

Produção de reativos de oxigênio em resposta à infestação pelo carrapato *Rhipicephalus microplus* em animais taurinos e zebuínos: um mecanismo imune importante para controle do parasita

Leticia dos Santos Moreira⁽¹⁾, Paola Eduarda de Almeida Souza⁽¹⁾, Nicole Tafnes de Brito Silva Honório⁽²⁾, Clarissa Vidal de Carvalho⁽²⁾, Robert Domingues⁽⁶⁾, Emanuelle Baldo Gaspar⁽³⁾, Marta Fonseca Martins⁽³⁾, Ana Luíza Franco⁽⁵⁾, Daniele Lima Reis Faza⁽⁴⁾, Humberto de Mello Brandão⁽³⁾, Marco Antônio Machado⁽³⁾, Mariana Magalhaes Campos⁽³⁾, Gabrielle Oliveira Soares⁽⁶⁾, Wanessa Araújo Carvalho⁽³⁾ e Márcia Cristina de Azevedo Prata⁽³⁾

⁽¹⁾Graduanda em Medicina Veterinária – UFJF, Juiz de Fora, MG. e-mail: le.santos@estudante.ufjf.br, ⁽²⁾Graduanda em Ciências Biológicas - UFJF, Juiz de Fora, MG, ⁽³⁾Pesquisador, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG, ⁽⁴⁾Analista, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG, ⁽⁵⁾Técnico, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG, ⁽⁶⁾Mestranda em Medicina Veterinária – UFV, Viçosa, MG

Resumo- A pecuária leiteira é de grande importância para a economia do Brasil, contudo, infestações por carrapatos afetam significativamente a produção de leite. Sabe-se que animais *Bos indicus* apresentam maior resistência a carrapatos do que animais *Bos taurus*. Estudos demonstram que a saliva do carrapato, inoculada durante a hematofagia, desencadeia a produção de reativos de oxigênio (ROS) por macrófagos e neutrófilos. Estes radicais livres podem afetar o ciclo de vida do parasita, contudo sua produção em bovinos de diferentes raças ainda não foi elucidada. Dessa forma, o objetivo deste estudo é verificar a produção de ROS no soro de bezerros da raça Gir (*Bos indicus*) e da raça Holandês (HPB; *Bos taurus*) desafiados, de forma controlada, com infestação artificial por carrapatos. Os animais foram isolados e infestados artificialmente, de forma controlada, com a mesma quantidade de larvas do carrapato bovino *Rhipicephalus microplus*. A dosagem de ROS foi feita no soro, coletado antes e após cada infestação, por meio da reação de Griess. Resultados demonstraram que animais Gir apresentam aumento significativo na produção de ROS no decorrer das infestações, com níveis plasmáticos maiores que animais HPB. Ademais, os animais Gir também apresentaram contagem significativamente menor de carrapatos, sugerindo que esse pode ser um dos fatores determinantes que afetam a infestação de carrapatos em bovinos. Dessa forma, a modulação da produção de ROS em células bovinas pode constituir uma ferramenta importante no combate ao carrapato.

Termos para indexação: carrapato, gir, holandês, pecuária de leite, reativos de oxigênio, resistência.

Production of reactive oxygen species in response to infestation by the tick *Rhipicephalus microplus* in taurine and zebu animals: a crucial immune mechanism for parasite control

Abstract- Dairy farming is of great importance to the economy of Brazil, however, tick infestations significantly affect milk production. It is acknowledged that *Bos indicus* animals exhibit greater resilience to ticks compared to *Bos taurus* animals. Studies elucidate that tick saliva, introduced during hematophagy, triggers the generation of reactive oxygen species (ROS) by macrophages and neutrophils. These free radicals can impact the parasite's life cycle, though their production across bovines of distinct breeds remains unresolved. Thus,

