

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo será disponibilizado somente a partir de 31/08/2018.



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

**AVALIAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA E IMUNOLÓGICA *IN VITRO* DOS EFEITOS
DOS EXTRATOS SALIVARES DE CARRAPATOS *Rhipicephalus sanguineus*
SENSU LATO (ACARI: IXODIDAE)**

Marina Rodrigues de Abreu

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

Agosto - 2017

**AVALIAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA E IMUNOLÓGICA *IN VITRO* DOS EFEITOS
DOS EXTRATOS SALIVARES DE CARRAPATOS *Rhipicephalus sanguineus*
SENSU LATO (ACARI: IXODIDAE)**

Marina Rodrigues de Abreu

Orientadora: Profa. Dra. Maria Izabel Souza Camargo

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

Agosto - 2017

595.42 Abreu, Marina Rodrigues de
A162a Avaliação morfofisiológica e imunológica in vitro dos
efeitos dos extratos salivares de carrapatos *Rhipicephalus*
sanguineus sensu lato (Acari: Ixodidae) / Marina Rodrigues
de Abreu. - Rio Claro, 2017
153 f. : il., figs., gráfs., tabs., fots.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Maria Izabel Souza Camargo

1. Ácaro. 2. Morfologia. 3. Imunologia. 4. Glândulas
salivares. 5. Macrófagos. 6. Imunomodulação. I. Título.

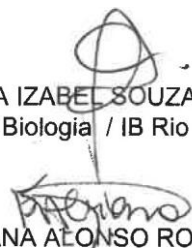
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: ANÁLISE MORFOFISIOLÓGICA *IN VITRO* DA AÇÃO DE EXTRATOS DE GLÂNDULAS SALIVARES DE FÊMEAS DE CARRAPATOS *Rhipicephalus sanguineus* (ACARI: IXODIDAE) SOBRE A LINHAGEM J774 E MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS BALB/C

AUTORA: MARINA RODRIGUES DE ABREU

ORIENTADORA: MARIA IZABEL SOUZA CAMARGO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR), pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. MARIA IZABEL SOUZA CAMARGO
Departamento de Biologia / IB Rio Claro



Profa. Dra. FABIANA ALONSO ROCHA
x / x



Profa. Dra. PATRICIA UCELLI SIMIO 1
Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes / UNICAMP

Rio Claro, 31 de agosto de 2017

Título alterado para: "Avaliação morfofisiológica e imunológica *in vitro* dos efeitos dos extratos salivares de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* (Acari: Ixodidae)"

**Dedico esse trabalho à minha
amada família e ao meu
companheiro de todas as
horas, Bruno.**

Agradecimentos

Gostaria de agradecer primeiramente a minha família, aos meus pais e meus irmãos, por todo apoio e confiança que vocês têm em mim, que foram a motivação para a conclusão dessa etapa. Um obrigada especial à minha mãe que dividiu comigo todas as alegrias e dificuldades dessa fase, você é incrível mãe.

Agradeço imensamente ao meu amigo e companheiro Bruno, por tanto amor, compreensão e paciência durante esse trabalho, por compartilhar todos os momentos de empolgação e frustração também, sem você para me amparar eu não teria conseguido.

À todos meus amigos, pelos necessários momentos de distração, pelas conversas e por partilharem das minhas angústias e aspirações, em especial às minhas amigas Rafaela e Marina, obrigada por estarem sempre presentes na minha vida e disponíveis a me ouvir.

Agradeço ao meu grupo de pesquisa BCSTM (Brazilian Central of Studies on Ticks Morphology) por todo apoio acadêmico e trabalho em equipe, sou muito grata por pertencer a esse grupo tão competente. Obrigada à todos pelas conversas no café ou no laboratório e por todo apoio nessa caminhada.

À minha orientadora Profa. Dra. Maria Izabel Camargo Mathias, pela oportunidade, confiança, e principalmente pela paciência em me auxiliar na conclusão desse trabalho. Bel você é meu exemplo de profissional e de força feminina, serei sempre grata e orgulhosa de ser sua orientada.

Agradeço a colaboração da Dra. Patrícia Ucelli Simioni, pelo conhecimento compartilhado, por toda a dedicação em me assessorar no desenvolvimento desse trabalho e pela paciência e empenho para a conclusão do mesmo.

À minha companheira de mestrado Lisiery, por me acompanhar nessa caminhada da pós-graduação, desde as disciplinas, feirinhas de quarta e até seu local de trabalho, obrigada por me receber tão bem e me ajudar tanto.

Ao suporte técnico mais bem humorado e divertido, Gerson, obrigada por fazer os dias do Departamento de Biologia mais felizes. Agradeço também à Cris por sempre estar disponível a nos auxiliar na secretaria e resolver qualquer problema.

Finalmente, a CAPES e a Prope pelo financiamento desse estudo.

E a todos que contribuíram direta ou indiretamente na conquista dessa etapa, muito obrigada.

RESUMO

A espécie *Rhipicephalus sanguineus* s. l., mais conhecida como “carrapato do cão”, possui uma grande importância médico-veterinária, não só por espoliar seus hospedeiros, mas também por ser um potencial vetor de agentes patogênicos. O sucesso biológico desses ectoparasitas deve-se à produção de uma saliva complexa produzida pelas glândulas salivares, cujos compostos são capazes de modular o sistema imune-inflamatório e hemostático dos hospedeiros. No entanto, mesmo com o conhecimento adquirido sobre o potencial da saliva no sistema imune-inflamatório dos hospedeiros, pouco se estudou sobre os mecanismos de ação dos extratos glandulares nessa resposta, e as alterações morfofisiológicas envolvidas. Desta forma, o presente projeto propôs a análise dos efeitos *in vitro* de extratos de glândulas salivares de fêmeas de carrapatos *R. sanguineus* s. l. com 2 e 4 dias de alimentação (**EG2** e **EG4**) sobre macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e células da linhagem J774, observando possíveis variações na atividade e na morfofisiologia destas células em função das diferentes exposições ao extrato. Os resultados demonstraram que apenas a concentração de 4 µg/mL do extrato **EG2** apresentou citotoxicidade sobre células da linhagem J774 quando expostas por 48 horas; as concentrações de 4 e 2 µg/mL de ambos os extratos estimularam perfis pró-inflamatórios em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c; a concentração de 2 µg/mL no tempo de 48 horas de exposição e 1 µg/mL no de 24 horas de exposição do **EG2** e as concentrações 2 e 1 µg/mL o **EG4** em 48 horas de exposição também estimularam atividade pró-inflamatória de células da linhagem J774; as demais concentrações dos extratos **EG2** e **EG4** tiveram atividade imunomodulatória sobre ambas linhagens, como demonstrado pela diminuição de liberação de NO, concomitante com a diminuição da secreção de citocinas pró-inflamatórias (IL2, IL-6 e TNF- α), aumento da síntese de IL-10, e confirmada pela análise morfológica sob microscopia de luz e varredura.

