

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ  
ESCOLA DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E MEDICINA VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

CHIARA MARIA THIESEN DOMINGUES ARAÚJO

**IMUNOMARCAÇÃO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS DERMAIS EM PELE  
DE BOVINOS INFESTADOS ARTIFICIALMENTE POR *Rhipicephalus*  
(*Boophilus*) *microplus* (ACARI:IXODIDAE)**

*Immunostaining of skin dermal dendritic cells in cattle artificially infested with  
*Rhipicephalus (Boophilus) microplus (Acari:Ixodidae)**

SÃO JOSÉ DOS PINHAIS

2016

CHIARA MARIA THIESEN DOMINGUES ARAÚJO

**IMUNOMARCAÇÃO DE CÉLULAS DENDRÍTICASDERMAIS EM PELE  
DE BOVINOS INFESTADOS ARTIFICIALMENTE POR *Rhipicephalus*  
(*Boophilus*) *microplus* (ACARI:IXODIDAE)**

*Immunostaining of skin dermal dendritic cells in cattle artificially infested with  
Rhipicephalus (Boophilus) microplus (Acari:Ixodidae)*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, área de concentração de Patologia, da Escola de Ciências Agrárias e Medicina Veterinária da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Jair R. Engracia Filho

**SÃO JOSÉ DOS PINHAIS**

**2016**

**TERMO DE APROVAÇÃO**  
**(Responsabilidade da Secretaria do PPGCA)**

**(Entregue pela secretaria)**

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
FORMATO DA DISSERTAÇÃO.....	viii
RESUMO GERAL.....	ix
ABSTRACT.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xii
LISTA DE TABELAS.....	xiii
LISTA DE FIGURAS.....	xiv
CAPÍTULO 1	
1 INTRODUÇÃO.....	1
CAPÍTULO 2	
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	4
2.1 <i>Rhipicephalus microplus</i> .....	4
2.2 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA.....	4
2.3 CÉLULAS DENDRÍTICAS.....	7
2.4 PROTEÍNA S100.....	10
CAPÍTULO 3	
3 IMUNOMARCAÇÃO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS DERMAIS EM PELE DE BOVINOS INFESTADOS ARTIFICIALMENTE POR <i>Rhipicephalus</i> ( <i>Boophilus</i> ) <i>microplus</i> (ACARI:IXODIDAE).....	11
Resumo.....	11
Abstract.....	12
3.1 INTRODUÇÃO.....	12
3.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	13
3.2.1 Hospedeiros.....	14
3.2.2 Infestação artificial.....	14

3.2.3 Biópsias de pele.....	15
3.2.4 Imunohistoquímica.....	16
3.2.5 Contagem de células.....	17
3.2.6 Análise dos dados.....	18
3.3 RESULTADOS.....	19
3.4 DISCUSSÃO.....	22
3.5 CONCLUSÃO.....	26
CAPÍTULO 4	
4 CONCLUSÃO GERAL.....	27
REFERÊNCIAS.....	28
ANEXOS.....	36

Dedico ao meu amor Bernardo, aos meus pais Volney e Rosana,  
e a minha irmã Isadora.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente quero agradecer à minha família. Meu marido Bernardo Araújo por todo amor, companheirismo, apoio e incentivo, sempre incondicional para que eu persiga meus sonhos. Aos meus pais Volney e Rosana Domingues por todas as oportunidades que me proporcionaram, além do apoio e força que me dão diariamente para crescimento pessoal e profissional. À minha irmã Isadora Domingues por sempre segurar minha mão nos momentos de dificuldade e sempre estar ao meu lado. Vocês são o motivo de eu chegar até aqui. Muito obrigada!

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Jair Rodini Engracia Filho, por me dar a oportunidade de ser sua orientada e por todo o aprendizado destes últimos anos.

Aos PIBICs Gabriela Nishihara Pinto e Yann Henrique Mendes, obrigada por toda a ajuda e dedicação de vocês ao nosso projeto.

À toda equipe do Laboratório de Patologia Experimental da PUCPR, por me receberem, ensinarem e ajudarem nesses dois anos.

Gostaria de estender meus agradecimentos a todos que de alguma forma participaram e colaboraram para este momento. Tenho certeza que sempre lembrarei com carinho dessa jornada e daqueles que tornaram esse sonho possível.

## FORMATO DA DISSERTAÇÃO

A presente dissertação é composta por capítulos.

O capítulo 1 apresenta uma introdução geral do tema e objetivos desta dissertação.

O capítulo 2 se trata de uma breve revisão de literatura.

O capítulo 3 é composto por um artigo para publicação em periódico científico.

O capítulo 4 finaliza esta dissertação com conclusões gerais deste trabalho e com sugestões para estudos futuros.

As referências bibliográficas de todos os capítulos encontram-se em lista única ao final da dissertação.

## RESUMO GERAL

A infestação por *Rhipicephalus microplus* é um dos desafios ambientais da bovinocultura mundial uma vez que causa grande impacto nos sistemas de produção de bovinos em países tropicais e subtropicais. Os prejuízos estão relacionados às perdas na produção de leite e carne, redução nas taxas de fertilidade, depreciação do couro, transmissão de doenças como a tristeza parasitária bovina, e despesas com mão de obra e carrapaticidas. Células dendríticas são células apresentadoras de antígeno conhecidas por sua habilidade única de apresentar antígenos processados para linfócitos T. Além do seu papel na imunidade adaptativa, servem de sentinelas reconhecendo a presença de patógenos invasores e secretando citocinas pró-inflamatórias envolvidas na defesa do hospedeiro. Atualmente está bem estabelecida a participação das células dendríticas na resposta imune aos carrapatos. Estudos *in vivo* e *in vitro* demonstraram que a saliva dos carrapatos possui mediadores que inibem a migração, a diferenciação e a atuação das células dendríticas na resposta à sua fixação e repasto sanguíneo no hospedeiro, sugerindo que a inibição das ações das células dendríticas é um dos mecanismos de evasão dos carrapatos à resposta imune do hospedeiro. Este trabalho teve como objetivos estudar a imunomarcagem de células dendríticas em pele de bovinos infestados artificialmente por *R. microplus*, comparar o número de células dendríticas pré e pós-infestação e correlacioná-las com o número de carrapatos dos hospedeiros. Uma infestação artificial com 10.000 larvas de *R. microplus* foi realizada em 138 animais F2 mestiços Holandês x Gir e após 21 dias procedeu-se a contagem de carrapatos fêmeas ingurgitadas (4,5 a 8 mm) em cada animal. Momentos antes da infestação e no dia da contagem de partenógenas foram coletadas biopsias de pele, que foram submetidas à análise imunohistoquímica utilizando a proteína S100. Observou-se imunomarcagem positiva para as células dendríticas dermais de bovinos. A média de partenógenas encontrada foi de 24,07 por animal. A correlação entre o número de carrapatos e o número de células dendríticas por área se mostrou positiva na pré-infestação ( $p=0,0252$ ), mas não na pós-infestação ( $p=0,053$ ). A média de células por área pré e pós-infestação foi igual estatisticamente

para todas as classes de infestação de carrapato. Conclui-se que células dendríticas dermais de bovinos apresentam imunomarcção positiva para a proteína S100 e que número presente de células dendríticas dermais não parece interferir na carga parasitária do hospedeiro.

**Palavras-chave:** Resistência. Células dendríticas. *Rhipicephalus microplus*. Proteína S100. Bovinos. Carrapatos

## ABSTRACT

Infestation by *Rhipicephalus microplus* is one of the many environmental challenges of livestock and has a major impact on cattle production systems in tropical and subtropical countries. These losses are related to decrease in milk and meat production, reduction in fertility rates, leather depreciation, transmission of diseases such as tick fever, and high expenses with acaricides. Dendritic cells are antigen presenting cells known for their unique ability of presenting processed antigens to T lymphocytes. In addition to its role in adaptive immunity, they serve as sentinels by recognizing the presence of invading pathogens and secreting proinflammatory cytokines involved in host defense. It is currently well established the participation of dendritic cells in the immune response to ticks. *In vivo* and *in vitro* studies have shown that the ticks' saliva has mediators that inhibit migration, differentiation and activity of dendritic cells in response to tick anchorage and blood feeding at the host, suggesting that inhibition of the actions of dendritic cells is one of the ticks evasion mechanisms to the host immune response. This study aimed to study the immunostaining of dendritic cells in skin of cattle artificially infested with *R. microplus*, and to correlate the numbers of dendritic cells pre and post-infestation and with ticks counts. Artificial infestation by 10,000 larvae of *R. microplus* was performed in 138 animals F2 crossbred Holstein x Gir, and 21 days after the infestation engorged counts of females tick (4 – 8 mm) were performed in each animal. Skin biopsies were performed just before the infestation and at the tick counting day and then submitted to immunohistochemical analysis using the S100 protein. A positive immunostaining of dermal dendritic cells was found. The average number of ticks was 24.07/animal. The correlation of the tick count and the number of cells per area was positive in pre-infestation condition ( $p = 0.0252$ ), but no significant difference in post-infestation ( $p = 0.053$ ). The average of cells per area pre and post-infestation was equal for all tick infestation classes. It is concluded that the S100 protein may be used to label bovine dermal dendritic cells, and the number of dermal dendritic cells does not affect the tick burden of the host.

