos e outros artrópodes hematófagos às gaiolas em que eles estavam sendo criados. Considerando os hábitos insidiosos desses parasitos é impossível garantir que não houve contato entre eles e os coelhos no decorrer do experimento. Além disso, esses coelhos eram oriundos de um criatório comercial, onde devemos considerar a presença de dípteros hematófagos e ácaros.

Evidências do envolvimento da resposta humoral na aquisição de resistência frente a infestação por ixodídeos foram inicialmente comprovadas por experimentos de transferência passiva de soro hiperimune para animais sensíveis (Trager, 1939). A partir de então vários estudos demonstraram a produção de anticorpos específicos por animais infestados ou imunizados que reagem com antígenos derivados das glândulas salivares e tecidos internos dos carrapatos (Labarthe, 1985; Whelen e

Wikel, 1993; Craig et al., 1996; Sanders et al., 1998). No presente experimento verificou-se um aumento considerável do título dos valores de absorvância de IgG anti-EGS nos animais imunizados (grupo GGS). Da mesma forma, os coelhos do grupo GIA que foram submetidos à infestação natural apresentaram um aumento na produção de anticorpos específicos dentro de sete dias após a primeira exposição. As quedas nos valores de absorvância ao longo do período experimental sugerem que os anticorpos produzidos pelos hospedeiros estavam sendo utilizados para a neutralização dos antígenos inoculados pelos carrapatos no sítio de alimentação.

Estes resultados também indicam que a resposta humoral produzida através da imunização com EGS foi mais forte que a observada apenas pela infestação natural dos animais parasitados (Grupo GIA). Todavia, a resistência alcançada através do parasitismo natural foi mais eficiente em coibir a alimentação e reprodução dos ixodídeos. Não foi verificado nenhum tipo de correlação entre grau de resistência e produção de IgG anti-EGS, nos grupos experimentais avaliados. Alguns animais apresentaram altos valores de absorvância e em contrapartida, altas taxas de parasitismo. Resultados semelhantes foram observados por Barriga et al. (1991); Rechav et al. (1992); Galbe e Oliver (1992) e Szabó et al. (2003). Esses achados reforçam o papel de outros mecanismos de resposta imune, tais como imunidade mediada por células e ativação do sistema de complemento, que atuam em sinergismo com a resposta humoral para a proteção dos hospedeiros contra os carrapatos. Outra possível explicação é a ocorrência do fenômeno de competição entre antígenos irrelevantes e protetores, sendo que esses últimos representam apenas uma pequena fração das substâncias produzidas pelos carrapatos que são apresentadas ao sistema imune do

hospedeiro e induzem a uma resposta efetiva (Barriga et al., 1991).

A resposta imune frente à imunização (grupo GGS) variou consideravelmente entre os diferentes indivíduos. De acordo com Wikel et al. (1994), a habilidade de um animal responder a um dado imunógeno depende de sua capacidade geneticamente definida, de processar este material e apresentá-lo ao linfócito T imunocompetente no contexto do complexo principal de histocompatibilidade (MHC). Desta forma, são esperadas variações na habilidade de animais provenientes de cruzamentos aleatórios e com diferentes composições genéticas, em desenvolverem e expressarem resistência contra o parasitismo por carrapatos e outros agentes infecciosos.

4.4 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA:

Exame histopatológico do sítio de alimentação dos ixodídeos é uma ferramenta útil para se explicar os mecanismos de alimentação dos carrapatos, a extensão dos danos causados nos tecidos dos hospedeiros e a natureza da resposta imune. No presente experimento, na maioria dos fragmentos analisados observou-se ulceração da epiderme no local de inserção do aparelho bucal dos ixodídeos. A lesão quase sempre se estendeu à derme adjacente. Resultados semelhantes foram observados por Latif et al. (1990) no sítio de fixação de fêmeas de *A. variegatum* em coelhos resistentes e sensíveis. Ambos, *A. cajennense* e *A. variegatum* são ixodídeos que possuem o rostro longo e que, portanto, inserem o gnatosoma profundamente na pele de seus hospedeiros alcançando áreas mais profundas e vascularizadas.

A reação cutânea em bovinos e em animais de laboratório caracteriza-se pela infiltração de basófilos, eosinófilos e células mononucleares, no sítio de fixação dos

ixodídeos (Brossard e Wikel, 2004). O tipo celular que predomina na resposta imune celular contra ixodídeos parece variar em função da espécie de parasitos e hospedeiros envolvidos. A predominância de eosinófilos na resposta imune celular de coelhos contra *A. americanum* (Brown, 1988) sugere o papel primário deste tipo celular, na resistência desses hospedeiros contra essa espécie de ixodídeo, fato também observado em bovinos infestados por *B. microplus* (Riek, 1956). Contudo, a resposta celular em cobaias apresentando resistência contra *A. americanum* é do Tipo Hipersensibilidade Basofílica Cutânea (Brown et al., 1984), sendo secundária a importância dos eosinófilos. No presente experimento, constatou-se entre outras células, a presença de eosinófilos no sítio de fixação de *A. cajennense* em todos os coelhos que foram infestados, ressaltando a importância desse tipo celular nessa resposta imune. A técnica de coloração utilizada não permitiu a precisa diferenciação dos demais tipos celulares presentes na lesão sendo, portanto, impossível determinar qual célula apresentou maior prevalência. Além disso, o principal objetivo da análise histopatológica neste trabalho, foi quantificar o grau de lesão dos animais e relacioná-lo ao tipo de tratamento empregado.

No presente experimento, o grau de lesão cutânea dos indivíduos reinfestados (Grupo GIA) e imunizados com EGS (Grupo GIA) foi significativamente superior ao observado no sítio de fixação dos ixodídeos nos coelhos primo-infestados (Grupo GC). Brown (1988) também observou que os sítios de fixação de fêmeas e machos de *A. americanum* na pele de coelhos pré-infestados, apresentavam-se significativamente mais eritematoso e endurecido e continham uma quantidade significativamente maior de células inflamatórias quando comparados aos observados nos animais primo-infestados.

Esses achados reforçam a teoria de que a resposta celular que se desenvolve no local de fixação dos ixodídeos é principalmente um mecanismo da imunidade adaptativa, embora a participação da resposta inflamatória inespecífica, caracterizada pela presença de neutrófilos, não possa ser negligenciada. Durante a primo-infestação, após a penetração da quelícera e hipostomo dos ixodídeos na pele dos hospedeiros, uma resposta inflamatória local se desenvolve na qual os neutrófilos residentes irão participar (Brossard e Wikel, 2004). Esses neutrófilos ativados iniciam a fagocitose dos antígenos salivares presentes no local e liberam uma gama de substâncias com propriedades pró-inflamatórias, atraindo granulócitos e células apresentadoras de antígenos para o sítio inflamatório (Wikel, 1996) que irão dar início a resposta adaptativa.

A semelhança na magnitude da lesão cutânea observada nos coelhos sucessivamente infestados (GIA) em relação àqueles imunizados (GGS), indica que a resposta celular incitada pelo EGS foi análoga a que se desenvolveu em função do parasitismo dos animais (Tabelas 4 e 6). De fato, uma vez que os EGS's dos ixodídeos contem os principais antígenos que são inoculados nos hospedeiros durante a infestação parasitária (Sahibi, 1997) é de se esperar que eles sejam capazes de estimular os mesmos mecanismos de resposta imune observados nos animais infestados. Apesar disso, no presente experimento observou-se uma maior taxa de recuperação dos ixodídeos alimentados nos animais imunizados com EGS em relação àqueles provenientes dos coelhos submetidos a três desafios parasitários. É provável que outros mecanismos envolvidos na lesão cutânea que não foram avaliados ou quantificados neste trabalho, tenham sido responsáveis por essa diferença observada. Além disso, é suposto que se os animais do grupo GGS tivessem sido submetidos a um segundo desafio parasitário, essa resposta celular observada nos animais imunizados do

grupo GGS poderia ter se manifestado com maior intensidade, comprometendo a fixação e alimentação dos parasitos.

Segundo Mulenga et al. (2000), os antígenos naturais ou expostos são considerados entre outras características, pela sua habilidade de induzir reações de hipersensibilidade em hospedeiros sensíveis e de reagir com soro imune anti-carrapato em provas sorológicas. Os resultados do presente experimento indicam que o EGS foi eficiente em induzir a produção de anticorpos específicos, em elicitar uma resposta celular cutânea e em comprometer o desempenho reprodutivo dos ixodídeos alimentados nos animais imunizados, todavia, foi incapaz de prevenir a fixação e a alimentação desses parasitos. A identificação dos determinantes antigênicos realmente protetores presentes no EGS de *A. cajennense*, bem como a determinação de quais elementos da resposta imune foram responsáveis pelo comprometimento do desempenho reprodutivo dos ixodídeos, pode ajudar a elucidar alguns dos fenômenos observados no presente experimento.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- ACKERMAN, S., CLARE, F.B., MCGILL, T.W., SONENHINE, D.E. Passage of host serum components, including antibody, across the digestive tract of *Dermacentor variabilis*, *Journal of Parasitology*, v.67, p.737-740, 1981.
- ANDREOTTI R.A., GOMES, A., MALAVAZI-PIZA, K.C., TANAKA, A.S. Controle do carrapato por meio de vacina – situação atual e perspectivas. EMBRAPA, v. 134, Campo Grande, 2002.
- BARRIGA, O.O., ANDUJAR, F., SAHIBI, H., ANDRZEJEWSKI, W.J. Manifestations of immunity in sheep repeatedly infested with *Amblyomma americanum* ticks.

Journal of Parasitology, v.77, n.5, p.703-709, 1991.

BECHARA, G.H., SZABÓ, M.P.J., MUKAI, L.S., ROSA, P.C.S. Immunization of dogs, hamsters and guinea pigs against *Rhipicephalus sanguineus* using crude unfed adult tick extracts. *Veterinary Parasitology*, v.52, p.79-90, 1994.

BORGES, L.M.F., OLIVEIRA, P.R., LISBOA, C.L.M., RIBEIRO, M.F.B. Horse resistance to natural infestations of *Anocentor nitens* and *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology*, v.104, p.265-273, 2002.

BROSSARD, M., WIKEL, S.K., Tick immunobiology. *Parasitology*, v.129, p. s161-s176, 2004.

BROWN, S.J. Highlights of contemporary research on host immune responses to ticks. *Veterinary Parasitology*, v.28, p.321-334, 1988.

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. *The Journal of Immunology*, v.129, n.2, p.790-796, 1982.

BROWN, S.J., SHAPIRO, S.Z., ASKENASE, P.W. Characterization of tick antigens inducing host immune resistance: I. Immunization of guinea pigs with *Amblyomma americanum*-derived salivary gland extracts and identification of an important salivary gland protein antigen with guinea pig anti-tick antibodies. *The Journal of Immunology*, v.133, n.6, p.3319-3325, 1984.

CASTAGNOLLI, K.C., FIGUEIREDO, L.B., SANTANA, D., CASTRO, M.B., ROMANO, M.A., SZABÓ, M.P.J.

Acquired resistance of horses to *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) ticks. *Veterinary Parasitology*, v.117, p.271-283, 2003.

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

DenHOLLANDER, N., ALLEN, J.R. Dermacentor variabilis: acquired resistance to ticks in BALB/c mice. *Experimental Parasitology*, v.59, p.118-129, 1985.

GALBE, J., OLIVER Jr., J.H., J.R. Immune Response of lizards and rodents to larval *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology*, v.29, n.5, p.774-782, 1992.

INOKUMA, H., TAMURA, K., ONISHI, T. Dog develop resistance to *Rhipicephalus sanguineus*. *Veterinary Parasitology*, v.68, p.295-297, 1997.

JITTAPALAPONG, S., STICH, R., GORDON, J.C., WITTUM, T.E., BARRIGA, O.O. Performance of female *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) fed on dogs exposed to multiple infestations or immunizations with tick salivary gland or midgut tissues. *Journal of Medical Entomology*, v.37, n.4, p. 601-611, 2000.

LABARTHE, N.V. Cross- reaction of tick salivary antigens in the *Boophilus microplus* – cattle system. *Veterinary Parasitology*, v.17, p.259-263, 1984/1985.

LABRUNA, M.B., LEITE, R.C. Reproductive aspects of *Haemaphysalis leporispalustris*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.92, n.3, p.373-376, 1997.

- LATIF, A.A., MAINE, J.N., DHADIALLA, T.S., NOKOE, S. Histological reactions to bites of *Amblyomma variagatum* and *Rhipicephalus appendiculatus* (Acari:Ixodidae) fed simultaneously on naive or sensitized rabbits. *Journal of Medical Entomology*, v.27, n.3, p.316-323, 1990.
- LATIF, A.A., PUNYUA, P.B., CAPSTICK, S., WALKER, A.R., FLETCHER, J.D. Histopathology of attachment sites of *Amblyomma variegatum* and *Rhipicephalus appendiculatus* on zebu cattle of varying resistance to tick. *Veterinary Parasitology*, v.38, p. 205-213, 1991.
- LOBATO, V., RATH, S., REYES, F.G.R. Considerações sobre a presença de ivermectina em alimentos de origem animal. *Revista Brasileira de Toxicologia*, v.17, n.1, p.27-38, 2004.
- LOPES,C.M.L., OLIVEIRA, P.R., HADDAD, J.P.A., PINHEIRO, R.R., FREITAS, C.M.V. PAZ, G.F., LEITE, R.C. Reproductive parameters and conversion efficiency index (CEI) of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) females under field and laboratory conditions. *Revue Médecine Vétérinaire*, v.151, n.10, p. 945-948, 2000.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J. FARR, L.A., RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, v.193, p.256-275, 1951.
- McSWAIN, J.L., ESSENBERG, R.C., SAUER, J.R. Absence of acquired resistance to nymphal *Ixodes ricinus* ticks in Balb/c mice developing cutaneous reactions. *The Journal of Parasitology*, v.68, p.100, 1982.
- MULENGA, A., TSUDA, A., SUGIMOTO, C., ONUMA, M. Blood meal acquisition by ticks; molecular advances and implications for vaccine development. *Japanese Journal Veterinary Research*, v.49, n.4, p.261-272, 2002.
- MULENGA,A., SUGIMOTO,C., ONUMA,M. Issues in tick vaccine development: identification and characterization of potential candidate vaccine antigens. *Microbes and Infections*, v.2, p.1353-1361, 2000.
- NUTTAL, P.A., LABUDA, M. Tick-host interactions: saliva-activated transmission. *Parasitology*, v.129, p.s177-s189, 2004.
- OLIVEIRA, P.R. *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) *Avaliação de técnica para estudo de dinâmica populacional e bioecologia em Pedro Leopoldo, Minas Gerais*. Belo Horizonte: Escola de Veterinária da UFMG. 1998. 110p. (Tese de Doutorado).
- OPDEBEECK, J.P., DALY, K.E. Immune response of infested and vaccinated Hereford cattle to antigens of the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.25, p.99-108, 1990.
- PINTER, A., LABRUNA, M.B., FACCINI, J.L.H. The sex ratio of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) with notes on the male feeding period in the laboratory. *Veterinary Parasitology*, v.105, p.79-88, 2002.
- RECHAV, Y., SPICKETT, A.M., DAUTH, J., TEMBO, S.D., CLARKE, F.C., HELLER-HAUPT, A., TRINDER, P.K.E. Immunization of guinea-pigs and cattle against adult *Rhipicephalus appendiculatus* ticks using semipurified nymphal homogenates and adult gut homogenate. *Immunology*, v.75, p.700-706, 1992.
- RIBEIRO, J.M.C. Role of saliva in tick/host interactions. *Experimental and Applied Acarology*, v.7, p.15-20, 1989.

- RIEK, R.F. Factors influencing the susceptibility of cattle to tick infestations. *The Australian Veterinary Journal*, v.32, p.204-209, 1956.
- SAHIBI, H., RHALEM, A., BARRIGA, O.O. Comparative immunizing power of infections salivary extracts, and intestinal extracts of *Hyalomma marginatum marginatum* in cattle. *Veterinary Parasitology*, v.68, p.359-366, 1997.
- SANDERS, M.L., GLASS, G.E., SCOTT, A.L., SCHWARTZ, B.S. Kinetics and cross-species comparisons of host antibody response to Lone Star Tick and American Dog Ticks (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology*, v.35, n.5, p.849-856, 1998.
- SONENSHINE, D.E., *Biology of Tick*. Vol.1. Oxford University Press, New York. 447 p., 1991.
- SZABÓ, M.P.J., AOKI, V.L., SANCHES, F.P.S., AQUINO, L.P.T.C.T., GARCIA, M.V., MACHADO, R.Z., BECHARA, G.H. Antibody and blood leukocyte response in *Rhipicephalus sanguineus* (Laterille, 1806) tick-infested dogs and guinea pigs. *Veterinary Parasitology*, v.115, p. 49-59, 2003.
- TRAGER, W. Acquired immunity to ticks. *Journal of Parasitology*, v.25, p.57-81, 1939.
- USHIO, H., HIROTA, S., JIPPO, T., HIGUCHI, S., KAWAMOTO, K., KITAMURA, Y., MATSUDA, H. Mechanisms of eosinophilia in mice infested with larval *Haemaphysalis longicornis* ticks. *Immunology*, v.84, p. 469-475, 1995.
- VanVUUREN, A.M.J., CRAUSE, J.C., VERSCHOOR, J.A., SPICKETT, A.M., NEITZ, A.W.H. The identification of a shared immunogen present in the salivary glands and gut of argasid ticks. *Experimental and Applied Acarology*, v.15, p.205-210, 1992.
- VALENZUELA, J.G. Exploring tick saliva: from biochemistry to 'sialomes' and functional genomics. *Parasitology*, v.129, p.s83-s94, 2004.
- VAUGHAN, J.A., SONENSHINE, D.E., AZAD, A.F. Kinetics of ingested host immunoglobulin G in hemolymph and whole body homogenates during nymphal development of *Dermacentor variabilis* and *Ixodes ricinus* ticks (Acari: Ixodidae). *Experimental and Applied Acarology*, v.27, p.329-340, 2002.
- VAZ Jr., I.S., MARTINEZ, R.H.M., OLIVEIRA, A., HECK, A., LOGULLO, C., GONZALES, J.C., DEWES, H., MASUDA, A. Functional bovine immunoglobulins in *Boophilus microplus* hemolymph. *Veterinary Parasitology*, v.62, p.155-160, 1996.
- WANG, H., NUTTAL, P.A. Excretion of host immunoglobulin in tick saliva and detection of IgG-binding proteins in tick haemolymph and salivary glands. *Parasitology*, v.109, p.525-530, 1994.
- WIKEL, S.K. *The Immunology of Host-Ectoparasitic Arthropod relationships*. 1 ed. Wallingford: Cab International, 1996. 331 p.
- WHELEN A.C., WIKEL, S.K. Acquired resistance of guinea pigs to *Dermacentor andersoni* mediated by humoral factors. *Journal of Parasitology*, v.79, n.6, p.908-912, 1993.
- WIKEL, S.K., RAMACHANDRA, R.N., BERGMAN, D. Tick-induced modulation of the host immune response. *International Journal for Parasitology*, v.24, n.1, p.59-66, 1994.