Sumário

INTRODUÇÃO	5
1. Carrapatos.....	5
2. <i>Rhipicephalus sanguineus</i> sensu lato.....	7
3. Glândulas Salivares.....	8
4. Saliva	10
5. Imunobiologia dos Extratos de Glândulas Salivares e da Saliva de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> s. l.....	14
6. Macrófagos	16
OBJETIVOS	18
MATERIAL E MÉTODOS	19
1. Obtenção e Manutenção dos Carrapatos.....	19
2. Produção dos Extrato das Glândulas Salivares (EG2 e EG4).....	21
3. Bioensaios <i>in vitro</i>	23
4. Análise Morfológica	28
RESULTADOS	31
CAPÍTULO 1.....	32
CAPÍTULO 2.....	75
DISCUSSÃO GERAL	133
CONSIDERAÇÕES FINAIS	138
REFERÊNCIAS	140

INTRODUÇÃO

1. Carrapatos

1.1. Biologia Geral

Os carrapatos são artrópodes ectoparasitas obrigatórios e de hábito hematófago, que parasitam grande diversidade de hospedeiros vertebrados durante a sua ontogenia (ANDERSON; MAGNARELLI, 2008). Esses animais são também conhecidos pela capacidade de transmitir inúmeros patógenos, como fungos, bactérias, protozoários e vírus responsáveis pela transmissão de doenças aos seus hospedeiros (LABRUNA et al., 2007).

O ciclo de vida dos carrapatos apresenta quatro estágios: ovo, larva, ninfa e adulto, os quais podem ocorrer em um único hospedeiro, como no caso das espécies monoxenas ou em mais de um, como nas espécies trioxenas (três hospedeiros), que se alimentam em hospedeiros diferentes em cada uma das fases do seu desenvolvimento (DENARDI et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2003; SONENSHINE; ROE, 2014). Além disso, durante o seu ciclo biológico, os carrapatos podem sobreviver por longos períodos fora dos hospedeiros, quando ficam abrigados entre a vegetação e as fendas no solo (WALKER, 1994).

Para completar o desenvolvimento e garantir seu sucesso reprodutivo, os carrapatos desenvolveram, ao longo da evolução, estratégias para detectar parâmetros essenciais de estímulos como odor, vibração, aparência visual e temperaturas radiadas (SONENSHINE; ROE, 2014). A seleção do local de fixação no hospedeiro, por exemplo, é realizada pelos quimiorreceptores presentes nos palpos e nas quelíceras, estes últimos utilizados para “provar” o hospedeiro. Após perfurar a epiderme e a derme do mesmo com as quelíceras, o hipostômio é introduzido na pele e permanece fixando o carrapato, por meio também da produção e secreção de uma substância proteica denominada

cimento, sintetizada pelas glândulas salivares e que tem como função auxiliar na fixação do aparelho bucal. Instalado esse canal de alimentação, começa a ser liberada a saliva do carrapato para o hospedeiro, bem como os fluidos sanguíneos do hospedeiro para os carrapatos (ANDERSON; MAGNARELLI, 2008).

Para que a fêmea possa alcançar o completo ingurgitamento (ingestão de sangue, podendo aumentar em até 100 vezes o seu tamanho original) concomitante ao seu processo de ovogênese, é necessário que ocorra a cópula com o macho. Uma vez ingurgitada completamente, a fêmea se solta do hospedeiro e inicia o processo de oviposição, que na família Ixodidae chega a alguns milhares de ovos, sendo o recorde registrado o de 36.206 ovos para a espécie *Amblyomma variegatum* (SONENSHINE; ROE, 2014). Em seguida, a fêmea morre e os ovos ficam em incubação (cerca de 20 dias, dependendo das condições ambientais) até a eclosão das larvas que sairão em busca de um hospedeiro para alimentar-se e então sofrer a ecdise para ninfas, que por sua vez também necessitarão se alimentar em hospedeiros para sofrer a ecdise final para tornar-se adultos (SONENSHINE; ROE, 2014).

1.2. Taxonomia e Sistemática

Os carrapatos pertencem ao Filo Arthropoda, Classe Arachnida, Subclasse Acari, Ordem Parasiformes, Subordem Ixodida (BARKER; MURRELL, 2004). Estima-se que atualmente existam cerca de 899 espécies divididas entre as famílias Nutalliellidae, Argasidae e Ixodidae (ANDERSON; MAGNARELLI, 2008; DANTAS-TORRES, 2008; NAVA et al., 2015).

A família Ixodidae atualmente é composta por 702 espécies descritas e conhecida por abrigar os “carrapatos de corpo duro” (do inglês “hard ticks”), pois os indivíduos apresentam um escudo dorsal quitinoso, que nos machos recobre quase toda a superfície dorsal e nas fêmeas apenas a metade anterior desta mesma região, o que possibilita a

expansão do corpo durante o processo de ingurgitamento. Existe, portanto, nesses carrapatos um dimorfismo sexual na fase adulta (GUGLIELMONE et al., 2014). Esses indivíduos apresentam também peças bucais inseridas na região anterior e proximal do corpo, e a água obtida do sangue do hospedeiro é secretada pelas próprias glândulas salivares durante o processo de alimentação (SONENSHINE; ROE, 2014).

A extensa quantidade de espécies e a ampla distribuição geográfica dos carrapatos da família Ixodidae podem ser atribuídas: à diversidade de hospedeiros, que varia desde mamíferos, aves, répteis, anfíbios e ainda outros aracnídeos, como os próprios carrapatos e até mesmo o homem (LABRUNA et al., 2007); bem como ao seu lento processo de ingurgitamento, permitindo que estes sejam transportados pelo hospedeiro por longas distâncias (ANDERSON; MAGNARELLI, 2008). Consequentemente, esta característica alimentar favorece a transmissão de patógenos para os hospedeiros e, portanto, a família Ixodidae é a que abriga as espécies que possuem maior importância econômica e médico-veterinária (DANTAS-TORRES, 2010).

2. *Rhipicephalus sanguineus sensu lato*

Dentro da família Ixodidae, encontram-se quatro subfamílias, dentre elas, a subfamília Rhipicephalinae, abrigando o gênero *Rhipicephalus* que conta com cerca de 79 espécies descritas (DANTAS-TORRES, 2010).

