
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR)

**Efeitos *in vitro* e *in vivo* do Extrato de
Glândulas Salivares de Fêmeas de
Carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* com
2 Dias de Alimentação Sobre Modelos
Tumorais**



Fabiana Alonso Rocha

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular).

Rio Claro
Estado de São Paulo – Brasil
Dezembro - 2014

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR)

**Efeitos *in vitro* e *in vivo* do Extrato de
Glândulas Salivares de Fêmeas de
Carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* com
2 Dias de Alimentação Sobre Modelos
Tumorais**



Fabiana Alonso Rocha

Orientadora: Profa. Dra. Maria Izabel Camargo-Mathias

Co-Orientadora: Dra. Karim C. S. Furquim

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular).

Rio Claro
Estado de São Paulo – Brasil
Dezembro- 2014

Dedico este trabalho a minha
família, meu companheiro
Juliano e minha filha Julia.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a CAPES, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, que possibilitou a realização deste trabalho apoiando-o financeiramente.

Agradeço a Professora Dra. Maria Izabel Camargo Mathias, pela orientação, instrução, parceria e ajuda atemporal durante a realização deste trabalho, sem a qual as possibilidades, a viabilização e a concretização deste sonho não teria sido possível.

Agradeço a Professora Dra. Karim Christina Scopinho Furquim, pela co-orientação, sempre disposta a co-orientar e ajudar em todos os momentos, contribuindo com seus conhecimentos para a realização deste trabalho.

Agradeço a todos aqueles que me ajudaram a realizar este trabalho e também aqueles que, do meu lado estiveram, na realização deste trabalho.

A graduanda Marina Abreu e ao mestrando Luis Adriano Anholetto que me ajudaram na realização deste trabalho com muito companheirismo.

Ao Técnico Gerson e a secretária Cristiane figuras ímpares do Departamento de Biologia, que contribuíram com seus conhecimentos técnicos e de vida.

As colegas Letícia Hebling, Fabiana Novaes e Maria José Morsoleto, que também contribuíram com seus conhecimentos e ajuda para a realização desta.

Ao meu marido pelo apoio, paciência e amor incondicional diante das várias adversidades que juntos superamos. A Julia, nossa filha, presente e benção que Deus nos deu no decorrer destes quatro anos.

Aos meus pais, Marlene e Orlando, por todo carinho, apoio e dedicação. A minha irmã, Stella, agradeço todo companheirismo e amizade.

A todos os amigos que estiveram ao meu lado, me agüentaram e me ajudaram das mais diferentes maneiras durante esse período, principalmente a Suzana N. F. Zago.

Aos responsáveis pela secretaria da pós-graduação desta universidade, que com carinho, atenção e prontidão sempre nos recebem e atendem.

A Deus por tornar tudo isso possível.

**“É preciso medir a verdade
segundo as inteligências; velá-la
aos fracos que ela tornaria
loucos, ocultá-la aos maus que
dela não poderiam apreender
senão fragmentos dos quais
fariam armas de destruição.
Encerra-a em teu coração, e que
ela fale por tua obra. A ciência
será tua força, a fé tua espada
e o silêncio tua armadura
invencível.”**

J. W. Rochester

Resumo

No presente trabalho foram realizados testes para demonstrar o potencial antitumoral de extratos de glândulas salivares de fêmeas de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* com 2 (**EGS2**) dias de alimentação sobre células das linhagens DH82 e HL-60 (*in vitro*), bem como os efeitos de duas concentrações diferentes (0,2 e 0,04 μ g/ μ L) de extratos (com uma ou duas injeções) obtidos a partir das mesmas glândulas da espécie de carrapato com o mesmo tempo de alimentação sobre a morfofisiologia da musculatura de pernas posteriores de ratas Wistar inoculadas com células do tumor de Walker 256 (*in vivo*). *In vitro* as células tumorais foram expostas às concentrações do extrato pelo período de 24 horas e então encaminhadas para as avaliações quantitativa (análise dos parâmetros viabilidade e o número total de células) e morfológica (análises sob microscopia de luz convencional: coloração pela hematoxilina e eosina, e sob microscopia confocal: marcação do citoesqueleto/núcleo, verificação da viabilidade celular, bem como detecção da atividade das caspases 3 e 7). Os resultados quantitativos mostraram que o extrato **EGS2** afetou negativamente tanto a viabilidade quanto a proliferação das células tumorais, sendo que a concentração de 0,2 reduziu a viabilidade das DH82 e a de 0,5 reduziu a proliferação destas. Para as células HL-60 as concentrações de 0,2 e de 0,5 reduziram a viabilidade, sendo ainda que a concentração de 0,5 foi mais eficaz nesse processo. Os dados morfológicos revelaram que tanto as DH82 (exposição a 0,2 μ g/mL do **EGS2**) quanto as HL-60 (exposição a 0,2 e 0,5 μ g/mL do **EGS2**) tiveram a viabilidade comprometida. Além disso, detectou-se alterações citoplasmáticas e nucleares como: a) desorganização do citoesqueleto (actina e tubulina), b) condensação e concentração da cromatina em blocos distribuídos ou por todo o núcleo ou somente na sua periferia (marginalização cromatínica), picnose, formação de “blebbs” e fragmentação nuclear, c) atividade das caspases 3 e 7 e d) rompimento celular, características estas que permitiram inferir que as células sofreram apoptose. As aplicações da técnica e coloração pela hematoxilina-eosina assim como daquela para marcação do citoesqueleto e núcleo nas DH82 (exposição a 0,5 μ g/mL do **EGS2**) mostraram que a viabilidade não foi comprometida, contudo houve desorganização do citoesqueleto, bem como presença de menor quantidade de células em divisão em comparação ao **Controle 2**. *In vivo* os resultados mostraram tanto na

histologia quanto na microscopia eletrônica que uma injeção da menor concentração do extrato (0,04 μ g/ μ L) foi mais efetiva na contenção da invasão tumoral, bem como causou menores “danos colaterais” ao tecido muscular, objeto deste estudo. Foi também realizada a quantificação do número de leucócitos, bem como dos níveis de creatinina a qual apresentou seu nível aumentado nas ratas submetidas a uma e a duas injeções do extrato na concentração de 0,04 μ g/ μ L quando comparadas àquelas submetidas a uma e a duas injeções do extrato na maior concentração, sugerindo que nos primeiros a injeção do extrato contribuiu para a manutenção da integridade do tecido muscular. Quanto ao parâmetro aumento/diminuição do número de leucócitos, os resultados sugeriram que em todas as ratas inoculadas houve aumento significativo do número total de leucócitos. Naquelas inoculadas e submetidas às injeções (uma e duas) na concentração de 0,2 μ g/ μ L houve aumento significativo de leucócitos quando comparou-se com aquelas apenas inoculadas e não expostas ao extrato, sugerindo que além das células tumorais o próprio extrato nesta concentração agiu como potencializador da resposta de defesa. Ao contrário, aquelas ratas inoculadas e submetidas às injeções (uma e duas) na concentração de 0,04 μ g/ μ L apresentaram redução significativa no número total de leucócitos quando comparadas às ratas apenas inoculadas e as inoculadas e injetadas com extrato na concentração de 0,2 μ g/ μ L. Esses resultados reforçaram que o extrato na concentração de 0,04 μ g/ μ L além de agir com maior efetividade na inibição das células tumorais, não atuou como agente estressor, visto o número de leucócitos ter sido menor. De forma geral, os extratos glandulares comprometeram tanto a viabilidade das células tumorais por meio da indução da apoptose, quanto à proliferação das mesmas, reduzindo essa taxa. Esses eventos variaram em função das concentrações, do modelo tumoral *in vitro* submetido às exposições (linhagens DH82 ou HL-60). Corroborando esses dados *in vivo*, aqueles obtidos sinalizaram que moléculas produzidas pelas glândulas salivares desta espécie de carrapatos teriam capacidade de inibir o crescimento tumoral, além de minimizar os “danos colaterais” ao organismo.

Palavras chave: *Rhipicephalus sanguineus*, câncer, DH82, HL-60, tumor de Walker 256.

Abstract

In this study, tests were conducted to demonstrate the antitumor potential of salivary gland extract of female ticks *Rhipicephalus sanguineus* 2 (**EGS2**) days of feeding on the DH82 cell lines HL-60 and (in vitro), as well as the effects of two different concentrations (0,2 and 0,04 μ g/uL) extracts (one or two injections) obtained from the same glands of the same species at the same time of tick feeding on morphophysiology muscle of hind legs of female Wistar rats inoculated with Walker 256 tumor cells (*in vivo*). *In vitro*, tumor cells were exposed to concentrations of the extract for 24 hours and then forwarded to the quantitative assessments (analysis parameters and viability percentage of total cells) and morphology (analysis under conventional light microscopy: hematoxylin and eosin and under confocal microscopy: marking cytoskeletal / core check cell viability, as well as the detection of the activity of caspases 3 and 7). The quantitative results show that the extract **EGS2** adversely affects both the viability as the proliferation of tumor cells, and the concentration of 0,2 reduced the viability of DH82 and 0,5 reduced the proliferation of these. For HL-60 concentrations of 0,2 and 0,5 reduced the viability still being the concentration of 0,5 was most effective in this process. Morphological data showed that both DH82 (exposure to 0,2 mg / mL of **EGS2**) and HL-60 (exposure to 0,2 to 0,5 mg / mL of **EGS2**) had impaired viability, or in such concentrations there was death of **EGS2** cell, which occurred earlier in DH82 (presence of large blocks containing cell debris). Moreover, it was detected cytoplasmic and nuclear changes resulting from exposure to the extracts, which were: a) disruption of the cytoskeleton (actin and tubulin), b) condensation of chromatin and concentration in blocks or distributed throughout the core or only on its periphery (chromatin marginalization), pyknosis, training "blebbs" and nuclear fragmentation, c) activity of caspases 3 e 7 d) cell disruption, this being allowed to infer that the cells underwent apoptosis. Moreover, the application of hematoxylin and eosin as that used to mark the nucleus and cytoskeleton in DH82 (exposure to 0,5 μ g / mL **EGS2**) showed that the viability was not impaired, but there was disruption of the cytoskeleton as well as the presence minor amount of dividing cells in comparison to Control 2. *In vivo*, quantification of the number of leukocytes was also carried out and creatinine levels in individuals of all groups. The results showed both histology and in electron microscopy that an injection of lower

concentration of the extract (0,04 μ g/uL) was more effective in containing tumor invasion and caused minor "collateral damage" to the muscle tissue, the subject of this study. Regarding the parameter creatinine, their level found to have increased in rats submitted to one and two injections of the extract at a concentration of 0,04 μ g/uL compared to those subjected to and the two injections of the extract in the highest concentration, suggesting that the first to extract the injection contributed to the maintenance of integrity of muscle tissue. As to the parameter increase / decrease in the number of leukocytes, the results suggested that in all inoculated mice showed a significant increase in the total number of leukocytes. Inoculated and those submitted injections (one-two) in the concentration of 0,2 μ g/uL significant increase of leukocytes when compared with those inoculated only and not exposed to the extract, suggesting that in addition to tumor cells the extract itself at this concentration acted as defense response enhancer. Conversely, those rats inoculated and subjected injections (one-two) in a concentration of 0,04 μ g/uL showed a significant reduction in the total number of leukocytes compared to mice inoculated only and inoculated with extract and injected at a concentration of 0,2 μ g/uL. These results reinforced that the extract at a concentration of 0,04 μ g/uL addition to acting with greater effectiveness in inhibiting tumor cells, did not act as a stressor agent, as the number of leukocytes was lower. Thus, our findings showed that the changes in the cytoskeleton of DH82 cells (exposure to 0,5 μ g / ml of **EGS2**) probably occurred due to impaired proliferation of them. In general, both glandular extracts committed viability of tumor cells through induction of apoptosis, as the proliferation of the same, reducing that rate. These events varied depending on the concentrations of tumor in vitro model subjected to exposure (DH82 lines or HL-60). Corroborating these data in vivo, those obtained signaled that molecules produced by the salivary glands of this species of ticks have ability to inhibit tumor growth, and minimize "collateral damage" to the body.

Keywords: *Rhipicephalus sanguineus*, cancer, DH82, HL-60, Walker 256 tumor.

SUMÁRIO

Resumo.....	iv
1. Introdução e Revisão da Literatura.....	1
2. Objetivos.....	15
3. Material e Métodos.....	17
3.1. Material.....	17
3.1.1. Obtenção das Larvas de <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	18
3.1.2. Obtenção das Ninfas de <i>R. sanguineus</i>	18
3.1.2.1. Confeção da Câmara Alimentadora (BECHARA et al., 1995).....	18
3.1.2.2. Fixação da Câmara Alimentadora no Hospedeiro (BECHARA et al., 1995)	19
3.1.3. Obtenção das Fêmeas Adultas de <i>R. sanguineus</i>	19
3.2. Métodos.....	20
3.2.1. Obtenção das Glândulas Salivares e do Extrato Glandular EGS2.....	20
3.2.2. Modelo de Estudo Tumoral <i>in vitro</i>	21
3.2.3. Bioensaio 1.....	23
3.2.4. Bioensaio 2.....	24
3.2.5. Bioensaio 3.....	25
3.2.6. Microscopia de Luz Convencional.....	26
3.2.7. Microscopia Confocal de Varredura a Laser.....	27
3.3. Modelo de Estudo Tumoral <i>in vivo</i>	30
3.3.1. Obtenção e manutenção das células do tumor de Walker 256.....	30
3.3.2. Implantação do tumor de Walker 256 e injeções com o extrato da glândula salivar de <i>R. sanguineus</i>	31
3.3.3. Injeção do extrato.....	31
3.3.4. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	32
3.3.5. Análise Bioquímica do Sangue.....	33
4. Resultados.....	35

Capítulo 1: Ação das Secreções Produzidas pelas Glândulas Salivares de Fêmeas de Carrapatos <i>Rhipicephalus sanguineus</i> com 2 Dias de Alimentação Sobre Modelos Tumorais <i>in vitro</i>: Células DH82 e HL-60.....	37
Capítulo 2: A Glândula Salivar de Fêmeas de Carrapatos <i>Rhipicephalus sanguineus</i>: Potencial Reservatório de Moléculas com Ação Inibidora (<i>in vivo</i>) Sobre Células de Tumor de Walker 256.....	89
5. Considerações Finais.....	121
6. Referências Bibliográficas Gerais.....	123

Introdução e Revisão da Literatura

1. Introdução e Revisão da Literatura

Carrapatos X Bioativos Salivares

Os carrapatos são ectoparasitas hematófagos, cuja alimentação se dá basicamente devido à ação combinada das estruturas bucais e da saliva, esta última produzida pelas glândulas salivares (BALASHOV, 1972).

As glândulas salivares da espécie *Rhipicephalus sanguineus* (LATREILLE, 1806) (Acari: Ixodidae) tem sido estudadas por Furquim desde 2007, que tem demonstrado que este órgão apresenta extrema complexidade morfofisiológica e, além disso, estabeleceu uma nova classificação para as células glandulares, a qual agregou um número maior de tipos no ácino II das glândulas tanto de fêmeas quanto de machos. Especificamente nas fêmeas as glândulas salivares são compostas por ácinos dos tipos I, II e III (FURQUIM, 2007; CAMARGO-MATHIAS; FURQUIM, 2013) e nos machos pelos I, II, III e IV (FURQUIM et al., 2008a, b, 2010). Os do tipo I são agranulares e estão envolvidos com o balanço hídrico do ectoparasita, enquanto os II e III, granulares, atuam no processo de fixação, alimentação e de osmorregulação na fase de grande consumo de sangue (FURQUIM, 2007). Já os do tipo IV (granulares), segundo a literatura não têm ainda sua função bem estabelecida, porém, parecem atuar na reprodução dos ectoparasitas (FELDMAN-MESHAM et al., 1970). Nas fêmeas de *R. sanguineus* os ácinos II são constituídos pelas células secretoras dos tipos *a*, *b*, *c1*, *c2*, *c3*, *c4*, *c5* e *c6*, enquanto que os III pelos tipos *d*, *e* e *f* (FURQUIM, 2007; CAMARGO-MATHIAS; FURQUIM, 2013). Nos machos verificou-se a presença adicional das células *c7* e *c8* nos ácinos II. Os ácinos IV são formados exclusivamente pelas células *g* (FURQUIM et al., 2008a, 2010).

Segundo Camargo-Mathias et al. (2011) a saliva dos carrapatos é uma mistura complexa assim como o órgão onde ela é produzida, sendo considerada um grande, diversificado e eficaz arsenal farmacológico que garante a alimentação e a sobrevivência dos carrapatos (STEEN et al., 2006; FRANCISCHETTI et al., 2010). Nesta saliva encontram-se moléculas das mais variadas naturezas com papel na modulação do sistema imune-inflamatório e hemostático dos hospedeiros (STEEN et al., 2006; HAJNICKÁ et al., 2011), sendo considerada um reservatório em potencial de moléculas multifuncionais, onde estão presentes compostos bioativos de grande

interesse (BATISTA et al., 2008). Por esta razão, a saliva vem sendo alvo de diferentes estudos devido, principalmente, ao grande interesse na identificação e isolamento de moléculas bioativas com ações: vasodilatadora, antiinflamatória, anticoagulante e imunossupressora (OLIVEIRA et al., 2010).

Segundo a literatura, a saliva de diferentes espécies de carrapatos, dentre elas a de *R. sanguineus*, modula diferentes passos da biologia das células dendríticas, como por exemplo sua maturação (OLIVEIRA et al., 2008; 2010), inibe a proliferação de células endoteliais e tem apresentado ações: anti-angiogênica (FRANCISCHETTI et al., 2010; DREWES et al., 2012), e anti-tumoral (KAZIMÍROVÁ et al., 2006; CHUDZINSKI-TAVASSI et al., 2010; SIMONS et al., 2011; AKAGI et al., 2012). Além disso, nela foram identificadas proteínas anticoagulantes, como o peptídeo anticoagulante do carrapato (TAP) obtido a partir da saliva do carrapato *Ornithodoros moubata* (WAXMAN et al., 1990), a boophilina, de *R. (Boophilus) microplus* (MACEDO-RIBEIRO et al., 2008), ixolaris e penthalaris de *Ixodes scapularis* (FRANCISCHETTI et al., 2002; FRANCISCHETTI et al., 2004) e amblyomin-X, de *Amblyomma cajennense* (BATISTA et al., 2010), as quais teriam potencial no tratamento de doenças como à trombose.

Dentre os elementos presentes na saliva dos carrapatos destacam-se os componentes de origem glicoprotéica, lipoprotéica e lipídica (CAMARGO-MATHIAS et al., 2011), como calreticulina, fosfatase ácida, esterases, aminopeptidases, metaloproteinases, lipocalinas e prostaglandinas (BROSSARD; WIKEL, 2004; STEEN et al., 2006; MULENGA et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2011; CAMARGO-MATHIAS et al., 2011), entre muitas outras, com propriedades farmacológica e/ou imunológica. Especificamente em fêmeas de *R. sanguineus* recentemente foi demonstrada a presença de proteínas, polissacarídeos, lipídeos, fosfatase ácida e cálcio na secreção salivar, sendo que de acordo com os estudiosos o cálcio provavelmente estaria ligado a uma calreticulina (FURQUIM et al., 2013). Ainda na saliva de carrapatos da espécie *R. sanguineus*, Oliveira et al. (2011) detectaram a presença de moléculas de origem não protéica, prostaglandina (PGE2) e adenosina (Ado), com potente propriedade imunomoduladora.

Segundo Furquim et al. (2013 e 2014) a complexidade bioquímica da composição da saliva do carrapato *R. sanguineus* se modifica ao longo do repasto

sanguíneo deste, devido à necessidade do mesmo modular o sistema homeostático local do hospedeiro. De acordo com os autores esta mistura varia tanto quantitativa quanto qualitativamente quando considerados períodos específicos do ciclo glandular como o início (2 dias de alimentação), o meio (4 dias) e o final (6 dias) da produção da secreção. Somando-se a isso, Furquim et al. (2011) também demonstraram que o comportamento secretor das glândulas salivares de fêmeas de *R. sanguineus* modificaria-se em função da resistência adquirida pelo hospedeiro, quando imunizado. Furquim et al. (2013) também verificaram que na secreção glandular destas mesmas fêmeas houve variação nos componentes de origem protéica, polissacarídica e lipídica, bem como da fosfatase ácida e do cálcio (provavelmente calreticulina), o que sinalizou que a secreção salivar teria a composição e ação também modificadas ao longo do ciclo glandular quando estas fossem alimentadas em hospedeiro previamente imunizado.

De acordo com a literatura, as calreticulinas da saliva dos carrapatos apresentam papel importante na relação parasita-hospedeiro, por agir como imunossupressor e antihemostático, facilitando assim o processo de alimentação (BROSSARD; WIKEL, 2004; STEEN et al., 2006). Além disso, as calreticulinas têm a capacidade de inibir a proliferação de células endoteliais apresentando, portanto, ação anti-angiogênica, o que possibilita alterar a taxa do crescimento tumoral (JAWORSKI et al., 1995; PIKE et al., 1999). Neste sentido e considerando a importância das calreticulinas para o sistema imunológico, bem como sua ação inibidora da angiogênese, muitos estudos tem sido realizados no sentido de se demonstrar a ação antitumoral desta, bem como encontrar métodos de utilizá-la na terapia do câncer (BASU; SRIVASTAVA, 1999; NAIR et al., 1999; PIKE et al., 1999; CHENG et al., 2001; OBEID et al., 2007).

Ainda com relação às moléculas bioativas presentes na saliva dos carrapatos, uma proteína Amblyomin-X encontrada na saliva de *A. cajennense*, participante do processo de coagulação, apresentou também atividade citotóxica em diferentes linhagens de células tumorais (CHUDZINSKI-TAVASSI et al., 2010). Kazimírová et al. (2006) demonstraram que moléculas presentes em extratos de glândulas salivares de diferentes espécies de carrapatos foram capazes de inibir o crescimento de células HeLa por indução de apoptose (*R. appendiculatus* e *A. variegatum*), bem como devido ao efeito anti-proliferativo das mesmas (*Ixodes ricinus*, *R. appendiculatus*, *Dermacentor reticulatus* e *A. variegatum*). Somando-se a isso Simons et al. (2011) relataram os

efeitos promissores da saliva bruta de carrapatos no controle de células tumorais, as quais entraram em processo de morte. E Poole et al. (2013) relataram o efeito inibidor da saliva na capacidade migratória e invasiva de células MDA- MB- 231.

Nesse sentido, a possibilidade de se obter moléculas provenientes da secreção de animais e de extratos de plantas para serem utilizados no tratamento dos vários tipos de câncer é uma busca constante das pesquisas da área (SHAFI et al., 2009), visto que os métodos de tratamento convencionais desta doença (em animais e em humanos) têm sido agressivos via intervenção cirúrgica, radioterapia e quimioterapia, provocando muitos efeitos colaterais no paciente (MORRIS; DOBSON, 2007).

Sob essa óptica os carrapatos deixam de ser considerados organismos nocivos e passam agora a ser considerados como uma importante fonte de moléculas bioativas com potencial para o desenvolvimento de novos tratamentos de algumas doenças, visto ser grande a variação na composição destes bioativos entre as diferentes espécies (KAZIMÍROVÁ, 2007), assim como é em uma mesma espécie em diferentes períodos do processo alimentar (SANDERS et al., 1996; FURQUIM, 2007; MULENGA et al., 2007). Além disso, dependendo das condições imunológicas do hospedeiro, as secreções das glândulas salivares apresentariam uma composição modificada ao longo do ciclo glandular e conseqüentemente agiriam diferentemente do observado quando estas fossem produzidas por carrapatos alimentados em hospedeiros não imunizados, ou seja, em condições normais (FURQUIM et al., 2011, 2013).

Câncer

O câncer corresponde a um conjunto de doenças cujos fatores biológicos compartilham características em comum, como a proliferação celular excessiva e a invasão tecidual (PISTILLI, 2009) e resulta de uma série progressiva de mutações genéticas ou epigenéticas (alterações que comprometem o produto da expressão gênica sem afetar o DNA, que se mantém intacto) (PISTILLI, 2009). As mudanças que ocorrem numa célula são conseqüências de uma série progressiva de alterações que modificam basicamente dois tipos de genes:

1) os pro-oncogenes, relacionados à indução da proliferação celular e que quando mutados aumentam sua expressão, acelerando a proliferação celular (LUO, 2008).

2) os genes supressores tumorais, relacionados à indução de morte celular, como o *p53*, cujo produto da sua expressão, a proteína *p53*, interrompe a divisão celular quando encontra defeitos no DNA (KERBEL; FOLKMAN, 2002). Mutações que comprometam a expressão do gene *p53*, além de acionar o fenótipo angiogênico, levam à superexpressão de *Bcl2*, gene antiapoptótico, e de *Bax*, gene pró-apoptótico.

As alterações celulares que dão origem ao câncer são resultado de uma série de condições provenientes de dois tipos de fatores: iniciador e promotor. O fator iniciador é primordial e essencial ao tumor e antecipado sempre aos fatores promotores, promovendo mutações no DNA, como deleções, translocações e inversões gênicas, por intermédio de carcinógenos químicos, oncovírus ou radiação. Fatores promotores somam-se ao fator iniciador, ou promovendo mais mutações na célula, ou acrescentando a esta apenas as alterações epigênicas, ou ainda ambas. A célula transformada difere da célula normal por vários aspectos sendo, um dos mais notáveis, sua capacidade de escapar de mecanismos de controle do ciclo celular, da apoptose e da ativação imunológica do seu meio ambiente, o que favorece a proliferação descontrolada. Essa célula adquire então o potencial, através de sucessivas divisões celulares e posteriores mutações, de dar origem a um conjunto de células tumorais (aproximadamente, um milhão delas) no caso de um tumor sólido (PISTILLI, 2009).

A partir de então, o crescimento desse tumor sólido torna-se limitado pois é dependente, unicamente, de receber oxigênio e nutrientes e eliminar seus produtos de excreção. Como consequência, as células, no centro da massa tumoral tendem a morrer por necrose ou apoptose. Acredita-se que microtumores, neste estágio, sobreviveriam por longos períodos num estado dormente, no qual o número de células viáveis equivaleria ao das que morrem (FOLKMAN, 1985; GASTL et al, 1997).

Para um desenvolvimento posterior ocorrer, o tumor precisa adquirir novas mutações, dentre elas a que está relacionada à indução da angiogênese (AUSPRUNK; FOLKMAN, 1977). Segundo Kerbel e Folkman (2002), o crescimento tumoral é estritamente dependente de angiogênese, a qual se torna possível porque as células que compõem o câncer passam a produzir fatores pró-angiogênicos, que induzem as células

endoteliais dos vasos sanguíneos da vizinhança a degradar sua lâmina basal e a migrar em direção ao tumor.

As células cancerosas começam a promover a angiogênese precocemente, assim que acionado o fenótipo angiogênico, caracterizado pela expressão de proteínas pró-angiogênicas pelo tumor, expressão esta dirigida por oncogenes como é o caso da expressão de VEGF induzida por *c-myc* (KNIES-BAMFORTH et al., 2004).

Células tumorais localizadas a mais de 100µm de distância de um vaso sanguíneo tornam-se hipóxicas, condição esta que induz a expressão de fatores angiogênicos, como o VEGF, fenômeno mediado pelo chamado fator induzível por hipóxia (HIF-1 α). A condição de hipóxia leva à estabilização do fator HIF-1 α que passa a escapar de sua via normal de degradação intracelular, podendo se ligar a HIF-1 β , o qual promove a transcrição de diversas proteínas como o VEGF (SHWEIKI et al., 1992; FONG, 2008).

Uma vez que o tumor passa a ter um suprimento sanguíneo, ele se tornará invasivo, adquirindo potencial para metástase com a formação de tumores secundários, ressaltando que a metástase é o mais temido e o menos entendido aspecto do câncer. Na verdade, o tumor só passa a ser considerado um câncer quando adquire a capacidade de invadir e colonizar regiões distantes daquela de origem. Esta capacidade depende, além dos fatores angiogênicos, da expressão de moléculas de adesão como as integrinas e as selectinas, permitindo a disseminação de células tumorais através dos vasos sanguíneos (ENNS et al., 2004).