**Keywords:** Resistance. Dendritic cells. *Rhipicephalus microplus*. S100 protein. Cattle.

## LISTA DE ABREVIATURAS

BOD	Demanda bioquímica de oxigênio
CAP	Células apresentadoras de antígeno
CHM	Complexo de histocompatibilidade maior
CD	Células dendríticas
CDD	Células dendríticas dermais
CNPGL	Centro Nacional de Pesquisa do Gado de Leite
DAB	Diaminobenzidina
HE	Hematoxilina-eosina
IL-1 $\beta$	Interleucina-1 beta
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
TMA	<i>Tissue microarray</i>
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral-alfa

## LISTA DE TABELAS

	<b>Página</b>
Tabela 1. Distribuição por classes de infestação de bovinos mestiços F2 Gir x Holandês artificialmente infestados por larvas de <i>R.</i> <i>microplus.artificial</i> .....	19

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
Figura 1. Célula dendrítica isolada de baço de ratos.....	7
Figura 2. Bloco de parafina após aplicação da técnica de <i>Tissue Microarray</i> .....	16
Figura 3. Contagem de células dendríticas dermais utilizando o programa Zen 2 (Carl Zeiss, 2011).....	18
Figura 4. Distribuição do número de carrapatos pelo rebanho bovino (n=138) F2 Gir x Holandês.....	19
Figura 5. Pele de bovino. Imunohistoquímica, proteína S100, 400x.....	21
Figura 6. Frequência relativa de bovinos relacionada ao número observado de células dendríticas dermais por área (mm <sup>2</sup> ).....	22
Figura 7. Correlação entre o número de células dendríticas dermais por área, observado nas amostras de pele de bovinos, pós-infestação.....	22

## CAPÍTULO 1

### 1 INTRODUÇÃO

A infestação por carrapatos *Rhipicephalus microplus* é um dos principais desafios ambientais da bovinocultura mundial por causar grande impacto nos sistemas de produção de bovinos em países tropicais e subtropicais (Biegelmeier et al., 2015).

O *R. microplus* é a espécie de carrapato mais importante para a indústria pecuária tropical, causando perda econômica anual aproximada de US\$ 13 bilhões no mundo (Silva et al., 2014). No Brasil, o impacto econômico causado pelo *R. microplus* considerando os prejuízos com ganho de peso e produção de leite, chega a US\$ 3,24 bilhões anuais (Grisi et al., 2014).

Tais prejuízos estão relacionados principalmente às perdas na produção de leite e carne, perda de peso, redução nas taxas de fertilidade, depreciação do couro devido às lesões provocadas nos locais de fixação do carrapato e pela transmissão de doenças, como a tristeza parasitária bovina (causada pela *Babesia* e *Anaplasma*) (Ayres et al., 2015). Outros prejuízos ao produtor relacionados à mão de obra, despesas com instalações, aquisição de carrapaticidas e de equipamentos de suporte para aplicação dos mesmos nos rebanhos também se tornam significativos (Andreotti, 2010).

O método mais utilizado para controlar a infestação de *R. microplus* nos rebanhos é a aplicação de acaricidas sintéticos, entretanto é comum as populações de carrapatos desenvolverem resistência a um ou mais acaricidas (Piper et al., 2008). Vacinas podem ser utilizadas como método de controle alternativo para as infestações por carrapato, como a TickGard® formulada pelos australianos e a Gavac® pelos cubanos (Andreotti et al., 2002). Ambas utilizam a glicoproteína Bm86, isolada do intestino do *R. microplus* (Cunha et al., 2012). Recentemente a proteína ribossomal P0 foi utilizada em experimentos como antígeno contra *R. microplus* em vacinas para bovinos, mostrando 96% de eficácia geral (Rodríguez-Mallon et al., 2015). Estas vacinas não agem como carrapaticidas, mas agem diminuindo a fertilidade das fêmeas, levando à redução na infestação por carrapatos (Andreotti et al., 2002).

O aumento do desenvolvimento de resistência a acaricidas pela população de carrapatos e a possibilidade de contaminação ambiental devido aos componentes químicos presentes, tem estimulado diversos pesquisadores a procurar métodos de controle alternativos, como por exemplo, a seleção de animais para aumentar a frequência de alelos favoráveis para genes relacionados à resistência ao carrapato (Biegelmeyer et al., 2015).

É sabido que animais *Bos indicus* são mais resistentes a infestações de carrapato que o gado *Bos taurus* (Biegelmeyer et al., 2015). Neste sentido, a primeira geração da cruz de taurinos x zebuínos mostrou maior resistência ao parasita e aumento de produtividade, permitindo que tenham um desempenho melhor do que taurinos e zebuínos puros em sistemas de produção de clima tropical (Porto-Neto et al., 2014).

Outros fatores relacionados à resistência inata dos bovinos são: raça, idade, comprimento do pelo, cor e espessura da pele (Pereira et al., 2008), o comportamento de auto-limpeza (Wikel, 1996), dentre outros.

Diferenças nos perfis de resposta imune e polimorfismo de genes responsáveis por codificar fatores imunes celulares ou humorais, estão sendo associados com fenótipos de susceptibilidade ou resistência (Piper et al., 2010)

Atualmente está bem estabelecida a participação das células dendríticas na resposta imune aos carrapatos (Li et al., 2004; Merji e Brossard, 2007). Estudos *in vivo* e *in vitro* demonstraram que a saliva dos carrapatos possui mediadores que inibem a migração, a diferenciação e a atuação das células dendríticas na resposta à sua fixação e repasto sanguíneo no hospedeiro (Cavassani et al., 2005; Sá-Nunes et al., 2007; Skallová et al., 2008; Oliveira et al., 2008; Oliveira et al., 2010), sugerindo que a inibição das ações das células dendríticas é um dos mecanismos de evasão dos carrapatos à resposta imune do hospedeiro.

Todavia, poucas tentativas têm sido feitas para descrever a relação entre os variados componentes imune celulares com a contagem de carrapatos e, portanto, com a resistência ao *R. microplus* em rebanhos. Como já ressaltado, a seleção e criação de

raças e de indivíduos com alta resistência ao carrapato constitui método promissor que pode ser de grande utilidade no controle de infestações (Marufu, 2014).

Neste sentido, este trabalho tem como objetivo estudar a imunomarcagem de células dendríticas em pele de bovinos utilizando-se a proteína S100, comparar o número de células dendríticas antes e pós-infestação artificial por *R. microplus*, e ainda, correlacioná-las com a carga de carrapatos na pele dos animais, avaliando-se a correlação entre o número destas células com o grau de resistência do hospedeiro. Os resultados obtidos poderão contribuir na elucidação dos mecanismos de resistência, enfatizando a participação da população de células dendríticas do hospedeiro encontrada pelos carrapatos durante o repasto sanguíneo, abrindo, assim, a perspectiva de utilizar a contagem de células dendríticas como método de seleção de animais mais resistentes ao carrapato *R. microplus*.

## CAPÍTULO 2

### 2 REVISÃO DA LITERATURA

#### 2.1 *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

A espécie de carrapato *Rhipicephalus microplus*, originária da Ásia, foi introduzida na maioria dos países tropicais e subtropicais por meio da importação de gado desse continente. Na região Neotropical – com exceção do Chile – essa espécie está distribuída desde o norte da Argentina até o México, incluindo as ilhas do Caribe e Antilhas. As áreas de distribuição geográfica ainda incluem a região sul e ocidental da África, Madagascar, Índia, China, Coreia, Bornéu, Sumatra, Filipinas, Japão, Nova Guiné e Ilha de Guam (Pereira et al., 2008).

O ciclo do *R. microplus* é monoxeno e pode ser dividido em duas fases complementares: fase parasitária e fase não parasitária. A fase parasitária pode ser delimitada no seu início pela fixação das larvas em um hospedeiro suscetível e no seu final que se dá quando as fêmeas abandonam o hospedeiro. A fase não parasitária começa com a fêmea fecundada e ingurgitada depois que se desprende do hospedeiro, caindo no chão para realizar a ovipostura (Pereira et al., 2008). Esta é feita no ambiente, onde ocorre a incubação, com duração média de 22 dias (podendo ser mais curto em climas mais quentes, e mais longo em climas mais frios). Após a eclosão, as larvas se posicionam na parte mais elevada da pastagem à espera de um hospedeiro para se fixarem. O ciclo é completado com a ecdise de larvas para ninfas e destas para adultos no mesmo hospedeiro (Nuñez et al., 1985).

#### 2.2 MECANISMOS DE DEFESA DO HOSPEDEIRO

O processo de fixação das larvas do *R. microplus* na pele do hospedeiro leva a uma série de eventos fisiológicos no local. Conseqüentemente, esta interação entre parasita e hospedeiro pode induzir a rejeição a larva. Carrapatos podem desativar esta resposta de rejeição secretando proteínas específicas que possuem papel essencial na manipulação da resposta do hospedeiro (Rodriguez-Valle et al., 2013). Os

componentes salivares secretados incluem vasodilatadores, anti-inflamatórios, anti-hemostáticos e imunossupressores (Oliveira et al., 2010).

Durante o processo de parasitismo, o hospedeiro monta sua resposta imunológica ao nível celular e humoral, envolvendo anticorpos, sistema complemento, citocinas, células apresentadoras de antígeno (APCs) e linfócitos (Wikel, 1996). Simultaneamente, graças à destruição de tecidos pelo hipostômio do carrapato, é estimulada uma resposta inflamatória no hospedeiro, caracterizada por aumento de permeabilidade vascular, desconforto local, edema, formação de vesículas na epiderme e infiltração de células inflamatórias (Beaudouin et al., 1997).

O conjunto de barreiras do hospedeiro que interfere negativamente no desenvolvimento do carrapato constitui a resistência desse hospedeiro. Algumas dessas barreiras são inatas e independem de contato preliminar com o parasito, outras surgem ou se acentuam com a idade tornando-se mais específicas contra o carrapato após um contato inicial, sendo estes os mecanismos específicos adquiridos (Pereira et al., 2008).

Alguns fatores como sexo, raça, idade, comprimento do pelo, cor e espessura da pele são fatores inatos que conferem resistência a carrapatos em bovinos. Animais de pelagem mais clara, fêmeas, e zebuínos foram considerados mais resistentes do que animais de pelagem escura, machos e taurinos havendo considerável variação individual e racial na resistência de bovinos ao *R. microplus* (Pereira et al., 2008).

No estudo de Marufu et al. (2014), a quantidade de carrapatos fixados foi correlacionada com diferentes contagens de eosinófilos, basófilos, células mononucleares e mastócitos em sítios de fixação de carrapato em novilhas com diferentes fenótipos de resistência ou suscetibilidade. Houve uma correlação positiva entre a quantidade de carrapatos e eosinófilos, e uma correlação negativa com basófilos, células mononucleares e mastócitos.