A espécie *R. sanguineus sensu stricto* (s. s.) foi descrita pela primeira vez em 1806 por Latreille. Atualmente, trata-se de um grupo com definição morfológica incerta e ainda, estudos moleculares recentes demonstraram que *R. sanguineus sensu lato* (s. l.) consiste, na verdade, em um complexo de espécies (aproximadamente 17). Porém, esse ainda é assunto que encontra-se em discussão pelos taxonomistas (DANTAS-TORRES; OTRANTO, 2015).

Os carrapatos *R. sanguineus* s. l. tem como hospedeiro preferencial o cão doméstico e por isso são conhecidos popularmente como “carrapato marrom do cão”, mas podem parasitar também outros animais de estimação e até mesmo seres humanos (DANTAS-TORRES; FIGUEREDO; BRANDÃO-FILHO, 2006; GRAY et al., 2013).

Esse ectoparasita é considerado de grande importância médico-veterinária, não só pelo fato de espoliar seus hospedeiros, mas também por ser considerado vetor de bactérias, vírus e protozoários, sendo as principais doenças relacionadas a esses carrapatos (em cães) a Erliquiose (*Ehrlichia canis*), Babesiose (*Babesia canis*) e Hemobartonelose (*Haemobartonella canis*), e ainda, há suspeitas de serem vetores em humanos de *Rickettsia conorii* na Europa e da *R. rickettsii* no México (DANTAS-TORRES, 2008, 2010). Dessa forma, esses ectoparasitas representam grande preocupação pelos prejuízos causados não só aos animais de estimação, mas também a saúde pública.

3. Glândulas Salivares

Tanto o processo espoliativo quanto a transmissão de agentes patogênicos ocorrem devido à ação imunossupressora da saliva, secretada pelas glândulas salivares, órgãos complexos e essenciais para o sucesso biológico destes ectoparasitas. Elas se localizam dorsolateralmente e aos pares na porção anterior do corpo do carrapato e são formadas por uma porção secretora (ácinos) e uma excretora (sistema de dutos) (CAMARGO-MATHIAS, 2013; FURQUIM; BECHARA; CAMARGO-MATHIAS, 2010).

Nas fêmeas de *R. sanguineus* s. l. a porção secretora é composta por três tipos de ácinos: I, II e III, sendo o primeiro agranular (envolvido no processo de osmorregulação)

e os dois últimos granulares, responsáveis pela síntese e secreção dos componentes bioativos da saliva (CAMARGO-MATHIAS, 2013).

O ácino I é agranular e pode ser encontrado em todas as fases do desenvolvimento dos carrapatos *R. sanguineus* s. l. Morfologicamente, apresenta ligação direta com o duto principal da glândula salivar. As células desse ácino apresentam sua região basal com extenso labirinto membranoso, que além de aumentar a superfície de contato com a hemolinfa, abriga grande quantidade de mitocôndrias, importantes organelas que participam do transporte ativo nos processos do equilíbrio de balanço hídrico durante o processo de alimentação (carrapato-sangue do hospedeiro) e também no jejum (carrapato-ambiente). Além disso, acredita-se que esse ácino contribua na produção do cemento (substância que auxilia na fixação do carrapato ao hospedeiro durante a alimentação) (SONENSHINE; ROE, 2014).

Assim, as glândulas salivares têm papel importante na manutenção do balanço hídrico eliminando o excesso de íons durante a ingestão de sangue, evitando o desencadeamento de um estresse osmótico para o carrapato. Ademais, durante o período de jejum do carrapato, essas glândulas também produzem uma secreção hiperosmótica para que esse obtenha água através de gotículas de vapor do ar, garantindo sua sobrevivência durante o período de privação hídrica (GRAY et al., 2013; YODER et al., 2006).

Os ácinos II (granulares), segundo Furquim et al. (2011), em fêmeas de *R. sanguineus* s. l., são constituídos por oito tipos celulares (**a**, **b**, **c1-c6**), e os ácinos III (granulares), por três tipos (**d**, **e** e **f**), sendo as células **a**, **d** e **e** as responsáveis pela síntese de secreção de natureza lipoproteica, enquanto as **b**, **c1-c6**, **d** e **f**, pela síntese de componentes de natureza glicoproteica (CAMARGO-MATHIAS; FURQUIM; NUNES, 2011).

Nos machos de carrapatos em geral, assim como naqueles da espécie *R. sanguineus* s. l. existe ainda o ácino IV, constituído apenas por células **g** (BINNINGTON, 1978; FURQUIM; BECHARA; CAMARGO-MATHIAS, 2010). Acredita-se que este ácino esteja relacionado com a lubrificação e transferência do espermatóforo para a fêmea durante a cópula, sugerindo função restrita na reprodução (SONENSHINE; ROE, 2014).

E finalmente, para que todo o produto sintetizado pela glândula possa chegar ao seu destino final (cavidade oral) existe a porção excretora que é formada por um sistema de dutos ramificados e interligados, com diâmetros variados. Os dutos acinares são aqueles de menor calibre e que tem a função de coletar a secreção do ácino e liberá-la nos dutos intermediários ou secundários (de diâmetro maior que os acinares) que se conectam ao duto excretor comum (maior diâmetro) que, por sua vez, leva a secreção até a cavidade oral do carrapato (CAMARGO-MATHIAS; FURQUIM; NUNES, 2011).

4. Saliva

A saliva nos carrapatos é uma mistura complexa e com funções também complexas que incluem a capacidade de modular os processos hemostático, inflamatório e imunológico do hospedeiro: I) aumentando o fluxo sanguíneo na região da fixação no hospedeiro, por meio da secreção de agentes vasodilatadores; II) inoculando anticoagulantes que mantêm o sangue do hospedeiro fluido; III) inibindo o processo inflamatório no hospedeiro agindo como imunossupressor, possibilitando a fixação do ectoparasita e dificultando a rejeição do mesmo pelo hospedeiro (BOWMAN; DILLWITH; SAUER, 1996). A modulação dos sistemas imune-inflamatório e hemostático dos hospedeiros, não só garante o sucesso biológico desses indivíduos, possibilitando seu longo período de alimentação, mas também facilita o papel de vetor de patógenos, permitindo a transmissão de microrganismos que encontram menos obstáculos

à sua penetração e instalação no hospedeiro (FRANCISCHETTI et al., 2009; NUTTALL; LABUDA, 2004).

