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

**ALTERAÇÕES NAS GLÂNDULAS SALIVARES E
INTESTINO DE FÊMEAS DE CARRAPATOS
Rhipicephalus sanguineus l. s. ALIMENTADAS EM
DIFERENTES PERÍODOS FRENTE A RESPOSTA
IMUNOLÓGICA DE HOSPEDEIROS IMUNIZADOS COM
EXTRATOS DE GLÂNDULAS SALIVARES DE
CARRAPATOS E COM A CALRETICULINA**

ELEN FERNANDA NODARI-DRAGONI

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
Setembro - 2018

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

**ALTERAÇÕES NAS GLÂNDULAS SALIVARES E
INTESTINO DE FÊMEAS DE CARRAPATOS
Rhipicephalus sanguineus l. s. ALIMENTADAS EM
DIFERENTES PERÍODOS FRENTE A RESPOSTA
IMUNOLÓGICA DE HOSPEDEIROS IMUNIZADOS COM
EXTRATOS DE GLÂNDULAS SALIVARES DE
CARRAPATOS E COM A CALRETICULINA**

ELEN FERNANDA NODARI-DRAGONI

Orientadora: Profa. Dra. Maria Izabel Souza Camargo

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
Setembro - 2018

N761a

Nodari-Dragoni, Elen Fernanda

Alterações nas glândulas salivares e intestino de fêmeas de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* l. s. alimentadas em diferentes períodos frente a resposta imunológica de hospedeiros imunizados com extratos de glândulas salivares de carrapatos e com a calreticulina / Elen Fernanda Nodari-Dragoni. -- Rio Claro, 2018

156 p. : il., tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro

Orientador: Maria Izabel Souza Camargo

1. Carrapato do cão. 2. Glândulas salivares. 3. Intestino. 4. Vacina. 5. Controle. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

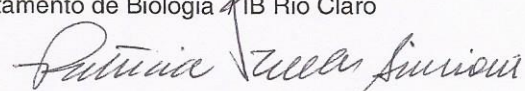
TÍTULO DA TESE: ALTERAÇÕES NAS GLÂNDULAS SALIVARES E INTESTINO DE FÊMEAS DE CARRAPATOS *Rhipicephalus sanguineus* l. s. ALIMENTADAS EM DIFERENTES PERÍODOS FRENTE A RESPOSTA IMUNOLÓGICA DE HOSPEDEIROS IMUNIZADOS COM EXTRATOS DE GLÂNDULAS SALIVARES DE CARRAPATOS E COM A CALRETICULINA.

AUTORA: ELEN FERNANDA NODARI DRAGONI

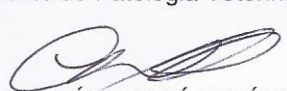
ORIENTADORA: MARIA IZABEL SOUZA CAMARGO

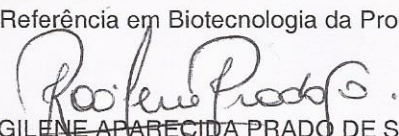
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR), pela Comissão Examinadora:


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


Profa. Dra. PATRICIA UCELLI SIMIONI
x / Faculdade de Americana


Prof. Dr. MARCOS ROGÉRIO ANDRÉ
Departamento de Patologia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Profa. Dra. CECÍLIA JOSÉ VERÍSSIMO
Laboratório de Referência em Biotecnologia da Produção Animal / Instituto de Zootecnia


Profa. Dra. ROGILENE APARECIDA PRADO DE SOUZA
Professora Substituta do Departamento de Bioquímica / IB Rio Claro

Rio Claro, 03 de setembro de 2018

*Dedico este trabalho aos meus pais, ao meu marido, á minha avó, aos meus irmãos e
sobrinhos e especialmente ao meu pinguinho de gente Levi, por todo apoio e compreensão ao
longo dessa caminhada.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço em especial aos meus pais, Rute e Rodney, por estarem sempre ao meu lado e acreditarem nos meus sonhos, por me educar e ensinar o valor das pessoas e da vida, e não das coisas.

Agradeço ao meu marido Leonardo por toda a compreensão, apoio e amor sem limites, compartilhando dos meus sonhos, conquistas e frustrações, por ser meu companheiro, meu porto seguro e sempre me ouvir com paciência.

À minha avó, irmãos, sobrinhos, sogros, cunhada e amigos-irmãos por estarem ao meu lado em todos esses momentos.

Agradeço imensamente à Profa. Dra. Maria Izabel Souza Camargo por toda a orientação e amizade, por sempre estar ao meu lado e ter me acolhido todos esses anos, proporcionando experiências únicas de crescimento pessoal e profissional.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (2014/02843-8), a qual agradeço imensamente.

Agradeço a todos os docentes que contribuíram para a minha formação ao longo de todos esses anos, e aos parceiros que tornaram a realização desse trabalho possível.

Agradeço ao meu grupo de pesquisa, o BCSTM pelo apoio, e em especial aos meus amigos Melissa, Luís Adriano, Natália, Marina e Renata, que tornaram os dias mais felizes, os experimentos mais curtos e os cafés mais agradáveis.

Agradeço a todo suporte dos técnicos e funcionários do Departamento de Biologia, em especial a Cristiane, que se tornou uma amiga e companheira de cafés.

Obrigada a todos que de alguma forma participaram dessa etapa tão importante da minha vida. Agradeço a Deus por permitir mais essa conquista e realização.

“Não é sobre chegar no topo do mundo e saber que venceu. É sobre escalar e sentir que o caminho te fortaleceu. É sobre ser abrigo e também ter morada em outros corações. E assim ter amigos em todas as situações”...

(Ana Vilela, trecho da música “Trem bala”)

Resumo e Abstract

RESUMO

Os carrapatos hoje em dia têm sido considerados como importante alvo de estudos, uma vez que são ectoparasitas que espoliam seus hospedeiros severamente, bem como são vetores de uma série de patógenos. Nessa direção, controlar esses Arthropoda tem se tornado prioridade, principalmente pelo fato de que o controle como vem sendo feito por meio do uso de químicos sintéticos, tem provocado além de outros efeitos, a seleção de populações resistentes. Especificamente os carrapatos que fazem parte do complexo *Rhipicephalus sanguineus* lato sensu têm se destacado por sua ampla distribuição e por parasitar, principalmente, o cão doméstico. Diante disso, para se realizar um controle destes ectoparasitas que seja eficiente e ao mesmo tempo sustentável vem se buscando alternativas diversas. Dentre elas destaque-se o controle imunológico por meio da aplicação de vacinas, o que consequentemente estimula a busca por antígenos que tenham capacidade de sensibilizar o sistema imune do hospedeiro e que ao mesmo tempo possua reatividade cruzada com outras espécies de carrapatos. O presente estudo teve como objetivo avaliar as alterações nas glândulas salivares e no intestino de fêmeas de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* l. s. alimentadas em diferentes períodos frente a resposta imunológica de hospedeiros imunizados com extratos de glândulas salivares de carrapatos da mesma espécie (e com a calreticulina), visto serem órgãos vitais para o sucesso biológico desse ectoparasita. Os resultados mostraram que o EGS2, o EGS4 e a CRT sensibilizaram o sistema imune dos hospedeiros via produção de anticorpos contra as proteínas presentes nos extratos e contra a CRT. Alterações na morfofisiologia das glândulas salivares e do intestino revelaram que a imunização interferiu na síntese e produção da fosfatase ácida e da calreticulina e aumentou a expressão de genes relacionados à morte, levando as glândulas a sofrer degeneração precoce. Essas alterações nos órgãos aqui estudados, sugeriram que proteínas presentes nas glândulas salivares, incluindo a CRT são antígenos candidatos ao desenvolvimento de vacinas para o controle de carrapatos.

Palavras-chave: Carrapato do cão; glândulas salivares; intestino; vacina; controle.

ABSTRACT

Ticks are currently been considered an important object of studies, once they are ectoparasites that severely spoliates their hosts and are vectors of a considerable number of pathogens. In this sense, it has become a priority to control these Arthropoda, mainly because such control has been performed with the use of synthetic chemicals, causing the emergence of resistant populations. Specific attention has been given to *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato ticks, which mainly parasitize domestic dogs and are widely distributed. The search for efficient and sustainable alternatives to control these ectoparasites is ongoing. One alternative would be the application of vaccines with antigens capable of sensibilizing the host's immune system and presenting cross-reactivity with other tick species. The objective of the present study was to evaluate the alterations in the salivary glands and midgut of *Rhipicephalus sanguineus* s. l. females fed for different periods against hosts immunized with salivary gland extracts from ticks of the same species (and with calreticulin), once these organs are vital for the biological success of the ectoparasite. The results showed that SGE2, SGE4 and CRT sensibilized the immune system of the hosts by producing antibodies against the extract proteins and CRT. Alterations in the morphophysiology of the salivary glands and in the midgut revealed that the immunization interfered in the synthesis and production of acid phosphatase and calreticulin, increasing the expression of death-related genes, leading the glands to suffer early degeneration. Such alterations in the analyzed organs suggested that the proteins present in the salivary glands including the CRT are candidates for the development of vaccines to control ticks.

Key-words: Brown dog tick;salivary glands; midgut; vaccine; control.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BCIP/NBT	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate/ nitro blue tetrazolium
BOD	Biochemical Oxygen Demand (Demanda Bioquímica de Oxigênio)
BSA	Bovine Serum Albumins (Albumina do soro bovino)
CEUA	Comissão de Ética no Uso Animal
CRT	Calreticulina
CRT-HI	Calreticulina do carrapato <i>Haemaphysalis longicornis</i>
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DMSO	Dimetil sulfóxido ou sulfóxido de dimetilo
DO	Densidade óptica
e.p.m.	erro padrão da média
EGS	Extrato da glândula salivar
EGS2	Extrato das glândulas salivares de fêmeas alimentadas por 2 dias
EGS4	Extrato das glândulas salivares de fêmeas alimentadas por 4 dias
GS2-Imu2	Glândula salivar de fêmeas alimentadas por 2 dias em hospedeiro imunizado com EGS2
GS4-Imu2	Glândula salivar de fêmeas alimentadas por 4 dias em hospedeiro imunizado com EGS2
I2-Imu2	Intestino de fêmeas alimentadas por 2 dias em hospedeiro imunizado com EGS2
I4-Imu2	Intestino de fêmeas alimentadas por 4 dias em hospedeiro imunizado com EGS2
GS2-Imu4	Glândula salivar de fêmeas alimentadas por 2 dias em hospedeiro imunizado com EGS4
GS4-Imu4	Glândula salivar de fêmeas alimentadas por 4 dias em hospedeiro imunizado com EGS4
I2-Imu4	Intestino de fêmeas alimentadas por 2 dias em hospedeiro imunizado com EGS4
I4-Imu4	Intestino de fêmeas alimentadas por 4 dias em hospedeiro imunizado com EGS4
GS2-ImuCRT	Glândula salivar de fêmeas alimentadas por 2 dias em hospedeiro imunizado com CRT

GS4-ImuCRT	Glândula salivar de fêmeas alimentadas por 4 dias em hospedeiro imunizado com CRT
I2-ImuCRT	Intestino de fêmeas alimentadas por 2 dias em hospedeiro imunizado com CRT
I4-ImuCRT	Intestino de fêmeas alimentadas por 4 dias em hospedeiro imunizado com CRT
ELF1	Fator de alongação 1
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ensaio de imunoabsorção enzimática)
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GS2	Glândula salivar de 2 dias
GS4	Glândula salivar de 4 dias
GST	Glutathione-S-Transferase
I2	Intestino de 2 dias
I4	Intestino de 4 dias
IgG	Imunoglobulina G
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
l. s.	lato sensu
OPD	o-phenylenediamine dihydrochloride
<i>P</i>	Significância
PBS	Phosphate Buffered Saline (Tampão fosfato salino)
PM	Peso Molecular
qPCR	Reação de polimerase em cadeia em tempo real
SDS-Page	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SOB	Super Optimal Broth (caldo super ideal), meio de cultura para bactérias
TBS	Tris-Buffered Saline (Tampão Tris salino)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	20
3 MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1 MATERIAL	22
3.1.1 Carrapatos <i>Rhipicephalus sanguineus</i> l. s. (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae)	22
3.2 MÉTODOS	22
3.2.1 Infestações para aquisição de fêmeas adultas de carrapatos <i>R. sanguineus</i>	22
3.2.2. Inoculação nos hospedeiros	23
3.2.3 Preparação dos extratos glandulares para inoculação nos hospedeiros	24
3.2.4 Expressão e extração da calreticulina recombinante de <i>Haemaphysalis longicornis</i> (CRT-HI)	24
3.2.5 Purificação da CRT-HI	25
3.2.6 Western Blot	25
3.2.7 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)	26
3.2.8 Análises <i>in silico</i>	27
3.2.9 Detecção da atividade da fosfatase ácida (HUSSEIN; BOWEN; LEWIS, 1990)	27
3.2.10 Teste imunohistoquímico para detecção da calreticulina	28
3.2.11 Detecção da calreticulina por imunofluorescência (adaptado de ANTUNES et al., 2015)	29
3.2.12 Extração do RNA e síntese de cDNA	29
3.2.13 Amplificação de genes relacionados à morte celular por PCR em tempo real	30
3.2.14 Análise da expressão dos genes relacionados à morte celular	31
4 RESULTADOS	36
CAPÍTULO 1	38
CAPÍTULO 2	71
CAPÍTULO 3	81
CAPÍTULO 4	105
CAPÍTULO 5	135
5 DISCUSSÃO GERAL	141
6 CONCLUSÕES	146
REFERÊNCIAS	148
ANEXO	156

Introdução

1 INTRODUÇÃO

Os carrapatos são artrópodes hematófagos e ectoparasitas de diferentes grupos animais, inclusive de outras espécies de carrapatos (LABRUNA et al., 2007). Constituem um grupo importante dos pontos de vista médico e veterinário, pois provocam lesões no hospedeiro, seja pelo processo de repasto ou pela transmissão de enfermidades como arboviroses, rickettsioses e espiroquetoses (BARBOSA SILVA et al., 2017; CONTRERAS; DE LA FUENTE, 2016; COSTA et al., 2017; KAUFMAN, 1989; MONTENEGRO et al., 2017).

A espécie *Rhipicephalus sanguineus* l. s. faz parte de um complexo que abrange 12 espécies, que possuem diferenças morfológicas, biológicas e genéticas (BURLINI et al., 2010; DANTAS-TORRES et al., 2013; DANTAS-TORRES; OTRANTO, 2015; LEVIN et al., 2012; LIU et al., 2013; MORAES-FILHO et al., 2011; NAVA et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2005; SANCHES et al., 2016; SZABÓ et al., 2005) estando o complexo distribuído por todos os continentes, devido às migrações humanas que levou consigo o cão doméstico, principal hospedeiro desse ectoparasita (WALKER; KEIRANS; HORAK, 2000). Na América Latina o grupo *R. sanguineus* l. s. está representado por duas linhagens distintas a tropical, distribuída do México ao Brasil, e a temperada restrita ao cone sul da América (MORAES-FILHO et al., 2011).

Nos cães, além de causar danos diretos, como a anemia (JERNIGAN et al., 2000), esse ectoparasita é responsável pela transmissão de *Ehrlichia canis*, *Babesia vogeli*, *Mycoplasma haemocanis*, *Hepatozoon canis* e *Anaplasma platy*. Nos humanos ainda é vetor de *Rickettsia conorii* na Europa e de *R. rickettsii* no Arizona – EUA. No Brasil, já foi confirmada a presença de *R. rickettsii* e *R. parkeri* causadoras da febre maculosa (BARBOSA SILVA et al., 2017; DE OLIVEIRA et al., 2016; LABRUNA, 2009; PADDOCK et al., 2017), bem como seu envolvimento com o ciclo endêmico da doença (MOERBECK et al., 2016).

Nos carrapatos estão presentes as glândulas salivares, consideradas fundamentais para o seu sucesso biológico. As mesmas desempenham várias funções que incluem a produção de substâncias necessárias à fixação e à alimentação dos ectoparasitas (BINNINGTON, 1978; GILL; WALKER, 1987; SONENSHINE; ROE, 2014; WALKER; FLETCHER; GILL, 1985). São estruturas pares (SONENSHINE; ROE, 2014) que se estendem antero-lateralmente na porção ventral da cavidade corpórea e desembocam na cavidade oral (OLIVIERI et al., 1992; TILL, 1961; WALKER; FLETCHER; GILL, 1985). Estão constituídas por uma porção secretora e uma excretora, porém não possuem um reservatório para armazenamento da

secreção. Nas fêmeas, a porção secretora está formada pelos ácinos **I**, **II** e **III** (BINNINGTON, 1978; CAMARGO-MATHIAS; FURQUIM, 2013; FURQUIM; BECHARA; CAMARGO-MATHIAS, 2010; WALKER; FLETCHER; GILL, 1985), interligados pela porção excretora que está composta por um sistema de ductos ramificados (NUNES et al., 2005; TILL, 1961).

Os ácinos glandulares do tipo **I** são agranulares, e atuam no balanço hídrico excretando uma solução higroscópica na região oral, capaz de absorver água do ar insaturado. Os **II** e **III** (granulares) estão constituídos por células que sintetizam e secretam produtos relacionados a: a) fixação do carrapato no hospedeiro; b) digestão de tecidos (WALKER; FLETCHER; GILL, 1985) e c) modulação local dos sistemas imune-inflamatório e hemostático do hospedeiro (PAESEN et al., 1999; RIBEIRO, 1987; RIBEIRO; MATHER, 1998; WALKER; FLETCHER; GILL, 1985).

Na saliva dos carrapatos os elementos presentes são principalmente de origem glicoprotéica, lipoprotéica e lipídica (BINNINGTON, 1978; CAMARGO-MATHIAS; FURQUIM; NUNES, 2011), como por exemplo a calreticulina, a fosfatase ácida, as esterases, as aminopeptidases, as metaloproteinases, as lipocalinas e as prostaglandinas (BINNINGTON, 1978; BROSSARD; WIKEL, 2004; CAMARGO-MATHIAS; FURQUIM; NUNES, 2011; GILL; BOID; ROSS, 1986; HARNNOI et al., 2007; JAWORSKI et al., 1995; KAEWHOM et al., 2008; KONNAI et al., 2011; MULENGA; BLANDON; KHUMTHONG, 2007; OLIVEIRA et al., 2011; RADULOVIĆ et al., 2014; STEEN; BARKER; ALEWOOD, 2006) que têm propriedades farmacológica e/ou imunológica. Nas fêmeas de *R. sanguineus* l. s. foram identificadas proteínas, polissacarídeos, lipídeos, fosfatase ácida e cálcio na secreção salivar (FURQUIM et al., 2013).

A composição da saliva do carrapato *R. sanguineus* l. s. não é sempre a mesma quando se considera os diferentes períodos de alimentação. Ela sofre transformações bioquímicas devido a necessidade do ectoparasita em modular o sistema hemostático do hospedeiro (FURQUIM et al., 2013). A composição da saliva varia tanto quantitativa quanto qualitativamente quando são considerados períodos específicos da produção da secreção como o início (2 dias de alimentação), o meio (4 dias) e o final (6 dias). Foi também demonstrado por Furquim et al. (2011) que o comportamento secretor das glândulas salivares de fêmeas de *R. sanguineus* l. s. modificar-se-ia em função da resistência adquirida pelo hospedeiro, quando imunizado.

O intestino dos carrapatos é o local onde a digestão do sangue acontece, bem como é o local onde se desenvolvem vários endoparasitas, constituindo-se ainda na principal barreira

física entre o carrapato e a resposta imunológica do hospedeiro (HIGUCHI, 1987; KOCAN et al., 1987). Este órgão está dividido em três regiões: intestino anterior (estomodeu), médio (mesenteron), e posterior (proctodeu), sendo que o anterior e o posterior são derivados da ectoderme e o médio, da endoderme (COONS; ALBERTI, 1999).

Durante o processo de digestão, as células intestinais passam por modificações que variam de acordo com o tempo que o carrapato passa se alimentando no hospedeiro, bem como com os estágios do seu ciclo, ou seja, larva, ninfa e adulto (AGBEDE; KEMP, 1985; AGYEI; RUNHAM, 1995; CAPERUCCI; CAMARGO-MATHIAS; BECHARA, 2009; COONS; ALBERTI, 1999; COONS; ROSELL-DAVIS; TARNOWSKI, 1986; REMEDIO et al., 2013; SONENSHINE; ROE, 2014; WALKER; FLETCHER, 1987). De forma geral, o intestino médio dos carrapatos, está formado por um epitélio simples cilíndrico ou pseudoestratificado apoiado sobre uma membrana basal e esta, por sua vez em uma fina camada de fibras musculares (SONENSHINE; ROE, 2014). As células epiteliais, geralmente são classificadas em 3 tipos: a) generativas; b) digestivas e c) secretoras (AGBEDE; KEMP, 1985; AGYEI; RUNHAM, 1995; BALASHOV, 1972; CAPERUCCI; CAMARGO-MATHIAS; BECHARA, 2009; REMEDIO et al., 2013; SONENSHINE; ROE, 2014; WALKER; FLETCHER, 1987), além das basofílicas (AGBEDE; KEMP, 1985), das endócrinas e das vitelogênicas (COONS; ALBERTI, 1999).

As células classificadas como generativas são aquelas indiferenciadas com forma de cúpula e com função de originar as digestivas e secretoras (AGBEDE; KEMP, 1985; WALKER; FLETCHER, 1987). São observadas com mais frequência nos estágios iniciais de cada ínstar, bem como na fase de alimentação lenta do carrapato. Sua ocorrência fica diminuída nos estágios de pós-ingurgitamento (AGBEDE; KEMP, 1985; REMEDIO et al., 2013; WALKER; FLETCHER, 1987). Morfologicamente apresentam microvilosidades voltadas para o lúmen do intestino o que lhes garante um aumento da superfície de absorção (AGBEDE; KEMP, 1985; CAPERUCCI; BECHARA; CAMARGO-MATHIAS, 2010; REMEDIO et al., 2013; WALKER; FLETCHER, 1987).

As células digestivas são consideradas as principais células do intestino médio, sendo responsáveis pela síntese e secreção das enzimas digestivas, bem como por realizar a absorção de água e de outras substâncias digeridas pelo carrapato (HARRISON; FOELIX, 1999). Segundo alguns autores, elas passam por modificações à medida que o processo digestivo evolui, caracterizando assim a ocorrência de momentos fisiológicos específicos, com consequente morfologia celular específica (AGYEI; RUNHAM, 1995; REMEDIO et al., 2013).

Na espécie *R. sanguineus* l. s., devido à estas modificações morfológicas, Remedio et al. (2013) classificaram as mesmas em 4 subtipos: a) digestivas residuais, b) digestivas pinocíticas, d) digestivas fagocíticas e f) digestivas maduras.

Os processos de alimentação e de digestão do sangue são essenciais para os carrapatos, visto ser o sangue uma rica fonte de proteínas e de nutrientes utilizados nos processos anabólicos (como a produção dos ovos) (GRANDJEAN, 1984).

Devido ao sucesso biológico dos carrapatos, estes ectoparasitas vêm sendo cada vez mais alvos de estudos. Deve-se ainda considerar que as alterações climáticas favorecem ainda o aumento populacional de algumas espécies, facilitando o contato com os humanos e aumentando o risco de transmissão de doenças (CAMARGO-MATHIAS, 2018; ESTRADA-PEÑA et al., 2013), tornando necessário realizar o seu controle com eficiência.

Atualmente a principal forma de controle de carrapatos tem sido realizada por meio da aplicação de substâncias químicas, método este que apresenta inconvenientes, tais como o alto custo não só do produto, mas também da aplicação e da mão de obra, o que quando não realizados adequadamente promove a seleção de populações resistentes, além de causarem danos ao meio ambiente e à saúde pública (FREITAS; POHL; VAZ, 2005). Toda essa problemática vem estimulando a busca por métodos de controle que sejam, além de eficientes, também sustentáveis, como os acaricidas naturais, o controle biológico e a produção de vacinas (ANHOLETO et al., 2017; FURQUIM et al., 2011; MATOS et al., 2014; ROMA et al., 2013; SABADIN et al., 2017; VENDRAMINI et al., 2012a, 2012b).

Diante desse cenário, o uso de vacinas, segundo Parizi et al. (2012), seria uma estratégia economicamente viável e benéfica para o controle dos carrapatos. Porém, para tanto há a necessidade de se buscar potenciais antígenos, os quais podem ter diferentes origens (extratos proteicos produzidos a partir de órgãos dos carrapatos ou proteínas isoladas) (ANTUNES et al., 2015; FURQUIM et al., 2011; JITTAPALAPONG et al., 2008; PARIZI et al., 2009, 2012; SABADIN et al., 2017). Os extratos proteicos vêm sendo produzidos ou a partir do carrapato inteiro ou de seus órgãos, tais como das glândulas salivares e dos intestinos (FURQUIM et al., 2011; JITTAPALAPONG et al., 2000, 2008). Segundo Furquim et al. (2011) e Jittapalapong et al. (2008), o extrato da glândula salivar seria capaz de estimular a imunidade nos hospedeiros e de interferir nas glândulas salivares de fêmeas alimentadas nos mesmos. Já entre as proteínas consideradas potencialmente antigênicas, destacam-se a fosfatase ácida e a calreticulina. A primeira por ser uma enzima hidrolítica que catalisa a hidrólise de uma variedade de monoésteres ortofosfórico e que já foi observada no intestino e nas glândulas de fêmeas do

carrapato *R. sanguineus* l. s., *R. (Boophilus) microplus* e *R. appendiculatus*.

As calreticulinas, proteínas ligantes de cálcio, funcionariam como facilitadoras da alimentação por meio de sua ação imunomoduladora e anti-hemostática (BROSSARD; WIKEL, 2004; JAWORSKI et al., 1995; JITTAPALAPONG et al., 2008; KAEWHOM et al., 2008). Além disso, modulariam a imunidade do hospedeiro, mimetizando ou induzindo nestes a autoimunidade (STEEN; BARKER; ALEWOOD, 2006).

Vêm sendo realizados estudos para a avaliação da resposta imunológica por parte do hospedeiro. Nestes, além da análise do soro para comprovação da presença de anticorpos, leva-se também em consideração parâmetros biológicos e morfológicos dos ectoparasitas (ANTUNES et al., 2015; FURQUIM et al., 2011, 2014a, 2014b; PARIZI et al., 2009; SABADIN et al., 2017). Dentre os métodos de avaliação dos parâmetros morfológicos destacam-se as técnicas histológicas, histoquímicas, imunohistoquímica e imunofluorescência. São utilizadas também, ferramentas moleculares, tais como a avaliação da expressão de genes relacionados ao processo de morte. Quando se considera a morte celular apoptótica, sabe-se que a mesma é ativada por duas vias: a intrínseca (mitocondrial) e a extrínseca (citoplasmática). A intrínseca ocorre devido à estímulos internos tais como danos no DNA, no retículo endoplasmático, vírus ou outro trauma celular (MAES; SCHLAMP; NICKELLS, 2017) o que leva a ativação das proteínas BH3-somente, que irão interagir e ativar os genes para as proteínas BaX ou BaK, localizados na membrana externa das mitocôndrias. Essas proteínas provocarão a permeabilidade da membrana externa da mitocôndria, permitindo a saída do citocromo C e interrompendo a cadeia de transporte de elétrons. Este, por sua vez, iniciará a formação do apoptossomo e a cascata de caspase, desencadeando a morte celular apoptótica (MAES; SCHLAMP; NICKELLS, 2017; TAIT; GREEN, 2010). A via extrínseca é ativada por meio de receptor localizado na superfície da membrana celular e é desencadeada por receptores de morte celular, tais como o CD95, Fas ou Apo-1, ligantes específicos da membrana, os quais sinalizarão para a agregação e formação de um complexo indutor de morte, que recrutará a pró-caspase-8, deixando-a ativa, que por sua vez ativará a caspase-3 que executará a morte apoptótica (ANAZETTI; MELO, 2007; GRIVICICH; REGNER; DA ROCHA, 2007).