O grau de resistência adquirida em cada hospedeiro é avaliado por meio de parâmetros biológicos de carrapatos alimentados em infestações sucessivas (Willadsen, 1980, Szabó et al., 1995). Assim, a imunidade adquirida é expressa e mensurada por redução no número de carrapatos que se fixam no hospedeiro, redução

no peso de ingurgitamento, e redução na produção de ovos e larvas, resultando em redução significativa na população de carrapatos (Willadsen, 1980). A imunidade adquirida a infestações de carrapatos envolve componentes imunoreguladores e vias efetoras humorais e celulares. Respostas de hipersensibilidade cutânea a larvas de *R. microplus* sugerem que reações de hipersensibilidade tardia podem ser associadas a um maior grau de resistência em carrapatos, observado em animais resistentes, enquanto que a ausência de reação de hipersensibilidade tardia, juntamente com reação de hipersensibilidade imediata intensa é observada em animais que são considerados menos resistentes (Marufu et al., 2014).

Muitos estudos, principalmente de países tropicais, têm demonstrado que existem diferenças na resistência ao carrapato entre e dentro das raças. É possível observar redução na contagem de carrapatos conforme aumenta a porcentagem de gene zebuino no gado (Ayres et al., 2015). Zebuínos e taurinos sem contato prévio com *R. microplus* são igualmente susceptíveis na infestação primária pela larva deste ixodídeo. Maior nível de resistência entre zebuínos se torna visível após período de susceptibilidade na primeira infestação (Silva et al., 2014).

No estudo de Biegelmeyer et al. (2015), foi observado que animais da raça Braford, considerados geneticamente resistentes, além de possuírem menor carga parasitária, também afetam negativamente a massa de peso dos ovos, produção de ovos e índices de nutrição dos carrapatos.

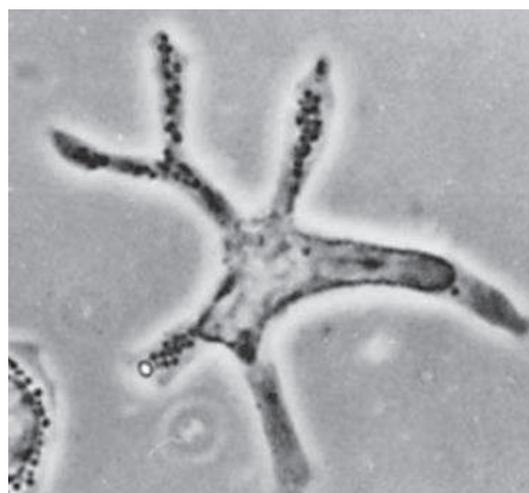
Piper et al. (2010) propõem que a secreção de imunoglobulinas na pele de animais susceptíveis como os da raça Holstein-Friesian, na presença do sistema complemento e população de células inflamatórias apresentando antígenos do carrapato nos linfonodos, pode agir estabelecendo um processo crônico, o qual facilita o repasto sanguíneo do carrapato no hospedeiro.

Elucidar os mecanismos pelos quais os animais resistentes previnem a infestação intensa por carrapatos é um passo crucial no desenvolvimento de biomarcadores preditivos para resistência a carrapatos, e para uso em programas de seleção de raças, assim como para o desenvolvimento de vacinas anti-carrapatos (Piper et al., 2010).

### 2.3 CÉLULAS DENDRÍTICAS

Células dendríticas (CD) são células apresentadoras de antígeno conhecidas por sua habilidade única de apresentar antígenos processados a linfócitos T. Além do seu papel na imunidade adaptativa, CD atuam como sentinelas, reconhecendo a presença de patógenos invasores e secretando citocinas pró-inflamatórias envolvidas na defesa do hospedeiro, fazendo assim a ligação entre a imunidade inata e adaptativa (Romero-Palomo et al., 2013). Estas células reconhecem agentes externos e possuem papel fundamental na iniciação de uma variedade de respostas imunes, entretanto, não é completamente esclarecido como as CD determinam o tipo, intensidade, duração, localização, memória, e outros aspectos da resposta imune (Murakami et al., 2013).

As células dendríticas foram descritas pela primeira vez por Steinman e Cohn (1973), quando observaram a presença destas células em órgãos linfóides de ratos, propondo este nome devido ao formato celular dendrítico (**figura 1**). Estas células estão presentes em todos os tecidos linfóides e em quase todos os tecidos não linfóides. São conhecidos diferentes subtipos de CD, os quais apresentam algumas diferenças morfológicas e de função: células dendríticas interdigitantes, presentes em órgãos linfóides; CD do sangue periférico; células de Langerhans na epiderme; CD dermais; CD do timo.



**Figura 1:** Célula dendrítica isolada de baço de ratos. Observar o formato dendrítico. Fotomicrografia de contraste de fase (Steinman e Cohn, 1973).

Entretanto, os fenótipos e funções das CD de bovinos ainda não estão bem definidas (Miyazawa et al., 2006). Células dendríticas residentes ou que estão migrando para os diferentes tecidos são distintas e podem ser classificadas em diferentes subtipos de acordo com os marcadores moleculares de superfície e funções. Foi sugerido que estes subtipos de CD possuem diferentes papéis na iniciação de vários tipos de respostas imunes (Murakami et al. 2013).

Foram descritos subtipos em tecido e sangue que podem ser tanto de origem mielóide como de origem plasmocitóide. Na sua forma imatura, CD mielóides do sangue e tecidos ligam-se a antígenos externos por um conjunto de receptores de lectina tipo C expressados na sua superfície. Após a exposição ao antígeno ou a citocinas pró-inflamatórias, ocorre a maturação das CD e sua migração para o linfonodo, onde apresentarão o antígeno para células T ativas. As células dendríticas plasmocitóides são encontradas principalmente no sangue e linfonodos, e tem como função primária promover a defesa antiviral (Harman et al., 2013).

A maturação das CD começa quando sinais de “perigo” exógeno, como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), se ligam aos receptores *Toll-like* apropriados e ativam ou suprimem a resposta imune (Oliveira et al., 2010).

As células dendríticas possuem pelo menos três mecanismos de captação de antígenos: macropinocitose, que implica na formação de vesículas endocitóticas, fagocitose e endocitose mediada por receptores, sendo que as duas últimas dependem de receptores distintos da superfície celular e, portanto, são antígeno específicas (Sparber et al., 2010).

A migração das CD dos tecidos para o linfonodo é, provavelmente, regulada pela expressão de receptores para quimiocinas e acontece através dos vasos linfáticos aferentes. Uma vez que entram no linfonodo, ocorre a morte celular das mesmas (Yrliid e Macpherson, 2003).

As células dendríticas, como parte do sistema imune inato, estão estrategicamente posicionadas na pele, uma vez que este órgão atua como interface entre o ambiente externo e tecidos internos. A epiderme abriga as células de

Langerhans (CL), enquanto a derme abriga as células dendríticas dermais (CDD) (Ng et al., 2008). Além da pele, as CD podem ser encontradas nos pulmões, traqueia, fígado e mucosas digestivas (Romero-Palomo et al., 2013).

A célula de Langerhans é o único tipo de célula dendrítica encontrado na epiderme durante seu curso estável. A ontogenia das CL depende de uma série de fatores solúveis, incluindo fatores de crescimento  $\beta$  e fator estimulante de colônia de macrófagos (Kaplan, 2010). As CL são ativadas por patógenos e/ou citocinas inflamatórias (IL-1 $\beta$  e TNF $\alpha$ ); após a ativação as CL diminuem a quantidade de E-caderina e aumenta a quantidade dos receptores quimiotáticos CCR7, CXCR4, e de metaloproteinases, que permitem a entrada das CL na derme e em seguida nos vasos linfáticos (Hwang, 2012).

Recentemente, foi identificado um subtipo de CD na derme que expressa Langerina (célula dendrítica dermal CD103<sup>+</sup>). Observou-se que as CDD são distintas das CL migratórias baseado na expressão de diferentes marcadores de superfície. A partir desta descoberta as CDD foram classificadas em Langerina positiva e Langerina negativa (Murakami et al., 2013).

Em contraste com as CL, pouco se sabe sobre a migração, interação e comportamento das CDD. Durante algumas infecções as CDD podem entrar em contato próximo com microrganismos, e ainda não está claro se estas células são capazes de detectar diretamente patógenos vivos, de células infectadas em processo de morte celular ou de patógenos mortos. Como estes eventos iniciais vão determinar a magnitude e qualidade da imunidade produzida pelas células T e B, é importante decifrar estes eventos *in situ* (Ng et al., 2008).

Ochoa et al. (2008) observaram que as CDD abrangem pelo menos duas grandes populações fenotípicas de células com aparência dendrítica: as células dendríticas imaturas e macrófagos. Estes dados sugerem que os macrófagos dermais com aparência dendrítica compõem uma nova parte da resposta inata do sistema imune residente da pele.

## 2.4 PROTEÍNA S100

As proteínas S100 compõem um grupo de pequenas proteínas ácidas de 10 a 12 kDa, com mais de 25 proteínas identificadas até o momento. Elas formam a maior família de proteínas de ligação de cálcio. Devido a sua ligação com diversas proteínas, as proteínas S100 estão envolvidas em diversas funções intra e extracelulares, como a fosforilação de proteínas, ativação de enzimas, interação com componentes do citoesqueleto e homeostase do cálcio (Zhu et al., 2013).

É possível observar marcação imunohistoquímica positiva da proteína S100 em algumas células de Langerhans e melanócitos da pele, células reticulares interdigitantes dos linfonodos, células reticulares epiteliais medulares do timo, condrócitos, tecido adiposo de algumas amostras, células mioepiteliais das glândulas salivares e da mama, células foliculares estreladas da glândula pituitária, nas células de Schwann e nas células gliais do tecido nervoso (Dako®, 2009). Células dendríticas também apresentam forte imunomarcação para a proteína S100 (Jian et al., 1990; Diaconescu et al., 2014).

Romero-Palomo et al. (2013) utilizaram a proteína S100 para marcar células dendríticas de linfonodos, tecido linfóide associado aos brônquios, e placa de Peyer de bovinos saudáveis. Somente Oliveira-Sequeira et al. (2000) utilizaram a proteína S-100 em pele de bovinos, conseguindo imunomarcação positiva para células dendríticas dermais, melanócitos, nervos e células endoteliais.