O processo de metástase envolve muitas etapas sequenciais pelas quais uma célula tumoral deve passar, tais como: 1) escapar do tumor primário, invadindo o tecido conjuntivo subjacente; 2) entrar na corrente circulatória sanguínea e/ou linfática; 3) sobreviver ao trajeto no interior do sistema circulatório; 4) escapar da circulação sanguínea ou linfática; 5) estabelecer uma nova colônia em órgãos distantes, a qual poderá crescer, formando um tumor secundário (WYCKOFF et al., 2000).

Sarcoma Histiocítico

O surgimento de neoplasia é comumente observado na prática veterinária de pequenos animais, sendo os tumores de pele e de tecidos moles os mais frequentes (MORRIS; DOBSON, 2007). As neoplasias representam grupos de tumores benignos e malignos originados de uma variedade de células (PESSOA et al., 2008). Além disso, os malignos são umas das principais causas de morte em cães e dentre eles, os de pele são os mais observados.

De acordo com a literatura, a proliferação histiocítica desordenada que afeta os cães é frequente e denominada de Distúrbio da Proliferação Histiocítica (AFFOLTER; MOORE, 2000), incluindo o sarcoma histiocítico (histiocitose maligna) (PESSOA et al., 2008), tumor bastante agressivo, caracterizado pela proliferação de histiócitos derivados da linhagem celular monócito/macrófago (BARNES et al., 2000; CLIFFORD; SKORUPSKI, 2007). Esse tumor maligno pode se instalar em diversos tecidos/órgãos (pulmão, linfonodos, fígado, baço, estômago, pâncreas, mediastino, pele, músculo esquelético, sistema nervoso central, osso, medula, entre outros) (CLIFFORD; SKORUPSKI, 2007) e pode ser encontrado nas formas: a) localizada (em um órgão específico) ou b) disseminada (em vários órgãos), neste último caso com curso clínico rápido e fatal.

A partir de células progenitoras neoplásticas oriundas de um tumor histiocítico maligno de cão foi estabelecida a linhagem celular contínua denominada DH82 (WELLMAN et al., 1988). A partir disso muitos estudos estão sendo realizados utilizando essas células *in vitro* (BARNES et al., 2000; DIVINO et al., 2010; THAMM et al., 2012; SIBLEY et al., 2013).

Morfológicamente as células tumorais da linhagem DH82 são descritas como: a) grandes, com diâmetro podendo variar de 25µm a 55µm, porém, a maioria delas (80%) tem diâmetro variando de 25µm a 35µm, b) arredondadas, mas podendo apresentar prolongações citoplasmáticas como pseudópodes, inclusive algumas fagocíticas de outras na própria cultura, c) citoplasma intensamente basofílico, com variável quantidade de grânulos eosinofílicos irregulares, assim como vacuolização, d) mononucleadas com núcleo arredondado e excêntrico e cromatina finamente granular, além de nucléolos em número variado (de um a múltiplos), os quais são grandes e morfológicamente irregulares. Cerca de 10% a 20% das células DH82 apresentam

diâmetro variando de 40µm a 50µm e morfologia semelhante à daquelas menores, exceto pela presença de múltiplos núcleos (2 a 13), contudo, ocasionalmente podem conter apenas um núcleo grande (WELLMAN et al., 1988). Wellman et al. (1988) explicaram essa variação de tamanho, bem como de número de núcleos observada na população de células da linhagem DH82 e propuseram que as células menores e mononucleadas hipertrofiariam e se tornariam multinucleadas.

Do ponto de vista histoquímico, as células DH82 são fortemente positivas para as técnicas: a) α -naphthol AS-D acetato esterase, para marcação inespecífica de esterase, b) para detecção de fosfatase ácida, a qual mostra a atividade do grupo de enzimas que atuam em pH ácido e que são denominadas de fosfatases ácidas e c) naphthol AS-D cloroacetato esterase, que mostra a atividade de esterase. Contrariamente, essas células não apresentam reação às técnicas: a) α -naphthol butirato esterase, marca atividade de esterase, b) Sudan black B, que marca lipídeos totais, c) fosfatase alcalina, que mostra a atividade do grupo de enzimas que atuam em pH básico e que são chamadas de fosfatases alcalinas, d) mieloperoxidase, que mostra a atividade de mieloperoxidase e e) deoxinucleotidil transferase terminal, que mostra atividade da deoxinucleotidil transferase terminal (WELLMAN et al., 1988).

Leucemia Promielítica Aguda

A leucemia promielítica aguda compreende aproximadamente 10% da leucemia mieloblastica aguda em seres humanos adultos (STONE; MAYER, 1990; MAYER et al., 1987). O reconhecimento dessa enfermidade como uma entidade clínica distinta ocorreu nos anos 50 (HILLESTAD, 1957).

Essa doença tem como sintoma típico a diátese hemorrágica, caracterizada como a tendência que algumas pessoas têm para sangramentos sem causa aparente, condição esta devida a distúrbios no sistema de coagulação ou fibrinólise devido ao desenvolvimento da leucemia promielítica (WARRELL et al., 1993).

Como consequência da diátese hemorrágica nos pacientes com leucemia promielítica, que se torna acentuada pelos efeitos citotóxicos da quimioterapia (MARTY et al., 1984; KANTARJIAN et al., 1986; CUNNINGHAM et al., 1989; SANZ et al., 1988), observa-se a alta taxa de mortalidade precoce, principalmente por hemorragia intracraniana (GRALNICK; SULTAN, 1975; JONES; SALEEM, 1978;

RODEGHIERO et al., 1990; CORDONNIER et al., 1985). A incidência de hemorragia fatal precoce varia de 8% a 47% dos casos (MARTY et al., 1984; KANTARJIAN et al., 1986; CUNNINGHAM et al., 1989; SANZ et al., 1988; RODEGHIERO et al., 1990; CORDONNIER et al., 1985), sendo que o grau de severidade está relacionado à leucocitose, trombocitopenia e hipofibrinogenemia (KANTARJIAN et al., 1986; SANZ et al., 1988; GANEM et al., 1983; VENTURA et al., 1989; BERMAN et al., 1991; THOMAS et al., 1991).

Alguns processos têm relação com a diátese hemorrágica, incluindo a acelerada coagulação intravascular, hiperfibrinólise e a trombocitopenia (WARRELL et al., 1993), uma vez que promielócitos malignos liberam substâncias que ativam a cascata de coagulação, gerando trombina e reduzindo fibrinogênio, fatores de coagulação e plaquetas (GOUAULT-HEILMANN et al., 1975; KUBOTA et al., 1991; BAUER; ROSENBERG, 1984). A hiperfibrinólise contribui com a tendência hemorrágica em alguns casos devido à liberação de ativadores de plasminogenio (WILSON et al., 1983; BENNETT et al., 1989; FRANCIS; SEYFERT, 1987) ou elastase (STERRENBERG; et al., 1985; SAITO et al., 1989) e pela progressiva redução de inibidores fibrinolíticos hemostáticos (como o α_2 -antiplasmina, o inibidor da atividade de plasminogenio e o inibidor da esterase C1) (AVVISATI et al., 1988; BROWER; HARPEL, 1982; SAKATA et al., 1991; SCHWARTZ et al., 1986; SCROBOHACI et al., 1991).

Estudos relatam ainda a completa remissão da leucemia promielítica aguda em cerca de 60% a 80% dos pacientes quando submetidos à tratamento quimioterápico (MAYER et al., 1987; KANTARJIAN et al., 1986; CUNNINGHAM et al., 1989; RODEGHIERO et al., 1990; AVVISATI et al., 1988), contudo, em alguns grupos de pacientes é observada uma persistência anormal de promielócitos após a quimioterapia (KANTARJIAN et al., 1985; STONE et al., 1988), possivelmente devido ao fato de algumas células malignas terem sido induzidas a sofrerem diferenciação terminal (WARRELL et al., 1993).

Além disso, embora ocorra excessiva mortalidade precoce nos casos de leucemia promielítica, a sobrevivência em longo prazo é um pouco maior que aquela associada a outros subtipos de leucemia mieloblastica aguda. Em 35% a 45% dos casos da doença é observada sobrevivência de cinco anos (HILLESTAD, 1957; CUNNINGHAM et al., 1989; BERMAN et al., 1991; STONE et al., 1988; HEAD et al., 1991).

Segundo Collins et al. (1977) a partir de leucócitos do sangue periférico de uma pessoa com leucemia promielítica aguda estabeleceu-se uma linhagem celular mielóide contínua denominada HL-60, que permitiu a realização de muitos estudos *in vitro*, possibilitando um maior entendimento dos muitos aspectos dessa doença (GALLAGHER et al., 1979; WARRELL et al., 1993; COLLINS, 1987).

As células HL-60 são do tipo promieloblasticas (informação fornecida pela ATCC[®] CCL-240[™]- <http://www.atcc.org/products/all/CCL-240.aspx>) e apresentam habilidade de responder a indutores farmacológicos de diferenciação (COLLINS et al., 1977; COLLINS, 1987). Além disso, essas células também se diferenciam espontaneamente, originando células mais maduras da linhagem granulocítica, incluindo mielócitos, metamielócitos e neutrófilos segmentados, contudo, o tipo celular predominante após essa diferenciação é o promielócito neutrofílico anormal (GALLAGHER et al., 1979).

Morfológicamente as células HL-60 apresentam: a) diâmetro aproximado de 13µm, podendo ser observadas variações que vão de 9µm a 25µm. As células maiores são normalmente binucleadas, b) forma variando de arredondada a ovalada, podendo-se ocasionalmente observar prolongamentos citoplasmáticos, c) citoplasma fortemente basofílico, além de múltiplos e proeminentes grânulos azurofílicos e d) núcleos grandes, arredondados com cromatina de granulação fina, bem como a presença de dois a quatro nucléolos (GALLAGHER et al., 1979).

O processo de diferenciação das células HL-60 em granulócitos mais maduros geralmente é acompanhado por uma redução no tamanho celular, decréscimo da relação núcleo/citoplasma, aumento da picnose e segmentação nuclear, decréscimo na basofilia citoplasmática e diminuição da granulação azurofílica (substituição da granulação grosseira por uma mais fina) (GALLAGHER et al., 1979).

Do ponto de vista histoquímico, as células HL-60 são fortemente marcadas por técnicas específicas para células mielóides, como: a) detecção de mieloperoxidase, que mostra a atividade de mieloperoxidase, b) naphtol AS-D cloroacetato esterase, que mostra a atividade de esterase e c) Sudan black B, que mostra a presença de lipídeos totais. Por outro lado, ainda não foi observada positividade para a fosfatase alcalina, que evidencia atividade do grupo de enzimas que atuam em pH básico, chamadas de fosfatases alcalinas (GALLAGHER et al., 1979).

Tanto a reação do PAS (periodic acid Schiff) (evidencia polissacarídeos totais), quanto a técnica da fosfatase ácida (mostra atividade do grupo de enzimas que atuam em pH ácido e que são denominadas de fosfatases ácidas) marcam o citoplasma destas células. As células granulocíticas mais maduras são fortemente positivas ao PAS, porém negativas para a fosfatase ácida. A marcação para o α -naphthol AS-D acetato esterase (inespecífica para esterase) é negativa (GALLAGHER et al., 1979). De forma geral, o padrão de marcação histoquímico descrito é característico de células mielóides (BECKMAN et al., 1974).

Carcinossarcoma de Walker 256

O carcinossarcoma de Walker 256 é descrito como uma neoplasia a qual já está bem caracterizada na literatura pertinente, sendo comumente implantado e mantido em ratas, uma vez que tem crescimento rápido e comportamento biológico agressivo, ou seja, localmente invasivo e com grande poder de desenvolver metástases com células se movimentando via circulações sanguínea e linfática (MORAES et al., 2000).

Os primeiros registros sobre essa doença descrevem que ele originou-se de um tumor espontâneo numa rata albina prenha do Biotério do professor George Walker da Escola de Medicina da Universidade John's Hopkins em 1928. A massa tumoral observada na época foi descrita como um adenocarcinoma mamário, o qual, no entanto sofria regressões quando as ratas estavam em períodos de lactação e retomava seu crescimento após o desmame. Essas observações foram importantes para que os pesquisadores começassem a utilizar esse tipo de câncer como um modelo biológico, cuja massa tumoral começou então a ser transplantada em animais da mesma linhagem para realização de estudos que esclarecessem melhor a biologia dessa doença (EARLE, 1935; IWAMA et al., 1973; FERNANDES, 1995; FELIX, 2001).

Em estudos subsequentes àquele realizados em 1935 começou-se a transplantar esse câncer em ratos da linhagem Sherman por meio de inoculação subcutânea, intramuscular, intraperitoneal, intrapleural, intracardíaca, intraesplênica, sanguínea arterial e venosa, bem como no tecido ósseo (IWAMA et al. 1973), podendo o mesmo ser detectável uma semana após a inoculação, desenvolvendo-se rapidamente e finalmente levando os animais à morte num período de aproximadamente 6 semanas. Após 15 dias do transplante via subcutânea o tumor desenvolvido foi descrito como

uma massa firme, esférica, lobulada e parcialmente encapsulada, a qual sofria metástases detectadas nos linfonodos pulmonares próximos à lesão e ocasionalmente naqueles retroperitoniais (DUNN, 1945; LIKELY et al., 1952; MIDER et al., 1948; McCOY; NEUMAN, 1956). Por outro lado, a inoculação dessas células tumorais através da via intraperitoneal ocasionava o desenvolvimento da forma ascítica do tumor de Walker 256 (IWAMA et al., 1973).

Estudos que tinham como procedimentos realizar os transplantes, após inúmeras tentativas ao longo dos anos, demonstraram que a linhagem celular apresentava diversas sub-linhagens, as quais eram caracterizadas por variações morfológicas e sendo, a partir daí classificadas como carcinomatosas, sarcomatosas e carcinossarcomatosas (EARLE, 1935; SCHREK; AVERY, 1937; TALALAY et al, 1952; FISHER; FISHER, 1964).

Com a evolução dos estudos, na década de 50 foram estabelecidas linhagens celulares as quais foram mantidas em culturas *in vitro*. Na empresa *American Type Culture Collection*[®] (HAY et al, 1994), a linhagem LLCWRC256 encontra-se hoje disponível e apresentando características imunofenotípicas de carcinoma indiferenciado, ou seja, de células tumorais que perderam a maioria ou todas as características do tecido de origem (HAY et al, 1994).

A literatura também tem registrado que a transplantabilidade do tumor de Walker 256 tem sido confirmada e demonstrada por meio de diversas técnicas como: a) inserção de fragmentos tumorais (EARLE, 1935), b) suspensão celular obtida a partir de tumores sólidos (EARLE, 1935; SCHREK; AVERY, 1937), c) suspensão celular obtida a partir de cultura *in vitro* e d) suspensão celular obtida a partir da forma ascítica do tumor. Nessa perspectiva também foram desenvolvidas diversas vias e sítios de inoculação tais como: a) subcutânea (EARLE, 1935; TALALAY et al, 1952; JENSEN; MUNTZING, 1970), intramuscular (EARLE, 1935; TALALAY et al, 1952; MORAES FILHO et al, 1980), intraperitoneal, intrapleural e endovenosa.

Estudos realizados ainda demonstraram que em modelos de transplante do tumor intramuscular tanto o crescimento tumoral quanto o tempo necessário para o aparecimento do mesmo mostraram-se diretamente proporcionais ao número de células inoculadas (SCHREK; AVERY, 1937). Após inoculação o crescimento tumoral mostrou melhores resultados em animais com idades entre 70 e 80 dias.

As células do tumor de Walker 256 *in vitro* tem características próprias tais como: a) hipertrofia, b) contornos irregulares, c) pleomorfismo (variação no tamanho e na forma) e d) presença de mais de um núcleo. Estes últimos caracteristicamente tendem a apresentar forma irregular, frequentemente podem apresentar-se lobulados, e ainda mostrando uma relação núcleo/citoplasma elevada; a cromatina encontra-se condensada e os nucléolos são evidentes. Além disso, as mitoses são frequentes e atípicas, originando células multinucleadas (ATLAS PATOLOGIA).

A literatura também registra resultados de muitos estudos *in vivo* com o tumor de Walker 256. Nestes, as células tumorais são implantadas nos diversos tecidos dos animais tais como cérebro (FÉLIX, 2001), língua (CARVALHO, 2008), músculo (BRIGATTE et al., 2013), osso (Mao-Ying et al., 2012; BRIGATTE et al., 2013), mama (LEWIS et al., 2013), adrenal (FONSECA et al., 2009), peritônio (BELLO, 2007) e rim (INÁCIO et al., 2010). Outras pesquisas mostram que o índice de “pega” do tumor nos animais inoculados atinge 100% dos casos (SILVA et al., 2006), apresenta menos de 0,6% de regressão espontânea, levando esse organismo a óbito em quase 100% dos casos devido a agressividade e também ao crescimento exacerbado (SHAUGHNESSY et al., 1991).

Objetivos

2. Objetivos

Diante do exposto os objetivos do presente estudo foram:

1. Avaliar *in vitro* qualitativa e quantitativamente os efeitos de extratos de glândulas salivares de fêmeas de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* com dois dias de alimentação sobre os parâmetros biológicos: viabilidade e percentual do número total de células DH 82 (sarcoma histiocítico) e HL-60 (leucemia pró mielítica aguda) após exposição de 24 horas.

2. Avaliar *in vivo* os efeitos destes mesmos extratos sobre a morfofisiologia da musculatura da perna direita traseira de fêmeas de ratos, sobre (uma ou duas injeções) previamente inoculadas com células do tumor de Walker 256 (carcinossarcoma de Walker 256).

Material e Métodos

3. Material e Métodos

3.1. Material

O presente trabalho foi submetido a apreciação do Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA) do Instituto de Biociências da UNESP de Rio Claro, SP, tendo sido o protocolo de número 3537 devidamente aprovado.

Para a realização deste trabalho foram utilizados os seguintes materiais biológicos:

- 1) Fêmeas de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* com 2 dias de alimentação em coelhos New Zealand White das quais se procedeu a remoção das glândulas salivares para obtenção do extrato **EGS2** (extrato de glândulas salivares de fêmeas com 2 dias de alimentação).
- 2) Linhagens celulares AMJ2-C11 (macrófagos normais), DH82 (sarcoma histiocítico), HL-60 (leucemia promielítica aguda) e Walker 256 (carcinossarcoma de Walker 256). As linhagens DH82 e HL-60 foram utilizadas como modelo de estudo tumoral *in vitro*.
- 3) Trinta e cinco ratas Wistar fêmeas com peso médio de 450g a 500g e idade entre 90 e 120 dias, para estudo do comportamento do tumor de Walker 256 (modelo de estudo tumoral *in vivo*). Estes animais foram distribuídos nos seguintes grupos de estudo: a) Controle 1 (**GC1**) (5 indivíduos saudáveis), b) Controle 2 (**GC2**) (5 indivíduos com tumor e submetidos a uma injeção de tampão fosfato de sódio, pH7,4), c) Controle 3 (**GC3**) (5 indivíduos apenas inoculados com células tumorais), d) Tratamento 1 (**GT1**) (5 indivíduos com tumor e submetidos à uma injeção do extrato **EGS2** na concentração de 0,04µg/µL), e) Tratamento 2 (**GT2**) (5 indivíduos com tumor e submetidos a duas injeções do extrato **EGS2** na concentração de 0,04µg/µL), f) Tratamento 3 (**GT3**) (5 indivíduos com tumor e submetidos à uma injeção do extrato **EGS2** na concentração de 0,2µg/µL) e g) Tratamento 4 (**GT4**) (5 indivíduos com tumor e submetidos a duas injeções do extrato **EGS2** na concentração de 0,2µg/µL).

Para obtenção das fêmeas de carrapatos com 2 dias de alimentação utilizou-se indivíduos machos e fêmeas em jejum, os quais foram obtidos a partir de colônias de *R. sanguineus* mantidas, especialmente para o desenvolvimento deste estudo, em estufa BOD em condições controladas (29°C, 80% de umidade e fotoperíodo de 12 horas) em sala do Biotério do Departamento de Biologia da UNESP de Rio Claro (SP). Essa

colônia foi iniciada a partir de quatro fêmeas (matrizes) completamente ingurgitadas, oriundas de colônia mantida em laboratório no Departamento de Patologia Veterinária da UNESP de Jaboticabal (SP), as quais foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Gervásio Henrique Bechara do Departamento de Patologia Veterinária, UNESP de Jaboticabal (SP).

3.1.1. Obtenção das Larvas de *R. sanguineus*

As fêmeas de *R. sanguineus* completamente ingurgitadas foram mantidas em tubos plásticos (com tampa com pequenos orifícios para oxigenação), para oviporem, o que ocorreu em 15 dias a partir do completo ingurgitamento das mesmas.

Os ovos foram recolhidos e depositados no interior de um inoculador, desenvolvido pelo próprio Prof. Dr. Gervásio Henrique Bechara, para facilitar a deposição das larvas recém eclodidas no hospedeiro (coelho).

3.1.1.1. Confeção do Inoculador e Deposição dos Ovos

Seringas de 3 mL tiveram 2 cm de suas extremidades, opostas às do embolo, removidas e esta abertura foi vedada com algodão. Então o êmbolo foi removido e a massa de ovos foi depositada no interior da mesma. A abertura correspondente ao encaixe do êmbolo também foi vedada com algodão levemente umedecido e o embolo foi encaixado parcialmente.

A massa de ovos foi depositada no interior do inoculador para que a eclosão das larvas ocorresse já no inoculador, facilitando assim a deposição destas no hospedeiro.

O inoculador foi acondicionado em estufa BOD (29°C, 80% de umidade e fotoperíodo de 12 horas), até a eclosão das larvas, que ocorreu em média em 15 dias.

3.1.2. Obtenção das Ninfas de *R. sanguineus*

As larvas (no interior do inoculador) foram alocadas (1 inoculador/hospedeiro) no interior das câmaras alimentadoras fixadas nos coelhos virgens de infestação.

3.1.2.1. Confeção da Câmara Alimentadora (BECHARA et al., 1995)

Para confeção da câmara alimentadora realizou-se os seguintes procedimentos:
a) um círculo de borracha fina de 9 cm de diâmetro foi cortado e teve uma de suas faces

revestida com tecido de algodão. Tal revestimento foi necessário pois esta parte da câmara ficaria em contato com a pele do coelho hospedeiro, b) um círculo de 3,5 cm de diâmetro foi retirado do centro do círculo de 9 cm, c) um tubo plástico tipo coletor universal teve sua parte inferior removida, ficando uma altura final de 2 cm e d) essa parte do tubo coletor que foi recortada e que ficou com 2 cm de altura foi fixada com cola plástica (Brascoplast) na borda do círculo de 3,5 cm, sendo que a região de contato entre a borracha do círculo e o tubo foi vedada internamente com a mesma cola e externamente com esparadrapo. Além disso, a região do tubo plástico contendo a rosca para encaixe da tampa ficou voltada para cima, ou seja, a câmara alimentadora foi montada de forma que depois de fixada no hospedeiro pudesse ser fechada com a própria tampa do tubo coletor, na qual foram feitos pequenos orifícios para que os carrapatos fossem supridos com ar.

3.1.2.2. Fixação da Câmara Alimentadora no Hospedeiro (BECHARA et al., 1995)

O hospedeiro, coelho virgem de infestação, teve uma área de sua região dorsal tosada. A mesma recebeu uma camada de cola plástica (Brascoplast). Da mesma forma a câmara alimentadora (região revestida com tecido) recebeu também uma camada desta cola. Em seguida, procedeu-se a fixação da câmara na pele do coelho. Para evitar a retirada da câmara pelo coelho, a mesma depois de fixada foi envolta por uma camada de esparadrapo, que cobriu parte da câmara e da região tosada.

Depois de fixada, a câmara permaneceu 24 horas destampada com a finalidade de se eliminar o odor da cola, para então serem depositados os carrapatos na fase larval.

Após a alocação destes, a primeira observação deu-se após 8 horas (tempo necessário para a acomodação dos ectoparasitas), e a partir daí a cada 5 horas.

O completo ingurgitamento das larvas ocorreu no prazo de 7 dias. Após este período as mesmas foram coletadas e armazenadas nos inoculadores que foram mantidos em condições controladas (29°C, 80% de umidade e fotoperíodo de 12 horas) em estufa BOD, para a ecdise das ninfas, que ocorreu em média depois de 15 dias.

3.1.3. Obtenção das Fêmeas Adultas de *R. sanguineus*

As ninfas foram alocadas em câmaras alimentadoras fixadas em coelhos virgens de infestação para ingurgitamento, segundo metodologia descrita por Bechara et al.

(1995). A primeira observação ocorreu 8 horas após, e a partir daí as seguintes deram-se a cada 5 horas.

Em 5 dias as ninfas completaram seu ingurgitamento, foram coletadas e depositadas em tubos plásticos para sofrerem ecdise para o estágio adulto (15 dias).

Estes indivíduos adultos em jejum foram então utilizados na infestação **A**, segundo procedimento descrito por Bechara et al. (1995), em sala do Biotério do Departamento de Biologia do Instituto de Biociências da UNESP de Rio Claro (SP).

- **Infestação A:** foi realizada em 10 coelhos virgens de infestação utilizando-se 25 casais de *R. sanguineus*/câmara alimentadora. Após a deposição destes indivíduos no interior das câmaras de alimentação, procederam-se as observações, sendo que a primeira ocorreu 8 horas após a liberação dos ectoparasitas, tempo necessário para acomodação dos mesmos. As observações subsequentes deram-se a cada 3 horas para se determinar o tempo de alimentação das fêmeas, que neste estudo foi de 2 dias.

Foram coletadas 600 fêmeas de carrapatos com 2 dias de alimentação, as quais foram utilizadas para retirada das glândulas salivares posteriormente utilizadas para a preparação do extrato glandular: **EGS2**= extrato de glândula salivar de fêmeas com 2 dias.

O extrato glandular **EGS2** obtido foi utilizado para: 1) realização dos bioensaios com as linhagens celulares AMJ2-C11, DH82 e HL-60 e 2) injeção nas ratas Wistar inoculadas com células Walker 256.

3.2. Métodos

3.2.1. Obtenção das Glândulas Salivares e do Extrato Glandular EGS2

As fêmeas com 2 dias de alimentação oriundas da infestação **A** foram retiradas dos hospedeiros pela região do hipostômio com o auxílio de pinça cirúrgica por meio de movimentos circulares. A seguir, esses indivíduos foram colocados em placas de Petri para dissecação contendo solução salina (7,5 g de NaCl, 2,38 g de Na₂HPO₄, 2,72 g de KH₂PO₄ e 1000 mL de água destilada), onde se procedeu a remoção das glândulas salivares.

Nas dependências do Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Biologia da UNESP Rio Claro (SP) as glândulas salivares foram colocadas em tubos eppendorfs contendo 50 µL de tampão fosfato pH 7.4, onde foram maceradas. Na

seqüência os tubos foram centrifugados por 30 minutos a 10.000 xg e os sobrenadantes recolhidos foram depositados em eppendorfs previamente esterilizados.

No interior de capela de fluxo laminar vertical pré-estéril (Pachane Pa50), o extrato foi filtrado com auxílio de unidades filtrantes estéreis (JBR610303, unidade filtrante descartável Millex GV, membrana durapore PVDF, Millipore, MilliUni), de 0.22 µm e diâmetro de 13 mm, acopladas a seringas hipodérmicas e então, encaminhado para a dosagem de proteínas, segundo metodologia descrita por Sedmark and Grossberg (1977) (método de Bradford) (**Tabela 1**).

Tabela 1: Valor da dosagem protéica do extrato obtido a partir de glândulas salivares de fêmeas de *Rhipicephalus sanguineus* com 2 dias de alimentação.

EGS2	
Concentração protéica	5,513 µg/mL

A seguir, o extrato concentrado foi armazenado em freezer a -20°C para posteriormente ser encaminhado aos seguintes procedimentos: a) realização dos bioensaios com as linhagens celulares AMJ2-C11, DH82 e HL-60 e b) injeção nas ratas Wistar inoculadas com células tumorais de Walker 256.

3.2.2. Modelo de Estudo Tumoral *in vitro*

Manutenção das Células AMJ2-C11, BD82 e HL-60

A manutenção das linhagens celulares foi realizada no Laboratório de Imunoparasitologia coordenado pela Profa. Dra. Rosângela Zacarias Machado do Departamento de Patologia Veterinária da UNESP de Jaboticabal (SP).