Em razão de toda essa complexidade estrutural e funcional, a saliva e as glândulas salivares destes organismos vem sendo alvo de estudos em diferentes linhas de pesquisa, buscando principalmente identificar e isolar os bioativos com ação vasodilatadora, anti-inflamatória, analgésica e imunomodulatória (OLIVEIRA et al., 2010). Os bioativos já descritos na saliva dos carrapatos são de natureza glico e/ou lipoproteica (BINNINGTON, 1978; WHEELER; COLEMAN; BENACH, 1991) e estão representados pelas fosfatases ácidas, esterases, aminopeptidases, metaloproteases, prostaglandinas, lipocalinas e calreticulinas (BINNINGTON, 1978; MULENGA; BLANDON; KHUMTHONG, 2007; OLIVEIRA et al., 2011) e outras com propriedades ainda desconhecidas.

Além da sua complexa composição, a saliva apresenta variações quantitativa e qualitativa quando são considerados os diferentes períodos do ciclo glandular e as diferentes espécies de carrapatos (CAMARGO-MATHIAS, 2013; XIANG et al., 2009). No caso da espécie *R. sanguineus* s. l. a secreção produzida pelas glândulas salivares apresenta características distintas quando considerados o início (2 dias), o meio (4 dias) e o final (6 dias) do seu ciclo secretor (CAMARGO-MATHIAS; FURQUIM; NUNES, 2011).

O ciclo de secreção da glândula salivar de *R. sanguineus* s. l. e seu processo degenerativo foi bem caracterizado por Furquim et al. (2010). Segundo os autores, os ácinos do tipo I não sofrem alterações morfológicas no decorrer da alimentação e adquirem características degenerativas somente após o término do ingurgitamento. Os indivíduos em jejum possuem as glândulas salivares com as células **a**, **c1**, **c3**, **d** e **e** ativas, já aqueles com dois dias de alimentação têm as células **b**, **c2**, **c4**, **c5**, **c6** e **f** ativas, os com 4 dias tem as, as células **a**, **b**, **c1-c4** e **c6** ativas, porém, as **c5** e **f** encontram-se em período

de inatividade e, finalmente os indivíduos com 7 dias de alimentação têm inativação das células **c6**, sendo que nesse último período começa-se observar processos de degradação das glândulas salivares.

Os mesmos autores demonstraram que as alterações degenerativas das glândulas salivares foram observadas com mais intensidade nas fêmeas do que nos machos e apresentavam características de mais de um tipo de morte celular (apoptose e morte autofágica), caracterizando assim uma apoptose atípica (FURQUIM et al., 2014; FURQUIM; BECHARA; CAMARGO-MATHIAS, 2008; FURQUIM; BECHARA; CAMARGO-MATHIAS, 2010). Segundo Sonenshine et al. (2014), acredita-se que a degeneração e perda de função da glândula salivar após o ingurgitamento ocorre devido a interferência do “fator de macho” ou “fator de ingurgitamento”, transferido para a fêmea durante a cópula concomitante ao seu período de alimentação, que induz a degeneração das glândulas salivares e estimula o desenvolvimento do ovário para que ocorra o processo de oviposição (WEISS; KAUFMAN, 2004).

Ainda, segundo Furquim et al. (2014), o comportamento secretor das glândulas salivares das fêmeas de *R. sanguineus* s. l. durante o período de alimentação se modificaria de acordo com a resistência do hospedeiro (no caso deste estar imunizado, ou seja, já ter sido anteriormente exposto à saliva do carrapato por uma ou mais vezes). Foi observado pelos autores uma significativa modificação na produção de componentes da saliva tais como de: proteínas, lipídios, polissacarídeos, fosfatase acida e cálcio, demonstrando a variação da complexidade bioquímica da saliva produzida por esses carrapatos diante da alteração imunológica do hospedeiro. Isso ocorreria devido ao sistema imune do hospedeiro e os componentes da saliva dos carrapatos terem coevoluído, resultando numa interação que poderia ser comparada a uma “corrida

armamentista” entre os mecanismos de defesa de um e do poder de invasão do outro (KOTÁL et al., 2015).

Em relação a ação anti-hemostática da saliva, algumas proteínas anticoagulantes importantes já foram identificadas como: a TAP (*tick anticoagulant peptide*) e a Moubatin isoladas da saliva de *Ornithodoros moubata* (FRANCISCHETTI; MATHER; RIBEIRO, 2005; WAXMAN; CONNOLLY, 1993); a Americanin encontrada no *Amblyomma americanum* (ZHU et al., 1997); a Variabilin purificada das glândulas salivares de *Dermacentor variabilis* (WANG et al., 1996); Boophilin e Microphilin da saliva de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (CIPRANDI et al., 2006; MACEDO-RIBEIRO et al., 2008); e apirases descritas em *Ixodes scapularis*, *O. moubata* (RIBEIRO et al., 1985) e *Ornithodoros savignyi* (MANS et al., 2002); todas com capacidade de inibir a agregação plaquetária e, portanto, com perspectiva de serem utilizadas no tratamento de doenças como a trombose, por exemplo.

Quanto a ação anti-inflamatória da saliva dos carrapatos, atribui-se principalmente a alta concentração de prostaglandinas presente na secreção salivar (SAUER; ESSENBERG; BOWMAN, 2000). Inibição da agregação plaquetária, vasodilatação e supressão da produção de interleucinas, como a IL-2, e o interferon IFN- γ , são atribuídas a elas (SA-NUNES et al., 2007).

Apesar do potencial já conhecido sobre a ação anti-hemostática, anticoagulante e anti-inflamatória da saliva dos carrapatos, novos estudos vêm sendo desenvolvidos buscando esclarecer as diversas facetas que envolvem o arsenal farmacológico da saliva dos carrapatos e os resultados tem demonstrado que esses ectoparasitas podem ser ótimos aliados em terapias alternativas de diversas doenças, como por exemplo neoplasias (ABREU et al., 2014; CHUDZINSKI-TAVASSI et al., 2010; SIMONS et al., 2011). Segundo a literatura, a saliva de diferentes espécies de carrapatos teria ainda a capacidade

de inibir a proliferação de células endoteliais apresentando ações anti-angiogênica (FRANCISCHETTI et al., 2009) e anti-tumoral (ABREU, 2014; KAZIMÍROVÁ; ŠTIBRÁNIOVÁ, 2013; SIMONS et al., 2011).