## CAPÍTULO 3

### 3 IMUNOMARCAÇÃO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS DERMAIS EM PELE DE BOVINOS INFESTADOS ARTIFICIALMENTE POR *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (ACARI:IXODIDAE) (*Immunostaining of skin dermal dendritic cells in cattle artificially infested with Rhipicephalus Boophilus microplus (Acari:Ixodidae)*)

#### RESUMO

Este trabalho teve como objetivos estudar a imunomarcação de células dendríticas em pele de bovinos infestados artificialmente por *R. microplus*, comparar o número de células dendríticas pré e pós-infestação e correlacioná-las com o número de carrapatos dos hospedeiros. Uma infestação artificial com 10.000 larvas de *R. microplus* foi realizada em 138 animais F2 mestiços Holandês x Gir e após 21 dias procedeu-se a contagem de carrapatos fêmeas ingurgitadas (4,5 a 8 mm) em cada animal. Momentos antes da infestação e no dia da contagem de partenógenas foram coletadas biopsias de pele, que foram submetidas à análise imunohistoquímica utilizando a proteína S100. Observou-se imunomarcacação positiva para as células dendríticas dermais de bovinos. A média de partenógenas encontrada foi de 24,07 por animal. A correlação entre o número de carrapatos e o número de células dendríticas por área se mostrou positiva na pré-infestação ( $p=0,0252$ ), mas não na pós-infestação ( $p=0,053$ ). A média de células por área pré e pós-infestação foi igual estatisticamente para todas as classes de infestação de carrapato. Conclui-se que células dendríticas dermais de bovinos apresentam imunomarcação positiva para a proteína S100 e que número presente de células dendríticas dermais não parece interferir na carga parasitária do hospedeiro.

**Palavras-chave:** Resistência. Células dendríticas. *Rhipicephalus microplus*. Proteína S100. Bovinos.

## ABSTRACT

This study aimed to study the immunostaining of dendritic cells in skin of cattle artificially infested with *R. microplus*, and to correlate the numbers of dendritic cells pre and post-infestation and with ticks counts. Artificial infestation by 10,000 larvae of *R. microplus* was performed in 138 animals F2 crossbred Holstein x Gir, and 21 days after the infestation engorged females tick (4 – 8 mm) counts were performed in each animal. Skin biopsies were performed just before the infestation and at the tick counting day and then submitted to immunohistochemical analysis using the S100 protein. A positive immunostaining for bovine dermal dendritic cells was found. The average number of ticks found per was 24.07 animal. The correlation of the tick count and the number of cells per area was positive in pre-infestation condition ( $p = 0.0252$ ), but no significant difference in post-infestation ( $p = 0.053$ ). The average of cells per area pre and post-infestation was equal for all tick infestation classes. It is concluded that the S100 protein may be used to label bovine dermal dendritic cells, and the number of dermal dendritic cells does not affect the tick burden of the host.

**Keywords:** Resistance. Dendritic cells. *Rhipicephalus microplus*. S100 protein. Cattle.

### 3.1 introdução

Infestações por carrapatos *Rhipicephalus microplus* são um dos principais desafios ambientais da pecuária e tem grande impacto nos sistemas de produção de bovinos das regiões tropicais e subtropicais. Anemia, perda de peso, queda na produção, transmissão de doenças e alto custo com o controle químico, são algumas das causas diretas e indiretas de perda econômica relacionada a este parasito (Biegelmeyer et al., 2015).

A aplicação de acaricidas é o método mais utilizado para controlar a infestação de carrapatos em um rebanho, no entanto a população de carrapatos resistentes a um ou mais destes químicos é muito comum (Piper et al., 2008). Bovinos mostram fenótipos divergentes e hereditários para resistência e susceptibilidade às infestações por *R. microplus* (Piper et al., 2010). Por isso a seleção de animais resistentes aos

carrapatos pode ser uma boa alternativa para o controle de infestações. Muitos pesquisadores vêm demonstrando que existem diferenças de resistência entre raças do hospedeiro, nas quais é possível observar redução na infestação de carrapatos conforme aumenta a porcentagem de gene zebuino (Ayres et al., 2015).

Os carrapatos conseguiram, durante sua evolução, desenvolver mecanismos para evadir-se da resposta imune do hospedeiro. No momento da fixação, o parasito inocula sua saliva, a qual contém substâncias vasodilatadoras, anti-inflamatórias, anti-hemostáticas, e moléculas imunossupressoras (Oliveira et al., 2010). Estudos vêm sendo conduzidos na avaliação do local de fixação do ixodídeo em animais infestados artificialmente, com o objetivo de elucidar as respostas celulares. Resultados destes estudos demonstraram que mastócitos, eosinófilos, basófilos e linfócitos, participam da resistência do hospedeiro com diversas funções e importância (Engracia Filho et al., 2006; Veríssimo et al., 2008; Marufu et al., 2014).

Células dendríticas são reguladores chave da resposta imune, capazes de promover ou suprimir respostas de células T. Essas células fazem uma ponte entre a imunidade inata e a adquirida, promovendo a captura de patógenos. Com isso as células dendríticas liberam citocinas e quimiocinas, atraindo outras células inflamatórias (Koch et al., 2005). Estudos mostram que a saliva de diversas espécies de carrapatos tem a capacidade de modular diferentes fases da biologia das células dendríticas (Oliveira et al., 2010), podendo interferir na expressão da resistência do hospedeiro.

Assim sendo, este trabalho tem como objetivo comparar o número de células pré e pós-infestação, e correlacionar estes números com a contagem de carrapatos na pele dos hospedeiros, avaliando se estas células podem ter relação com o grau de resistência, podendo servir como uma ferramenta para seleção de animais mais resistentes.

### **3.2 Material e métodos**

O presente experimento foi desenvolvido com material obtido em projeto anterior desenvolvido por Engracia Filho et al. (2006) em parceria com a Embrapa Juiz de Fora-

MG. São descritos abaixo, nos tópicos 3.2.1 a 3.2.3, os procedimentos realizados no projeto supracitado. Este experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais sob o parecer 0965/2015.

### 3.2.1 Hospedeiros

A população experimental utilizada, bovinos mestiços Holandês HPB x Gir, oriundos de uma geração F<sub>2</sub> composta por 138 animais, era pertencente ao Centro Nacional de Pesquisa do Gado de Leite (CNPGL) situada em Juiz de Fora-MG.

Para obter a geração F<sub>2</sub>, foram utilizadas 20 fêmeas Gir, caracterizadas como geração F<sub>0</sub>, em trabalho de superovulação e transferência de embriões que receberam sêmen de quatro touros da raça Holandesa, não pertencentes ao CNPGL. Dos produtos destas inseminações artificiais foram selecionados quatro touros e 44 fêmeas da geração F<sub>1</sub> para se formar quatro famílias de geração F<sub>2</sub>, evitando-se o parentesco entre o reprodutor e as fêmeas a ele designadas, obtendo-se assim os 138 animais F<sub>2</sub> utilizados para estudo.

Como o experimento foi realizado em diferentes períodos, a idade dos animais F<sub>2</sub> variou de 242 até 674 dias.

Os animais da geração F<sub>2</sub> não receberam tratamento carrapaticida antes da infestação artificial e, como não houve controle das infestações naturais por carrapatos antes da realização do experimento, todos os animais F<sub>2</sub> foram considerados pré-sensibilizados naturalmente por *R. microplus*. Os mesmos foram mantidos em piquetes de capim-estrela (*Cynodon nlemfuensis*).

### 3.2.2 Infestação artificial

Avaliou-se a resposta celular ao *Rhipicephalus microplus* por meio de contagem de fêmeas adultas a partir de infestações artificiais com larvas infectantes. Os animais F<sub>2</sub> receberam infestações artificiais com larvas de carrapato *R. microplus*, pertencentes à cepa POA, originária do Rio Grande do Sul, mantida pelo Laboratório de Parasitologia do CNPGL, Juiz de Fora-MG.

As larvas de *R. microplus* foram preparadas em laboratório no CNPGL incubando-se 0,5 grama de ovos, em estufa tipo B.O.D. (temperatura de 27°C, umidade em torno de 85% e fotoperíodo de 12 horas), em dispositivos adaptados (seringas plásticas descartáveis), gerando aproximadamente 10.000 larvas eclodidas por seringa.

As infestações artificiais foram realizadas entre sete e 10 dias após eclosão das larvas de *R. microplus*, aplicando um dispositivo por animal da geração F<sub>2</sub>, distribuindo-se as larvas ao longo da região cervical dos bovinos, de modo que as larvas pudessem atingir ambos os lados do corpo.

As contagens foram realizadas no dia modal de queda dos carrapatos que, segundo a literatura, ocorre em torno do 21º dia pós-infestação (Seifert, 1984). Foram contadas as fêmeas semi-ingurgitadas, de 4,5 a 8,0 mm de diâmetro presentes em um dos lados do animal. O resultado obtido foi multiplicado por dois para obter o número total de carrapatos presentes no hospedeiro. A quantificação do número de ixodídeos foi realizada sempre no período da manhã, até no máximo às 11 horas. Os animais foram agrupados em três classes de infestação (baixa, moderada e alta), seguindo-se classificação de Veríssimo et al. (2004).

Não foi realizada avaliação hematológica dos animais para pesquisa de hemoparasitas.

### 3.2.3 Biópsias de pele

Momentos antes da infestação artificial e, posteriormente, no mesmo dia da contagem dos ixodídeos foram realizadas biópsias da pele do pavilhão auricular interno direito de todos os animais F<sub>2</sub>. Escolheu-se este local em virtude da cartilagem do pavilhão auricular servir como delimitação da pele, permitindo assim uma contagem mais precisa das células da derme e epiderme. Quando havia ixodídeo presente no local da coleta, priorizou-se realizar a biópsia o mais distante possível do sítio de fixação para evitar a influência do ixodídeo na população celular.

Os animais foram imobilizados em troncos de contenção e a área escolhida para biópsia recebeu assepsia prévia com iodopovidona 10% e anestesia local com cloridrato de lidocaína a 2 % (Bravet Ltda). As biópsias foram realizadas com auxílio de

"punch" de 6 mm de diâmetro e os fragmentos foram imersos em frascos contendo formalina tamponada a 10%, lacrados e encaminhados ao Departamento de Patologia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária/UNESP, campus de Jaboticabal, para processamento histológico e posterior exame histopatológico, e de imunohistoquímica no Laboratório de Patologia Experimental da Pontifícia Universidade Católica do Paraná.