Os macrófagos (alveolares) normais (AMJ2-C11) e as células tumorais (BD82 e HS60) foram gentilmente cedidos pela Dra. Rosângela, ressaltando que estas células foram por ela adquiridas da American Type Culture Collection (ATCC®) e foram mantidas sob as seguintes condições de cultura:

- **Células AMJ2-C11:** cultivadas em frasco de 25 cm², em meio de cultura DMEM (meio de Eagle modificado por Dulbecco – Cultilab) suplementado com 5% de soro fetal bovino, com 5% CO₂ e a 37°C. Essa linhagem celular foi utilizada somente para a realização do teste MTT, sendo esta uma linhagem de células saudáveis, utilizadas para o controle deste teste.

- **Células DH82:** cultivadas em frasco de 25 cm², em meio de cultura Scaves (meio Dulbecco modificado) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado, com 5% de CO₂ a 37°C.

- **Células HL-60:** cultivadas em frasco de 25 cm², em meio de cultura Scaves (meio Dulbecco modificado) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado, com 5% de CO₂ a 37°C.

Para dar início aos bioensaios **1, 2 e 3**, as culturas das três linhagens celulares foram processadas como segue:

As células DH82 são aderentes e, portanto, foram tripsinizadas, lavadas em meio de cultura, para que o soro fetal bovino nele contido neutralizasse a atividade da tripsina, e centrifugadas a 5000 xg por 3 minutos. Na sequência, as células peletizadas foram novamente lavadas no próprio meio de cultura e ressuspensas em 1 mL de meio de cultura. Então, uma alíquota da suspensão de células foi encaminhada para a quantificação celular em contador de células automático modelo TC10 da Bio Rad.

As culturas das células AMJ2-C11 e HL-60 (células em suspensão) foram centrifugadas a 5000 xg por 3 minutos, lavadas em meio de cultura e ressuspensas em 1 mL do mesmo meio da cultura. Então, uma alíquota da suspensão de células foi encaminhada para a quantificação celular no mesmo contador.

Para realização da quantificação das células de cada uma das amostras, utilizou-se uma mistura de 10 µL de amostra celular e 10 µL de azul de Tripán, a qual foi depositada na lâmina de leitura, acoplada à leitor automático. Os bioensaios foram realizados com a concentração de 1 x 10⁶ células/mL.

3.2.3. Bioensaio 1

Foi realizado no Laboratório Imunoparasitologia da UNESP de Jaboticabal (SP) para a determinação das concentrações ideais dos extratos a serem utilizadas nos bioensaios 2 e 3.

Neste bioensaio, as amostras foram submetidas à coloração do azul de Tripán (ensaio de viabilidade) (10 µL de amostra celular com extrato+ 10 µL de azul de Tripán) e posteriormente analisadas no contador celular, procedimento realizado para avaliar as concentrações tóxicas (que afetam a viabilidade e/ou proliferação celular) para as células DH82 e HL-60 e não tóxicas para as AMJ2-C11.

Foram realizados testes de exposição com as três linhagens celulares com o extrato **EGS2** nas seguintes concentrações: 0,1µg/mL, 0,2µg/mL, 0,4µg/mL, 0,5µg/mL, 0,6µg/mL, 0,8µg/mL, 1,0µg/mL e 2,0µg/mL, por períodos de exposição de 5 e 24 horas.

Para tanto, em uma placa de 24 poços foram semeadas 1×10^6 células/mL de meio de cultura + volume equivalente de extrato para se obter as concentrações 0,1µg/mL, 0,2µg/mL, 0,4µg/mL, 0,5µg/mL, 0,6µg/mL, 0,8µg/mL, 1,0µg/mL e 2,0µg/mL, resultando num volume final de 1 mL.

Especificamente para a linhagem DH82 (células aderentes), foi necessário semear as células na placa, aguardar a aderência das mesmas (aproximadamente 2 horas), retirar o meio e depositar novo meio de cultura + volume equivalente de extrato para se obter as concentrações a serem testadas nos tempos acima estabelecidos. Então, após as exposições, o meio foi novamente retirado, as células foram tripsinizadas, lavadas no próprio meio de cultura, centrifugadas e ressuspensas em 1 mL de meio de cultura.

Na sequência, coletou-se alíquotas de cada uma das amostras celulares expostas às diferentes concentrações dos extratos por 5 e 24 horas e procedeu-se a leitura em contador de células conforme descrito no item 3.2.2, o qual forneceu diretamente a viabilidade celular das amostras em porcentagem, bem como o número total de células.

Além disso, realizou-se a leitura de alíquotas das suspensões das três linhagens celulares sem exposição aos extratos, procedimento esse que foi realizado para verificar

o quanto os extratos estavam interferindo na proliferação das células. As leituras foram realizadas em quintuplicatas para cada uma das situações.

Após esses procedimentos, foram selecionadas as concentrações de extrato para realização dos bioensaios subsequentes, que foram a de 0,2µg/mL e a de 0,5µg/mL para o extrato **EGS2**, com tempo de exposição de 24 horas.

3.2.4. Bioensaio 2

Foi realizado no Laboratório de Imunoparasitologia da UNESP de Jaboticabal (SP) para verificar o efeito das concentrações selecionadas dos extratos (0,2µg/mL e 0,5µg/mL para o **EGS2**) nos parâmetros proliferação e viabilidade das células DH82 e HL-60, análise que permitiu a obtenção de dados quantitativos sobre tais parâmetros das células expostas às concentrações selecionadas nos seus respectivos tempos de exposição.

Cada uma das linhagens tumorais foi incubada nas concentrações selecionadas do extrato **EGS2** pelo período de 24 horas.

Em placa de 24 poços foram semeadas 1×10^6 células/mL de meio de cultura + volume equivalente de extrato para se obter as concentrações desejadas (0,2 e 0,5µg/mL), resultando num volume final de 1 mL (**Teste**). E para o controle do experimento (**Controles 1 e 2**) utilizou-se somente 1 mL das suspensões celulares.

Especificamente para a linhagem DH82 (células aderentes), após semear as células na placa, foi necessário aguardar a aderência das mesmas (período de aproximadamente 2 horas), retirar o meio e depositar novo meio de cultura + volume equivalente de extrato para se obter as concentrações a serem testadas nos tempos acima estabelecidos. Então, após as exposições, o meio foi novamente retirado, as células foram tripsinizadas, lavadas em meio, centrifugadas e ressuspensas em 1 mL de meio de cultura.

Foram então realizadas coletas das suspensões de células tumorais tanto expostas ao extrato quanto de um dos controles (**Controle 2**) 24 horas após o início do experimento, ou seja, no tempo **T24** para análise em contador automático. Também foi realizada uma leitura inicial (tempo 0= **T0**) das duas suspensões de células tumorais (**Controle 1- T0**). Sendo assim, além das situações de exposição às diferentes

concentrações de extrato no tempo **T24**, foram também analisados os controles **Controle 1- T0** e **Controle 2- T24**.

De cada amostra foram coletadas cinco alíquotas para realização das leituras. O procedimento de leitura foi semelhante ao descrito no item **3.2.2**.

Foram obtidos dados sobre o número total de células/mL; o número de células vivas/mL, bem como a taxa de viabilidade celular (%) para cada uma das amostras. Também foram obtidos dados sobre o percentual do número total de células a partir da aplicação da fórmula:

$$\text{NTC (\%)} = \frac{\text{n}^\circ \text{ total de células/mL (T}_f\text{)} \times 100\%}{\text{n}^\circ \text{ total de células/mL (T}_i\text{)}}$$

NTC (%)= percentual do número total de células;

T_i= tempo inicial, ou seja, leitura inicial (**T0**);

T_f= tempo final, ou seja, leitura realizada com 24 horas (**T24**) após o início do bioensaio;

Então, obteve-se as médias dos parâmetros taxa de viabilidade e percentual do número total de células, as quais foram analisadas estatisticamente por meio do teste ANOVA com pós-teste de TUKEY, foram consideradas significantes as diferenças com $p < 0,05$.

3.2.5. Bioensaio 3

Foi realizado no Laboratório Imunoparasitologia da UNESP de Jaboticabal (SP). Todo o procedimento de exposição das linhagens tumorais às concentrações do extrato **EGS2** selecionadas (**Teste**), bem como a situação **Controle 2** foi semelhante ao descrito no item **3.2.4**.

Foram coletadas amostras de 200 µL de cada uma das situações **Teste** e **Controle 2**, o que ocorreu da seguinte forma: 1) para as células DH82 e HL- 60 expostas às concentrações de 0,2 µg/mL e 0,5 µg/mL do extrato **EGS2** foram realizadas

coletas com 24 horas após a exposição e 2) para as células DH82 e HL-60 do grupo **Controle 2** coletou-se também com 24 horas de experimento.

Na sequência, as amostras de células foram centrifugadas a 3000 xg por 5 minutos, então o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso nos fixadores formalina neutra tamponada 10% (para realização da coloração pela hematoxilina-eosina e da citoquímica para fosfatase ácida), e formaldeído 3,4% (para realização da técnica para marcação do citoesqueleto/núcleo). Então, novamente centrifugou-se as suspensões celulares (3000 xg por 5 minutos) e procedeu-se o processamento para cada uma das técnicas aplicadas para microscopia de luz convencional e confocal.

3.2.6. Microscopia de Luz Convencional

Foi realizada no Laboratório de Histologia do Departamento de Biologia da UNESP de Rio Claro (SP).

Tanto as amostras celulares peletizadas quanto a musculatura removida da perna de ratas Wistar dos diferentes bioensaios foram fixadas em formalina neutra tamponada 10% (pH 7-7.4) e em paraformaldeído 4%, durante 24 horas a 4°C. Após a fixação, as amostras foram processadas de acordo com o protocolo para aplicação de técnica histológica rotineira (hematoxilina-eosina) e para a citoquímica para detecção de fosfatase ácida.

- Técnica de coloração pela hematoxilina de Harris e eosina aquosa (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983)

Após a fixação em formalina neutra tamponada 10%, as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de álcool (70%, 80%, 90% e 95%), banhos de 12 (peletts) e de 30 (músculo) minutos cada, transferidas para resina de embebição, incluídas e seccionadas (espessura de 3µm). A etapa de embebição e a inclusão ocorreram em resina Leica. As secções foram recolhidas em lâminas de vidro, reidratadas em água destilada por 1 minuto, coradas, por 7 minutos, em hematoxilina e lavadas em água por 5 minutos. Na sequência, foram coradas com eosina por 5 minutos e novamente lavadas. Então, após a secagem das lâminas, estas foram montadas em bálsamo de Canadá para posterior observação e foto documentação.

3.2.7. Microscopia Confocal de Varredura a Laser

Esta análise foi realizada no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Biologia da UNESP de Rio Claro (SP).

- Marcação de núcleo e citoesqueleto (células peletizadas)

Para realização destas técnicas as células foram peletizadas (centrifugação a 3.000 xg por 5 minutos), fixadas em formaldeído 3,4%, lavadas em tampão fosfato-salino (PBS), permeadas com Triton X-100 0,1% por 20 minutos, lavadas em solução de PBS e soro fetal bovino 5%, dois banhos de 5 minutos cada, e submetidas aos diferentes marcadores.

Para marcação do citoesqueleto, foram adicionados a cada amostra 50 µL de solução contendo anticorpos monoclonais alfa-tubulina (5µg/mL) e beta-tubulina (3µg/mL) (Sigma Aldrich) diluídos em PBS (anticorpos primários). Então as células foram ressuspensas em vortex e incubadas durante a noite com essa mistura.

Após esse período, as amostras foram novamente centrifugadas (3.000 xg por 5 minutos), e submetidas a dois banhos de 5 minutos cada em PBS. Na sequência, receberam 50 µL de solução contendo anticorpo anti-rato conjugado com Cy5 (vermelho) (1:1000, Molecular Probes) diluído em PBS (anticorpo secundário), as células foram ressuspensas em vortex e incubadas por 1 hora na mistura. As amostras foram na sequência peletizadas (centrifugação a 3.000 xg por 5 minutos) e lavadas em PBS (dois banhos de 5 minutos cada). Em seguida, receberam 50 µL da solução de faloidina-alexa 488 (verde) (Molecular Probes) (5µL de faloidina + 200 µL de PBS + 2µL de soro normal de cabra), foram ressuspensas, permanecendo nesse corante por 30 minutos, para marcação do microfilamento de actina, e novamente foram peletizadas e lavadas em PBS, dois banhos de 5 minutos cada.

Na etapa seguinte, as amostras foram ressuspensas em 10 µL de PBS e essa mistura foi montada entre lâmina e lamínula com uma gota do meio ProLong® Gold Antifade associado a DAPI (marcador de núcleo) (azul) (Molecular Probes) e na

sequencia as lâminas foram observadas e fotodocumentadas em Microscópio Confocal de Varredura a Laser Leica modelo TCS SP5II.

As amostras foram observadas na lente objetiva de 63x, com utilização de zoom de 2,56x em alguns casos, e abertura de Pinhole de 95,46 μm . O comprimento de onda do laser utilizado foi de 488nm para a actina, 633nm para a tubulina e 405nm para o material nuclear.

- Marcação de viabilidade celular (células peletizadas)

Essa marcação foi realizada utilizando-se o kit Live Dead (Molecular Probes).

Amostras de células foram centrifugadas a 3.000g por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado por completo e adicionou-se 100 μL de tampão Hepes/amostra. Na sequencia, foram acrescentados 0,5 μL do reagente SyBr15 (verde), ressuspendeu-se as células e procedeu-se a incubação por 10 minutos. Então, foram adicionados à mistura 0,5 μL de iodeto de propídio (vermelho), incubou-se por mais 10 minutos e centrifugou-se (3.000 xg por 5 minutos). O sobrenadante foi removido, permanecendo um volume final de aproximadamente 5 μL para a ressuspensão das células.

Na sequência, uma gota da suspensão celular foi colocada entre lâmina e lamínula e encaminhada para observação e foto documentação em Microscópio Confocal de Varredura a Laser Leica modelo TCS SP5II.

As amostras foram observadas na lente objetiva de 40x (com abertura de Pinhole de 67,9 μm) e 63x (com abertura de Pinhole de 95,46 μm) e utilização de zoom de 2,56x em alguns casos. O comprimento de onda do laser utilizado foi de 488nm para o iodeto de propídio e de 633nm para o SyBr15.

Por meio desta técnica pode-se observar núcleos de células com membrana íntegra marcados em verde. Núcleos de células cuja integridade da membrana celular foi perdida (células mortas) marcados em vermelho ou laranja, pois nestas o iodeto de propídio consegue penetrar devido a perda da capacidade seletiva da membrana.

- Atividade das caspases 3 e 7 (células peletizadas)

Essa marcação foi realizada utilizando-se o kit Cell Event Caspase-3/7 Green (Molecular Probes). Para tanto, adicionou-se uma gota do reagente em cada uma das amostras de células (1 gota do reagente/150 μL de suspensão celular). As amostras

foram incubadas com o reagente por 30 minutos e na sequência foram centrifugadas por 5 minutos a 3.000 xg. Então, descartou-se parte do sobrenadante, permanecendo um volume final de aproximadamente 5 µL para a ressuspensão das células.

Na sequência, uma gota da suspensão celular foi colocada entre lâmina e lamínula e encaminhada para a observação e foto documentação em Microscópio Confocal de Varredura a Laser Leica modelo TCS SP5II.

As amostras foram observadas sob objetiva de 40x (com abertura de Pinhole de 67,9 µm) e 63x (com abertura de Pinhole de 95,46µm) e zoom de 2,56x em alguns casos. O comprimento de onda do laser utilizado foi de 488nm (verde).

Nas células onde as caspases 3 e 7 encontram-se em atividade, a aplicação desta técnica provoca uma reação cujo produto ao se ligar aos núcleos os marca em verde.

3.3. Modelo de Estudo Tumoral *in vivo*

3.3.1. Obtenção e manutenção das células do tumor de Walker 256

As células de tumor de Walker 256 foram cedidas gentilmente pela Profa. Dra. Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes Supervisora do Laboratório de Nutrição e Câncer do Departamento de Fisiologia IB/UNICAMP/Campinas, SP. Após realização dos experimentos os animais portadores do tumor foram sacrificados utilizando-se a mistura das drogas quetamina e xilasina, até que os animais entrassem em óbito. Na sequência o tecido tumoral foi retirado e colocado em placas de Petri contendo solução salina a 0,9% para poder ser fragmentado. Posteriormente procedeu-se a filtração em gaze e o líquido coletado foi transferido para tubos Falcon de 50 mL, os quais foram centrifugados a 4°C, por 10 minutos, a 3000 rpm. Todos os procedimentos foram realizados em gelo. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuscitado em solução salina a 0,9% obtendo-se dessa forma uma suspensão celular concentrada.

Para a contagem das células, realizou-se uma diluição de 1:100, ou seja, utilizou-se uma parte da suspensão concentrada e 100 partes de solução salina 0,9%. Na sequência, realizou-se uma mistura de 200µL da suspensão diluída com 200µL do corante azul de Tripán 1%. A contagem do número de células foi realizada sob

microscópio de luz em câmara de Neubauer. A viabilidade celular foi determinada considerando que as células viáveis seriam as refringentes à luz. Para se determinar o número de células aplicou-se a fórmula:

$$\text{Nº de células/mL} = \text{NTC}/4 \times \text{fator de diluição} \times \text{fator de correção}$$

NTC= número total de células dos quatro quadrantes

Fator de diluição= 40

O número de células da suspensão de trabalho foi de 1×10^7 células/mL.

Após a contagem do número de células, 1 mL da suspensão de trabalho foi inoculada via intraperitoneal, em três ratas Wistar adultas para obtenção de tumor líquido (ascite). Decorridos aproximadamente 15 dias da inoculação das células de Walker 256 nas ratas, o líquido ascítico foi coletado do abdômem destas.

3.3.2. Implantação do tumor de Walker 256 e injeções com o extrato da glândula salivar de *R. sanguineus*

O modelo de câncer utilizado no presente estudo foi descrito por Brigatte et al. (2007). Neste modelo os ratos com ascite foram eutanasiados e o líquido ascítico foi extraído e colocado em tubo de ensaio contendo EDTA. O líquido foi diluído 100 vezes em tampão fosfato de sódio, pH 7,4. Então procedeu-se a contagem de células utilizando-se o corante azul de Tripán, conforme descrito no item 3.3.1. A suspensão de células inoculadas foi de 1×10^6 células/mL na região intraplantar posterior direita das ratas (300 µL de suspensão/pata).

3.3.3. Injeção do extrato

Os extratos de glândula **EGS2** foram diluídos com tampão fosfato de sódio, pH 7,4, para se obter as concentrações de 0,04µg/µL e de 0,2µg/µL, as quais foram injetadas nas 35 ratas Wistar dos diferentes grupos de estudo.

O procedimento de injeção das diferentes concentrações do extrato **EGS2** foi realizado em sala fechada e esterilizada, no Biotério do Departamento de Biologia do Instituto de Biociências da UNESP *campus* Rio Claro/SP.

A primeira injeção das diferentes concentrações do extrato **EGS2** ocorreu 15 dias após a inoculação das células tumorais dos seguintes grupos: a) Grupo Tratamento 1 (**GT1**) (uma injeção do extrato **EGS2** na concentração de 0,04µg/µL), b) Grupo Tratamento 2 (**GT2**) (duas injeções do extrato **EGS2** na concentração de 0,04µg/µL), c) Grupo Tratamento 3 (**GT3**) (uma injeção do extrato **EGS2** na concentração de 0,2µg/µL) e d) Grupo Tratamento 4 (**GT4**) (duas injeções do extrato **EGS2** na concentração de 0,2µg/µL).

Neste estudo foram também considerados outros três grupos, os quais não foram submetidos à injeções com o extrato glandular: a) Grupo Controle 1 (**GC1**) (5 ratas saudáveis), b) Grupo Controle 2 (**GC2**) (5 ratas inoculadas com células tumorais e submetidas à uma injeção de tampão fosfato de sódio, pH7,4) e c) Grupo Controle 3 (**GC3**) (5 ratas apenas inoculadas com células tumorais).

A segunda injeção do extrato **EGS2** foi realizada 4 dias após a primeira, nos seguintes grupos: a) Grupo Tratamento 2 (**GT2**) (5 ratas inoculadas com células tumorais e submetidas à uma injeção do extrato **EGS2** na concentração de 0,04µg/µL) e b) Grupo Tratamento 4 (**GT4**) (5 ratas inoculadas com células tumorais e submetidas à uma injeção do extrato **EGS2** na concentração de 0,2µg/µL).

Decorridos 21 dias da primeira inoculação das células tumorais e realizados os devidos bioensaios, os animais foram eutanasiados pela veterinária Letícia Graballos Hebling.

Nas dependências do Laboratório de Histologia do Departamento de Biologia do IB da UNESP *campus* de Rio Claro, SP as pernas posteriores direitas dos 5 indivíduos de cada grupo (**GC1**, **GC2**, **GC3**, **GT1**, **GT2**, **GT3** e **GT4**) foram retiradas, dissecadas para retirada da musculatura e o material foi encaminhado para a aplicação das diferentes técnicas de estudo.

3.3.4. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A técnica de MET possibilita a caracterização ultraestrutural do material que no presente estudo foi a musculatura da perna das ratas.

Fragmentos do material foram fixados em glutaraldeído 2.5% em tampão cacodilato de sódio 0,1M (pH 7.2) durante 24 horas, à temperatura ambiente. Em

seguida, realizou-se duas lavagens no mesmo tampão (15 minutos cada lavagem) e, logo depois, efetuou-se a pós-fixação em solução de tetróxido de ósmio (OsO_4) 1% durante 2 horas. As amostras foram novamente lavadas em tampão cacodilato de sódio 0.1M por duas vezes (15 minutos cada lavagem). O material passou por um banho de álcool etílico 10% durante 15 minutos, e foi contrastado em solução de acetato de uranila a 1%, dissolvido em álcool 10%, por 2 horas, no escuro. Então procedeu-se a desidratação em série crescente de álcool etílico (70% a 100%, com duração de 15 minutos cada solução) e em acetona pura, com duração de 15 minutos. O material foi embebido em resina Epon-Araldite mais acetona, na proporção de 1:1, por 24 horas e incluído em resina Epon-Araldite pura. Em seguida, levado à estufa por 72 horas, a 60°C, para polimerização.

Os blocos foram seccionados em ultra-micrótomo, as secções colocadas em grades de cobre e contrastadas em solução de acetato de uranila, durante 45 minutos. Na sequência as mesmas foram lavadas em água e contrastadas em citrato de chumbo por 15 minutos sendo novamente lavadas em água e em solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,02M (adaptado de REYNOLDS, 1963).

Após esses procedimentos o material foi analisado e fotografado em Microscópio Eletrônico de Transmissão (MET) Philips CM100 alocado no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Biologia, IB-UNESP, *campus* de Rio Claro-SP.

3.3.5. Análise Bioquímica do Sangue

Para realização dos exames clínicos foi coletado sangue de todos os ratos de cada um dos grupos no momento do seu sacrifício. O mesmo foi devidamente armazenado em tubos heparinizados Vacutainer[®] e posteriormente enviado para análises no Laboratório CedVet na cidade de Rio Claro (SP) para quantificação de leucócitos e dos níveis de creatinina.

Os valores obtidos para estes parâmetros foram submetidos à análise estatística por meio da aplicação do teste ANOVA com pós-teste de TUKEY, sendo consideradas significantes as diferenças com $p < 0,05$.

Resultados

4. Resultados

Capítulo 1: Ação das Secreções Produzidas pelas Glândulas Salivares de Fêmeas de Carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* com 2 Dias de Alimentação Sobre Modelos Tumoriais *in vitro*: Células DH82 e HL-60.

Capítulo 2: A Glândula Salivar de Fêmeas de Carrapatos *Rhipicephalus sanguineus*: Potencial Reservatório de Moléculas com Ação Inibidora (*in vivo*) Sobre Células de Tumor de Walker 256.

Capítulo 1

Ação das Secreções Produzidas pelas Glândulas Salivares de Fêmeas de Carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* com 2 Dias de Alimentação Sobre Modelos Tumorais *in vitro*: Células DH82 e HL-60.

Resumo

Neste trabalho testou-se o potencial antitumoral de extratos das glândulas salivares de fêmeas de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* com 2 (**EGS2**) dias de alimentação em células das linhagens DH82 e HL-60. As células tumorais foram expostas a diferentes concentrações do extrato pelo período de 24 horas e então encaminhadas para as avaliações quantitativa (análise dos parâmetros viabilidade e percentual do número total de células) e morfológica (análises em microscopia de luz convencional: coloração pela hetoxilina e eosina, e em microscopia confocal: marcação do citoesqueleto/núcleo, viabilidade celular, bem como detecção da atividade das caspases 3 e 7). Os resultados quantitativos mostraram que o extrato **EGS2** afetou negativamente tanto a viabilidade quanto a proliferação das células tumorais, sendo que a concentração de 0.2 reduziu a viabilidade das DH82 e a de 0.5 reduziu a proliferação destas. Para as células HL-60 as concentrações de 0.2 e de 0.5 reduziram a viabilidade, sendo ainda a concentração de 0,5 mais eficaz nesse processo. Os dados morfológicos revelaram que tanto as DH82 (exposição à 0.2 do **EGS2**) quanto as HL-60 (exposição à 0,2 e 0,5 µg/mL do **EGS2**) tiveram a viabilidade comprometida, ou seja, em tais concentrações do **EGS2** houve morte celular, a qual ocorreu mais precocemente nas DH82 (presença de extensos blocos contendo resíduos celulares). Além disso, detectou-se alterações celulares (citoplasmáticas e nucleares) decorrentes da exposição aos extratos, que foram: a) desorganização do citoesqueleto (actina e tubulina), b) condensação e concentração da cromatina em blocos distribuídos por todo o núcleo ou somente na sua periferia (marginalização cromatínica), picnose, formação de “blebbs” e fragmentação nuclear, c) atividade das caspases 3 e 7 e d) rompimento celular, características estas que permitiram concluir que as células sofreram apoptose. Por outro lado, a aplicação da técnica da hematoxilina-eosina assim como daquela para marcação do citoesqueleto e núcleo nas DH82 (exposição à 0.5µg/mL do **EGS2**) mostraram que a viabilidade não foi comprometida, contudo houve desorganização do citoesqueleto, bem como presença de menor quantidade de células em divisão em comparação ao **Controle**

2. Assim, os resultados aqui obtidos mostraram que as alterações no citoesqueleto das DH82 (exposição à 0,5µg/mL do **EGS2**) provavelmente ocorreram devido ao comprometimento da proliferação das mesmas. De forma geral, os extratos glandulares comprometeram tanto a viabilidade das células tumorais por meio da indução da apoptose, quanto a proliferação das mesmas, reduzindo essa taxa. Esses eventos variaram em função das concentrações, bem como do modelo tumoral *in vitro* submetido às exposições (linhagens DH82 ou HL-60)

Palavras-chave: Fêmeas de carrapatos, glandula salivar, viabilidade celular, morfologia, DH82 e HL-60.

1. Introdução

A obtenção de moléculas provenientes da secreção de animais e de extratos de plantas para serem utilizadas no tratamento dos vários tipos de câncer é uma busca constante das pesquisas da área (SHAFI et al., 2009), visto que os métodos de tratamento convencionais desta doença (em animais e em humanos) têm sido agressivos uma vez que envolvem intervenções cirúrgicas, radioterapia e quimioterapia, procedimentos estes que provocam fortes efeitos colaterais (MORRIS; DOBSON, 2007).

A saliva dos carrapatos é descrita como sendo uma mistura complexa e é considerada um grande, diversificado e eficaz arsenal farmacológico que garante a alimentação e a sobrevivência dos carrapatos (STEEN et al., 2006; FRANCISCHETTI et al., 2010; CAMARGO-MATHIAS et al., 2011). Nesta saliva encontram-se moléculas das mais variadas naturezas com papel na modulação do sistema imune-inflamatório e hemostático dos hospedeiros (STEEN et al., 2006; HAJNICKÁ et al., 2011), sendo considerada praticamente um reservatório (em potencial) de moléculas multifuncionais contendo bioativos de grande interesse (BATISTA et al., 2008). Por esta razão, a saliva destes animais vem sendo objeto de diferentes estudos devido, principalmente, ao grande interesse na identificação e isolamento de suas moléculas, as quais podem agir como: vasodilatadoras, antiinflamatórias, anticoagulantes e imunossupressoras (OLIVEIRA et al., 2010).