Assim, diante das informações aqui expostas e devido à grande importância dos carrapatos especificamente da espécie *R. sanguineus* l. s. no cenário da saúde pública, além da dificuldade que se tem encontrado em controlar os carrapatos de forma geral, o presente trabalho teve como objetivo estudar e identificar antígenos que quando compartilhados por diferentes órgãos, tais como as glândulas salivares e o intestino, teriam potencial imunogênico,

contribuindo assim com informações que serão úteis dentro da temática: estratégias eficientes e sustentáveis de controle de carrapatos de importância econômica.

Objetivos

2 OBJETIVOS

Geral:

Com base nas informações anteriormente expostas e considerando-se: a) a importância médico-veterinária dos carrapatos da espécie *R. sanguineus* l. s. e b) a busca por novos métodos de controle destes ectoparasitas, incluindo o desenvolvimento de vacinas, o presente trabalho teve como objetivo: avaliar as alterações nas glândulas salivares e intestino de fêmeas de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* l. s. alimentadas em diferentes períodos frente à resposta imunológica de hospedeiros imunizados com extratos de glândulas salivares de carrapatos e com a calreticulina, visto serem órgãos vitais para o sucesso biológico desse ectoparasita.

Específicos:

a) Avaliar o potencial imunogênico de extratos das glândulas salivares obtidos de fêmeas de carrapatos *R. sanguineus* l. s. alimentadas por 2 e 4 dias em hospedeiros não imunizados, bem como da proteína calreticulina isolada do carrapato *Haemaphysalis longicornis*, expressa em *Escherichia coli* e purificada em laboratório;

b) Detectar a atividade da fosfatase ácida e da calreticulina nas glândulas salivares e no intestino das fêmeas (em ambos os períodos) alimentadas em hospedeiros imunizados e não imunizados;

c) Mapear as alterações morfofisiológicas que ocorrem nas glândulas salivares das fêmeas quando alimentadas em hospedeiros previamente imunizados com a calreticulina isolada de *H. longicornis*;

d) Avaliar nas glândulas salivares das fêmeas alimentadas por 4 dias em hospedeiros imunizados e não imunizados, a expressão dos genes BaX, citocromo C e caspase-8, todos relacionados aos processos de morte celular.

Material e Métodos

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 Carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* l. s. (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae)

Para a realização deste estudo foram utilizadas fêmeas adultas de carrapatos *R. sanguineus* l. s. linhagem tropical, alimentadas por 2 e 4 dias em hospedeiros (coelhos Grupo Genético Botucatu). Para tanto, machos e fêmeas em jejum, oriundos de colônia mantida em estufa BOD nas condições de 29°C, 80% de umidade e fotoperíodo de 12 horas, foram alimentados em coelhos do grupo controle (sem imunização) e naqueles imunizados com extratos das glândulas salivares de 2 e 4 dias (EGS2 e EGS4) e com a proteína calreticulina, segundo procedimento descrito por Bechara et al. (1995).

Esse experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) UNESP – Rio Claro, SP, protocolo nº 11/2014 (Anexo1).

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Infestações para aquisição de fêmeas adultas de carrapatos *R. sanguineus*

Para a aquisição das fêmeas foram realizadas as infestações **A**, **B**, **C** e **D**, segundo procedimento descrito por Bechara et al. (1995).

- **Infestação A:** foi realizada em coelhos não imunizados e virgens de infestação com a utilização de 50 casais de *R. sanguineus* l. s./hospedeiro para obtenção de 100 fêmeas de carrapatos com 2 (50 indivíduos) e 4 (50 indivíduos) dias de alimentação para obtenção de glândulas salivares (**GS2** e **GS4**) e intestino (**I2** e **I4**), onde os números correspondem aos dias de alimentação, GS=glândula salivar, I = intestino. Essas glândulas e intestinos foram utilizados para as técnicas imunohistoquímicas/imunofluorescência e histoquímicas, sendo que as glândulas salivares também foram utilizadas para a obtenção dos extratos para imunização dos hospedeiros, coelhos Grupo Genético Botucatu, virgens de infestação, que foram utilizados nas infestações **B** e **C** (**EGS2** e **EGS4**), onde EGS = extrato de glândula salivar em dias de alimentação.

- **Infestação B:** foi realizada em coelhos imunizados com o extrato **EGS2** utilizando-se 50 casais de carrapatos *R. sanguineus* l. s. adultos/hospedeiro para aquisição de 100 fêmeas com 2 (50 indivíduos) e 4 (50 indivíduos) dias de alimentação para obtenção de glândulas salivares (**GS2-Imu2** e **GS4-Imu2**) e intestino (**I2-Imu2** e **I4-Imu2**). Essas glândulas e intestinos foram utilizados para técnicas de imunohistoquímicas/imunofluorescência e histoquímicas.

- **Infestação C:** foi realizada em coelhos imunizados com o extrato **EGS4** utilizando-se 50 casais de carrapatos *R. sanguineus* l. s. adultos/hospedeiro para aquisição de 100 fêmeas com 2 (50 indivíduos) e 4 (50 indivíduos) dias de alimentação para obtenção de glândulas salivares (**GS2-Imu4** e **GS4-Imu4**) e intestino (**I2-Imu4** e **I4-Imu4**). Essas glândulas e intestinos foram utilizados para técnicas de imunohistoquímicas/imunofluorescência e histoquímicas.

- **Infestação D:** foi realizada em coelhos imunizados com a proteína calreticulina do carrapato *Haemaphysalis longicornis*, expressa em sistema heterólogo de *E. coli* e purificada em laboratório, cedido pelo Dr. Itabajara da Silva Vaz Jr. do Centro de Biotecnologia da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), utilizando-se 50 casais de carrapatos *R. sanguineus* l. s. adultos/hospedeiro para aquisição de 100 fêmeas com 2 (50 indivíduos) e 4 (50 indivíduos) dias de alimentação para obtenção de glândulas salivares (**GS2-ImuCRT** e **GS4-ImuCRT**) e intestino (**I2-ImuCRT** e **I4-ImuCRT**). Essas glândulas e intestinos foram utilizados para técnicas de imunohistoquímicas/imunofluorescência e histoquímicas.

3.2.2. Inoculação nos hospedeiros

Em sala do Biotério do Departamento de Biologia da UNESP de Rio Claro (SP) coelhos virgens de infestação tiveram sua região dorso-lateral direita tosada e subcutaneamente, via seringa hipodérmica, foram inoculados com os extratos **EGS2**, **EGS4** e a proteína calreticulina, por três vezes a intervalos de 21 dias.

Somente após 15 dias da última inoculação, os coelhos foram infestados (Infestação **B**, **C** e **D**) com carrapatos *R. sanguineus* l. s. para aquisição das glândulas salivares e dos intestinos que foram utilizados nas metodologias de microscopia de luz, confocal a laser e molecular.

3.2.3 Preparação dos extratos glandulares para inoculação nos hospedeiros

As fêmeas com 2 e 4 dias de alimentação (infestação **A**) foram retiradas pela região do hipostômio com o auxílio de pinça cirúrgica por meio de movimentos circulares da pele dos coelhos. A seguir, os carrapatos 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 foi realizada a remoção das glândulas salivares.

Nas dependências do Laboratório de Histologia do Departamento de Biologia da UNESP Rio Claro (SP) as glândulas salivares foram colocadas (separadamente por período de alimentação), em microtubos contendo 200 µL de tampão fosfato pH 7,4, onde foram maceradas. Na sequência os tubos foram centrifugados por 30 minutos a 10.000 xg, os sobrenadantes recolhidos foram depositados em microtubos esterelizados e encaminhados para a dosagem de proteínas totais, segundo metodologia descrita por Bradford (1976) (método de Bradford).

Após a determinação do conteúdo protéico de cada amostra, no interior de capela de fluxo laminar vertical pré-estéril, cada extrato foi, separadamente, diluído com tampão fosfato (concentração final de 0,2 µg/µL) e filtrado com auxílio de unidades filtrantes esterelizadas (JBR610303, unidade filtrante descartável Millex GV, membrana durapore PVDF, Millipore, MilliUni), de 0,22 µm e diâmetro de 13 mm, acopladas a seringas hipodérmicas. Depois, os extratos foram alíquotados em volumes de 70 µL e novamente armazenados em microtubos esterelizados em freezer a -20 °C. Somente no momento das inoculações foi realizada a mistura de cada um dos extratos (70 µL de extrato/hospedeiro) com 70 µL de adjuvante de Freund completo (referência nº F 5881, Sigma Aldrich, USA).

3.2.4 Expressão e extração da calreticulina recombinante de *Haemaphysalis longicornis* (CRT-HI)

O plasmídeo, pET-43a expression vector (Novagen), contendo o gene da calreticulina recombinante de *H. longicornis* foi transformado na bactéria *Escherichia coli* AD494 (DE). Essas bactérias transformadas foram plaqueadas em ágar SOB contendo os antibióticos canamicina (50 µg/ml), clorafenicol (3,4 µg/ml) e ampicilina (100 µg/ml), e mantidas em estufa a 37°C para crescimento. Uma colônia isolada foi inoculada em pré-inóculo (30 mL) em meio SOB com ampicilina (100 µg/ml) a 37°C em 160 rpm por 16 horas. Após, foi adicionado em 500 mL de SOB, 5 mL do pré-inóculo incubado à 37° C em agitação de 160 rpm por 2h15 até atingir a densidade óptica (DO) de 0,6 (em sextuplicata). Ao atingir a DO de 0,6, as bactérias

foram induzidas pela adição 1mM de IPTG em incubação a 30°C/180 rpm por 16 horas. O meio com as bactérias foi lavado em PBS, centrifugados a 5000 rpm por 15 minutos e ressuspensionado em 10% do volume inicial em PBS 300mM de NaCl. A amostra foi congelada por 16 horas, sonicada (3 vezes por 30 segundos à 40 MHz no gelo), centrifugada, ressuspensionada em tampão de ligação e armazenada em freezer -20° C. A expressão da CRT-HI foi confirmada através de eletroforese em gel de poliacrilamida em SDS e corado com Coomassie Brilliant Blue.

3.2.5 Purificação da CRT-HI

A proteína recombinante CRT-HI foi expressada com cauda de histidina e purificada através de coluna HisTrap FF (GE Healthcare). A amostra ressuspensionada em tampão de ligação (imidazol 40 mM) foi descongelada, centrifugada e o sobrenadante filtrado em membrana filtrante de 0,2 µm. A coluna de purificação passou por uma limpeza com água filtrada, e após foi equilibrada com tampão de ligação. A amostra foi passada pela coluna e a fração não ligante foi descartada, tendo sido a coluna novamente lavada com tampão de ligação, e efetuada a leitura da densidade óptica (DO) em espectrofotômetro (λ 280 nm), até estar próxima de zero. Realizou-se a passagem do tampão de eluição (imidazol 200 mM), sendo as amostras recolhidas de 1 em 1 mL para leitura das DO's. A coluna foi novamente lavada com tampão de eluição (imidazol 500 mM) para desligar todas as proteínas ligadas a coluna. Devido ao volume as amostras foram divididas em 4 frações e purificadas separadamente. A purificação foi confirmada através de eletroforese em gel de poliacrilamida em SDS e corado com Coomassie Brilliant Blue (**Figura 1A-B**). Foi realizada também a confirmação da expressão da CRT-HI por Western Blot (**Figura 2**).

As frações eluídas foram dialisadas em PBS e quantificadas pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). Aliquotadas em volumes de 70 µL contendo 200 µg de proteínas e utilizadas para a imunização dos hospedeiros.

3.2.6 Western Blot

Os soros dos hospedeiros imunizados tanto com o extrato das glândulas salivares de 2 e 4 dias, quanto com a proteína recombinante calreticulina (CRT-HI) foram analisados por Western Blot. As amostras dos extratos EGS2, EGS4 e da proteína calreticulina, a 1µg/canaleta, foram aplicadas no gel de poliacrilamida 12%. Ao término da migração das amostras pelo gel o mesmo foi transferido para uma membrana de nitrocelulose através de uma corrente constante de 100mA por 1 hora em equipamento de transferência semiseco (Hoefer, GE).

As membranas foram bloqueadas com 0,1M Trisma base, 0,9% NaCl, pH 7.6 (TBS) + 2% de BSA (Sigma-Aldrich, USA) por 1 hora em temperatura ambiente e sob agitação constante, lavadas em TBS-0,1% Tween-20 por 5 minutos sob agitação constante por duas vezes. Os soros foram testados a 1:500 em TBS-0,1% Tween-20 + 2% de leite desnatado (Molico). As membranas foram incubadas com os soros anti-EGS2, anti-EGS4 e anti-CRT-HI por 16 horas à temperatura ambiente e sob agitação constante, lavadas por três vezes em TBS-0,1% Tween-20 por 5 minutos sob agitação constante e incubadas por 1 hora a temperatura ambiente e sob agitação constante com anticorpo secundário anti-IgG coelho conjugado com fosfatase alcalina (Sigma Aldrich, USA) (1:10.000 em TBS-0,1% Tween-20). Lavadas em TBS-0,1% Tween-20 por 5 minutos sob agitação constante (duas vezes). Finalmente foi aplicada a solução de substrato-cromógeno de BCIP/NBT em tampão de revelação. A revelação foi realizada à temperatura ambiente até a coloração ter sido suficiente para visualização da reação. Tomou-se os devidos cuidados para que a membrana não fosse queimada.

3.2.7 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

Para análise da resposta humoral, os soros dos hospedeiros controle e imunizados com a proteína CRT- HI, foram submetidos ao método de ELISA como segue:

A- Sensibilização:

-Foram adicionadas 10 µg de CRT-HI em 50 µL de tampão carbonato-bicarbonato 50 mM pH 9,6 (0,2 µg/µL) em cada poço das placas de titulação, que foram posteriormente incubadas por 16 horas a 4°C.

- Na sequência foram lavadas utilizando o PBS-Tween-20 por 3 vezes, para a remoção do excesso de reagente não adsorvido, para serem posteriormente secas (por inversão) em papel absorvente.

B- Bloqueio:

- Realizou-se o bloqueio dos sítios reativos remanescentes, adicionando-se a cada poço 200 µL de Blotto 5% (leite desnatado 5% em PBS).

- Posteriormente incubou-se as placas por 2 horas à 37°C em estufa. Seguiu-se a lavagem em PBS-Tween-20 e posterior secagem das mesmas.

C- Adição do anticorpo primário:

- Foram adicionados em cada poço das placas 100 µL de soro dos coelhos de ambos os grupos (anticorpo primário) diluído em Blotto 2% em diferentes concentrações (diluição seriada: 1/50 a 1/256000);

- As placas foram incubadas em estufa por 1 hora à 37° C;
- Foram lavadas com PBS-Tween-20 e secas.

D- Adição do anticorpo secundário marcado com a enzima:

- Foram adicionados em cada poço das placas 100 µL do anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com a peroxidase, diluído em Blotto 2% em 1/5000;
- As placas foram incubadas em estufa por 1 hora à 37°C;
- Passaram por lavagem com PBS-Tween-20 e foram posteriormente secas.

E- Revelação:

- Foram adicionados em cada poço das placas, 50 µL do substrato-cromógeno (0,03% de H₂O₂ e 0,4 mg de OPD em tampão citrato-fosfato 0,05M pH 5,0). Na sequência as mesmas foram incubadas (no escuro) por 30 min à temperatura ambiente.
- Procedeu-se o bloqueio da reação em cada poço das placas adicionando-se 25 µL de H₂SO₄ 4N.
- Após, as placas foram lidas em espectrofotômetro de microplaca (EZ Read 400 Microplate Reader, Biochrom) no comprimento de onda de 492 nm.

Os resultados obtidos foram apresentados como média ± e.p.m. e submetido estatisticamente a análise de variância com comparações múltiplas (ANOVA), seguido do teste Bonferroni (duas vias), com significância de $P > 0,0001$. O programa GraphPad Prisma (GraphPad Prism Software Inc, 2007) foi utilizado para conduzir as análises.

3.2.8 Análises *in silico*

O alinhamento das sequências de aminoácidos das CRTs (*H. longicornis* FJ536258, *R. sanguineus* AAR29961) foi realizado através do software BioEdit versão 7.2.6.1. As regiões imunogênicas da CRT foram preditas pelo algoritmo de Jameson Wolf, utilizando o software Laser gene versão 7.0.0.

3.2.9 Detecção da atividade da fosfatase ácida (HUSSEIN; BOWEN; LEWIS, 1990)

Para a realização desta técnica as glândulas salivares e os intestinos das fêmeas de *R. sanguineus* l. s. foram fixados em formalina neutra tamponada 10% (pH 7- 7.4), durante 1 hora e 30 minutos, a 4° C. Na sequência foram lavadas em tampão acetato de sódio (0,05M, pH 4,8) e incubadas por 45 minutos a 37° C em: naftol AS-TR fosfato, DMSO (dimetil sulfóxido), tampão acetato de sódio (0,05M, pH 4,8), MnCl₂.4H₂O 10% e sal vermelho violeta.

Para o preparo do meio de incubação foi dissolvido 3 mg do substrato naftol AS-TR fosfato em duas gotas de DMSO e, em seguida foram adicionados 10 mL de tampão acetato de sódio. Então, foram acrescentados 0,2 mL de cloreto de manganês 10% e 6 mg do sal vermelho violeta e, para finalizar, a solução final foi vigorosamente misturada.

Para o controle, o substrato (3 mg de naftol AS-TR fosfato) foi excluído do meio de incubação. Na sequência, foi realizada a desidratação em concentrações crescentes de álcool (70%, 80%, 90% e 95%) em banhos de 15 minutos e se transferiu o material para resina de embebição e de inclusão (resina Leica). Posteriormente o material foi seccionado, com 7 µm de espessura. As secções foram recolhidas em lâminas de vidro e contra-coradas com hematoxilina de Harris por 3 segundos para as glândulas salivares e 10 segundos para os intestinos. Então, as lâminas depois de secas foram montadas em Etelan® para observação e fotodocumentação em fotomicroscópio Leica DM750.

3.2.10 Teste imunohistoquímico para detecção da calreticulina

Os intestinos das fêmeas de *R. sanguineus* l. s. alimentadas por 2 e 4 dias em hospedeiros controle e imunizados, depois de removidos foram fixados em paraformaldeído 4% por 1 hora e processados histologicamente para inclusão em paraplast. O material foi seccionado com 6 µm de espessura, recolhido em lâminas de vidro Starfrost® e desparafinado. Na sequência, as lâminas foram aquecidas em micro-ondas em tampão citrato para a recuperação antigênica, bloqueadas para peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio, tratadas com Triton X-100 0,5% (Sigma Aldrich, USA) para permeabilização, lavadas por 30 minutos com PBS contendo BSA 3% (Sigma Aldrich, USA) e incubadas em anticorpo policlonal de coelho para calreticulina do carrapato *Haemaphysalis longicornis* (1:100, anticorpo produzido após sucessivas inoculações da proteína calreticulina dessa espécie de carrapato, em coelho hospedeiro) por 1 hora a 37°C. As lâminas foram então lavadas em PBS contendo BSA 3% e incubadas por 1 hora e 30 minutos em anticorpo para IgG de coelho conjugado com peroxidase (1: 100, Sigma Aldrich, USA) à 37° C. O resultado da ligação do anticorpo secundário foi visualizado por meio da utilização do reagente KPL TrueBlue™ peroxidase substrate. As lâminas foram então desidratadas, secas, montadas com Entellan®, observadas e fotodocumentadas em fotomicroscópio Leica DM750.

3.2.11 Detecção da calreticulina por imunofluorescência (adaptado de ANTUNES et al., 2015)

As glândulas salivares das fêmeas de *R.sanguineus* l. s. alimentadas por 2 e 4 dias em coelhos hospedeiros controle e imunizados (EGS2, EGS4 e CRT-HI) foram fixadas em RNA later (Sigma Aldrich, USA) e armazenados em freezer -80° C. Após foram lavadas em PBS (pH 7,4) por 10 minutos (2x) e pós-fixadas em formaldeído 3,7% em PBS por 2 horas. As glândulas foram novamente lavadas em PBS, permeabilizadas com Triton-X100 0,5% (Sigma Aldrich, USA) em PBS por 30 minutos, lavadas em PBS para retirar o excesso e foram bloqueados os sítios inespecíficos com BSA 3% (Sigma Aldrich, USA) a 4° C por 16 horas. Foram lavadas em PBS, e incubadas com soro de coelho imunizado com a CRT-HI diluído em PBS (1:50) em solução de bloqueio por 1 hora a 37°C, lavados em PBS, e incubados com anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com FITC (488 green) (Rhea Biotech, Brasil) diluído (1:100) em solução de bloqueio por 1 hora a 37°C. Após a lavagem final com PBS, as glândulas salivares foram submetidas a montagem total em meio ProLong® Gold Antifade com DAPI (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) e cobertas com lamínulas. As imagens foram adquiridas em microscópio de varredura a laser confocal Leica TCS-SP5 II, com ganho de 1000, offset -1,0% e potência de laser à 19%. Os padrões foram estabelecidos para comparação da emissão de fluorescência das glândulas salivares do grupo controle com os imunizados.

3.2.12 Extração do RNA e síntese de cDNA

Para extração do RNA das glândulas salivares das fêmeas de *R. sanguineus* l. s. alimentadas por 4 dias em hospedeiros imunizados com extrato das glândulas salivares (EGS2 e EGS4) e com a calreticulina (CRT), utilizou-se a solução monofásica de isotiocianato de guanidina e fenol, Trizol (Invitrogen Life Technologies, Estados Unidos), segundo protocolo do fabricante, com pequenas modificações. Após adição de 100 µL do reagente Trizol a cada amostra, estas foram maceradas e homogeneizadas com pistilo mecânico e em seguida incubadas por 16 horas a 4°C. Na sequência, adicionou-se a cada tubo 20 µL de clorofórmio e procedeu-se a centrifugação a 12.000 x g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante, contendo o RNA, foi transferido para um novo tubo com auxílio de micropipeta, sendo adicionados 50 µL de álcool isopropílico à 4°C. Após incubação à temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugação a 12.000 x g por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi removido e o sedimento lavado com 100 µL de etanol a 75%. Após nova centrifugação a 7.500 x g por 5 minutos a 4°C, o etanol foi retirado, os tubos foram mantidos abertos em temperatura ambiente por 10 minutos

para secagem e o sedimento ressuspensionado com água livre de DNases e RNases. A concentração de RNA total foi estimada em espectrofotômetro (NanoDrop ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer, NanoDrop Technologies) usando absorbância a 260 nm, e sua qualidade foi verificada por eletroforese em gel desnaturante de agarose (1%) corado com brometo de etídio.

Para a síntese do cDNA, as amostras foram normalizadas, diluindo-se cada uma delas para uma concentração final de 265 ng/μL. O cDNA foi sintetizado utilizando-se o kit iScript cDNA synthesis (Bio-rad Laboratories, California, Estados Unidos), de acordo com recomendações do fabricante. Para a síntese de 20 μL de cDNA foram utilizados 15 μL da amostra normalizada, 4 μL da mix 5x iScript reaction e 1 μL da transcriptase reversa iScript. As reações foram realizadas em termociclador T100 (Bio-rad Laboratories, California, Estados Unidos), utilizando-se uma etapa de preparação de 5 minutos a 25° C, seguida pela etapa da transcrição reversa a 46° C durante 20 minutos e finalmente, procedeu-se a inativação da transcriptase reversa mantendo-se a temperatura de 95° C por 1 minuto. O cDNA produzido foi armazenado a -20° C para posterior utilização nas reações da polimerase em cadeia em tempo real (qPCR).

3.2.13 Amplificação de genes relacionados à morte celular por PCR em tempo real

A avaliação da expressão de alguns genes foi utilizada para mensurar o efeito dos tratamentos no processo de morte celular. Foram utilizados neste estudo genes que codificam proteínas envolvidas na via intrínseca da morte celular, como BaX (**B** cell leukemia/lymphoma-2 associated **X**) e citocromo C, bem como o gene que codifica a caspase-8, envolvida na via extrínseca do processo de morte celular. Oligonucleotídeos iniciadores específicos foram desenhados com o auxílio do software Primer 3 versão 0.4.0, a partir de sequências depositadas em base de dados como UniProt, utilizando-se a plataforma Blast2GO. A reação foi padronizada a fim de garantir a melhor temperatura e a concentração ideal dos oligonucleotídeos iniciadores, e o produto da PCR foi sequenciado através do método Sanger, feito pela STABVIDA Portugal, garantindo a amplificação do alvo correto. Os genes que codificam a proteína ribossomal 16S rRNA, a β-tubulina e o fator de alongação 1 (ELF1) foram utilizados como genes de referência, os quais foram escolhidos com base na literatura (FERROLHO et al., 2017; ZIVKOVIC et al., 2010). Os oligonucleotídeos iniciadores e as condições ideais utilizadas na qPCR são apresentadas na **Tabela 1**, sendo que para determinar

a temperatura de anelamento foi realizado um gradiente de temperatura de 55°C a 95°C com acréscimo de 0,5°C por 5 segundos e utilizando diferentes concentrações dos oligonucleotídeos iniciadores (de 0,1; 0,2 e 0,5 µM). Os ensaios de amplificação foram realizados em triplicata utilizando uma reação de volume total final de 10 µL, contendo uma mistura de 1 µL do cDNA-amostra, 5 µL de tampão iQ SYBR Green Supermix (BioRad, California, USA), 0,2 µM de cada oligonucleotídeo iniciador para a caspase e 0,5 µM para os demais genes, e água ultrapura esterilizada (VWR, Alfragide, Portugal) q.s.p. 10 µL. As reações de amplificação foram conduzidas em placas de PCR de padrão baixo do tipo “multiplate unskirted” (Bio-rad Laboratories, California, Estados Unidos) contendo 96 poços, em aparelho termociclador CFX96 Thermal Cycler (Bio-Rad, Califórnia, Estados Unidos). Adicionalmente, foram realizadas análises de sensibilidade das reações de qPCR, utilizando 6 diluições em série (de 10⁻¹ a 10⁻⁶) com cDNA de *R. sanguineus* l. s. para os genes de referência e com fragmentos sintetizados (gBlock) para os genes relacionados com a morte celular. A eficiência de amplificação foi calculada a partir da inclinação da curva padrão em cada corrida, utilizando a seguinte fórmula ($E = 10^{-1 / \text{inclinação}}$) (BUSTIN et al., 2009). Todas as análises foram realizadas obedecendo às normas estabelecidas pelo MIQE (Minimum Information for publication of Quantitative real-time PCR Experiments) (BUSTIN et al., 2009). Água ultrapura esterilizada (VWR, Alfragide, Portugal) foi utilizada como controle negativo nos ensaios de qPCR.

3.2.14 Análise da expressão dos genes relacionados à morte celular

A análise da expressão dos genes relacionados ao processo de morte celular foi conduzida utilizando-se o programa Bio-Rad CFX Manager™ (Bio-rad Laboratories, California, Estados Unidos). Os níveis de expressão destes genes foram normalizados com os genes de referência 16S rRNA, β-tubulina e ELF1. O cálculo da expressão normalizada relativa de cada gene foi calculada pelo método do 2-ΔΔC_q, que calcula a diferença entre os valores de C_q do gene alvo e dos genes de referência (ΔC_q) e compara estes valores. Os genes foram considerados diferencialmente expressos para cima ou para baixo considerando um limiar de 1,3 vezes e intervalo de confiança de 95% ($P < 0,05$).

Figura 1: (A) SDS-Page das amostras para confirmação do processo de expressão e de purificação da proteína recombinante calreticulina. (1) – Padrão de peso molecular – IgG bovino; (3) – Extrato total antes da purificação; (5) – Fração não ligante; (7) – Eluído de 200 mM após 4 ml; (8) – Eluído de 200 mM após 5 ml; (9 – 10) – Eluído de 500 mM. (2; 4 e 6) – vazio (B) SDS-Page das amostras para confirmação do processo de expressão e de purificação da proteína recombinante calreticulina. (1) – Padrão de peso molecular – IgG bovino; (2) – Extrato total (a) antes da purificação; (3) – Fração não ligante da amostra 1; (4) – Amostra 1; (5) – Amostra 2; (6) – Extrato total (b) antes da purificação; (7) – Fração não ligante da amostra 3; (8) – Amostra 3; (9) – Fração não ligante da amostra 4; (10) – Amostra 4.