#### 3.2.4 Imunohistoquímica

As amostras foram processadas segundo histotécnica de rotina, com inclusão em parafina e secção em micrótomo em cortes de 4 $\mu$ m de espessura.

Para o desenvolvimento do projeto, as lâminas obtidas das amostras foram coradas pelas técnicas da hematoxilina-eosina (HE), utilizadas para observação de alterações teciduais e avaliação da morfologia geral do local.

A técnica de *Tissue Microarray* (TMA) descrita por Mattioli et al. (2011) foi aplicada nas amostras emblocadas. Para tanto, uma broca metálica de cinco milímetros de diâmetro foi utilizada, e novos blocos de parafina foram confeccionados agrupando os materiais colhidos nas condições de pré e pós-infestação (**figura 2**).



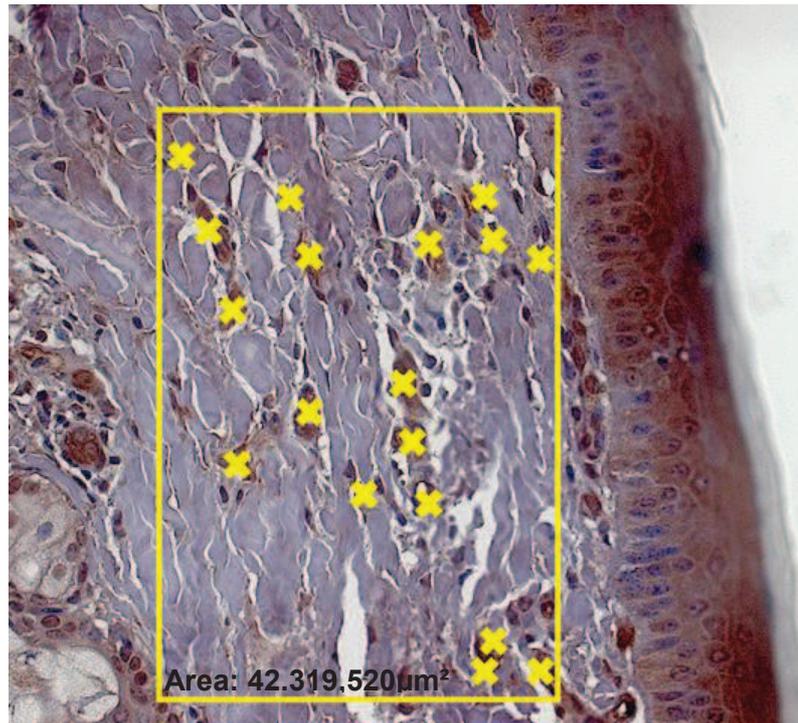
**Figura 2:** Bloco de parafina com as amostras após aplicação da técnica de Tissue Microarray.

Os blocos de TMA foram seccionados em cortes com espessura de 4 µm em micrótomo, desparafinizados com xilol (2 x 10 min) e reidratados com álcool etílico absoluto (1 x 1 min) e álcool etílico 80% (2 x 1 min). A peroxidase endógena foi inibida utilizando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5% em metanol) por 15 minutos. Target Retrieval Soution™ (Dako, Glostrup, Dinamarca) foi utilizado para recuperação antigênica induzida por calor de acordo com as instruções do fabricante. As amostras foram incubadas com o anticorpo policlonal proteína S100 (Dako, Glostrup, Dinamarca) em diluição 1:200 com tampão fosfato salino. Para controle negativo a adição do anticorpo foi substituída pelo uso de tampão fosfato salino. O anticorpo secundário, Advance™ (Dako, Glostrup, Dinamarca) foi aplicado por 25 minutos de acordo com as instruções do fabricante. As imunorreações foram visualizadas depois de incubar as amostras com cromógeno DAB 1,1 (OriGene, Rockville, MD, EUA), e em seguida contracora-las utilizando Hematoxilina de Harris (3 min).

### *3.2.5 Contagem de células*

As lâminas prontas foram avaliadas em microscópio Carl Zeiss Axio Vision® com câmera fotográfica acoplada. Foram feitas, em média, quatro contagens de cada lâmina utilizando-se objetiva de 40x, tendo como prioridade fotografar a região da derme.

Para a contagem das células foi utilizado o programa Zen 2 (Carl Zeiss, 2011), no qual era delimitada uma área aleatória na região da derme das fotos previamente tiradas. Dentro desta área foi realizada a contagem das células imunomarcadas (**figura 3**). Para que a célula fosse contabilizada ela deveria apresentar imunexpressão de citoplasma e núcleo, sendo que o núcleo deveria estar sobre a linha ou dentro da área delimitada. Após, foram calculadas as médias das áreas e células contadas em cada amostra, e estes valores foram convertidos em número de células por milímetro quadrado.



**Figura 3:** Contagem de células dendríticas dermais utilizando o programa Zen 2 (Carl Zeiss, 2011). A área delimitada esta representada por um retângulo amarelo, e as células contadas estão marcadas com um X amarelo.

### 3.2.6 Análise dos dados

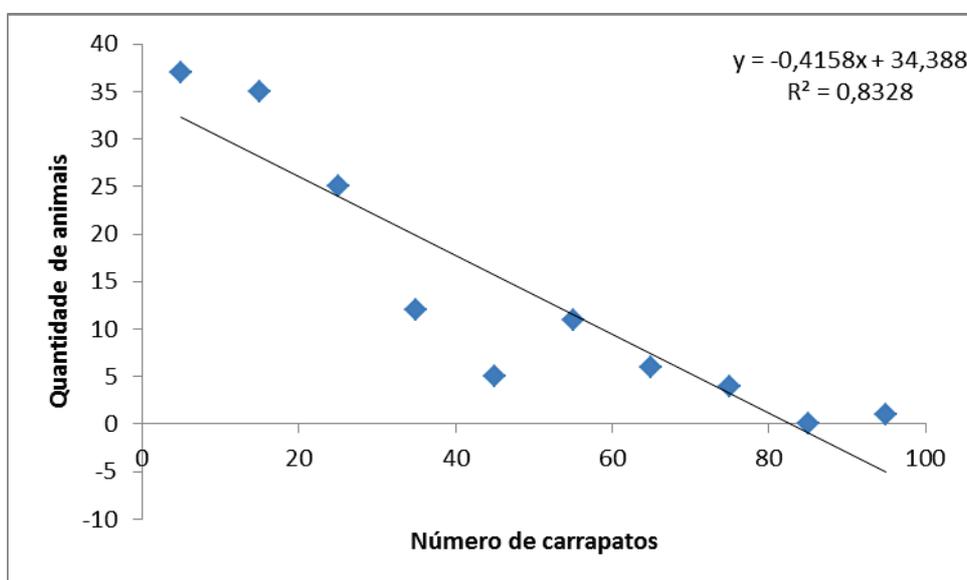
Para a análise dos dados, os animais foram separados em grupos de acordo com a contagem de carrapatos (21º dia pós-infestação) (Veríssimo et al., 2004), criando-se assim classes para carrapatos (**tabela 1**). Testes de correlação de Pearson e análise de variância foram utilizados para analisar os dados.

**Tabela 1:** Distribuição por classes de infestação de bovinos mestiços F2 Gir x Holandês artificialmente infestados por larvas de *R. microplus*.artificial.

Contagem de carrapatos	Classe	Número de animais
Até 25 (baixa)	1	85
26 ≥ 100 (moderada)	2	51
≥ 101 (alta)	3	1

### 3.3 RESULTADOS

Foi encontrada uma média de 24,97 carrapatos por animal na contagem pós-infestação, porém houve grande variação do número de carrapatos entre os indivíduos (figura 4).

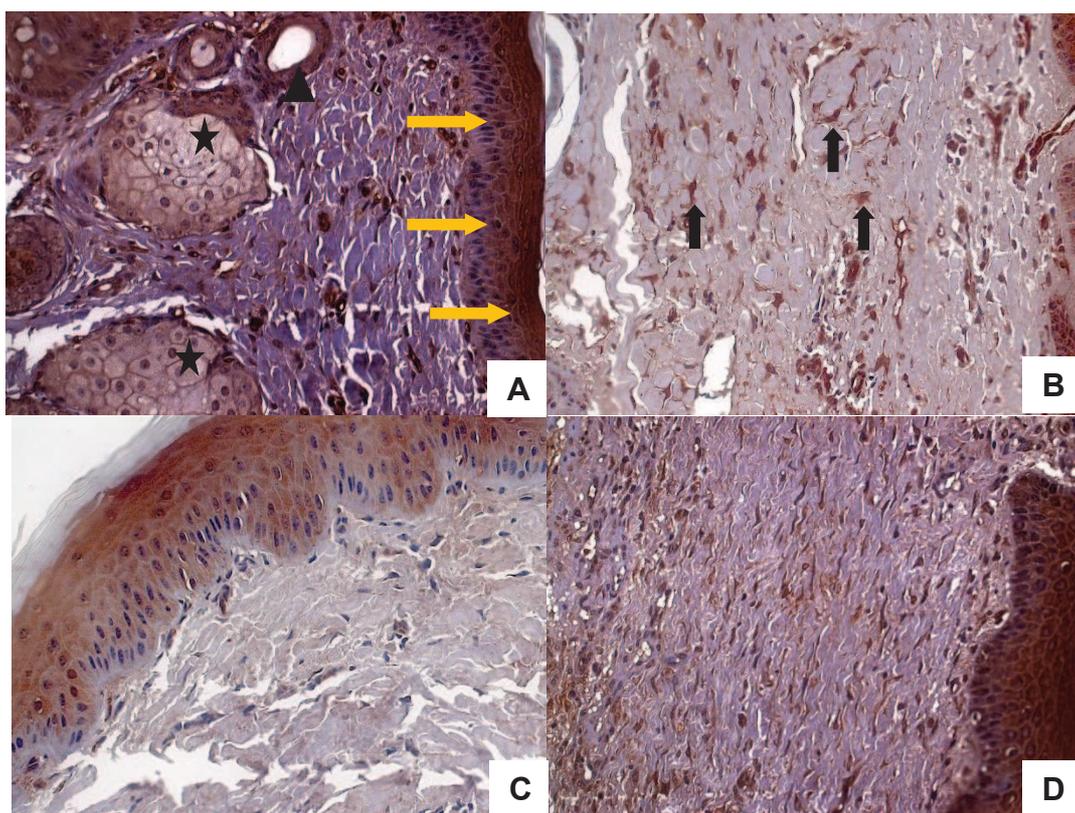


**Figura 4:** Distribuição do número de carrapatos pelo rebanho bovino (n=138) F2 Gir x Holandês.

Para cada amostra foi confeccionada uma lâmina corada com Hematoxilina e Eosina para avaliar a morfologia geral e possíveis alterações teciduais. Nestas lâminas não foi observada nenhuma alteração morfológica relevante, uma vez que se tratava de pele íntegra.