Segundo a literatura, a saliva de diferentes espécies de carrapatos, dentre elas de *Rhipicephalus sanguineus* (carrapato do cão), modula diferentes passos da biologia das

células dendríticas, como por exemplo sua maturação (OLIVEIRA et al., 2008; 2010), inibe a proliferação de células endoteliais e tem apresentado ações: anti-angiogênica (FRANCISCHETTI et al., 2010; DREWES et al., 2012) e anti-tumoral (KAZIMÍROVÁ et al., 2006; CHUDZINSKI-TAVASSI et al., 2010; SIMONS et al., 2011; AKAGI et al., 2012). Além disso, nela tem sido identificadas proteínas anticoagulantes, como o peptídeo anticoagulante do carrapato (TAP) obtido a partir da saliva de *Ornithodoros moubata* (WAXMAN et al., 1990), a boophilina, de *R. (Boophilus) microplus* (MACEDO-RIBEIRO et al., 2008), ixolaris e penthalaris de *Ixodes scapularis* (FRANCISCHETTI et al., 2002; FRANCISCHETTI et al., 2004) e o amblyomin-X, de *Amblyomma cajennense* (BATISTA et al., 2010), que teriam potencial no tratamento de doenças como a trombose.

Ainda com relação às moléculas bioativas com potencial antitumoral presentes na saliva dos carrapatos, uma proteína encontrada na saliva de *A. cajennense*, com ação no processo de coagulação, apresentou também atividade citotóxica em diferentes linhagens de células tumorais (CHUDZINSKI-TAVASSI et al., 2010). Kazimírová et al. (2006) demonstraram que moléculas presentes em extratos de glândulas salivares de diferentes espécies de carrapatos foram capazes de inibir o crescimento de células HeLa por indução de apoptose (*R. appendiculatus* e *A. variegatum*), bem como devida a ação anti-proliferativa das mesmas (*Ixodes ricinus*, *R. appendiculatus*, *Dermacentor reticulatus* e *A. variegatum*). Somando-se a isso Simons et al. (2011) relataram os efeitos da saliva bruta de carrapatos sobre as células tumorais, as quais entraram em processo de morte. Além disso, Poole et al. (2013) relataram o efeito inibidor da saliva de carrapatos sobre as capacidades migratória e invasiva de células MDA- MB- 231.

Assim, sob essa óptica os carrapatos deixam agora de ser considerados apenas organismos nocivos e num outro status passam a ser considerados como uma importante fonte de moléculas bioativas com potencial para o desenvolvimento de novos tratamentos para algumas doenças, visto ter, a sua saliva, grande a variação na composição destes bioativos entre as diferentes espécies (KAZIMÍROVÁ, 2007), bem como dentro da mesma espécie, porém, em diferentes períodos do processo alimentar (SANDERS et al., 1996; FURQUIM, 2007; MULENGA et al., 2007).

Diante destas informações, o presente trabalho teve por objetivos avaliar os efeitos de diferentes concentrações de extrato de glândulas salivares de fêmeas de

carrapatos *R. sanguineus* com 2 dias de alimentação sobre os modelos tumorais *in vitro* DH82 (histiocitose maligna) e HL-60 (leucemia promielítica aguda) por meio de: a) análise quantitativa dos parâmetros viabilidade e percentual do número total de células e b) morfofisiologia das células de ambas as linhagens, fazendo uso de técnicas de microscopia de luz convencional (hematoxilina e eosina) e microscopia confocal (marcações do citoesqueleto/núcleo, viabilidade e atividade das caspases sinalizadoras de apoptose 3 e 7).

2. Material e Métodos

2.1. Material

Para a realização deste trabalho foram utilizadas fêmeas de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) (LATREILLE, 1806) com 2 dias de alimentação em coelhos New Zealand White. Essas fêmeas foram obtidas a partir de indivíduos em jejum oriundos da colônia de *R. sanguineus* mantida em estufa BOD em condições controladas (29°C, 80% de umidade e fotoperíodo de 12 horas) em sala do Biotério do Departamento de Biologia da UNESP de Rio Claro (SP), os quais foram submetidos à infestação em coelhos.

Além disso, foram também utilizadas as linhagens celulares DH82 (histiocitose maligna) e a HL-60 (leucemia promielítica aguda) como modelo de estudo *in vitro*, as quais foram gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Rosângela Zacarias Machado do Departamento de Patologia Veterinária da UNESP de Jaboticabal (SP), que as adquiriu da American Type Culture Collection (ATCC®).

2.2. Métodos

2.2.1. Infestação para obtenção das fêmeas de carrapatos com 2 dias de alimentação

Esse procedimento foi realizado no Biotério do Departamento de Biologia da UNESP de Rio Claro (SP) de acordo com procedimento descrito por Bechara et al. (1995).

Para tanto, utilizou-se coelhos New Zealand White virgens de infestação como hospedeiros, os quais receberam 25 casais de *R. sanguineus*/câmara alimentadora. Após a deposição destes indivíduos no interior das câmaras, procederam-se as observações,

sendo que a primeira ocorreu 8 horas após a liberação dos ectoparasitas, tempo necessário para acomodação dos mesmos. As observações subsequentes deram-se a cada 3 horas para se determinar o tempo de alimentação das fêmeas, que neste estudo foi de 2 dias.

Decorridos 2 dias de alimentação, as fêmeas foram removidas dos hospedeiros pela região do hipostômio com o auxílio de pinça cirúrgica por meio de movimentos circulares para remoção de suas glândulas salivares,

2.2.2. Obtenção dos extratos glandulares

Nas dependências do Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Biologia da UNESP Rio Claro (SP) as fêmeas de *R. sanguineus* foram colocadas em placas de Petri para dissecação contendo solução salina (7,5 g de NaCl, 2,38 g de Na₂HPO₄, 2,72 g de KH₂PO₄ e 1000 mL de água destilada), suas glândulas salivares foram removidas, colocadas (separadamente por período de alimentação), em 50µL de tampão fosfato pH 7.4 e maceradas. Os produtos obtidos foram centrifugados por 30 minutos a 10.000 xg e os sobrenadantes (extratos) foram recolhidos, sendo o **EGS2**= extrato de glândula salivar de fêmeas com 2 dias de alimentação.

No interior de capela de fluxo laminar vertical pré-estéril o **EGS2** foi, separadamente, filtrado com auxílio de unidades filtrantes estéreis (JBR610303, unidade filtrante descartável Millex GV, membrana durapore PVDF, Millipore, MilliUni), de 0.22µm e diâmetro de 13 mm e encaminhados para a dosagem de proteínas, segundo metodologia descrita por Sedmark and Grossberg (1977) (método de Bradford).

2.2.3. Bioensaios de exposição das linhagens celulares aos extratos

Todos os procedimentos de manutenção, quantificação, exposição das linhagens celulares aos extratos assim como fixação das mesmas foram realizados no Laboratório de Imunoparasitologia coordenado pela Profa. Dra. Rosângela Zacarias Machado do Departamento de Patologia Veterinária da UNESP de Jaboticabal (SP).

Tanto as células DH82 quanto as HL-60 foram cultivadas em frasco de 25 cm², em meio de cultura Scaves (meio Dulbecco modificado) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado, com 5% de CO₂ a 37°C.

Os bioensaios foram realizados em placas de cultura de 24 poços, as quais foram semeadas com 1×10^6 células/mL de meio de cultura + volume equivalente de extrato para se obter as concentrações desejadas (0,2 $\mu\text{g/mL}$ e 0,5 $\mu\text{g/mL}$), resultando num volume final de 1 mL (**Teste**). Para controle do experimento (**Controles 1 e 2**) utilizou-se somente 1 mL das suspensões celulares.

Bioensaio 1

Este bioensaio foi realizado para a obtenção de dados quantitativos dos parâmetros viabilidade celular e percentual do número total de células.

Foram então realizadas coletas de cada uma das situações **Teste** assim como do controle **Controle 2- T24** 24 horas após o início do experimento, ou seja, no tempo **T24** para análise em contador automático. Também foi realizada uma leitura inicial (tempo 0= **T0**) das duas suspensões de células tumorais (**Controle 1- T0**). Sendo assim, além das situações de exposição às diferentes concentrações de extrato no tempo **T24**, foram também analisados os controles **Controle 1- T0** e **Controle 2- T24**. Ou seja, foram realizadas as seguintes coletas: a) 24 horas após a exposição das DH82 à 0,2 $\mu\text{g/mL}$ do **EGS2**, b) 24 horas após a exposição das DH82 à 0,5 $\mu\text{g/mL}$ do **EGS2**, c) 24 horas após a exposição das HL-60 à 0,2 $\mu\text{g/mL}$ do **EGS2** e d) 24 horas após a exposição das HL-60 à 0,5 $\mu\text{g/mL}$ do **EGS2**

De cada amostra foram coletadas cinco alíquotas de 10 μL , as quais foram misturas à 10 μL de azul de Tripán para realização das leituras em contador automático da Bio Rad modelo TC10. Foram obtidos dados sobre o número total de células/mL; o número de células vivas/mL, bem como a taxa de viabilidade celular (%) para cada uma das amostras. Também foram obtidos dados sobre o percentual do número total de células.

Então, obteve-se as médias dos parâmetros taxa de viabilidade e percentual do número total de células, as quais foram analisadas estatisticamente por meio do teste ANOVA com pós-teste de TUKEY, foram consideradas significantes as diferenças com $p < 0,05$.

Bioensaio 2

Foram coletadas amostras de 200 μL de cada uma das situações **Teste** e **Controle 2**, o que ocorreu da seguinte forma: a) para as células DH82 e HL- 60

expostas às concentrações de 0,2 µg/mL e 0,5 µg/mL do extrato **EGS2** foram realizadas coletas com 24 horas após a exposição e b) para as células DH82 e HL-60 do grupo **Controle 2** coletou-se também com 24 horas de experimento.

Parte das amostras de células foi centrifugada a 3000 xg por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso nos fixadores formalina neutra tamponada 10% e formaldeído 3,4%. Então, novamente centrifugou-se as suspensões celulares (3000 xg por 5 minutos) e procedeu-se o processamento para cada uma das técnicas aplicadas para microscopia de luz convencional assim como confocal.

A outra parte das amostras (HL-60 expostas à 0,2µg/mL do **EGS2** por 24 horas e HL-60 expostas à 0,5µg/mL do **EGS2** por 24 horas) foi encaminhada para aplicação das técnicas de viabilidade celular e para detecção das caspases 3 e 7 para microscopia confocal.

2.2.4. Microscopia de luz convencional

Esta análise foi realizada no Laboratório de Histologia do Departamento de Biologia da UNESP de Rio Claro (SP). As células foram fixadas em formalina neutra tamponada 10% (pH 7- 7.4), durante 24 horas a 4°C, peletizadas e desidratadas em concentrações crescentes de álcool (70%, 80%, 90% e 95%), banhos de 12 minutos cada. Os pellets foram transferidos para resina de embebição, incluídos e seccionados com 3µm de espessura. A etapa de embebição e a inclusão ocorreram em resina Leica. As secções foram recolhidas em lâminas de vidro, submetidas à coloração pela hematoxilina e eosina segundo Junqueira e Junqueira (1983), secas e montadas em bálsamo de Canadá para posterior observação e fotodocumentação.

2.2.5. Microscopia confocal de varredura a laser

Esta análise foi realizada no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Biologia da UNESP de Rio Claro (SP).

Marcação de núcleo e citoesqueleto

Para realização destas técnicas as células foram peletizadas (centrifugação a 3.000 xg por 5 minutos), fixadas em formaldeído 3,4%, lavadas em tampão fosfato-salino (PBS), permeadas com Triton X-100 0,1% por 20 minutos, lavadas em solução

de PBS e soro fetal bovino 5%, dois banhos de 5 minutos cada, e submetidas aos diferentes marcadores.

Para marcação do microtúbulos, foram adicionados a cada amostra 50µL de solução contendo anticorpos monoclonais produzidos em rato anti α -tubulina (5µg/mL) e anti β -tubulina (3µg/mL) (Sigma Aldrich) diluídos em PBS (anticorpos primários). Então as células foram ressuspendidas em vortex e incubadas durante a noite com a mistura.

Após esse período, as amostras foram novamente centrifugadas (3.000 xg por 5 minutos), e submetidas a dois banhos de 5 minutos cada em PBS. Na sequencia, receberam 50µL de solução contendo anticorpo produzido em coelho anti-rato conjugado com Cy5 (vermelho) (1:1000, Molecular Probes) diluído em PBS (anticorpo secundário), as células foram ressuspendidas em vortex e incubadas por 1 hora na mistura. As amostras foram na sequencia peletizadas (centrifugação a 3.000 xg por 5 minutos) e lavadas em PBS (dois banhos de 5 minutos cada). Em seguida, receberam 50µL da solução de faloidina-alexa 488 (verde) (Molecular Probes) (5µL de faloidina + 200µL de PBS + 2µL de soro normal de cabra), foram ressuspendidas, permanecendo nessa solução por 30 minutos, para marcação do microfilamento de actina, e novamente foram peletizadas e lavadas em PBS, dois banhos de 5 minutos cada.

Na etapa seguinte, as amostras foram ressuspendidas em 10µL de PBS e essa mistura foi montada entre lâmina e lamínula com uma gota do meio de montagem ProLong® Gold Antifade contendo DAPI (marcador de material nuclear) (azul) (Molecular Probes) e na sequencia as lâminas foram observadas e fotodocumentadas em Microscópio Confocal de Varredura a Laser Leica modelo TCS SP5II.

As amostras foram observadas na lente objetiva de 63x, com utilização de zoom de 2,56x em alguns casos, e abertura de Pinhole de 95,46 µm. O comprimento de onda do laser utilizado foi de 488nm para a actina (faloidina+ alexaFluor 488), 633nm para a tubulina (Cy5) e 405nm para o núcleo (DAPI).

Marcação de viabilidade celular

Essa marcação foi realizada utilizando-se o kit Live Dead (Molecular Probes).

Amostras de células foram centrifugadas a 3.000g por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado por completo e adicionou-se 100µL de tampão Hapes/amostra. Na

sequencia, foram acrescentados 0,5µL do reagente SyBr15 (verde), ressuspendeu-se as células e procedeu-se a incubação por 10 minutos. Então, foram adicionados à mistura 0,5µL de iodeto de propídio (vermelho), incubou-se por mais 10 minutos e centrifugou-se (3.000 xg por 5 minutos). O sobrenadante foi removido, permanecendo um volume final de aproximadamente 5µL para a ressuspensão das células.

Na sequencia, uma gota da suspensão celular foi colocada entre lâmina e lamínula e encaminhada para a observação e fotodocumentação em Microscópio Confocal de Varredura a Laser Leica modelo TCS SP5II.

As amostras foram observadas na lente objetiva de 40x (com abertura de Pinhole de 67,9 µm) e 63x (com abertura de Pinhole de 95,46µm) e utilização de zoom de 2,56x em alguns casos. O comprimento de onda do laser utilizado foi de 488nm para o iodeto de propídio e de 633nm para o SyBr15.

Por meio desta técnica pode-se observar núcleos de células com membrana íntegra marcados em verde. Núcleos de células cuja integridade da membrana celular foi perdida (células mortas) são marcados em vermelho ou laranja, pois nestas o iodeto de propídio consegue penetrar devido à perda da capacidade seletiva da membrana.

Deteção da atividade das caspases 3 e 7

Essa marcação foi realizada utilizando-se o kit Cell Event Caspase-3/7 Green (Molecular Probes). Para tanto, adicionou-se uma gota do reagente em cada uma das amostras de células (1 gota do reagente/150µL de suspensão celular). As amostras foram incubadas com o reagente por 30 minutos e na sequencia foram centrifugadas por 5 minutos a 3.000 xg. Então, descartou-se parte do sobrenadante, permanecendo um volume final de aproximadamente 5µL para a ressuspensão das células.

Na sequencia, uma gota da suspensão celular foi colocada entre lâmina e lamínula e encaminhada para a observação e fotodocumentação em Microscópio Confocal de Varredura a Laser Leica modelo TCS SP5II.

As amostras foram observadas sob objetiva de 40x (com abertura de Pinhole de 67,9 µm) e 63x (com abertura de Pinhole de 95,46µm) e zoom de 2,56x em alguns casos. O comprimento de onda do laser utilizado foi de 488nm (verde).

Nas células onde as caspases 3 e 7 encontram-se em atividade, a aplicação desta técnica provoca uma reação cujo produto ao se ligar aos núcleos os marca em verde.

3. Resultados

3.1. Percentual do Número Total de Células e Taxa de Viabilidade

- Controle 2-T24

Células DH82 analisadas 24 horas após o início do bioensaio

O parâmetro percentual do número total de células sofre redução ($64\% \pm 0,021$) quando comparado ao **Controle 1- T0** ($100\% \pm 0$) ($p < 0,01$) (Tabela 1; Fig. 1).

Inversamente, a taxa de viabilidade sofre aumento ($97\% \pm 0,014$) quando comparada ao **Controle 1- T0** ($95\% \pm 0,018$) ($p < 0,05$) (Tabela 1; Fig. 2).

Células HL-60 analisadas 24 horas após o início do bioensaio

O percentual do número total de células mostra redução ($29,7\% \pm 0,004$) quando comparado ao **Controle 1- T0** ($100\% \pm 0$) ($p < 0,01$) (Tabela 1; Fig. 3).

A taxa de viabilidade não se altera tanto para o **Controle 1- T0** ($86\% \pm 0,015$) quanto para o **2- T24** ($86\% \pm 0,014$) (Tabela 1; Fig. 4).

- Exposição de 24 horas ao extrato EGS2

Células DH82 expostas a 0,2µg/mL de extrato

Neste ensaio o percentual do número total de células sofre redução ($60,6\% \pm 0,018$) tanto em relação ao **Controle 1-T0** ($100\% \pm 0$) quanto ao **2-T24** ($64\% \pm 0,021$) ($p < 0,01$) (Tabela 1; Fig. 1). A taxa de viabilidade ($50\% \pm 0,02$) também é reduzida em comparação aos **Controles 1- T0** ($95\% \pm 0,018$) e **2-T24** ($97\% \pm 0,014$) ($p < 0,01$) (Tabela 1; Fig. 2).

Células DH82 expostas a 0,5µg/mL de extrato

O percentual do número total de células sofre redução nesta situação de exposição ($34,18\% \pm 0,001$) em comparação aos **Controles 1- T0** ($100\% \pm 0$) e **2- T24** ($64\% \pm 0,021$) ($p < 0,01$). Comparando-se o dado obtido para a concentração de $0,5\mu\text{g/mL}$ ($34,18\% \pm 0,001$) ao obtido na de $0,2\mu\text{g/mL}$ ($60,6\% \pm 0,018$) há uma redução ($p < 0,01$) (Tabela 1; Fig. 1).

A taxa de viabilidade sofre aumento nesta situação ($99\% \pm 0,023$) em relação ao **Controle 1- T0** ($95\% \pm 0,018$) ($p < 0,01$), mas não em relação ao **2-T24** ($97\% \pm 0,014$)

($p > 0,05$), pois a diferença não é significativa. Ao se comparar o dado obtido na concentração de $0,5\mu\text{g/mL}$ ($99\% \pm 0,023$) ao de $0,2\mu\text{g/mL}$ ($50\% \pm 0,02$) observa-se aumento neste parâmetro ($p < 0,01$) (Tabela 1; Fig. 2).

Células HL-60 expostas a $0,2\mu\text{g/mL}$ de extrato

Nesta situação de exposição, o parâmetro percentual do número total de células é maior ($109\% \pm 0,007$) em relação aos **Controles 1- T0** ($100\% \pm 0$) e **2- T24** ($29,7\% \pm 0,004$) ($p < 0,01$) (Tabela 1; Fig. 3).

Em relação à taxa de viabilidade, é observada redução ($42\% \pm 0,021$) em relação aos **Controles 1- T0** ($86\% \pm 0,015$) e **2-T24** ($86\% \pm 0,014$) ($p < 0,01$) (Tabela 1; Fig. 4).

Células HL-60 expostas a $0,5\mu\text{g/mL}$ de extrato

O percentual do número total de células não se altera significativamente quando se compara esta situação ($99,24\% \pm 0,016$) ao **Controle 1- T0** ($100\% \pm 0$), porém, nota-se aumento em relação ao **Controle 2-T24** ($29,7\% \pm 0,004$) ($p < 0,01$) (Tabela 1; Fig. 3) e redução quando comparado à situação de exposição de $0,2\mu\text{g/mL}$ de extrato ($109\% \pm 0,007$).

Observa-se aumento no parâmetro viabilidade celular quando se compara esta situação ($42\% \pm 0,006$) aos **Controles 1- T0** ($86\% \pm 0,015$) e **2-T24** ($86\% \pm 0,014$) ($p < 0,01$), contudo, não há diferença significativa quando comparado o dado obtido para a concentração de $0,5\mu\text{g/mL}$ ($42\% \pm 0,006$) ao de $0,2\mu\text{g/mL}$ ($42\% \pm 0,021$) (Tabela 1; Fig. 4).

Tabela 1: Taxas de proliferação e de viabilidade das células DH82 e HL-60 expostas por 24 horas à diferentes concentrações do extrato de glândulas salivares de fêmeas de *R. sanguineus* com 2 dias de alimentação (EGS2).

Parâmetros	Controle 1- T0		Controle 2-T24		EGS2	
	DH82	HL-60	DH82	HL-60	DH82 0,2µg/mL	HL-60 0,5µg/mL
NTC (%)	100% ± 0	100% ± 0	64% ± 0,021 ^(*, 1)	29,7% ± 0,004 ^(*, 1)	60,6% ± 0,018 ^(*, **, 1)	109% ± 0,007 ^(*, **, 1)
Taxa de Viabilidade	95% ± 0,018	86% ± 0,015	97% ± 0,014 ^(*, 2)	86% ± 0,014	50% ± 0,02 ^(*, **, 1)	42% ± 0,006 ^(*, **, 1)

valores fornecidos como média ± desvio padrão.

NTC (%): percentual do número total de células.

Controle 1- T0: suspensão celular analisada antes do início do **Bioensaio 2**, ou seja, no tempo 0 (**T0**).

Controle 2- T24: suspensão celular analisada 24 horas após o início do **Bioensaio 2**.

(*)= significância em relação ao **Controle 1- T0** da mesma linhagem celular.

(**)= significância em relação ao **Controle 2- T24** da mesma linhagem celular.

(1)= $p < 0,01$

(2)= $p < 0,05$

3.2. Microscopia de Luz

3.2.1. Técnica de Coloração pela Hematoxilina-Eosina

- Controle 2- T24

Células DH82 analisadas 24 horas após o início do bioensaio

Estas células apresentam morfologia arredondada (Fig. 5). O citoplasma está repleto de grandes grânulos ora positivos (Figs. 5B-C) ora negativos (Fig. 5D) à eosina, os quais também tem semelhança com vacúolos citoplasmáticos.

Os núcleos estão excêntricos, com formas arredondada ou ovalada e cromatina variando desde condensada em algumas células até descondensada em outras (Figs. 5B-D). São observados um ou mais nucléolos/núcleo (Figs. 5B-D). Em algumas células a cromatina está organizada na forma de cromossomos, indicando processo de divisão celular (Figs. 5C, E-F).

São também observadas células com dimensões maiores, as quais podem ser mono ou multinucleadas (Figs. 5F-G).

Células HL-60 analisadas 24 horas após o início do bioensaio

Estas células são menores do que as DH82, contudo a relação núcleo/citoplasma é maior (Fig. 6).

Apresentam morfologia arredondada (Fig. 6) e algumas possuem prolongamentos citoplasmáticos (Figs. 6C, F). O citoplasma é homogêneo e eosinofílico, os núcleos são arredondados, estão dispostos centralmente na célula e a cromatina está condensada (Fig. 6). Estas células podem ser mono (Figs. 6B-F) ou binucleadas (Fig. 6D) e seus nucléolos não são muito evidentes (Figs. 6B-F). Em algumas a cromatina está organizada na forma de cromossomos, indicando processo de divisão celular (Figs. 6B-F).

São observadas também células hipertrofiadas mono ou multinucleadas, podendo os núcleos apresentar lóbulos (Figs. 6E-F), as quais são resultado da diferenciação e maturação celular. Além disso, são observadas poucas células com características de morte, como marginalização cromatínica e fragmentação celular (Figs. 6A-C).

- Exposição de 24 horas ao extrato EGS2

Células DH82 expostas a 0,2µg/mL de extrato

Nesta situação de exposição observa-se algumas células íntegras (Figs. 7A-B), semelhantes àsquelas do **Controle 2**, bem como com claras características de morte (Figs. 7A, C-D), além de extensos blocos de massa celular resultantes da fragmentação das células (Figs. 7A-D). Não são observadas células em divisão (Figs. 7A-D).

Nas células em processo de morte são observadas alterações como: a) desorganização citoplasmática caracterizada pela perda da granulação citoplasmática observada no **Controle 2**, o que pode resultar ou numa massa citoplasmática ou em grandes extensões de vacuolização (Figs. 7C-D), b) picnose (Fig. 7A, C), c) marginalização cromatínica (Figs. 7C-D) e d) fragmentação (nuclear e celular) (Figs. 7A, C-D).

Células DH82 expostas a 0,5µg/mL de extrato

Estas células apresentam características semelhantes (Figs. 7E-I) àsquelas observadas no **Controle 2**. São observadas raras células em processo de divisão (Figs. 7E, I).

Células HL-60 expostas a 0,2µg/mL de extrato

Nesta situação de exposição são observadas células com características de morte (Figs. 8A-G) assim como fragmentadas (massa celular) (Figs. 8A-B, D-F). Não são observadas células em divisão (Figs. 8A-G).

São observadas alterações características de morte celular tais como: a) picnose (Figs. 8C-D), b) marginalização cromatínica (Figs. 8C-G), “blebbs” (Fig. 8F) e c) fragmentação (nuclear e celular) (Figs. 8A-D, G).

Além disso, ainda são observadas aquelas células hipertrofiadas mono ou multinucleadas (podendo os núcleos apresentar lóbulos) (Figs. 8B, E-G) como no **Controle 2**, indicando a ocorrência de diferenciação e maturação celular.

Células HL-60 expostas a 0,5µg/mL de extrato

Nesta situação de exposição as características celulares são semelhantes (Figs. 8H-L) àquelas da situação de exposição de 0,2µg/mL de extrato, por outro lado, as porções de massa celular resultantes da fragmentação das células são observadas com maior frequência (Fig. 8H). Não são observadas células em divisão (Figs. 8H-L).

As alterações celulares que caracterizam a ocorrência de morte são: a) picnose (Figs. 8I-L), b) marginalização cromatínica (Figs. 8I-K), “blebbs”(Figs. 8I-K) e c) fragmentação (nuclear e celular) (Figs. 8I-L).

Nesta situação também são observadas células hipertrofiadas mono ou multinucleadas (Figs. 8J-L).

3.3. Microscopia Confocal de Varredura a Laser

3.3.1. Análises de Núcleo e Citoesqueleto

- Controle 2- T24

Células DH82 analisadas 24 horas após o início do bioensaio

Em condições normais as células desta linhagem possuem forma arredondada e relação núcleo/citoplasma menor que a observada nas HL-60, ou seja, apresentam núcleo com tamanho reduzido em comparação ao citoplasma (Figs. 9A-B).

O citoesqueleto, majoritariamente constituído por actina, encontra-se organizado e está distribuído homogeneamente por toda a extensão celular. Os núcleos apresentam-se íntegros (morfologia regular) (Figs. 9A-B).

Células HL-60 analisadas 24 horas após o início do bioensaio

Essas células apresentam volume inferior que as da linhagem DH82, contudo a relação núcleo/citoplasma é maior (Fig. 10A).

Sua morfologia é arredondada, o citoesqueleto está organizado e distribuído homogeneamente pelo citoplasma, sendo constituído majoritariamente por actina (Fig. 10A).

Os núcleos apresentam-se íntegros e com morfologia regular (Fig. 10A).

- Exposição de 24 horas ao extrato EGS2

Células DH82 expostas a 0,2µg/mL de extrato

São observadas células tanto com morfologia regular (Fig. 9C) quanto irregular (Fig. 9D). Além disso, observam-se alterações tanto no citoesqueleto quanto no núcleo, pois o citoesqueleto se desorganiza resultando na formação de blocos de actina por todo o citoplasma, porém concentrados principalmente na periferia da célula e aderidos internamente à membrana (Figs. 9C-D). Em algumas células observa-se também blocos de tubulina concentrados também na periferia da célula (Fig. 9D). A relação actina/tubulina é semelhante (Figs. 9C-D) à do **Controle 2**.

A cromatina observada nos núcleos encontra-se condensada e organizada na forma de grandes blocos por toda a extensão do núcleo (Figs. 9C-D).