No que se refere a ação imunossupressora da secreção salivar, diversos estudos visando o melhor entendimento dos complexos mecanismos fisiológicos e bioquímicos envolvidos na relação hospedeiro-carrapato mostraram que a saliva bruta de diversas espécies de carrapatos possuiria o potencial de: afetar a proliferação de linfócitos T (KOPECKY; KUTHEJLOVA; PECHOVA, 1999; SCHOELER; WIKEL, 2001); inibir a função dos neutrófilos, incluindo sua atividade oxidativa e fagocitária (RIBEIRO; WEIS; TELFORD, 1990); diminuir a atividade das células “natural killer” (KUBES et al., 1994); diminuir a atividade oxidativa de macrófagos (KUTHEJLOVA et al., 2001); suprimir a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-2 e IFN- γ) e aumentar a produção de citocinas (IL-4, IL-5 e IL-10) relacionadas com a produção de anticorpos IgE e reações imunes mediadas por eosinófilos e mastócitos contra alérgenos (características da indução de linfócitos do tipo Th2) (BROSSARD; WIKEL, 2004; WIKEL, 1999). No entanto, esses mecanismos parecem distinguir-se de acordo com as diferentes espécies e ainda quando considerado a saliva bruta ou o extrato de glândula salivar (KOTÁL et al., 2015).

5. Imunobiologia dos Extratos de Glândulas Salivares e da Saliva de *Rhipicephalus sanguineus* s. l.

Devido a sua importância médico veterinária e econômica, a maioria dos trabalhos disponíveis na literatura referentes a estudos utilizando extratos de glândulas salivares de *R. sanguineus* s. l. tratam das propriedades imunomodulatórias da saliva ou do desenvolvimento da resposta imune inflamatória do hospedeiro, visando entender melhor a relação imunobiológica estabelecida na interface carrapato-hospedeiro e buscando

novas maneiras de controle desses ectoparasitas, como por exemplo a produção de vacinas.

Segundo Ferreira e Silva (1998;1999), a saliva dessa espécie de carrapato teria efeito na inibição da proliferação de células T, diminuição da produção da citocina IL-2, IL-12 e INF- γ , aumento na produção de citocinas IL-4, IL-10 e TGF- β , inibição da atividade fagocíticas de macrófagos frente a exposição de *Trypanossoma cruzi* e redução das taxas de óxido nítrico.

Recentemente, a prostaglandina E₂ e a adenosina da saliva de *R. sanguineus* s. l. foram identificadas como os compostos responsáveis pela modulação da função de células dendríticas (células apresentadoras de antígenos), inibindo a produção de citocinas IL-12p40 e TNF- α e expressão de CD40, e aumentando a produção de IL-10. Porém, apenas a prostaglandina E₂ demonstrou capacidade de inibir a maturação de células dendríticas (OLIVEIRA et al., 2011).

Além disso, o extrato da glândula salivar de carrapatos *R. sanguineus* s. l. suprimiu a produção de IgG2 e a expressão de DNAm de IL-2, IL-5 e IFN- γ de maneira dose-dependente, e não interferiu na expressão de DNAm de IL-4 (MATSUMOTO et al., 2003).

Ainda, quando comparados organismos capazes de desenvolver resistência a infestações de carrapatos (*guinea pigs*) e aqueles que não a apresentam (cães e camundongos), observou-se que os resistentes diferem dos demais principalmente por apresentar aumento na produção de células T após infestação por carrapatos, e pelo aumento de basófilos e células monucleadas (linfócitos, macrófagos e células NK) no local da fixação do ectoparasita, ao contrário dos organismos não resistentes que apresentam inibição da produção de células T e infiltrados de eosinófilos e neutrófilos no local da ferida (FERREIRA et al., 2003).

No entanto, injeções de extratos de glândulas salivares de *R. sanguineus* s. l. com 2, 4 e 6 dias de alimentação estimularam o aparecimento de sinais de sensibilização em coelhos hospedeiros (diminuindo a infestação por esses ectoparasitas e até reduzindo a reprodutividade dos mesmos), demonstrando uma intensa resposta imune-inflamatória dos hospedeiros, especialmente ao extrato de 4 dias, sugerindo que as moléculas presentes no extrato de glândulas salivares de *R. sanguineus* s. l. possuiriam imunogenicidade distinta de acordo com o período do ciclo glandular e que a reação imune decorrente da presença desse extrato poderia ser mais forte do que a ação imunomoduladora (HEBLING; CMARGO-MATHIAS; FURQUIM, 2011).

Dessa forma, mesmo com o conhecimento da ação imunossupressora da saliva da espécie *R. sanguineus* s. l., ainda há muito a se esclarecer sobre os mecanismos envolvidos na modulação do sistema imune do hospedeiro, como quais seriam os fatores que estariam sendo ativados ou inativados para promover tal resposta imunológica, e ainda, levando-se em conta as diferentes necessidades imunomodulatórias conforme o ciclo glandular, ou seja, no início (2 dias), meio (4 dias) e fim (6 dias) do processo de alimentação, quais seriam as diferentes reações imunológicas entre esses períodos.

6. Macrófagos

Os macrófagos, considerados os maiores leucócitos do sistema imune, são produzidos na medula óssea em formato de monócitos que circulam no sangue e migram para os tecidos onde se diferenciam. São considerados células apresentadoras de antígeno profissionais, podendo ser ativados na presença de diferentes antígenos em contato com seus complexos receptores de membrana, e posteriormente, apresentando-os aos linfócitos T. Os mesmos são responsáveis também pela eliminação e fagocitose de microrganismos invasores, assim como pela secreção de proteínas sinalizadoras

(citocinas) que ativam e recrutam outras células do sistema imune, papel fundamental na indução da inflamação e no sucesso da resposta imune (MURPHY et al., 2010).

As citocinas são proteínas mediadoras do sistema imune, produzidas pelos macrófagos em resposta a presença de microorganismos e de outros antígenos, e são responsáveis pela regulação dos processos inflamatórios e imunomodulatórios, sendo capazes de estimular a proliferação e diferenciação de linfócitos, ativação de células efetoras, e até mesmo por influenciar na síntese e ação de outras citocinas (ABBAS et al., 2007; MURPHY et al., 2010).

Além das citocinas, os macrófagos ativados produzem intermediários reativos de nitrogênio como o óxido nítrico (NO), através da ação da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS), ativada por sua vez pela presença de produtos microbianos, como por exemplo o lipopolissacarídeo (LPS) extraído da parede celular de bactérias Gram-negativas (MACRI et al., 2009). O óxido nítrico liberado tem importante papel na destruição e eliminação de microorganismos patogênicos e é um ótimo indicador da intensidade de ativação de macrófagos (ABBAS et al. 2007).