Durante o processo de imunohistoquímica, houve intenso descolamento do material no processo de recuperação antigênica, portando esta etapa teve seu tempo reduzido para evitar perda amostral importante. Além disso, o material teve um tempo de aderência na lâmina prolongado, por aproximadamente seis meses. A perda amostral foi de 56 amostras, porém não houve interferência estatística nos resultados.

A marcação positiva para células dendríticas dermais apresentou média pré-infestação de 575 células/mm<sup>2</sup>, e 630 células/mm<sup>2</sup> no pós-infestação. Entretanto não foi possível realizar a avaliação das células de Langerhans na epiderme devido a intensa marcação dos queratinócitos (**figura 5**).



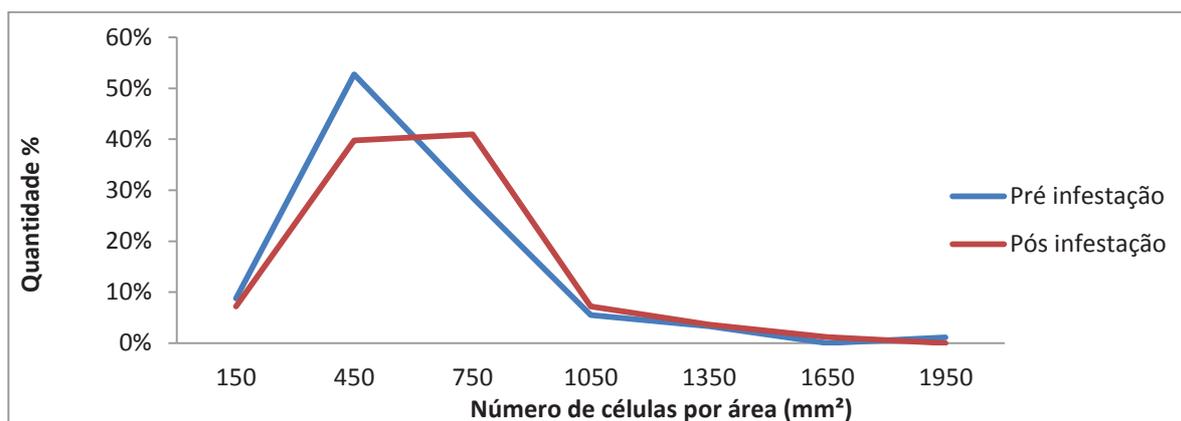
**Figura 5:** Pele de bovino. Imunohistoquímica, proteína S100, 400x. A. Imunomarcção positiva de glândulas sebáceas (estrela) e folículo piloso (cabeça de seta), intensa marcação de queratinócitos (seta amarela). B. Imunomarcção positiva de células dendríticas dermais, é possível observar o formato “estrelado” das células (seta). C. Amostra com imunomarcção positiva, observa-se a ausência de células dendríticas dermais nesta amostra. D. Amostra com imunomarcção positiva, é possível visualizar um grande número de células dendríticas dermais.

A correlação do número de carrapatos e o número de células imunomarcadas, foi positiva ( $p=0,0252$ ) na pré-infestação.

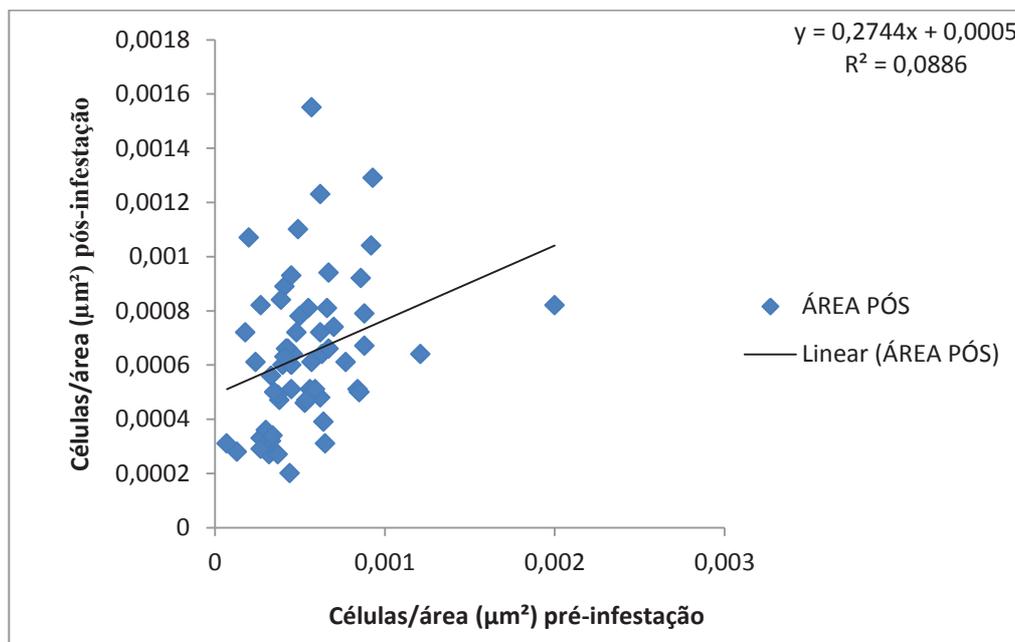
Não houve correlação entre o número de carrapatos e o número de células imunomarcadas na pós-infestação ( $p=0,053$ ). Observou-se que a quantidade média de carrapatos não influenciou a quantidade média de células por área pós-infestação.

A média de células por área foi igual para as classes de carrapato 1 e 2 (pré-infestação  $p=0,1005$ ; pós-infestação  $p=0,0911$ ). A classe 3 não pôde ser avaliada por apresentar somente um animal.

A porcentagem de animais com suas contagens de células por área pré e pós-infestação podem ser observados na **figura 6**, e a correlação de células pré e pós-infestação na **figura 7**.



**Figura 6:** Frequência relativa de bovinos relacionada ao número observado de células dendríticas dermais por área (mm<sup>2</sup>). A linha azul representa o número de células pré-infestação, e a linha vermelha representa o número de células pós-infestação.



**Figura 7:** Correlação entre o número de células dendríticas dermais por área, observado nas amostras de pele de bovinos, pós-infestação.

### 3.4 DISCUSSÃO

Por serem os animais selecionados para este estudo geneticamente semelhantes, pressupôs-se que a amostra era homogênea quanto aos mecanismos de resistência. Entretanto, como pode ser observado na figura 4, houve variação

importante na contagem de carrapatos entre os indivíduos. Pereira et al. (2008) afirmaram que existe considerável variação individual e racial na resistência de bovinos ao *R. microplus*. Barriga et al. (1993) sugeriram que diferenças genéticas entre animais afetam características de ingurgitamento do *R. microplus* em indivíduos aparentemente homogêneos (mesma raça, idade, sexo ou manejo).

Animais altamente resistentes têm mostrado maior desgranulação de mastócitos e maior densidade de eosinófilos, observados em respostas de hipersensibilidade tardia, sugerindo que este tipo de resposta está associado a uma maior resistência dos animais (Jonsson et al., 2014). Engracia Filho et al. (2006) e Veríssimo et al. (2008), em estudo com animais geneticamente homogêneos, observaram que havia diferença entre as cargas parasitárias destes animais e que animais classificados como susceptíveis apresentavam número significativamente menor de mastócitos na derme superficial, quando comparado a animais classificados como resistentes.

Muitos estudos focam em aspectos fisiológicos e, principalmente, imunológicos para explicar a diferença de resistência entre indivíduos, porém grande número de evidências vem sugerindo que o comportamento tem papel fundamental. Estudos comportamentais relatam traços que afetam o sucesso do parasito em colonizar os hospedeiros (Sarasa et al., 2011). O fator comportamental pode ter grande relevância para explicar a diferença da carga parasitária em uma população homogênea.

O mesmo pode ocorrer em relação às reações de hipersensibilidade, que levam o animal a se lambem e se coçar mais, retirando parasitos. Se animais mais resistentes possuem mais mastócitos dermais, como descrito por Engracia Filho et al. (2006), estes animais poderão estar promovendo maior retirada de carrapatos devido ao prurido causado pela histamina pós-desgranulação dos mastócitos, auxiliando como componente mecânico no controle parasitário.

A sazonalidade é citada por diversos autores como fator importante na carga parasitária dos animais (Carneiro et al., 1992; Oliveira et al., 2008; Ayres et al., 2015). Entretanto, no estudo feito por Engracia Filho et al. (2006), no qual foram utilizados os mesmos animais deste projeto, a sazonalidade não interferiu nos mecanismos de resistência do hospedeiro e nem na vida parasitária do ixodídeo quando realizada

infestação artificial, pois a fase de vida livre do parasito, a qual está mais sujeita aos efeitos da sazonalidade, é abolida.

Brown (1984) em um estudo com cobaias e carrapatos *Amblyomma americanum*, afirmou que a idade é uma variável importante na avaliação da resistência adquirida a carrapatos, e observou que cobaias mais jovens são imunologicamente mais responsivas a infestações por carrapatos do que cobaias mais velhas. Em crianças, Heinze et al. (2013) mostram que há declínio do número de células dendríticas de acordo com o desenvolvimento das crianças. Não existem estudos sobre as condições normais das CD em bovinos em diferentes idades para efeitos comparativos, sendo este um fator que deve ser futuramente estudado.