Células DH82 expostas a 0,5µg/mL de extrato

As células apresentam morfologia tanto regular (Fig. 9E) quanto irregular (Fig. 9F). O citoesqueleto encontra-se desorganizado, na forma de blocos de actina e tubulina localizados principalmente no citoplasma periférico (Figs. 9E-F). Observa-se também células cujo citoesqueleto apresenta predominância de tubulina (Fig. 9F). O nível de desorganização notado no citoesqueleto destas células parece inferior (Figs. 9E-F) àquele observado naquelas expostas à concentração de 0,2µg/mL do extrato **EGS2**.

Nos núcleos a cromatina está menos condensada (Figs. 9E-F) quando comparada às células do **Controle 2**.

Células HL-60 expostas a 0,2µg/mL de extrato

A maioria dessas células ou está em processo de fragmentação ou já está fragmentada (Fig. 10B). Além disso, o citoesqueleto encontra-se desorganizado, na forma de blocos de actina e tubulina distribuídos por todo o citoplasma. Em alguns casos tais blocos se encontram em maior concentração na periferia da célula e estão aderidos à membrana (Fig. 10B). A relação actina/tubulina é semelhante (Fig. 10B) à do **Controle 2**.

É observada a presença de núcleos com forma irregular, com blocos de cromatina condensada, com marginalização cromatínica, bem como fragmentados (Fig. 10B).

Células HL-60 expostas a 0,5µg/mL de extrato

Estas células apresentam morfologia irregular, ou seja, deixaram de apresentar forma arredondada (Figs. 10C-F). Em alguns casos as mesmas encontram-se fragmentadas (Figs. 10C, E-F).

A actina encontra-se organizada em blocos na periferia citoplasmática aderidos à membrana (Figs. 10C-E). São observadas células onde a relação actina/tubulina é semelhante (Figs. 10C-E) às células do **Controle 2**. Além disso, são observadas células cujo citoplasma apresenta predominância de tubulina (Figs. 10C-F).

São observados núcleos com forma irregular (Figs. 10C, E), marginalização cromatínica (Figs. 10D-E) e presença de “blebbs” (Fig. 10C), além da presença de fragmentos nucleares (Fig. 10D).

3.3.2. Viabilidade Celular

- Controle 2- T24

Células HL-60 analisadas 24 horas após o início do bioensaio

São observadas tanto células com a integridade da membrana mantida (núcleo verde) quanto aquelas que perderam essa característica (células mortas) (núcleo vermelho) (Figs. 11A-B).

- Exposição de 24 horas ao extrato EGS2

Células HL-60 expostas a 0,2µg/mL de extrato

Nesta situação de exposição a proporção de células cuja integridade da membrana foi perdida (células mortas) é maior (Figs. 11C-D) do que daquelas observadas no **Controle 2**.

Células HL-60 expostas a 0,5µg/mL de extrato

Na exposição de 0,5µg/mL de extrato nota-se semelhante proporção quando analisadas as células HL-60 que mostram perda da integridade da membrana plasmática (Figs. 11E-F) e aquelas expostas à concentração de 0,2µg/mL do extrato **EGS2**.

3.3.3. Análise da Marcação da Atividade das Caspases 3 e 7

- Controle 2- T24

Células HL-60 analisadas 24 horas após o início do bioensaio

Nas células do **Controle 2- T24** são observados apenas poucos núcleos marcados (Fig. 12A), ressaltando que essa marcação (verde e esférica) se concentra em uma ou mais regiões da cromatina (Figs. 12B-C), indicando um padrão e revelando a atividade das caspases 3 e 7 (núcleos apoptóticos).

- Exposição de 24 horas ao extrato EGS2

Células HL-60 expostas a 0,2µg/mL de extrato

Observa-se nesta situação de exposição maior proporção de núcleos apoptóticos (Fig. 12A) em comparação ao **Controle 2**. Além disso, algumas destas células exibem padrão de marcação nuclear semelhante (Fig. 12E) à do **Controle 2** (mais concentrada), enquanto que em outras o aspecto é difuso (mais espalhado) (Fig. 12F).

Células HL-60 expostas a 0,5µg/mL de extrato

Observa-se uma proporcionalidade entre os núcleos apoptóticos desta situação de exposição (Fig. 12G) e àqueles verificados na concentração de 0,2µg/mL do extrato **EGS2**. Além disso, nota-se também uma semelhança no padrão de marcação desta situação (Fig. 12H) com aquela de 0,2µg/mL de extrato.

Figura 1: Percentual do número total de células DH82 não expostas (**Controles 1 e 2**) e expostas por 24 horas às concentrações de 0,2µg/mL e de 0,5 µg/mL do extrato **EGS2**.

NTC= número total de células.

Controle 1 (T0)= suspensão celular analisada antes do início do **Bioensaio 2**, ou seja, no tempo 0 (T0).

Controle 2 (T24)= suspensão celular analisada 24 horas após o início do **Bioensaio 2**.

0,2µg/mL EGS2 (T24)= suspensão celular exposta por 24 horas à 0,2µg/mL do extrato **EGS2**.

0,5µg/mL EGS2 (T24)= suspensão celular exposta por 24 horas à 0,5µg/mL do extrato **EGS2**.

*= significativamente diferente em relação ao **Controle 1- T0** da mesma linhagem celular.

= significativamente diferente em relação ao **Controle 2-T24 da mesma linhagem celular.

Figura 2: Taxa de viabilidade das células DH82 não expostas (**Controles 1 e 2**) e expostas por 24 horas às concentrações de 0,2µg/mL e de 0,5 µg/mL do extrato **EGS2**.

Controle 1 (T0)= suspensão celular analisada antes do início do **Bioensaio 2**, ou seja, no tempo 0 (T0).

Controle 2 (T24)= suspensão celular analisada 24 horas após o início do **Bioensaio 2**.

0,2µg/mL EGS2 (T24)= suspensão celular exposta por 24 horas à 0,2µg/mL do extrato **EGS2**.

0,5µg/mL EGS2 (T24)= suspensão celular exposta por 24 horas à 0,5µg/mL do extrato **EGS2**.

*= significativamente diferente em relação ao **Controle 1- T0** da mesma linhagem celular.

= significativamente diferente em relação ao **Controle 2-T24 da mesma linhagem celular.

Figura 3: Percentual do número total de células HL-60 não expostas (**Controles 1 e 2**) e expostas por 24 horas às concentrações de 0,2µg/mL e de 0,5 µg/mL do extrato **EGS2**.

NTC= número total de células.

Controle 1 (T0)= suspensão celular analisada antes do início do **Bioensaio 2**, ou seja, no tempo 0 (T0).

Controle 2 (T24)= suspensão celular analisada 24 horas após o início do **Bioensaio 2**.

0,2µg/mL EGS2 (T24)= suspensão celular exposta por 24 horas à 0,2µg/mL do extrato **EGS2**.

0,5µg/mL EGS2 (T24)= suspensão celular exposta por 24 horas à 0,5µg/mL do extrato **EGS2**.

*= significativamente diferente em relação ao **Controle 1- T0** da mesma linhagem celular.

= significativamente diferente em relação ao **Controle 2-T24 da mesma linhagem celular.

Figura 4: Taxa de viabilidade das células HL-60 não expostas (**Controles 1 e 2**) e expostas por 24 horas às concentrações de 0,2µg/mL e de 0,5 µg/mL do extrato **EGS2**.

Controle 1 (T0)= suspensão celular analisada antes do início do **Bioensaio 2**, ou seja, no tempo 0 (T0).

Controle 2 (T24)= suspensão celular analisada 24 horas após o início do **Bioensaio 2**.

0,2µg/mL EGS2 (T24)= suspensão celular exposta por 24 horas à 0,2µg/mL do extrato **EGS2**.

0,5µg/mL EGS2 (T24)= suspensão celular exposta por 24 horas à 0,5µg/mL do extrato **EGS2**.

*= significativamente diferente em relação ao **Controle 1- T0** da mesma linhagem celular.

= significativamente diferente em relação ao **Controle 2-T24 da mesma linhagem celular.

Figura 5: Secções histológicas das células DH82 do grupo **Controle 2- T24** submetidas à coloração pela hematoxilina-eosina.

A-G. São observadas células esféricas, íntegras, com núcleos excêntricos e citoplasma repleto de vacúolos ora eosinofílicos (**A-C**) ora negativos para este corante (**A, D**). Além disso, são também notadas células em divisão (**A-C, E-F**) assim como aquelas hipertrofiadas mono (**A, G**) ou multinucleadas (**A, F**).

seta dupla: célula hipertrofiada mononucleada; **seta tripla:** célula hipertrofiada multinucleada; **seta:** célula em divisão; **n:** núcleo com cromatina descondensada; **n*:** núcleo com cromatina condensada; *****: nucléolo; **ev:** vacúolo eosinofílico; **v:** vacúolo negativo para a eosina.

Barras: **A**= 50µm; **B-G**= 20µm.

Figura 6: Secções histológicas das células HL-60 do grupo **Controle 2- T24** submetidas à coloração pela hematoxilina-eosina.

A-F. As células são esféricas e íntegras, os núcleos são centrais e a cromatina condensada, além disso, a relação núcleo/citoplasma é maior que a observada na outra linhagem tumoral. São observadas também algumas poucas células em processo de morte (**A-C**), assim como aquelas com prolongamentos citoplasmáticos (**C, F**), em divisão (**A, C-F**), bem como aquelas hipertrofiadas mono ou multinucleadas (**A, E-F**).

cabeça de seta: célula não hipertrofiada; **seta dupla:** célula hipertrofiada mononucleada; **seta tripla:** célula hipertrofiada multinucleada; **seta:** célula em divisão; **ac:** célula apoptótica; **cf:** fragmentos celulares; **cp:** prolongamentos celulares; **n:** núcleo; **lbn:** núcleo lobulado.

Barras: **A=** 50µm; **B-F=** 20µm.

Figura 7: Secções histológicas das células DH82 expostas por 24 horas ao extrato EGS2 submetidas à coloração pela hematoxilina-eosina.

A-D. Células expostas à concentração de 0,2µg/mL do extrato. São observadas algumas poucas células íntegras (**A-B**) assim como aquelas com características de morte apoptótica (**A, C-D**). Além disso, também são notados extensos blocos de massa citoplasmática (**A-D**).

E-I. Células expostas à concentração de 0,5µg/mL do extrato. Estas estão íntegras (semelhantes ao **Controle T-24**) (**E-I**). São também observadas raras células em divisão (**E, I**), além daquelas hipertrofiadas mono (**E-F**) ou multinucleadas (**G-H**).

cm: massa citoplasmática; **c:** célula íntegra; **ac:** célula apoptótica; **cabeça de seta:** célula não hipertrofiada; **seta dupla:** célula hipertrofiada mononucleada; **seta tripla:** célula hipertrofiada multinucleada; **seta:** célula em divisão; **circulo pontilhado:** resíduos nucleares; **bc:** célula rompida; **pn:** núcleo picnótico; **m:** núcleo com marginalização cromatínica; **nf:** fragmento nuclear; **n:** núcleo com cromatina descondensada; **n*:** núcleo com cromatina condensada; *****: nucléolo.

Barras: **A, E**= 50µm; **B-D, F-H**= 20µm.

Figura 8: Secções histológicas das células HL-60 expostas por 24 horas ao extrato EGS2 submetidas à coloração pela hematoxilina-eosina.

A-G. Células expostas à concentração de 0,2µg/mL do extrato apresentando características de morte apoptótica. São ainda observadas aquelas células hipertrofiadas mono (**F**) e polinucleadas (**A, E, G**).

H-L. Células expostas à concentração de 0,5µg/mL do extrato com alterações que caracterizam apoptose. Além disso, são também observadas as células hipertrofiadas mono (**J, L**) ou multinucleadas (**J**).

cm: massa citoplasmática; **ac:** célula apoptótica; **bc:** célula rompida; **seta dupla:** célula hipertrofiada mononucleada; **seta tripla:** célula hipertrofiada multinucleada; **pn:** núcleo picnótico; **m:** núcleo com marginalização cromatínica; **fn:** núcleo fragmentado; **bb:** núcleo com “blebbs”.

Barras: **A, B, H**= 50µm; **G**= 25µm; **C-F, I-L**= 20µm.

Figura 9: Células DH82 controle (**Controle 2- T24**) e expostas por 24 horas ao extrato **EGS2** submetidas à técnica para marcação do citoesqueleto e núcleo.

A-B. Células do grupo **Controle 2- T24**. Nestas células tanto o núcleo quanto o citoesqueleto não apresentam alterações. A Actina e Tubulina encontram-se distribuídas regularmente ao longo do citoplasma e os núcleos estão íntegros.

C-D. Células expostas à concentração de 0,2µg/mL. São observadas células tanto com morfologia regular (**C**) quanto irregular (**D**). O citoesqueleto está desorganizado (blocos de actina e tubulina na periferia celular) e nos núcleos são observados blocos de cromatina condensada (**C-D**).

E-F. Células expostas à concentração de 0,5µg/mL. Observa-se células tanto com morfologia regular (**F**) quanto irregular (**E**). O citoesqueleto destas células apresenta alterações (desorganizado e a actina e a tubulina concentram-se em blocos na periferia celular).

c: célula íntegra; **acr:** célula apoptótica com morfologia regular; **aci:** célula apoptótica com morfologia irregular; **ic:** célula com morfologia irregular; **rc:** célula com morfologia regular; **n:** núcleo; **n*:** núcleo com blocos de cromatina condensada; **seta:** bloco de actina; **circulo:** bloco de tubulina.

Barras: **A=** 50µm; **B-F=** 15µm.

Figura 10: Células HL-60 não expostas (**Controle 2- T24**) e expostas por 24 horas ao extrato **EGS2** submetidas à técnica para marcação do citoesqueleto e núcleo.

A. Células do grupo **Controle 2- T24**. Nestas células tanto o núcleo quanto o citoesqueleto não apresentam alterações. O citoesqueleto encontra-se distribuído regularmente ao longo do citoplasma e os núcleos estão íntegros.

B. Células expostas à concentração de 0,2µg/mL. Estas células ou estão rompidas ou em processo de fragmentação. Os núcleos e o citoesqueleto apresentam alterações. São observados núcleos com morfologia irregular, bem como fragmentos. O citoesqueleto encontra-se desorganizado e tanto a actina quanto a tubulina concentram-se em blocos na periferia celular.

C-F. Células expostas à concentração de 0,5µg/ml. Estas encontram-se fragmentadas (**C, E-F**) ou em processo de fragmentação (**C-F**). Tanto o núcleo quanto o citoesqueleto apresentam alterações. São observados núcleos com morfologia irregular (**C, E**), com marginalização cromatínica (**D-E**), com “blebbs” (**C**), bem como fragmentos (**D**). O citoesqueleto encontra-se desorganizado e a actina e a tubulina estão concentradas na forma de blocos na periferia celular (**C-F**).

c: célula íntegra; **aci:** célula apoptótica com morfologia irregular; **bc:** célula rompida; **n:** núcleo; **in:** núcleo irregular; **n*:** núcleo com blocos de cromatina condensada; **m:** núcleo com marginalização cromatínica; **bb:** núcleo com “blebbs”; **fn:** núcleo fragmentado; **seta:** bloco de actina; **círculo:** bloco de tubulina.

Barras: **A**= 20µm; **B-E**= 15µm; **F**= 10µm.

Figura 11: Células HL-60 não expostas (**Controle 2- T24**) e expostas por 24 horas ao extrato **EGS2** submetidas à técnica para marcação de viabilidade.

A-B. Células do grupo **Controle 2- T24**. Aqui é observada maior proporção de células cuja integridade da membrana é mantida (células vivas) (núcleos verdes) em relação àquelas que perderam tal característica (células mortas) (núcleos vermelhos).

C-D. Células expostas à concentração de 0,2µg/mL. Nesta situação há maior proporcionalidade de células mortas (núcleos vermelhos) em relação às vivas (núcleos verdes).

E-F. Células expostas à concentração de 0,5µg/mL. A proporção de células mortas (núcleos vermelhos) é semelhante àquela da situação de exposição à 0,2µg/mL do extrato.

seta dupla: célula viva; **seta:** célula morta; **n:** núcleo.

Barras: **A, E**= 50µm; **B, F**= 10µm; **C, D**= 25µm.

Figura 12: Células HL-60 não expostas (**Controle 2- T24**) e expostas por 24 horas ao extrato **EGS2** submetidas à técnica para detecção da atividade das caspases 3 e 7.

A-C. Células do grupo **Controle 2- T24**. São observados somente alguns poucos núcleos marcados (apoptóticos) (**A**), sendo tal marcação esférica e concentrada (**B, C**).

D-F. Células expostas à concentração de 0,2µg/mL. Nesta situação há maior proporção de núcleos marcados (**D**) em comparação ao **Controle 2- T24**. Além disso, observa-se que essa marcação pode ser tanto concentrada (**E**) (semelhante à do **Controle 2- T24**) quanto difusa (espalhada) (**F**).

G-H. Células expostas à concentração de 0,5µg/mL. A proporção de núcleos marcados é semelhante (**G**) àquela da situação de exposição à 0,2µg/mL do extrato. Aqui a marcação também pode ser concentrada ou difusa (**H**).

an: núcleo apoptótico; **seta:** marcação concentrada; **seta dupla:** marcação difusa.

Barras: **A, D, G**= 50µm; **B**= 5µm; **C, H**= 10µm; **E, F**= 7,5µm.

4. Discussão

No presente estudo foram avaliados *in vitro* os efeitos dos extratos obtidos a partir de glândulas salivares de fêmeas de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* com 2 (**EGS2**) dias de alimentação sobre células das linhagens tumorais DH82 (sarcoma histiocítico) e HL-60 (leucemia promielítica aguda).

Os resultados obtidos deixaram evidente que as alterações diretamente relacionadas à proliferação e a viabilidade celulares variaram em função a) da concentração do extrato, bem como c) do modelo biológico, ou seja, da linhagem celular utilizada e, diferentemente do que foi relatado na literatura (KAZIMÍROVÁ et al., 2006; CHUDZINSKI-TAVASSI et al., 2010; SIMONS et al., 2011; AKAGI et al., 2012), as alterações observadas não são dose dependentes, portanto, não são proporcionais à concentração do extrato utilizado.

A análise quantitativa dos parâmetros viabilidade e percentual do número total de células tumorais expostas às diferentes concentrações dos extratos revelou que o **EGS2** influenciou tanto a indução do processo de morte quanto a redução da proliferação celular. Esse extrato na concentração de 0,2µg/mL provocou a redução de 50% na taxa de viabilidade das células DH82, porém não se tem garantia de que o mesmo teria interferido na capacidade proliferativa destas, visto a redução no percentual celular (60,6%) poder ter ocorrido também devido à morte das mesmas. O extrato na concentração de 0,5µg/mL agiu reduzindo o percentual do número total de células DH82, porém, sem interferir na viabilidade das mesmas, confirmando seu potencial inibidor da proliferação celular. No caso das células HL-60 tanto a concentração de 0,2µg/mL quanto a de 0,5µg/mL induziram a morte, reduzindo a viabilidade celular em cerca de 58%, porém aumentando o percentual do número total de células em relação ao **Controle 2- T24**, sinalizando que nessas concentrações o extrato **EGS2** estimularia a proliferação celular, e ainda ressaltando que a concentração de 0,2µg/mL seria aquela que mais estimularia esse processo.

Estes dados aqui obtidos foram fortes sinalizadores de que o extrato **EGS2**: a) na concentração 0,2µg/mL tem potencial para provocar a morte das células DH82, b) na de 0,5µg/mL tem potencial para reduzir a capacidade proliferativa das DH82 e c) as

concentrações de 0,2µg/mL e de 0,5µg/mL são estimuladoras da proliferação das HL-60, porém comprometendo a sua viabilidade (**Tabela 2**), dados que são corroborados por aqueles de Kazimírová et al. (2006), quando estudaram o potencial antitumoral de extratos de glândulas salivares de diferentes espécies de carrapatos em diferentes períodos de alimentação (inclusive em jejum) agindo sobre células HeLa, ficando demonstrado que cada extrato agiria de forma específica: a) ou inibindo a proliferação celular ou b) induzindo as células a entrarem em apoptose.

Tabela 2: Resumo dos resultados quantitativos onde pode-se visualizar e comparar a ação dos extratos.

Extrato	Concentração (µg/mL)	Células	Viabilidade	Proliferação
EGS2	0,2	DH82	- *	=
		HL-60	-	+
	0,5	DH82	=	- *
		HL-60	-	+

*: situações onde os extratos atuaram como inibidores.

+: aumento no parâmetro analisado; -: redução no parâmetro analisado; =: sem alteração no parâmetro.

A análise quantitativa aqui realizada revelou que as situações onde as células sofreram apenas inibição pela exposição aos extratos foram aquelas quando as células DH82 foram submetidas às concentrações de 0,2µg/mL (redução da viabilidade) e de 0,5µg/mL (redução da proliferação) do **EGS2** (**Tabela 3**). Por outro lado, a proliferação das células HL-60 expostas à 0,2µg/mL e à 0,5µg/mL do extrato **EGS2** foi estimulada, contrariando registros da literatura que relataram que os componentes da saliva dos carrapatos reduziram a capacidade proliferativa de linfócitos *in vitro* (WIKEL et al., 1978; BROSSARD; WIKEL, 1997; TURNI et al., 2002). Uma possível explicação poderia ser que as células HL-60 expostas ao extrato teriam respostas diferentes daquelas das células dendríticas normais, uma vez que a fisiologia das células tumorais também seria diferente das saudáveis, reforçando a evidencia de que os componentes salivares oriundos de carrapatos teriam potencial de provocar a morte de células

tumorais *in vitro*, sem, contudo, afetar aquelas sadias (CHUDZINSKI-TAVASSI et al., 2010; SIMONS et al., 2011). Outro fato que poderia confirmar isso foi aquele aqui obtido com a análise histológica, que mostrou que as células HL-60 expostas ao **EGS2** tiveram mantidas as capacidades de diferenciação e de maturação (observação de células maduras e com núcleos lobulados), contrariando dados da literatura que mostraram que a saliva de carrapatos inibiria a diferenciação e a maturação de células dendríticas tanto da medula quanto do baço de camundongos (CAVASSANI et al., 2005; MEJRI; BROSSARD, 2007; SKALLOVÁ et al., 2008).

Vale ainda ressaltar que os dados aqui obtidos na análise quantitativa confirmaram que os extratos interferem tanto na proliferação quanto na viabilidade das células tumorais e, além disso, a interferência nos parâmetros proliferação e viabilidade celular foi específica, reduzindo a capacidade proliferativa sem induzir morte celular e vice-versa. O estudo desenvolvido por Kazimírová et al. (2006) mostrou que a inibição das células tumorais frente à exposição à diferentes extratos glandulares ocorreu preferencialmente devido à inibição da proliferação celular mais do que pela indução de efeitos citotóxicos. Por outro lado, corroborando os dados aqui obtidos, outros trabalhos disponíveis na literatura também mostraram que componentes da saliva do carrapato *A. cajennense* (SIMONS et al., 2011), assim como a proteína recombinante amblyomin-X (obtida de uma biblioteca de c-DNA das glândulas salivares do carrapato *A. cajennense*) (CHUDZINSKI-TAVASSI et al., 2010; AKAGI et al., 2012) induziriam as células tumorais à entrarem em apoptose, devido a interrupção do ciclo celular (CHUDZINSKI-TAVASSI et al., 2010; AKAGI et al., 2012).

A quantificação da proliferação e da viabilidade das células tumorais aqui analisadas foram confirmadas pelos resultados aqui obtidos a partir da realização das análises sob microscopia de luz convencional (coloração pela hematoxilina-eosina) e confocal (marcação do citoesqueleto e núcleo, viabilidade e atividade das caspases 3 e 7), as quais mostraram que as células DH82 (exposição à 0,2µg/mL do extrato **EGS2**), bem como as HL-60 (exposição à 0,2µg/mL e à 0,5µg/mL de **EGS2**) sofreram intenso processo de morte, confirmando os dados quantitativos. Contudo, a observação da presença de massas celulares (restos citoplasmáticos e nucleares resultante do rompimento das células) foi mais evidente na linhagem DH82 exposta à 0,2µg/mL

(**EGS2**) do que nas outras duas situações, mostrando que o processo de morte destas células DH82 estaria mais avançado do que o das HL-60 provavelmente devido ao extrato **EGS2** (0,2µg/mL) ter induzido precocemente à morte das DH82.

A histologia mostrou também que comparando os resultados das células HL-60 tanto expostas à 0,2µg/mL como à 0,5µg/mL do extrato **EGS2**, as massas celulares foram mais frequentes nesta última. Somando-se a isso, a análise quantitativa mostrou que, além do percentual do número total de células HL-60 expostas à 0,2µg/mL do extrato **EGS2** ter sido significativamente maior, a taxa de viabilidade para ambas as situações permaneceu a mesma (42%), resultados que sinalizaram que o extrato **EGS2** na concentração de 0,5µg/mL teria maior capacidade de induzir precocemente a morte das células HL-60 do que a de 0,2µg/mL, confirmando que a maior concentração, neste caso específico, teria um efeito inibidor mais potente.

Os dados histológicos mostrando a ocorrência de morte das células DH82 e HL-60 foram também confirmados pela microscopia confocal, via análises de citoesqueleto e de núcleo. As células expostas ao extrato **EGS2** sofreram alterações indicativas de processo de morte. Além disso, tanto a viabilidade quanto a atividade das caspases 3 e 7 apontaram para maior proporção de células HL-60 (exposição à 0,2µg/mL e 0,5µg/mL de **EGS2**) com perda da integridade da membrana (células mortas) e com ativação das caspases 3 e 7 (células apoptóticas) quando comparadas àquelas do **Controle 2- T24**.

As alterações histológicas que caracterizaram a ocorrência de morte nas células DH-82 e HL-60 expostas ao **EGS2** foram semelhantes em ambas as linhagens, ou seja: picnose, marginalização cromatínica, formação de “blebbs” e fragmentação (nuclear e celular).

A microscopia confocal revelou na análise dos núcleos e do citoesqueleto que nas células DH82 (exposição à 0,2µg/mL de extrato **EGS2**) a cromatina encontrou-se condensada e distribuída na forma de grandes blocos no núcleo, caracterizando o início do processo de marginalização. Além disso, observou-se nítida desorganização do citoesqueleto. Nas células HL-60 expostas a 0,2µg/mL e 0,5µg/mL de **EGS2** observou-se fragmentação de células e cromatina condensada disposta: ou em blocos pelo núcleo todo, ou marginalizada, além da ocorrência de “blebbs” e fragmentos nucleares. Quanto ao citoesqueleto, este também apresentou-se desorganizado tanto em relação à actina

quanto à tubulina. De acordo com a literatura as alterações nucleares seriam clássicas da ocorrência de processo apoptótico (ALLEN et al., 1997; ZIEGLER; GROSCURTH, 2004; ELMORE, 2007; TAATJES et al., 2008; NDOZANGUE-TOURIGUINE et al., 2008). As alterações quanto à desorganização do citoesqueleto aqui observada também foram um forte indicativo de que as células tumorais entraram em apoptose, processo esse que acarretaria a desorganização tanto dos filamentos de actina como dos microtúbulos (BONFOCO et al., 1996). Há também na literatura registros de que a clivagem da actina seria responsável pelas mudanças morfológicas nas células apoptóticas (MASHIMA et al., 1999; NDOZANGUE-TOURIGUINE et al., 2008). Além disso, a quebra de proteínas do citoesqueleto (actina e a citoqueratina) estaria envolvida na regulação da via apoptótica (KULMS et al., 2002; NDOZANGUE-TOURIGUINE et al., 2008; DESOUZA et al., 2012).

A análise e detecção da atividade das caspases 3 e 7 comprovaram que as concentrações de 0,2µg/mL e de 0,5µg/mL do extrato **EGS2** induziram as células HL-60 a entrar em apoptose, visto ser este o único evento celular onde seria observada a atividade das caspases (ZIEGLER; GROSCURTH, 2004; ELMORE, 2007; TAATJES et al., 2008).

A indução da apoptose nas linhagens tumorais aqui submetidas ao extrato **EGS2** foi confirmada por dados da literatura que mostraram que tanto os componentes da saliva dos carrapatos quanto o amblyomin teriam potencial para induzir as células tumorais a entrarem em apoptose (CHUDZINSK-TAVASSI et al., 2010; SIMONS et al., 2011; AKAGI et al., 2012). Segundo os autores, tais moléculas apresentariam atividade pró-apoptótica (AKAGI et al., 2012), pois atuariam em pontos de checagem do ciclo celular, interrompendo (bloqueando) seu progresso e, portanto, sinalizando que a célula deveria morrer (SIMONS et al., 2011; CHUDZINSK-TAVASSI et al., 2010).