WIKEL, S.K., BERGMAN, D. Tick-host immunology: significant advances and challenging opportunities. *Parasitology Today*, v.13, n.10, p.383-388, 1997.

Tabela 2-Parâmetros parasitários e reprodutivos (média ± desvio padrão) das teleóginas de *A. cajennense* coletadas nos coelhos do grupo GIA, nas sucessivas infestações.

Parâmetros	Infestações		
	Primeira	Segunda	Terceira
Taxa de Recuperação (%)	38,33 ^a	21,67 ^b	15,00 ^b
Parasitários			
Período de Parasitismo (dias)	10,217 ± 1,65 ^a	11,46 ± 2,03 ^a	10,33 ± 1,87 ^a
Peso Corporal (mg)	746,13 ± 176,27 ^a	546,31 ± 243,02 ^b	531,11 ± 176,85 ^b
IEAL [*]	75,70 ± 24,44 ^a	49,54 ± 22,36 ^b	51,95 ± 17,37 ^b
Reprodutivos			
Peso da Postura (mg)	379,17 ± 116,21 ^a	239,62 ± 159,82 ^b	257,78 ± 110,04 ^b
Eclodibilidade (%)	85,87 ± 11,25 ^a	62,08 ± 32,44 ^b	85,56 ± 7,68 ^a
IEPO [†]	50,33 ± 8,95 ^a	42,63 ± 12,25 ^b	46,17 ± 12,31 ^{ab}
IEPL [‡]	43,55 ± 10,70 ^a	29,32 ± 17,57 ^b	39,45 ± 11,22 ^{ab}

* Índice de Eficiência Alimentar: peso corporal (mg) / período de postura (dias)

† Índice de Eficiência de Produção de ovos: peso postura (mg) / peso corporal (mg) x 100

‡ Índice de Eficiência de Produção de Larvas: peso postura (mg) / peso corporal (mg) x eclodibilidade (%)

^{a,b} Letras diferentes em uma mesma linha indicam diferença significativa (p<0,05) – Teste T de Student

Tabela 3-Parâmetros parasitários e reprodutivos (média ± desvio padrão) das teleóginas de *A. cajennense* provenientes da terceira infestação dos coelhos do grupo GIA e da primeira infestação dos animais dos grupos GGS e GC.

Parâmetros	GRUPOS		
	GIA (3ª Infestação)	GGS	GC
Taxa de Recuperação (%)	15,00 ^a	48,33 ^b	40,00 ^b
Parasitários			
Período de Parasitismo (dias)	10,33 ± 1,87 ^a	10,41 ± 1,70 ^a	10,58 ± 2,19 ^a
Peso Corporal (mg)	531,11 ± 176,85 ^a	704,31 ± 169,39 ^b	693,67 ± 197,60 ^b
IEAL [*]	51,95 ± 17,37 ^a	69,96 ± 21,65 ^b	68,71 ± 22,86 ^b
Reprodutivos			
Peso da Postura (mg)	257,78 ± 110,04 ^a	333,97 ± 139,95 ^{ab}	380,17 ± 147,01 ^b
Eclodibilidade (%)	85,56 ± 7,68 ^a	84,66 ± 20,26 ^a	84,79 ± 15,43 ^a
IEPO [†]	46,17 ± 12,31 ^{ab}	45,49 ± 14,61 ^b	53,61 ± 11,19 ^a
IEPL [‡]	39,45 ± 11,22 ^a	37,78 ± 15,21 ^{a§}	44,45 ± 12,16 ^{a§}

* Índice de Eficiência Alimentar: peso corporal (mg) / período de postura (dias)

† Índice de Eficiência de Produção de ovos: peso postura (mg) / peso corporal (mg) x 100

‡ Índice de Eficiência de Produção de Larvas: peso postura (mg) / peso corporal (mg) x eclodibilidade (%)

^{a,b} Letras diferentes em uma mesma linha indicam diferença significativa (p<0,05) – Teste T de Student

§ Valores significativamente diferentes se p<0,10

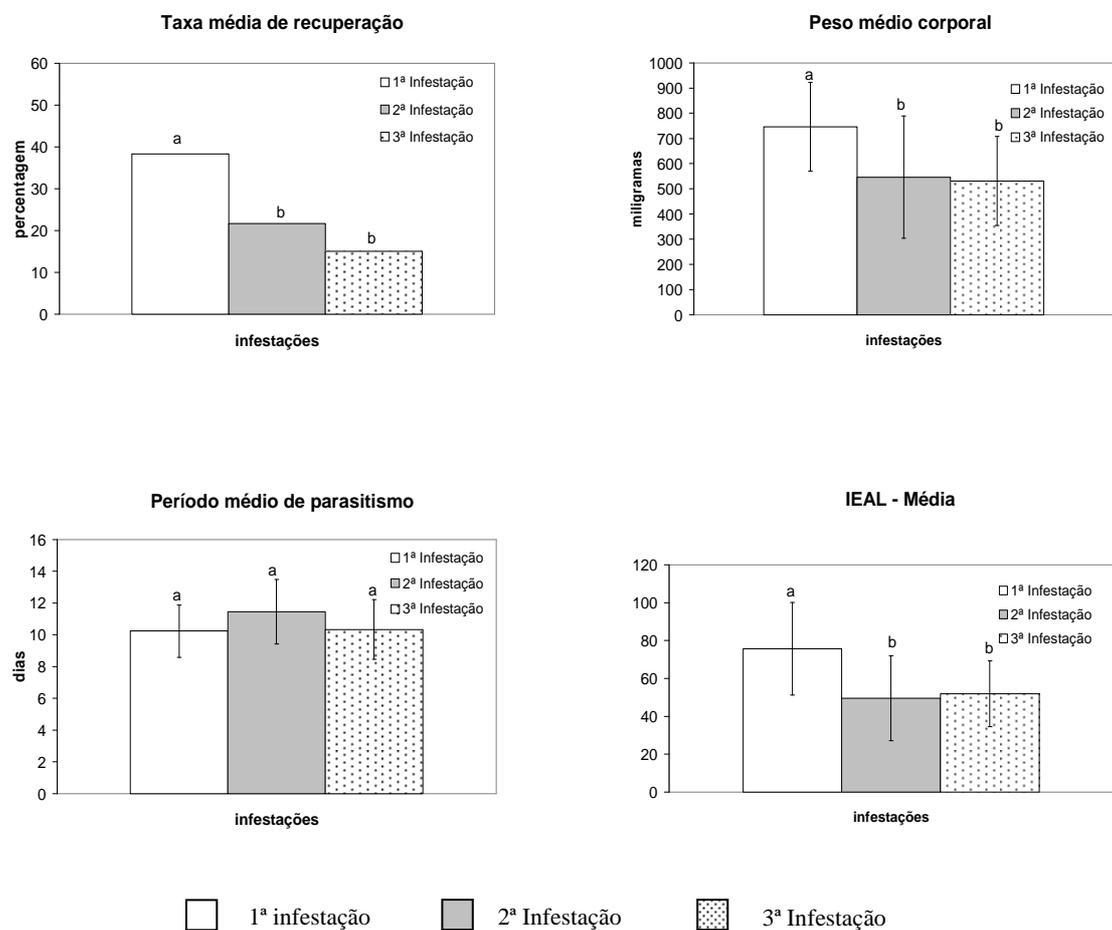


Figura 2 - Parâmetros parasitários médios (peso corporal, período de parasitismo, taxa de recuperação e Índice de Eficiência na Alimentação-IEAL) reportados nos carrapatos obtidos dos coelhos do Grupo Infestação Artificial (GIA), durante a primeira, segunda e terceira infestação. ^{a,b}Letras diferentes em cima das barras indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

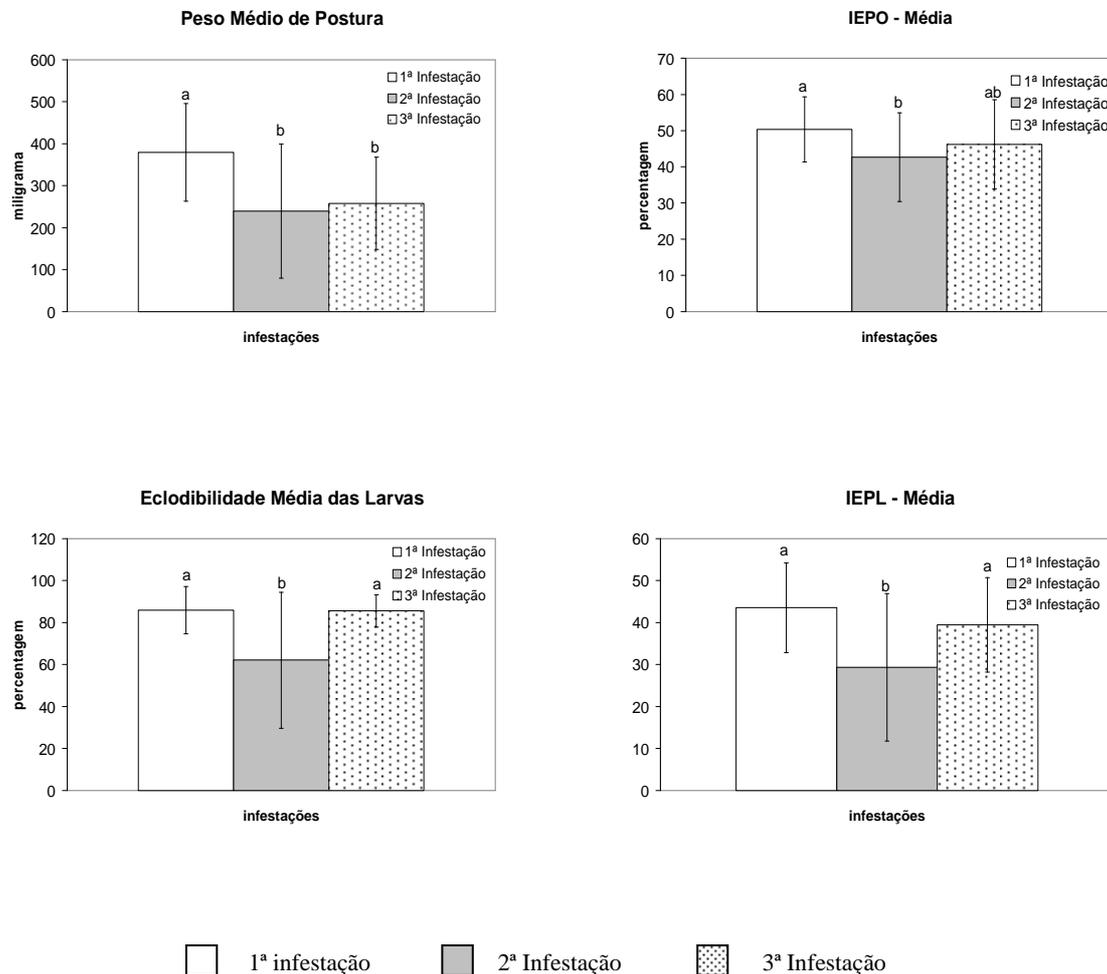


Figura 3 - Parâmetros reprodutivos médios (peso postura, eclodibilidade das larvas, índice de eficiência na produção de ovos - IEPO e índice de eficiência na produção de larvas - IEPL) reportados nos carrapatos obtidos dos coelhos do Grupo Infestação Artificial (GIA), durante as sucessivas infestações. ^{a,b}Letras diferentes em cima das barras indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

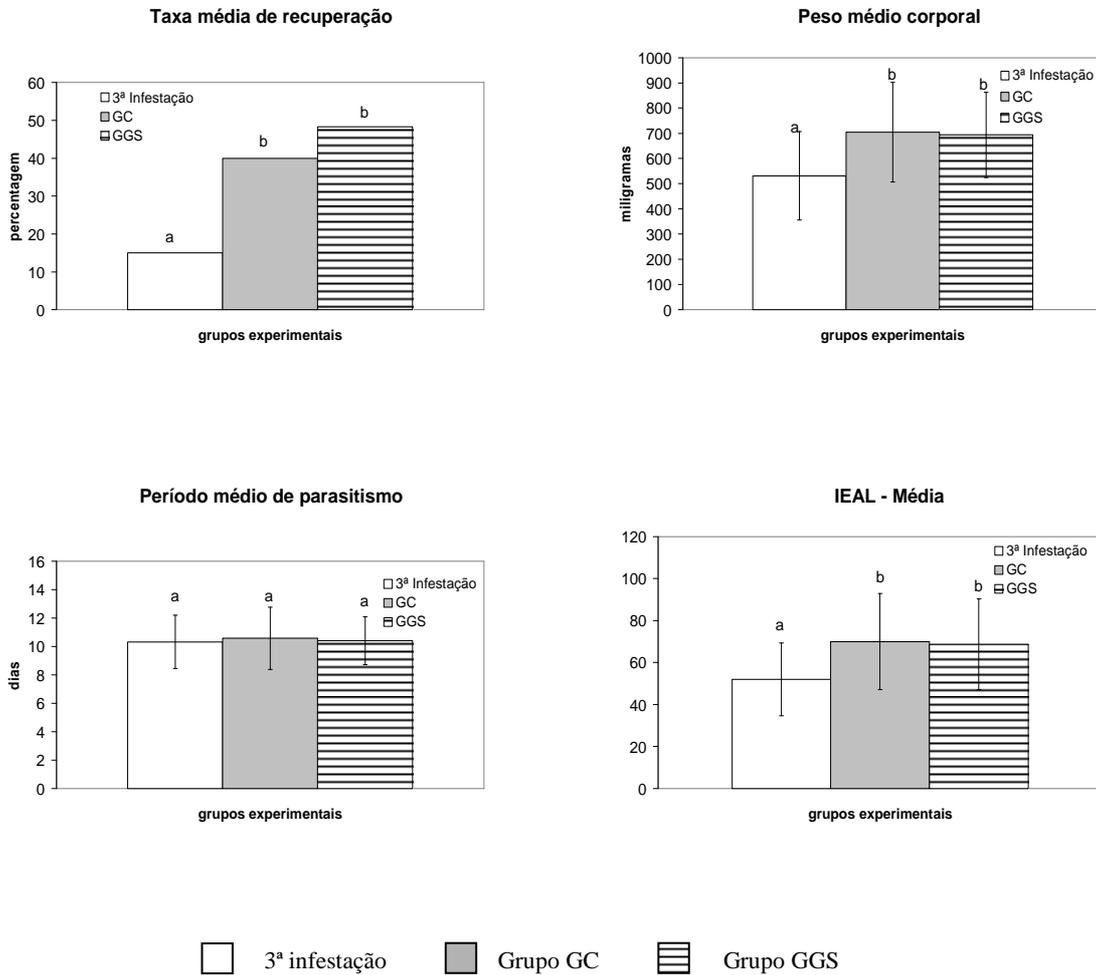


Figura 4 - Parâmetros parasitários médios (peso corporal, período de parasitismo, taxa de recuperação e Índice de Eficiência na Alimentação-IEAL) reportados nos carrapatos obtidos da terceira infestação dos coelhos do Grupo Infestação Artificial (GIA) e da infestação dos coelhos do Grupo Controle (GC) e do Grupo Glândula Salivar (GGS). ^{a,b}Letras diferentes em cima das barras indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

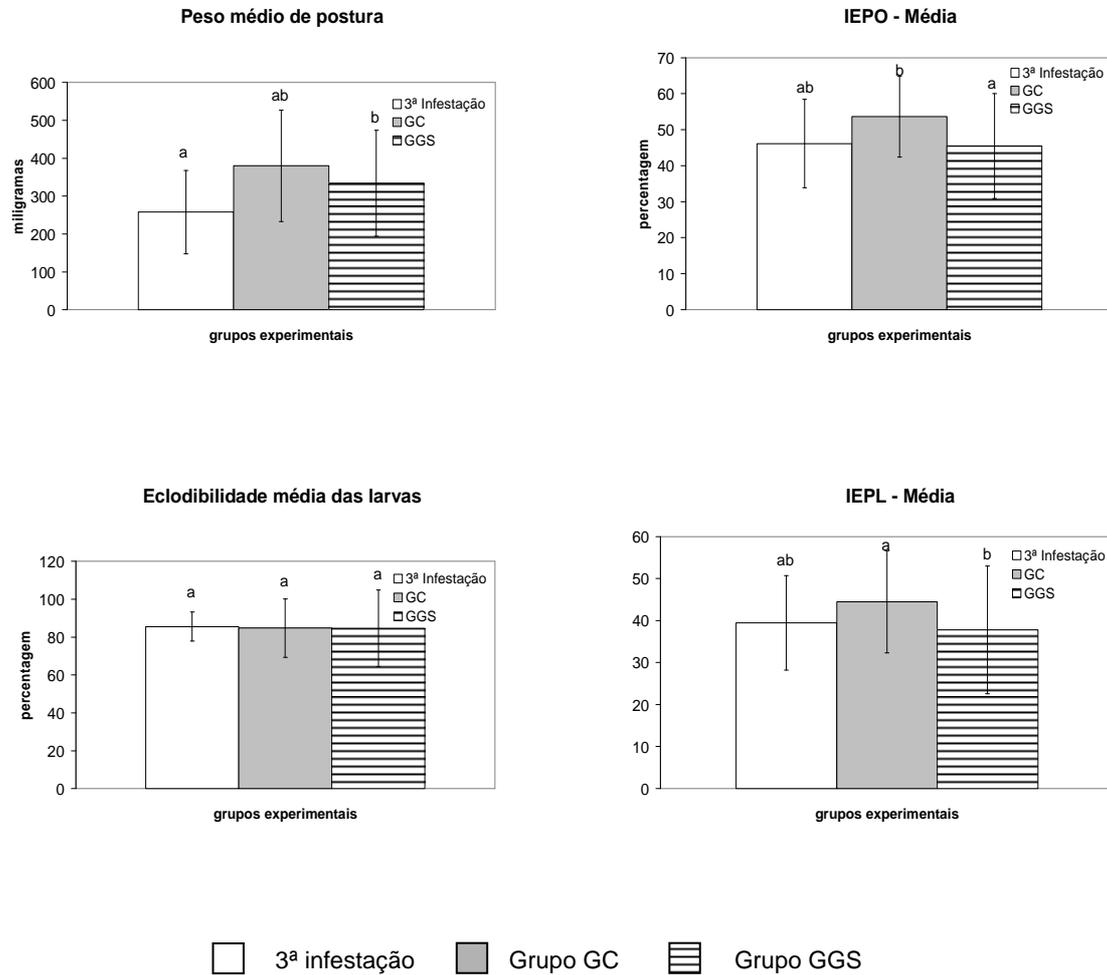


Figura 5 - Parâmetros reprodutivos médios (peso postura, eclodibilidade das larvas, Índice de Eficiência na Produção de Ovos -IEPO e Índice de Eficiência na Produção de Larvas -IEPL) reportados nos carrapatos obtidos da terceira infestação dos coelhos do Grupo Infestação Artificial (GIA) e da infestação dos coelhos do Grupo Controle (GC) e do Grupo Glândula Salivar (GGS).^{a,b} Letras diferentes em cima das barras indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

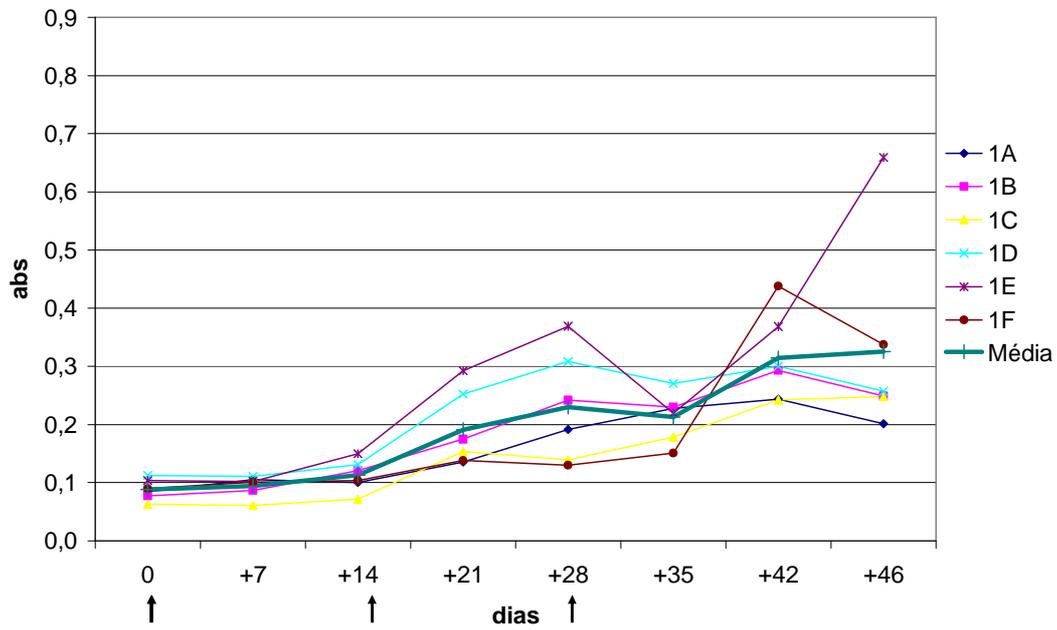


Figura 6 - Valores de absorbância de IgG anti-EGS no soro de coelhos pertencentes ao Grupo Infestação Artificial (GIA). As setas correspondem aos dias de infestação.