the aim of this study is to assess ROS production in the serum of Gir breed (*Bos indicus*) and Holstein breed (HPB; *Bos taurus*) calves, intentionally subjected to controlled artificial tick infestations. The animals were isolated and artificially infested with equal quantities of larvae from the bovine tick *Rhipicephalus microplus*. ROS measurement was performed on serum samples collected before and after each infestation, utilizing the Griess reaction. Results indicate that Gir animals manifest a significant rise in ROS production during infestations, exhibiting plasma levels surpassing those of HPB animals. Furthermore, Gir animals also display notably lower tick counts, suggesting that this might be one of the determinants affecting tick counts in bovines. Hence, modulating ROS production in bovine cells could constitute a pivotal tool in combating tick infestations.

Index terms: dairy farming, gyr, holstein, oxygen reagents, resistance, tick.

Introdução

O carrapato *Rhipicephalus microplus* está presente durante todo o ano, desencadeando perdas de US\$ 3,24 bilhões ano no mercado nacional (Grisi et al., 2014) relacionadas a aquisição de carrapaticidas e de equipamentos de suporte para aplicação dos mesmos nos rebanhos, queda na produção de leite e carne, danos no couro e transmissão de agentes de doenças (Andreotti, 2010).

Animais *Bos indicus* apresentam maior resistência a carrapatos do que animais *Bos taurus* devido a alguns fatores imunológicos e comportamentais (Tabor et al., 2017). A saliva do carrapato inoculada no hospedeiro, durante a hematofagia, promove a ativação do processo inflamatório, que é influenciado pela raça bovina e histórico de exposição (Utech et al., 1978).

As espécies reativas de oxigênio (ROS) estão envolvidas na iniciação, progressão e resolução da resposta inflamatória, além de atuarem como agentes microbicidas e mediadores de sinalização intracelular (Forrester et al., 2018). Parasitas são afetados por essas moléculas que, quando complexadas, favorecem a perda de ferro intracelular, a inativação de enzimas essenciais para o ciclo de Krebs, para a cadeia transportadora de elétrons e para a síntese de DNA (James, 1995). Apesar de achados demonstrarem que há diferença no desenvolvimento de inflamação em bovinos resistentes e susceptíveis aos carrapatos, pouco se sabe sobre a produção de ROS.

Dessa forma, o objetivo desse estudo é verificar a produção de ROS no soro de bezerros da raça Gir (*Bos indicus*) e Holandês (HPB; *Bos taurus*) desafiados, de forma controlada, com infestação artificial por carrapatos. Os resultados que a seguir são expostos vão ao encontro dos Objetivos do Desenvolvimento Sustentável (ODS) contidos na Agenda 2030, proposta pela Organização das Nações Unidas, da qual o Brasil é signatário, contribuindo para o alcance dos seguintes objetivos específicos: ODS 1 - Erradicação da pobreza: Acabar com a pobreza em todas as suas formas, em todos os lugares; ODS 2 - Erradicação da fome: acabar com a fome, alcançar a segurança alimentar e melhoria da nutrição e promover a agricultura sustentável; ODS 8 - Empregos dignos e crescimento econômico: promover o crescimento econômico sustentado, inclusivo e sustentável, emprego pleno e produtivo, e trabalho decente para todos.

Material e métodos

Animais Gir (n=10) e HPB (n=10) foram separados da mãe ao nascimento e isolados, imediatamente, em baias teladas e alimentados com colostro em pó (The Saskatoon Colostrum Company Ltd., Canadá) nas primeiras 24 horas para padronização da imunidade passiva. Os animais foram desafiados com infestações controladas com larvas infestantes de carrapato (10.000 larvas/animal na primeira e 20.000 nas subsequentes), por três vezes, com intervalo de 45 dias entre elas. Amostras de soro foram coletadas antes de cada infestação e após 24 horas, além de feita a contagem de teleóginas conforme preconizado por (Wharton; Utech, 1970).