Ainda em relação à análise da atividade das caspases 3 e 7, o presente estudo demonstrou a ocorrência de um padrão de marcação nuclear das células em apoptose, portanto, com as caspases 3 e 7 ativas. Nas células HL-60 do grupo **Controle 2** esta marcação foi esférica e concentrada em apenas algumas regiões do núcleo. Quando as células foram expostas ao extrato glandular **EGS2** a mesma ficou mais espalhada

(difusa), demonstrando que os extratos interferiram nesse padrão de marcação e, portanto, no comportamento fisiológico das células.

A análise em microscopia de luz apontou ausência de características de morte nas células DH82 expostas à 0,5µg/mL do extrato **EGS2**, contudo, as células em divisão foram observadas com menor frequência. Já a análise em microscopia confocal revelou a ocorrência de alterações apenas no citoesqueleto (desorganização dos microfilamentos actina e da microtubulina) das células DH82 (exposição à 0,5µg/mL do extrato **EGS2**), as quais também não caracterizaram a ocorrência de morte. Os dados morfológicos obtidos para as células DH82 (exposição à 0,5µg/mL do extrato **EGS2**) foram confirmados por aqueles obtidos na análise quantitativa, que mostrou que embora estas células tenham tido a proliferação comprometida, tiveram a viabilidade mantida, o que permite inferir que a redução na proliferação das células DH82 (exposição à 0,5µg/mL do extrato **EGS2**) poderia estar relacionada também com a desorganização do citoesqueleto, evento de caráter pré-apoptótico, que de acordo com alguns autores seria responsável pela regulação desse processo (LEVEE et al., 1996; GUENAL et al., 1997; KORICHNEVA; HAMMERLING, 1999; KULMS et al., 2002; NDOZANGUE-TOURIGUINE et al., 2008; DESOUZA et al.; 2012). A desorganização no citoesqueleto das células DH82 (exposição à 0,5µg/mL do extrato **EGS2**) foi menos acentuada que nas DH82 (exposição à 0,2µg/mL do extrato **EGS2**) e HL-60 (exposição às concentrações de 0,2 µg/mL e 0,5µg/mL do **EGS2**) (situações onde observou-se apoptose), não desencadeando a apoptose nas mesmas, mas agindo de forma a inibir a proliferação destas. Isto é posto uma vez que sabe-se que a tubulina tem papel no processo de divisão celular por fazer parte das fibras do fuso mitótico e assim, qualquer alteração na sua organização refletiria diretamente no processo de divisão celular.

Tabela 3: Resumo comparativo dos resultados da exposição das células DH82 e HL-60 às concentrações de 0,2 e de 0,5µg/mL do extrato **EGS2**.

	DH82 (0,2µg/mL)	DH82 (0,5µg/mL)	HL-60 (0,2µg/mL)	HL-60 (0,5µg/mL)
Alterações				
Forma Celular	- esférica e/ou rompimento celular	- esférica e/ou irregular	- esférica, irregular e/ou rompimento celular	- esférica, irregular e/ou rompimento celular
Aspecto Citoplasmático	massa citoplasmática, vacuolizado e/ou extravasado	- homogêneo	- homogêneo e/ou extravasado	- homogêneo e/ou extravasado
Citoesqueleto	- desorganizado, com actina/tubulina em blocos	- desorganizado, com actina/tubulina em blocos e predominância de tubulina	- desorganizado, com actina/tubulina em blocos	- desorganizado, com actina em blocos e predominância de tubulina
Núcleo	- picnótico e/ou fragmentado	- íntegro	- irregular, picnótico, com blebbs e/ou fragmentado	- irregular, picnótico, com blebbs e/ou fragmentado
Cromatina	- condensada, em processo de marginalização e/ou já marginalizada	- descondensada	- condensada, em processo de marginalização e/ou já marginalizada	- condensada e/ou já marginalizada
Consequência das Alterações	- morte celular	- divisão celular reduzida	- morte celular	- morte celular

DH82 (0,2µg/mL): células DH82 expostas à 0,2µg/mL do extrato **EGS2**; **DH82 (0,5µg/mL):** células DH82 expostas à 0,5µg/mL do extrato **EGS2**.

HL-60 (0,2µg/mL): células HL-60 expostas à 0,2µg/mL do extrato **EGS2**; **HL-60 (0,5µg/mL):** células HL-60 expostas à 0,5µg/mL do extrato **EGS2**.

Ainda com relação a redução da proliferação das células aqui estudadas frente à exposição aos extratos de glândulas salivares, de acordo com dados da literatura tanto a saliva do carrapato *A. cajennense* quanto o peptídeo amblyomin apresentariam atividade pró-apoptótica, interrompendo o ciclo celular e sinalizando para a célula que ela “deveria” entrar em apoptose (CHUDZINSK-TAVASSI et al., 2010; SIMONS et al., 2011; AKAGI et al., 2012). De acordo com Chudzinsk-Tavassi et al. (2010), existiria nas células tumorais quando expostas ao amblyomin uma alteração no sistema ubiquitinina-proteossoma, e ocorreria uma superexpressão do gene responsável por codificar a subunidade catalítica $\beta 2$ do proteossoma, provocando um decréscimo na própria atividade proteossomal e aumentando as proteínas ubiquitiniladas com consequente interrupção do ciclo celular. Outra possível explicação para o comprometimento da proliferação das células DH82 (exposição à 0,5 μ g/mL do extrato **EGS2**) seria o fato de que o extrato **EGS2** nesta concentração não teria a capacidade de modular a expressão do gene codificador da subunidade $\beta 2$ do proteossoma das células DH82 e HL-60 o suficiente para interromper o ciclo e induzi-las à apoptose, porém, tal modulação inibiria sim a proliferação.

Assim, os dados aqui apresentados deixaram claro que os extratos glandulares testados teriam potencial para comprometer a viabilidade das células destas duas linhagens tumorais induzindo o processo de apoptose e reduzindo a proliferação das mesmas, eventos que variaram em função: a) do extrato (**EGS2**), b) das concentrações e c) do modelo tumoral utilizados, possibilitando demonstrar o potencial antitumoral do extrato **EGS2** obtido a partir de glândulas salivares de fêmeas de *R. sanguineus* com 2 de alimentação, sendo que a potencialidade destes extratos ficou evidente uma vez que: **1)** o **EGS2** afetou negativamente tanto a viabilidade quanto a proliferação das células tumorais e na concentração de 0,2 μ g/mL induziu a ocorrência de apoptose nas células DH82. Na concentração de 0,5 μ g/mL inibiu a proliferação destas, assim estas duas concentrações estariam envolvidas na indução da apoptose nas células HL-60, tendo sido a de 0,5 μ g/mL mais potente do que a de 0,2 μ g/mL. **2)** o **EGS2** induziu as células DH82 a entrarem em apoptose mais precocemente do que as HL-60.

Concluindo, os resultados aqui apresentados foram sinalizadores de que extrato glandular **EGS2** obtido de carrapatos *R. sanguineus* é um forte candidato para atuar como inibidor das células das linhagens tumorais DH82 e HL-60, abrindo a perspectiva para o desenvolvimento de novos estudos com esse enfoque e subsidiando a literatura com dados de relevante importância contra o câncer.

Capítulo 2

A Glândula Salivar de Fêmeas de Carrapatos *Rhipicephalus sanguineus*: Potencial Reservatório de Moléculas com Ação Inibidora (*in vivo*) Sobre Células de Tumor de Walker 256

Resumo

No presente trabalho foram avaliados os efeitos da injeção de duas concentrações diferentes (0,2 e 0,04 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) de extratos (uma ou duas) obtidos a partir de glândulas salivares de fêmeas de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) (Latreille, 1806) com dois dias de alimentação sobre a morfofisiologia da musculatura de pernas posteriores de ratas Wistar inoculadas com células do tumor de Walker 256. Foi também realizada a quantificação do número de leucócitos, bem como dos níveis de creatinina dos indivíduos de todos os grupos. Os resultados mostraram tanto na histologia quanto na microscopia eletrônica que a injeção única da menor concentração do extrato (0,04 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) foi mais efetiva na contenção da invasão tumoral, bem como causou menores “danos colaterais” ao tecido muscular, objeto deste estudo. Os resultados revelaram ainda que em relação ao parâmetro creatinina, seu nível encontrou-se aumentado nas ratas submetidas a uma e a duas injeções do extrato na concentração de 0,04 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ quando comparadas àquelas submetidas a uma e duas injeções do extrato na maior concentração, sugerindo que nos primeiros a injeção do extrato contribuiu para a manutenção da integridade do tecido muscular. Quanto ao parâmetro aumento/diminuição do número de leucócitos, os resultados sugeriram que em todas as ratas inoculadas houve aumento significativo do número total de leucócitos. Naquelas inoculadas e submetidas as injeções (uma e duas) de extrato na concentração de 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ houve aumento significativo de leucócito quando comparou-se com aquelas apenas inoculadas e não expostas ao extrato, resultado este que pode ser explicado pelo fato de que além das células tumorais o próprio extrato nesta concentração agiu como potencializador da resposta de defesa. Ao contrário, aquelas ratas inoculadas e submetidas as injeções (uma e duas) de extrato na concentração de 0,04 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ apresentaram redução significativa no número total de leucócitos quando comparadas as ratas apenas inoculadas e as inoculadas e injetadas com extrato na concentração de 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Esses resultados reforçaram que o extrato na concentração de 0,04 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ além de agir com maior efetividade na inibição das células tumorais, não atuou como

agente estressor, visto o número de leucócitos ter sido menor. Os dados aqui obtidos sinalizaram, portanto, que as moléculas produzidas pelas glândulas salivares desta espécie de carrapatos teriam capacidade de inibir o crescimento tumoral, com “danos colaterais” mínimos ao organismo.

Palavras-chave: Carrapatos, extrato de glândula salivar, ratos Wistar, músculo e morfofisiologia.

Introdução

A saliva dos carrapatos é uma mistura complexa e considerada um grande e eficaz arsenal farmacológico que garante a alimentação e a sobrevivência desses ectoparasitas (STEEN et al., 2006; FRANCISCHETTI et al., 2010) pela produção de substâncias que tem ação diversificada. Nesta secreção encontram-se presentes bioativos capazes de atuar principalmente na modulação do sistema imune-inflamatório e hemostático dos hospedeiros (STEEN et al., 2006; HAJNICKÁ et al., 2011), podendo dentre eles ser destacados a presença de componentes de origem glico e, lipoprotéica, além daqueles lipídicos (CAMARGO-MATHIAS et al., 2011), bem como calreticulina, fosfatase ácida, esterases, aminopeptidases, metaloproteinases, lipocalinas e prostaglandinas (BROSSARD; WIKEL, 2004; STEEN et al., 2006; MULENGA et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2011; CAMARGO-MATHIAS et al., 2011). Por esta razão, a saliva dos carrapatos em geral vem sendo alvo de diferentes estudos devido, principalmente, ao grande interesse sobre a composição e o modo de ação desses bioativos, alguns já previamente descritos como vasodilatadores, antiinflamatórios, anticoagulantes, imunossupressores (OLIVEIRA et al., 2010), e recentemente indicados como agentes anti-angiogênicos (FRANCISCHETTI et al., 2010; DREWES et al., 2012) e anti-tumoral (KAZIMÍROVÁ et al., 2006; CHUDZINSKI-TAVASSI et al., 2010; SIMONS et al., 2011; AKAGI et al., 2012).

Quando se trata especificamente do carrapato do cão pertencente à espécie *Rhipicephalus sanguineus*, estudos já demonstraram que a complexidade bioquímica da sua saliva sofre modificações a medida que o repasto sanguíneo progride, isso devido a necessidade dos ectoparasitas de modular o sistema homeostático do hospedeiro, permitindo aos ectoparasitas que sejam biologicamente bem sucedidos. Esta mistura que

compõe a saliva dos carrapatos *R. sanguineus* pode sofrer variações tanto quantitativa quanto qualitativa quando considerados períodos específicos do seu ciclo glandular como o início do mesmo aos 2 dias de alimentação, o meio aos 4 dias e o final aos 6 dias (FURQUIM, 2010; KAZIMÍROVÁ, 2007).

A literatura tem registrado que em estudos anteriores foi encontrada na saliva de carrapatos da espécie *Amblyomma cajennense*, os quais tem como hospedeiros preferenciais os cavalos, uma proteína que participaria de processos de coagulação e apresentaria também atividade citotóxica sobre células de linhagens tumorais (CHUDZINSKI-TAVASSI et al., 2010). Ainda estudos realizados por Kazimírová et al. (2006) demonstraram que diferentes moléculas presentes em extratos de glândulas salivares de outras espécies de carrapatos teriam capacidade de inibir o crescimento de células da linhagem HeLa ou por meio da indução de apoptose (*R. appendiculatus* e *A. variegatum*), ou devido a sua ação anti-proliferativa (*Ixodes ricinus*, *R. appendiculatus*, *Dermacentor reticulatus* e *A. variegatum*). Somando-se a isso Simons et al. (2011) relataram que a saliva bruta de algumas espécies de carrapatos poderia atuar sobre o controle *in vitro* de células tumorais, as quais entrariam, devido a exposição, em processo de morte. E finalmente Poole et al. (2013) relataram o efeito inibidor que a saliva de carrapatos teria sobre a capacidade migratória e invasiva de células MDA-MB- 231.

As informações acima expostas vêm enfocar os carrapatos sob uma nova perspectiva onde os mesmos deixariam de ser considerados apenas como organismos nocivos e, passariam a representar uma importante fonte de bioativos com potencial de interferir sobre o controle do desenvolvimento de células de linhagens tumorais e consequentemente sobre o crescimento de tumores (SHAFI et al., 2009, MORRIS; DOBSON, 2007). No entanto, é sabido que muitos estudos sobre essa temática ainda precisam ser desenvolvidos fazendo uso das mais diversificadas ferramentas técnicas disponíveis.

Assim, diante do exposto, o presente estudo teve como objetivo analisar os efeitos do extrato de glândulas salivares obtidos a partir de fêmeas de carrapatos *R. sanguineus* alimentadas por dois dias em coelhos hospedeiros, sobre a morfofisiologia da musculatura das pernas posteriores de ratas Wistar, previamente inoculadas com células do tumor de Walker 256, *in vivo*.

Material e Métodos

Modelo de Estudo Tumoral *in vivo*

Para a realização do estudo *in vivo* foram utilizadas 35 ratas Wistar fêmeas com peso médio entre 450g a 500g e idade entre 90 e 120 dias, que foram distribuídas nos seguintes grupos de estudo: a) Controle 1 (**GC1**) (5 indivíduos sadios), b) Controle 2 (**GC2**) (5 indivíduos com tumor e injetados com tampão fosfato de sódio pH7,4), c) Controle 3 (**GC3**) (5 indivíduos apenas com tumor), d) Grupo Teste 1 (**GT1**) (5 indivíduos com tumor e submetidos a uma injeção do extrato **EGS2** na concentração de 0,04µg/µL), e) Grupo Teste 2 (**GT2**) (5 indivíduos com tumor e submetidos a duas injeções do extrato **EGS2** na concentração de 0,04µg/µL), f) Grupo Teste 3 (**GT3**) (5 indivíduos com tumor e submetidos a uma injeção do extrato **EGS2** na concentração de 0,2µg/µL) e g) Grupo Teste 4 (**GT4**) (5 indivíduos com tumor e submetidos a duas injeções do extrato **EGS2** na concentração de 0,2µg/µL).

1. Obtenção e Manutenção das Células do Tumor de Walker 256

As células de tumor de Walker 256 foram gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes, Supervisora do Laboratório de Nutrição e Câncer do Departamento de Fisiologia IB/UNICAMP/Campinas/SP. Os animais inoculados com as células foram sacrificados e o tecido tumoral foi fragmentado, filtrado em gaze e o líquido coletado transferido para tubos Falcon de 50 mL, os quais foram centrifugados a 4°C, por 10 minutos, a 3000 rpm. Todos os procedimentos foram realizados a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em solução salina a 0,9% obtendo-se dessa forma uma suspensão celular concentrada.

Para a contagem das células, realizou-se uma diluição de 1:100 em solução salina 0,9%. Na sequência, realizou-se a mistura de 200µL da suspensão diluída com 200µL do corante azul de tripan 1%. A contagem do número de células foi realizada sob microscópio de luz em câmara de Neubauer. A viabilidade celular foi determinada considerando que as células viáveis seriam as refringentes à luz. O número de células da suspensão de trabalho foi de 1×10^7 células/mL.

Após a contagem de células, 1 mL da suspensão de trabalho foi inoculado, via intraperitoneal, na região abdominal de três ratas Wistar adultas para obtenção de tumor líquido (ascite). Decorridos aproximadamente 15 dias da inoculação, o líquido ascítico foi coletado do abdômen destas.

2. Implantação do Tumor de Walker 256

O modelo de câncer utilizado no presente estudo foi descrito por Brigatte et al. (2007). Neste modelo os ratos com ascite foram eutanasiados utilizando-se a mistura das drogas quetamina e xilasina, até que os animais entrassem em óbito. Após o líquido ascítico ter sido coletado, este foi colocado em tubo de ensaio contendo EDTA. O líquido foi diluído na proporção de 1:100 em tampão fosfato de sódio, pH 7,4. Então procedeu-se a contagem de células utilizando-se o corante azul de tripan, conforme descrito no item anterior. A suspensão inoculada foi de 1×10^6 células/mL na região intraplantar posterior direita (300 μ L de suspensão/pata).

3. Obtenção das Glândulas Salivares e do Extrato Glandular EGS2

Para obtenção das fêmeas de carrapatos com 2 dias de alimentação utilizou-se indivíduos machos e fêmeas em jejum, os quais foram obtidos a partir de colônias de *R. sanguineus* mantidas, especialmente para o desenvolvimento deste estudo, em estufa BOD em condições controladas (29°C, 80% de umidade e fotoperíodo de 12 horas) em sala do Biotério do Departamento de Biologia da UNESP de Rio Claro (SP).

As fêmeas com 2 dias de alimentação oriundas de prévia infestação foram retiradas dos hospedeiros pela região do hipostômio com o auxílio de pinça cirúrgica por meio de movimentos circulares. A seguir, esses indivíduos foram colocados em placas de Petri para dissecação contendo solução salina (7,5 g de NaCl, 2,38 g de Na₂HPO₄, 2,72 g de KH₂PO₄ e 1000 mL de água destilada), onde procedeu-se a remoção das glândulas salivares.

As glândulas salivares foram colocadas em tubos eppendorfs contendo 50 μ L de tampão fosfato pH 7.4, onde foram maceradas. Na sequência os tubos foram centrifugados por 30 minutos a 10.000xg e os sobrenadantes recolhidos foram depositados em eppendorfs previamente esterilizados.

No interior de capela de fluxo laminar vertical pré-estéril, o extrato foi filtrado com auxílio de unidades filtrantes estéreis (JBR610303, unidade filtrante descartável Millex GV, membrana durapore PVDF, Millipore, MilliUni), de 0,22 μm e diâmetro de 13 mm, acopladas a seringas hipodérmicas e então, encaminhado para a dosagem de proteínas (método de Bradford).

A seguir, o extrato concentrado foi armazenado em freezer a -20°C até o momento de uso.

4. Injeção do Extrato de Glândula Salivar EGS2 nas ratas Wistar inoculadas com células de tumor de Walker 256

Os extratos **EGS2** foram diluídos com o tampão fosfato de sódio, pH 7,4, para se obter as concentrações de $0,04\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e de $0,2\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

O procedimento de injeção das diferentes concentrações do extrato **EGS2** foi realizado em local fechado e esterilizado, em sala do Biotério do Departamento de Biologia do Instituto de Biociências da UNESP *campus* Rio Claro/SP.

A primeira injeção das diferentes concentrações do extrato **EGS2** ocorreu 15 dias após a inoculação das células tumorais, sendo injetado o extrato na concentração $0,04\mu\text{g}/\mu\text{L}$ nos Grupos Teste 1 (**GT1**) e 2 (**GT2**) e na concentração de $0,2\mu\text{g}/\mu\text{L}$ nos Grupos Teste 3 (**GT3**) e 4 (**GT4**).

Nesse mesmo dia foi realizada a única injeção do tampão fosfato de sódio, pH7,4 no Grupo Controle 2 (**GC2**).

A segunda injeção dos extratos foi realizada 4 dias após a primeira, somente nos grupos: Teste 2 (**GT2**) com o extrato **EGS2** na concentração de $0,04\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e Teste 4 (**GT4**) extrato **EGS2** na concentração de $0,2\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

No 21° dia após a inoculação das células tumorais e efetuadas as injeções do extrato, os animais foram eutanasiados utilizando-se a mistura das drogas quetamina e xilasina em excesso, até que estes viessem a óbito.

Em seguida em ambiente esterilizado o material muscular foi retirado e preparado para análise.

5. Métodos de Análise

5.1. Microscopia de Luz Convencional

- Técnica da hematoxilina de Harris e eosina aquosa (HE) (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983)

O material biológico foi fixado com paraformaldeído 4% em microtubos de plástico de 1,5mL pelo período de 24 horas. As amostras foram, em seguida, lavadas por três vezes com tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7.4. A desidratação ocorreu em série crescente de álcool etílico a 70%, 80%, 90% e 95% (banhos de 30 minutos cada). Posteriormente, o material foi embebido em resina por 24 horas e incluído em moldes plásticos contendo resina mais polimerizador até que os blocos endurecessem.

Após esse processo, os blocos foram seccionados em micrótomo para obtenção de secções com 3µm de espessura que após, foram recolhidas em lâminas de vidro.

As lâminas contendo cerca de seis secções cada, foram armazenadas em estufa e posteriormente coradas pela hematoxilina durante sete minutos. Depois de lavadas por quatro minutos em água corrente, foram então coradas pela eosina aquosa durante cinco minutos e lavadas em água corrente novamente. Após secagem ao ar livre, as lâminas foram mergulhadas rapidamente em xilol e, em seguida, cobertas com bálsamo do Canadá e posteriormente cobertas com lamínula.

As lâminas obtidas foram examinadas e fotografadas em microscópio de luz Leica DM750.

5.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A fim de se realizar a análise de rotina em Microscopia Eletrônica de Transmissão, fragmentos musculares foram fixados em glutaraldeído a 2.5% em tampão cacodilato de sódio 0,1M (pH 7.2), durante 2 horas, à temperatura ambiente. Em seguida, foram realizadas duas lavagens em tampão cacodilato de sódio 0,1M durante 15 minutos cada e, logo depois, efetuada a pós-fixação em solução de tetróxido de ósmio (OsO₄) a 1% durante duas horas. As amostras, então, foram novamente lavadas durante 15 minutos em tampão cacodilato de sódio 0,1M por duas vezes. O material passou por um banho de álcool etílico 10% durante 15 minutos, e foi contrastado em solução de acetato de uranila a 1%, dissolvido em álcool 10%, por 2 horas, no escuro. Seguiu-se a desidratação em série gradativa de álcool etílico (de 70 a 100%, com

duração de 15 minutos cada) e em acetona pura, com duração de 15 minutos. O material foi embebido em resina+acetona, na proporção de 1:1, por 24 horas e incluído em resina pura. Em seguida foi levado à estufa por 72 horas, a 60°C, para polimerização.

Os blocos foram seccionados em ultra micrótomo, e as secções de 80 nm colocadas em grades de cobre. Posteriormente foram contrastadas em solução de acetato de uranila, durante 45 minutos, lavadas em água e contrastadas em citrato de chumbo, por 15 minutos, sendo novamente lavadas em água e em solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0.02M (adaptado de REYNOLDS, 1963).

Após os procedimentos o material foi analisado e fotografado em Microscópio Eletrônico de Transmissão (MET) Philips CM 100 alocado no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Biologia, IB-UNESP, *campus* de Rio Claro-SP.

5.3. Exames Clínicos

Para a realização dos exames clínicos, o sangue dos animais foi coletado no momento de seu sacrifício. O mesmo foi devidamente armazenado em tubos heparinizados e posteriormente enviado para as análises laboratoriais dos seguintes parâmetros: quantificação de leucócitos e dos níveis de creatinina.

Os valores obtidos para estes parâmetros foram submetidos a análise estatística por meio da aplicação do teste ANOVA com pós teste de Tukey, sendo consideradas significantes as diferenças com $p < 0,05$.

O presente trabalho foi submetido à apreciação do Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA) do Instituto de Biociências da UNESP de Rio Claro, SP, tendo sido o protocolo de número 3537 devidamente aprovado.

6. Resultados

6.1. Avaliação Microscópica da Ação *in vivo* dos Extratos Sobre o Modelo Tumoral Técnica de Coloração pela Hematoxilina-Eosina

Grupo Controle 1

Para efeito de comparação dos resultados aqui obtidos, os indivíduos deste grupo, ou seja, aqueles que não foram inoculados com células tumorais (Fig. 1A, C) serviram de modelo para a descrição da organização histológica do músculo estriado

esquelético em condições normais, tomando-se também como base as descrições de Junqueira (2013).

Histologicamente este tipo de músculo é constituído por células alongadas, também denominadas de fibras musculares, as quais tem a característica de serem multinucleadas e ainda de terem seus núcleos localizados periféricamente e com morfologia achatada (Fig. 1C). No citoplasma destas células é possível observar estriações tanto no sentido longitudinal como no transversal, onde as primeiras correspondem à disposição das miofibrilas e as segundas à organização dos miofilamentos grossos e finos, formando os denominados sarcômeros, considerados as unidades contráteis da fibra muscular (Fig. 1C, F).

Ainda com relação à organização histológica desse tipo de músculo, observa-se que cada célula ou fibra muscular é circundada por tecido conjuntivo frouxo, o qual é denominado de endomísio. O conjunto destas células forma então o feixe muscular o qual está revestido externamente pelo perimísio, ou seja, uma camada de tecido conjuntivo constituído por elastina e colágeno, que agrupa as fibras musculares e, finalmente os feixes agrupados constituirão o músculo o qual, por sua vez, está revestido externamente pelo epimísio, uma camada de tecido conjuntivo que contém feixes entrelaçados de fibra colágena.

Essa mesma descrição histológica é encontrada nos músculos das pernas posteriores direitas dos indivíduos do grupo **Controle 1** aqui estudados, ou seja, aqueles animais não submetidos a inoculação com células tumorais, e que segue o mesmo padrão histológico, uma vez que são observadas fibras alongadas e multinucleadas, apresentando estriações tanto transversais como longitudinais (Fig. 1C). Entre as fibras musculares pode-se ainda observar a presença de tecido conjuntivo. Os núcleos aqui presentes também são fusiformes e estão dispostos na periferia das fibras (Fig. 1C).

Confirmando os resultados obtidos na histologia, pode-se observar na figura 1F a organização do músculo estriado esquelético no nível da microscopia eletrônica onde os sarcômeros ficam evidenciados, principalmente pela presença de estriações transversais (arranjo dos miofilamentos finos e grossos). Além disso, núcleos achatados e periféricos mostram a cromatina descondensada.

Grupo Controle 2

Os indivíduos desse grupo foram submetidos à inoculação de células da linhagem tumoral de Walker 256 + tampão fosfato de sódio, pH 7,4 (Fig. 1B). No tecido muscular da perna posterior observa-se uma grande invasão de células que histologicamente se caracterizam por apresentar hipertrofia, contornos irregulares, pleomorfismo (variação no tamanho e na forma) e por conter mais de um núcleo, os quais, por sua vez, apresentam formas irregulares e, especificamente a presença de cromatina condensada (Fig. 1D). Essas células tumorais preenchem praticamente todo o espaço antes ocupado pelo tecido conjuntivo interfibras musculares, deixando as mesmas indistinguíveis nas secções histológicas, caracterizando assim uma total desorganização desse tecido (Fig. 1D). No nível ultra estrutural é possível observar a morfologia dessas células tumorais, chamando-se a atenção principalmente para a relação núcleo/citoplasma das mesmas (Fig. 1G). Provavelmente o PBS injetado também tenha provocado alterações na matriz extracelular, edemaciando o tecido, como pode ser observado na figura 1D.