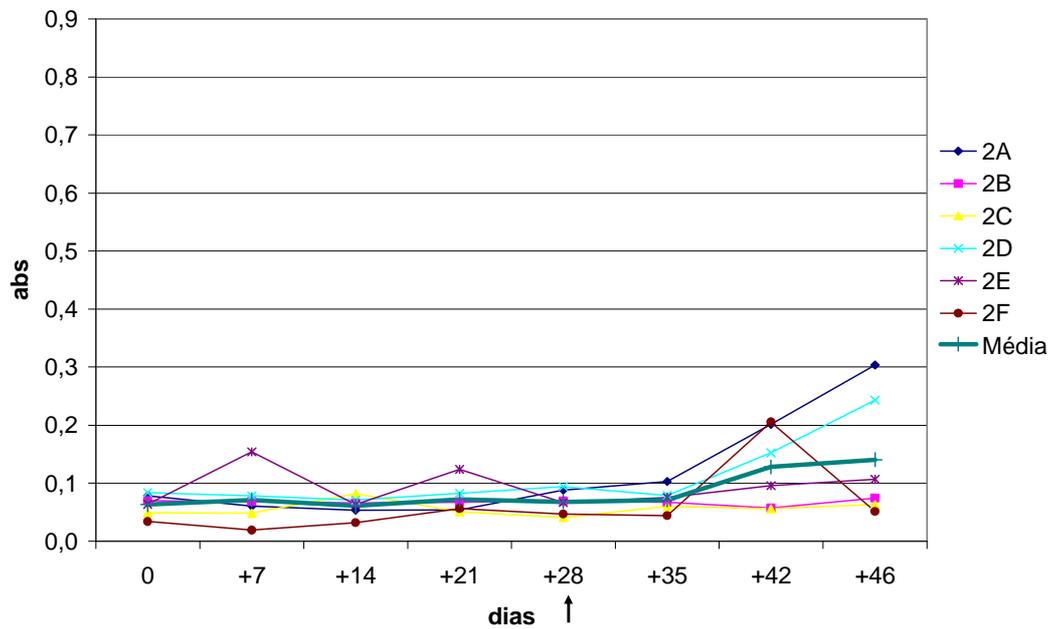


Figura 7 - Valores de absorbância de IgG anti-EGS no soro de coelhos pertencentes ao Grupo Controle (GC). As setas correspondem aos dias de infestação.

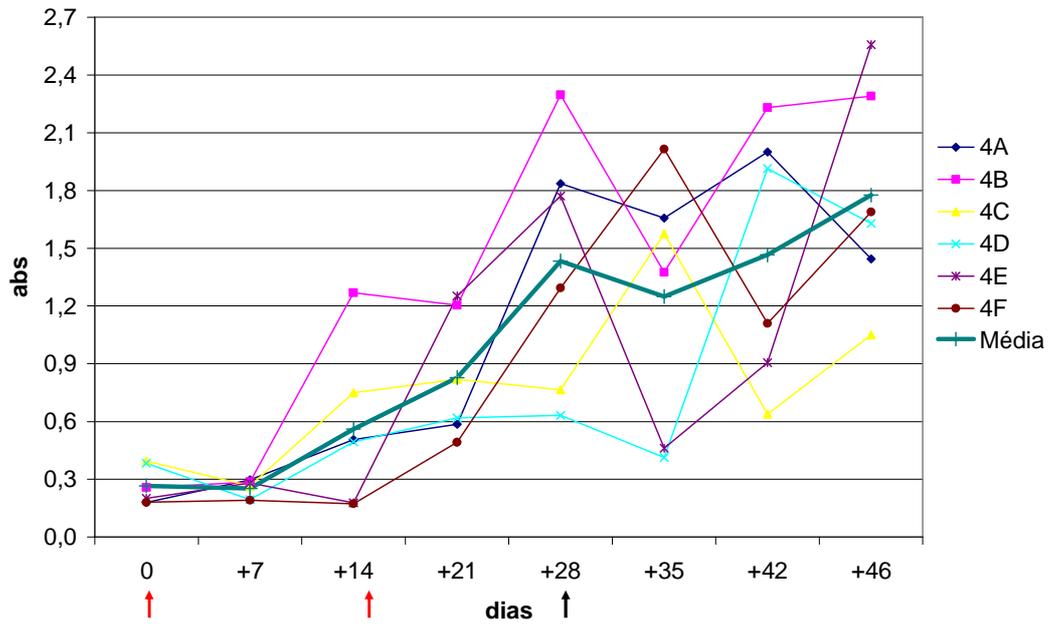


Figura 8 - Valores de absorbância de IgG anti-EGS no soro de coelhos pertencentes ao Grupo Glândula Salivar (GGS). As setas vermelhas correspondem aos dias de imunização e a preta ao dia de infestação

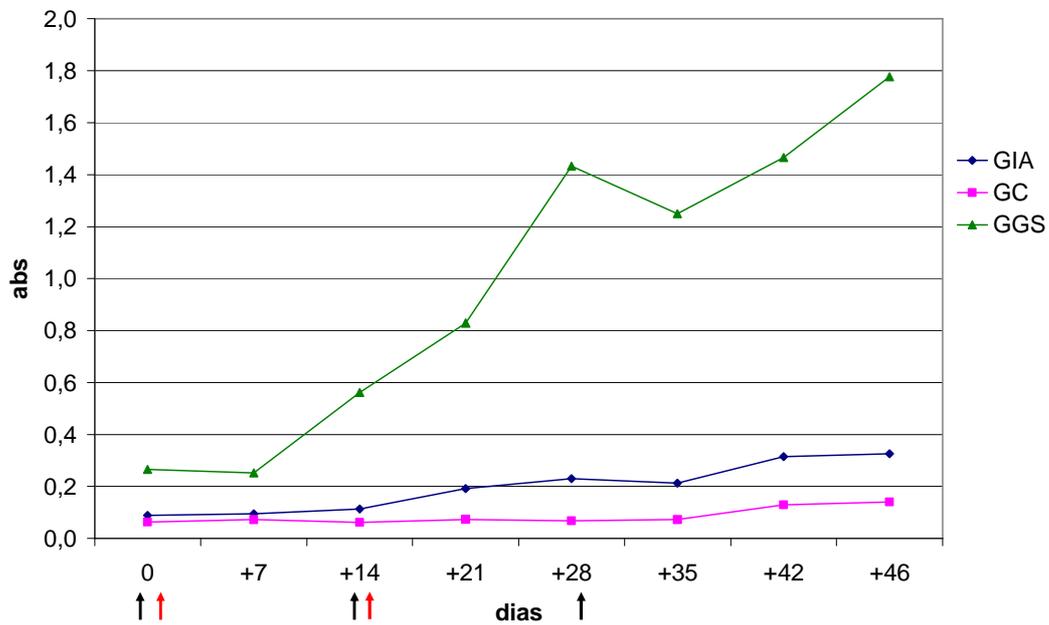


Figura 9 - Valores médios de absorbância de IgG anti-EGS no soro de coelhos pertencentes ao Grupo Infestação Artificial (GIA), Grupo Controle (GC) e Grupo Glândula Salivar (GGS). As setas vermelhas correspondem aos dias de imunização e as pretas aos dias de infestação.

Tabela 4-Resultados da análise histopatológica do sítio de fixação dos ixodídeos nos coelhos do Grupo Infestação Artificial (GIA):

Animal	Grau de Lesão	Lesão na Derme	Infiltrado Inflamatório	Necrose	Fiboplasia	Infecção Secundária	Miosite
1A	Intensa	+ [§]	Intenso	+	+	- [§]	-
1B	Intensa	+	Intenso	+	+	+	-
1C	Disc / Mod*	+	Moderado	-	+	-	-
1D	Intensa	+	Intenso	+	+	-	+
1E	Intensa	+	Intenso	+	+	-	+
1F	Intensa	+	Intenso	+	+	-	-

*Disc = discreta; Mod = moderada

§O símbolo (+) indica alteração presente e o símbolo (-) indica alteração ausente ou não detectada

Tabela 5-Resultados da análise histopatológica do sítio de fixação dos ixodídeos nos coelhos do Grupo Controle (GC):

Animal	Grau de Lesão	Lesão na Derme	Infiltrado Inflamatório	Necrose	Fiboplasia	Infecção Secundária	Miosite
2A	intensa	+ [§]	intenso	+	+	+	+
2B	intensa	+	intenso	+	+	- [§]	+
2C	moderada	+	disc / mod*	-	+	-	-
2D	mod / inten*	+	discreto	-	+	-	-
2E	moderada	+	moderado	-	+	-	+
2F	intensa	+	intenso	+	+	+	+

*disc = discreta; mod = moderada; inten = intensa; mod/inten = moderada a intensa; disc/mod = discreta a moderada

§O símbolo (+) indica alteração presente e o símbolo (-) indica alteração ausente ou não detectada

Tabela 6-Resultados da análise histopatológica do sítio de fixação dos ixodídeos nos coelhos do Grupo Glândula Salivar (GGS):

Animal	Grau de Lesão	Lesão na Derme	Infiltrado Inflamatório	Necrose	Fiboplasia	Infecção Secundária	Miosite
4A	intensa	+ [§]	intenso	+	+	+	+
4B	intensa	+	intenso	+	+	- [§]	+
4C	intensa	+	intenso	+	+	-	+
4D	intensa	+	intenso	+	+	-	+
4E	intensa	+	intenso	+	+	-	+
4F	intensa	+	Mod / inten*	+	+	-	+

*disc = discreta; mod = moderada; inten = intensa; mod/inten = moderada a intensa; disc/mod = discreta a moderada

§O símbolo (+) indica alteração presente e o símbolo (-) indica alteração ausente ou não detectada

CAPÍTULO 3:

RESPOSTA HUMORAL E INFLAMATÓRIA E A SUA CONSEQUÊNCIA NO DESENVOLVIMENTO DE RESISTÊNCIA EM *Oryctolagus cuniculus* IMUNIZADOS COM EXTRATOS DERIVADOS DE GLÂNDULA DE GENÉ (EGG) DE FÊMEAS DE *Amblyomma cajennense* (FABRICIUS, 1787) (ACARI: IXODIDAE).

RESUMO

O presente experimento teve por objetivo avaliar a resposta humoral e o desenvolvimento de resistência em coelhos imunizados com um extrato de glândulas de Gené (EGG) de fêmeas de *Amblyomma cajennense* (Grupo GGG) e em coelhos submetidos a três (Grupo GIA) ou a uma infestação artificial por fêmeas e machos dessa espécie de ixodídeo (Grupos GC). Os coelhos pertencentes ao grupo GIA tornaram-se resistentes a partir da segunda infestação. Os parâmetros parasitários foram os mais influenciados pela resposta imune dos animais reinfestados. A imunização de coelhos do grupo GGG com o extrato de glândulas de Gené não apresentou nenhum efeito significativo sobre as variáveis parasitárias e reprodutivas que foram observadas nos ixodídeos provenientes dos coelhos do grupo GGG. Resultados obtidos no exame sorológico demonstraram que os valores médios de absorbância de IgG anti-EGG nos coelhos do grupo GIA, apresentaram um discreto aumento a partir da terceira infestação (dia +28) e alcançaram valores máximos no 42º dia de experimento, quando começaram a decair. A imunização dos animais do grupo GGG com o EGG foi eficiente em induzir a produção de anticorpos específicos contra este antígeno. Os valores médios de absorbância de IgG anti-EGG aumentaram a partir do 7º dia após a imunização e curiosamente alcançaram índices máximos após a infestação artificial, sugerindo a ocorrência de determinates antigênicos comuns entre as secreções salivares e o EGG. Contudo, apesar disso, a resposta humoral alcançada pelos animais não foi capaz de protegê-los do desafio parasitário.

Palavras-chave: ixodídeos, *Amblyomma cajennense*, imunologia, resistência imune, vacina, glândula de Gené, antígeno oculto.

1 INTRODUÇÃO:

Amblyomma cajennense é um carrapato de três hospedeiros, sendo encontrado parasitando uma grande variedade de animais domésticos e silvestres durante os estágios imaturos de desenvolvimento, porém tendo os eqüinos como principais hospedeiros da fase adulta (Guimarães et al., 2001; Teglas et al., 2005). É a principal espécie de carrapato que parasita o homem no centro-sul brasileiro sendo por consequência, considerado o principal vetor da Febre Maculosa no Brasil (Sangioni et al., 2005). Além disso, está envolvido na transmissão experimental do vírus causador da Encefalomielite Venezuelana Eqüina (Linthicum et al., 1991) e apresenta-se como provável vetor de *Hepatozon canis* (O'Dwyer et al., 2001), de *Erlichia bovis* (Massard, 1984) e *Cowdria ruminantium* (Walker e Olwage, 1987).

A despeito de sua importância na saúde pública e na medicina veterinária, o controle desse parasito baseia-se principalmente na aplicação de acaricidas nos animais parasitados. Vale lembrar que de acordo com Pinheiro (1987), o *A. cajennense* apresenta uma elevada resistência natural aos carrapaticidas convencionais, exigindo um aumento na concentração dos produtos para a sua utilização no controle da fase adulta (Leite et al, 1998; Pinheiro, 1987). Além disso, sua baixa especificidade por hospedeiro nos estágios imaturos, facilita a manutenção e dispersão desse parasito e compromete as estratégias de controle e erradicação até então preconizadas e utilizadas nos carrapatos monoxenos. Desta forma, torna-se necessário o desenvolvimento de medidas alternativas, em destaque para o controle imunológico.

Estudos preliminares indicam que os eqüinos, um dos principais hospedeiros de *A. cajennense*, apresentam baixo grau de

resistência à infestação natural e artificial por esse ixodídeo (Castagnolli et al., 2003). Os carrapatos e seus hospedeiros naturais provavelmente co-evoluíram por um longo período e esses parasitos desenvolveram mecanismos que os possibilitam escapar da resposta imune do hospedeiro (Rechav et al., 1992). Do ponto de vista molecular, a relação parasito-hospedeiro e os mecanismos de adaptação e co-evolução ocorrem principalmente em função da interação entre as substâncias presentes na saliva dos carrapatos e os artifícios de resposta imune dos hospedeiros que são ativados durante a infestação por essas moléculas.

Até recentemente, a maioria dos estudos envolvendo o desenvolvimento de vacinas contra carrapatos relacionavam-se com a utilização de antígenos expostos, derivados das glândulas salivares desses parasitos. Tais antígenos além de impedirem a fixação dos ixodídeos são igualmente eficientes em coibir a transmissão de patógenos por esses parasitos (Sahibi et al., 1997). Todavia, essas substâncias podem ser submetidos à pressão do sistema imune dos hospedeiros e ao longo do tempo apresentar sua antigenicidade reduzida (Mulenga et al., 2000).

Allen e Humphreys (1979) foram os primeiros a obter sucesso, imunizando cobaias e bovinos, com antígenos ocultos derivados de órgãos internos dos carrapatos. A partir de então uma grande variedade de extratos derivados de carrapatos tem sido testada no desenvolvimento de vacinas (Bechara et al., 1994; Sahibi et al., 1997; Jittapalpong, 2000; Tellam et al., 2002; Patarroyo et al., 2002). Em destaque, a proteína Bm86, derivada das células intestinais de *Boophilus microplus* e que constituiu a base das vacinas cubana (de la Fuente et al., 1999) e australiana (Willadsen et al., 1995) e recentemente do peptídeo sintético

desenvolvido da Universidade Federal de Viçosa, Brasil (Patarroyo et al., 2002).

A presença de imunoglobulinas dos hospedeiros na hemolinfa dos carrapatos e a atividade dessas moléculas contra os tecidos e estruturas internas dos ixodídeos têm sido observadas em uma grande variedade de ixodídeos (Ackerman et al., 1981; Whelen e Wikel, 1993; Vaz Jr. et al., 1998; Vaughan et al., 2002). Tais moléculas podem afetar a ecdise ou postura dos ixodídeos uma vez que agem diretamente nos tecidos internos dos parasitos, comprometendo suas funções (Wang e Nuttall, 1994;).

Desta forma, o presente trabalho teve por objetivo a avaliação da resposta imune de coelhos, frente à imunização desses animais com um extrato produzido a partir das glândulas de Gene, provenientes de fêmeas de *A. cajennense*. Essa glândula secreta uma cera durante a oviposição que lubrifica os ovos e impede a sua dessecação (Balashov, 1972, Sonenshine, 1991; Schöl et al., 2001). Esse trabalho também objetivou determinar a cinética da resposta humoral dos coelhos submetidos a infestações consecutivas por adultos de *A. cajennense* e dos animais imunizados com o EGG e posteriormente submetidos ao desafio parasitário.