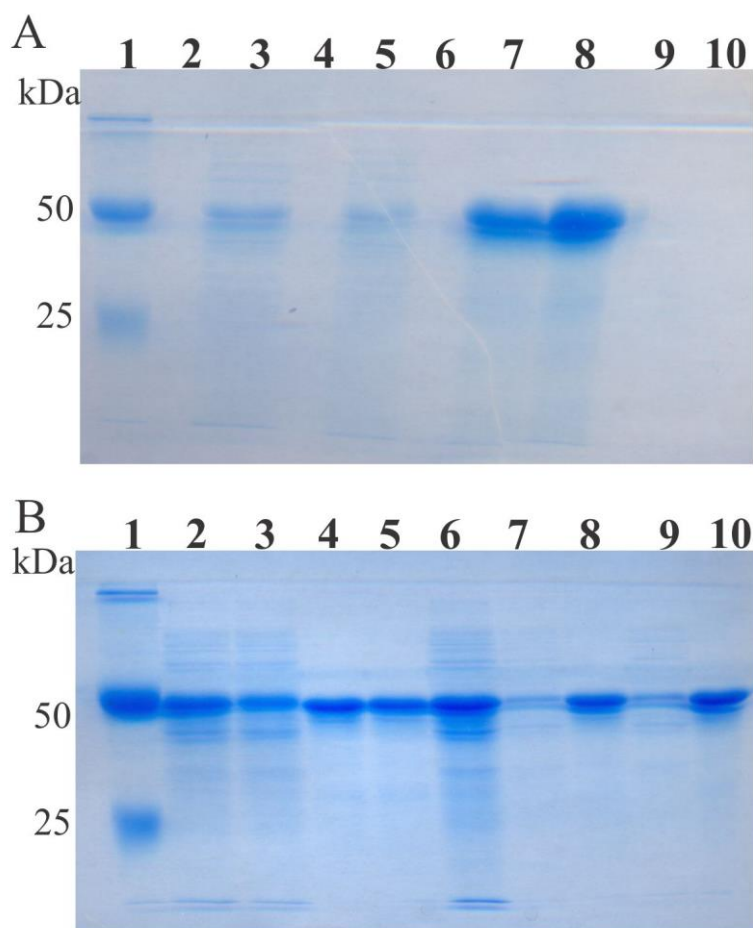


Figura 2: Western Blot para a confirmação da expressão e purificação da proteína calreticulina (CRT-HI). Controle positivo CRT-HI: incubado com soro bovino anti-CRT; **(1)** amostra 3; **(3)** Amostra conhecida de CRT-HI; Controle negativo CRT-HI: incubado com soro bovino anti-GST; **(4)** IgG bovino; **(5)** amostra 1; Controle positivo anti-histidina: incubado com anticorpo monoclonal anti-histidina; **(6)** amostra 3; **(8)** Amostra conhecida de CRT-HI; Controle negativo histidina: incubado sem soro e sem anticorpo; **(9)** IgG bovino; **(10)** amostra 1.

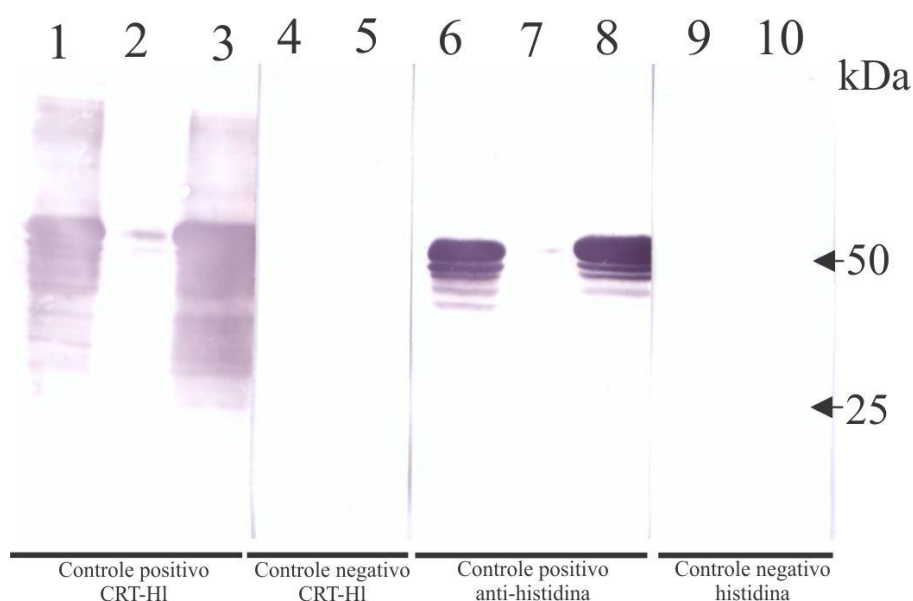


Tabela 1 - Conjunto de oligonucleotídeos iniciadores e as condições utilizadas na qPCR

Gene	Primers	Condições
Citocromo C	F: 5'- GTC TCA TTG GAC GCA AGA CA -3' R: 5'- TAA GGC CAG CAA AAA CCA TC - 3'	95°C por 3 min, 45 ciclos de 95°C por 15 seg, anelamento 60°C por 30 seg e 55°C à 95°C com acréscimo de 0,5°C por 5 seg.
BaX	F: 5'- ACT CGG GAC AAC CTC ACA AC -3' R: 5'- TCG CTG CAG AAG AAG AAG AA - 3'	95°C por 3 min, 45 ciclos de 95°C por 15 seg, anelamento 60°C por 30 seg e 55°C à 95°C com acréscimo de 0,5°C por 5 seg
Caspase 8	F: 5'- TGC GAA AGT TCG AGC CCA TG -3' R: 5'- GAA GTG CCT TGA GAT CTC CG - 3'	95°C por 3 min, 45 ciclos de 95°C por 15 seg, anelamento 60°C por 30 seg e 55°C à 95°C com acréscimo de 0,5°C por 5 seg
16S Ticks	F: 5'- GAC AAG AAG ACC CTA -3' R: 5'- ATC CAA CAT CGA GGT - 3' (ZIVKOVIC et al., 2010)	95°C por 3 min, 45 ciclos de 95°C por 15 seg, anelamento 57,2°C por 30 seg e 55°C à 95°C com acréscimo de 0,5°C por 5 seg.
ELF	F: 5'- CGT CTA CAA GAT TGG TGG CAT T -3' R: 5'- CTC AGT GGT CAG GTT GGC AG - 3' (FERROLHO et al., 2017)	95°C por 3 min, 45 ciclos de 95°C por 15 seg, anelamento 57,2°C por 30 seg e 55°C à 95°C com acréscimo de 0,5°C por 5 seg.
β-tubulina	F: 5'- AAC ATG GTG CCC TTC CCA CG -3' R: 5'- GCA GCC ATC ATG TTC TTT GC - 3' (FERROLHO et al., 2017)	95°C por 3 min, 45 ciclos de 95°C por 15 seg, anelamento 58°C por 30 seg e 55°C à 95°C com acréscimo de 0,5°C por 5 seg.

Resultados

4 RESULTADOS

Os resultados obtidos no presente trabalho estão aqui apresentados sob a forma de cinco capítulos (artigos científicos publicado ou em preparação para ser submetido em periódicos científicos internacionais especializados na área objeto do estudo e um capítulo de livro publicado):

Capítulo 1: Dinâmica da síntese e secreção das enzimas fosfatase ácida e da calreticulina nas glândulas salivares de fêmeas de *Rhipicephalus sanguineus* l. s. alimentadas por 2 e 4 dias em hospedeiros imunizados com extratos glandulares

Capítulo 2: Midgut of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae) females fed for 2 and 4 days: acid phosphatase detection and morphophysiology of epithelial cells

Capítulo 3: Localização da fosfatase ácida e da proteína calreticulina nas células do intestino médio de fêmeas de *Rhipicephalus sanguineus* l. s. alimentadas por 2 e 4 dias em hospedeiros imunizados com extrato de glândula salivar desta mesma espécie

Capítulo 4: A proteína calreticulina: antígeno candidato nos estudos de imunogenicidade contra *Rhipicephalus sanguineus* l. s.

Capítulo 5: Tick feeding process (digestory system)

Capítulo 1

CAPÍTULO 1

Dinâmica da síntese e secreção das enzimas fosfatase ácida e da calreticulina nas glândulas salivares de fêmeas de *Rhipicephalus sanguineus* l. s. alimentadas por 2 e 4 dias em hospedeiros imunizados com extratos glandulares.

Elen Fernanda Nodari¹, Melissa Carolina Pereira¹, Marina Rodrigues de Abreu¹, Gustavo Seron Sanches², Sandra Antunes², Ana Domingos², Letícia Maria Gráballos Ferraz Hebling¹, Luiz Juliano³, Luis Fernando Parizi⁴, Itabajara da Silva Vaz Júnior⁴ e Maria Izabel Camargo-Mathias^{1*}

¹UNESP – Universidade Estadual Paulista, Avenida 24 A, 1515, 13506-900 - Rio Claro, SP, Brasil, CP 199

²IHMT – Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Nova Universidade de Lisboa, Rua da Junqueira 100, 1349-008, Lisboa, Portugal

³UNIFESP – Universidade Federal de São Paulo, Rua Botucatu, 862, 7º andar, 04023-062 - São Paulo, SP, Brasil, CP 199

⁴UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Centro de Biotecnologia, Avenida Bento Gonçalves, 9500, Porto Alegre 91501-970, RS, Brasil

* Autor correspondente. E-mail: micm@rc.unesp.br

RESUMO

Os carrapatos, ectoparasitas hematófagos obrigatórios de grande sucesso biológico, tem nas suas glândulas salivares a base para esse sucesso. Esse órgão desempenha várias funções, tais como a produção de substâncias para a fixação e alimentação ao hospedeiro. O presente estudo teve como objetivo avaliar a resistência adquirida por hospedeiros após sucessivas imunizações com extratos glandulares EGS2 e EGS4. Além disso, identificou a presença da fosfatase ácida e da calreticulina e avaliou a expressão dos genes relacionados a morte apoptótica, nos ácinos da glândula salivar de fêmeas de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* l. s. alimentadas por 2 e 4 dias nesses hospedeiros. Os resultados mostraram que os EGS2 e EGS4 induziram a aquisição de resistência no hospedeiro, e influenciaram no processo de secreção da fosfatase ácida, o que consequentemente interferiu na fisiologia da glândula, diminuindo a eficiência da alimentação do ectoparasita e induzindo a degeneração precoce deste órgão através da morte apoptótica intrínseca.

Palavras-chave: fosfatase ácida; calreticulina; imunidade adquirida; carrapatos; controle.

1 INTRODUÇÃO

Os carrapatos, ectoparasitas hematófagos obrigatórios tem nas glândulas salivares a base para o seu sucesso biológico, visto as mesmas desempenharem papéis importantes para sobrevivência do animal (BINNINGTON, 1978; CAMARGO-MATHIAS; FURQUIM; NUNES, 2011; WALKER; FLETCHER; GILL, 1985). A saliva dos carrapatos é uma mistura de bioativos que age durante os períodos de parasitismo e de não parasitismo (SONENSHINE; ROE, 2014), inclusive sendo caracterizada pela função de modulação do sistema imune-inflamatório do hospedeiro (CAMARGO-MATHIAS; FURQUIM; NUNES, 2011; FURQUIM et al., 2011; SAUER; ESSENBERG; BOWMAN, 2000; WIKEL, 1999) suprimindo-o desde os primeiros dias de alimentação e, conseqüentemente funcionando como uma porta de entrada para a transmissão de patógenos aos seus hospedeiros (BALASHOV, 1972; DANTAS-TORRES; OTRANTO, 2015; WIKEL, 1999). Nas glândulas também são produzidos proteínas (FURQUIM et al., 2011; GILL; BOID; ROSS, 1986; JITTAPALAPONG et al., 2000a; NUNES; BECHARA; CAMARGO-MATHIAS, 2011) os quais possuem potencial para mobilizar o sistema imune do hospedeiro, e são alvos em pesquisas para a produção de vacinas.

A aquisição de resistência por parte dos hospedeiros vem sendo foco de vários estudos realizados: a) através de sucessivas infestações de carrapatos (JITTAPALAPONG et al., 2000a; NUNES; BECHARA; CAMARGO-MATHIAS, 2011; VERONEZ et al., 2010), b) pela inoculação de extratos produzidos a partir de partes, órgãos ou do carrapato inteiro (FERREIRA; MACHADO; BECHARA, 1996; FURQUIM et al., 2011; HEBLING et al., 2013; JITTAPALAPONG et al., 2000a, 2000b, 2008) e c) a partir do isolamento de proteínas (PARIZI et al., 2009, 2012; SABADIN et al., 2017).

Além disso, muitos métodos vêm sendo postulados e utilizados para determinar a resistência nos hospedeiros. Estas avaliações tem sido realizadas tanto a partir da resposta imunológica do hospedeiro frente a imunização com extratos aplicados sucessivamente via subcutânea (HEBLING et al., 2013; JITTAPALAPONG et al., 2000b), quanto pela avaliação de parâmetros tais como a progressão dos processos de alimentação, de reprodução, além da análise das alterações morfológicas que eventualmente ocorrem nas glândulas salivares e no intestino, quando analisados carrapatos alimentados em hospedeiros previamente imunizados ou após sucessivas infestações (CAPERUCCI; BECHARA; CAMARGO-MATHIAS, 2010; CAPERUCCI; CAMARGO-MATHIAS; BECHARA, 2009; FURQUIM et al., 2011; JITTAPALAPONG et al., 2008; NUNES; BECHARA; CAMARGO-MATHIAS, 2011; VERONEZ et al., 2010).

Muitos autores vêm estudando questões relativas a resposta imunológica relacionada ao parasitismo com carrapatos. Nesta direção Gill, Boid e Ross (1986) reportaram a ocorrência de resposta intensa a alguns antígenos glandulares (glicoproteínas, fosfatase ácida, esterases e aminopeptidases) do carrapato *Hyalomma anatolicum anatolicum*, sintetizados principalmente pelas células dos ácinos II e III de fêmeas (BINNINGTON, 1978; WALKER; FLETCHER; GILL, 1985). Especificamente a enzima fosfatase ácida, catalisadora da hidrólise de uma variedade de monoésteres ortofosfóricos, também está presente nas glândulas salivares de *Rhipicephalus sanguineus* l. s., *R. (Boophilus) microplus*, *R. appendiculatus* e *H. anatolicum anatolicum*, confirmando a sua importante participação no metabolismo celular durante os processos de produção e liberação da secreção glandular (BINNINGTON, 1978; FURQUIM; BECHARA; CAMARGO-MATHIAS, 2008; NODARI et al., 2012; NUNES; CAMARGO-MATHIAS; BECHARA, 2006a, 2006b; WALKER; FLETCHER; GILL, 1985).

Outra proteína importante presente nas glândulas salivares dos carrapatos é a calreticulina, uma proteína transportadora de cálcio, sendo facilitadora do processo de alimentação e transmissão de patógenos, através de sua atividade anti-trombótica e inibidora do sistema complemento dos hospedeiros (KAEWHOM et al., 2008), proteína essa que vem sendo considerada um potencial antígeno candidato a vacinas (KAEWHOM et al., 2008; PARIZI et al., 2009; RADULOVIĆ et al., 2014).

Assim, considerando essas informações, o presente estudo teve por objetivo, avaliar o potencial imunogênico de extratos obtidos a partir de glândulas salivares de fêmeas de carrapatos *R. sanguineus* l. s. alimentadas por 2 e 4 dias (EGS2 e EGS4), através da análise do soro coletado de hospedeiros imunizados. Além disso, foi objetivo confirmar a presença e detectar a atividade da fosfatase ácida e da calreticulina nas células das glândulas salivares de fêmeas alimentadas em hospedeiros imunizados, visto estas duas proteínas terem sido identificadas como antígenos glandulares iniciadores de intensa resposta imunológica (GILL; BOID; ROSS, 1986; KAEWHOM et al., 2008; RADULOVIĆ et al., 2014). A obtenção de informações desta natureza certamente fornecerá subsídios para desenvolvimento de novas estratégias de controle destes ectoparasitas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

2.1.1 Carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* l. s. (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae)

Para a realização deste estudo foram utilizadas fêmeas adultas de carrapatos *R. sanguineus* l. s. linhagem tropical, alimentadas por 2 e 4 dias em hospedeiros (coelhos Grupo Genético Botucatu). Para tanto, machos e fêmeas em jejum, oriundos de colônia mantida em estufa BOD nas condições de 29°C, 80% de umidade e fotoperíodo de 12 horas, foram alimentados em coelhos do grupo controle (sem imunização) e naqueles imunizados com extratos das glândulas salivares de 2 e 4 dias (EGS2 e EGS4), segundo procedimento descrito por Bechara et al. (1995).

Esse experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) UNESP – Rio Claro, SP, protocolo nº 11/2014.

2.2 Métodos

2.2.1 Inoculação nos hospedeiros

Em sala do Biotério do Departamento de Biologia, do Instituto de Biociências da UNESP de Rio Claro (SP) coelhas virgens de infestação tiveram sua região dorso-lateral tosada e subcutaneamente, com seringa hipodérmica, foram inoculadas com os extratos EGS2 e EGS4 por três vezes a intervalos de 21 dias.

Os soros dos coelhos foram recolhidos antes do processo de imunização e após 15 dias da última inoculação para análise e comprovação do processo de imunização por meio de Western Blot. Somente após 15 dias da última inoculação, os coelhos foram infestados com carrapatos *R. sanguineus* l. s.

2.2.2 Western Blot

As amostras dos extratos EGS2 e EGS4 (extrato das glândulas salivares de fêmeas alimentadas por 2 e 4 dias), utilizados para a inoculação nos hospedeiros, a 1 µg/canaleta, foram aplicadas no gel de poliacrilamida 12%. Ao término da migração das amostras pelo gel o mesmo foi transferido para uma membrana de nitrocelulose através de uma corrente constante de 100mA por 1 hora em equipamento de transferência semiseco (Hoefer, GE).

As membranas foram bloqueadas com 0,1 M Trisma base, 0,9% NaCl, pH 7,6 (TBS) + 2% de BSA (Sigma Aldrich, USA) por 1 hora em temperatura ambiente e sob agitação constante, lavadas em TBS-0,1% Tween-20 por 5 minutos sob agitação constante por duas vezes. As membranas foram incubadas com o soro anti-EGS2 e anti-EGS4 (1:500 em TBS-0,1% Tween-20 + 2% de leite desnatado) por 16 horas à temperatura ambiente e sob agitação constante, lavadas por três vezes em TBS-0,1% Tween-20 por 5 minutos sob agitação constante e incubadas por 1 hora a temperatura ambiente e sob agitação constante com anticorpo secundário anti-IgG coelho conjugado com fosfatase alcalina (Sigma Aldrich, USA), diluído 1:10.000 em TBS-0,1% Tween-20. Lavadas em TBS-0,1% Tween-20 por 5 minutos sob agitação constante (duas vezes). Finalmente foi aplicada a solução de substrato-cromógeno de BCIP/NBT em tampão de revelação. A revelação foi realizada à temperatura ambiente até a coloração ter sido suficiente para visualização da reação. Tomou-se os devidos cuidados para que a membrana não fosse queimada.

2.2.3 Detecção da atividade da fosfatase ácida (HUSSEIN et al., 1990)

As glândulas salivares das fêmeas alimentadas por 2 e 4 dias em coelhos hospedeiros controle e imunizados (EGS2 e EGS4) foram fixadas em formalina neutra tamponada 10% (pH 7- 7.4), durante 1 hora e 30 minutos, a 4° C. Na sequência foram lavadas em tampão acetato de sódio (0.05M, pH 4.8) e incubadas por 45 minutos a 37° C em: naftol AS-TR fosfato, DMSO (dimetil sulfóxido), tampão acetato de sódio (0.05M, pH 4.8), MnCl₂.4H₂O 10% e sal vermelho violeta.

Como controle, o substrato (3 mg de naftol AS-TR fosfato) foi removido do meio de incubação. Na sequência, foi realizada a desidratação das glândulas em concentrações crescentes de álcool (70%, 80%, 90% e 95%) em banhos de 15 minutos e após foram transferidas para resina de embebição e de inclusão (resina Leica). Posteriormente foram seccionadas com 7 µm de espessura e as secções foram recolhidas em lâminas de vidro para serem contra-coradas com verde de metila por 5 segundos. Depois de secas as lâminas foram montadas em Etellan[®] para observação e fotodocumentação em fotomicroscópio Leica DM750.

2.2.4 Detecção da calreticulina por imunofluorescência (adaptado de ANTUNES et al., 2015)

As glândulas salivares das fêmeas alimentadas por 2 e 4 dias em coelhos hospedeiros controle e imunizados (EGS2 e EGS4) foram fixadas em RNA later (Sigma Aldrich, USA) e

armazenados em freezer -80° C. Após foram lavadas em PBS (pH 7,4) por 10 minutos (2x) e pós-fixadas em formaldeído 3,7% em PBS por 2 horas. As glândulas foram novamente lavadas em PBS, permeabilizadas com Triton-X100 0,5% (Sigma Aldrich, USA) em PBS por 30 minutos, lavadas em PBS para retirar o excesso e foram bloqueados os sítios inespecíficos com BSA 3% (Sigma Aldrich, USA) a 4° C por 16 horas. Foram lavadas em PBS, e incubadas com soro de coelho imunizado com a CRT-HI diluído em PBS (1:50) em solução de bloqueio por 1 hora a 37°C, lavados em PBS, e incubados com anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com FITC (488 green) (Rhea Biotech, Brasil) diluído (1:100) em solução de bloqueio por 1 hora a 37°C. Após a lavagem final com PBS, as glândulas salivares foram submetidas a montagem total em meio ProLong® Gold Antifade com DAPI (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) e cobertas com lamínulas. As imagens foram adquiridas em microscópio de varredura a laser confocal Leica TCS-SP5 II, com ganho de 1000, offset -1,0% e potência de laser à 19%. Os padrões foram estabelecidos para comparação da emissão de fluorescência das glândulas salivares do grupo controle com os imunizados.

2.2.5 Extração do RNA e síntese de cDNA

Para extração do RNA das glândulas salivares das fêmeas alimentadas por 4 dias em hospedeiros imunizados com extrato das glândulas salivares (EGS2 e EGS4) e em hospedeiros não imunizado, utilizou-se a solução monofásica de isotiocianato de guanidina e fenol, Trizol (Invitrogen Life Technologies, Estados Unidos), segundo protocolo do fabricante, com pequenas modificações. Após adição de 100 µL do reagente Trizol a cada amostra, estas foram maceradas e homogeneizadas com pistilo mecânico e em seguida incubadas por 16 horas a 4°C. Na sequência, adicionou-se a cada tubo 20 µL de clorofórmio e procedeu-se a centrifugação a 12.000 x g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante, contendo o RNA, foi transferido para um novo tubo com auxílio de micropipeta, sendo adicionados 50 µL de álcool isopropílico à 4°C. Após incubação à temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugação a 12.000 x g por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi removido e o sedimento lavado com 100 µL de etanol a 75%. Após nova centrifugação a 7.500 x g por 5 minutos a 4°C, o etanol foi retirado, os tubos foram mantidos abertos em temperatura ambiente por 10 minutos para secagem e o sedimento ressuspenso com água livre de DNases e RNases. A concentração de RNA total foi estimada em espectrofotômetro (NanoDrop ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer, NanoDrop Technologies) usando absorvância a 260 nm, e sua qualidade foi verificada por eletroforese em gel de agarose (1%) corado com brometo de etídio.

Para a síntese do cDNA, as amostras foram normalizadas, diluindo-se cada uma delas para uma concentração final de 265 ng/μL. O cDNA foi sintetizado utilizando-se o kit iScript cDNA synthesis (Bio-rad Laboratories, California, Estados Unidos), de acordo com recomendações do fabricante. Para a síntese de 20 μL de cDNA foram utilizados 15 μL da amostra normalizada, 4 μL da mix 5x iScript reaction e 1 μL da transcriptase reversa iScript. As reações foram realizadas em termociclador T100 (Bio-rad Laboratories, California, Estados Unidos), utilizando-se uma etapa de preparação de 5 minutos a 25 °C, seguida pela etapa da transcrição reversa a 46°C durante 20 minutos e finalmente, procedeu-se a inativação da transcriptase reversa mantendo-se a temperatura de 95°C por 1 minuto. O cDNA produzido foi armazenado a -20°C para posterior utilização nas reações da polimerase em cadeia em tempo real (qPCR).

2.2.6 Amplificação de genes relacionados à morte celular por PCR em tempo real

A avaliação da expressão de alguns genes foi utilizada para mensurar o efeito dos tratamentos no processo de morte celular. Foram utilizados neste estudo genes que codificam proteínas envolvidas na via intrínseca da morte celular, como BaX (**B** cell leukemia/lymphoma-2 associated **X**) e citocromo C, bem como o gene que codifica a caspase-8, envolvida na via extrínseca do processo de morte celular. Oligonucleotídeos iniciadores específicos foram desenhados com o auxílio do software Primer 3 versão 0.4.0, a partir de sequências depositadas em base de dados como UniProt, utilizando-se a plataforma Blast2GO. A reação foi padronizada a fim de garantir a melhor temperatura e a concentração ideal dos oligonucleotídeos iniciadores, e o produto da PCR foi sequenciado através do método Sanger, feito pela STABVIDA Portugal, garantindo a amplificação do alvo correto. Os genes que codificam a proteína ribossomal 16S rRNA, a β-tubulina e o fator de alongação 1 (ELF1) foram utilizados como genes de referência, os quais foram escolhidos com base na literatura (FERROLHO et al., 2017; ZIVKOVIC et al., 2010). Os oligonucleotídeos iniciadores e as condições ideais utilizadas na qPCR são apresentadas na **Tabela 1**, sendo que para determinar a temperatura de anelamento foi realizado um gradiente de temperatura de 55°C a 95°C com acréscimo de 0,5°C por 5 segundos e utilizando diferentes concentrações dos oligonucleotídios iniciadores (de 0,1; 0,2 e 0,5 μM). Os ensaios de amplificação foram realizados em triplicata utilizando uma reação de volume total final de 10 μL, contendo uma mistura de 1 μL do cDNA-amostra, 5 μL de tampão iQ SYBR Green Supermix (BioRad, California, USA), 0,2 μM de cada

oligonucleotídeo iniciador para a caspase e 0,5 μ M para os demais genes, e água ultrapura esterilizada (VWR, Alfragide, Portugal) q.s.p. 10 μ L. As reações de amplificação foram conduzidas em placas de PCR de padrão baixo do tipo “multiplate unskirted” (Bio-rad Laboratories, California, Estados Unidos) contendo 96 poços, em aparelho termociclador CFX96 Thermal Cyclor (Bio-Rad, Califórnia, Estados Unidos). Adicionalmente, foram realizadas análises de sensibilidade das reações de qPCR, utilizando 6 diluições em série (de 10⁻¹ a 10⁻⁶) com cDNA de *R. sanguineus* l. s. para os genes de referência e com fragmentos sintetizados (gBlock) para os genes relacionados com a morte celular. A eficiência de amplificação foi calculada a partir da inclinação da curva padrão em cada corrida, utilizando a seguinte fórmula ($E = 10^{-1} / \text{inclinação}$) (BUSTIN et al., 2009). Todas as análises foram realizadas obedecendo às normas estabelecidas pelo MIQE (Minimum Information for publication of Quantitative real-time PCR Experiments) (**Tabela 2**) (BUSTIN et al., 2009). Água ultra-pura esterilizada (VWR, Alfragide, Portugal) foi utilizada como controle negativo nos ensaios de qPCR.