De forma geral, após a realização desses procedimentos observa-se que o tecido muscular apresenta total desorganização histológica, bem como mostra a presença de massas eosinofílicas, resultado da grande quantidade de células tumorais aí presentes, as quais já tiveram suas características morfológicas anteriormente descritas (Fig. 1D). Destaque-se ainda nesse grupo a observação histológica (confirmada pela microscopia eletrônica) de células tumorais com núcleos irregulares, fortemente corados e aqueles em processo de marginalização cromatínica (Fig. 1G). A microscopia eletrônica mostra também a presença de núcleos em processo de fragmentação, bem como corpos apoptóticos (Fig. 1G).

Grupo Controle 3

Os resultados obtidos dos indivíduos deste grupo de estudo, os quais foram submetidos apenas à inoculação com células da linhagem tumoral de Walker 256, mostram uma histologia intermediária entre aquelas observadas nos indivíduos dos grupos **Controle 1** e **2**, ou seja, existe uma grande invasão de células tumorais no tecido muscular, principalmente na matriz extracelular, o que vem provocar uma extensa desorganização do tecido (Fig. 1E). No entanto, embora essa desorganização seja

bastante evidente ainda é possível se observar a presença das fibras musculares, situação essa contrária àquela observada no grupo **Controle 2**.

Nas regiões intercelulares observa-se a presença de células com características pleomórficas, núcleos picnóticos e formato irregular (Fig. 1H). Nessas mesmas regiões no nível da microscopia eletrônica, observa-se nitidamente que as fibras colágenas além de se desarranjarem, parecem ainda terem sofrido fragmentação, descaracterizando dessa forma o aspecto típico da matriz intercelular observada no músculo estriado (Fig. 1H).

Além disso, já não é possível visualizar nas secções histológicas as típicas estriações transversais das fibras musculares, indicando que as mesmas também se desorganizam em função da invasão neoplásica (Fig. 1E).

Grupo Teste 1

Os indivíduos desse grupo, além da inoculação com células tumorais da linhagem de Walker 256 foram também submetidos à uma injeção do extrato **EGS2** na concentração de $0,04\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (Fig. 2). Os resultados mostram que as fibras embora ainda histologicamente desorganizadas apresentam certa integridade, uma vez que pode-se observar, ao contrário da situação anterior, que as mesmas encontram-se dispostas paralelamente entre si, com seus núcleos localizados periféricamente e, ainda com a presença das estriações transversais (Fig. 3A-D). No grupo anteriormente descrito, ou seja, **Controle 3**, além da desorganização histológica as próprias fibras musculares se desorganizam interiormente, fato comprovado pela ausência de estriações transversais, bem como, pela presença de núcleos picnóticos e, em alguns casos, núcleos em processo de fragmentação (Fig. 1E, H).

Um detalhe bastante observado nesse grupo de estudo é a presença de células que estão em processo de degranulação (Fig. 3C, D), muito provavelmente, devido à presença do elemento tóxico no músculo. Essa degranulação é bastante semelhante àquela que ocorre com os mastócitos nos processos de reação de hipersensibilidade imediata.

Observações realizadas no nível de microscopia eletrônica mostram que muito embora a frequência de invasão de células tumorais tenha sido reduzida isso não evitou que as fibras musculares fossem danificadas (Fig. 3E-H). Nesse sentido os danos estão

relacionados principalmente ao desalinhamento dos sarcômeros (Fig. 3E, F), alterando a morfofisiologia do tecido como um todo. Além das fibras, os núcleos também sofrem alterações tais como marginalização cromatínica e muito provavelmente início de fragmentação (Fig. 3F-H).

Grupo Teste 2

Nesta situação os indivíduos foram submetidos à inoculação de células tumorais, bem como a duas injeções do extrato **EGS2** também na concentração de 0,04µg/µL (Fig. 2). A histologia do músculo desses indivíduos mostra também uma aparente desorganização das fibras musculares, as quais podem ser observadas paralelas umas as outras, com núcleos periféricos, fusiformes e distintos (Fig. 4A-D). Porém, ao contrário da situação anterior, nesse caso a presença de estriações transversais é rara e pode-se observar que aquelas longitudinais, que caracterizam a disposição paralela das miofibrilas, apresentam severas alterações, uma vez que parecem estar separadas umas das outras por um espaço (não corado pela técnica aplicada) e, com consequente formação de estruturas semelhantes a vacúolos (Fig. 4C-D). Ainda com menor frequência do que nos indivíduos do grupo anteriormente descrito (Fig. 3A-D), verifica-se que existe menor intensidade de células em processo de degranulação localizadas por entre os espaços da matriz extracelular (Fig. 4D).

Nestes indivíduos pode-se também observar que as áreas invadidas pelas células neoplásicas são menos frequentes (Fig. 4A, C-D) do que àquelas observadas no **Grupo Teste 1**. Nestas áreas as massas eosinofílicas persistem e fica impossibilitada a observação dos limites celulares, ficando apenas evidentes os núcleos irregulares e em processo de fragmentação (Fig. 4C).

Muito embora haja redução da invasão neoplásica, a análise ultra estrutural mostra a ocorrência de severos danos nas fibras e na matriz intercelular. Esses danos podem ser traduzidos como: surgimento de extensas áreas de degradação citoplasmática (Fig. 4E), presença de fragmentos de sarcômeros resultantes do desalinhamento e fragmentação dos mesmos (Fig. 4F). Ainda em relação às alterações, as fibras apresentam a sua membrana totalmente desorganizada, bem como o citoplasma preenchido por vesículas de micropinocitose (Fig. 4G, H), ou seja, contendo porções do fluido extra celular que foram englobadas e trazidas para o meio intracelular. Além

disso, observa-se entre as vesículas material com aspecto granular e eletrondenso (Fig. 4E, H).

Grupo Teste 3

Neste grupo os indivíduos foram submetidos à inoculação de células tumorais e à uma injeção do extrato **EGS2** na concentração de 0,2µg/µL (Fig. 2). A histologia do tecido muscular desses indivíduos mostra que mesmo na presença do extrato existe uma grande invasão de células tumorais por entre as fibras musculares (Fig. 3I-K) confirmada também pelas análises ultraestruturais (Fig. 3L, M). No entanto, as mesmas ainda conseguem manter a disposição paralela entre si (Fig. 3I, J). As estriações transversais e longitudinais não podem ser observadas (Fig. 3J) e os núcleos das fibras musculares apresentam-se com a cromatina condensada (Fig. 3I, J). Além disso, em algumas regiões os mesmos parecem estar sofrendo fragmentação (Fig. 3K).

As células neoplásicas são observadas com maior frequência que nos **Grupos Teste** anteriormente descritos e ocorrem na região da matriz intercelular (Fig. 3L, M). Aqui também observa-se a formação de uma massa eosinofílica onde as células estão pleomórficas e com núcleos picnóticos, marginalização cromatínica e ainda em fragmentação (Fig. 3K). Ultraestruturalmente é possível observar a total desorganização da matriz intercelular, onde em meio às fibras colágenas fragmentadas (Fig. 3N) pode-se observar a presença de fragmentos nucleares muito eletrondensos (Fig. 3L, M).

Nesse grupo também pode-se observar a presença de grânulos distribuídos pela matriz intercelular, provavelmente resultado da degranulação de outras células (Fig. 3K).

Grupo Teste 4

Os indivíduos deste grupo foram inoculados com as células tumorais e submetidos a duas injeções do extrato **EGS2** na concentração de 0,2µg/µL (Fig. 2). Os resultados histológicos mostram de forma geral um tecido muscular completamente invadido pelas células tumorais (matriz intercelular) o que provoca uma desorganização das fibras (Fig. 4I, J), histologia esta semelhante àquela observada nos indivíduos que tiveram a inoculação de células tumorais mas não foram submetidos às injeções de extratos. As fibras musculares não apresentam o arranjo típico, ou seja, não são

observadas as estriações transversais (Fig. 4J), além do que a histologia sugere que as mesmas tem sua membrana (endomísio) também alterada, no sentido de que em algumas regiões pode-se notar um descolamento desta do citoplasma periférico (Fig. 4J) (resultado corroborado pela ultraestrutura) (Fig. 4M).

A histologia desses indivíduos também mostra que os núcleos os quais deveriam estar arranjados perifericamente agora parecem mudar sua localização em função da própria desorganização sofrida pelas fibras (Fig. 4J). Cabe ressaltar que muitos deles estão com picnose acentuada, porém alguns parecem estar com a cromatina dispersa (Fig. 4J). Observa-se que as áreas neoplásicas são mais frequentes (Fig. 4I-L) em comparação àquelas dos indivíduos do **Teste 3**. Nesta massa neoplásica também são observadas células com características de mastócitos, as quais estão sofrendo degranulação (Fig. 4K).

Na matriz intercelular também é possível observar a presença de estruturas que lembram pequenos filamentos (curtos e bastante eosinofílicos) distribuídos por entre as células tumorais, provavelmente fibras colágenas (Fig. 4L).

6.2. Análise Estatística dos Parâmetros Sanguíneos das Ratas

Os resultados referentes a análise clínica do sangue das ratas aqui estudadas mostram que com relação ao parâmetro nível de creatinina, há um aumento significativo ($1,15 \pm 0,07$) nas ratas submetidas a uma e a duas injeções do extrato na concentração de $0,04 \text{ ug/uL}$ quando comparadas àquelas submetidas a uma e duas injeções do extrato na concentração de $0,2 \text{ ug/uL}$ ($0,45$ e $0,55$ respectivamente $\pm 0,071$) com $p < 0,01$ (Tabela 1; Fig. 5).

Os resultados referentes a quantificação dos leucócitos mostram que em todas as ratas inoculadas com as células tumorais ($12699,5$; $7699,5$; $6299,5$; $21699,5$; $26599,5 \pm 0,7$) quando comparadas aquelas sadias ($5899,5 \pm 0,7$), observa-se aumento significativo do número total de leucócitos e, naquelas inoculadas e submetidas a uma ($21699,5 \pm 0,7$) e duas ($26599,5 \pm 0,7$) injeções de extrato na concentração de $0,2 \text{ ug/uL}$ há aumento significativo quando faz-se a comparação com aquelas que foram apenas inoculadas ($12699,5 \pm 0,7$) com $p < 0,01$ (Tabela 1; Fig. 6).

Tabela 1: Resultados dos parâmetros biológicos quantitativos: Nível de Creatinina e Quantidade de Leucócitos.

Parâmetros	Controle 1 (GC1)		Controle 2 (GC2)		EGS2	
	Sem tumor	Com tumor e submetido a uma injeção de PBS	1 injeção (GT1)	2 injeções (GT2)	1 injeção (GT3)	2 injeções (GT4)
Creatinina (mg/dL)	0,75 ±0,0707	0,95 ±0,0707	1,15 ±0,0707 ^(*,**,1)	1,15 ±0,0707 ^(*,1)	0,45 ±0,0707 ^(*,2)	0,55 ±0,0707 ^(**,1)
Leucócitos (n°/ µL)	5899,5 ±0,7071	12699,5 ±0,7071 ^(*,1)	7699,5 ±0,7071 ^(**,1)	6299,5 ±0,7071 ^(**,1)	21699,5 ±0,7071 ^(**,1)	26599,5 ±0,7071 ^(**,1)

valores fornecidos como média ± desvio padrão.

Controle 1- Sem tumor: grupo não submetido a inoculação de células tumorais de Walker 256.

Controle 2- Com tumor e submetido a uma injeção de PBS: grupo submetido a inoculação de células tumorais de Walker 256 e tratado com uma injeção de PBS.

(*)= significativamente diferente em relação ao **Controle 1- Sem tumor**.

(**)= significativamente diferente em relação ao **Controle 2- Com tumor e submetido a uma injeção de PBS**.

(1)= $p < 0,01$

(2)= $p < 0,05$

Figura 1

A. Fotografia mostrando pata posterior de rato não inoculado com células de tumor de Walker 256 (sadio).

C. Histologia da musculatura da perna posterior de rato saudável mostrando as fibras musculares (**mf**) com núcleos (**n**) localizados periféricamente. Coloração HE.

F. Micrografia eletrônica de fibras musculares da perna posterior de ratos sadios mostrando a organização dos sarcômeros (**sar**) os quais estão interpostos por mitocôndrias (**m**).

B. Fotografia mostrando pata posterior de rato inoculado com células de tumor de Walker 256 (**Wtc**).

D. e E. Histologia da musculatura de pernas posteriores de ratos inoculados com células tumorais (**Wtc**). Em **D** foram inoculadas células de tumor de Walker 256 (**Wtc**) + PBS (**C2**). Verifica-se que as fibras musculares não são visualizadas com facilidade devido ao edema instalado no tecido. Em **E** (**C3**) ainda é possível observar-se as fibras musculares (**mf**) em meio ao tumor instalado. **D. e E.** Coloração HE.

G. Detalhe ultraestrutural de células tumorais invadindo o tecido muscular onde são observados núcleos (**n**) com cromatina marginalizada (**ch**), além da presença de corpos apoptóticos (**ab**) espalhados pelo tecido muscular.

E. Histologia da musculatura de pernas de ratos inoculadas com células tumorais (**Wtc**) onde ainda é possível observar-se a presença de fibras musculares (**mf**).

H. Micrografia eletrônica mostrando a presença de fibras colágenas (**cf**) desorganizadas na matriz do tecido muscular inoculado. Detalhe de núcleo (**n**) de uma célula tumoral com regiões onde há condensação da cromatina.

Barra: C, D= 25 μm ; E= 100 μm ; F= 0,5 μm ; G, H= 2,5 μm

Figura 2

A.C.D. Esquemas ilustrativos mostrando: **A.** Localização da glândula salivar (**sg**) no carrapato. **C e D.** Injeção dos extratos de dois dias (**SGE2**) nas concentrações 0,04 e 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

B. Montagem total da glândula salivar (**sg**) corada pela técnica de fosfatase ácida, onde pode ser observada a organização em ácinos arredondados.

Figura 3

A-D e I-K. Histologia da musculatura de ratos inoculados e tratados com extratos de glândulas salivares onde: **A-D.** secções de músculo inoculado com células tumorais (**Wtc**) e tratado com uma injeção extrato na concentração de 0,04 µg/µL (**T1**). Podem ser observadas as fibras musculares (**mf**) com seus núcleos. **dt**= granulação espalhada pela matriz do tecido muscular. **ts**= presença de estriações transversais. **I-J.** Secções de músculo inoculado com células tumorais (**Wtc**) e tratado com uma injeção de extrato na concentração de 0,2 µg/µL (**T3**). **mf**= fibra muscular, **n**=núcleo, **Wtc**= células de tumor de Walker, **dt**= degranulação celular na matriz do tecido muscular, **fn**= núcleos fragmentados. Coloração HE.

E-H e L-N. Ultraestrutura mostrando detalhes da histologia onde: **E-H** secções de músculo inoculado com células tumorais (**Wtc**) e tratado com uma injeção extrato na concentração de 0,04 µg/µL (**T1**) **n**= núcleo, **mis**= restos de sarcômeros espalhados pela matriz intercelular, **mf**= fibra muscular, **seta**= núcleo da fibra muscular com cromatina marginalizada, **círculo pontilhado** em **H** mostrando núcleo em processo de fragmentação. **L-N.** Secções de músculo inoculado com células tumorais (**Wtc**) e tratado com uma injeção extrato na concentração de 0,2 µg/µL (**T3**), **fn**= núcleos fragmentados, **círculo pontilhado** em **N** mostrando presença de fibras colágenas desarranjadas na matriz do tecido muscular.

Barra: A= 50 µm; B, J= 25 µm; C, D, K= 10 µm; E= 5 µm; F, G= 2,5 µm; H, L, M, N= 1 µm; I= 100 µm

Figura 4.

A-D e I-L. Histologia da musculatura de ratos inoculados (**Wtc**) e tratados com extratos de glândulas salivares onde: **A-D.** secções de músculo inoculado com células tumorais (**Wtc**) e tratado com duas injeções do extrato na concentração de 0,04 µg/µL (**T2**). Podem ser observadas as fibras musculares (**mf**) com seus núcleos (**n**). **dt**= granulação espalhada pela matriz do tecido muscular. **mfd**= miofilamentos desorganizados nas fibras musculares, **dt**= degranulação celular na matriz do tecido muscular. **I-L.** Secções de músculo inoculado com células tumorais (**Wtc**) e tratado com duas injeções do extrato na concentração de 0,2 µg/µL (**T4**). **mf**= fibra muscular, **n**=núcleo, **tc**= células tumorais, **dt**= célula em processo de degranulação na matriz do tecido muscular, **cf**= fibras colágenas desorganizadas na matriz do tecido muscular, **cl**= limite celular. Coloração HE.

E-H e M. Ultraestrutura mostrando detalhes da histologia onde: **E-H.** secções de músculo inoculado com células tumorais (**Wtc**) e tratado com duas injeções extrato na concentração de 0,04 µg/µL (**T2**). Em **E** no **círculo pontilhado** observar a presença de grande região vacuolizada no citoplasma da fibra muscular. Em **F (mis)** observar a presença de restos de sarcômeros, resultantes da desorganização do tecido muscular. **Círculos pontilhados** em **G e H** observar a presença de grande quantidade de microvesículas de pinocitose (**mpv**), **pm**= membrana plasmática. Em **M** secção de músculo inoculado com células tumorais (**Wtc**) e tratado com duas injeções do extrato na concentração de 0,2 µg/µL (**T4**), observar a desorganização da membrana plasmática mostrando regiões rompidas (**seta pm**).

Barra: A, I= 100 µm; B, J= 25 µm; C, D, K, L= 10 µm; E, H, M= 0,5 µm; F= 250 nm; G= 2,5 µm

Figura 5. Gráfico mostrando a variação média nos níveis de creatinina dos indivíduos dos diferentes grupos de estudo.

Figura 6. Gráfico mostrando a variação média na quantidade de leucócitos nos indivíduos dos diferentes grupos de estudo.

7. Discussão

A busca por substâncias que tenham ação inibidora sobre o desenvolvimento das células tumorais em geral, tem sido uma constante, visto terem essas células características morfofisiológicas que as tornam especiais e de difícil controle. Por outro lado, some-se a isso a escassez de informações disponíveis na literatura com relação às inúmeras diferenças encontradas nas secreções salivares produzidas pelos diversos gêneros e espécies de carrapatos. Reforçando essas informações o estudo *in vitro* anteriormente desenvolvido por Furquim et al. (informação pessoal) utilizando como modelo linhagens tumorais DH82 e HL-60 demonstrou que extratos glandulares de fêmeas de *R. sanguineus* comprometeram tanto a viabilidade das células tumorais por meio da indução da apoptose, quanto a proliferação das mesmas, reduzindo essa taxa. Assim estes dados foram fatores determinantes e estimuladores para o desenvolvimento deste trabalho o qual teve como principal foco demonstrar o potencial de ação do extrato de glândulas salivares de fêmeas de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* alimentadas por dois dias em coelhos hospedeiros sobre tumor de Walker 256, inoculado *in vivo* nas pernas posteriores direitas de ratas Wistar.

Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que a invasão das células tumorais via inoculação foi bastante agressiva e em questão de dois dias, devido à alta taxa de proliferação das mesmas, ocuparam praticamente todo o espaço intercelular ou interfibrilar (as células musculares são também denominadas de fibras musculares uma vez que são muito mais longas do que largas) da musculatura alvo. Essa ocupação provocou no músculo grandes alterações morfológicas tais como a desorganização tanto do tecido quanto das próprias fibras musculares, o que certamente trouxe prejuízos para a fisiologia deste músculo. Ficou evidente que as próprias fibras musculares perderam sua característica morfológica típica, ou seja, a sequencia repetida de bandas uniformes ao longo do comprimento das células (GARTNER et al, 2014), o que dá origem as estriações tanto transversal (arranjo dos sarcômeros) quanto longitudinal (disposição dos filamentos contráteis), já exaustivamente descritas na literatura (JUNQUEIRA et al, 2013).

A invasão das células tumorais no tecido muscular promoveu o surgimento de massas eosinofílicas, as quais empurraram e deslocaram as fibras musculares do seu local de origem. Como os movimentos de contração e de relaxamento dos músculos

devem ser sincronizados e uma vez que o tecido muscular assim funciona, essa desorganização certamente impossibilitará a dinâmica da fisiologia muscular de ocorrer com precisão.

Os ensaios realizados neste trabalho produziram respostas diferentes segundo as concentrações dos extratos utilizados que foram: 0,2 e 0,04 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e ainda, segundo o número de injeções (uma ou duas) aplicadas nos animais modelo. Os resultados obtidos mostraram que aqueles animais submetidos a apenas uma injeção do extrato na concentração de 0,04 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ tiveram a taxa de invasão de células tumorais reduzida, visto que os espaços interfibrilares abrigaram massas eosinofílicas menores e com rara frequência, além da presença de células de defesa (leucócitos de forma geral), e de mastócitos em atividade (degranulando). A presença de mastócitos em atividade em tecidos invadidos por células tumorais, segundo Jonas et al (2000) e Junqueira et al (2013) poderia ser indicativo de que esse processo quando em exsudatos inflamatórios mediará as respostas celulares e vasculares do tecido e nos diferentes microambientes teriam efeitos tanto promotor quanto inibidor nos tumores (OLIVEIRA-NETO et al, 2007). Além disso, os mastócitos, segundo outros autores estariam intimamente associados à progressão tumoral via promoção de angiogênese (ELPEK, 2001).

De forma geral o resultado obtido com essa concentração de extrato foi muito semelhante aquele encontrado no grupo controle 1 (ratas sadias). Por outro lado, aqueles animais que foram submetidos a duas injeções do extrato nesta mesma concentração apresentaram além de maior presença de células tumorais também clara desorganização das fibras musculares (que puderam ser observadas já no nível de microscopia de luz) representadas por: a) ausência ou pouca presença de estriações transversais, significando que os sarcômeros se desalinham e b) presença de espaços intermiofibrilares, o que certamente comprometeu a fisiologia do tecido muscular.

Em relação aos resultados obtidos para a concentração de 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (independente do número de injeções do extrato) verificou-se que em ambas as situações houve grandes alterações morfofisiológicas no tecido muscular, uma vez que observou-se: a) intensa invasão de células tumorais na matriz intercelular, b) extensa desorganização das fibras musculares. Ressalte-se que embora nos dois ensaios tenham sido detectados prejuízos ao tecido, naquele onde os animais foram submetidos a duas

injeções do extrato, as áreas de invasão de células tumorais foram muito maiores, mostrando que o extrato não foi capaz de conte-las.

Dessa forma, os resultados aqui obtidos sinalizaram que, embora tenham sido detectados “danos colaterais”, a injeção de diferentes concentrações de extratos de glândulas salivares de fêmeas de carrapatos *R. sanguineus* alimentadas por dois dias em coelhos hospedeiros, promoveu a redução da invasão de células da linhagem Walker 256 em bioensaios realizados na musculatura de ratas Wistar *in vivo*, representando uma possível estratégia para controlar o crescimento desordenado de células tumorais.

Ficou claro que a injeção única da menor concentração do extrato foi mais efetiva na contenção da invasão tumoral, bem como causou menores “danos colaterais” ao tecido muscular, objeto deste estudo.

Paralelamente aos bioensaios morfohistológicos, no presente trabalho também foram clinicamente avaliados os parâmetros sanguíneos dos animais: nível de creatinina e quantificação dos leucócitos. O primeiro foi realizado uma vez que existe uma relação direta entre o nível de creatina quinase (enzima responsável pela degradação da creatinina) e as lesões musculares (Jonas et al., 2000; Kopp et al., 2004; Neto et al., 2008; Horjus et al., 2011) e o segundo pelo envolvimento dos mesmos na inibição das células tumorais (comportamento de defesa).

Os resultados obtidos revelaram que em relação ao parâmetro creatinina, seu nível encontra-se aumentado nas ratas submetidas a uma e a duas injeções do extrato na concentração de 0,04µg/µL quando comparadas com as ratas submetidas a uma e duas injeções do extrato na concentração de 0,2µg/µL, sugerindo que nos primeiros a injeção do extrato contribuiu para a manutenção da integridade do tecido muscular. Nessa direção essa hipótese encontra suporte no fato de que não existe diferença estatística significativa no parâmetro em questão ao se comparar os resultados das ratas submetidas as injeções de 0,04µg/µL aos daquelas apenas inoculadas com as células tumorais, demonstrando que o extrato não afetou a morfologia muscular.

Quanto ao parâmetro aumento/diminuição do número de leucócitos, os resultados obtidos mostraram que: a) em todas as ratas inoculadas com células tumorais houve aumento significativo do número total de leucócitos, uma vez que as células tumorais agiram como antígeno estimulando a resposta de defesa. Naquelas inoculadas e submetidas as injeções (uma e duas) de extrato na concentração de 0,2µg/µL houve

aumento significativo de leucócito quando comparou-se com aquelas apenas inoculadas e não expostas ao extrato, resultado este que pode ser explicado pelo fato de que além das células tumorais o próprio extrato nesta concentração agiu como potencializador da resposta de defesa. Ao contrário, aquelas ratas inoculadas e submetidas às injeções (uma e duas) de extrato na concentração de $0,04\mu\text{g}/\mu\text{L}$ apresentaram redução significativa no número total de leucócitos quando comparadas as ratas apenas inoculadas e as inoculadas e injetadas com extrato na concentração de $0,2\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Esses resultados reforçaram que o extrato na concentração de $0,04\mu\text{g}/\mu\text{L}$ além de agir com maior efetividade na inibição das células tumorais, não atuou como agente estressor, visto o número de leucócitos ter sido menor.

Desta forma, os dados obtidos no presente trabalho por meio da realização de ensaios *in vivo*, fazendo uso de células do tumor de Walker 256 e exposição das mesmas a diferentes concentrações de extratos obtidos de glândulas salivares de fêmeas de *R. sanguineus* com dois dias de alimentação, sinalizaram que moléculas produzidas pelas glândulas salivares desta espécie de carrapatos teriam capacidade de inibir o crescimento tumoral, além de minimizar os danos colaterais ao organismo. Ressalte-se aqui que estudos realizados em modelos *in vivo*, ao contrário daqueles realizados *in vitro* apresentam a variável resposta fisiológica do organismo quando submetido a exposição a agentes estressores (no caso células tumorais e extrato de glândula salivar) e, ainda que a saliva dos carrapatos em geral é considerada um reservatório de bioativos moduladores do sistema imune-inflamatório.

Considerações Finais

5. Considerações Finais

- Os extratos glandulares mostraram potencial em comprometer a viabilidade das células DH82 e HL-60, induzindo o processo de apoptose e reduzindo a proliferação das mesmas, eventos que variaram em função: a) do extrato (**EGS2**), b) das concentrações e c) do modelo tumoral utilizados.

- O potencial antitumoral do extrato **EGS2** obtido a partir de glândulas salivares de fêmeas de *R. sanguineus* com 2 dias de alimentação: **1)** afetou negativamente tanto a viabilidade quanto a proliferação das células tumorais e na concentração de 0,2µg/mL induziu a ocorrência de apoptose nas células DH82. Na concentração de 0,5µg/mL inibiu a proliferação destas; estas duas concentrações estão envolvidas na indução da apoptose nas células HL-60, tendo sido a de 0,5µg/mL a mais potente. **2)** induziu as células DH82 a entrarem em apoptose mais precocemente do que as HL-60.

- O extrato glandular **EGS2** é um forte candidato na inibição das células das linhagens tumorais DH82 e HL-60.

- O extrato glandular **EGS2** tem capacidade de inibir o crescimento tumoral, além de minimizar os “danos colaterais” ao organismo. Ressalte-se aqui que em estudos *in vivo*, existe variável resposta fisiológica do organismo quando submetido a exposição a agentes estressores (no caso células tumorais e extrato de glândula salivar).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

6. Referências Bibliográficas Gerais

AFFOLTER, V. K.; MOORE, P. F. Canine cutaneous and systemic histiocytosis: Reactive histiocytosis of dermal dendritic cells. **The American Journal of Dermatopathology**, v. 22, p. 40-48, 2000.

AKAGI, E. M. ET AL. Pro-apoptotic effects of Amblyomin-X in murine renal cell carcinoma “in vitro”. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 66, p. 64-69, 2012.

ARMANI, A. L. C. Atlas de patologia geral. Universidade Estadual de Londrina, 2007.

ALLEN, R. T. ET AL. Morphological and biochemical characterization and analysis of apoptosis. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 37, p. 215-228, 1997.

AUSPRUNK, D. H.; FOLKMAN, J. Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. **Microvascular Research**, v. 14, p. 53-65, 1977.

AVVISATI, G. ET AL. Acquire α -2-antiplasmin deficiency in acute promyelocytic leukemia. **British Journal of Haematology**, v. 70, p. 43-48, 1988.