2 MATERIAL E MÉTODOS:

2.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO DO EXPERIMENTO:

O experimento foi realizado no período de Março de 2004 a Julho de 2005, na Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais e no Laboratório de Imunologia da Fundação Ezequiel Dias (FUNED). Foram utilizadas as instalações do Hospital Veterinário e do Laboratório de Histopatologia do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária e o Infectório e o laboratório de Endo-ectoparasitoses do

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva.

Antes da realização do experimento o projeto piloto (protocolo nº 045/04) foi submetido ao Comitê de Ética em Experimentação animal, tendo sido aprovada e autorizada a sua realização.

2.2 ANIMAIS UTILIZADOS NO EXPERIMENTO:

Foram utilizados 18 coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) fêmeas da raça Nova Zelândia com aproximadamente 2,0 Kg de peso e que nunca tiveram contato prévio com carrapatos. Esses animais eram provenientes de uma criação comercial localizada na Fazenda Experimental Professor Hélio Barbosa no município de Igarapé, Minas Gerais.

Os coelhos foram mantidos em gaiolas individuais recebendo água e ração comercial à vontade. Essas gaiolas foram suspensas a um metro de altura para impedir o contato dos animais com os dejetos e permitir a limpeza diária do local.

2.3 OBTENÇÃO DOS CARRAPATOS:

Durante os meses de março a outubro de 2004, 18 equinos naturalmente infestados foram raspados na cabeça, cernelha e tábua do pescoço em intervalos quinzenais, utilizando-se raspadeira manual conforme técnica descrita por Oliveira (1998). Os exemplares ingurgitados que se desprenderam do corpo dos animais, foram coletados, colocados em placas de Petri e acondicionados em estufa bioclimatizada (27 °C e 80% UR), sendo observados diariamente até completada a ecdise.

Nos meses de outubro a fevereiro de 2004, fêmeas naturalmente ingurgitadas foram coletadas sobre o corpo desses equinos e enviadas ao laboratório para a extração das glândulas de Gené.

Na infestação artificial dos animais utilizaram-se machos e fêmeas de *A. cajennense* com aproximadamente dois meses de idade, obtidos a partir da ecdise das ninfas coletadas nos equinos.

2.4 PREPARAÇÃO DO EXTRATO DE GLÂNDULA DE GENÉ (EGG):

A remoção das glândulas de Gené foi realizada de acordo com a técnica descrita por Schöl et al. (2001), utilizando-se fêmeas de *A. cajennense* que se encontravam no início do período de ovoposição. Tais fêmeas foram acomodadas em uma placa de Petri e dissecadas sob lupa estereoscópica, tendo o seu gnatossoma removido através do corte da superfície dorsal com bisturi número 11. Os órgãos expostos foram imersos em PBS (0,7 mM NH₂PO₄, 4 mM K₂HPO₄, 0,15 M NaCl), facilitando a observação e evitando a dessecação do material coletado. Realizou-se a limpeza e separação das glândulas com a remoção de fragmentos de outros órgãos, pedaços de traquéia, hemolinfa e conteúdo intestinal. Foram dissecadas aproximadamente 1000 fêmeas em ovoposição e as glândulas obtidas foram acondicionadas em 200 µl de PBS (pH 7,4) e estocadas a -4°C.

Para a produção do EGG, as glândulas coletadas foram homogeneizadas e submetidas a sonicagem (40MHz) por 10 segundos (intervalo de um minuto em gelo) num total de seis vezes conforme modificação da técnica descrita por Jittapalapong et al. (2000). O material obtido foi centrifugado a 15.000 rpm durante 15 minutos, sendo o sobrenadante coletado e estocado a -4°C.

A dosagem protéica do extrato de glândula de Gené produzido foi feita de acordo com método descrito por Lowry et al. (1951).

2.5 DELINEAMENTO:

Os 18 coelhos foram divididos em três grupos homogêneos que foram denominados pelas siglas GGG (grupo extrato de glândula de Gené), GIA (grupo infestação artificial) e GC (grupo controle).

O grupo GGG foi composto por coelhos pré-imunizados com o EGG e submetidos a uma infestação artificial por fêmeas e machos de *A. cajennense*. Os animais do grupo GIA não receberam nenhuma imunização prévia, porém, foram

submetidos a três infestações consecutivas por adultos desta espécie de ixodídeos, durante o período experimental. Nos coelhos do grupo GC nenhum procedimento experimental foi realizado inicialmente, mas esses animais foram submetidos a uma infestação concomitante ao primeiro desafio parasitário do grupo GGG e à terceira infestação do grupo GIA.

Foram procedidas coletas de sangue em intervalos semanais que se iniciou no dia anterior à primeira imunização (GGG) ou infestação (GIA) dos animais.

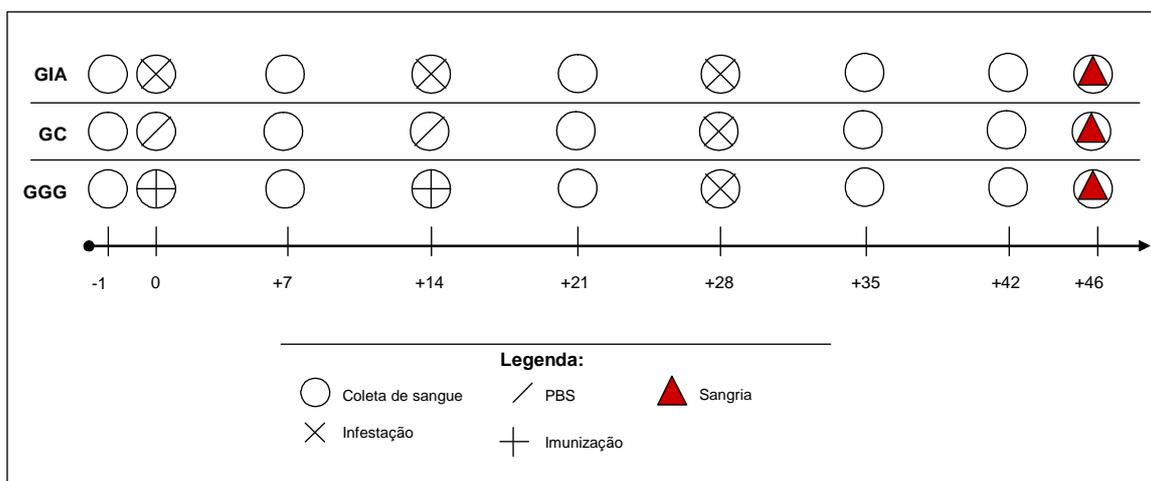


Figura 1. Esquema de infestação, imunização e coleta de material dos animais pertencentes aos grupos GIA, GC e GGS.

2.5.1 Imunização dos animais:

No dia zero a partir do início do experimento, os coelhos pertencentes ao grupo GGG receberam 280µg de EGG diluído em PBS e emulsionado em adjuvante incompleto de Freund, perfazendo um volume final de 0,2 ml de inóculo por animal. O imunógeno foi aplicado no flanco direito do corpo do animal e no dia 14, uma nova aplicação foi realizada utilizando-se a mesma dose de antígeno e adjuvante.

No momento da primeira imunização e reforço desses animais, os coelhos pertencentes aos grupos GIA e GC

receberam uma dose de PBS correspondente ao volume de imunógeno aplicado nos demais grupos.

2.5.2 Infestação artificial dos animais:

A partir de duas semanas após a segunda imunização (28º dia), os coelhos pertencentes aos grupos experimentais GGG e GC foram infestados com adultos virgens e não alimentados de *A. cajennense*.

De acordo com modificação da técnica descrita por Pinter et al. (2002), os animais tiveram a região lombo-sacra tricotomizada e uma câmara de alimentação de formato

retangular (7 x 8 cm) foi fixada à pele do local, utilizando-se adesivo colante da marca Brascoplast (Castagnolli et al., 2003). Um total de dez fêmeas e sete machos foi inoculado por animal em cada infestação, no interior da câmara de alimentação.

Para coibir a retirada da câmara pelos animais foi utilizado um colar de plástico rígido, com a circunferência interna ajustável à largura do pescoço dos coelhos e com circunferência externa de aproximadamente o dobro da interna, seguindo metodologia descrita por Labruna e Leite (1997).

Nos animais pertencentes ao grupo GIA foram realizadas três infestações consecutivas em intervalos quinzenais, nos dias 0, 14 e 28 a partir do início do experimento, utilizando-se a mesma metodologia empregada nos grupos GGG e GC. Desta forma, as três infestações dos coelhos do grupo GIA coincidiram, respectivamente, com a imunização, o booster e a primeira infestação dos animais pertencentes aos grupos GGG e GC. A tabela 1 demonstra os esquemas de infestação e imunização dos diferentes grupos experimentais.

Tabela1. Esquema de inoculação e infestação dos animais pertencentes aos grupos GGG, GIA e GC.

GRUPO	DIA 0	DIA 14	DIA 28
GGG	1ª Imunização	2ª Imunização	1ª Infestação
GIA	1ª Infestação	2ª Infestação	3ª Infestação
GC	-----	-----	1ª Infestação

Após a inoculação nos hospedeiros, os carrapatos foram examinados diariamente por inspeção visual do interior das câmaras de alimentação. Durante o período de parasitismo foi registrado o período de alimentação dos ixodídeos que se fixaram e o número de fêmeas que se ingurgitaram em cada animal, conforme Sahibi et al. (1997). As teleóginas que se desprenderam foram encaminhadas ao laboratório onde foram pesadas individualmente, colocadas em placas de petri e acondicionadas em estufa bioclimatizada do tipo BOD a 27°C e 80% de umidade relativa. Após três dias de inoculados, os carrapatos que não se fixaram foram retirados das câmaras de alimentação e considerados como rejeitados pelo hospedeiro.

Durante o período de postura e eclodibilidade das larvas, as teleóginas recuperadas foram avaliadas diariamente e as massas de ovos produzidas foram individualmente pesadas, colocadas em

seringas plásticas esterilizadas e acondicionadas na mesma estufa B.O.D. Os seguintes parâmetros parasitários foram avaliados: período de parasitismo, peso corporal e o índice de eficiência na alimentação (IEAL) que é calculado dividindo-se o peso total após o ingurgitamento, pelo período total de parasitismo (Barriga et al., 1991). Esse índice permite a comparação entre infestações de quão eficiente o parasito foi em obter o alimento.

Entre os parâmetros reprodutivos registrados, incluem-se o peso da massa de ovos e eclodibilidade das larvas. Além desses, o índice de eficiência na produção de ovos (IEPO)⁵ e o índice de eficiência na produção de larvas (IEPL)⁶, foram

⁵ IEPO = peso postura / peso corporal da fêmea ingurgitada x 100

⁶ IEPL = peso postura / peso corporal da fêmea ingurgitada x eclodibilidade larvas

calculados de acordo com a metodologia descrita por Bechara et al., (1994).

2.5.3. Coleta de soro:

Para o acompanhamento da cinética da resposta humoral dos animais submetidos à imunização e desafio parasitário, amostras de sangue foram coletadas dos coelhos pertencentes aos grupos GGG, GIA e GC, mediante a punção venosa do pavilhão auditivo. As coletas foram feitas nos dias - 1, 7, 14, 21, 28, 35, 42 e 46. Após a coagulação do sangue coletado, o soro foi retirado e estocado a -4°C .

2.6 ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO INDIRETO (ELISA):

Empregou-se como antígeno o extrato derivado da glândula de Gené (EGG) que foi utilizado na imunização dos coelhos do grupo GGG. Os soros coletados de todos os animais dos grupos GGG, GIA e GC foram avaliados para a detecção de anticorpo específico anti-EGG.

Microplacas de poliestireno (Maxisorp™, Nunc, Danmark) foram sensibilizadas com 100µL/poço de EGS na concentração de 1ng/µL, diluído em tampão carbonato/bicarbonato (Sigma, USA) 0,05M pH 9,6 e incubadas durante a noite a 4°C. Em seguida, as placas foram lavadas por duas vezes com solução de lavagem (Salina + 0,05% de Tween 20) e foram bloqueadas por adição de 100µL/well de solução de bloqueio – 0,01M PBS pH 7,4 + 3% de Soro-Albumina Bovina (BSA) a 37°C por uma hora. As placas foram novamente lavadas como previamente descrito.

Os soros testados foram diluídos em PBST 0,05% (1:64.000) e em seguida adicionados à microplaca (100µL/poço) que foi novamente incubada a 37°C por uma hora. As placas foram lavadas como previamente descrito por seis vezes e

100µL/poço do conjugado (IgG Anti-coelho conjugada com peroxidase, Sigma, USA) diluído a 1:40.000 em tampão de incubação (0.1M PBS + 0,1% de Tween 20). Incubação a 37° por uma hora.

Após a lavagem da placa por seis vezes conforme descrito anteriormente, adicionou-se 100µL/poço do substrato dicloridrato de ortofenilenodiamina (OPD – Sigma, USA) em tampão citrato (0,15M pH 5,0) e peróxido de hidrogênio. As microplacas foram novamente incubadas a 37° por uma hora. A reação foi interrompida pela adição de 50µl/poço da solução de 0,37 mM de ácido sulfúrico (Vetec, Brasil) com realização imediata da leitura de absorbância em comprimento de onda de 492nm em um leitor de ELISA (Labsystems, Multiskan, Unisciense, Brasil).

2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA:

Em todos os testes realizados empregou-se um nível de significância de $p < 0,05$. As taxas de recuperação de cada infestação dentro de cada grupo foram comparadas pelo teste estatístico do qui-quadrado. Os demais parâmetros parasitários foram submetidos à análise de variância e as médias entre infestações dentro do grupo GIA, GGG e GC foram confrontadas utilizando-se o teste T de Student.

Realizou-se análise de correlação entre os valores médios de absorbância de IgG anti-EGG e a taxa média de recuperação de carrapatos nos animais dos diferentes grupos.

3 RESULTADOS:

3.1 DESEMPENHO DAS FÊMEAS DE *A. cajennense* RECUPERADAS NAS SUCESSIVAS INFESTAÇÕES DO GRUPO GIA:

Os resultados obtidos nos carrapatos alimentados nos coelhos do grupo GIA estão demonstrados na tabela 2 e nas figuras 2 e 3. Os parâmetros parasitários e reprodutivos dos ixodídeos provenientes dos coelhos do grupo GIA, foram afetados pelas infestações sucessivas. O padrão de resposta observado caracterizou-se por uma queda significativa do peso médio corporal, IEAL médio, peso médio de postura, eclodibilidade média das larvas e dos índices reprodutivos (IEPO e IEPL) nos carrapatos obtidos na segunda infestação ($p < 0,05$). Contudo, na terceira infestação esses parâmetros apresentaram tendência crescente ou de se manterem estáveis, observando-se valores semelhantes aos reportados nos animais primo-infestados.

3.2 DESEMPENHO DAS FÊMEAS DE *A. cajennense* RECUPERADAS DOS COELHOS IMUNIZADOS COM EGG:

Conforme demonstrado na tabela 3 e nas figuras 4 e 5, a imunização com EGG não apresentou nenhum efeito significativo sobre as variáveis parasitárias e reprodutivas que foram observadas nos ixodídeos provenientes dos coelhos do grupo GGG.

Com exceção do período de parasitismo que não variou entre os grupos experimentais, todos os parâmetros analisados foram estatisticamente semelhantes nos parasitos coletados dos animais do grupo controle (GC) e dos coelhos imunizados (GGG) ($p < 0,05$). Contudo esses parâmetros foram significativamente reduzidos nos carrapatos provenientes da terceira infestação dos animais do grupo GIA ($p < 0,05$).

3.3 ANÁLISE SOROLÓGICA:

A cinética da produção de anticorpos nos animais pertencentes aos grupos GIA, GC e GGG está demonstrada nas figuras 6, 7, 8 e

9. No dia -1, antes da imunização ou infestação, todos os animais avaliados já apresentavam baixos valores de absorbância de IgG anti-EGG.

Nos coelhos do grupo GIA os valores médios de absorbância de IgG anti-EGG apresentaram um discreto aumento a partir da terceira infestação (dia +28) e alcançaram valores máximos no dia 42. A partir de então, começaram a decair. Em termos gerais, a amplitude da resposta observada entre os animais foi muito baixa e apresentou pouca variação durante o período experimental, com exceção do coelho 1E.

Contraditoriamente no grupo GC, os valores médios de absorbância de IgG anti-EGG começaram a aumentar antes da infestação dos animais e apresentaram níveis máximos no 46º dia após uma discreta diminuição. Da mesma forma que se observou entre os animais do grupo GIA, não houve nenhum aumento expressivo da quantidade de anticorpo anti-EGG no soro dos coelhos do grupo controle, durante o período de observação. Os animais 2A e 2D apresentaram uma resposta mais forte que atingiu o ponto máximo uma semana após o desafio parasitário (dia 35).

A produção de anticorpos específicos nos animais imunizados com EGG apresentou uma grande variação individual, durante todo o período de observação. Os valores médios de absorbância de IgG anti-EGG aumentaram discretamente após as duas imunizações e principalmente em seguida ao desafio parasitário. Alguns animais apresentaram valores e amplitude de variação consideravelmente altos, sobretudo após a infestação no 28º dia. Não foi verificada correlação significativa entre o número de carrapatos ingurgitados nos animais imunizados e a produção de anticorpo anti-EGG ($r = 0,653$; $p < 0,05$).

A comparação da absorbância média de IgG anti-EGG nos três grupos demonstra que os animais imunizados (grupo GGG) responderam com uma maior produção de anticorpo específico em relação aos demais. Contudo, o aumento em função da imunização foi aquém do observado quando os coelhos foram expostos à infestação natural (dia 28).

4 DISCUSSÃO:

4.1 DESEMPENHO DAS FÊMEAS DE *A. cajennense* RECUPERADAS NAS SUCESSIVAS INFESTAÇÕES DO GRUPO GIA:

Os resultados obtidos com os carrapatos recuperados dos animais do grupo GIA, indicam a ocorrência de resistência nesses hospedeiros a partir da segunda infestação (Tabela 2, Figuras 2 e 3). Algumas relações parasito-hospedeiro são caracterizadas pela aquisição de resistência aos ixodídeos que se desenvolve com resultado de exposições repetidas dos animais a esses parasitos (Willadsen, 1980; Brossard e Wikel, 2004). De acordo com Ribeiro (1989), imunidade adaptativa contra carrapatos que se desenvolvem em animais de laboratório é freqüentemente mais intensa do que a observada nos hospedeiros naturais. De fato, Castagnoli et al. (2003) observaram que equinos desenvolveram um modesto grau de resistência às sucessivas infestações por *A. cajennense*.

Apesar dos parâmetros parasitários e reprodutivos dos ixodídeos alimentados nos coelhos do grupo GIA terem sido afetados na segunda infestação parasitária, observou-se que na exposição subsequente a resistência imune se manteve estável e algumas variáveis apresentaram valores semelhantes aos obtidos nos animais primo-infestados. Saliva de artrópodes hematófagos contém moléculas com atividades anti-coagulante, anti-plaquetária e vasodilatadoras que inibem a hemostasia

e mantém o fluxo sanguíneo no sítio da alimentação (Ribeiro, 1995). Em adição, as secreções salivares dos ixodídeos contém fatores que moludam a reposta inflamatória dos hospedeiros, a imunidade inata e a resposta imune adquirida (Wikel, 1996). Esses mecanismos de modulação são particularmente importante para carrapatos que requerem dias para se alimentarem (Wikel e Bergman, 1997), como é o caso das fêmeas e machos de *A. cajennense*.