2.2.7 Análise da expressão dos genes relacionados à morte celular

A análise da expressão dos genes relacionados ao processo de morte celular foi conduzida utilizando-se o programa Bio-Rad CFX Manager™ (Bio-rad Laboratories, California, Estados Unidos). Os níveis de expressão destes genes foram normalizados com os genes de referência 16S rRNA, β -tubulina e ELF1. O cálculo da expressão normalizada relativa de cada gene foi calculada pelo método do 2- $\Delta\Delta C_q$, que calcula a diferença entre os valores de C_q do gene alvo e dos genes de referência (ΔC_q) e compara estes valores. Os genes foram considerados diferencialmente expressos para cima ou para baixo considerando um limiar de 1,3 vezes e intervalo de confiança de 95% ($P < 0,05$).

3 RESULTADOS

3.1 Western Blot

A análise dos soros dos coelhos hospedeiros controle e imunizados com extrato das glândulas salivares (EGS2 e EGS4), comprovaram a ocorrência de processo de imunização. Nos animais controle, ou seja, aqueles que não tiveram contato prévio com carrapatos, observou-se que no soro não estavam presentes níveis detectáveis de anticorpos contra as proteínas dos extratos (**Fig.1-2**). Nos animais imunizados com EGS2, observou-se no soro a

presença de anticorpos contra proteínas do EGS2 com peso molecular (PM) de 23 e 21 kDa, bem como do EGS2 e EGS4 com PM aproximado de 59,5 e 57 kDa (**Fig. 1**). Os hospedeiros imunizados com EGS4, produziram anticorpos contra as proteínas do EGS4 num espectro que variou de 250 a 30 kDa, tendo a marcação sido mais intensa contra as proteínas com peso molecular entre 72, 66, 56 e 50 kDa (**Fig. 2**). Nesse soro foram também encontrados níveis detectáveis de anticorpos contra proteínas presentes no EGS2 com PM aproximado de 60, 56 e 50 kDa (**Fig. 2**). Para melhor visualização dos resultados, os pesos moleculares das proteínas reconhecidas por anticorpos presentes no soro dos coelhos hospedeiros imunizados com o extrato das glândulas salivares com 2 e 4 dias de alimentação estão detalhados na **Tabela 3**.

3.2 Detecção da fosfatase ácida

Os resultados da marcação da fosfatase ácida nas glândulas salivares de fêmeas do carrapato *R. sanguineus* l. s. estão ilustrados nas figuras (**3** e **4**) onde observa-se que no grupo controle houve marcação positiva para essa enzima, confirmando que a mesma é parte constituinte da secreção produzida por essa glândula em ambos os períodos de alimentação aqui analisados (2 e 4 dias) (**Figs. 3A** e **4A**). Nos grupos teste, onde os indivíduos foram alimentados em hospedeiros imunizados via inoculação dos extratos da glândula salivar (EGS2 e EGS4), a marcação foi mais intensa, principalmente nos ácinos **II** e **III** das glândulas das fêmeas alimentadas por 4 dias em hospedeiros imunizadas com o EGS4 (**Fig. 4C**), e nos ácinos **II** daquelas alimentadas por 4 dias em hospedeiros imunizados com o EGS2 (**Fig. 4B**). Já nos indivíduos alimentados por 2 dias, não foram detectados aumentos significativos na intensidade da marcação da fosfatase ácida (**Figs. 3B-C**). Em todos os grupos teste foram observados ácinos com morfologia irregular sendo que alguns deles não puderam mais ser identificados e, tendo portanto, sido classificados como **indeterminados (ind)**, e fortemente marcados para a fosfatase ácida (**Figs. 3B3, B4 e C2; 4B2 e C2**).

3.3 Detecção da calreticulina

Os resultados obtidos da aplicação da imunofluorescência indireta para detecção da calreticulina (CRT) nas glândulas salivares de fêmeas do carrapato *R. sanguineus* l. s. estão mostrados nas figuras 5 e 6. Nas glândulas do grupo controle observa-se a presença de marcação positiva, tanto nas fêmeas alimentadas por 2, como por 4 dias, comprovando que a CRT é constituinte original da glândula salivar (**Figs. 5A-B; 6A-B**). Nos grupos teste, onde as fêmeas foram alimentadas em hospedeiros imunizados via inoculação dos extratos da glândula salivar

(EGS2 e EGS4), não se detectou diferenças na marcação da CRT quando comparou-se os resultados com o grupo controle (**Figs. 5C-F; 6C-F**).

3.4 Expressão dos genes relacionados à morte celular

Os resultados da expressão dos genes relacionados à morte celular nas glândulas salivares de fêmeas de *R. sanguineus* l. s. alimentadas por 4 dias em hospedeiros imunizados com EGS2 e EGS4, estão representados na figura 7. O gene BaX, nas glândulas salivares das fêmeas alimentadas em hospedeiros imunizados com EGS2 teve sua expressão diminuída (down-regulation), quando comparou-se com o controle, entretanto essa alteração na expressão não foi significativa. A mesma situação se repetiu para o gene do citocromo C. Ficou claro que houve um aumento na expressão desse gene (up-regulation), porém, a mesma também não foi significativa. A análise da expressão da caspase-8, mostrou que não houve alteração quando comparado ao controle.

Nas fêmeas alimentadas em hospedeiros imunizados com EGS4, tanto o gene BaX, quanto o citocromo C tiveram sua expressão significativamente aumentada (up-regulation) quando comparou-se aos resultados obtidos do grupo controle. Assim, como na situação anterior, o gene para a caspase-8 não sofreu alterações na sua expressão.

Tabela 1 - Conjunto de oligonucleotídeos iniciadores e as condições utilizadas na qPCR

Gene	Primers	Condições
Citocromo C	F: 5'- GTC TCA TTG GAC GCA AGA CA -3' R: 5'- TAA GGC CAG CAA AAA CCA TC - 3'	95°C por 3 min, 45 ciclos de 95°C por 15 seg, anelamento 60°C por 30 seg e 55°C à 95°C com acréscimo de 0,5°C por 5 seg.
BaX	F: 5'- ACT CGG GAC AAC CTC ACA AC -3' R: 5'- TCG CTG CAG AAG AAG AAG AA - 3'	95°C por 3 min, 45 ciclos de 95°C por 15 seg, anelamento 60°C por 30 seg e 55°C à 95°C com acréscimo de 0,5°C por 5 seg
Caspase 8	F: 5'- TGC GAA AGT TCG AGC CCA TG -3' R: 5'- GAA GTG CCT TGA GAT CTC CG - 3'	95°C por 3 min, 45 ciclos de 95°C por 15 seg, anelamento 60°C por 30 seg e 55°C à 95°C com acréscimo de 0,5°C por 5 seg
16S Ticks	F: 5'- GAC AAG AAG ACC CTA -3' R: 5'- ATC CAA CAT CGA GGT - 3' (ZIVKOVIC et al., 2010)	95°C por 3 min, 45 ciclos de 95°C por 15 seg, anelamento 57,2°C por 30 seg e 55°C à 95°C com acréscimo de 0,5°C por 5 seg.
ELF	F: 5'- CGT CTA CAA GAT TGG TGG CAT T -3' R: 5'- CTC AGT GGT CAG GTT GGC AG - 3' (FERROLHO et al., 2017)	95°C por 3 min, 45 ciclos de 95°C por 15 seg, anelamento 57,2°C por 30 seg e 55°C à 95°C com acréscimo de 0,5°C por 5 seg.
β-tubulina	F: 5'- AAC ATG GTG CCC TTC CCA CG -3' R: 5'- GCA GCC ATC ATG TTC TTT GC - 3' (FERROLHO et al., 2017)	95°C por 3 min, 45 ciclos de 95°C por 15 seg, anelamento 58°C por 30 seg e 55°C à 95°C com acréscimo de 0,5°C por 5 seg.

Tabela 2: Parâmetros da reação para os genes das glândulas salivares de fêmeas alimentadas em hospedeiros controle e imunizados com EGS2 e EGS4

Genes	Eficiência	R²	Inclinação	y-Intercepção
Citocromo C	95,05%	0,9935	-3,452	3,010
BaX	90,55%	0,9895	-3,5715	3,656
Caspase 8	112%	0,950	-3,0645	8,693
16S Ticks	96,95%	0,9965	-3,397	20,338
ELF	101,8%	0,994	-3,280	24,738
β-tubulina	81,5%	0,991	-3,8625	25,684

Tabela 3 - Peso molecular das proteínas reconhecidas por anticorpos presentes no soro dos hospedeiros imunizados.

Peso molecular aproximado (kDa)	Hospedeiro imunizado com:	
	EGS2	EGS4
72		X
66		X
60		X
59,5	X	
57	X	
56		X
50	X	X
55-60		X
23	X	
21	X	

FIGURAS

Figura 1 - Western blot dos soros dos hospedeiros do grupo controle (**C**) e do grupo imunizado (**I**) com extrato de glândulas salivares de 2 dias (EGS2). **(1)** Peso molecular padrão; **(2)** EGS2; **(3)** EGS4. Pode-se observar que o soro do animal imunizado apresentou anticorpos contra as proteínas presentes tanto no EGS2, quanto no EGS4.

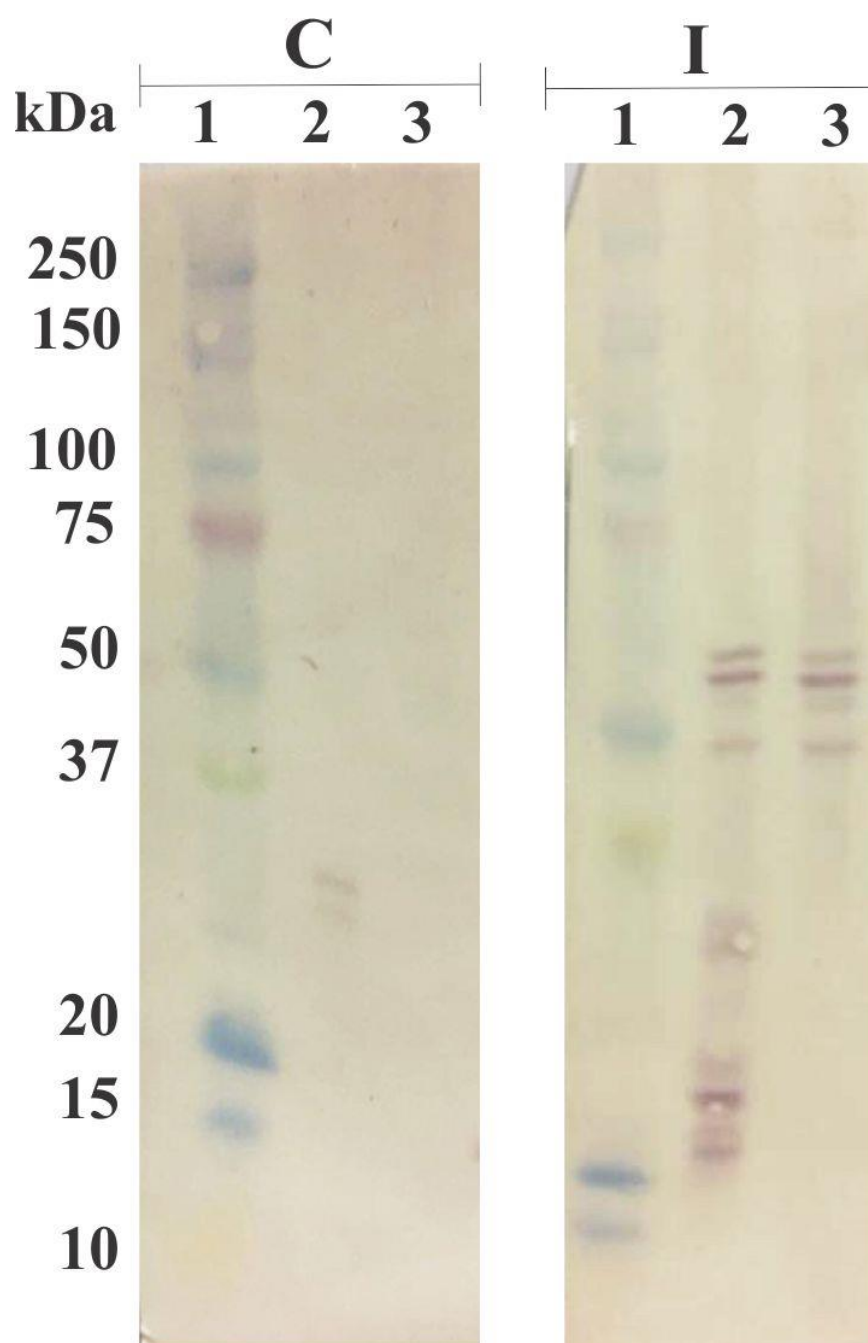


Figura 2 - Western blot dos soros dos hospedeiros do grupo controle (**C**) e do grupo imunizado (**I**) com extrato de glândulas salivares de 4 dias (EGS4). **(1)** Peso molecular padrão; **(2)** EGS2; **(3)** EGS4. No hospedeiro imunizado com o EGS4, o soro apresentou anticorpos apenas contra algumas das proteínas presentes no EGS2, ao contrário do observado para o EGS4 onde maior número de proteínas foram reconhecidas.

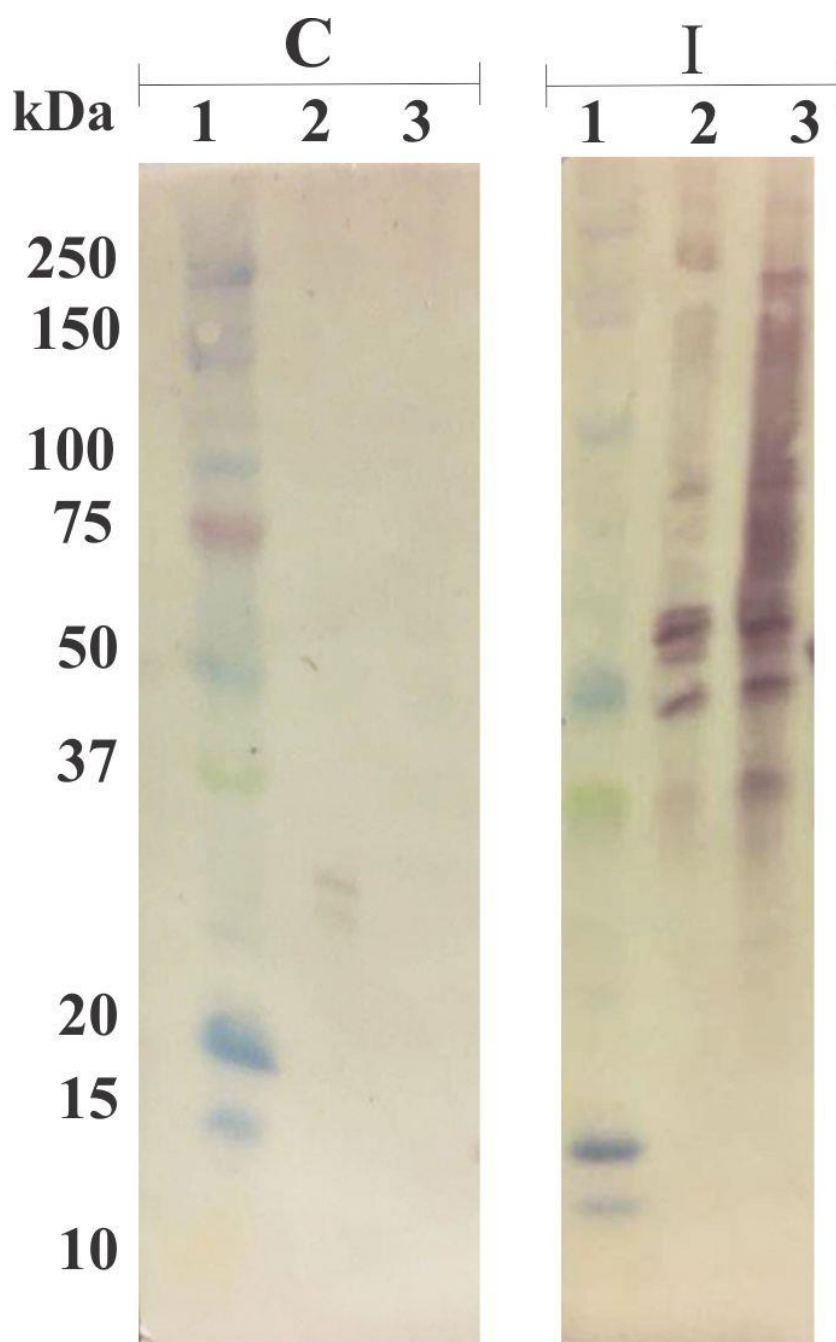


Figura 3 – Detecção da fosfatase ácida nas glândulas salivares de fêmeas de *Rhipicephalus sanguineus* l. s. alimentadas por 2 dias em (A) hospedeiros não imunizados, (B) hospedeiros imunizados com EGS2 e (C) hospedeiros imunizados com EGS4. (A) ácinos I (ácino tipo I), II (ácino tipo II) e III (ácino tipo III). Existe forte marcação para a fosfatase ácida no lúmen dos ácinos granulares (II e III). (B1-B4) ácinos I, II e III com morfologia irregular e a presença dos primeiros ácinos **indeterminado (ind)** fortemente marcados para a fosfatase ácida. (C1-C4) observa-se ácinos I, II, III e **indeterminado (ind)** com morfologia irregular e fortemente marcados para a fosfatase ácida.

dt = duto; **lu**= lumen; **n** = núcleo.

Barras: 50 µm.

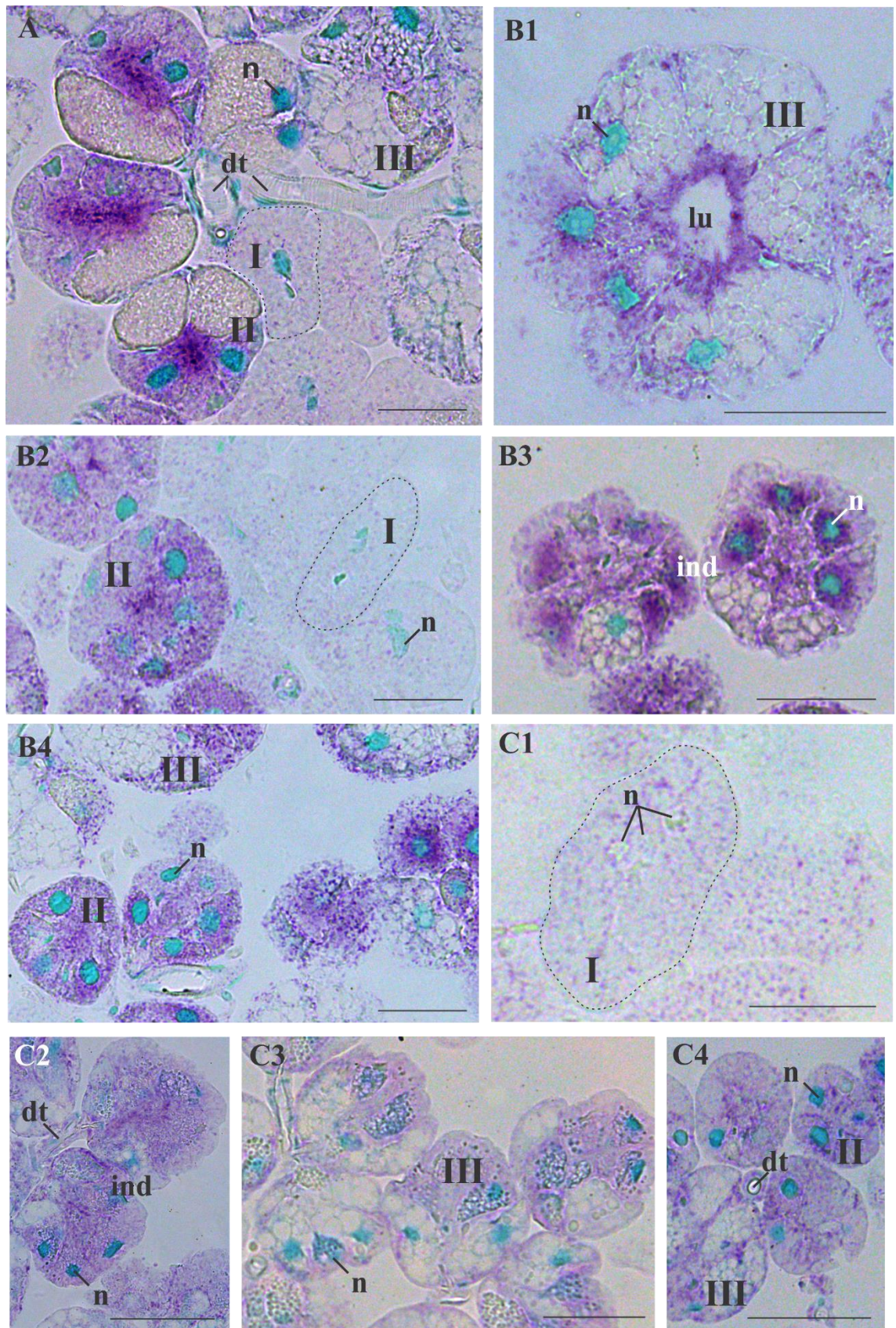


Figura 4 - Detecção da fosfatase ácida nas glândulas salivares de fêmeas de *Rhipicephalus sanguineus* l. s. alimentadas por 4 dias em (A) hospedeiros não imunizados, (B) hospedeiros imunizados com **EGS2** e (C) hospedeiros imunizados com **EGS4**. (A1-A3) observa-se ácinos **I** (ácino tipo I), **II** (ácino tipo II) e **III** (ácino tipo III) com forte marcação para a fosfatase ácida no lúmen acinar dos ácinos granulares (**II** e **III**). (B1-B4) ácinos **I**, **II** e **III** com morfologia irregular e a presença dos primeiros ácinos **indeterminado (ind)** fortemente marcados para a fosfatase ácida. (C1-C4) ácinos **I**, **II**, **III** e **indeterminado (ind)** com morfologia irregular e fortemente marcados para a fosfatase ácida. Presença de fragmentos acinares (→).

dt= duto; **lu**= lumen; **n** = núcleo.

Barras: 50 µm

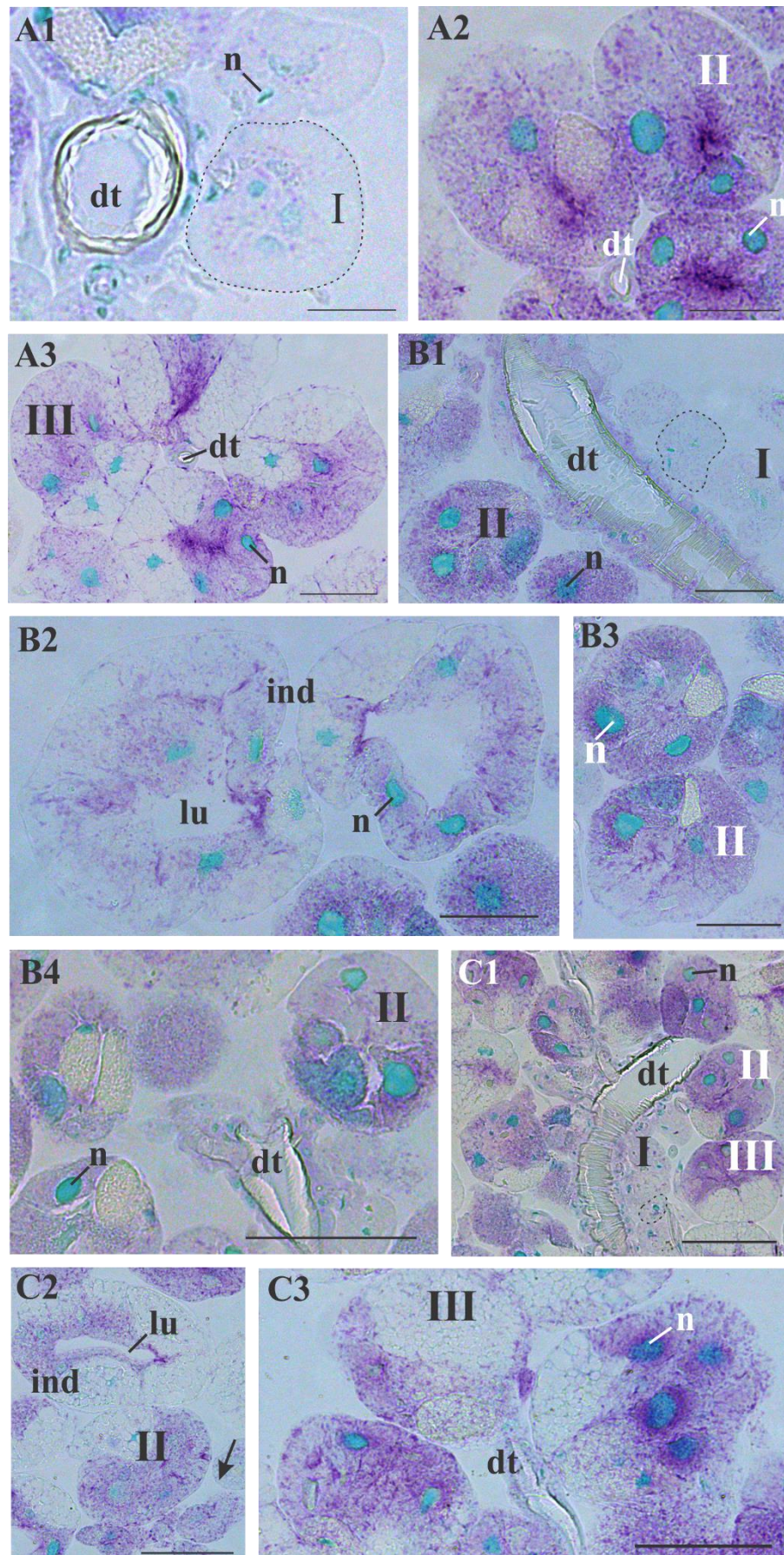


Figura 5 - Imunofluorescência das glândulas salivares de fêmeas do carrapato *R. sanguineus* l. s. alimentadas por 2 dias. **(A-B)** Glândula salivar de fêmea alimentada por 2 dias em hospedeiro sem imunização. **(C-D)** Glândula de fêmea alimentada por 2 dias em hospedeiro imunizado com EGS2. **(E-F)** Glândula de fêmea alimentada por 2 dias em hospedeiro imunizado com EGS4. **Verde**= marcação para a CRT; **Azul**= núcleos. **Barras**= 50 μ m.