As células da linhagem J774 são macrófagos de ratos originalmente isoladas de sarcoma histiocístico e descritas primeiramente por Ralph e Nakoinz (1977). Essa linhagem celular consiste basicamente em macrófagos aderentes e de migração lenta com a capacidade de fagocitose e liberação de mediadores do sistema imune, tais como as citocinas e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, como o óxido nítrico, por exemplo (RALPH; NAKOINZ, 1977). Devido essa geração de indicadores de resposta imunológica semelhantes as células de origem dessa linhagem (como produção e modulação de citocinas, indução da síntese de óxido nítrico, regulação de prostaglandinas, resposta pró-inflamatória e interação e infecção de microrganismos), a mesma tem sido frequentemente utilizada como modelo efetivo em estudos *in vitro* relacionados a

imunorregulação e atividade anti-inflamatória de macrófagos (D' ACQUISTO et al., 1997; JUSTO et al., 2015; MAROTTA; SAUTEBIN; ROSA, 1992).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

- As concentrações (4; 2; 1; 0,5 e 0,1 µg/mL) dos extratos **EG2** e **EG4** de glândulas salivares de fêmeas de carrapatos *R. sanguineus* s. l. não apresentaram citotoxicidade significativa sobre macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, no entanto, no extrato **EG2** a concentração de 4 µg/mL apresentou citotoxicidade sobre células da linhagem J774 quando expostas por 48 horas;

- As concentrações de 4 e 2 µg/mL de ambos os extratos (**EG2** e **EG4**) estimularam perfis pró-inflamatórios em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, confirmados pelos testes de viabilidade celular e de produção de NO, corroborando as análises morfológicas sob microscopia de luz e eletrônica de varredura;

-As concentrações 1; 0,5 e 0,1 µg/mL dos extratos **EG2** e **EG4**, por sua vez, demonstraram perfis imunomodulatórios em macrófagos peritoneais, confirmados principalmente pela análise morfológica sob microscopia de luz e eletrônica de varredura, mas não pela dosagem de NO, o que sugeriu que essa imunomodulação seria desencadeada por outros mediadores, possivelmente por citocinas;

- A concentração de 2 µg/mL no tempo de 48 horas de exposição e 1 µg/mL no de 24 horas de exposição do **EG2** e as concentrações 2 e 1 µg/mL o **EG4** em 48 horas de exposição também apresentaram atividade pró-inflamatória em células da linhagem J774, confirmada pelo aumento da liberação NO, de citocina pró-inflamatória (IL-2) e análise morfológica sob microscopia de luz;

-

- As demais concentrações dos extratos **EG2** e **EG4** tiveram atividade imunomodulatória sobre as células da linhagem J774 demonstrada pela diminuição de liberação de NO, concomitantemente a diminuição de citocinas pró-inflamatórias (IL2, IL-6 e TNF- α), aumento da síntese de IL-10, e confirmada pela análise morfológica sob microscopia de luz.

REFERÊNCIAS

ABBAS, Abul K.; LICHTMAN, Andrew HH; PILLAI, Shiv. Cellular and Molecular Immunology E-Book. **Elsevier Health Sciences**, 2014.

ABREU, M. R. et al. Salivary Glands of Female Ticks *Rhipicephalus sanguineus* Like a Potential Source of Molecules with Inhibitory Action: In vivo study with Walker 256 Tumor Cells. **Journal of Pharmaceutical Care & Health Systems**, v. 1, n. 4, p. 1–8, 2014.

AFFOLTER, V. K.; MOORE, P. F. Localized and disseminated histiocytic sarcoma of dendritic cell origin in dogs. **Veterinary pathology**, v. 39, n. 1, p. 74–83, 2002.

ALBINA, Jorge E. et al. Nitric oxide-mediated apoptosis in murine peritoneal macrophages. **The Journal of Immunology**, v. 150, n. 11, p. 5080-5085, 1993.

ANDERSON, J. F.; MAGNARELLI, L. A. Biology of ticks. **Infectious disease clinics of North America**, v. 22, n. 2, p. 195–215, v, jun. 2008.

BARKER, S. C.; MURRELL, A. Systematics and evolution of ticks with a list of valid genus and species names. **Parasitology**, v. 129 Suppl, n. February, p. S15–S36, 2004.

BECHARA, G. H. et al. *Rhipicephalus sanguineus* tick in Brazil: feeding and reproductive aspects under laboratorial conditions. **Braz J Vet Parasitol**, v. 4, n. 2, p. 61-66, 1995.

BINNINGTON, K. C. Sequential changes in salivary gland structure during attachment and feeding of the cattle tick, *Boophilus microplus*. **International Journal for Parasitology**, v. 8, n. 2, p. 97–115, 1978.

BOWMAN, A. S.; DILLWITH, J. W.; SAUER, J. R. Tick salivary prostaglandins: Presence, origin and significance. **Parasitology Today**, , v. 12, n. 10, p. 388-396, 1996.

BRAKE, D. K.; PÉREZ DE LEÓN, A. A. Immunoregulation of bovine macrophages by factors in the salivary glands of *Rhipicephalus microplus*. **Parasites & vectors**, v. 5, p. 38, 2012.

BROSSARD, M.; WIKEL, S. K. Tick immunobiology. **Parasitology**, v. 129, n. 7, p. S161–S176, 2004.

BUSSOLARO, Daniel. **Efeitos in vitro do chumbo inorgânico [Pb (II)] na resposta imunitária de macrófagos peritoneais de camundongo**. 2009. 69p. Dissertação de Mestrado (Biologia Celular e Molecular)- Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná. 2009.

CAMARGO-MATHIAS, M.; FURQUIM, K. S.; NUNES, P. Immunomodulatory effects of tick saliva. **ISJ**, v. 8, p. 231–240, 2011.

CAMARGO-MATHIAS, M. I. **Guia básico de morfologia interna de carrapatos ixodídeos**. São Paulo: Editora Unesp, 2013.

CHEN, G. et al. Ixodes scapularis saliva mitigates inflammatory cytokine secretion during *Anaplasma phagocytophilum* stimulation of immune cells. **Parasites & vectors**, v. 5, n. 1, p. 229, 2012.

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, n. 7, p. 1145–1154, 2010.

CIPRANDI, A. et al. *Boophilus microplus*: Its saliva contains microphilin, a small thrombin inhibitor. **Experimental Parasitology**, v. 114, n. 1, p. 40–46, 2006.

D' ACQUISTO, Fulvio et al. Involvement of NF- κ B in the regulation of cyclooxygenase-2 protein expression in LPS-stimulated J774 macrophages. **FEBS letters**, v. 418, n. 1-2, p. 175-178, 1997.