4.2 DESEMPENHO DAS FÊMEAS DE *A. cajennense* RECUPERADAS DOS COELHOS IMUNIZADOS COM EGG:

O parasitismo por carrapatos induz a uma resposta imune do hospedeiro, direcionada contra moléculas antigênicas presentes do sítio de fixação e substância presentes na saliva dos ixodídeos (Labarthe, 1985; Whelen e Wikel, 1993; Craig et al., 1996; Sanders et al, 1998). Essa resposta imune representa parte da correlação entre parasito e hospedeiro, sendo, portanto, sujeita aos mecanismos de modulação impostos pelos carrapatos (Willadsen, 2001).

Neste contexto, os chamados antígenos ocultos surgem como uma nova alternativa de controle imunológico que pode superar os inconvenientes relacionados aos antígenos salivares, uma vez que não participam da resposta imune natural não são susceptíveis à imunomodulação pelos carrapatos. Além disso, a descoberta de que as imunoglobulinas produzidas pelos hospedeiros podem atravessar o epitélio intestinal dos ixodídeos (Ackerman et al., 1981; Whelen e Wikel, 1993; Vaz Jr. et al., 1998; Vaughan et al., 2002), contribuiu para a premissa de que antígenos localizados nos tecidos internos e que representam funções biológicas e fisiológicas importantes para a sobrevivência desses parasitos, são passíveis de serem utilizados como imunógenos.

No presente trabalho observou-se que a imunização dos coelhos do grupo GGG não alterou os parâmetros parasitários e reprodutivos dos ixodídeos recuperados nesses animais (tabela 3, figuras 4 e 5). O principal efeito esperado era que a resposta imune produzida contra os antígenos presentes no EGG afetasse principalmente a eclodibilidade das larvas provenientes dos coelhos vacinados. De acordo com Balashov (1972), as glândulas de Gené são responsáveis por produzirem uma secreção que primariamente irá proteger os ovos de uma possível dessecação. Ovos que não são recobertos pela cera produzida pelas glândulas de Gené perdem água rapidamente e, por conseguinte não conseguem se desenvolver (Sonenshine, 1991).

Tellam et al. (2002) verificaram que a vacinação de ovinos com vitelina purificada proveniente de ovos de *B. microplus* reduziu significativamente a taxa de recuperação, o peso corporal e a oviposição das teleóginas de *B. microplus* recuperadas desses animais. Resultados semelhantes foram obtidos neste mesmo experimento quando esses autores utilizaram uma glicoproteína purificada com peso molecular de 80 KDa, proveniente de larvas dessa mesma espécie de ixodídeo. Bechara et al. (1994), comentam a necessidade da utilização de imunógenos purificados na produção de vacinas contra carrapatos. Esse procedimento pode minimizar a ocorrência de competição antigênica entre epítomos irrelevantes em relação àqueles que são realmente protetores (Barriga et al., 1991). Desta forma, é possível que no presente experimento, a utilização do extrato bruto de glândula de Gené, tenha comprometido a eficácia da resposta. Todavia, deve-se também considerar a possibilidade de que no material utilizado como imunógeno, os epítomos imunodominantes não apresentavam funções biológicas importantes e que o desenvolvimento de uma resposta imune contra eles, não

afetaria as atividades fisiológicas normais do parasito.

4.3 ANÁLISE SOROLÓGICA:

Uma diferença importante entre os antígenos salivares e ocultos é que enquanto os primeiros são capazes de induzir uma gama de mecanismos efetores da resposta imune, os antígenos internos ou ocultos parecem entrar em contato apenas com anticorpos produzidos pela reposta humoral (Willadsen, 2001). Os resultados obtidos na análise sorológica demonstram que a imunização dos animais do grupo GGG com o EGG foi eficiente em induzir a produção de anticorpos específicos contra este antígeno. Os valores médios de absorvância de IgG anti-EGG aumentaram a partir do 7º dia após a imunização e alcançaram índices máximos após a infestação artificial (figura 8). Contudo, a resposta humoral alcançada pelos animais não foi capaz de protegê-los do desafio parasitário. Esses resultados reforçam a hipótese de que as moléculas antigênicas presentes no EGG que induziram a resposta humoral não desempenham funções biológicas importantes na sobrevivência das fêmeas de *A. cajennense*. Outra possível justificativa é que o número de aplicações, a dose de antígeno utilizada e consequentemente a quantidade de anticorpos produzidos não foi suficiente para produzir um efeito deletério nos ixodídeos que estavam se alimentando nos animais imunizados. Jittapalpong et al. (2000) obtiveram resultados satisfatórios na imunização de cães com antígenos intestinais de *R. sanguineus*. Todavia, esses autores realizaram três imunizações nos animais experimentais, enquanto que no presente experimento, os coelhos do grupo GGG só receberam duas doses de EGG.

Após a infestação parasitária, os valores de absorvância de IgG anti-EGG nos coelhos do grupo GGG aumentaram e atingiram o pico no dia 35 do experimento (Figura 8).

Além disso, os animais do grupo GIA apresentaram resposta humoral detectável pelo ELISA contra o extrato de glândula de Gené (Figura 6). Determinantes antigênicos comuns podem ser compartilhados entre espécies filogeneticamente diferentes de ixodídeos e entre diferentes estágios e tecidos dentro de uma mesma espécie (Wikel, 1996; Trimmell et al., 2005). Este é um ponto interessante a ser investigado, pois a possibilidade de epítomos comuns entre as secreções salivares e o EGG, dispensaria a necessidade de revacinações periódicas caso a eficácia deste último tivesse sido comprovada. Por outro lado, se essa compatibilidade antigênica realmente ocorre é esperado que a resposta imune produzida contra os antígenos derivados da glândula de Gené seja passível de ser modulada pelos ixodídeos, durante a infestação parasitária.

Todos os animais do presente experimento já apresentavam valores baixos de IgG anti-EGG, antes da imunização com o EGG ou da infestação parasitária (figuras 6, 7 e 8). Alguns trabalhos demonstram a ocorrência de reação cruzada entre antígenos presentes nas glândulas de ixodídeos e de outros artrópodes (Labarthe, 1985; denHollander e Allen, 1985, citado por Craig et al., 1996). Segundo Barriga, et al. (1991), alguns antígenos dos ixodídeos devem estar relacionados com moléculas largamente distribuídas na natureza, que provavelmente são expostas aos hospedeiros.

A pesquisa com antígenos ocultos atualmente se restringe apenas à produção de imunógenos para o controle de *B. microplus* (Mullenga, 2000). De acordo com Rechav et al. (1992), embora algum nível de imunização contra carrapatos trioxenos possa ser alcançado, a eficiência não é tão alta como a reportada para o *B. microplus* (monoxeno), provavelmente devido à maior produção de imunoglobulinas durante o longo período parasitários deste último. O gênero

Amblyomma é o que apresenta o maior número de espécies no Brasil (Oliveira et al., 2003), entretanto, este é o primeiro trabalho que sugere a pesquisa de um antígeno oculto para o controle imunológico desses ixodídeos. Apesar da imunização alcançada com o EGG no presente experimento não ter causado efeito nos carrapatos alimentados nos animais imunizados, essa ainda é uma alternativa que merece ser pesquisada devido à importância do órgão de Gené no processo de oviposição dos ixodídeos. A utilização de maiores concentrações de antígeno em contrapartida à identificação de determinantes antigênicos realmente protetores, deve ser considerada em investigações futuras.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ACKERMAN, S., CLARE, F.B., MCGILL, T.W., SONENHINE, D.E. Passage of host serum components, including antibody, across the digestive tract of *Dermacentor variabilis*, *Journal of Parasitology*, v.67, p.737-740, 1981.

ALLEN, J.R., HUMPHREYS, S.J. Immunisation of guinea pigs and cattle against ticks. *Nature*, v.280, p.491-493, 1979.

BALASHOV, Y.S. Bloodsucking ticks (Ixodoidea) Vectors of diseases of man and animals. *Miscellaneous Publications of the Entomological Society of America*, v.8, n.5, p.337, 1972.

BARRIGA, O.O., ANDUJAR, F., SAHIBI, H., ANDRZEJEWSKI, W.J. Manifestations of immunity in sheep repeatedly infested with *Amblyomma americanum* ticks. *Journal of Parasitology*, v.77, n.5, p.703-709, 1991.

- BECHARA, G.H., SZABÓ, M.P.J., MUKAI, L.S., ROSA, P.C.S. Immunization of dogs, hamsters and guinea pigs against *Rhipicephalus sanguineus* using crude unfed adult tick extracts. *Veterinary Parasitology*, v.52, p.79-90, 1994.
- CASTAGNOLLI, K.C., FIGUEIREDO, L.B., SANTANA, D., CASTRO, M.B., ROMANO, M.A., SZABÓ, M.P.J. Acquired resistance of horses to *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) ticks. *Veterinary Parasitology*, v.117, p.271-283, 2003.
- CRAIG, L.E., NORRIS, D.E., SANDERS, M.L., GLASS, G.E., SCHWARTZ, B.S. Acquired resistance and antibody response of raccons (*Procyon lotor*) to sequential feedings of *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology*, v.63, p.291-301, 1996.
- DenHOLLANDER, N., ALLEN, J.R. Dermacentor variabilis: acquired resistance to ticks in BALB/c mice. *Experimental Parasitology*, v.59, p.118-129, 1985.
- de la FUENTE, J., RODRIGUEZ, M., MONTERO, C., REDONDO, M., GARCIA-GARCIA, J.C., MENDEZ, L., SERRANO, E., VALDES, M., ENRIQUEZ, A., CANALES, M., RAMOS, E., BOUE, O., MACHADO, H., LLONART, R. Vaccination against ticks (*Boophilus* spp.): the experience with the Bm86-based vaccine Gavac (TM). *Genetic Annales Biomoleculare Ingenier*, v. 15, p.143-148, 1999.
- GUIMARÃES, J.H., TUCCI, C.E., BARROS-BATTESTI, D.M. Ectoparasitos de importância veterinária. Editoras Plêiades/FAPESP, São Paulo, SP., 218p., 2001.
- JITTAPALAPONG, S., STICH, R., GORDON, J.C., WITTUM, T.E., BARRIGA, O.O. Performance of female *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) fed on dogs exposed to multiple infestations or immunizations with tick salivary gland or midgut tissues. *Journal of Medical Entomology*, v.37, n.4, p. 601-611, 2000.
- LABARTHE, N.V. Cross- reaction of tick salivary antigens in the *Boophilus microplus* – cattle system. *Veterinary Parasitology*, v.17, p.259-263, 1984/1985.
- LABRUNA, M.B., LEITE, R.C. Reproductive aspects of *Haemaphysalis leporispalustris*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.92, n.3, p.373-376, 1997.
- LEITE, R.C., OLIVEIRA, P.R., LOPES, C.M.L., FREITAS, C.M.V. A febre Maculosa que vem do carrapato – *Amblyomma cajennense*: uma proposta de controle estratégico. *Vetores e Pragas*. v.2, 1998.
- LINTHICUM, K.J., LOGAN, T.M., BAILEY, C.L., GORDON, S.W., PETER, C.J., MONATH, T.P., OSORIO, J., FRANCO, D.B., McLEAN, R.G., LEDUC, J.W. Venezuelan equine encephalomyelitis virus infection in and transmission by the tick *Amblyomma cajennense* (Arachnida: Ixodidae). *Journal of medical Entomology*, v.28, n.3, p.405-409, 1991.
- LOPES C. M. L., LEITE R. C., LABRUNA, M. B., OLIVEIRA, P. R., BORGES L. M. F., RODRÍGUEZ, B. Z., CARVALHO H. A., FREITAS C. M. V., VIEIRA JÚNIOR C. R. Host specificity of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) with comments on the drop-off rhythm. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 93, n.3, p.347-351, 1998.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J. FARR, L.A., RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, v.193, p.256-275, 1951.
- MASSARD CA. *Ehrlichia bovis* (Donatien & Lestoquard, 1936). Diagnóstico, Cultivo

"in Vitro" e Aspectos Epidemiológicos em Bovinos no Brasil, Tese de Doutorado, UFRRJ, Itaquai, Rio de Janeiro, 113 pp, 1984.

MULENGA, A., SUGIMOTO, C., ONUMA, M. Issues in tick vaccine development: identification and characterization of potential candidate vaccine antigens. *Microbes and Infections*, v.2, p.1353-1361, 2000.

O'DWYER, L.H., MASSARD, C.L., SOUZA, J.C.P. Hepatozon canis infection associated with dog ticks of rural areas of Rio de Janeiro state, Brazil. *Veterinary Parasitology*, v.94, v.3, p.143-150, 2001.

OLIVEIRA, P.R. *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) Avaliação de técnica para estudo de dinâmica populacional e bioecologia em Pedro Leopoldo, Minas Gerais. Belo Horizonte: Escola de Veterinária da UFMG. 1998. 110p. (Tese de Doutorado).

OLIVEIRA, P.R., BORGES, L.M., LEITE, R.C., FREITAS, C.M.V. Seasonal dynamics of the Cayenne tick, *Amblyomma cajennense* on horses in Brazil. *Medical and Veterinary Entomology*, v.17, p.412-416, 2003.

PATARROYO, J.H., PORTELA, R.W., De CASTRO, R.O., PIMENTEL, J.C., GUZMAN, F., PATARROYO, M.E., VARGAS, M.I., PRATES, A.A., MENDES, M.A.D. Immunization of cattle with synthetic peptides derived from the *Boophilus microplus* gut protein (Bm86). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.88, p.163-172, 2002.

PINHEIRO, V.R.E. Avaliação do efeito carrapaticida de alguns piretróides sintéticos sobre o carrapato *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acarina: Ixodidae). Itaguaí: Universidade Federal

Rural do Rio de Janeiro, 1987, 126p. (Tese de Mestrado).

PINTER, A., LABRUNA, M.B., FACCINI, J.L.H. The sex ratio of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) with notes on the male feeding period in the laboratory. *Veterinary Parasitology*, v.105, p.79-88, 2002.

RECHAV, Y., SPICKETT, A.M., DAUTH, J., TEMBO, S.D., CLARKE, F.C., HELLER-HAUPT, A., TRINDER, P.K.E. Immunization of guinea-pigs and cattle against adult *Rhipicephalus appendiculatus* ticks using semipurified nymphal homogenates and adult gut homogenate. *Immunology*, v.75, p.700-706, 1992.

RIBEIRO, J.M.C. Role of saliva in tick/host interactions. *Experimental and Applied Acarology*, v.7, p.15-20, 1989.

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

SAHIBI, H., RHALEM, A., BARRIGA, O.O. Comparative immunizing power of infections salivary extracts, and intestinal extracts of *Hyalomma marginatum marginatum* in cattle. *Veterinary Parasitology*, v.68, p.359-366, 1997.

SANDERS, M.L., GLASS, G.E., SCOTT, A.L., SCHWARTZ, B.S. Kinetics and cross-species comparisons of host antibody response to Lone Star Tick and American Dog Ticks (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology*, v.35, n.5, p.849-856, 1998.

SANGIONI, L.A., HORTA, M.C., VIANNA, M.C.B., GENNARI, S.M., SOARES, R.M., GALVÃO, M.A.M., SCHUMAKER, T.T.S., FERREIRA, F., VIDOTTO, O., LABRUNA, M.B. Rickettsial infection in animals and

- brazilian spotted fever endemicity. *Emerging Infectious Diseases*, v.11, n.2, p.265-270, 2005.
- SHÖL, H., SIEBERZ, J., GÖBEL, E., GOETHE, R. Morphology and structural organization of Gené's organ in *Dermacentor reticulatus* (Acari: Ixodidae). *Experimental and Applied Acarology*, V.25, p.327-352, 2001.
- SONENSHINE, D.E., *Biology of Tick*. Vol.1. Oxford University Press, New York. 447 p., 1991.
- TEGLAS, M., MATERN, E., LEIN, S., FOLEY, P., MAHAN, S.M., FOLEY, J. Tick and tick-borne disease in Guatemalan cattle and horses. *Veterinary Parasitology*, v. 131, n.1-2, p.119-127, 2005.
- TELLAM, R.L., KEMP, D., RIDING, G., BRISCOE, S., SMITH, D., SHARP, P., IRVING, D., WILLADSEN, P. Reduced oviposition of *Boophilus microplus* feeding on sheep vaccinated with vitelin. *Veterinary Parasitology*, v.103, p.141-156, 2002.
- TRIMNELL, A.R., DAVIES, G.M., LISSINA O., HAILS, R.S., NUTTALL P.A. A cross-reactive tick cement antigen is a candidate broad-spectrum tick vaccine. *Vaccine*, v. 23, n.34, p.4329-4341, 2005.
- VAZ Jr., I.S., MARTINEZ, R.H.M., OLIVEIRA, A., HECK, A., LOGULLO, C., GONZALES, J.C., DEWES, H., MASUDA, A. Functional bovine immunoglobulins in *Boophilus microplus* hemolymph. *Veterinary Parasitology*, v.62, p.155-160, 1996.
- VAUGHAN, J.A., SONENSHINE, D.E., AZAD, A.F. Kinetics of ingested host immunoglobulin G in hemolymph and whole body homogenates during nymphal development of *Dermacentor variabilis* and *Ixodes ricinus* ticks (Acari: Ixodidae). *Experimental and Applied Acarology*, v.27, p.329-340, 2002.
- WALKER, J.B., OLWAGE, A. The tick vectors of *Cowdria ruminantium* (Ixodoidea, Ixodidae, genus Amblyomma) and their distribution. *Onderstepoort Journal Veterinary Research*, v.54, n.3, p.353-379, 1987.
- WANG, H., NUTTAL, P.A. Excretion of host immunoglobulin in tick saliva and detection of IgG-binding proteins in tick haemolymph and salivary glands. *Parasitology*, v.109, p.525-530, 1994.
- WHELEN A.C., WIKEL, S.K. Acquired resistance of guinea pigs to *Dermacentor andersoni* mediated by humoral factors. *Journal of Parasitology*, v.79, n.6, p.908-912, 1993.
- WILLADSEN, P. Immunity to ticks. *Advances in Parasitology*, v.18, p.293-313, 1980.
- WILLADSEN, P., BIRD, P., COBON, G.S., HUNGERFORD, J., TOMLEY, F.M., TAYLOR, D.W. Commercialisation of a recombinant vaccine against *Boophilus microplus*, *Parasitology*, v.110, p.43-50, 1995.
- WILLADSEN, P. The molecular revolution in the development of vaccines against ectoparasites. *Veterinary Parasitology*, v.101, p.353-367, 2001.
- WIKEL, S.K. *The Immunology of Host-Ectoparasitic Arthropod relationships*. 1 ed. Wallingford: Cab International, 1996. 331 p.
- WIKEL, S.K., BERGMAN, D. Tick-host immunology: significant advances and challenging opportunities. *Parasitology Today*, v.13, n.10, 1997

Tabela 2-Parâmetros parasitários e reprodutivos (média ± desvio padrão) das teleóginas de *A. cajennense* coletadas nos coelhos do grupo GIA, nas sucessivas infestações.