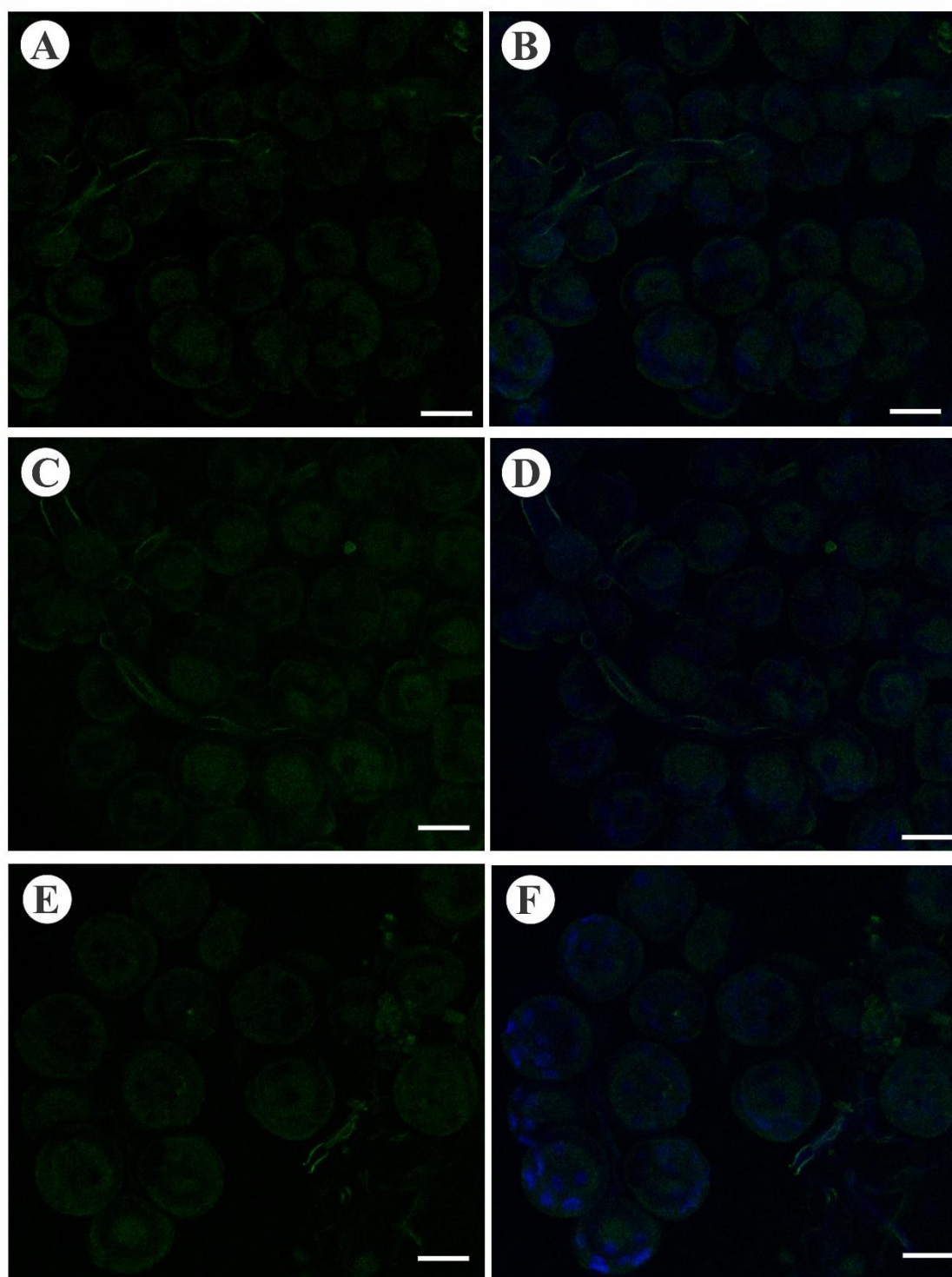


Figura 6 - Imunofluorescência das glândulas salivares de fêmeas do carrapato *R. sanguineus* l. s. alimentadas por 4 dias. (A-B) Glândula de fêmea alimentada por 4 dias em hospedeiro sem imunização. (C-D) Glândula de fêmea alimentada por 4 dias em hospedeiro imunizado com EGS2. (E-F) Glândula de fêmea alimentada por 4 dias em hospedeiro imunizado com EGS4. **Verde**= marcação para a CRT; **Azul**= núcleos. **Barras**= 50 μ m.

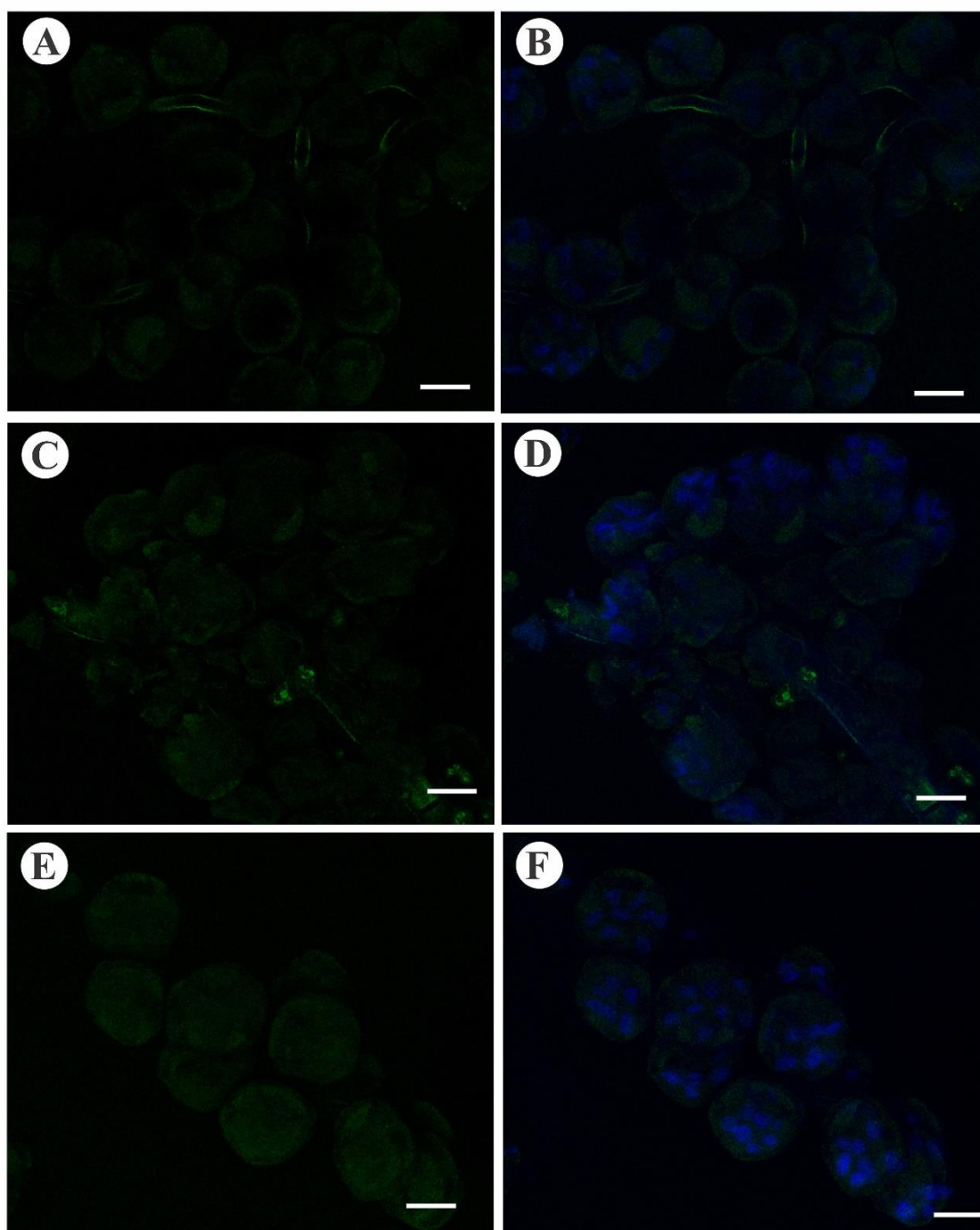
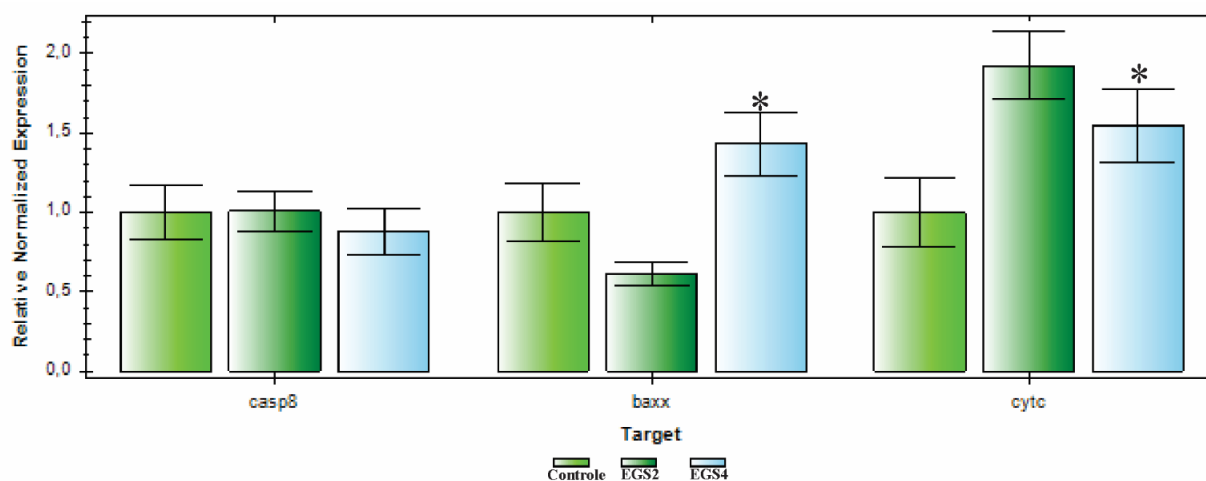


Figura 7 - Expressão dos genes relacionados a morte celular nas glândulas salivares de fêmeas de *R. sanguineus* l. s. alimentadas por 4 dias em hospedeiros controle e imunizado com extrato das glândulas salivares (EGS2 e EGS4). Foram analisados os genes que codificam as proteínas relacionadas a via intrínseca da morte celular, como o gene BaX (baxx) e o citocromo C (cytc) e a via extrínseca, como o gene para a caspase-8 (casp8). Os dados foram normalizados com a expressão dos genes que codificam a proteína ribossomal 16S rRNA, a β -tubulina e o fator de alongação 1 (ELF1). Observa-se a variação na expressão dos diferentes genes, entretanto apenas os genes BaX e citocromo C, das fêmeas alimentadas em hospedeiro imunizado com EGS4 tiveram aumento significativo (*) em sua expressão (up-regulation).



4 DISCUSSÃO

No presente estudo foram realizadas análises do soro dos coelhos hospedeiros imunizados com o extrato das glândulas salivares de fêmeas de carrapatos *R. sanguineus* l. s. alimentadas por 2 e 4 dias (EGS2 e EGS4), bem como realizados bioensaios com as glândulas salivares de fêmeas dessa mesma espécie alimentadas por 2 e 4 dias nesses coelhos hospedeiros, para detecção da atividade das enzimas fosfatase ácida e da calreticulina (CRT). A fosfatase ácida é uma enzima hidrolítica que catalisa a hidrólise de uma variedade de monoésteres ortofosfóricos, está presente nas glândulas salivares de fêmeas do carrapato *R. sanguineus* l. s. e participa no metabolismo celular durante o processo de produção e liberação da secreção (BINNINGTON, 1978; FURQUIM; BECHARA; CAMARGO-MATHIAS, 2008; NODARI et al., 2012; WALKER; FLETCHER; GILL, 1985). A CRT é uma proteína ligante de cálcio secretada também pelas glândulas salivares com função de ser facilitadora do processo de alimentação por meio de sua ação anti-hemostática e imunomoduladora (BROSSARD; WIKEL, 2004; JAWORSKI et al., 1995; JITTAPALAPONG et al., 2008; RADULOVIĆ et al., 2014; STEEN; BARKER; ALEWOOD, 2006). Além disso, ela está altamente conservada nas diferentes espécies de carrapatos, o que a torna uma molécula atrativa para o desenvolvimento de vacinas (ANTUNES et al., 2015; FERREIRA et al., 2002; PARIZI et al., 2009).

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstraram que as proteínas presentes nos extratos EGS2 e EGS4 foram imunogênicas e induziram a resposta imunológica do hospedeiro, tanto para o EGS2, quanto para o EGS4, estimulando o sistema imune destes a produzir anticorpos contra as proteínas dos extratos. Os resultados revelaram ainda que o processo de desenvolvimento de resistência contra os antígenos do EGS4 foi mais eficiente, visto nestes estar presentes anticorpos anti-proteínas do EGS4 que tiveram o peso molecular variando entre 250 a 30 kDa. Foram observados anticorpos no soro dos coelhos imunizados com o EGS4 contra proteínas do EGS2, corroborando os achados de Hebling et al. (2013), que relataram que a resposta inflamatória teria menor intensidade nos hospedeiros imunizados com EGS2 e, que nos hospedeiros imunizados com EGS4, a resposta imune-inflamatória seria mais intensa e estaria representada por infiltrado inflamatório (basófilos, células envolvidas com o processo inflamatório). Segundo Monteiro e Bechara (2008) este resultado indicaria o desenvolvimento de resistência no hospedeiro (HEBLING et al., 2013). Ainda segundo Hebling et al. (2013), a resposta do sistema imune do hospedeiro contra o EGS4, teria ocorrido uma vez que as glândulas salivares de fêmeas alimentadas por 4 dias estariam mais ativas do que aquelas das alimentadas por 2 dias e ainda, que nas primeiras haveria mais moléculas imunogênicas, o que

consequentemente levaria a uma resposta imune-inflamatória mais intensa.

Os dados aqui obtidos para marcação da CRT, mostraram que tanto as glândulas das fêmeas alimentadas por 2, quanto por 4 dias em hospedeiro controle teriam marcação positiva para a CRT, corroborando outros autores ao observarem as células das glândulas salivares de carrapatos *R. microplus* (ANTUNES et al., 2015; FERREIRA et al., 2002).

A marcação para CRT não foi alterada quando se comparou os dados do grupo controle com os dos grupos imunizados com EGS2 e EGS4, sugerindo menor presença de CRT nos extratos das glândulas salivares utilizados nas imunizações, o que, porém, ainda não seria eficiente para sensibilizar o sistema imune do hospedeiro a ponto deste produzir anticorpos contra essa proteína em quantidade suficiente para alterar este órgão, dados que corroboraram os de Antunes et al. (2015), que verificaram baixa imunogenicidade da CRT.

A detecção da fosfatase ácida nas células das glândulas salivares, aqui analisadas mostrou que nas fêmeas alimentadas em hospedeiros não imunizados (grupo controle) a marcação foi positiva e que esteve preferencialmente localizada na região do lúmen dos ácinos II e III, dados estes que corroboraram os de outros autores (BINNINGTON, 1978; FURQUIM; BECHARA; CAMARGO-MATHIAS, 2008; NODARI et al., 2012; NUNES; CAMARGO-MATHIAS; BECHARA, 2006b; WALKER; FLETCHER; GILL, 1985). Nas fêmeas alimentadas em hospedeiros imunizados com o extrato glandular, detectou-se sinais de degeneração da glândula, representados pela perda da forma original dos ácinos, a presença de ácinos indeterminados, assim como o aumento na intensidade da marcação para a fosfatase ácida, indicando que o EGS2 e o EGS4 induziriam o desenvolvimento de resistência no hospedeiro. Esses dados confirmaram os resultados aqui obtidos quando da análise do soro dos hospedeiros, bem como aqueles disponíveis na literatura, onde Furquim et al. (2011, 2014a, 2014b) e Jittapalapong et al. (2008), relataram que a imunização de hospedeiros com o extrato da glândula salivar afetaria diretamente as glândulas salivares de indivíduos alimentados nos mesmos, diminuindo a eficiência do seu processo de alimentação.

Forte marcação para a fosfatase ácida foi observada nos ácinos granulares das glândulas de fêmeas alimentadas por 4 dias em hospedeiros imunizados com ambos os extratos: EGS2 (ácinos II) e EGS4 (ácinos II e III). Furquim et al. (2011, 2014a, 2014b), Nunes et al., (2011) e Jittapalapong et al. (2008) já haviam relatado que a resistência adquirida pelos hospedeiros afetaria muito mais os ácinos granulares, do que os agranulares, o que foi corroborado pelos resultados aqui obtidos. Provavelmente isso deveu-se ao fato dos ácinos II e III serem os responsáveis pela secreção de moléculas antigênicas e pela modulação do sistema imune-

inflamatório do hospedeiro, enquanto que os I atuariam na osmorregulação e no balanço hídrico do ectoparasita (BINNINGTON, 1978; FURQUIM et al., 2011; WALKER; FLETCHER; GILL, 1985). Adicionalmente, estudos desenvolvidos por Ferreira et al. (1996), demonstraram que ácinos II e III no carrapato *R. sanguineus* l. s. seriam responsáveis pela síntese e secreção de moléculas antigênicas, as quais provocariam intensa resposta imunológica do hospedeiro. Gill; Boid; Ross, (1986) também reportaram a ocorrência de intensa resposta imunológica nos hospedeiros contra antígenos glandulares, tais como glicoproteínas, fosfatases ácida e esterases, produzidas pelos ácinos II e III provenientes da saliva dos carrapatos *Hyalomma anatolicum anatolicum*. Assim, a intensa marcação da fosfatase ácida nos ácinos II e III, nos indivíduos alimentados por 4 dias em hospedeiros imunizados e a observação de características de degeneração do tecido glandular, estariam sugerindo a instalação precoce do processo de morte celular apoptótica atípica, no qual, segundo a literatura, haveria a participação da fosfatase ácida na remoção de restos citoplasmáticos deixados pela degeneração. Cabe ressaltar que, em condições normais, essas características do processo de morte celular ocorreria apenas na etapa final do processo de ingurgitamento (FURQUIM; BECHARA; CAMARGO-MATHIAS, 2008; NODARI et al., 2012).

Na análise dos genes, especificamente nas fêmeas alimentadas por 4 dias em hospedeiro previamente imunizado com EGS2, observou-se uma alteração (não significativa) na expressão do BaX e do citocromo C, confirmando os dados aqui obtidos para a fosfatase ácida. Já a análise da expressão dos genes das glândulas de fêmeas alimentadas por 4 dias em hospedeiros imunizados com EGS4, mostrou aumento (significativo) na expressão do BaX e do citocromo C, ambos relacionados a via intrínseca da morte celular apoptótica (programada). Em ambas as situações, a expressão do gene para a caspase-8, não sofreu alteração, sugerindo que o processo de morte celular nas glândulas salivares ainda continuaria ocorrendo pela via intrínseca da apoptose, mecanismo de morte que teria importante papel no desenvolvimento e na imunidade do ectoparasita (MAES; SCHLAMP; NICKELLS, 2017).

Dessa forma, os dados obtidos no presente estudo, corroboraram aqueles encontrados por Furquim et al. (2011) que verificaram que a resistência do hospedeiro, induzida pela exposição aos extratos glandulares de fêmeas alimentadas em hospedeiros por 2, 4 e 6 dias, teria potencial de causar intensos danos morfológicos nas glândulas salivares de fêmeas alimentadas por 4 dias, levando-as precocemente a degeneração. Ainda segundo esses autores, a degeneração precoce poderia ser explicada pela ativação de mecanismos controladores da síntese de ecdisteróides, hormônios esses que teriam papel na ativação e na desativação

glandular (FURQUIM et al., 2011; LOMAS; GELMAN; KAUFMAN, 1998; MAO; MCBLAIN; KAUFMAN, 1995; WEISS; KAUFMAN, 2001).

Os resultados obtidos com o desenvolvimento deste trabalho comprovaram que a imunização de hospedeiros com EGS2 e EGS4, foram capazes de interferir na morfofisiologia da glândula salivar das fêmeas de *R. sanguineus* l. s., principalmente naquelas alimentadas por 4 dias em hospedeiros imunizados com EGS4, o que provocou nos ectoparasitas a diminuição da eficiência na alimentação, reduzindo a capacidade secretora da glândula e estimulando sua degeneração precoce e consequentemente interferindo na oviposição.

AGRADECIMENTO

Autores agradecem à FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo nº 2014/02843-8), e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (Processo nº 300625/2012-0 e M.I. Camargo Mathias Bolsas de pesquisas acadêmicas) pelo suporte financeiro e Sr. Gérson de Mello Sousa e Dr. Priscila Cintra Socolowski pelo suporte técnico.

REFERÊNCIAS

ANTUNES, S. et al. Artificial feeding of *Rhipicephalus microplus* female ticks with anti calreticulin serum do not influence tick and *Babesia bigemina* acquisition. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 6, n. 1, p. 47–55, 2015.

BALASHOV, Y. 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.

BECHARA, G. H. et al. *Rhipicephalus sanguineus* tick in Brazil: feeding and reproductive aspects under laboratorial conditions. **Brazilian Journal Veterinary Parasitology**, São Paulo, v. 4, n. 2, p. 61–66, 1995.

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

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

BUSTIN, S. A. et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**, Baltimore, v. 55, n. 4, p. 611–

622, 2009.

CAMARGO-MATHIAS, M. I.; FURQUIM, K. C. S.; NUNES, P. H. Immunomodulatory effects of tick saliva. **Invertebrate Survival Journal**, v. 8, p. 231–240, 2011.

CAPERUCCI, D.; BECHARA, G. H.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Ultrastructure features of the midgut of the female adult *Amblyomma cajennense* ticks Fabricius, 1787 (Acari: Ixodidae) in several feeding stages and subjected to three infestations. **Micron**, New York, v. 41, n. 7, p. 710–721, 2010.

CAPERUCCI, D.; CAMARGO-MATHIAS, M. I.; BECHARA, G. H. Histopathology and Ultrastructure Features of the Midgut of Adult Females of the Tick *Amblyomma cajennense* Fabricius, 1787 (Acari: Ixodidae) in Various Feeding Stages and Submitted to Three Infestations. **Ultrastructural Pathology**, v. 33, n. 6, p. 249–259, 2009.

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

FERREIRA, B. R.; MACHADO, R. Z.; BECHARA, G. H. Western blot analysis of tick antigens from a *Rhipicephalus sanguineus* unfed larval extract and identification of antigenic sites in tick sections using immunohistochemistry. A comparative study between resistant and susceptible host species. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 62, p. 161–174, 1996.

FERREIRA, C. A. S. et al. Cloning and partial characterization of a *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) calreticulin. **Experimental Parasitology**, San Diego, v. 101, p. 25–34, 2002.

FERROLHO, J. et al. Ferritin 1 silencing effect in *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae) during experimental infection with *Ehrlichia canis*. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 8, n. 1, p. 174–184, 2017.

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**, Berlin, v. 109, n. 1, p. 147–162, 2011.

FURQUIM, K. C. S. et al. Secretory Behavior of Salivary Glands of *Rhipicephalus sanguineus* Fed on Immunized Rabbit Hosts. **Journal Cytology & Histology**, v. 4, p. 1–12, 2014a.

FURQUIM, K. C. S. et al. Morphological Plasticity of Ticks' Salivary Glands and the Meaning of Hematophagy in Hosts Immunized with Glandular Extract of Females Fed for 4 Days. **Animal and Veterinary Sciences**, v. 2, n. 6, p. 194–207, 2014b.

FURQUIM, K. C. S.; BECHARA, G. H.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Death by apoptosis in salivary glands of females of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). **Experimental Parasitology**, San Diego, v. 119, n. 1, p. 152–163, 2008.

GILL, H. S.; BOID, R.; ROSS, C. A. Isolation and characterization of salivary antigens from

Hyalomma anatolicum anatolicum. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 8, n. 1, p. 11–25, 1986.

HEBLING, L. M. G. F. et al. Inoculation of salivary gland extracts obtained from female of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari, Ixodidae) with 2, 4, and 6 days of feeding in rabbit: I - Histopathology of the feeding lesion. **Parasitology Research**, Berlin, v. 112, n. 2, p. 577–584, 2013.

HUSSEIN, M. A.; BOWEN, I. D.; LEWIS, G. H. J. 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**, London, v. 14, n. 9, p. 775–781, 1990.

JAWORSKI, D. C. et al. A secreted calreticulin protein in ixodid tick (*Amblyomma americanum*) saliva. **Journal of Insect Physiology**, v. 41, n. 4, p. 369–375, 1995.

JITTAPALAPONG, S. et al. Performance of female *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) fed on dogs exposed to multiple infestations or immunization with tick salivary gland or midgut tissues. **Journal of medical entomology**, v. 37, n. 4, p. 601–11, 2000a.

JITTAPALAPONG, S. et al. Humoral immune response of dogs immunized with salivary gland, midgut, or repeated infestations with *Rhipicephalus sanguineus*. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 916, p. 283–288, 2000b.

JITTAPALAPONG, S. et al. Immunization with tick salivary gland extracts. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 1149, p. 200–4, 2008.

KAUEWHOM, P. et al. Molecular analysis of calreticulin expressed in salivary glands of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* indigenous to Thailand. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 1149, p. 53–57, 2008.

LOMAS, L. O.; GELMAN, D.; KAUFMAN, W. R. Ecdysteroid Regulation of Salivary Gland Degeneration in the Ixodid Tick, *Amblyomma hebraeum*: A Reconciliation of *in Vivo* and *in Vitro* Observations. **General and Comparative Endocrinology**, v. 109, n. 200–211, 1998.

MAES, M. E.; SCHLAMP, C. L.; NICKELLS, R. W. BAX to basics: How the BCL2 gene family controls the death of retinal ganglion cells. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 57, p. 1–25, 2017.

MAO, H.; MCBLAIN, W. A.; KAUFMAN, W. R. Some Properties of the Ecdysteroid Receptor in the Salivary Gland of the Ixodid Tick, *Amblyomma hebraeum*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 99, n. 3, p. 340–348, 1995.

MONTEIRO, G. E. R.; BECHARA, G. H. Cutaneous Basophilia in the Resistance of Goats to *Amblyomma cajennense* Nymphs after Repeated Infestations. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 1149, n. 1, p. 221–225, 2008.

NODARI, E. F. et al. Degenerative process and cell death in salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) semi-engorged female exposed to the acaricide permethrin. **Microscopy Research and Technique**, v. 75, n. 8, p. 1012–1018, 2012.

NUNES, E. T.; CAMARGO-MATHIAS, M. I.; BECHARA, G. H. Structural and cytochemical changes in the salivary glands of the *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (CANESTRINI, 1887) (Acari: Ixodidae) tick female during feeding. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 140, n. 1–2, p. 114–123, 2006a.

NUNES, E. T.; CAMARGO-MATHIAS, M. I.; BECHARA, G. H. G. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae): Acid phosphatase and ATPase activities localization in salivary glands of females during the feeding period. **Experimental Parasitology**, San Diego, v. 114, n. 2, p. 109–117, 2006b.

NUNES, P. H.; BECHARA, G. H.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Secretory process of salivary glands of female *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) ticks fed on resistant rabbits. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 53, n. 2, p. 179–187, 2011.

PARIZI, L. F. et al. Comparative immunogenicity of *Haemaphysalis longicornis* and *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* calreticulins. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 164, n. 2–4, p. 282–290, 2009.

PARIZI, L. F. et al. The quest for a universal vaccine against ticks: Cross-immunity insights. **The Veterinary Journal**, London, v. 194, n. 2, p. 158–165, 2012.

RADULOVIĆ, Ž. M. et al. A 24–48 h fed *Amblyomma americanum* tick saliva immuno-proteome. **BMC Genomics**, v. 15, p. 518–548, 2014.

SABADIN, G. A. et al. Effect of recombinant glutathione S-transferase as vaccine antigen against *Rhipicephalus appendiculatus* and *Rhipicephalus sanguineus* infestation. **Vaccine**, Kidlington, v. 35, n. 48, p. 6649–6656, 2017.

SAUER, J. R.; ESSENBERG, R. C.; BOWMAN, A. S. Salivary glands in ixodid ticks: Control and mechanism of secretion. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 46, n. 7, p. 1069–1078, 2000.

SONENSHINE, D. E.; ROE, R. . **Biology of ticks**. 2^a ed. New York: Oxford University Press, 2014.

STEEN, N. A.; BARKER, S. C.; ALEWOOD, P. F. Proteins in the saliva of the Ixodida (ticks): Pharmacological features and biological significance. **Toxicon**, New York, v. 47, n. 1, p. 1–20, 2006.

VERONEZ, V. A. et al. Histopathology of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) ticks fed on resistant hosts. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 50, n. 2, p. 151–161, 2010.

WALKER, A. R.; FLETCHER, J. D.; GILL, H. S. Structural and histochemical changes in the salivary glands of *Rhipicephalus appendiculatus* during feeding. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 15, n. 1, p. 81–100, 1985.

WEISS, B. L.; KAUFMAN, W. R. The relationship between “critical weight” and 20-hydroxyecdysone in the female ixodid tick, *Amblyomma hebraeum*. **Journal of Insect**

Physiology, Oxford, v. 47, n. 11, p. 1261–1267, 2001.

WIKEL, S. K. Tick modulation of host immunity: An important factor in pathogen transmission. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 29, n. 6, p. 851–859, 1999.

ZIVKOVIC, Z. et al. Subolesin expression in response to pathogen infection in ticks. **BMC Immunology**, v. 11, n. 7, p. 1–12, 2010.