DANTAS-TORRES, F. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): From taxonomy to control. **Veterinary Parasitology**, 2008.

DANTAS-TORRES, F. Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. **Parasites & Vectors**, v. 3, p. 26, 2010.

DANTAS-TORRES, F. .; FIGUEREDO, L. A. .; BRANDÃO-FILHO, S. P. *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae), the brown dog tick, parasitizing humans in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, p. 64–67, 2006.

DANTAS-TORRES, F.; OTRANTO, D. Further thoughts on the taxonomy and vector role of *Rhipicephalus sanguineus* group ticks. **Veterinary Parasitology**, v. 208, n. 1–2, p. 9–13, 2015.

DENARDI, S. E. et al. Morphological characterization of the ovary and vitellogenesis dynamics in the tick *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 125, n. 3–4, p. 379–395, 2004.

FERREIRA, B. R. et al. Antigens from *Rhipicephalus sanguineus* ticks elicit potent cell-mediated immune responses in resistant but not in susceptible animals. **Veterinary Parasitology**, v. 115, n. 1, p. 35–48, 2003.

FERREIRA, B. R.; LIONI, L. M. Y. Expressão gênica de citocinas em cobaias resistentes a carrapatos *Rhipicephalus sanguineus*. **Medicina**, p. 1–77, 2005.

FERREIRA, B. R.; SILVA, J. S. Saliva of *Rhipicephalus sanguineus* tick impairs T cell proliferation and IFN- γ -induced macrophage microbicidal activity. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 64, n. 3, p. 279–293, 1998.

FERREIRA, B. R.; SILVA, J. S. Successive tick infestations selectively promote a T-helper 2 cytokine profile in mice. **Immunology**, v. 96, n. 3, p. 434–439, 1999.

FRANCISCHETTI, I. M. B. et al. The role of saliva in tick feeding. **Frontiers in bioscience (Landmark edition)**, v. 14, p. 2051–88, 2009.

FRANCISCHETTI, I. M. B.; MATHER, T. N.; RIBEIRO, J. M. C. Tick saliva is a potent inhibitor of endothelial cell proliferation and angiogenesis. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 94, n. 1, p. 167–174, 2005.

FURQUIM, K. C. S. et al. Cytology & Histology Secretory Behavior of Salivary Glands of *Rhipicephalus sanguineus* Fed on Immunized Rabbit Hosts. **J Cytol Histol**, v. 4, 2014.

FURQUIM, K. C. S.; BECHARA, G. H.; CAMARGO MATHIAS, M. I. Degeneration of salivary glands of males of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari, Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 154, n. 3–4, p. 325–335, 2008.

FURQUIM, K. C. S.; BECHARA, G. H.; MATHIAS, M. I. C. 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**, v. 50, n. 1, p. 59–70, 2010.

GRAY, J. et al. Systematics and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 4, n. 3, p. 171-180, 2013.

GRIESS, J. P.; BEMERKUNGEN, Z. A. H. H. Über einige Azoverbindungen. **Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft**, v. 12, p. 426–428, 1879.

GUGLIELMONE, Alberto A. et al. The hard ticks of the world. **Springer**, Dordrecht. doi, v. 10, n. 1007, p. 978-94, 2014.

GWAKISA, P. et al. Salivary gland extract of *Rhipicephalus appendiculatus* ticks inhibits in vitro transcription and secretion of cytokines and production of nitric oxide by LPS-stimulated JA-4 cells. **Veterinary Parasitology**, v. 99, n. 1, p. 53–61, 2001.

HEBLING, L. M. F. G.; CMARGO-MATHIAS, M. I.; FURQUIM, K. C. S. **Estudo dos efeitos de extratos de glândulas salivares de fêmeas de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari:Ixodidae) na resposta imunológica de hospedeiros pós inoculados.** 2011. Dissertação De Mestrado (Biologia Celular e Molecular), Instituto de Biociências, UNESP *campus* Rio Claro, São Paulo. 2011.

JUNCADELLA, I. J. et al. T-cell signaling pathways inhibited by the tick saliva immunosuppressor, Salp15. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 49, n. 3, p. 433–438, 2007.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**, 12^aed. 2014.

JUSTO, O. R. et al. Evaluation of in vitro anti-inflammatory effects of crude ginger and rosemary extracts obtained through supercritical CO₂ extraction on macrophage and tumor cell line : the influence of vehicle type. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, p. 1–15, 2015.

KOPECKY, J.; KUTHEJLOVA, M.; PECHOVA, J. Salivary gland extract from *Ixodes ricinus* ticks inhibits production of interferon-gamma by the upregulation of interleukin-10. **Parasite immunology**, v. 21, n. 7, p. 351–356, 1999.

KOTÁL, J. et al. Modulation of host immunity by tick saliva. **Journal of Proteomics**, v. 128, p. 58–68, 2015.

KUBES, M. et al. Salivary gland extracts of partially fed *Dermacentor reticulatus* ticks decrease natural killer cell activity in vitro. **Immunology**, v. 82, p. 113–116, 1994.

KUTHEJLOVA, M. et al. Salivary gland extract inhibits killing of *Borrelia afzelli* spirochetes by mouse macrophages. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 1, p. 575–578, 2001.

LABRUNA, M. B. et al. A preliminary investigation of Ehrlichia species in ticks, humans, dogs, and capybaras from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 143, n. 2, p. 189–195, 2007.

MACEDO-RIBEIRO, S. et al. Isolation, cloning and structural characterization of boophilin, a multifunctional Kunitz-type proteinase inhibitor from the cattle tick. **PLoS ONE**, v. 3, n. 2, p. 1–17, 2008.

MANS, B. J. et al. Pathogenic mechanisms of sand tampan toxicoses induced by the tick, *Ornithodoros savignyi*. **Toxicon**, v. 40, n. 7, p. 1007–1016, 2002.

MAROTTA, P.; SAUTEBIN, L.; ROSA, M. DI. Modulation of the induction of nitric oxide synthase by eicosanoids in the murine macrophage cell line J774. **British journal of pharmacology**, v. 107, n. 3, p. 640–641, 1992.

MATHIAS, MI Camargo; FURQUIM, KC Scopinho; NUNES, P. H. Immunomodulatory effects of tick saliva. **Invertebr. Survival J.**, v. 8, p. 231-240, 2011.

MATSUMOTO, K. et al. Effects of salivary gland extract from *Rhipicephalus sanguineus* on IgG subclass production and cytokine mRNA expression in mononuclear cells of canine peripheral blood. **The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science**, v. 65, n. 1, p. 137–40, 2003.