Parâmetros	Infestações		
	Primeira	Segunda	Terceira
Taxa de Recuperação (%)	38,33 ^a	21,67 ^b	15,00 ^b
Parasitários			
Período de Parasitismo (dias)	10,217 ± 1,65 ^a	11,46 ± 2,03 ^a	10,33 ± 1,87 ^a
Peso Corporal (mg)	746,13 ± 176,27 ^a	546,31 ± 243,02 ^b	531,11 ± 176,85 ^b
IEAL [*]	75,70 ± 24,44 ^a	49,54 ± 22,36 ^b	51,95 ± 17,37 ^b
Reprodutivos			
Peso da Postura (mg)	379,17 ± 116,21 ^a	239,62 ± 159,82 ^b	257,78 ± 110,04 ^b
Eclodibilidade (%)	85,87 ± 11,25 ^a	62,08 ± 32,44 ^b	85,56 ± 7,68 ^a
IEPO [†]	50,33 ± 8,95 ^a	42,63 ± 12,25 ^b	46,17 ± 12,31 ^{ab}
IEPL [‡]	43,55 ± 10,70 ^a	29,32 ± 17,57 ^b	39,45 ± 11,22 ^{ab}

* Índice de Eficiência Alimentar: peso corporal (mg) / período de postura (dias)

† Índice de Eficiência de Produção de ovos: peso postura (mg) / peso corporal (mg) x 100

‡ Índice de Eficiência de Produção de Larvas: peso postura (mg) / peso corporal (mg) x eclodibilidade (%)

^{a,b} Letras diferentes em uma mesma linha indicam diferença significativa (p<0,05) – Teste T de Student

Tabela 3-Parâmetros parasitários e reprodutivos (média ± desvio padrão) das teleóginas de *A. cajennense* provenientes da terceira infestação dos coelhos do grupo GIA e da primeira infestação dos animais dos grupos GGG e GC.

Parâmetros	GRUPOS		
	GIA (3ª Infestação)	GGG	GC
Taxa de Recuperação (%)	15,00 ^a	43,33 ^b	40,00 ^b
Parasitários			
Período de Parasitismo (dias)	10,33 ± 1,87 ^a	10,47 ± 1,27 ^a	10,58 ± 2,19 ^a
Peso Corporal (mg)	531,11 ± 176,85 ^{a§}	755,23 ± 235,08 ^b	693,67 ± 197,60 ^{b§}
IEAL [*]	51,95 ± 17,37 ^a	74,02 ± 25,02 ^b	68,71 ± 22,86 ^b
Reprodutivos			
Peso da Postura (mg)	257,78 ± 110,04 ^a	386,88 ± 132,21 ^b	380,17 ± 147,01 ^{ab}
Eclodibilidade (%)	85,56 ± 7,68 ^a	86,15 ± 9,83 ^a	84,79 ± 15,43 ^a
IEPO [†]	46,17 ± 12,31 ^{a§}	51,02 ± 6,53 ^a	53,61 ± 11,19 ^{a§}
IEPL [‡]	39,45 ± 11,22 ^a	43,88 ± 7,19 ^a	44,45 ± 12,16 ^a

* Índice de Eficiência Alimentar: peso corporal (mg) / período de postura (dias)

† Índice de Eficiência de Produção de ovos: peso postura (mg) / peso corporal (mg) x 100

‡ Índice de Eficiência de Produção de Larvas: peso postura (mg) / peso corporal (mg) x eclodibilidade (%)

^{a,b} Letras diferentes em uma mesma linha indicam diferença significativa (p<0,05) – Teste T de Student

§ Valores significativamente diferentes se p<0,10

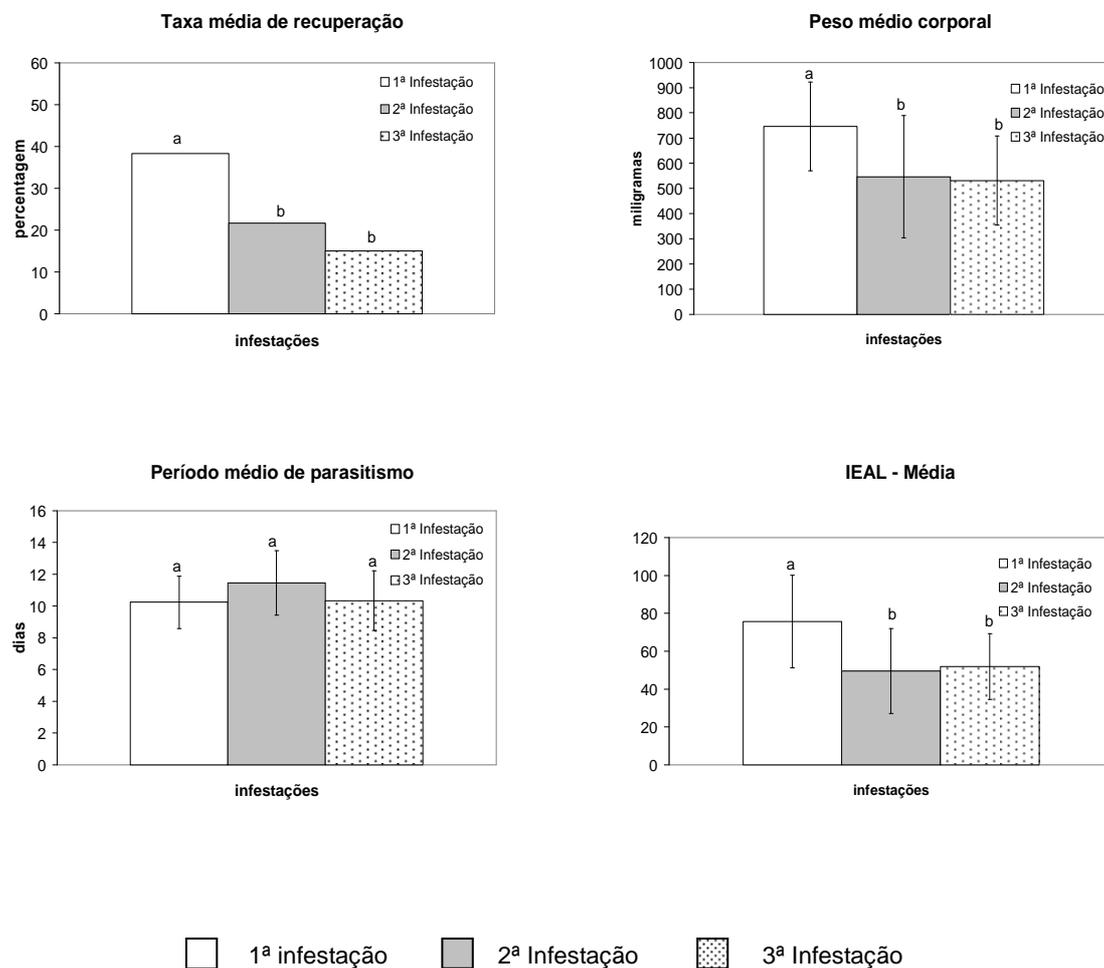


Figura 2- Parâmetros parasitários médios (peso corporal, período de parasitismo, taxa de recuperação e Índice de Eficiência na Alimentação -IEAL) reportados nos carrapatos obtidos dos coelhos do Grupo Infestação Artificial (GIA), durante as sucessivas infestações. ^{a,b}Letras diferentes em cima das barras indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

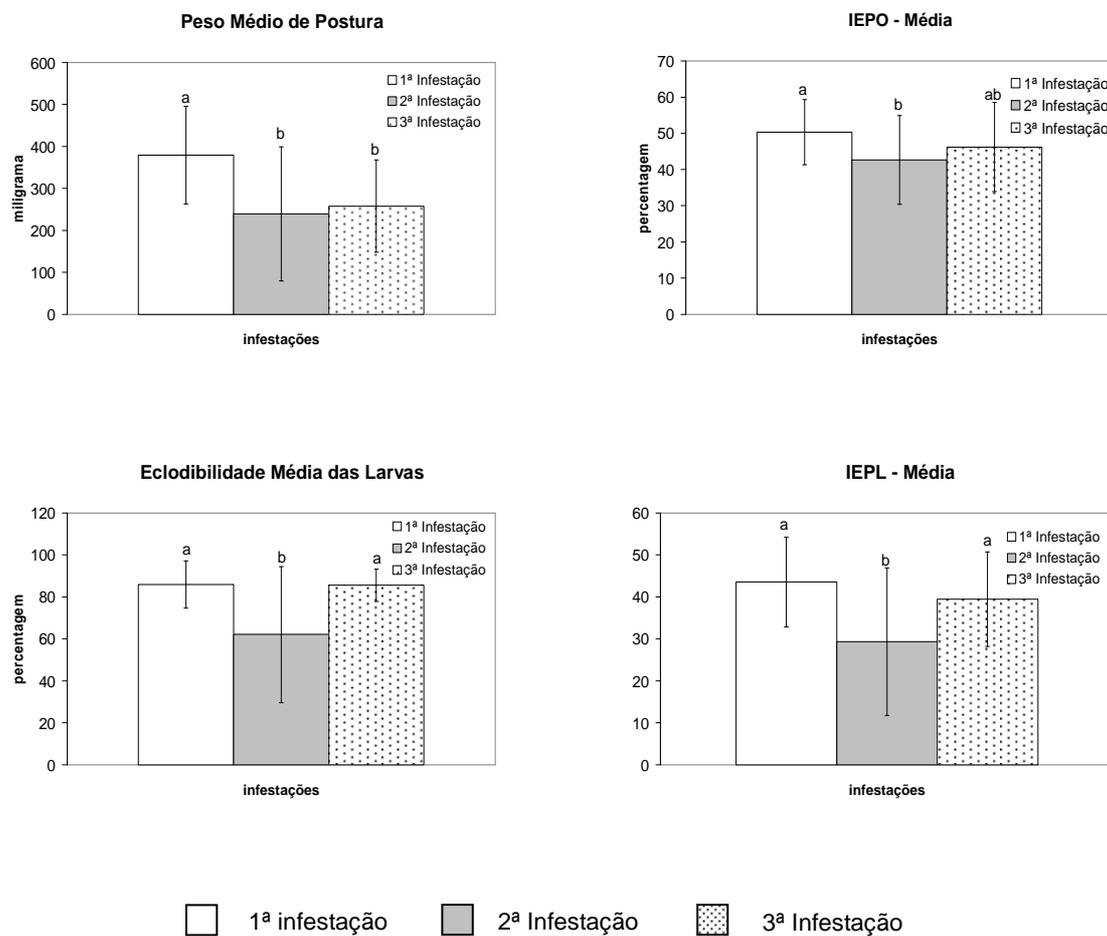


Figura 3- Parâmetros reprodutivos médios (peso postura, eclodibilidade das larvas, índice de eficiência na produção de ovos - IEPO e índice de eficiência na produção de larvas – IEPL) reportados nos carrapatos obtidos dos coelhos do Grupo Infestação Artificial (GIA), durante as sucessivas infestações. ^{a,b}Letras diferentes em cima das barras indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

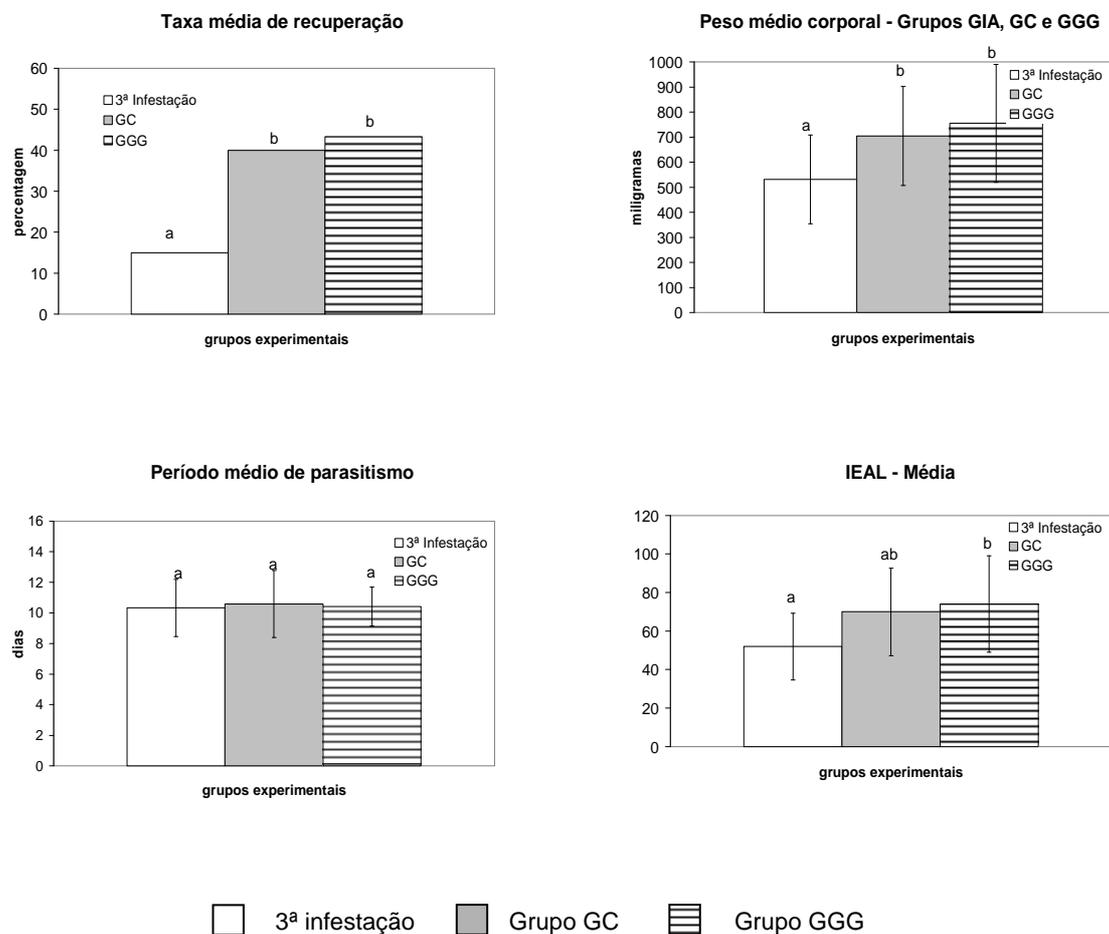


Figura 4- Parâmetros parasitários médios (peso corporal, período de parasitismo, taxa de recuperação e Índice de Eficiência Alimentar -IEAL) reportados carrapatos obtidos da terceira infestação dos coelhos do Grupo Infestação Artificial (GIA) e da infestação dos coelhos do Grupo Controle (GC) e do Grupo Glândula de Gené (GGG).^{a,b} Letras diferentes em cima das barras indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

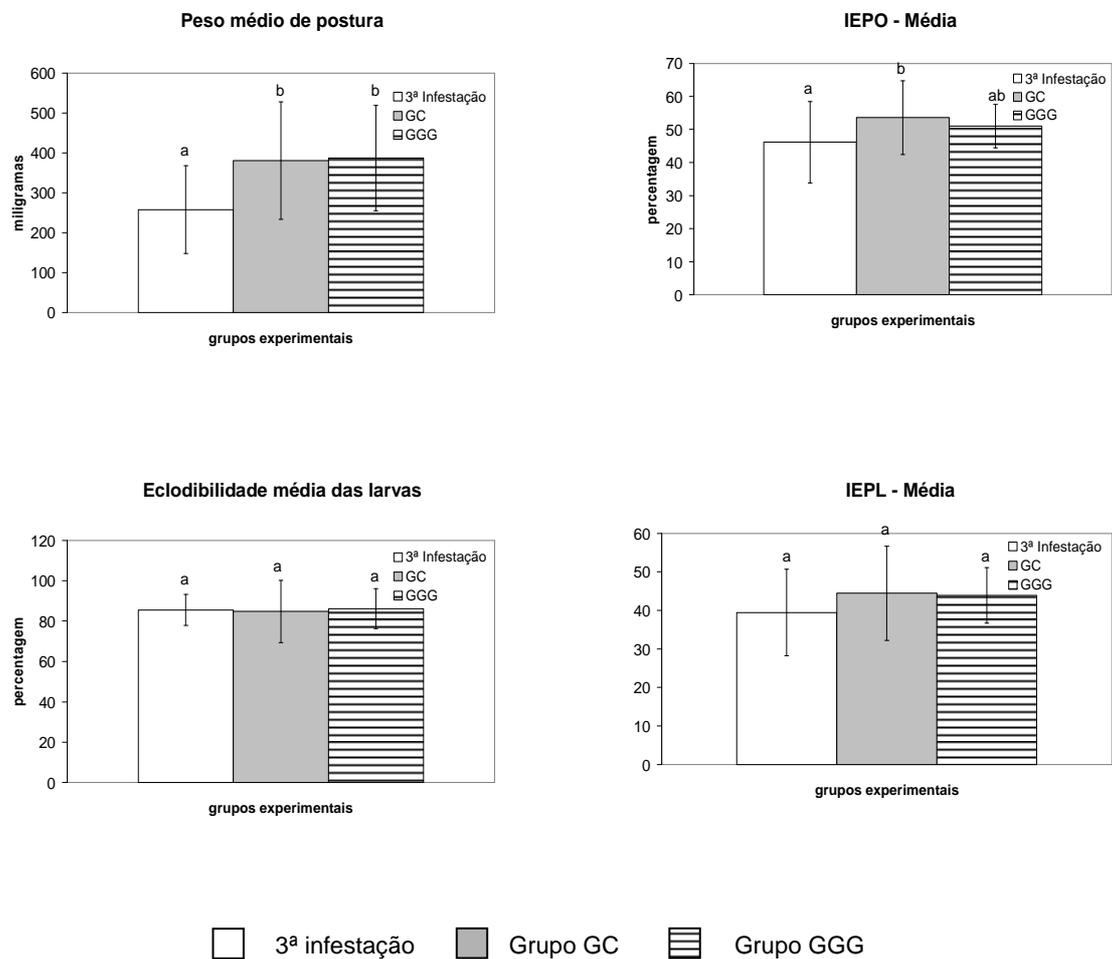


Figura 5- Parâmetros reprodutivos médios (peso postura, eclodibilidade das larvas, Índice de Eficiência na Produção de Ovos -IEPO e Índice de Eficiência na Produção de Larvas -IEPL) reportados nos carrapatos obtidos da terceira infestação dos coelhos do Grupo Infestação Artificial (GIA) e da infestação dos coelhos do Grupo Controle (GC) e do Grupo Glândula de Gené (GGG).^{a,b} Letras diferentes em cima das barras indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

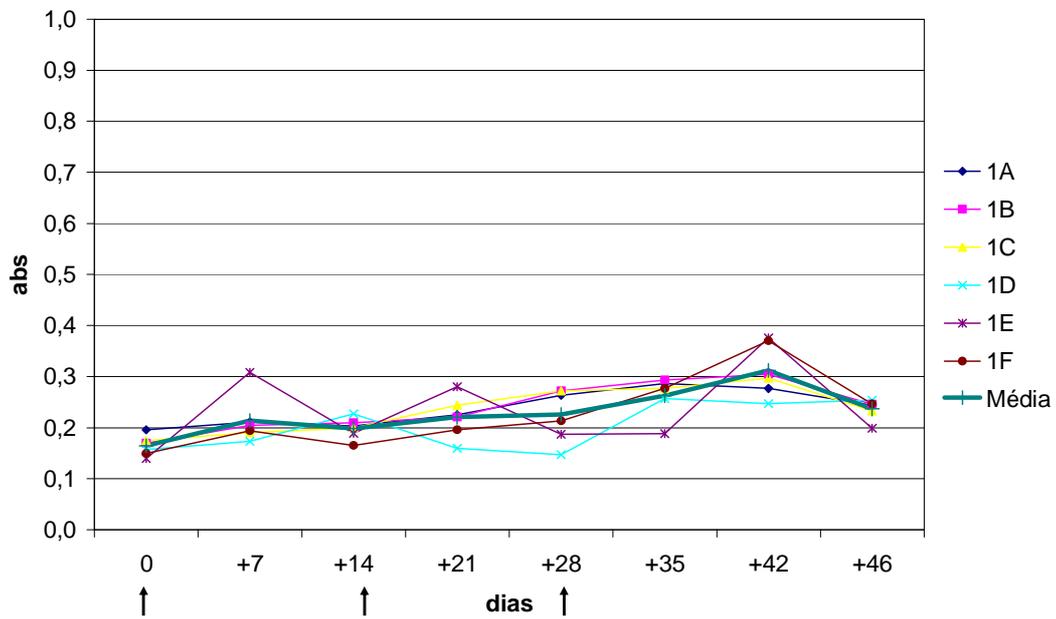


Figura 6-Valores de absorbância de IgG anti-EGG no soro de coelhos pertencentes ao Grupo Infestação Artificial (GIA). As setas correspondem aos dias de infestação.