Capítulo 2

CAPÍTULO 2

Midgut of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (acari: ixodidae) females fed for 2 and 4 days: acid phosphatase detection and morphophysiology of epithelial cells

Elen Fernanda Nodari¹, Luiz Juliano², Melissa Carolina Pereira¹, Letícia Maria Gráballos Ferraz Hebling¹, Marina Rodrigues De Abreu¹ And Maria Izabel Camargo-Mathias^{1*}

¹UNESP, Avenida 24 A, 1515, 13506-900 - Rio Claro, SP, CP 199, Brazil.

²UNIFESP, Rua Botucatu, 862, 7º Andar, 04023-062 - São Paulo, SP, CP 199, Brazil.

Artigo publicado no periódico: *Jornal of Biochemistry International*, v. 3, p. 85-91, 2016.

RESUMO

Os carrapatos são ectoparasitas de grande importância médica e veterinária, pois provocam lesões nos hospedeiros e transmitem a estes, agentes patogênicos. O complexo *Rhipicephalus sanguineus* lato sensu se destaca pela sua distribuição em todos os continentes, bem como por parasitar, principalmente, o cão doméstico. O intestino médio dos carrapatos tem por função primordial realizar condução e a digestão de todo o sangue ingerido durante o ingurgitamento, tanto na fase de crescimento quanto na fase de expansão o órgão, esta última considerada aquela em que ocorre devido a maior ingestão de sangue. Os dados da literatura mostram que a digestão ocorre preferencialmente no interior das células, via fusão dos endossomos com os lisossomos estes, organelas que contém enzimas hidrolíticas, como a fosfatase ácida. O presente estudo detectou e posteriormente avaliou a presença dessa enzima nas células do intestino médio de *R. sanguineus* alimentados por 2 e 4 dias em coelhos hospedeiros. Os resultados mostraram que todos os tipos celulares respondem positivamente a atividade da fosfatase ácida variando, no entanto quanto ao grau de intensidade e localização. Foram observadas células digestivas apresentando positividade que variou de forte a fraca intensidade. As células generativas apresentaram-se mais fortemente positivas nos indivíduos com 4 dias de alimentação, em comparação com os de 2 dias. A forte marcação positiva para fosfatase ácida, observada nas diferentes células do intestino médio, inclusive e especialmente nas generativas (células tronco) vem reforçar a multifuncionalidade das células digestivas/secretoras, encontradas no intestino médio de fêmeas alimentadas por 2 dias, bem como vem demonstrar a ocorrência de células secretoras no intestino médio de fêmeas de *R. sanguineus* l. s. nos estágios de alimentação que compreendem 2 dias. A presença da fosfatase ácida tanto nas células generativas, quanto nas digestivas/secretoras, coloca esta enzima como um alvo de estudo na busca para estratégias de controle de carrapatos, devido ao papel primordial do intestino médio na absorção e digestão do sangue do hospedeiro, o que garantiria não só a sobrevivência dos ectoparasitas, quanto a sobrevivência de sua prole (nutrientes para a ovogênese).

Palavras-chave: Citoquímica; células digestivas; células generativas; reação enzimática; *Rhipicephalus sanguineus* l. s.; carrapatos.



MIDGUT OF *Rhipicephalus sanguineus* SENSU LATO (ACARI: IXODIDAE) FEMALES FED FOR 2 AND 4 DAYS: ACID PHOSPHATASE DETECTION AND MORPHOPHYSIOLOGY OF EPITHELIAL CELLS

ELEN FERNANDA NODARI¹, LUIZ JULIANO², MELISSA CAROLINA PEREIRA¹,
LETÍCIA MARIA GRÁBALLOS FERRAZ HEBLING¹,
MARINA RODRIGUES DE ABREU¹
AND MARIA IZABEL CAMARGO-MATHIAS^{1*}

¹UNESP, Avenida 24 A, 1515, 13506-900 - Rio Claro, SP, CP 199, Brazil.

²UNIFESP, Rua Botucatu, 862, 7º Andar, 04023-062 - São Paulo, SP, CP 199, Brazil.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

This work was carried out in collaboration between all authors. Authors EFN, LJ and MICM designed the study.

Author EFN wrote the protocol and wrote the first draft of the manuscript. Authors EFN, MCP, LMGFH and MRA managed the material, methods and analyses of the study. Authors EFN and MICM managed the literature searches. Authors LJ and MICM reviewed the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Received: 19th January 2017

Accepted: 12th February 2017

Published: 17th February 2017

Original Research Article

ABSTRACT

Ticks are ectoparasites of medical and veterinary importance. The *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato complex deserves particular attention for its distribution in all the continents, parasitizing mainly the domestic dog as well as man. The primary function of the ticks gut is to conduct and digest blood, and its digestion occurs preferably in the interior of the midgut cells, through the fusion of endosomes and lysosomes, organelles containing hydrolytic enzymes, such as acid phosphatase. The present study detected and posteriorly evaluated the presence of this enzyme in the midgut cells of *R. sanguineus* s. l. fed for 2 and 4 days on rabbit hosts. The results showed that all the cell types responded positively to the acid phosphatase activity, with variations in intensity and location. Digestive cells showed weak or strong staining, and the generative cells were strongly stained in the 4-day fed. The strong positive staining for acid phosphatase was observed in the different midgut cells, especially in the generative ones (stem cells) that reinforces the multifunctionality of the digestive/secretory cells. In the feeding period of 2 days, it was observed secretory cells in the midgut of the *R. sanguineus* s.l. females. Thus, the presence of acid phosphatase, both in generative and digestive/secretory cells, places this enzyme as an important target for further studies aiming to find new strategies to control ticks, considering the fundamental role of the midgut in the absorption and digestion of the host's blood, ensuring the survival of the ectoparasites and their offspring as well (nutrients for the oogenesis).

Keywords: Cytochemistry; digestive cells; generative cells; enzymatic reaction; *Rhipicephalus sanguineus* s.l.; ticks.

*Corresponding author: Email: micm@rc.unesp.br;

1. INTRODUCTION

Ticks are obligate hematophagous and constitute one of the most important groups under the medical and veterinary points of view, once they injure the host, either by the feeding process or by the transmission of pathogens such as arbovirosis, rickettsiosis and spirochetosis, among others [1].

The gut is of great importance for the success of these ectoparasites, once it represents the largest physical barrier between the tick and the host immune response [2,3] as well as, is where several endoparasites develops. In ticks, this organ is responsible for the digestion of all the blood ingested during engorgement both in the growth (development of this organ) and in the expansion phases, when the largest blood ingestion occurs [4].

In general, the tick midgut have three different types of cells, namely generative, digestive and secretory cells [4–9]. This classification represents the stages of differentiation/development of a single type; or according to Agyei et al. [10,11] the cells described by some authors as secretory would otherwise be digestive ones.

Thus, differently from other hematophagous arthropods, the ticks process the ingested blood while feeding on the host through intracellular process, which has been confirmed by the observation of endo/lysosomal vesicles in the interior of the midgut cells [8].

Regarding the acting enzymes present in the tick midgut, the acid phosphatase hydrolyses several orthophosphoric monoesters. This enzyme is stored in the lysosomes distributed in the interior of the midgut cells of some species of tick. According to Coons et al. [12], the digestion process starts when the lysosomes (containing the hydrolytic enzymes, including the acid phosphatase) fuse with the endosomes and form the digestive vacuoles. Using transmission electron microscopy Gough and Kemp [13] showed the presence of acid phosphatase in the interior of the Golgi cisternae and in the endosomes of digestive and secretory cells. Agyei et al. [10,11] observed large granules of acid phosphatase in the midgut digestive cells of semi engorged *B. microplus* females, which suggested that these are multifunctional cells. In contrast, Coons et al. [12] and Walker and Fletcher [9] propose that the digestion in the ticks starts in the midgut lumen, through holocrine secretion synthesized by digestive/secretory cells and containing acid phosphatase, suggesting that the digestion would not be exclusively intracellular. Therefore, considering the polemics concerning the

available data in the literature about which and how many cell types are present in the tick's midgut, and also the fact that some authors defend the hypothesis that the digestion in these individuals would occur only in the intracellular environment, the present study aimed to histochemically detect the location of the acid phosphatase (important lysosomal enzyme) in the tick midgut cells and find elements to infer the actual function of these cells *Rhipicephalus sanguineus* s.l females fed for 2 and 4 days.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 *Rhipicephalus sanguineus* s. l. Ticks

In this study, six *R. sanguineus* s. l. female ticks fed on New Zealand White rabbits were used, three in each feeding period (2 and 4 days). The females were obtained from the colonies maintained by the "Brazilian Central of Studies on Ticks Morphology" (BCSTM) in São Paulo State University (UNESP), campus Rio Claro, SP, Brazil, in controlled conditions ($28^{\circ}\text{C} \pm 1$, 80% humidity and 12h photoperiod of 12 hours) in BOD incubator (Biological Oxygen Demand) Eletrolab EL 202.

The feeding laboratorial conditions of *R. sanguineus* s. l. ticks in the hosts were followed according Bechara et al. [14] technique and in accordance with the Ethics Committee on Animal Use (CEUA – IB – UNESP/Rio Claro), protocol 11/2014.

2.2 Detection of Acid Phosphatase

The *R. sanguineus* s. l. ticks were dissected and the midguts were removed. After, the material was fixed in 10% buffered neutral formalin for one hour and thirty minutes at 4°C and processed according to the methods described by Hussein et al. [15] for detection of acid phosphatase. Then, the material was dehydrated in increasing concentrations of ethanol (70%, 80%, 90% and 95%), for 15 minutes each, embedded in Leica resin, and sectioned at a thickness of 7 μm . Sections were placed on glass slides, counterstained with methyl green for 20 seconds, and mounted in Entellan® (Merck Millipore) for later examination under light microscope. In this experiment, control samples (negative control) were incubated without substrate.

3. RESULTS

In the present study, the description by Remedio et al. [16] was used to histologically classify the cells of *R. sanguineus* s. l. midgut, which is constituted by a pseudostratified epithelium (covering the lumen) comprising the following types of cells: a) generative

(stem cells) and b) digestive (which can be found in the young, mature or residual stages).

3.1 Acid Phosphatase

Midgut fragments of *R. sanguineus* s. l. females fed for 2 and 4 days were used as negative control. The fragments were incubated in the same media recommended by the technique protocol, excluding the substrate for the acid phosphatase enzyme, and the results obtained were midgut cells negative for the technique.

3.1.1 Females fed for 2 days

In the 2-day fed females (A-B), acid phosphatase was identified in the cytoplasm of the midgut digestive and generative cells (Fig. 1C-H). A variation in the intensity of staining and in the location of positive granulation was observed. Some digestive cells were weakly stained (Fig. 1C), while in others the cytoplasm was strongly stained. Some digestive cells, predominantly those found in the midgut lumen; i.e., already detached from the epithelium and herein called mature digestive, showed irregular morphology, suggesting the rupture of the plasma

membrane with consequent release of the cytoplasm into the external environment (degranulation of the midgut lumen). Therefore, some of these cells, strongly stained by the acid phosphatase present in the lumen, would be in advanced degeneration process (Fig. 1D and F).

3.1.2 Females fed for 4 days

In these females (Figs. A-B), both the generative and digestive cells were larger (15% approximately) than those of the individuals in the previous situation. In the generative cells, the staining for acid phosphatase was more intense in the females fed for 4 days than in those fed for 2 days (Fig. 2C and F-H). The digestive cells showed differences in staining intensity and in the location of acid phosphatase. Moreover, some cells were weakly stained (Fig. 2F) and others varied from moderately to strongly stained (Figs. 2D). The presence of mature digestive cells in the midgut lumen was also observed; however, differently from those fed for 2 days, they would display intact morphology and were weakly to moderately stained by acid phosphatase (Figs. 2C-G).

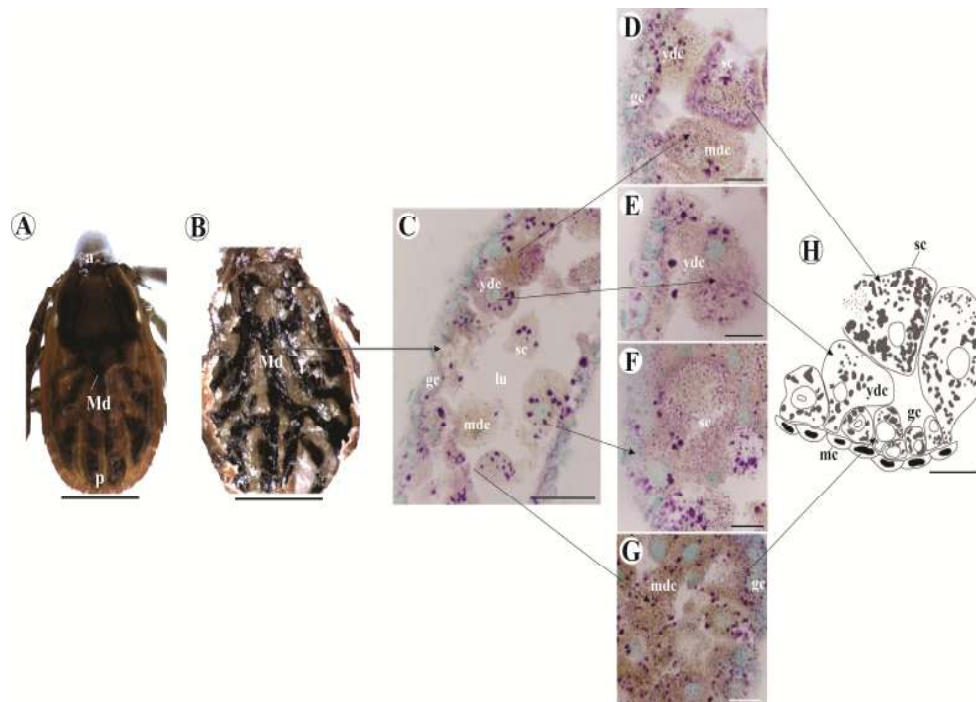


Fig. 1. Acid phosphatase detection in the midgut of *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* females fed for 2 days

(A) External general view (B) Exposed midguts (Md) (C-G) Histological sections to observe young (ydc) and mature digestive cells (mdc), secretory (sc) and generative cells (gc) with acid phosphatase staining varying from weak to moderate (D) Detail of the lumen with the presence of a cell detached from the epithelium, in degranulation stage (holocrine secretion), here called secretory cell (H) Details of the epithelium covering the midgut of females fed for 2 days
a = anterior region; p = posterior region; lu = lumen; Bar (A-B) 1mm; (C) 50 μ m; (D-H) 20 μ m

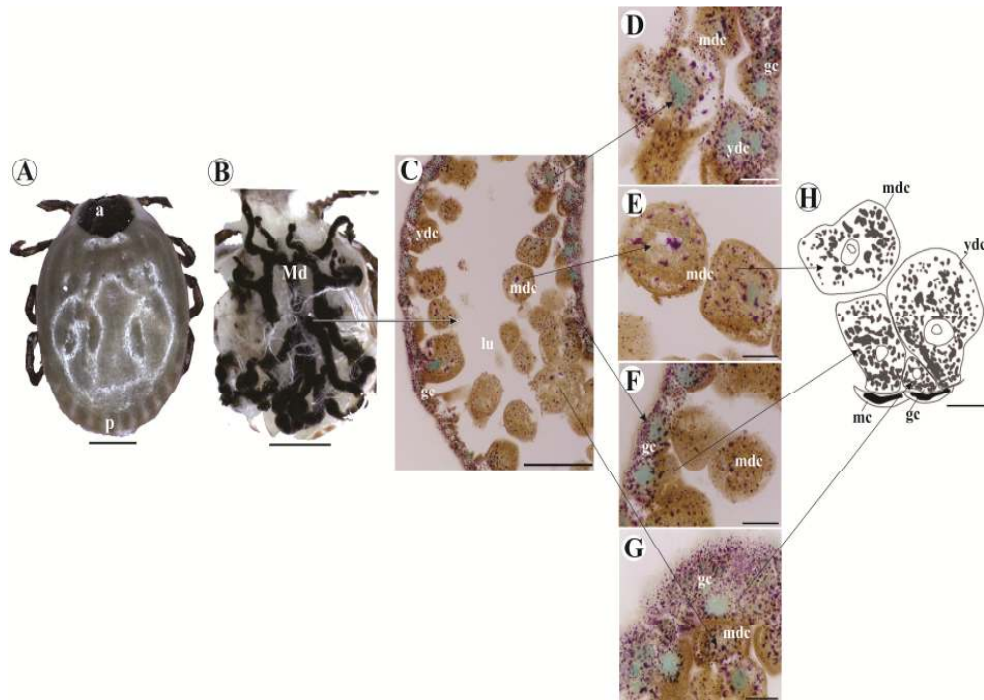


Fig. 2. Acid phosphatase detection in the midgut of *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* females fed for 4 days

(A) External general view (B) Exposed midguts (Md) (C-G) Histological sections to observe young (ydc) and mature digestive cells (mdc), and generative cells (gc) with phosphatase staining varying from weak to strong (H) Details of the midgut epithelium of the females fed for 4 days

a= anterior region; p= posterior region lu = lumen; Bar (A-B) = 1mm; (C) 100 μ m; (D-H) = 20 μ m

4. DISCUSSION

The present study detected and posteriorly evaluated the presence of acid phosphatase in the midgut cells of *R. sanguineus* s. l. females fed for 2 and 4 days on rabbits host. The results showed that the cells (classified into three types: degenerative, young digestive and mature digestive) reacted positively to the acid phosphatase activity; however, the reaction varied according to the level of intensity and location.

According to the literature, the generative cells are pluripotent i.e., in this case, they would be responsible for the differentiation and proliferation of digestive cells in the midgut [16]. The activity of these cells would be triggered by the presence of blood in the digestive system, which would perform mechanical actions, exerting pressure on the epithelium and causing the mechanical stretching of the midgut, once the contact of generative cells with the blood would stimulate cell division and the differentiation into digestive/ secretory cells [6]. Studying *R. appendiculatus*, Walker and Fletcher [9], demonstrated that the generative cells would not be the ones responsible for synthesizing and secreting,

once they do not have a developed synthesis apparatus in their cytoplasm. However, according to some authors, their cytoplasm would have a great accumulation of lipids, which, according to Remedio et al. [16], could be acting as a reserve source of energy. Contrarily to the data reported in the literature, the results of this study showed strong staining for acid phosphatase in the cytoplasm of the generative cells, which indicates that these cells would have pre-stored an enzymatic arsenal to be used in the moment of cell differentiation, a process triggered by either chemical or mechanical stimuli [9].

Therefore, the generative cells (responsible for the epithelium renewal), even still undifferentiated, would have hydrolytic enzymes stored, allowing them (depending on the stimulus) to differentiate into secretory cells – active participants in the extracellular digestion and secretion of elements towards the lumen; or digestive cells, responsible for the intracellular digestion, mainly by the fusion of endosomes with lysosomes, signaling that digestive and secretory cells would have subtle differences when their stocks of acid phosphatase are compared.

Remedio et al. [16] reported that the generative cells in unfed females have a nucleus with condensed chromatin in the cytoplasm, indicating that these cells have low metabolic activity, which was not observed in the midgut cells of semi engorged females, whose nucleus is less condensed. These morphological characteristics would certainly be influencing the physiologic ones, causing alterations in the cellular metabolism, considering that, as the feeding process progresses these cells become increasingly more active. Therefore, the data obtained in this study strongly corroborate Remedio et al. [16], once in the semi engorged females studied here the generative cells in the 4-day fed females were more intensely stained (positive acid phosphatase) than in the 2-day fed females.

Remedio et al. [16], studying the midgut of *R. sanguineus* s. l. females and males fed for different periods (unfed, semi-engorged and engorged), verified the absence of secretory cells in the ticks' epithelia; however, in the present study the presence of cells with irregular morphology was observed in the midgut of the 2-day fed females. These cells were probably in beginning of the degeneration process, with the rupture of the plasma membrane and consequent release of the cytoplasmic content into the midgut lumen (degranulation); corroborating data obtained by Agyei et al. [10] for the species *B. microplus* and *R. appendiculatus*, where the presence of cells with lysosomal enzymes detaching from the epithelium and moving towards the lumen was observed. Reaching the lumen, these cells would continue the degranulation process until total degeneration, signaling that these cells would actually be the secretory holocrine cells [10]. Walker and Fletcher [9] demonstrated that, when present in the tick's digestive tract, the acid phosphatase from the salivary glands [17] or from the secretory cells of the midgut epithelium would have the capacity to pre-digest the material absorbed by the cells through efficient processes of selective endocytosis. On the other hand, Agbede and Kemp [5] postulated that the secretory cells would be the main responsible for the lysis of the blood cells originated from the tick's feeding process on the host and present in the lumen of the digestive tract. The lysis of these cells would allow and facilitate the absorption of the blood components, which would be very important for the individuals in the initial feeding stages. These are relevant data, once they corroborate the ones obtained in this study, considering that secretory cells were only found in the midgut epithelium of females fed for 2 days; i.e., in the initial feeding stage. In the studies developed by Remedio et al. [16], who analyzed only unfed and semi engorged (fed for 4-5 days) females, this cell type was not identified.

Therefore, the presence of secretory cells, whose morphology is little different from the digestive cells, as well as the detection of acid phosphatase in the generative cells, confirm the hypothesis that the digestive and secretory cells would be the same cell type in different physiological stages, corroborating Agyei et al. [11], who suggested that the digestive cells would undergo different stages, where both their morphology and physiology would be altered, characterizing the multifunctionality.

The midgut epithelium cells showing all the morphological characteristics of the digestive type showed positive staining for acid phosphatase; however, this staining varied in intensity (weak of strong). These data corroborate Gough and Kemp [13], who also reported variation in the reaction intensity and location of the acid phosphatase in the cytoplasm of digestive cells in *B. microplus* semi engorged females. According to these authors, this variation would probably occur due to the feeding stage of the individual and consequent physiologic state of the midgut epithelial cells. Still according to Remedio et al. [16] and corroborated here, these physiological variations would be the basis to classify the *R. sanguineus* s. l. midgut epithelial cells as young and mature digestive, emphasizing that the young one could be subdivided into pyknotic and phagocytic types.

Therefore, when the generative cells differentiated into young digestive, they started the absorption (by pinocytosis) of the soluble blood components, originated from the extracellular pre-digestion. During the digestion itself, these cells would undergo morphological alterations, their form changes from cubic to columnar, stretching towards the lumen, and they start to phagocytize the erythrocytes and leukocytes present there (phagocytic digestive). In this moment, these cells would be found in high digestion activity, which would consequently cause the positive staining for acid phosphatase (in different intensities), probably because the digestion process would occur asynchronously [16]. It is important to emphasize that the different cell types (pyknotic, phagocytic and mature digestive cells) were found with distinct enzymatic contents, depending on the intracellular digestion stage.

According to Agyei and Runham [11], in the end of the intracellular digestion process, the digestive cells would detach from the midgut epithelium, usually keeping their spherical shape and would remain loose in the midgut lumen. The cytoplasm of these cells would show protein-positive vacuoles, in addition to several residual bodies, which would allow their classification as mature digestive cells. In *R.*

(*Boophilus microplus*), the cytoplasm of mature digestive cells contained deposits of glycogen, lipid droplets, and a significant number of yellow to dark brown granules [5]. Remedio et al. [16] also observed the presence of many granules with these characteristics in the midgut of *R. sanguineus* s. l. females, corroborating the information that the digestive cells found in the midgut lumen of females fed for 2 and 4 days could be considered mature digestive cells, due to the presence of granule conglomerates of the same color distributed in the cytoplasm. In addition, for being in the end of the intracellular digestion process, these cells would present weaker staining for acid phosphatase.

However, in this study some mature cells were strongly stained by acid phosphatase, suggesting that these are physiologically multifunctional cells, mainly in the 2-day fed females that would be in the process of synthesis and secretion of acid phosphatase for the extracellular digestion; and not using this enzyme exclusively for intracellular digestion.

5. CONCLUSIONS

Thus, the results for acid phosphatase obtained in the present study reinforce the multifunctionality of the digestive/secretory cells found in the midgut of the 2-day fed females, and demonstrates the occurrence of secretory cells in the midgut of *R. sanguineus* s. l. females in the feeding stages within the period of 2 days. Another important finding was the presence of acid phosphatase both in generative and digestive/secretory cells, which places this enzyme as a target for further studies aimed to find new strategies for tick control, due to its fundamental role in the absorption and digestion of the host's blood, ensuring the survival of the ectoparasites and their offspring as well (nutrients for oogenesis).

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors are grateful to FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Grants n° 2014/02843-8), to the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (Grant n° 300625/2012-0) and L. Juliano and M.I. Camargo Mathias academic carrier research fellowships) for the financial support and to Mr. Gérson de Mello Sousa for technical support.

COMPETING INTERESTS

Authors have declared that no competing interests exist.