A dosagem de reativos de oxigênio foi feita com o Kit Griess (Thermoscientific®), conforme recomendações do fabricante. Foi misturado o reagente de Griess (150ul) com o soro dos animais (n=6/grupo), feita curva padrão com amostra de referência contida no kit (Figura 1) e água como controle negativo (150ul de cada). A mistura foi incubada a temperatura ambiente, por 30 minutos, seguida da leitura de absorbância no espectrofotômetro de placas a 548 nm. O cálculo para quantificação de ROS nas amostras foi feito com base na curva de DO vs concentração das diluições das amostras de referência resultante da leitura de absorbância.

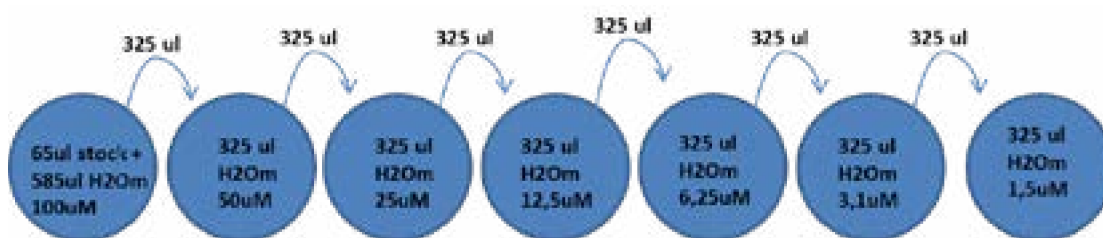


Figura 1. Desenho esquemático da diluição da amostra de referência do kit Griess (Thermoscientific) destacando a concentração e volumes utilizados.

Resultados e discussão

A contagem de carrapatos em animais da raça Gir (zebuínos) foi significativamente menor nas três infestações artificiais com carrapatos em relação aos HPB (taurinos; Figura 2), o que já era esperado conforme estudos de Wagland (1979). Mesmo o desafio com larvas de carrapato tendo apresentado a mesma carga parasitária, e os animais estarem com a imunidade passiva controlada devido ao uso de um colostro em pó importado de uma região livre do *R. microplus*, a carga parasitária foi afetada pela raça desde a primeira infestação, demonstrando a importância da genética do animal no desenvolvimento de uma imunidade protetora contra o parasita (Tabor et al., 2017).

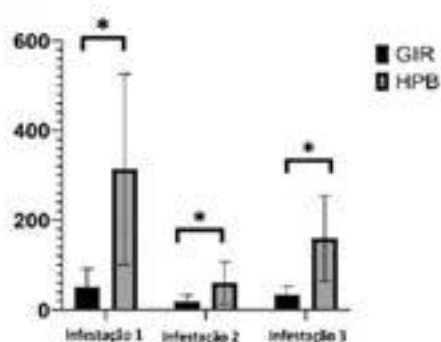


Figura 2. Contagem média de carrapatos em animais taurinos e zebuínos. No eixo X, média do número de teleóginas contadas aos 21 dias após infestação artificial em animais Gir (n=10) e HPB (n=10) com 10 dias de intervalo entre estas. (*) Comparação entre as duas raças (P<0,05), Mann-Whitney.

Em relação à produção de ROS, podemos observar uma diferença significativa entre animais Gir e HPB após a primeira infestação por carrapatos (Figura 3). Essa produção aumenta gradativamente de acordo com a exposição (P<0,05, Two-Way Anova) sendo que animais Gir apresentam maiores níveis após a segunda infestação. Esses radicais livres possuem papéis ambivalentes, amplificando a inflamação do hospedeiro (Hernandez et al., 2022), que por sua vez facilita o ingurgitamento do carrapato e desestabiliza seu metabolismo energético, afetando o ingurgitamento e seu ciclo de vida.