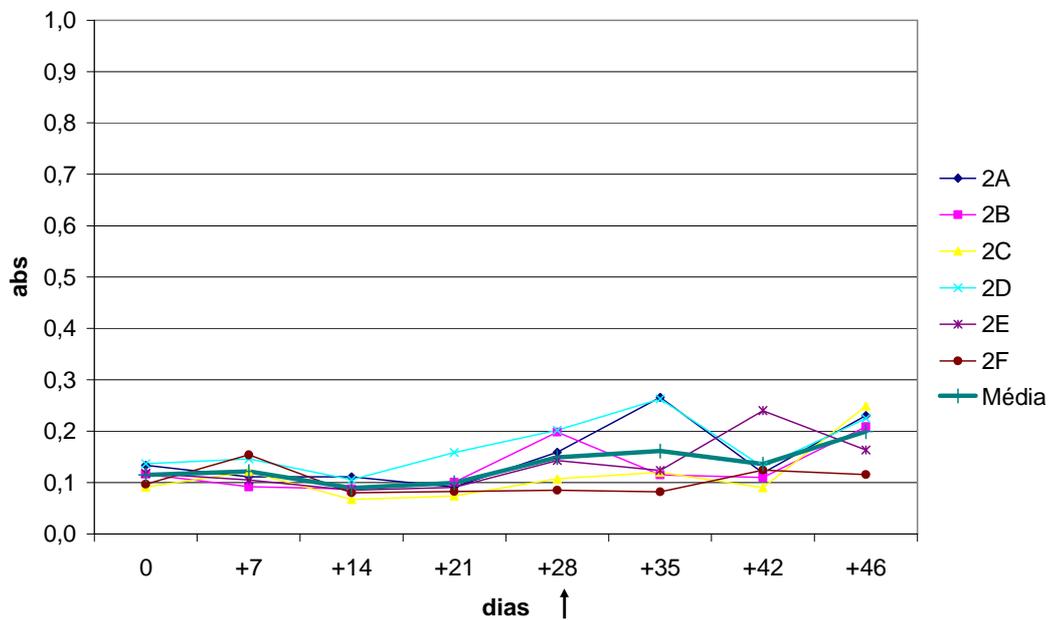


Figura 7-Valores de absorbância de IgG anti-EGG no soro de coelhos pertencentes ao Grupo Controle (GC). As setas correspondem aos dias de infestação

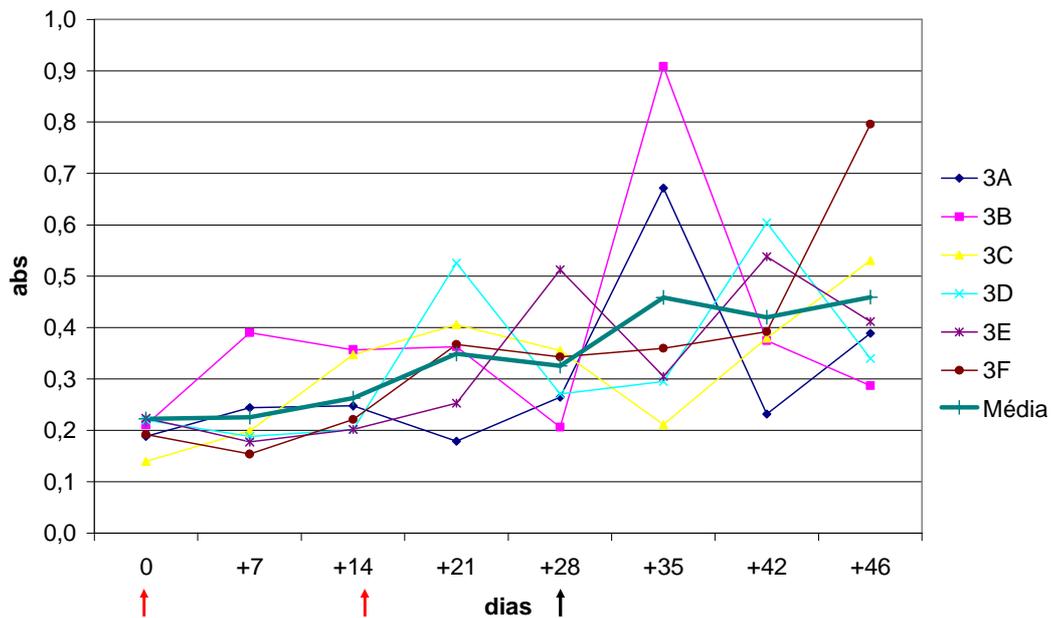


Figura 8-Valores de absorvância de IgG anti-EGG no soro de coelhos pertencentes ao Grupo Glândula de Gene (GGG). As setas vermelhas correspondem aos dias de imunização e a preta ao dia de infestação

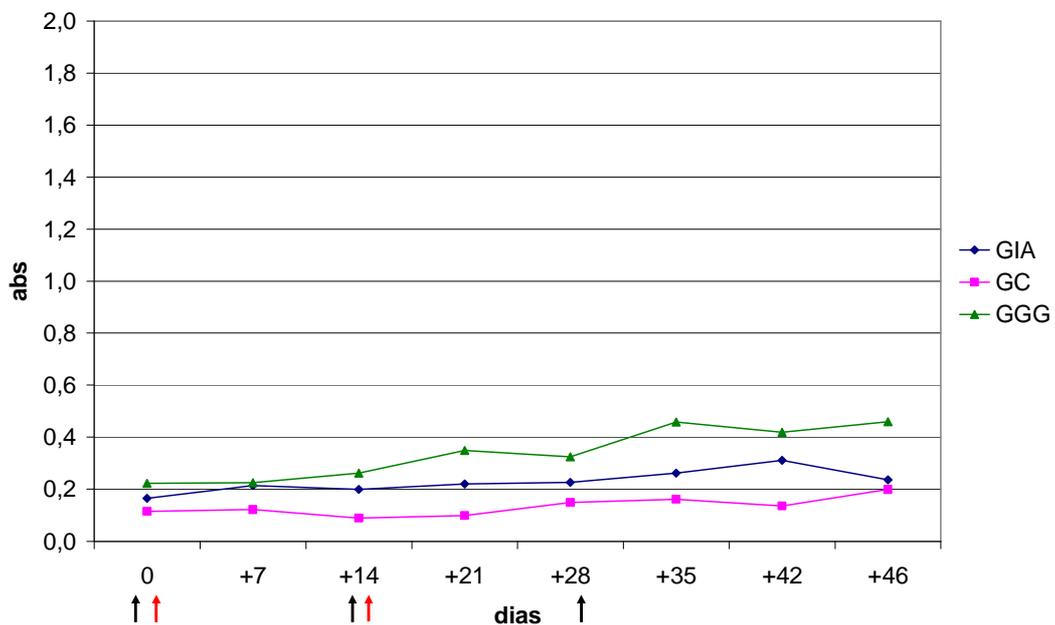


Figura 9-Valores médios de absorvância de IgG anti-EGG no soro de coelhos pertencentes aos Grupo Infestação Artificial (GIA), Grupo Controle (GC) e Grupo Glândula Salivar (GGG). As setas vermelhas correspondem aos dias de imunização e as pretas aos dias de infestação.

CONSIDERAÇÕES FINAIS:

Coelhos submetidos a três infestações pelos diferentes estágios de *A. cajennense* adquiriram resistência imune. O parasitismo por larvas e ninfas provocou uma resposta imune mais tardia e menos vigorosa nos animais desafiados, fato que confirma a menor especificidade parasitária dos estágios imaturos de desenvolvimento desse ixodídeo. Os parasitos adultos foram mais rápidos e eficientes em induzir resistência nos coelhos parasitados, uma vez que se verificou uma redução significativa nos principais parâmetros parasitários e reprodutivos das teleóginas recuperadas a partir da segunda infestação. Esse fenômeno foi evidente tanto nos carrapatos recuperados dos animais do grupo GN quanto nos provenientes dos coelhos do grupo GIA, representando um padrão na resposta avaliada. Em contrapartida, observou-se que a partir da terceira infestação experimental, resistência imune dos coelhos infestados por carrapatos adultos apresentou tendência decrescente ou de se manter estável, sugerindo a ocorrência de modulação na imunidade adquirida. Considerando que os parasitos adultos se alimentam por mais tempo e consequentemente inoculam uma maior variedade e quantidade de moléculas antigênicas nos hospedeiros, é provável que eles sejam mais capazes de estimular e de controlar a resposta imune dos animais parasitados. Indiscutivelmente, esses mecanismos de modulação são mais evidentes nos hospedeiros naturais com os quais o *A. cajennense* tem co-evoluído por mais tempo. No entanto, a pressão imposta pelos desafios parasitários consecutivos nos coelhos do presente experimento, fato que não ocorre em suas condições naturais de infestação por *A. cajennense* nestes hospedeiros, pode ter precipitado o desenvolvimento da modulação e, possivelmente, da adaptação da resposta imune.

A imunização dos coelhos com o EGS foi eficiente em induzir tanto a resposta humoral quanto a resposta celular. Além disso, os índices médios de eficiência na produção de ovos e larvas foram significativamente reduzidos nos carrapatos recuperados nos animais imunizados. Todavia, ao contrário do que era esperado, nenhum efeito foi observado sobre os parâmetros parasitários das fêmeas ingurgitadas que foram obtidas. Esses resultados sugerem que a resposta imune do hospedeiro não se restringe apenas ao local de parasitismo e que sua ação parece persistir mesmo após os ixodídeos abandonarem o hospedeiro. É provável que os diferentes mecanismos efetores da resposta imune tenham atingido os órgãos internos dos carrapatos, responsáveis pelo desempenho reprodutivo dos parasitos. Além disso, sabe-se que determinantes antigênicos comuns podem ser compartilhados entre espécies filogeneticamente diferentes e entre diferentes estágios e tecidos dentro de uma mesma espécie (Wikel, 1996; Trimnell et al., 2005) o que justifica o fato da imunização com EGS ter induzido a produção de anticorpos específicos que provavelmente se ligaram em órgãos ou tecidos internos dos carrapatos.

A imunização dos coelhos do grupo GGG o EGG não produziu o efeito esperado, uma vez que a eclodibilidade média dos ovos das fêmeas ingurgitadas que foram recuperadas nos animais imunizados foi semelhante à reportada nos parasitos provenientes dos coelhos primo-infetados (Grupo GC). Apesar do EGG ter estimulado a produção de anticorpos específicos nos animais vacinados, a resposta humoral desenvolvida não foi capaz de protegê-los do desafio parasitário. Curiosamente, os valores de absorvância de IgG anti-EGG aumentaram após a infestação parasitária, indicando a ocorrência de reação cruzada entre os antígenos presentes na glândula

salivar e na glândula de Gené. É provável que a dose de antígeno utilizada tenha sido insuficiente para produzir uma resposta imune protetora ou que os determinantes antigênicos presentes na glândula de Gené sejam incapazes de induzir resistência imune nos animais imunizados. Essas observações sugerem que maiores estudos são necessários para se descartar ou propor a utilização do EGG como alternativa para o controle imunológico do *A. cajennense*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS:

- ACKERMAN, S., CLARE, F.B., MCGILL, T.W., SONENHINE, D.E. Passage of host serum components, including antibody, across the digestive tract of *Dermacentor variabilis*, *Journal of Parasitology*, v.67, p.737-740, 1981.
- ALLEN, J.R. Tick resistance: basophils in skin reaction of resistant guinea pigs. *Int. J. Parasitol.*, v.3, p.195-200, 1973.
- ALLEN, J.R., HUMPHREYS, S.J. Immunisation of guinea pigs and cattle against ticks. *Nature*, v.280, p.491-493, 1979.
- ALLEN, J.R., KHALIL, H.M., GRAHAM, J.E. The location of tick salivary antigens, complement and immunoglobulin in the skin of guinea-pigs infested with *Dermacentor andersoni* larvae. *Immunology*, v.38, p.467-472, 1979.
- ANDREOTTI R.A., GOMES, A., MALAVAZI-PIZA, K.C., TANAKA, A.S. Controle do carrapato por meio de vacina – situação atual e perspectivas. EMBRAPA, v. 134, Campo Grande, 2002.
- ARAGÃO, H.B. Ixodidas brasileiros e de alguns países limítrofes. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.31, n.4, p.759-843, 1936.
- BALASHOV, Y.S. Bloodsucking ticks (Ixodoidea) Vectors of diseases of man and animals. *Miscellaneous Publications of the Entomological Society of America*, v.8, n.5, p.337, 1972.
- BARRIGA, O.O., ANDUJAR, F., SAHIBI, H., ANDRZEJEWSKI, W.J. Manifestations of immunity in sheep repeatedly infested with *Amblyomma americanum* ticks. *J. Parasitol.*, v.77, n.5, p.703-709, 1991.
- BECHARA, G.H., SZABÓ, M.P.J., MUKAI, L.S., ROSA, P.C.S. Immunization of dogs, hamsters and guinea pigs against *Rhipicephalus sanguineus* using crude unfed adult tick extracts. *Vet. Parasitol.*, v.52, p.79-90, 1994.
- BORGES, L.M.F., OLIVEIRA, P.R., LISBOA, C.L.M., RIBEIRO, M.F.B. Horse resistance to natural infestations of *Anocentor nitens* and *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology*, v.104, p.265-273, 2002.
- BROSSARD, M., WIKEL, S.K., Tick immunobiology. *Parasitology*, v.129, p. s161-s176, 2004.
- BROWN, S.J. Highlights of contemporary research on host immune responses to ticks. *Veterinary Parasitology*, v.28, p.321-334, 1988.
- BROWN, S.J., KNAPP, F.W. *Amblyomma americanum*: sequential histological analysis of larval and nymphal feeding sites on guinea pigs. *Exp. Parasitol.*, v.49, p.188-205, 1980.
- 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. *The Journal of Immunology*, v.129, n.2, p.790-796, 1982.

- BROWN, S.J., SHAPIRO, S.Z., ASKENASE, P.W. Characterization of tick antigens inducing host immune resistance: I. Immunization of guinea pigs with *Amblyomma americanum*-derived salivary gland extracts and identification of an important salivary gland protein antigen with guinea pig anti-tick antibodies. *The Journal of Immunology*, v.133, n.6, p.3319-3325, 1984.
- CASTAGNOLLI, K.C., FIGUEIREDO, L.B., SANTANA, D., CASTRO, M.B., ROMANO, M.A., SZABÓ, M.P.J. Acquired resistance of horses to *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) ticks. *Veterinary Parasitology*, v.117, p.271-283, 2003.
- CHABAUD, A.G. L'infestation par des Ixodines provoque-t-elle une immunité chez l'hôte? *Annales de Parasitologie*. v.25, p.474-479, 1950.
- 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). *Veterinary Parasitology*, v.63, p.291-301, 1996.
- CUPP, E.W. Biology of tick. In: *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, v.21, n.1, p. 1-26, 1991.
- de la FUENTE, J., RODRIGUEZ, M., MONTERO, C., REDONDO, M., GARCIA-GARCIA, J.C., MENDEZ, L., SERRANO, E., VALDES, M., ENRIQUEZ, A., CANALES, M., RAMOS, E., BOUE, O., MACHADO, H., LLONART, R. Vaccination against ticks (*Boophilus* spp.): the experience with the Bm86-based vaccine Gavac (TM). *Genetic Annales Biomoleculare Ingenier*, v. 15, p.143-148, 1999.
- DenHOLLANDER, N., ALLEN, J.R. Dermacentor variabilis: acquired resistance to ticks in BALB/c mice. *Experimental Parasitology*, v.59, p.118-129, 1985.
- FERREIRA, B.R., SILVA, J.S. Saliva of *Rhipicephalus sanguineus* tick impairs T cell proliferation and INF- γ induced macrophage microbicidal activity. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.64, p.279-293, 1998.
- FERREIRA, B.R., SILVA, J.S. Successive tick infestations selectively promote a t-helper 2 cytokine profile in mice. *Immunology*, v.96, p.434-439, 1999.
- FREITAS, C.M.V., LEITE, R.C., LOPES, C.M.L., RODRIGUES, D.S., OLIVEIRA, P.R. Lack of parthenogenetic reproduction in *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari, Ixodidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.97, n.6, p.843-846, 2002.
- GALBE, J., OLIVER Jr., J.H. Immune Response of lizards and rodents to larval *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology*, v.29, n.5, p.774-782, 1992.
- GEORGE, J.E., OSBUN, R.L., WIKEL, S.K. Acquisition and expression of resistance by *Bos indicus* and *Bos indicus* x *Bos taurus* calves to *Amblyomma americanum* infestation. *The Journal of Parasitology*, n.7, v.2, p.174-182, 1985.
- GUIMARÃES, J.H., TUCCI, C.E., BARROS-BATTESTI, D.M. Ectoparasitos de importância veterinária. Editoras Plêiades/FAPESP, São Paulo, SP., 218p., 2001.
- HLATSHWAYO, M., SZABO, M.J., BECHARA, G.H., MBATI, P.A. Cross-reactivity between antigens from *Amblyomma cajennense* and *A. hebraeum*