REFERENCES

1. Kaufman WR. Tick-host interaction: A synthesis of current concepts. *Parasitol. Today*. 1989;5:47–56. DOI: 10.1016/0169-4758(89)90191-9
2. Higuchi S. Development of *Theileria sergenti* in the midgut of the tick, *Haemaphysalis longicornis*. *Nihon Juigaku Zasshi*. 1987;49: 341–347.
3. Kocan KM, Morzaria SP, Voigt WP, Kiarie J, Irvin AD. Demonstration of colonies of *Cowdria ruminantium* in midgut epithelial cells of *Amblyomma variegatum*. *Am. J. Vet. Res.* 1987;48:356–60.
4. Balashov YS. Bloodsucking ticks (Ixodoidea)--vectors of diseases of man and animals. *Misc. Publ. Entomol. Soc. Am.* 1972;8:161–376.
5. Agbede RIS, Kemp DH. Digestion in the cattle-tick *Boophilus microplus*: Light microscope study of the gut cells in nymphs and females. *Int. J. Parasitol.* 1985;15:147–157. DOI: 10.1016/0020-7519(85)90080-3
6. Agyei AD, Runham NW. Studies on the morphological changes in the midguts of two ixodid tick species *Boophilus microplus* and *Rhipicephalus appendiculatus* during digestion of the blood meal. *Int. J. Parasitol.* 1995;25: 55–62. DOI: 10.1016/0020-7519(94)00114-4
7. Caperucci D, Mathias MIC, Bechara GH. Histopathology and ultrastructure features of the midgut of adult females of the tick *Amblyomma cajemense* fabricius. 1787 (Acari: Ixodidae) in various feeding stages and submitted to three infestations. *Ultrastruct. Pathol.* 2009;33:249–259. DOI: 10.3109/01913120903296945
8. Sonenshine DE, Roe R. *Biology of ticks*. 2^a, Oxford University Press, New York; 2014.
9. Walker AR, Fletcher JD. Histology of digestion in nymphs of *Rhipicephalus appendiculatus* fed on rabbits and cattle naive and resistant to the ticks. *Int. J. Parasitol.* 1987; 17:1393–1411. DOI: 10.1016/0020-7519(87)90075-0
10. Agyei AD, Herbert IV, Runham NW. Histochemical localisation of acid phosphatase and non-specific esterase in the midguts of two species of tick, *Boophilus microplus* and *Rhipicephalus appendiculatus*, as determined by light microscopy. *Parasitol. Res.* 1991;77: 629–634.
11. Agyei AD, Runham NW, Blackstock N. Histochemical changes in the midgut of two ixodid tick species *Boophilus microplus* and *Rhipicephalus appendiculatus* during digestion

- of the blood meal. *Exp. Appl. Acarol.* 1992;13: 187–212.
DOI: 10.1016/0020-7519(94)00114-4
12. Coons LB, Rosell-Davis R, Tarnowski BI. Blood meal digestion in ticks, in: J.R. Sauer, A.J. Hair (Eds.), *Morphol. Physiol. Behav. Biol. Ticks*, Ellis Horwood Ltd, Chichester. 1986;248–279.
13. Gough JM, Kemp DH. Acid phosphatase in midgut digestive cells in partially fed females of the cattle tick *Boophilus microplus*. *J. Parasitol.* 1995;81:341–349.
14. Bechara GH, Szabó MPJ, Ferreira BR, Garcia MV. *Rhipicephalus sanguineus* tick in Brazil: Feeding and reproductive aspects under laboratorial conditions. *Brazil J. Vet. Parasitol.* 1995;4:61–66.
15. Hussein MA, Bowen ID, Lewis GHJ. The histochemical localization of ATPase, cholinesterase and acid phosphatase activity in *Culex pipiens* (Diptera, Culicidae) larvae using a methacrylate embedding technique. *Cell Biol. Int. Rep.* 1990;14:775–781.
DOI: 10.1016/0309-1651(90)90004-I
16. Remedio RN, Sampieri BR, Vendramini MCR, Souza NM, Anholeto LA, Denardo TAGB, Camargo-Mathias MI. Morphology of the midgut of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) adult ticks in different feeding stages. *Parasitol. Res.* 2013;112:415–425.
DOI: 10.1007/s00436-012-3153-x
17. Koh K, Mori T, Shiraishi S, Uchida TA. Ultrastructural changes of the midgut epithelial cells in feeding and moulting nymphs of the tick *Haemaphysalis longicornis*. *Int. J. Parasitol.* 1991;21:23–36.
DOI: 10.1016/0020-7519(91)90117-P

Capítulo 3

CAPÍTULO 3

Localização da fosfatase ácida e da proteína calreticulina nas células do intestino médio de fêmeas de *Rhipicephalus sanguineus* l. s. alimentadas por 2 e 4 dias em hospedeiros imunizados com extrato de glândula salivar desta mesma espécie

Elen Fernanda Nodari¹, Luiz Juliano², Melissa Carolina Pereira¹, Natalia Rubio Claret Pereira¹, Marina Rodrigues de Abreu¹, Letícia Maria Gráballos Ferraz Hebling¹ e Maria Izabel Camargo-Mathias^{1*}

¹UNESP – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Avenida 24 A, 1515, 13506-900 - Rio Claro, SP, Brasil, CP 199

²UNIFESP – Universidade Federal de São Paulo, Rua Botucatu, 862, 7º andar, 04023-062 - São Paulo, SP, Brasil, CP 199

* Autor correspondente. *E-mail*: micm@rc.unesp.br

RESUMO

Os carrapatos são considerados um dos mais importantes grupos de ectoparasitas dos pontos de vista médico e veterinário, por causarem lesões no hospedeiro, bem como por transmitirem patógenos. O intestino desses artrópodes tem papel relevante no seu sucesso, visto ser este o local onde se desenvolvem vários endoparasitas causadores de doenças. Além disso esse órgão representa a maior barreira física entre o carrapato e a resposta imunológica do hospedeiro e, juntamente com as glândulas salivares, são considerados locais onde ocorre a produção de antígenos. A aquisição de resistência por parte dos hospedeiros vem sendo foco de vários estudos, inclusive daqueles que buscam encontrar novas formas de controle destes ectoparasitas. Assim, o presente estudo, teve como objetivo avaliar a resposta imunológica dos hospedeiros, por meio: a) da marcação histoquímica da fosfatase ácida e b) da imunohistoquímica da calreticulina presente nas células do intestino médio de fêmeas alimentadas em hospedeiros imunizados com extrato da glândula salivar (EGS) do carrapato *R. sanguineus* l. s. Os resultados mostraram que as células generativas e as digestivas do epitélio intestinal, tiveram marcação positiva, o que indicou que as mesmas estariam ativas na síntese destas duas enzimas. Entretanto, houve reação menos intensa nas fêmeas alimentadas em hospedeiros imunizados quando comparou-se com o grupo controle, demonstrando que a resistência adquirida pelo hospedeiro interferiu na síntese dessas proteínas. A observação de intensa vacuolização citoplasmática nas células intestinais também sinalizou uma interferência parcial ou total da ingestão de sangue. Essas alterações provavelmente levaram a interferência direta no processo de digestão do carrapato e, indiretamente na dinâmica da vitelogênese.

Palavras-chave: células digestivas; células generativas; controle; imunidade adquirida, carrapato-do-cão.

1 INTRODUÇÃO

Os carrapatos são artrópodes hematófagos e ectoparasitas de animais pertencentes a diversos grupos, que incluem desde vertebrados até outras espécies de carrapatos (LABRUNA et al., 2007), constituindo-se assim em um dos mais importantes grupos dos pontos de vista médico e veterinário, por causarem lesões no hospedeiro e a estes transmitirem patógenos (KAUFMAN, 1989).

O intestino destes ectoparasitas é um órgão que tem grande participação no seu sucesso biológico, pois representa a maior barreira física entre o carrapato e a resposta imunológica do hospedeiro (HIGUCHI, 1987; KOCAN et al., 1987). Além disso é o local onde se desenvolvem vários endoparasitas, os quais, por ocasião do processo de alimentação, são transmitidos para os hospedeiros, causando nestes diversas doenças. Deve-se considerar também sua importância como uma fonte de produção de antígenos juntamente com as glândulas salivares (CAPERUCCI; BECHARA; CAMARGO-MATHIAS, 2010; CAPERUCCI; CAMARGO-MATHIAS; BECHARA, 2009; FURQUIM et al., 2011; GILL; BOID; ROSS, 1986; JITTAPALAPONG et al., 2000a; NUNES; BECHARA; CAMARGO-MATHIAS, 2011).

As proteínas antigênicas encontradas na relação carrapato/hospedeiro vem sendo foco de vários estudos na busca por diferentes formas de controle do primeiro. Entre elas tem sido realizadas sucessivas infestações de carrapatos nos hospedeiros (JITTAPALAPONG et al., 2000a; NUNES; BECHARA; CAMARGO-MATHIAS, 2011; VERONEZ et al., 2010) ou ainda a inoculação de extratos produzidos a partir de órgãos dos mesmos (FERREIRA; MACHADO; BECHARA, 1996; FURQUIM et al., 2011; HEBLING et al., 2013; JITTAPALAPONG et al., 2000a, 2000b, 2008). A avaliação da aquisição de resistência é realizada tanto por meio da análise da resposta imunológica do hospedeiro (HEBLING et al., 2013; JITTAPALAPONG et al., 2000b) quanto por parâmetros dos carrapatos, tais como a progressão do processo de alimentação, reprodução e as alterações morfológicas ocorridas nas glândulas salivares e no intestino (CAPERUCCI; BECHARA; CAMARGO-MATHIAS, 2010; CAPERUCCI; CAMARGO-MATHIAS; BECHARA, 2009; FURQUIM et al., 2011; JITTAPALAPONG et al., 2008; NUNES; BECHARA; CAMARGO-MATHIAS, 2011; VERONEZ et al., 2010).

A estimulação da resposta imunológica no hospedeiro é associada com: glicoproteínas, fosfatase ácida, esterases e aminopeptidases (GILL; BOID; ROSS, 1986) e, a fosfatase ácida teria destaque especial por ser uma enzima catalisadora da hidrólise de uma variedade de

monoésteres ortofosfóricos, estando presente tanto nas glândulas salivares de diferentes espécies de carrapatos (BINNINGTON, 1978; FURQUIM; BECHARA; CAMARGO-MATHIAS, 2008; NODARI et al., 2012; NUNES; CAMARGO-MATHIAS; BECHARA, 2006a, 2006b; WALKER; FLETCHER; GILL, 1985), quanto nos diferentes tipos celulares do intestino médio (AGYEI; HERBERT; RUNHAM, 1991; GOUGH; KEMP, 1995; NODARI et al., 2016). Outra proteína considerada importante é a calreticulina, proteína ligante de cálcio que funcionaria como facilitadora da alimentação do carrapato devido as suas ações imunossupressora e antihemostática (BROSSARD; WIKEL, 2004; JAWORSKI et al., 1995; JITTAPALAPONG et al., 2008). Além disso, já é sabido que a calreticulina teria papel na modulação da imunidade do hospedeiro (STEEN; BARKER; ALEWOOD, 2006).

Embora já se tenha disponível na literatura algum conhecimento sobre o efeito das imunizações na alimentação dos carrapatos, ainda são poucos os estudos que abordam as células do intestino médio de carrapatos, quando estes são alimentados em hospedeiros imunizados com extrato de suas glândulas salivares. Estudos dessa natureza mostrariam a ocorrência de alterações morfológicas, detectariam a presença da fosfatase ácida e da proteína calreticulina o que num futuro próximo poderiam servir como base para os estudos de desenvolvimento de vacinas, bem como subsidiariam a busca por novas formas de controle. Os carrapatos *R. sanguineus* l. s., são cosmopolitas e de grande importância médica e veterinária, por serem parasitas de cães domésticos, além de serem vetores para diversos patógenos, tanto para o próprio cão, quanto para o homem (WALKER; KEIRANS; HORAK, 2000).

Assim, considerando o exposto, o presente estudo, teve por objetivo, analisar as possíveis alterações na atividade da fosfatase ácida e na presença da calreticulina nas células do intestino médio de fêmeas do carrapato *R. sanguineus* l. s. alimentados por 2 e 4 dias em hospedeiros previamente imunizados com extrato da glândula salivar, visto a fosfatase ácida ser um antígeno glandular que estimula intensa resposta imunológica, e a calreticulina ser importante na imunomodulação desse ectoparasita.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

2.1.1. Carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* l. s. (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae)

Foram utilizadas fêmeas adultas de carrapatos *R. sanguineus* l. s. alimentadas por 2 e 4

dias em hospedeiros (coelhos Grupo Genético Botucatu) do grupo controle (sem imunização) e em hospedeiros do grupo imunizado com extrato de glândula salivar de fêmeas dessa mesma espécie alimentadas por 2 e 4 dias (EGS2 e EGS4), segundo procedimento descrito por Bechara et al., (1995).

Esse experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) UNESP – Rio Claro, SP, protocolo nº 11/2014.

2.2 Métodos

2.2.1 Inoculação nos hospedeiros

Em sala do Biotério do Departamento de Biologia do Instituto de Biociências da UNESP de Rio Claro (SP) coelhas virgens de infestação tiveram sua região dorsolateral tosada e subcutaneamente, com seringa hipodérmica, foram inoculadas com os extratos EGS2 e EGS4 por três vezes a intervalos de 21 dias. Após 15 dias da última inoculação os hospedeiros foram infestados.

2.2.2 Detecção da atividade da fosfatase ácida (HUSSEIN; BOWEN; LEWIS, 1990)

Fêmeas de carrapatos foram dissecadas em solução fisiológica, para retirada dos intestinos. Na sequência os mesmos foram fixados em formalina neutra tamponada 10% (pH 7-7.4), durante 1 hora e 30 minutos, a 4° C e depois foram lavados em tampão acetato de sódio (0.05M, pH 4.8) para serem incubados por 45 minutos a 37° C em: naftol AS-TR fosfato, DMSO (dimetil sulfóxido), tampão acetato de sódio (0.05M, pH 4.8), MnCl₂.4H₂O 10% e sal vermelho violeta. No controle, o substrato (3 mg de naftol AS-TR fosfato) foi removido do meio de incubação. Após realizou-se a desidratação dos intestinos em concentrações crescentes de álcool (70%, 80%, 90% e 95%) em banhos de 15 minutos para transferência do material para resina de embebição e de inclusão (resina Leica). Posteriormente este foi seccionado, com 7 µm de espessura e as secções foram recolhidas em lâminas de vidro para contra coloração pelo verde de metila por 5 segundos. Depois de secas as lâminas foram montadas em Entellan[®] para observação e fotodocumentação em fotomicroscópio Leica DM750.

2.2.3 Imunohistoquímica para a localização da calreticulina

Os intestinos das fêmeas alimentadas por 2 e 4 dias em hospedeiros controle e

imunizados, depois de removidos foram fixados em paraformaldeído 4% por 1 hora e processados histologicamente para inclusão em paraplast. O material foi seccionado com 6 µm de espessura, recolhido em lâminas de vidro Starfrost® e desparafinado. Na sequência, as lâminas foram aquecidas em micro-ondas em tampão citrato para a recuperação antigênica, bloqueadas com peróxido de hidrogênio para peroxidase endógena, tratadas com Triton X-100 0,5% (Sigma Aldrich, USA) para permeabilização, lavadas por 30 minutos com PBS contendo BSA 3% (Sigma Aldrich, USA) e incubadas em anticorpo policlonal de coelho para calreticulina do carrapato *Haemaphysalis longicornis* (1:100, anticorpo produzido após sucessivas inoculações em coelho hospedeiro da proteína calreticulina dessa espécie de carrapato expressa em *E. coli* e purificada, e coletado o soro dos coelhos imunizados após 15 dias da última inoculação) por 1 hora a 37°C. As lâminas foram então lavadas em PBS contendo BSA 3% (Sigma Aldrich, USA) e incubadas por 1 hora e 30 minutos em anticorpo para IgG de coelho conjugado com peroxidase (1: 100, Sigma Aldrich, USA) à 37° C. O resultado da ligação do anticorpo secundário foi visualizado por meio da utilização do reagente KPL TrueBlue™ peroxidase substrate. As lâminas foram então desidratadas, secas, montadas com Entellan®, observadas e fotodocumentadas em fotomicroscópio Leica DM750. Foram utilizados como controles negativos lâminas sem o anticorpo primário e sem o anticorpo primário e secundário.

3 RESULTADOS

3.1 Fosfatase ácida

3.1.1 Controle negativo

No presente trabalho foi utilizado como controle negativo fragmentos do intestino médio de fêmeas de *R. sanguineus* l. s. alimentadas por 2 e 4 dias, os quais foram incubados no mesmo meio indicado pelo protocolo da técnica, excluindo-se o substrato para a enzima fosfatase ácida. O objetivo foi o de verificar a ocorrência ou não de ligações inespecíficas e, os resultados obtidos demonstraram que as células intestinais foram negativas à técnica (coloração carmim).

3.1.2 Fêmeas alimentadas por 2 dias em coelhos imunizados com EGS2

Nas células intestinais das fêmeas alimentadas por 2 dias, verificou-se significativa redução de intensidade da marcação para a fosfatase ácida, principalmente naquelas digestivas (**Figs.1B-C**). Nas generativas a intensidade da marcação foi fraca (**Figs.1B-C**).

3.1.3 Fêmeas alimentadas por 2 dias em coelhos imunizados com EGS4

As células generativas nas fêmeas alimentadas por 2 dias em coelhos imunizados continuaram a reagir com forte intensidade à marcação para a fosfatase ácida, em comparação àquelas do grupo controle (**Fig.1E**). Nas digestivas observou-se que houve diminuição na intensidade da marcação e, inclusive não tendo sido possível a visualização de células, principalmente das digestivas maduras, as quais já se encontravam em processo de degeneração e, consequentemente com liberação do seu conteúdo para o lúmen do intestino médio (**Fig.1D**).

3.1.4. Fêmeas alimentadas por 4 dias em coelhos imunizados com EGS2

As células generativas e digestivas de fêmeas alimentadas por 4 dias em hospedeiro imunizado com **EGS2** mostraram que houve diminuição na intensidade de marcação da fosfatase ácida, fato esse mais evidente nas células digestivas (**Figs.2B-D**). Observou-se a presença de células digestivas com citoplasma vacuolizado (**Fig. 2C**).

3.1.5. Fêmeas alimentadas por 4 dias em coelhos imunizados com EGS4

Nas fêmeas alimentadas por 4 dias em coelho imunizado com **EGS4**, as alterações na intensidade de marcação da fosfatase ácida, foram as mais evidentes em comparação com os resultados obtidos das situações anteriores (**Figs. 2E-H**). Nas células generativas houve diminuição significativa da atividade da fosfatase ácida, bem como a maioria das células digestivas foram negativas à marcação (**Figs. 2E-H**). Observou-se a frequente presença de células digestivas com citoplasma completamente vacuolizado (**Figs.2F-H**).

3.2 Imunohistoquímica para a detecção da calreticulina (CRT)

3.2.1 Fêmeas alimentadas por 2 dias em coelhos sem imunização

Nas fêmeas alimentadas por 2 dias em coelho controle, ou seja, que não foi imunizado com os extratos das glândulas salivares, pode-se observar intensa marcação para a CRT, tanto nas células generativas quanto nas digestivas (**Fig. 3A**).

3.2.2 Fêmeas alimentadas por 2 dias em coelhos imunizados com EGS2

Nas células intestinais, generativas e digestivas, das fêmeas alimentadas por 2 dias em hospedeiros imunizados com o extrato das glândulas salivares de 2 dias, observou-se diminuição da marcação para a CRT, principalmente nas células digestivas, isso quando

comparou-se às do grupo controle. Nas células generativas a marcação para CRT foi de intensidade moderada (**Fig. 3B**).

3.2.3 Fêmeas alimentadas por 2 dias em coelhos imunizados com EGS4

As células generativas e digestivas do intestino das fêmeas alimentadas em hospedeiros imunizados com EGS4, não sofreram alterações na marcação para a CRT quando comparadas àquelas do grupo controle (**Fig. 3C**).

3.2.4 Fêmeas alimentadas por 4 dias em coelhos sem imunização

As fêmeas alimentadas por 4 dias em coelhos do grupo controle, apresentaram fraca marcação para a CRT, e ainda sendo observada apenas nas células generativas (**Fig. 3D**).

3.2.5 Fêmeas alimentadas por 4 dias em coelhos imunizados com EGS2

Nas fêmeas alimentadas por 4 dias em hospedeiros imunizados com EGS2, houve um leve aumento na intensidade da marcação da CRT, observada tanto nas células generativas, quanto nas digestivas, quando comparadas às do grupo controle (**Fig. 3E**).

3.2.6 Fêmeas alimentadas por 4 dias em coelhos imunizados com EGS4

Nas fêmeas alimentadas em coelho imunizado, observou-se que a marcação para a CRT continuou sendo de fraca intensidade estando presente apenas nas células generativas (**Fig. 3F**).

FIGURAS

Figura 1 - Fêmeas de *R. sanguineus* l. s. alimentadas por 2 dias.

(A) esquema do intestino de fêmeas alimentadas por 2 dias em hospedeiros não imunizados.

(lu) Lúmen do intestino.

(B-C) Fêmeas alimentadas em hospedeiros imunizados com EGS2, onde observa-se redução na marcação da fosfatase ácida nas células generativas (**gc**) e digestivas (**dc**);

(D-E) Fêmeas alimentadas em hospedeiros imunizados com EGS4, onde observa-se redução na marcação para a fosfatase ácida principalmente nas células digestivas (**dc**).

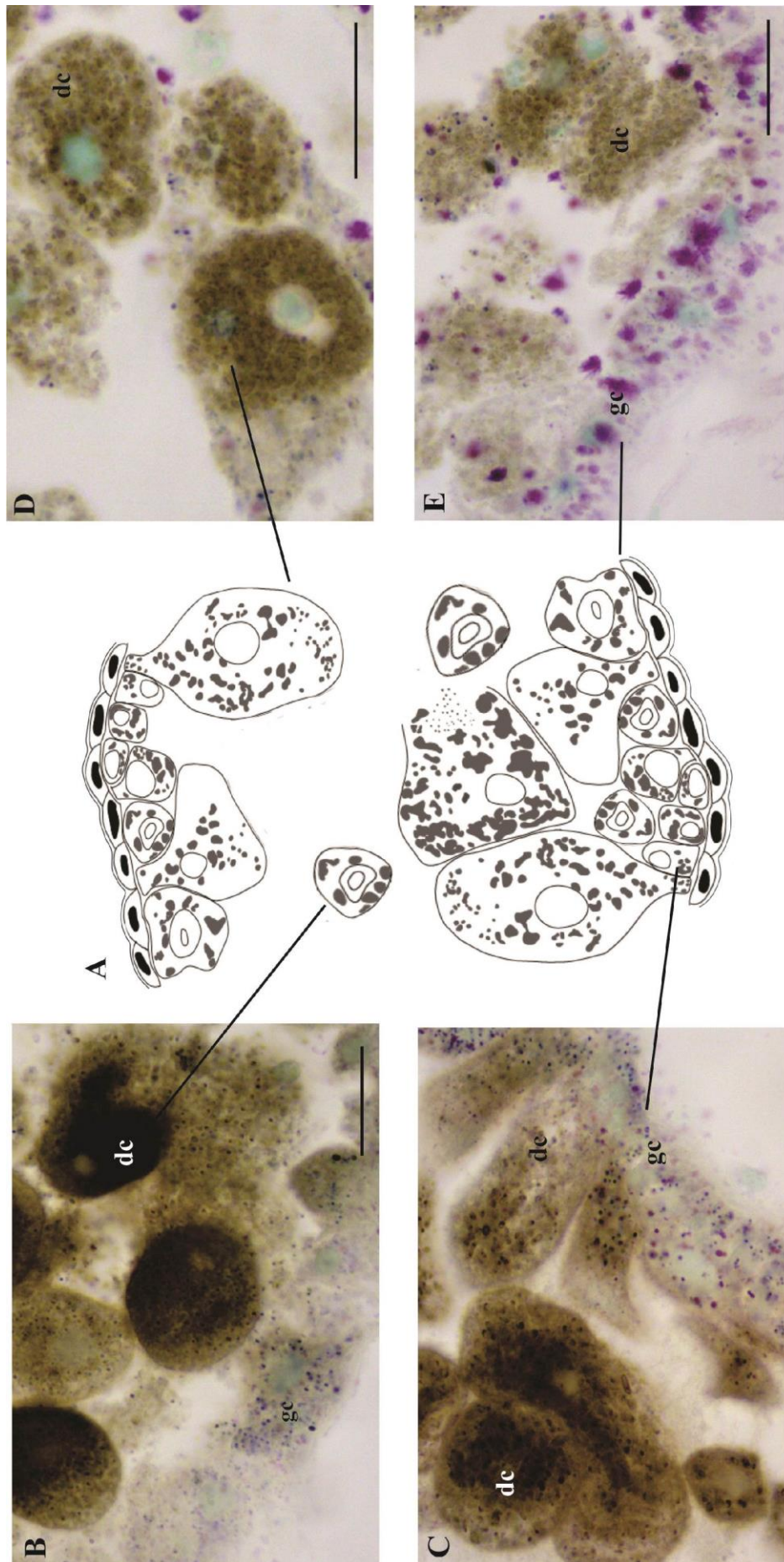


Figura 2 - Fêmeas de *R. sanguineus* l. s. alimentadas por 4 dias.

(A) esquema do intestino de fêmeas alimentadas por 4 dias em hospedeiros não imunizados.

(lu) Lúmen do intestino.

(B-D) Fêmeas alimentadas em hospedeiros imunizados com EGS2, onde observa-se redução na marcação da fosfatase ácida nas células generativas (**gc**) e digestivas (**dc**);

(E-H) Fêmeas alimentadas em hospedeiros imunizados com EGS4, onde observa-se redução na marcação para a fosfatase ácida principalmente nas células digestivas (**dc**), bem como vacuolização (**v**).

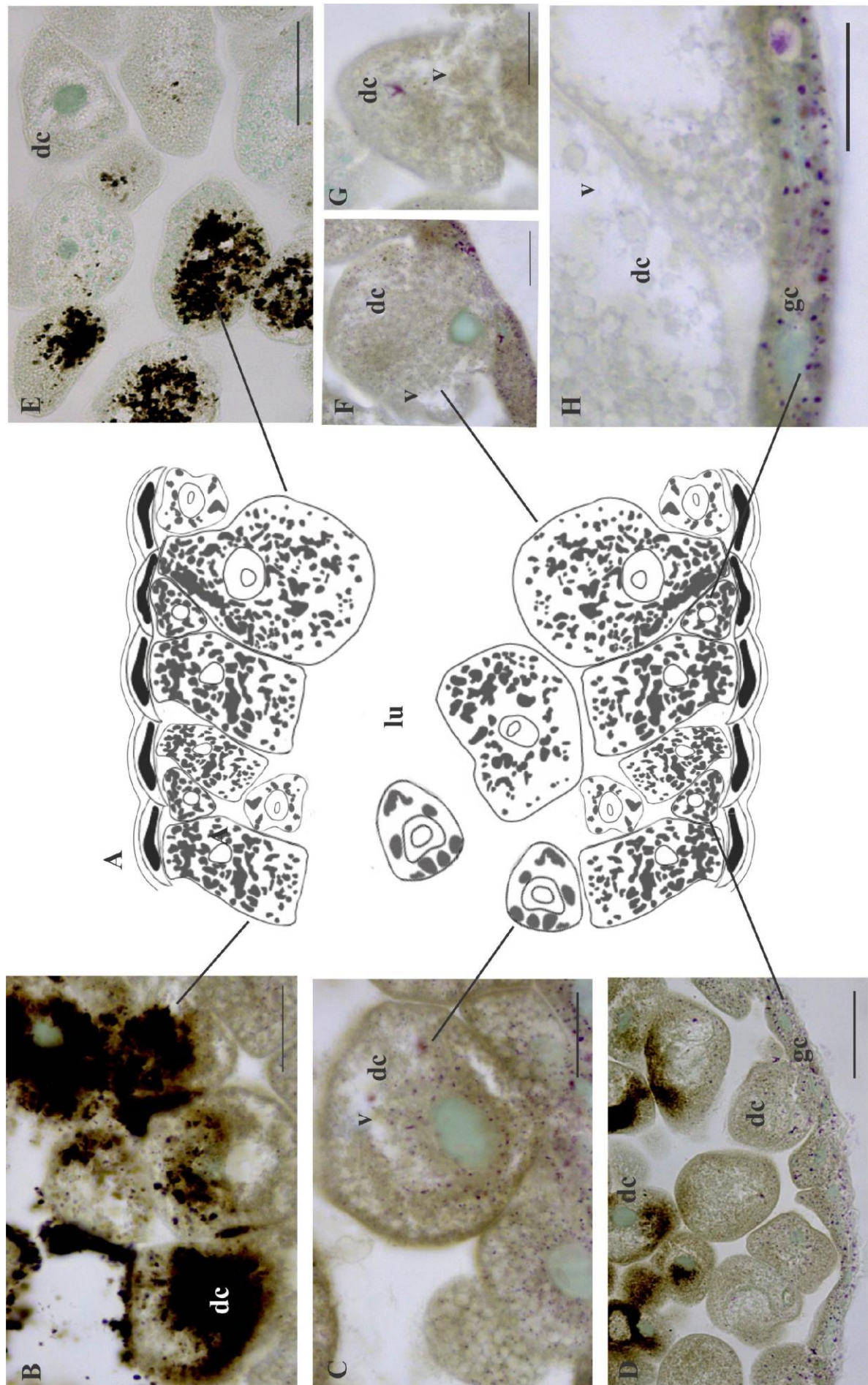
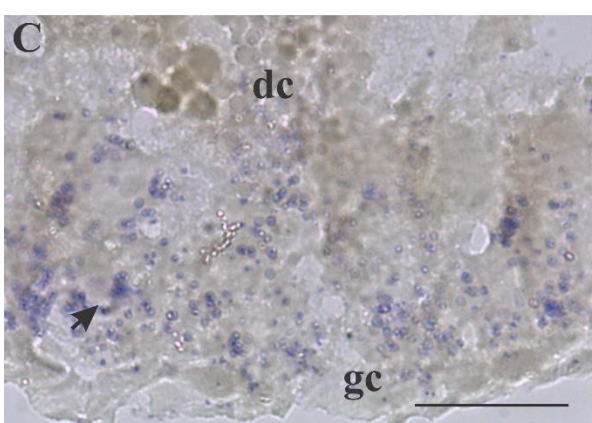
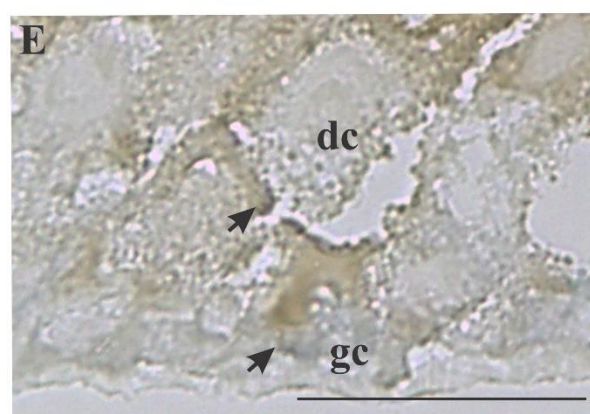
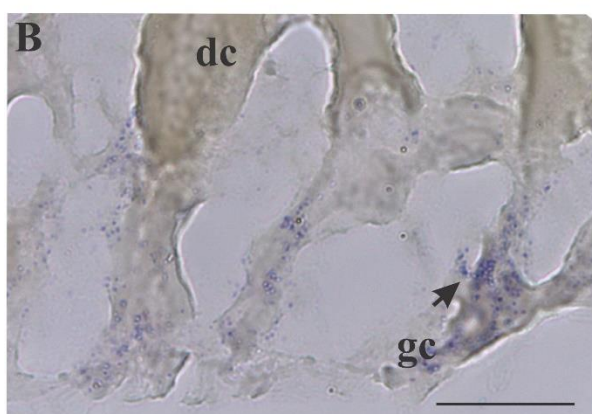
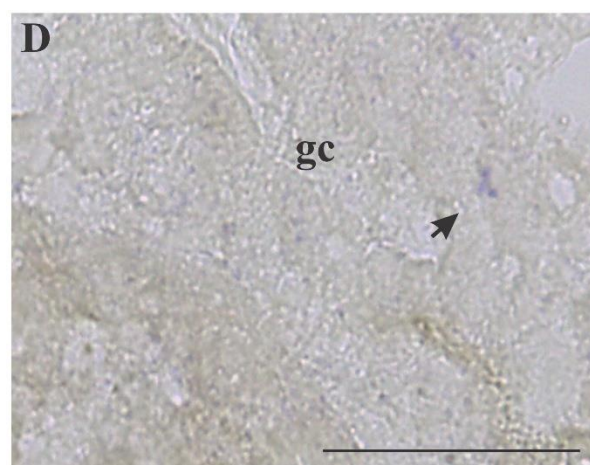
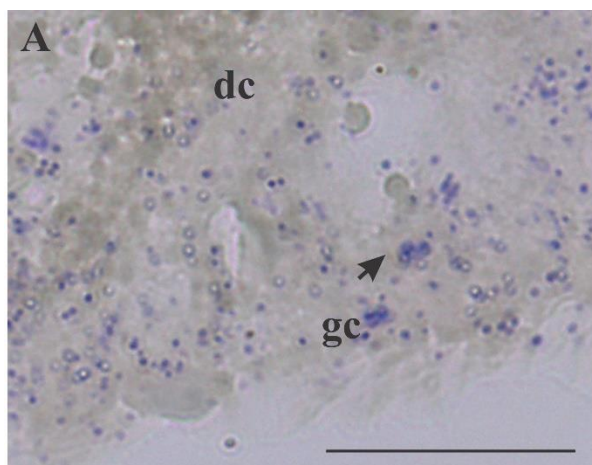


Figura 3 - (A-C) Imunohistoquímica do intestino de fêmeas do carrapato *R. sanguineus* l. s. alimentadas por 2 dias. **(A)** Fêmea alimentada por 2 dias em hospedeiro sem imunização, onde observa-se intensa marcação para CRT nas células generativas (**gc**) e digestivas (**dc**). **(B)** Fêmea alimentada por 2 dias em hospedeiro imunizado com EGS2, onde observa-se diminuição na marcação para CRT, principalmente nas células digestivas (**dc**). **(C)** Fêmea alimentada por 2 dias em hospedeiro imunizado com EGS4. Não é observada alteração na marcação da CRT. **(D-F)** Imunohistoquímica do intestino de fêmeas do carrapato *R. sanguineus* l. s. alimentadas por 4 dias. **(D)** Fêmea alimentada por 4 dias em hospedeiro sem imunização, com fraca marcação para CRT. **(E)** Fêmea alimentada por 4 dias em hospedeiro imunizado com EGS2, observa-se leve aumento na marcação para CRT. **(F)** Fêmea alimentada por 4 dias em hospedeiro imunizado com EGS4, onde não é observada alteração na marcação da CRT quando comparado com o controle. **Seta**= marcação para CRT. **Barras**= 50 µm.