O ambiente no local de fixação encontrado pelo carrapato no hospedeiro tem grande influência sobre o grau de infestação e a determinação da resistência do hospedeiro. Espera-se que um animal que possui maior número de CD, tenha maior capacidade de apresentação de antígeno, resultando em menor carga parasitária. Os resultados deste estudo mostram que houve correlação significativa e positiva entre o número de carrapatos e de células imunomarcadas nas amostras de pré-infestação. Estudos recentes mostram que a saliva de diversas espécies de carrapatos modula diferentes estágios da biologia das CD, possuindo efeito inibitório na maturação, diferenciação, migração e na capacidade de apresentar antígeno (Oliveira et al., 2010). Um estudo mais recente feito por Carvalho-Costa et al. (2015) demonstra que a saliva de carrapatos *Amblyomma cajennense* provoca inibição da migração de células dendríticas, corroborando com o que foi descrito por Oliveira et al. (2010).

Não houve diferença significativa entre o número de células por área pré-infestação entre as classes de carrapato, evidenciando que as mesmas não influenciam de maneira negativa na carga parasitária do hospedeiro.

Entretanto, uma correlação positiva entre o número total de carrapatos e células dendríticas dermais foi observado, sugerindo que um maior número destas células pode criar um ambiente mais favorável para a fixação do carrapato, pois a saliva dos carrapatos inibe a ação das CD (que são apresentadoras de antígeno), e como

consequência haverá menor resposta imunológica, podendo esta ser uma explicação para esta correlação positiva entre a contagem de carrapatos e o número de células.

Foi levantada a hipótese de que a alteração no ambiente corpóreo produzida pelo *R. microplus* pudesse influenciar de forma positiva ou negativa na carga parasitária. Entretanto, não houve diferença significativa entre a contagem de carrapatos e o número de células por área pós-infestação, refutando a hipótese levantada. Oliveira et al. (2010) sugerem que carrapatos, durante sua evolução, possivelmente desenvolveram estratégias de sobrevivência para evadir-se da resposta pró-inflamatória/imune do hospedeiro por meio de receptores *Toll-like*. A capacidade de adaptação dos parasitos deve ser estudada mais a fundo para melhor compreensão da participação deles em driblar o sistema imune do hospedeiro.

Era esperado que houvesse imunomarcção de células dendríticas dermais, macrófagos, células de Langerhans na epiderme e condrócitos. Estas imunomarcções descritas em outras espécies foram observadas nas amostras deste estudo, além de marcação de intensidade um pouco menor nas glândulas sebáceas, e intensa marcação de queratinócitos, que acabou inviabilizando a observação de células de Langerhans.

Oliveira-Sequeira et al. (2000) utilizaram a proteína S100 para avaliação imunohistoquímica de CD em pele de bovinos infestados experimentalmente por *Dermatobia hominis*, entretanto as CL não foram marcadas e os queratinócitos apresentaram leve imunomarcção. Por outro lado, os pesquisadores obtiveram imunomarcção fortemente positiva para as CDD. Romero-Palomo et al. (2013) realizaram estudo usando diversos marcadores para identificar a população de células dendríticas em bovinos saudáveis, porém o marcador da proteína S100 não foi utilizado na pele. O presente estudo foi um passo inicial que agora evoluirá para a utilização de outros marcadores, como a Langerina (CD207), para observar se é possível marcar as CL de bovinos e, possivelmente, diferenciar as subpopulações de células dendríticas dermais.

Outros aspectos relacionados aos mecanismos de evasão dos carrapatos e à imunidade celular e humoral, como a população celular residente e migratória,

produção de anticorpos e citocinas inflamatórias, devem ser estudados para um melhor entendimento da interação hospedeiro-parasito.

### 3.5 CONCLUSÃO

Por meio deste estudo, conclui-se que:

- A proteína S100 pode ser utilizada para imunomarcção de células dendríticas dermais de bovinos;
- A Proteína S100 pode produzir imunomarcção em queratinócitos, interferindo na avaliação das células de Langerhans bovinas;
- O número de células dendríticas dermais não interferiu no grau de infestação por carrapatos em bovinos artificialmente infestados

## **CAPÍTULO 4**

### **4 CONCLUSÃO GERAL**

A infestação por carrapatos nos rebanhos é de grande relevância na pecuária, e compreender de forma plena todos os mecanismos envolvidos entre o parasito e o hospedeiro são de suma importância. Este estudo avaliou apenas um aspecto envolvido no mecanismo de defesa do hospedeiro, outros estudos comparando não somente fatores celulares podem trazer novas descobertas. Comparações dos tipos de pelo, pelagem e idade dos animais com outros fatores imunológicos podem ser interessantes, para um melhor entendimento do papel que estes parâmetros podem exercer no sistema imune do hospedeiro.

Formas alternativas no controle de carrapatos devem ser buscadas, visando reduzir custos ao produtor e auxiliar na boa manutenção do meio ambiente. A seleção de animais com determinadas características que possam contribuir para um menor grau de infestação vem se mostrando como uma alternativa para esta finalidade.

## REFERÊNCIAS

Andreotti R, Gomes A, Malavazi-Piza KC, Sasaki SD, Sampaio CAM, Tanaka AS. BmTI antigens induce a bovine protective immune response against *Boophilus microplus* tick. *International Immunopharmacology*. 2002; 2: 557 – 563.

Andreotti, R. Situação atual da resistência do carrapato-do-boi *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* aos acaricidas no Brasil [Internet]. [Campo Grande]: Embrapa Gado de Corte; 2010 [atualizado em dezembro 2010; citado 24 março 2016]. Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/871264>

Ayres DR, Pereira RJ, Boligon AA, Baldi F, Roso VM, Albuquerque LG. Genetic parameters and investigation of genotype x environment interactions in Nelore x Hereford crossbreed for resistance to cattle ticks in different regions of Brazil. *Journal of Applied Genetics*. 2015; 56: 107 – 113.

Barriga OO, Da Silva SS, Azevedo CSJ. Inhibition and recovery of ticks functions in cattle repeatedly infested with *Boophilus microplus* cattle. *Journal of Parasitology*. 1993; 79: 710 – 715.

Beaudouin E, Kanny G, Guerin B, Guerin L, Plenat F, Moneretvautrin DA. Usual manifestation of hypersensitivity after a tick bite: report of two cases. *Annals of Allergy, Asthma, & Immunology*. 1997; 79: 43 – 46.

Biegelmeier P, Nizoli LQ, da Silva SS, dos Santos TRB, Dionello NJL, Gúlias-Gomes CC, Cardoso FF. Bovine genetic resistance effects on biological traits of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Veterinary Parasitology*. 2015; 208: 231 –237.

Brown SJ. Effect of host age on the expression of acquired resistance to ticks. *Experientia*. 1984; 40: 199 – 200.

Carneiro JR, Calil F, Panicali E, Rodrigues N. Ocorrência de ixodidae e variação estacional do *Boophilus microplus* (Can., 1888) em bovinos da bacia leiteira de Goiânia – GO. *Revista de Patologia Tropical*. 1992; 21(2): 235 – 242.

Carvalho-Costa TM, Mendes MT, Silva MV, Costa TA, Tiburcio MGS, Anê ACBM, Rodrigues Júnior V, Oliveira CJF. Immunosuppressive effects of *Amblyomma cajennense* tick saliva on murine bone marrow-derived dendritic cells. *Parasites and Vectors*. 2015; 8: 22.

Cavassani KA, Aliberti JC, Dias AR, Silva JS, Ferreira BR. Tick saliva inhibits differentiation, maturation and function of murine bone-marrow-derived dendritic cells. *Immunology*. 2005; 114: 235 – 245.

Cunha RC, Léon AAP, Leite FPL, Pinto LS, Santos Júnior AG, Andreotti R. Bovine immunoprotection against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* with recombinant Bm86-Campo Grande antigen. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 2012; 21(3): 254 – 262.

Dako® Anti S100 [Internet]. Denmark; 2009. [Citado em 26 de agosto de 2015]. Disponível em: <http://www.dako.com/br/download.pdf?objectid=104923004>

Diaconescu DE, Dima L, Marinescu DM, Tântu MM, Rogozea LM. S100-positive dendritic cells in squamous cell laryngeal cancer. *Romanian Journal of Morphology and Embryology*. 2014; 55(4): 1371 – 1375.

Engracia Filho JR, Bechara GH, Teodoro RL. Dermal mast cell counts in F2 Holstein x Gir crossbred cattle artificially infested with the tick *Boophilus microplus* (Acari:Ixodidae). *Annals of the New York Academy of Science*. 2006; 1081: 476 – 478.

Grisi L, Leite CR, Martins JRS, Barros ATM, Andreotti R, Cançado PHD, León AAP, Pereira JB, Villela HS. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 2014; 23: 150 – 156.

Guerrero FD, Lovis L, Martins JR. Acaricide resistance mechanisms in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 2012; 21: 1 – 6.

Harman AN, Bye CR, Nasr N, Sandgren KJ, Kim M, Mercier SK, Botting RA, Lewin SR, Cunningham AL, Cameron PU. Identification of lineage relationships and novel markers of blood and skin human dendritic cells. *The Journal of Immunology*. 2013; 190: 66 – 79.

Heinze A, Elze MC, Kloess S, Ciocarlie O, Königs C, Betz S, Bremm M, Esser R, Klingebiel T, Serban M, Hutton JL, Koehl U. Age-matched dendritic cell subpopulations reference values in childhood. *Scandinavian Journal of Immunology*. 2013; 77: 213 – 220.

Hwang ST. Homeward bound: how do skin dendritic cells find their way into the lymph system?. *Journal of Investigative Dermatology*. 2012; 132: 1070 – 1073.

Jian H, Huaide H, Qingbi P, Zhijian Z, Xinru Y. Immunohistochemical study on S100 protein-positive dendritic cells in patients with gastric carcinoma. *Chinese Journal of Cancer Research*. 1990; 2(2): 54 – 58.

Jonsson NN, Piper EK, Constantinoiu CC. Host resistance in cattle to infestation with the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. *Parasite Immunology*. 2014; 36: 553 – 559.

Kaplan DH. *In vivo* function of Langerhans cells and dermal dendritic cells. *Trends in Immunology*. 2010; 31(12): 446 – 451.

Koch S, Kohl K, Klein E, von Bubnoff D, Bieber T. Skin homing of Langerhans cells precursors: adhesion, chemotaxis and migration. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2005; 117(1): 163 – 168.