MOR, D. D.; FERREIRA, B. R.; CAMPANELLI, A. P. **Modulação da resposta imune pela saliva de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* : estudo do envolvimento de células T regulatórias**. 2006. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo. 2006.

MORITA, H. et al. Cytokine Production by the Murine Macrophage Cell Line J774 . 1 after Exposure to Lactobacilli after Exposure to Lactobacilli. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 66, n. 9, p. 1963-1966, 2002.

MULENGA, A.; BLANDON, M.; KHUMTHONG, R. The molecular basis of the *Amblyomma americanum* tick attachment phase. **Experimental and Applied Acarology**, v. 41, n. 4, p. 267–287, 2007.

NAVA, S. et al. The taxonomic status of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806). **Veterinary Parasitology**, v. 208, n. 1–2, p. 2–8, 2015.

NORTH, Robert J. Opinions the concept of the activated macrophage. **The Journal of Immunology**, v. 121, n. 3, p. 806-809, 1978.

NUTTALL, P. A.; LABUDA, M. Tick-host interactions: saliva-activated transmission. **Parasitology**, v. 129, p. S177–S189, 2004.

OLIVEIRA, C. J. F. et al. Tick saliva induces regulatory dendritic cells: MAP-kinases and Toll-like receptor-2 expression as potential targets. **Veterinary Parasitology**, v. 167, n. 2–4, p. 288–297, 2010.

OLIVEIRA, C. J. F. et al. Deconstructing tick saliva: Non-protein molecules with potent immunomodulatory properties. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 13, p. 10960–10969, 2011.

OLIVEIRA, P. R. et al. Seasonal dynamics of the Cayenne tick, *Amblyomma cajennense* on horses in Brazil. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 17, n. 4, p. 412–416, 2003.

OLIVEIRA, S. M. **Triagem de medicamentos homeopáticos que ativam macrófagos com detecção e quantificação de IFN- γ , IL-4 e NO**. 2005. Dissertação de Mestrado (Biologia Celular e Molecular) departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná. 2005.

OLSON, N.; VAN DER VLIET, A. Interactions between nitric oxide and hypoxia-inducible factor signaling pathways in inflammatory disease. **Nitric Oxide**, v. 25, n. 2, p. 125–137, 2012.

RALPH, P.; NAKOINZ, I. Direct Toxic Effects of Immunopotentiators on Monocytic, Myelomonocytic, and Histiocytic or Macrophage Tumor Cells in Culture. **Cancer Research**, v. 37, n. 2, p. 546–550, 1977.

RAMACHANDRA, R. N.; WIKEL, S. K. Modulation of host-immune responses by ticks (Acari: Ixodidae): effect of salivary gland extracts on host macrophages and lymphocyte cytokine production. **Journal of medical entomology**, v. 29, n. 5, p. 818–826, 1992.

RIBEIRO, J. C.; WEIS, J. J.; TELFORD, S. R. Saliva of the tick *Ixodes dammini* inhibits neutrophil function. **Experimental Parasitology**, v. 70, n. 4, p. 382–388, 1990.

RIBEIRO, J. M. et al. Antihemostatic, antiinflammatory, and immunosuppressive properties of the saliva of a tick, *Ixodes dammini*. **The Journal of experimental medicine**, v. 161, n. 2, p. 332–44, 1985.

ROCHA, F. A. **Efeitos in vitro e in vivo do Extrato de Glândulas Salivares de Fêmeas de Carrapatos Rhipicephalus sanguineus com 2 Dias de Alimentação Sobre Diferentes Modelos Tumoraes**. 2014. Tese de Doutorado (Biologia Celular e Molecular), Instituto de Biociências, UNESP campus Rio Claro, São Paulo. 2014.

SA-NUNES, A. et al. Prostaglandin E2 Is a Major Inhibitor of Dendritic Cell Maturation and Function in *Ixodes scapularis* Saliva. **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 3, p. 1497–1505, 2007.

SAUER, J. R.; ESSENBERG, R. C.; BOWMAN, A. S. Salivary glands in ixodid ticks: Control and mechanism of secretion. **Journal of Insect Physiology**, 2000.

SCHOELER, G. B.; WIKEL, S. K. Modulation of host immunity by haematophagous arthropods. **Annals of tropical medicine and parasitology**, v. 95, n. 8, p. 755–771, 2001.

SIMONS, S. M. et al. The action of *Amblyomma cajennense* tick saliva in compounds of the hemostatic system and cytotoxicity in tumor cell lines. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 65, n. 6, p. 443–450, 2011.

SONENSHINE, D. E.; ROE, R. M. **Biology of ticks (vol. 1 e 2)**. New York: Oxford University Press, 2014.

WALKER, Alan R. **Arthropods of humans and domestic animals: a guide to preliminary identification**. Springer Science & Business Media, 1994.

WANG, X. et al. Variabilin, a novel RGD-containing antagonist of glycoprotein IIb-IIIa and platelet aggregation inhibitor from the hard tick *Dermacentor variabilis*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 30, p. 17785–17790, 1996.

WAXMAN, L.; CONNOLLY, T. M. Isolation of an inhibitor selective for collagen-stimulated platelet aggregation from the soft tick *Ornithodoros moubata*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 8, p. 5445–5449, 1993.

WEISS, B. L.; KAUFMAN, W. R. Two feeding-induced proteins from the male gonad

trigger engorgement of the female tick *Amblyomma hebraeum*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 16, p. 5874–9, 2004.

WHEELER, C. M.; COLEMAN, J. L.; BENACH, J. L. Salivary gland antigens of *Ixodes dammini* are glycoproteins that have interspecies cross-reactivity. **J Parasitol**, v. 77, n. 6, p. 965–973, 1991.

WIKEL, Stephen K. Tick modulation of host immunity: an important factor in pathogen transmission. **International journal for parasitology**, v. 29, n. 6, p. 851–859, 1999.

XIANG, F. YU et al. Proteomic Analysis of Proteins in the Salivary Glands of the Fed and Unfed Female Tick *Rhipicephalus haemaphysaloides*. **Agricultural Sciences in China**, v. 8, n. 1, p. 121–127, 2009.

YODER, J. A. et al. Developmental profiles in tick water balance with a focus on the new Rocky Mountain spotted fever vector, *Rhipicephalus sanguineus*. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 20, n. 4, p. 365–372, 2006.

ZHU, K. et al. Isolation and characterization of americanin, a specific inhibitor of thrombin, from the salivary glands of the lone star tick *Amblyomma americanum* (L.). **Experimental parasitology**, v. 87, n. 1, p. 30–38, 1997.