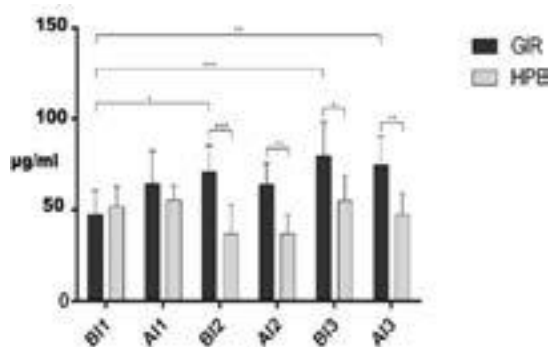


Figura 3. Concentração de ROS convertido em nitrito no soro de animais taurinos e zebuínos desafiados com carrapatos. Soro de animais Gir (n=6) e HPB (n=6) foram coletados antes (BI) e após (AI) as três diferentes infestações artificiais com larvas infestantes de *R. microplus*. No eixo Y, concentração de nitrito (µg/ml). Os asteriscos (*, **, ***) indicam P<0,05, Two-way Anova.

Dessa forma, sugere-se que a produção de ROS aumentada nos animais Gir esteja atuando de forma negativa sobre o organismo dos carrapatos, impedindo o seu ingurgitamento e, conseqüentemente, sendo um dos fatores determinantes da resistência desses animais à infestação por carrapatos.

Conclusões

Animais Gir apresentam menor contagem de fêmeas de carrapato ingurgitadas e maiores níveis de ROS que animais HPB. Desse modo, a modulação da produção de ROS em células bovinas pode constituir uma ferramenta importante no combate ao carrapato, tendo em vista o prejuízo significativo que estes parasitas causam para a economia do país.

Agradecimentos

Ao apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig).

Referências

- ANDREOTTI, R. **Situação atual da resistência do carrapato-do-boi *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* aos acaricidas no Brasil**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2010. 36 p. (Embrapa Gado de Corte. Documentos, 180). Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/24569/1/DOC180.pdf>. Acesso em: 17 ago. 2023.
- FORRESTER, S. J.; KIKUCHI, D. S.; HERNANDES, M. S.; XU, Q.; GRIENGLING, K. K. Reactive oxygen species in metabolic inflammatory signaling. **Circulation Research**, v. 122, n. 6, p. 877-902, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.311401>.
- GRISI, L.; LEITE, R. C.; MARTINS, J. R. de S.; BARROS, A. T. M. de; ANDREOTTI, R.; CANÇADO, P. H. D.; LEÓN, A. A. P. de; PEREIRA, J. B.; VILLELA, H. S. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Revista brasileira de parasitologia veterinária**, v. 23, n. 2, p. 150-156, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1984-29612014042>.
- HERNANDEZ, E. P.; ANISUZZAMAN; ALIM, M. A.; KAWADA, H.; KWOFIE, K. D.; LADZEKPO, D.; KOIKE, Y.; INOUE, T.; SASAKI, S.; MIKAMI, F.; MATSUBAYASHI, M.; TANAKA, T.; TSUJI, N.; HATTA, T. Ambivalent roles of oxidative in triangular relationships among arthropod vectors, pathogens and hosts. **Antioxidants**, v. 11, n. 7, 1254, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/antiox11071254>.
- JAMES, S. L. Role of nitric oxide in parasitic infections. **Microbiological Reviews**, v. 59, n. 4, p. 533-547, 1995. DOI: <https://doi.org/10.1128/mr.59.4.533-547.1995>.
- TABOR, A. E.; ALI, A.; REHMAN, G.; GARCIA, G. R.; ZANGIROLAMO, A. F.; MALARDO, T.; JONSSON, N. N. Cattle tick *Rhipicephalus microplus*-host interface: a review of resistant and susceptible host responses. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, article 506, 2017. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00506>.
- UTECH, K.; WHARTON, R. H.; KERR, J. D. Resistance to *Boophilus microplus* (Canestrini) in diferente breeds of cattle. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 29, n. 4, p. 885-895, 1978. DOI: <https://doi.org/10.1071/AR9780885>.