BALASHOV, YU. S. Bloodsucking ticks (Ixodoidea)- vectors of diseases of man and animals. **Miscellaneous Publications of the Entomological Society of America**, Lanham, v.8, p. 161-376, 1972.

BARNES, A. ET AL. Immunological and inflammatory characterization of three canine cell lines: K1, K6 and DH82. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 75, p. 9-25, 2000.

BASU, S.; SRIVASTAVA, P. K. Calreticulin, a peptide-binding chaperone of the endoplasmic reticulum, elicits tumor- and peptide-specific immunity. **Journal of Experimental Medicine**, v. 189, p. 797-802, 1999.

BATISTA, F. C. ET AL. Expressed sequence tags (ESTs) from the salivary glands of the tick *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). **Toxicon**, v. 51, p. 823-834, 2008.

BATISTA, F. C. ET AL. A new factor Xa inhibitor from *Amblyomma cajennense* with a unique domain composition. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 493, p. 151-156, 2010

BAUER, K. A.; ROSENBERG, R. D. Thrombin generation in acute promyelocytic leukemia. **Blood**, v. 64, p. 791-796, 1984.

BECHARA, G. H. ET AL. *Rhipicephalus sanguineus* tick in Brazil: feeding and reproductive aspects under laboratorial conditions. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 4, p. 61-66, 1995.

BENNETT, B. ET AL. The bleeding disorder in acute promyelocytic leukemia: Fibrinolysis due to u-PA rather than defibrination. **British Journal of Haematology**, v. 71, p. 511-517, 1989.

BERMAN, E. ET AL. Prognostic analysis of patients with acute promyelocytic leukemia (APL). **Blood**, v. 78 (suplemento 43a), abstract, 1991.

BONFOCO, E. ET AL. Cytoskeletal breakdown and apoptosis elicited by NO donors in cerebellar granule cells require NMDA receptor activation. **Journal of Neurochemistry**. v. 67, p. 2484-2493, 1996.

BRIGATTE, P.; KONNO, K.; GUTIERREZ, V. P.; SAMPAIO, S. C.; ZAMBELLI, V. O.; CURI, R.; CURY, Y. Walker 256 tumor-bearing rats as a model to study cancer pain. **J Pain**, v. 8, p. 412-21, 2007.

BRIGATTE, P.; SAMPAIO, S. C.; GUTIERREZ, V. P.; GUERRA, J. L.; SINHORINI, I. L.; CURI, R.; CURY, Y. Peripheral kappa and delta opioid receptors are involved in the antinociceptive effect of crotalphine in a rat model of cancer pain. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 8, p. 1-7, 2013.

BRITTO, F. B.; CAETANO, F. H. Morphological features and occurrence of degenerative characteristics in the hypopharyngeal glands of the paper wasp *Polistes versicolor* (Olivier) (Hymenoptera: Vespidae). **Micron**, v. 37, p. 742-747, 2006.

BROSSARD, M.; WIKEL, S.K. Immunology of interactions between ticks and hosts. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 11, p. 270-276, 1997

BROSSARD, M.; WIKEL, S. K. Tick immunobiology. **Parasitology**, v. 129, p. S161-S176, 2004.

BROWER, M. S.; HARPEL, P. C. Proteolytic cleavage and inactivation of α -2-plasmin inhibitor and C1 inactivator by human polymorphonuclear leukocyte elastase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 257, p. 9849-9854, 1982.

CAMARGO-MATIAS, M.I., FURQUIM, K.C.S. The Histology as a Tool for the Understanding of the Morphophysiology of the Brown Dog Tick (*Rhipicephalus sanguineus*). In: JENKINS, O.P. (ed.). **Advances in Zoology Research**, New York, v. 5. Nova Science Publishers, Inc, p. 167-191, 2013.

CAMARGO-MATHIAS, M. I. ET AL. Immunomodulatory effects of tick saliva. **Invertebrate Survival Journal**, v. 8, p. 231-240, 2011.

CAVASSANI, K. A. ET AL. Tick saliva inhibits differentiation, maturation and function of murine bone-marrow-derived dendritic cells. **Immunology**, v. 114, p. 235-245, 2005.

CHENG, W. F. ET AL. Tumor-specific immunity and antiangiogenesis generated by a DNA vaccine encoding calreticulin linked to a tumor antigen. **Journal of Clinical Investigation**, v. 108, p. 669-78, 2001.

CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M. ET AL. A new tick Kunitz type inhibitor, Amblyomin-X, induces tumor cell death by modulating genes related to the cell cycle and targeting the ubiquitin-proteasome system. **Toxicon**, v. 56, p. 1145-1154, 2010.

CLIFFORD, C.A., SKORUPSKI, K.A. Histiocytic diseases. In: WITHROW, S.T., VAIL, D.M. (eds.). **Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology**, 4th. Ed. Sant Louis: Sanders and Elsevier, 2007, p. 814-823.

COLLINS, S. ET AL. Continuous growth and differentiation of human myeloid leukemic cells in suspension culture. **Nature**, v. 270, p. 347-349, 1977.

COLLINS, S. The HL-60 promyelocytic leukemia cell line: proliferation, differentiation, and cellular oncogene expression. **Blood**, v. 70, p. 1233-1244, 1987.

CORDONNIER, C. ET AL. Acute promyelocytic leukemia in 57 previously untreated patients. **Cancer**, v. 55, p. 18-25, 1985.

COSTA, R. A. C.; CRUZ-LANDIM, C. Distribution of acid phosphatases in the hypopharyngeal glands from workers, queens and males of a Brazilian stingless bee *Scaptotrigona postica* Latreille: An ultrastructural cytochemical study. **Histochemical Journal**, v. 33, p. 653-662, 2001

CUNNINGHAM, I. ET AL. Acute promyelocytic leukemia: Treatment results during a decade at Memorial Hospital . **Blood**, v. 73, p. 1116-1122, 1989.

DESOUZA, M. ET AL. The actin cytoskeleton as a sensor and mediator of apoptosis. **Bioarchitecture**, v. 1, p. 75-87, 2012.

DIVINO, J. N. ET AL. Endothelin-1 production by the canine macrophage cell line DH82: Enhanced production in response to microbial challenge. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 136, p. 127-132, 2010.

DREWES, C. C. ET AL. Actions of the Kunitz-type serine protease inhibitor Amblyomin-X on VEGF-A-induced angiogenesis. **Toxicon**, v. 60, p. 333-340, 2012.

DUNN , T . B. Morphology and histogenesis of mammary tumors . **A . A . S . Publication**, v. 22 , p. 13 - 38 ,1945.

EARLE, W. R. A study of the Walker rat mammary carcinoma 256, in vivo and in vitro. **Am. J. Cancer**, n.24 p.566-612. 1935.

ELMORE, S. Apoptosis: A review of programmed cell death. **Toxicology Pathology**, v. 35, p. 495-516, 2007.

ELPEK, G.Ö.; GELEN T.; AKSOY, N.H.; ERDOGAN, A.; DERTSIZ, L.; DEMIRCAN, A.; ET AL. The prognostic relevance of angiogenesis and mast cells in squamous cell carcinoma of the oesophagus. **J Clin Pathol**, v. 54, p. 940-944, 2001.

ENNS, A. ET AL. Integrins can directly mediate metastatic tumor cell adhesion within the liver sinusoids. **Journal of Gastrointestinal Surgery**, v. 8, p. 1049-1060, 2004.

FELDMAN-MUHSAM, B. S.; SALITERNIK-GIVANT, S. Salivary secretion of the male tick during copulation. **Journal of Insect Physiology**, v. 16, p. 1945-1949, 1970.

FELIX, F. H. C. MODELO DE IMPLANTE DE TUMOR DE WALKER NO CÉREBRO DE RATOS. 2001. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Ceará.

FOLKMAN, J. Tumor angiogenesis. **Advances in Cancer Research**, v. 43, p. 175-203, 1985.

FISHER, E.R.; FISHER, B. LOCAL FACTORS AFFECTING TUMOR GROWTH. I. EFFECT OF TISSUE HOMOGENATES. **CANCER RES.** V. 23, P. 1651-1657, 1964.

FONG, G. H. Mechanisms of adaptative angiogenesis to tissue hypoxia. **Angiogenesis**, v. 11, p. 121-140, 2008.

FONSECA, E. A. I. et al. Study of morphological alterations of the adrenal glands in the neoplastic cachexia. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde (Londrina)**, v. 30, n. 2, p. 163-174, 2009.

FRANCIS, R. B. JR.; SEYFERT, U. Tissue plasminogen activator antigen and activity in disseminated intravascular coagulation: clinicopathologic correlation. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 110, p. 541-547, 1987.

FRANCISCHETTI, I. M. ET AL. Ixolaris, a novel recombinant tissue factor pathway inhibitor (TFPI) from the salivary gland of the tick *Ixodes scapularis* identification of factor X and factors Xa as scaffolds for the inhibition of factor VIIa/ tissue factor complex. **Blood**, v. 99, p. 3602-3612, 2002.

FRANCISCHETTI, I. M. ET AL. Penthalaris a novel recombinant five-Kunitz tissue factor pathway inhibitor (TFPI) from the salivary gland of the tick vector of Lyme disease, *Ixodes scapularis*. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 91, p. 886-898, 2004.

FRANCISCHETTI, I. M. ET AL. The role of saliva in tick feeding. **Frontiers in Bioscience**, v. 14, p. 2051-2088, 2010.

FURQUIM, K. C. S. **Estudo das glândulas salivares de fêmeas e de machos de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari, Ixodidae): caracterização do ciclo secretor com ênfase no processo de degeneração.** 2007. 237 f. Tese de Doutorado, Instituto de Biociências, UNESP, Rio Claro, 2007.

FURQUIM, K. C. S. ET AL. Degeneration of salivary glands of males of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari, Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 154, p. 325-335, 2008a.

FURQUIM, K. C. S. ET AL. Markers of cell death in salivary glands of males of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari, Ixodidae). **Parasitology International**, v. 57, p. 396-404, 2008b.

FURQUIM, K. C. S. ET AL. Morpho-histochemical characterization of salivary gland cells of males of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) at different feeding stages: description of new cell types. **Experimental and Applied Acarology**, 50: 59-70, 2010.

FURQUIM, K. C. S. ET AL. Ticks' response to feeding on host immunized with glandular extracts of *Rhipicephalus sanguineus* females fed for 2, 4, and 6 days. I. Inactivity or early degeneration of salivary glands? **Parasitology Research**, 109: 147-162, 2011.

FURQUIM, K. C. S.; CAMARGO-MATHIAS, M. I.; HEBLING, L. M. G. F.; ROMA, G. C.; BECHARA, G. H. Alterations in the secretory behavior of salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus* females (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) feeding in resistant rabbit. **Air & Water Borne Diseases**, v. 2, p. 114, 2014 (doi: 10.4172/2167-7719.1000114).

GALLAGHER, R. ET AL. Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia. **Blood**, v. 54, p. 713-733, 1979.

GANEM, G. ET AL. Prognostic factors in acute promyelocytic leukemia (APL): A retrospective study of 101 patients treated by daunorubicin containing remission induction regimen. **Blood**, v. 63 (suplemento 171a), abstract, 1983.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Atlas Colorido de Histologia**. 6. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014, p. 512.

GASTL, G. ET AL. Angiogenesis as a target for tumor treatment. **Oncology**, v. 54, p. 177-184, 1997.

GOUAULT-HEILMAN, M. ET AL. The procoagulant factor of leukemic promyelocytes: Demonstration of immunologic cross reactivity with human brain tissue factor. **British Journal of Haematology**, v. 30, p. 151-158, 1975.

GRALNICK, H. R.; SULTAN, C. Acute promyelocytic leukemia: Hemorrhagic manifestation and morphologic criteria. **British Journal of Haematology**, v. 29, p. 373-376, 1975.

GUENAL, I. ET AL. Down-regulation of actin genes precedes microfilament network disruption and actin cleavage during p53-mediated apoptosis. **Journal of Cell Science**, v. 110, p. 489-495, 1997.

HAJNICKÁ, V. ET AL. Ixodid tick salivary gland products target host wound healing growth factors. **International Journal for Parasitology**, v. 41, p. 213-223, 2011.

HAY, R.; CAPUTO, J.; CHEN, T.R.; et al. **ATCC Cell Lines and Hybridomas**. 8 ed. USA: American Type Culture Collection, 1994.

HEAD, D. R. ET AL. Survival with cytotoxic therapy in acute promyelocytic leukemia: A SWOG report. **Blood**, v. 78 (suplemento 268a), abstract, 1991.

HILLESTAD, L. K. Acute promyelocytic leukemia. **Acta Medica Scandinavica**, v. 159, p. 189-194, 1957.

HORJUS, D. L. ET AL. Creatine and creatine analogues in hypertension and cardiovascular disease. **Cochrane Database Syst Rev**, v. 9, 2011.

HUSSEIN, M. A.; BOWEN, I. D.; LEWIS, G. H. The histochemical localization of ATPase, cholinesterase and acid phosphatase activity in *Culex pipiens* (Diptera, Culicidae) larvae using a methacrylate embedding technique. **Cell Biology International Reports**, v. 14, p. 775-781, 1990.

INÁCIO, C. M. Action of tacrolimus on Wistar rat kidneys implanted with Walker 256 carcinosarcoma. **Acta Cirúrgica Brasileira** - Vol. 25 (1) 2010

JAWORSKI, D. C. ET AL. A secreted calreticulin protein in ixodid tick (*Amblyomma americanum*) saliva. **Journal of Insect Physiology**, v. 41, p. 369-375, 1995.

JENSEN, G.; Muntzing, J., Differences in the growth of the Walker carcinoma in Sprague-Dawley and Wistar rats. **Z. Krebsforsch**, 74, 55-8, 1970.

JONES, M. E.; SALEEM, A. Acute promyelocytic leukemia: A review of literature. **American Journal of Medicine**, v. 65, p. 673-677, 1978.

JONAS, F. ET AL. Adenovirus-mediated overexpression of p15INK4B inhibits human glioma cell growth, induces replicative senescence, and inhibits telomerase activity similarly to p16INK4A. **Cell growth & differentiation: the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research**, v. 11, n. 7, p. 373-384, 2000.

JUNQUEIRA, L. C. U.; JUNQUEIRA, L. M. M. S. **Técnicas básicas de citologia e histologia**. São Paulo: Editora Santos, 1983. 123 p.

JUNQUEIRA, L. C. U. & CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 12. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. 556p.

KANTARJIAN, H. M. ET AL. A characteristic pattern of leukemic cell differentiation without cytoreduction during remission induction in acute promyelocytic leukemia. **Journal of Clinical Oncology**, v. 3, p. 793-798, 1985.

KANTARJIAN, H. M. ET AL. Acute promyelocytic leukemia: M.D. Anderson Hospital experience. **American Journal of Medicine**, v. 80, p. 789-797, 1986.

KAZIMÍROVÁ, M. ET AL. Anti-proliferative activity and apoptotic effect of tick salivary gland extracts on human HeLa cells. **Neuroendocrinology Letters**, v. 27 (suplemento 2), p. 48-52, 2006.

KAZIMÍROVÁ, M. Bioactive compounds in ticks acting on host thrombohemostasis. In: Wiwanitkit, **Thrombohemostatic Disease Research**. V ed. New York: Nova Science Publishers, Inc., 2007, p. 95-113.

KERBEL, R.; FOLKMAN, J. Clinical translation of angiogenesis inhibitors. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, p. 727-739, 2002.

KNIES-BAMFORTH, U. E. ET AL. C-myc interacts with hypoxia to induce angiogenesis *in vivo* by a vascular endothelial growth factor-dependent mechanism. **Cancer Research**, v. 64, p. 6563-6570, 2004.

KORICHNEVA, I.; HÄMMERLING, U. F-actin as a functional target for retro-retinoids: A potential role in anhydroretinol-triggered cell death. **Journal of Cell Science**, v. 112, p. 2521-2528, 1999.

KOPP, J. ET AL. Correlation between serum creatinine kinase levels and extent of muscle damage in electrical burns. **Burns**, v. 30, n. 7, p. 680-683, 2004.

KUBOTA, T. ET AL. Tissue factor released from leukemic cells. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 65, p. 59-63, 1991.

KULMS, D. ET AL. Apoptosis induced by disruption of the actin cytoskeleton is mediated via activation of CD95 (Fas/APO-1). **Cell Death and Differentiation**, v. 9, p. 598-608, 2002.

LEVEE, M. G. ET AL. Actin polymerization and depolymerization during apoptosis in HL-60 cells. **American Journal of Physiology**, v. 271, p. 1981-1992, 1996.

LIKELY, G. D. ; SANFORD, K. K. ; EARLE, W. R. Further studies on de proliferation in vitro of single is olated tissue cells . **J. Nat. Cancer Inst.** , v. 13 , p. 177 - 184 , 1952.

LUO, B. ET AL. Highly parallel identification of essential genes in cancer cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, p. 20380-20385, 2008.

MACEDO-RIBEIRO, S. ET AL. Isolation, Cloning and Structural Characterisation of Boophilin, a Multifunctional Kunitz-Type Proteinase Inhibitor from the Cattle Tick. **PLoS ONE**, v. 3, p. e1624, 2008.

MAO-YING, Q. L. Robust spinal neuroinflammation mediates mechanical allodynia in Walker 256 induced bone cancer rats. *Molec. Brain*. 5-16, 2012.

MARTY, M. ET AL. Leucémie aigue promyélocytaire: Etude retrospective de 119 malades traités par Daunorubicine. **Nouvelle Revue Française D'hematologie**, v. 26, p. 371-378, 1984.

MASHIMA, T. ET AL. Caspase-mediated cleavage of cytoskeletal actin plays a positive role in the process of morphological apoptosis. **Oncogene**, v. 18, p. 2423-2430, 1999.

MAYER, R. J. ET AL. Intensive postremission therapy in adults with acute nonlymphocytic leukemia using various dose schedules of ara-C: A progress report from the CALGB: **Cancer and Leukemia Group B. Seminars in Oncology**, v. 14 (suplemento 1), p. 25-31, 1987.

MEJRI, N.; BROSSARD, M. Splenic dendritic cells pulsed with Ixodes ricinus tick saliva prime naive CD⁺T to induce T_H2 cell differentiation *in vitro* and *in vivo*. **International Immunology**, v. 19, p. 535-543, 2007.

McCOY, T. A. & NEUMAN, R. E. The cultivation of Walker carcinoma 256 in vitro from cell suspensions. **J. Nat. Cancer Inst.**, v.16, p. 1221 - 1229, 1956.

MIDER, G. B.; TESLUK, H.; MORTON, J. J. Effects of Walker carcinoma 256 on food intake, body weight and nitrogen metabolism of grow in rats. **Acta UnioInternat.Canc. Louvain**.v. 6, p. 409 -420, 1948.

MORAES, S.P., CUNHA, A., REIS NETO, J. A., BARBOSA, H., RONCOLATTO, C.A.P., DUARTE, R. F., Modelo experimental de tumor de Walker. *Acta Cirúrgica Brasileira* [serial on line], v.15, n. 4. Oct-dec.2000.

MORAES FILHO, M. O. Efeitos antineoplásticos do *cróton micronifolius* no carcinossarcoma 256 de Walker. Dissertação de Mestrado. UFC. 1980

MORRIS, J.; DOBSON, J. **Oncologia em pequenos animais**. São Paulo: Editora Roca LTDA, p. 299, 2007.

MULENGA, A. ET AL. The molecular basis of the *Amblyomma americanum* tick attachment phase. **Experimental and Applied Acarology**, v. 41, p. 267-287, 2007.

NAIR, S. ET AL. Calreticulin displays *in vivo* peptide-binding activity and can elicit CTL responses against bound peptides. **Journal of Immunology**, v. 162, p. 6426-6432, 1999.

NDOZANGUE-TOURIGUINE, O. ET AL. Cytoskeleton and apoptosis. **Biochemical Pharmacology**. v. 76, p. 11-18, 2008.

NETO, A.; FERREIRA, J. M. Níveis comparativos de estresse oxidativo em camundongos em duas situações do limite orgânico: overreaching induzido por treinamento de natação e câncer. **Rev. bras. med. Esporte**, v. 14, p. 548-552, 2008.

OBEID, M. ET AL. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. **Nature Medicine**, v. 13, p. 54-61, 2007.

OLIVEIRA, C. J. ET AL. Tick saliva inhibits the chemotactic function of MIP-1 and selectively impairs chemotaxis of immature dendritic cells by down-regulating cell-surface CCR5. **International Journal for Parasitology**, v. 38, p. 705-716, 2008.

OLIVEIRA, C. J. ET AL. Tick saliva induces regulatory dendritic cells: MAP-kinases and Toll-like receptor-2 expression as potential targets. **Veterinary Parasitology**, v. 167, p. 288-297, 2010.

OLIVEIRA, J. C. ET AL. Deconstructing saliva. Non-protein Molecules with potente immunomodulatory properties. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 286, p. 10960-10969, 2011.

OLIVEIRA-NETO, H. H.; LEITE, A. F.; COSTA N. L.; ALENCAR, R.C.; LARA, V. S., SILVA, T. A. ET AL. Decrease in mast cells in oral squamous cell carcinoma: possible failure in the migration of these cells. **Oral Oncol.** v. 43, p. 484-90, 2007.

PESSOA, M. C. P. ET AL. Aspectos clínicos, diagnóstico e tratamento dos histiocitomas caninos. **Medicina Veterinária**, v. 2, p. 42-53, 2008.

PIKE, S. E. ET AL. Calreticulin and calreticulin fragments are endothelial cell inhibitors that suppress tumor growth. **Blood**, v. 94, p. 2461-2468, 1999.

PISTILLI, M. L. V. **Identificação da enzima geradora da endostatina humana: Um Proteassoma extracelular.** 2009. 155 f. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil, 2009.

POOLE, N. M. ET AL. Effects of tick saliva on the migratory and invasive activity of Saos-2 osteosarcoma and MDA-MB-231 breast cancer cells. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 4, p. 120-127, 2013.

REYNOLDS, E. S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. **J. Cell Biol.** v.17, p. 208-12, 1963.

RODEGHIERO, F. ET AL. Early deaths and anti-hemorrhagic treatments in acute promyelocytic leukemia: A GIMEMA retrospective study in 268 consecutive patients. **Blood**, v. 75, p. 2112-2117, 1990.

SAITO, M. ET AL. Quantitative estimation of elastase- α_1 - proteinase inhibitor (E- α_1 PI) complex in leukemia: Marked elevation in cases of acute promyelocytic leukemia. **Thrombosis Research**, v. 53, p. 163-171, 1989.

SAKATA, Y. ET AL. The specific activity of plasminogen activator inhibitor-1 in disseminated intravascular coagulation with acute promyelocytic leukemia. **Blood**, v. 77, p. 1949-1957, 1991.

SANDERS, M. L. ET AL. Salivary gland changes and host antibody responses associated with feeding of male lone star ticks (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 33, p. 628-634, 1996.

SANZ, M. A. ET AL. Acute promyelocytic leukemia: Therapy results and prognostic factors. **Cancer**, v. 61, p. 7-13, 1988.

SEDMAK, J. J., GROSSBERG, S. E. A rapid, sensitive and versatile assay for protein using coomassie brilliant blue G250. **Analytical biochemistry**, v. 79, p. 544-552, 1977.

SCHREK, R.; AVERY, R.C. Histological observation on transplantable rat and rabbit tumors cultivated in the chorio-allantoic membrane of chick embryos, with special reference to the walker rat tumor 256. **Am. J. Pathol.** v. 13, p. 45, 1937.

SCHWARTZ, B. S. ET AL. Epsilon-aminocaproic acid in the treatment of patients with acute promyelocytic leukemia and acquire α -2-plasmin inhibitor deficiency. **Annals of Internal Medicine**, v. 105, p. 873-877, 1986.

SCROBOHACI, M. ET AL. Disseminated intravascular coagulation (DIC) and/or primary fibrinolysis in acute promyelocytic leukemia, effect of all-*trans* retinoic acid treatment. **Blood**, v. 78 (suplemento 48a), abstract, 1991.

SHAFI, G. ET AL. Induction of apoptosis in HeLa cells by chloroform fraction of seed extracts of *Nigella sativa*. **Cancer Cell International**, v. 9, p. 29, 2009.

SHWEIKI, D. ET AL. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. **Nature**, v. 359, p. 843-845, 1992.

SIBLEY, T. A. ET AL. Human intravenous immunoglobulin (hIVIG) inhibits anti-CD32 antibody binding to canine DH82 cells and canine monocytes *in vitro*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 151, p. 229-234, 2013.

SILVA, Sônia Leite et al. Um novo modelo de isolamento do tumor de Walker utilizando o gradiente de Ficoll-Hypaque. **Acta Cir Bras**, v. 21, n. 2, p. 101-5, 2006.

SKALLOVÁ, A. Tick saliva inhibits dendritic cell migration, maturation, and function while promoting development of Th2 responses. **The Journal of Immunology**, v. 180, p. 6186-6192, 2008.

SIMONS, S. M. ET AL. The action of *Amblyomma cajennense* tick saliva in compounds of hemostatic system and cytotoxicity in tumor cell lines. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 65 (6), p. 443-450, 2011.

STEEN, N. A. ET AL. Proteins in the saliva of the Ixodida (ticks): Pharmacological features and biological significance. **Toxon**, v. 47, p. 1-20, 2006.

STERRENBURG, L. ET AL. Evidence of fibrinogen breakdown by leukocyte enzymes in a patient with acute promyelocytic leukemia. **Haemostasis**, v. 15, p. 126-133, 1985.

STONE, R. M.; MAYER, R. J. The unique aspects of acute promyelocytic leukemia. **Journal of Clinical Oncology**, v. 8, p. 1913-1921, 1990.

STONE, R. M. ET AL. Complete remission in acute promyelocytic leukemia despite persistence of abnormal bone marrow promyelocytes during induction therapy: Experience in 34 patients. **Blood**, v. 71, p. 690-696, 1988.

TAATJES, D. J. ET AL. Morphological and cytochemical determination of cell death by apoptosis. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 129, p. 33-43, 2008.

TALALAY, P.; TAKANO, E.M.V.; HUGHINS. Studies on the walker tumor. I. Standardization of growth of a transplantable tumor. **Cancer Res.** v. 12, p. 834-837, 1952.

THAMM, D. H. ET AL. Masitinib as a chemosensitizer of canine tumor cell lines: A proof of concept study. **The Veterinary Journal**, v. 191, p. 131-134, 2012.

THOMAS, X. ET AL. Prognostic factors in acute promyelocytic leukemia: A retrospective study of 67 cases. **Leukemia & Lymphoma**, v. 4, p. 249-256, 1991.

TURNI, C. ET AL. Effect of salivary gland extracts from the tick, *Boophilus microplus*, on leucocytes from Brahman and Hereford cattle. **Parasite Immunology**, v. 24, p. 355-361, 2002,

VENTURA, G. J. ET AL. Analysis of risk factors for fatal hemorrhagic during induction therapy of patients with acute promyelocytic leukemia. **Hematol Pathol**, v. 3, p. 23-28, 1989.

WARRELL JR, R. P. ET AL. Acute promyelocytic leukemia. **New England Journal of Medicine**, v. 329, p. 177-189, 1993.

WAXMAN, L. ET AL. Tick anticoagulant peptide (TAP) is a novel inhibitor of blood coagulation factor Xa. **Science**, v. 248, p. 593-596, 1990.

WELLMAN, M. L. ET AL. A macrophage-monocyte cell line from a dog with malignant histiocytosis. **In Vitro Cellular & Development Biology**, v. 24, p. 223-229, 1988.

WIKEL, S. K. ET AL. IV. Skin reactivity and *in vitro* lymphocyte responsiveness to salivary gland antigen. **Immunology**, v. 34, p. 257-263, 1978.

WILSON, E. L. ET AL. The secretion of plasminogen activators by human myeloid leukemic cells *in vitro*. **Blood**, v. 61, p. 568-574, 1983.

WYCKOFF, J. B. ET AL. A critical step in metastasis: *in vivo* analysis of intravasation at the primary tumor. **Cancer Research**, v. 60, p. 2504-2511, 2000.

ZIEGLER, U.; GROSCURTH, P. Morphological features of cell death. **Physiology**, v. 19, p. 124-128, 2004.

HL-60 (ATCC® CCL-240™). ATCC Cell Lines. Disponível em: <<http://www.atcc.org/products/all/CCL-240.aspx>>. Acesso em: 08/08/2014.