Li J, Mbow ML, Sun L, Li L, Yang G, Griswold DE, Schantz A, Shealy DJ, Goletz TJ, Wan J, Peritt D. Induction of dendritic cell maturation by IL-18. *Cellular Immunology*. 2004; 227: 103 – 108.

Marufu MC, Dzama K, Chimonyo M. Cellular responses to *Rhipicephalus microplus* infestations in pre-sensitised cattle with differing phenotypes of infestation. *Experimental and Applied Acarology*. 2014; 62: 241 – 252.

Mattioli TMF, Noronha L, Lima AAS, Grégio AMT, Machado MAN, Azevedo MLV, Martins APC, Azevedo-Alanis LR. Utilização de brocas trefina para confecção de tissue microarray. *Archives of Oral Research*. 2011; 2(7): 161 – 167.

Mejri N, Brossard M. Splenic dendritic cells pulsed with *Ixodes ricinus* tick saliva prime naive CD4+T to induce Th2 cell differentiation in vitro and in vivo. *International Immunology*. 2007; 19: 535 – 543.

Miyazawa K, Aso H, Honda M, Kido T, Minashima T, Kanaya T, Watanabe K, Ohwada S, Rose MT, Yamaguchi T. Identification of bovine dendritic cell phenotype from bovine peripheral blood. *Research in Veterinary Science*. 2006; 81: 40 – 45.

Murakami R, Denda-Nagai K, Hashimoto S, Nagai S, Hattori M, Irimura T. A unique dermal dendritic cell subset that skews the immune response toward Th2. *Plos One*. 2013; 8(9): e73270.

Ng LG, Hsu A, Mandell MA, Roediger B, Hoeller C, Mrass P, Iparraguirre A, Cavanagh LL, Triccas JA, Beverley SM, Scott P, Weninger W. Migratory dermal dendritic cells act as rapid sensors of protozoan parasites. *Plos Pathogens*. 2008; 4(11): e1000222.

Nuñez JL, Muñoz-Cobeñas ME, Moldeto HL. *Boophilus microplus*: the common cattle tick. Berlin: Springer-Verlag; 1985.

Ochoa MT, Loncaric A, Krutzic SR, Becker TC, Modlin RL. “Dermal dendritic cells” comprise two distinct populations: CD1<sup>+</sup> dendritic cells and CD209<sup>+</sup> macrophages. *Journal of Investigative Dermatology*. 2008; 128: 2225 – 2231.

Oliveira CJ, Cavassani KA, More DD, Garlet GP, Aliberti JC, Silva JS, Ferreira BR. Tick saliva inhibits the chemotactic function of MIP-1a and selectively impairs chemotaxis of immature dendritic cells by down-regulating cell-surface CCR5. *International Journal of Parasitology*. 2008; 38: 705 – 716.

Oliveira CJF, Carvalho WA, Garcia GR, Gutierrez FRS, Santos IKFM, Silva JS, Ferreira BR. Tick saliva induces regulatory dendritic cells: MAP-kinases and Toll-like receptor-2 expression as potential targets. *Veterinary Parasitology*. 2010; 167: 288 – 297.

Oliveira-Sequeira TCG, Bachi CE, Lello E. S-100 dendritic cells in normal *Dermatobia hominis* infested cattle skin. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. 2000; 37(4): 00 – 00.

Pereira MC, Labruna MB, Szabó MPJ, Klafke GM. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* Biologia, Controle e Resistencia. São Paulo: MedVet; 2008.

Piper EK, Jackson LA, Bagnall NH, Kongsuwan KK, Lew AE, Jonsson NN. Gene expression in the skin of *Bos Taurus* and *Bos indicus* cattle infested with the cattle tick,

*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2008; 126: 110 – 119.

Piper EK, Jackson LA, Bielefeldt-Ohmann H, Gondro C, Lew-Tabor AE, Jonsson NN. Tick-susceptible *Bos taurus* cattle display an increased cellular response at the site of larval *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* attachment, compared with tick-resistance *Bos indicus* cattle. *International Journal for Parasitology*. 2010; 40: 431 – 441.

Porto-Neto LR, Reverter A, Prayaga KC, Chan EKF, Johnston DJ, Hawken RJ, Fordyce G, Garcia JF, Sonstegard TS, Bolormaa S, Goddard ME, Burrow HM, Henshall JM, Lenhart SA, Barendse W. The genetic architecture of climatic adaption of tropical cattle. *Plos One*. 2014; 9(11): e113284.

Rodríguez-Mallon A, Encinosa PE, Méndez-Pérez L, Bello Y, Fernández RR, Garay H, Cabrales A, Méndez L, Borroto C, Estrada MP. High efficacy of a 20 amino acid peptide of the acid ribosomal protein P0 against the cattle tick , *Rhipicephalus microplus*. *Ticks and Tick-borne Diseases*. 2015; 6: 530 – 537.

Rodriguez-Valle M, Moolhuijzen P, Piper EK, Weiss O, Vance M, Bellgard M, Lew-Tabor A. *Rhipicephalus microplus* lipocalins (LRMs): Genomic identification and analysis of the bovine immune response using in silico predicted B and T cell epitopes. *International Journal for Parasitology*. 2013; 43: 739 – 752.

Romero-Palomo F, Risalde MA, Molina V, Sánchez-Cordón PJ, Pedrera M, Gómez-Villamandos JC. Immunohistochemical detection of dendritic cell markers in cattle. 2013; 50: 1099 – 1108.

Sá-Nunes A, Báfica A, Lucas DA, Conrads TP, Veenstra TD, Andersen JF, Mather TN, Ribeiro JM, Francischetti IM. Prostaglandin E2 is a major inhibitor of dendritic cell

maturation and function in *Ixodes scapularis* saliva. *Journal of Immunology*. 2007; 179: 1497 – 1505.

Sarasa M, Pérez JM, Alasaad S, Serrano E, Soriguer RC, Granados JE, Fandos P, Joachim J, Gonzalez G. Neatness depends on season, age, and sex in Iberian ibex *Capra pyrenaica*. *Behavioral Ecology*. 2011; 22(5): 1070 – 1078.

Seifert GW. Selection of beef cattle in Northern Australia for resistance to the cattle tick (*Boophilus microplus*): research and application. *Preventive Veterinary Medicine*. 1984; 2: 553 – 558.

Silva JB, Rangel CP, Baêta BA, Fonseca AH. Analysis of the risk factors relating to cows' resistance to *Rhipicephalus microplus* ticks during the peripartum. *Experimental Applied Acarology*. 2014; 63: 551 – 557.

Skallová A, Iezzi G, Ampenberger F, Kopf M, Kopecky J. Tick saliva inhibits dendritic cell migration, maturation and function while promoting development of Th2 responses. *Journal of Immunology*. 2008; 180: 6186 – 6192.

Sparber F, Tripp CH, Hermann M, Romani N, Stoitzner P. Langerhans cells and dermal dendritic cells capture protein antigens in the skin: possible targets for vaccination through the skin. *Immunobiology*. 2010; 215: 770 – 779.

Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. *The Journal of Experimental Medicine*. 1973; 137: 1142 – 1162.

Szabó MPJ, Mukai LS, Rosa PCS, Bechara GH. Differences in the acquired resistance of dogs, guinea-pigs and hamsters to repeated infestations with ticks *Rhipicephalus sanguineus* (Acari:Ixodidae). *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. 1995; 32: 43 – 50.

Veríssimo CJ, Otsuk LP, Zeitlin AZ, Bechara GH. Infestação por carrapatos *Boophilus microplus* (ACARI:IXODIDAE) em vacas Jersey. Arquivos do Instituto Biológico. 2004; 71: suplemento

Veríssimo CJ, Bechara GH, Mukai LS, Ostuk IP, Arcaro JRP. Mast cell counts correlate with *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tick load in different cattle breeds. Brazilian Journal of Veterinary Pathology. 2008; 1(2): 81 – 87.

Wikel SK. Host immunity to ticks. Annual Review of Entomology. 1996; 41: 1 – 22.

Willadsen P. Immunity to tick. Advances in Parasitology. 1980; 18: 293 –313.

Yrliid U, Macpherson G. Phenotype and function of rat dendritic cell subsets. Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica. 2003; 111: 756 – 765.

Zhu L, Okano S, Takahara M, Chiba T, Tu Y, Oda Y, Furue M. Expression of S100 protein family members in normal skin and sweat gland tumors. Journal of Dermatological Science. 2013; 70: 211 – 219.

## ANEXOS

### Protocolo de imunohistoquímica utilizado no estudo

- Corte dos blocos em micrótomo com 4  $\mu\text{m}$  de espessura;
- Aderência do material cortado por seis meses em laminas eletricamente carregadas;
- Desparafinização com dois banhos de 10 minutos em xilol, banho em álcool etílico absoluto por um minuto, dois banhos em álcool etílico 80% por um minuto;
- Bloqueio da peroxidase endógena com solução de peróxido de hidrogênio e metanol 5% por 15 minutos;
- Recuperação antigênica das amostras com recuperador Target Retrieval Solution<sup>TM</sup> (Dako, Glostrup, Dinamarca) em banho-maria a 99°C por 8 minutos, após é deixado esfriar em temperatura ambiente antes de seguir para a próxima etapa;
- Delimitação da área das amostras com caneta hidrofóbica, seguido de aplicação de solução tampão fosfato tris pH 7,3 para evitar a secagem do material, e acomodação das lâminas em câmara úmida;
- Retirada da solução tampão, e aplicação de alíquota do marcador S100 policlonal (Dako, Glostrup, Dinamarca) em diluição 1:200;
- “*Overnight*” em geladeira;
- Lavagem das laminas com solução tampão fosfato tris pH 7,3, e aplicação o kit revelador Advance Link (Dako, Glostrup, Dinamarca) por 10 minutos, seguido de lavagem com solução tampão e aplicação do Advance Enzyme (Dako, Glostrup, Dinamarca) por 15 minutos;
- Aplicação do cromógeno DAB 1:1 (OriGene Rockville, MD, EUA), até a visualização da coloração castanha e lavar com água destilada;
- Contra-coloração com Hematoxilina de Harris por 3 minutos, seguido de enxague com água de torneira e mais 3 minutos em banho com água;

- Desidratar com três banhos de um minuto com álcool etílico absoluto;
- Diafanizar com três banhos de um minuto com xilol.