- (Acari: Ixodidae). *J S Afr Vet Assoc.*, v.75, n.1, p.40-42, 2004.
- HLATSHWAYO, M., SZABO, M.J., BECHARA, G.H., MBATI, P.A. Cutaneous hypersensitivity induced in rabbits by extracts of the tick *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). *J S Afr Vet Assoc.*, v.75, n.1, p.37-39, 2004b.
- INOKUMA, H., TAMURA, K., ONISHI, T. Dog develop resistance to *Rhipicephalus sanguineus*. *Veterinary Parasitology*, v.68, p.295-297, 1997.
- JITTAPALAPONG, S., STICH, R., GORDON, J.C., WITTUM, T.E., BARRIGA, O.O. Performace of female *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) fed on dogs exposed to mutiple infestations or immunizations with tick salivary gland or midgut tissues. *Journal of Medical Entomology*, v.37, n.4, p. 601-611, 2000.
- KEMP, D.H., KOUDSTAAL, D., ROBERTS, J.A., KEER, J.D. *Boophilus microplus*: the effect of host resistance on larval attachments and growth. *Parasitology*, v.73, p. 123-136, 1976.
- KOPECKÝ, J., KUTHEJLOVÉ, M. Supressive effect of *Ixodes ricinus* salivary gland extract on mechanisms of natural immunity in vitro. *Parasite Immunology*, v.20, n. 4, p.169-17, 1998.
- KUBES, M., FUCHSBERGER, N., LABUDA, M., ZUFFOVÁ, E., NUTTAL, P.A. Salivary gland extracts of partially fed *Dermacentor reticulatus* tick decrease natural killer cell activity *in vitro*. *Immunology*, v.82, p.113-116, 1994.
- LABARTHE, N.V. Cross- reaction of tick salivary antigens in the *Boophilus microplus* – cattle system. *Veterinary Parasitology*, v.17, p.259-263, 1984/1985.
- LABRUNA, M.B., LEITE, R.C. Reproductive aspects of *Haemaphysalis leporispalustris*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.92, n.3, p.373-376, 1997.
- LABRUNA M.B., KERBER C.E., FERREIRA F., FACCINI J.L., DE WAAL D.T., GENNARI S.M. Risk factors to tick infestations and their occurrence on horses in the state of Sao Paulo, Brazil. *Veterinary Parasitology*, v.97, n.1, p.1-14, 2001.
- LABRUNA, M.B., KASAI, N., FERREIRA, F., FACCINI, J.L.H., GENNARI, S.M. Seasonal dynamics of ticks (Acari: Ixodidae) on horses in the state of São Paulo, Brazil. *Veterinary Parasitology*, v.105, p. 65-77, 2002.
- LABRUNA, M.B., AMAKU, M., METZNER, J.A., PINTER, A., FERREIRA, F. Larval behavioral diapause regulates life cycle of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) in Southeast Brazil. *Journal of Medical Entomology*, v.40, n.2, p.170-178, 2003.
- LATIF, A.A., MAINE, J.N., DHADIALLA, T.S., NOKOE, S. Histological reactions to bites of *Amblyomma variagatum* and *Rhipicephalus appendiculatus* (Acari:Ixodidae) fed simultaneously on naive or sensitized rabbits. *J. Med. Entomol.*, v.27, n.3, p.316-323, 1990.
- LATIF, A.A., PUNYUA, P.B., CAPSTICK, S., WALKER, A.R., FLETCHER, J.D. Histopatology of attachment sites of *Amblyomma variegatum* and *Rhipicephalus appendiculatus* on zebu cattle of varying resistance to tick. *Veterinary Parasitology*, v.38, p. 205-213, 1991.
- LEITE,R.C., OLIVEIRA,P.R., LOPES,C.M.L., FREITAS, C.M.V. A febre Maculosa que vem do carrapato – *Amblyomma cajennense*: uma proposta de

controle estratégico. *Vetores e Pragas*. v.2, 1998.

LINTHICUM, K.J., LOGAN, T.M., BAILEY, C.L., GORDON, S.W., PETER, C.J., MONATH, T.P., OSORIO, J., FRANCY, D.B., McLEAN, R.G., LEDUC, J.W. Venezuelan equine encephalomyelitis virus infection in and transmission by the tick *Amblyomma cajennense* (Arachnida: Ixodidae). *Journal of medical Entomology*, v.28, n.3, p.405-409, 1991.

LOBATO, V., RATH, S., REYES, F.G.R. Considerações sobre a presença de ivermectina em alimentos de origem animal. *Revista Brasileira de Toxicologia*, v.17, n.1, p.27-38, 2004.

LOPES C. M. L., LEITE R. C., LABRUNA, M. B., OLIVEIRA, P. R., BORGES L. M. F., RODRÍGUEZ, B. Z., CARVALHO H. A., FREITAS C. M. V., VIEIRA JÚNIOR C. R. Host specificity of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) with comments on the drop-off rhythm. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 93, n.3, p.347-351,1998.

LOPES,C.M.L., OLIVEIRA, P.R., HADDAD, J.P.A., PINHEIRO, R.R., FREITAS, C.M.V. PAZ, G.F., LEITE, R.C. Reproductive parameters and conversion efficiency index (CEI) of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) females under field and laboratory conditions. *Revue Méd. Vét*, v.151, n.10, p. 945-948, 2000.

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J. FARR, L.A., RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, v.193, p.256-275, 1951.

MALE, D., ROITT, I., BROSTOFF, J. *Imunologia*. 6ª edição. Editora Manole: São Paulo, 2003, 481p.

MASSARD CA. *Ehrlichia bovis* (Donatien & Lestoquard, 1936). Diagnóstico, Cultivo "in Vitro" e Aspectos Epidemiológicos em Bovinos no Brasil, Tese de Doutorado, UFRRJ, Itaquai, Rio de Janeiro, 113 pp, 1984.

McSWAIN, J.L., ESSENBERG, R.C., SAUER, J.R. Absence of acquired resistance to nymphal *Ixodes ricinus* ticks in Balb/c mice developing cutaneous reactions. *The Journal of Parasitology*, v.68, p.100, 1982.

MORENO, E. C. *Incidência de ixodídeos em bovinos de leite e prevalência em animais domésticos da região metalúrgica de Minas Gerais*. Belo Horizonte: Escola de Veterinária da UFMG, 1984, 105 p. (Tese, Mestrado).

MUKAI, L.S., NETTO, A.C., SZABO, M.P., BECHARA, G.H. Hypersensitivity induced in dogs by nymphal extract of *Amblyomma cajennense* ticks (Acari:Ixodidae). *Ann N Y Acad Sci*. v.969, p.184-186, 2002.

MUKAI, L.S., NETTO, A.C., SZABO, M.P., BECHARA, G.H. Development of resistance to nymphs of *Amblyomma cajennense* ticks (Acari:Ixodidae) in dogs. *Ann N Y Acad Sci*. v.969, p.180-183, 2002b.

MULENGA,A., SUGIMOTO,C., ONUMA,M. Issues in tick vaccine development: identification and characterization of potential candidate vaccine antigens. *Microbes and Infections*, v.2, p.1353-1361, 2000.

MULENGA, A., TSUDA, A., SUGIMOTO, C., ONUMA, M. Blood meal acquisition by ticks; molecular advances and implications for vaccine development. *Japanese Journal Veterinary Research*, v.49, n.4, p.261-272, 2002.

- MUSTATOV, V.A. Changes in physiology and size of ixodid ticks when feeding repeatedly on the same animal. *Parazitologiya*, v.1, p.288-292, 1967.
- NEITZ, W.O., BOUGHTON, F., WALTERS, H.S. Laboratory investigations on the life-cycle of the karoo paralysis tick (*Ixodes rubicundus* Neumann, 1904). *Onderstepoort Journal Veterinary Research*, v.38, n.3, p.215-224, 1971.
- NUTTAL, P.A., LABUDA, M. Tick-host interactions: saliva-activated transmission. *Parasitology*, v.129, p.s177-s189, 2004.
- O'DWYER, L.H., MASSARD, C.L., SOUZA, J.C.P. Hepatozon canis infection associated with dog ticks of rural areas of Rio de Janeiro state, Brazil. *Veterinary Parasitology*, v.94, v.3, p.143-150, 2001.
- OLIVEIRA, P.R. *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) Avaliação de técnica para estudo de dinâmica populacional e bioecologia em Pedro Leopoldo, Minas Gerais. Belo Horizonte: Escola de Veterinária da UFMG. 1998. 110p. (Tese de Doutorado).
- OLIVEIRA, P.R., BORGES, L.M., LOPES, C.M., LEITE, R.C. Population dynamics of the free-living stages of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: ixodidae) on pastures of Pedro Leopoldo, Minas Gerais State, Brazil. *Veterinary Parasitology*, v.92, n.4, p.295-301, 2000.
- OLIVEIRA, P.R., BORGES, L.M., LEITE, R.C., FREITAS, C.M.V. Seasonal dynamics of the Cayenne tick, *Amblyomma cajennense* on horses in Brazil. *Medical and Veterinary Entomology*, v.17, p.412-416, 2003.
- OPDEBEECK, J.P., DALY, K.E. Immune response of infested and vaccinated Hereford cattle to antigens of the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.25, p.99-108, 1990.
- PATARROYO, J.H., PORTELA, R.W., De CASTRO, R.O., PIMENTEL, J.C., GUZMAN, F., PATARROYO, M.E., VARGAS, M.I., PRATES, A.A., MENDES, M.A.D. Immunization of cattle with synthetic peptides derived from the *Boophilus microplus* gut protein (Bm86). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.88, p.163-172, 2002.
- PINHEIRO, V.R.E. Avaliação do efeito carrapaticida de alguns piretróides sintéticos sobre o carrapato *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acarina: Ixodidae). Itaguaí: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1987, 126p. (Tese de Mestrado).
- PINTER, A., LABRUNA, M.B., FACCINI, J.L.H. The sex ratio of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) with notes on the male feeding period in the laboratory. *Veterinary Parasitology*, v.105, p.79-88, 2002.
- RECHAV, Y., SPICKETT, A.M., DAUTH, J., TEMBO, S.D., CLARKE, F.C., HELLER-HAUPT, A., TRINDER, P.K.E. Immunization of guinea-pigs and cattle against adult *Rhipicephalus appendiculatus* ticks using semipurified nymphal homogenates and adult gut homogenate. *Immunology*, v.75, p.700-706, 1992.
- RIBEIRO, J.M.C. Role of saliva in tick/host interactions. *Experimental and Applied Acarology*, v.7, p.15-20, 1989.
- RIBEIRO, J.M.C. Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists? *Infectious Agents Disease*, v.4, p.143-152, 1995.
- RIEK, R.F. Factors influencing the susceptibility of cattle to tick infestations. *Aust. Vet. J.*, v.32, p.204-209, 1956.

- SAHIBI, H., RHALEM, A., BARRIGA, O.O. Comparative immunizing power of infections salivary extracts, and intestinal extracts of *Hyalomma marginatum marginatum* in cattle. *Veterinary Parasitology*, v.68, p.359-366, 1997.
- SANAVRIA A., PRATA, M.C.A. Alterações determinadas por larvas e ninfas de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) em orelhas de coelhos. *Revista brasileira de Medicina Veterinária*, v.19, n.3, p.119-122, 1997.
- SANDERS, M.L., GLASS, G.E., SCOTT, A.L., SCHWARTZ, B.S. Kinetics and cross-species comparisons of host antibody response to Lone Star Tick and American Dog Ticks (Acari: Ixodidae). *J. Med. Entomol.*, v.35, n.5, p.849-856, 1998.
- SANGIONI, L.A., HORTA, M.C., VIANNA, M.C.B., GENNARI, S.M., SOARES, R.M., GALVÃO, M.A.M., SCHUMAKER, T.T.S., FERREIRA, F., VIDOTTO, O., LABRUNA, M.B. Rickettsial infection in animals and brazilian spotted fever endemicity. *Emerging Infectious Diseases*, v.11, n.2, p.265-270, 2005.
- SHAPIRO, S.Z., VOIGHT, W.P., FUJISAKI, K. Tick antigens recognized by serum from guinea pig resistant to infestation with the tick *Rhipicephalus appendiculatus*. *J. Parasitol.*, v.72, n.3, p.454-463, 1986.
- SHER, A., COFFMAN, R.L. Regulation of immunity to parasites by Tcells and T cell-derived cytokines. *Annu. Rev. Immunol.*, v.10, p.385, 1992.
- SHÖL, H., SIEBERZ, J., GÖBEL, E., GOETHE, R. Morphology and structural organization of Gené's organ in *Dermacentor reticulatus* (Acari: Ixodidae). *Experimental and Applied Acarology*. V.25, p.327-352, 2001.
- SONENSHINE, D.E., *Biology of Tick*. Vol.1. Oxford University Press, New York. 447 p., 1991.
- SONESHINE, D.E., *Biology of Tick*. Vol.2. Oxford University Press, New York. 410 p., 1993.
- SZABÓ, M.P.J., AOKI, V.L., SANCHES, F.P.S., AQUINO, L.P.T.C.T., GARCIA, M.V., MACHADO, R.Z., BECHARA, G.H. Antibody and blood leukocyte response in *Rhipicephalus sanguineus* (Laterille, 1806) tick-infested dogs and guinea pigs. *Veterinary Parasitology*, v. 115, p. 49-59, 2003.
- SZABO M.P., CASTAGNOLLI K.C., SANTANA D.A., DE CASTRO M.B., ROMANO M.A. *Amblyomma cajennense* ticks induce immediate hypersensitivity in horses and donkeys. *Experimental and Applied Acarology*, v.33, n.1-2, p.109-117, 2004
- TEGLAS, M., MATERN, E., LEIN, S., FOLEY, P., MAHAN, S.M., FOLEY, J. Tick and tick-borne disease in Guatemalan cattle and horses. *Veterinary Parasitology*, v. 131, n.1-2, p.119-127, 2005.
- TELLAM, R.L., KEMP, D., RIDING, G., BRISCOE, S., SMITH, D., SHARP, P., IRVING, D., WILLADSEN, P. Reduced oviposition of *Boophilus microplus* feeding on sheep vaccinated with vitelin. *Veterinary Parasitology*, v.103, p.141-156, 2002.
- TRAGER, W. Acquired immunity to ticks. *J. Parasitol.*, v.25, p.57-81, 1939.
- TRAGER, W. Further observation on acquired immunity to the tick *Dermacentor variabilis* (Say). *J. Parasitol.*, v.25, p.137-139, 1939b.

- TRIMNELL, A.R., DAVIES, G.M., LISSINA O., HAILS, R.S., NUTTALL P.A. A cross-reactive tick cement antigen is a candidate broad-spectrum tick vaccine. *Vaccine*, v. 23, n.34, p.4329-4341, 2005.
- USHIO, H., HIROTA, S., JIPPO, T., HIGUCHI, S., KAWAMOTO, K., KITAMURA, Y., MATSUDA, H. Mechanisms of eosinophilia in mice infested with larval *Haemaphysalis longicornis* ticks. *Immunology*, v.84, p. 469-475, 1995.
- VALENZUELA, J.G. Exploring tick saliva: from biochemistry to 'sialomes' and functional genomics. *Parasitology*, v.129, p.s83-s94, 2004.
- VanVUUREN, A.M.J., CRAUSE, J.C., VERSCHOOR, J.A., SPICKETT, A.M., NEITZ, A.W.H. The identification of a shared immunogen present in the salivary glands and gut of argasid ticks. *Experimental and Applied Acarology*, v.15, p.205-210, 1992.
- VARMA, M.R.G. Ticks and mites. In: LANE, R.P. & CROSSKEY, R.W. *Medical insects and arachnids*. Londres: Chapman & Hall, 1993. p.597-631.
- VAUGHAN, J.A., SONENSHINE, D.E., AZAD, A.F. Kinetics of ingested host immunoglobulin G in hemolymph and whole body homogenates during nymphal development of *Dermacentor variabilis* and *Ixodes ricinus* ticks (Acari: Ixodidae). *Experimental and Applied Acarology*, v.27, p.329-340, 2002.
- VAZ Jr., I.S., MARTINEZ, R.H.M., OLIVEIRA, A., HECK, A., LOGULLO, C., GONZALES, J.C., DEWES, H., MASUDA, A. Functional bovine immunoglobulins in *Boophilus microplus* hemolymph. *Veterinary Parasitology*, v.62, p.155-160, 1996.
- WALKER, J.B., OLWAGE, A. The tick vectors of *Cowdria ruminantium* (Ixodoidea, Ixodidae, genus Amblyomma) and their distribution. *Onderstepoort Journal Veterinary Research*, v.54, n.3, p.353-379, 1987.
- WANG, H., NUTTALL, P.A. Excretion of host immunoglobulin in tick saliva and detection of IgG-binding proteins in tick haemolymph and salivary glands. *Parasitology*, v.109, p.525-530, 1994.
- WHELEN A.C., WIKEL, S.K. Acquired resistance of guinea pigs to *Dermacentor andersoni* mediated by humoral factors. *Journal of Parasitology*, v.79, n.6, p.908-912, 1993.
- WIKEL, S.K. Immunomodulation of host responses to ectoparasite infestation – an overview. *Veterinary Parasitology*, v.14, p.321-339, 1984.
- WIKEL, S.K. *The Immunology of Host-Ectoparasitic Arthropod relationships*. 1 ed. Wallingford: Cab International, 1996. 331 p.
- WIKEL, S. K. Tick modulation of host immunity: an important factor in pathogen transmission. *Int. J. Parasitol.*, v.29, p.851-859, 1999.
- WIKEL, S.K., ALLEN, J.R. Acquired resistance to ticks: I. Passive transfer of resistance. *Immunology*, v.30, p.311-316, 1976a.
- WIKEL, S.K., ALLEN, J.R. Acquired resistance to ticks: II. Effects of cyclophosphamide on resistance. *Immunology*, v.30, p.479-484, 1976b.

WIKEL, S.K., WHELEN, A.C. Ixodid-host interaction, identification and characterization of relevant antigens and tick induced host immunosuppression. *Vet. Parasitol.*, v.20, p.149-174, 1986.

WIKEL, S.K., BERGMAN, D. Tick-host immunology: significant advances and challenging opportunities. *Parasitology Today*, v.13, n.10, 1997.

WIKEL, S.K., RAMACHANDRA, R.N., BERGMAN, D. Tick-induced modulation of the host immune response. *International Journal for Parasitology*, v.24, n.1, p.59-66, 1994.

WILLADSEN, P. Immunity to ticks. *Advances in Parasitology*, v.18, p.293-313, 1980.

WILLADSEN, P. Anti-tick vaccines. *Parasitology*, v.129, p.s367-s387, 2004.

WILLADSEN, P. The molecular revolution in the development of vaccines against ectoparasites. *Veterinary Parasitology*, v.101, p.353-367, 2001.

WILLADSEN, P., BIRD, P., COBON, G.S., HUNGERFORD, J., TOMLEY, F.M., TAYLOR, D.W. Commercialisation of a recombinant vaccine against *Boophilus microplus*. *Parasitology*, v.110, p.43-50, 1995.

WILLADSEN, P., JONGEJAN, F. Immunology of the tick-host interaction and the control of ticks and tick-borne diseases. *Parasitol. today*, v.15, n.7, p.258-262, 1999.