4 DISCUSSÃO

No presente estudo foram realizados bioensaios para detecção da fosfatase ácida e da calreticulina, utilizando como modelo biológico fêmeas do carrapato *R. sanguineus* l. s. A calreticulina (CRT), proteína ligante de cálcio, é essencial no processo de alimentação dos carrapatos, visto ser necessário manter o sangue do hospedeiro fluído desde o local de alimentação no hospedeiro até o interior do intestino do carrapato (RADULOVIĆ et al., 2014). Sendo o cálcio considerado o quarto co-fator da via de ativação da coagulação sanguínea (ASTRUP, 2006), postulou-se que os carrapatos secretariam essa proteína ligante de CA^{2+} , para sequestrá-lo e assim impedir a agregação plaquetária (RADULOVIĆ et al., 2014; STEEN; BARKER; ALEWOOD, 2006), além do que as CRTs seriam facilitadoras da alimentação, uma vez que atuariam como imunossupressoras e antihemostáticas (BROSSARD; WIKEL, 2004; JAWORSKI et al., 1995; JITTAPALAPONG et al., 2008) e também modulariam a imunidade do hospedeiro, simulando um mimetismo molecular ou mesmo induzindo a autoimunidade (STEEN; BARKER; ALEWOOD, 2006).

O intestino médio nos carrapatos está composto por células generativas e digestivas e, nas fêmeas alimentadas por 2 dias em hospedeiros controle aqui analisadas, observou-se uma intensa marcação para a CRT, corroborando os dados de Antunes et al. (2015) e de Rachinsky, Guerrero e Scoles (2007), que relataram a presença dessa proteína no intestino médio de *R. microplus*, bem como de Ferreira et al. (2002) que a observaram em todos os tecidos de carrapatos em vários estágios de desenvolvimento nessa mesma espécie. Os resultados das fêmeas alimentadas por 4 dias em hospedeiro controle, mostraram fraca marcação para a CRT, sugerindo que essa proteína encontrar-se-ia em menor atividade, devido ao período de alimentação, corroborando Agyei e Runham (1995) que relataram baixa atividade celular no final do processo preparatório para a digestão (fase lenta), e o aumento das células digestivas no início da segunda fase de alimentação (fase rápida), as quais nesse momento conteriam maior teor de enzimas lisossomais (AGYEI; HERBERT; RUNHAM, 1991; NODARI et al., 2016).

Nos indivíduos alimentados em hospedeiros imunizados com EGS2, houve alteração da marcação da CRT tanto nas células generativas quanto nas digestivas nos indivíduos alimentados por 2 dias, enquanto que nos alimentados em hospedeiro imunizado com EGS4 não foram detectadas alterações significativas na marcação para CRT, corroborando Radulović et al., (2014). Nas fêmeas alimentadas por 4 dias (período de transição da alimentação entre a fase lenta e a rápida), essa proteína, embora presente, estaria em menores taxas, ou seja, em menor atividade. Resultados semelhantes foram também obtidos por Jaworski et al. (1995) nas

glândulas salivares de fêmeas do carrapato *Amblyomma americanum*, onde a maior atividade de secreção da CRT teria sido nos 3º (fase lenta) e 6º (final do processo de alimentação) dias de alimentação do ectoparasita. Nos indivíduos alimentados por 4 dias foi observada fraca marcação para a CRT, tanto nos ectoparasitas alimentados no hospedeiro controle quanto nos imunizados com EGS4, e um leve aumento na marcação dessa proteína naqueles alimentados em hospedeiros imunizados com EGS2. Essa variação de marcação nos diferentes períodos de alimentação sugere que essa proteína atuaria diferentemente durante o ciclo de alimentação do ectoparasita, participando da imunomodulação e/ou da antihemostase do hospedeiro durante a início, meio e final do processo de alimentação (JAWORSKI et al., 1995).

Quando foram considerados os resultados para a detecção da fosfatase ácida nas células do intestino médio das fêmeas alimentadas por 2 e 4 dias em hospedeiros previamente imunizados com extratos glandulares (EGS2 e EGS4), observou-se que as mesmas reagiram positivamente. A fosfatase ácida é a principal enzima do arsenal das células intestinais de carrapatos, e desempenha papel fundamental na digestão dos componentes do sangue (AGYEI; HERBERT; RUNHAM, 1991; AGYEI; RUNHAM; BLACKSTOCK, 1992; COONS; ROSELL-DAVIS; TARNOWSKI, 1986; GOUGH; KEMP, 1995; NODARI et al., 2016). A marcação nas fêmeas alimentadas em hospedeiro imunizado foi menos intensa do que aquela observada nas fêmeas alimentadas em hospedeiros não imunizados (NODARI et al., 2016). Essa diminuição da atividade da fosfatase ácida seria decorrente da resposta imune do hospedeiro, visto ser o intestino a principal barreira física entre o carrapato e a resposta imunológica (HIGUCHI, 1987; KOCAN et al., 1987), corroborando Caperucci et al. (2010) e Veronez et al. (2010) que observaram alterações morfológicas nas células intestinais de fêmeas alimentadas em hospedeiros imunizados e/ou após sucessivas infestações, bem como observaram a diminuição do metabolismo dessas células.

Nas células do intestino das fêmeas alimentadas em hospedeiros imunizados observou-se a presença de alterações significativas na marcação da fosfatase ácida, principalmente naquelas digestivas. Nos indivíduos alimentados por 2 dias em hospedeiros imunizados com ambos os extratos, observou-se diferenças na marcação, visto as células generativas e as digestivas do primeiro grupo teste (I2-EGS2) terem sido mais fracamente marcadas para a fosfatase ácida, enquanto que no segundo (I2-EGS4), apenas as células digestivas tiveram fraca marcação, dados que poderiam sugerir que as composições do EGS2 e do EGS4 seriam diferentes, ou seja, glândulas salivares de fêmeas alimentadas por 2 dias estariam menos ativas do que aquelas alimentadas por 4 dias. Estas últimas seriam mais ricas em moléculas imunogênicas, o que consequentemente levaria a uma resposta imune-inflamatória mais intensa

(HEBLING et al., 2013).

Nos indivíduos alimentados por 4 dias em hospedeiros imunizados com EGS2 e EGS4, observou-se redução na intensidade da marcação da fosfatase ácida quando comparados com os alimentados pelo mesmo período em hospedeiros não imunizados (NODARI et al., 2016). Essas variações entre os grupos testes provavelmente estaria ocorrendo devido a ativação do sistema imune do hospedeiro, que estaria respondendo de forma diferente e específica aos diferentes extratos, ou ainda, isso poderia estar ocorrendo devido ao período de alimentação considerado. Esta última hipótese corroboraria os dados de Furquim et al. (2011), uma vez que o processo de alimentação evoluiu até o quarto dia, haveria antígenos que seriam compartilhados tanto pelo EGS2, quanto pelo EGS4 e que mobilizariam o sistema imune do hospedeiro e interferiria no processo de alimentação e digestão do sangue.

No intestino das fêmeas alimentadas por 2 dias em hospedeiros imunizados não se observou a presença das células secretoras holócrinas, ou seja, contendo enzimas lisossomais. Estas se destacariam do epitélio em direção ao lúmen intestinal e aí, passariam por um processo de degranulação (liberação do conteúdo citoplasmático para o lúmen do intestino) até finalmente chegarem à total degeneração (AGYEI; HERBERT; RUNHAM, 1991). Essas células seriam responsáveis, nos estágios iniciais de alimentação desse ectoparasita, pelo processo que antecederia a digestão (pré-digestão) inclusive já tendo sido observadas em diferentes espécies de carrapatos alimentados em hospedeiros não imunizados (AGYEI; HERBERT; RUNHAM, 1991; NODARI et al., 2016; WALKER; FLETCHER, 1987).

Walker e Fletcher (1987) já haviam relatado anteriormente a diminuição das células secretoras, além da diminuição de seus grânulos de secreção, quando analisadas ninfas de *R. appendiculatus* alimentadas em hospedeiros resistentes. A partir dos resultados obtidos os autores postularam que essa diminuição seria resultante da produção de anticorpos pelo hospedeiro contra potenciais antígenos (glicoproteínas da membrana plasmática das células digestivas e de fosfatases ácida das células secretoras). Por outro lado deveria ser considerado o fato de que as partes bucais dos carrapatos ixodídeos seriam adaptadas para impedir o regurgitamento do conteúdo intestinal durante a alimentação, o que dificultaria o contato dos antígenos com o hospedeiro (WALKER; FLETCHER, 1987). Os mesmos autores relataram, ainda, a existência de antígenos que seriam compartilhados tanto pela glândula salivar, quanto pelo intestino (SHAPIRO; VOIGT; FUJISAKI, 1986; WALKER; FLETCHER, 1987), o que garantiria que, mesmo que o hospedeiro não tivesse tido contato com antígenos provenientes do intestino, seu sistema imune os reconheceria e provocaria alterações no intestino (WALKER; FLETCHER, 1987). Dados da literatura sugeriram que alguns desses antígenos

compartilhados seriam a fosfatase ácida e a calreticulina, visto ambos terem potencial imunogênico (ANTUNES et al., 2015; FERREIRA et al., 2002; GILL; BOID; ROSS, 1986) e estarem presentes nas glândulas salivares e no intestino das fêmeas de *R. sanguineus* l. s. (FURQUIM; BECHARA; CAMARGO-MATHIAS, 2008; NODARI et al., 2016). Essa presença, aliada à diminuição na marcação para a fosfatase ácida e para CRT encontradas no intestino das fêmeas alimentadas em hospedeiros imunizados com os extratos das glândulas salivares aqui observadas, demonstraram que os antígenos presentes nas glândulas salivares seriam capazes de sensibilizar o sistema imune do hospedeiro contra os antígenos compartilhados com as células do intestino.

Adicionalmente a diminuição de intensidade de marcação da fosfatase ácida nas células intestinais dos indivíduos alimentados por 4 dias em hospedeiros previamente imunizados, também verificou-se a presença de intensa vacuolização citoplasmática nas células digestivas, o que seria um indicativo da inibição parcial ou total da ingestão de sangue, refletindo no epitélio intestinal como fator inibidor dos processos de divisão e de diferenciação celular (VERONEZ et al., 2010). A ausência ou a diminuição da ingestão de sangue poderia estar correlacionada com a diminuição da CRT nas células intestinais nos estágios iniciais da alimentação, levando a uma baixa na atividade dessa proteína importante nos processos de coagulação e de imunomodulação (RADULOVIĆ et al., 2014; STEEN; BARKER; ALEWOOD, 2006).

Assim, de maneira geral, os resultados aqui obtidos das fêmeas de carrapatos *R. sanguineus* l. s. alimentadas em hospedeiros imunizados com EGS2 e EGS4, tais como: a) redução da marcação para a atividade da fosfatase ácida, b) redução na marcação para CRT e c) células digestivas vacuolizadas, permitiram concluir que a imunização dos hospedeiros com esses extratos estimulou o surgimento de resistência nos mesmos, tendo sensibilizado seu sistema imune e ter interferido diretamente no processo de digestão do carrapato e, indiretamente na dinâmica da vitelogênese.

AGRADECIMENTOS

Autores agradecem à FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo nº 2014/02843-8), e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (Processo nº 300625/2012-0 e M.I. Camargo Mathias Bolsas de pesquisas acadêmicas) pelo suporte financeiro e Sr. Gérson de Mello Sousa pelo suporte técnico.

REFERÊNCIAS

- AGYEI, A. D.; HERBERT, I. V.; RUNHAM, N. W. Histochemical localisation of acid phosphatase and non-specific esterase in the midguts of two species of tick, *Boophilus microplus* and *Rhipicephalus appendiculatus*, as determined by light microscopy. **Parasitology Research**, Berlin, v. 77, p. 629–634, 1991.
- AGYEI, A. D.; RUNHAM, N. W. Studies on the morphological changes in the midguts of two ixodid tick species *Boophilus microplus* and *Rhipicephalus appendiculatus* during digestion of the blood meal. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 25, n. 1, p. 55–62, 1995.
- AGYEI, A. D.; RUNHAM, N. W.; BLACKSTOCK, N. Histochemical changes in the midgut of two ixodid tick species *Boophilus microplus* and *Rhipicephalus appendiculatus* during digestion of the blood meal. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 13, p. 187–212, 1992.
- ANTUNES, S. et al. Artificial feeding of *Rhipicephalus microplus* female ticks with anti calreticulin serum do not influence tick and *Babesia bigemina* acquisition. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 6, n. 1, p. 47–55, 2015.
- ASTRUP, T. Blood Clotting and Related Processes. In: NORD, F. F. (Ed.). . **Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology**. 10. ed. [s.l.] Wiley-Blackwell, 2006. p. 1–49.
- BECHARA, G. H. et al. *Rhipicephalus sanguineus* tick in Brazil: feeding and reproductive aspects under laboratorial conditions. **Brazilian Journal Veterinary Parasitology**, São Paulo, v. 4, n. 2, p. 61–66, 1995.
- BINNINGTON, K. C. Sequential changes in salivary gland structure and feeding of the cattle tick, *Boophilus microplus*. **International Journal of Parasitology**, Oxford, v. 8, p. 97–115, 1978.
- BROSSARD, M.; WIKEL, S. K. Tick immunobiology. **Parasitology**, Cambridge, v. 129 Suppl, n. 2004, p. S161–S176, 2004.
- CAPERUCCI, D.; BECHARA, G. H.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Ultrastructure features of the midgut of the female adult *Amblyomma cajennense* ticks Fabricius, 1787 (Acari: Ixodidae) in several feeding stages and subjected to three infestations. **Micron**, New York, v. 41, n. 7, p. 710–721, 2010.
- CAPERUCCI, D.; CAMARGO-MATHIAS, M. I.; BECHARA, G. H. Histopathology and Ultrastructure Features of the Midgut of Adult Females of the Tick *Amblyomma cajennense* Fabricius, 1787 (Acari: Ixodidae) in Various Feeding Stages and Submitted to Three Infestations. **Ultrastructural Pathology**, v. 33, n. 6, p. 249–259, 2009.
- COONS, L. B.; ROSELL-DAVIS, R.; TARNOWSKI, B. I. Blood meal digestion in ticks. In: SAUER, J. R.; HAIR, A. J. (Eds.). . **Morphology, physiology and behavioral biology of ticks**. Chichester: Ellis Horwood Ltd, 1986. p. 248–279.

FERREIRA, B. R.; MACHADO, R. Z.; BECHARA, G. H. Western blot analysis of tick antigens from a *Rhipicephalus sanguineus* unfed larval extract and identification of antigenic sites in tick sections using immunohistochemistry. A comparative study between resistant and susceptible host species. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 62, p. 161–174, 1996.

FERREIRA, C. A. S. et al. Cloning and partial characterization of a *Boophilus microplus* (Acari : Ixodidae) calreticulin. **Experimental Parasitology**, San Diego, v. 101, p. 25–34, 2002.

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**, Berlin, v. 109, n. 1, p. 147–162, 2011.

FURQUIM, K. C. S.; BECHARA, G. H.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Death by apoptosis in salivary glands of females of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). **Experimental Parasitology**, San Diego, v. 119, n. 1, p. 152–163, 2008.

GILL, H. S.; BOID, R.; ROSS, C. A. Isolation and characterization of salivary antigens from *Hyalomma anatolicum anatolicum*. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 8, n. 1, p. 11–25, 1986.

GOUGH, J. M.; KEMP, D. H. Acid phosphatase in midgut digestive cells in partially fed females of the cattle tick *Boophilus microplus*. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 81, n. 3, p. 341–349, 1995.

HEBLING, L. M. G. F. et al. Inoculation of salivary gland extracts obtained from female of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari, Ixodidae) with 2, 4, and 6 days of feeding in rabbit: I - Histopathology of the feeding lesion. **Parasitology Research**, Berlin, v. 112, n. 2, p. 577–584, 2013.

HIGUCHI, S. Development of *Theileria sergenti* in the midgut of the tick, *Haemaphysalis longicornis*. **Nihon juigaku zasshi. The Japanese journal of veterinary science**, Tokyo, v. 49, n. 2, p. 341–347, 1987.

HUSSEIN, M. A.; BOWEN, I. D.; LEWIS, G. H. J. 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**, London, v. 14, n. 9, p. 775–781, 1990.

JAWORSKI, D. C. et al. A secreted calreticulin protein in ixodid tick (*Amblyomma americanum*) saliva. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 41, n. 4, p. 369–375, 1995.

JITTAPALAPONG, S. et al. Performance of female *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) fed on dogs exposed to multiple infestations or immunization with tick salivary gland or midgut tissues. **Journal of medical entomology**, v. 37, n. 4, p. 601–11, 2000a.

JITTAPALAPONG, S. et al. Humoral immune response of dogs immunized with salivary gland, midgut, or repeated infestations with *Rhipicephalus sanguineus*. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 916, p. 283–288, 2000b.

JITTAPALAPONG, S. et al. Immunization with tick salivary gland extracts. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 1149, p. 200–4, 2008.

KAUFMAN, W. R. Tick-host interaction: a synthesis of current concepts. **Parasitology today**, Amsterdam, v. 5, n. 2, p. 47–56, 1989.

KOCAN, K. M. et al. Demonstration of colonies of *Cowdria ruminantium* in midgut epithelial cells of *Amblyomma variegatum*. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 48, n. 3, p. 356–60, 1987.

LABRUNA, M. B. et al. Hyperparasitism in *Amblyomma rotundatum* (Acari: Ixodidae). **The Journal of parasitology**, Lawrence, v. 93, n. 6, p. 1531–1532, 2007.

NODARI, E. F. et al. Degenerative process and cell death in salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) semi-engorged female exposed to the acaricide permethrin. **Microscopy Research and Technique**, v. 75, n. 8, p. 1012–1018, 2012.

NODARI, E. F. et al. Midgut of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae) females fed for 2 and 4 days: acid phosphatase detection and morphophysiology of epithelial cells. **Jornal of Biochemistry International**, v. 3, n. 3, p. 85–91, 2016.

NUNES, E. T.; CAMARGO-MATHIAS, M. I.; BECHARA, G. H. Structural and cytochemical changes in the salivary glands of the *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (CANESTRINI, 1887) (Acari: Ixodidae) tick female during feeding. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 140, n. 1–2, p. 114–123, 2006a.

NUNES, E. T.; CAMARGO-MATHIAS, M. I.; BECHARA, G. H. G. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae): Acid phosphatase and ATPase activities localization in salivary glands of females during the feeding period. **Experimental Parasitology**, Orlando, v. 114, n. 2, p. 109–117, 2006b.

NUNES, P. H.; BECHARA, G. H.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Secretory process of salivary glands of female *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) ticks fed on resistant rabbits. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 53, n. 2, p. 179–187, 2011.

RACHINSKY, A.; GUERRERO, F. D.; SCOLES, G. A. Differential protein expression in ovaries of uninfected and *Babesia*-infected southern cattle ticks, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 37, p. 1291–1308, 2007.

RADULOVIĆ, Ž. M. et al. A 24–48 h fed *Amblyomma americanum* tick saliva immuno-proteome. **BMC Genomics**, v. 15, p. 518–548, 2014.

SHAPIRO, S. Z.; VOIGT, W. P.; FUJISAKI, K. Tick antigens recognized by serum from a guinea pig resistant to infestation with the tick *Rhipicephalus appendiculatus*. **The Journal of parasitology**, Lawrence, v. 72, n. 3, p. 454–63, 1986.

STEEN, N. A.; BARKER, S. C.; ALEWOOD, P. F. Proteins in the saliva of the Ixodida (ticks): Pharmacological features and biological significance. **Toxicon**, New York, v. 47, n. 1, p. 1–20, 2006.

VERONEZ, V. A. et al. Histopathology of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) ticks fed on resistant hosts. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 50, n. 2, p. 151–161, 2010.

WALKER, A. R.; FLETCHER, J. D. Histology of digestion in nymphs of *Rhipicephalus appendiculatus* fed on rabbits and cattle naive and resistant to the ticks. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 17, n. 8, p. 1393–1411, 1987.

WALKER, A. R.; FLETCHER, J. D.; GILL, H. S. Structural and histochemical changes in the salivary glands of *Rhipicephalus appendiculatus* during feeding. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 15, n. 1, p. 81–100, 1985.

WALKER, J. B.; KEIRANS, J. E.; HORAK, I. G. **The Genus *Rhipicephalus* (Acari, Ixodidae): a Guide to the Brown Ticks of the World**. [s.l.] Cambridge University Press, 2000.

Capítulo 4

CAPÍTULO 4

A proteína calreticulina: antígeno candidato nos estudos de imunogenicidade contra *Rhipicephalus sanguineus* l. s.

Elen Fernanda Nodari¹, Melissa Carolina Pereira¹, Natalia Rubio Claret Pereira¹, Luis Fernando Parizi², Itabajara da Silva Vaz Júnior², Gustavo Seron Sanches³, Sandra Antunes³, Ana Domingos³, Letícia Maria Gráballos Ferraz Hebling¹, Luiz Juliano⁴ e Maria Izabel Camargo-Mathias^{1*}

¹UNESP – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Avenida 24 A, 1515, 13506-900 - Rio Claro, SP, Brasil, CP 199

²UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Centro de Biotecnologia, Avenida Bento Gonçalves, 9500, Porto Alegre 91501-970, RS, Brasil

³IHMT – Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Nova Universidade de Lisboa, Rua da Junqueira 100, 1349-008, Lisboa, Portugal

⁴UNIFESP – Universidade Federal de São Paulo, Rua Botucatu, 862, 7º andar, 04023-062 - São Paulo, SP, Brasil, CP 199

* Autor correspondente. *E-mail*: micm@rc.unesp.br

RESUMO

Os carrapatos são considerados artrópodes praga uma vez que sendo ectoparasitas hematófagos, causam grandes prejuízos na agropecuária, visto os mesmos atacarem vertebrados de importância econômica e médica veterinária. Desta forma tem se intensificado a busca por métodos de controle que consigam eliminar os ectoparasitas sem causar danos maiores aos hospedeiros, nem tão pouco ao meio ambiente. Assim o controle imunológico de carrapatos por meio da aplicação de vacinas, vem sendo considerado uma estratégia economicamente viável e sustentável. Dentre os potenciais alvos para a produção de vacinas está a calreticulina com funções de ser facilitadora da alimentação, de participar na hemostasia e na imunomodulação dos hospedeiros. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial imunogênico da proteína recombinante calreticulina do carrapato *Haemaphysalis longicornis* (CRT-HI) e sua reatividade cruzada contra o carrapato *Rhipicephalus sanguineus* l. s. As análises *in silico* revelaram similaridade de 87% entre as sequências das CRTs dessas duas espécies e que as regiões conservadas são antigênicas. Os resultados *in vitro* demonstraram que há reatividade cruzada entre as CRTs, e que a CRT-HI após 3 inoculações é imunogênica para os hospedeiros. Foram analisadas as glândulas salivares de fêmeas de *R. sanguineus* l. s. alimentadas por 4 dias em hospedeiros imunizados e detectou-se alterações morfofisiológicas, bem como verificou-se a expressão de genes relacionados à morte, que demonstraram que a imunização dos hospedeiros com a calreticulina interfere na morfofisiologia das glândulas salivares levando-as à degeneração precoce, provocando redução na síntese e na secreção dos elementos da saliva. Esses resultados vêm fortemente sinalizar que a calreticulina seria um potencial antígeno candidato no desenvolvimento de vacinas para o controle de carrapatos.

Palavras-chave: vacina; imunização; antígeno; controle; carrapato do cão; glândula salivar.

1 INTRODUÇÃO

Os carrapatos são considerados artrópodes de grande importância médica e veterinária, por serem os agentes diretos de danos aos seus hospedeiros, onde realizam o repasto sanguíneo. Além disso esses ectoparasitas atuam como transmissores de enfermidades como arboviroses, rickettsioses, espiroquetoses e de protozoonoses (KAUFMAN, 1989). O complexo *Rhipicephalus sanguineus* se destaca por sua distribuição cosmopolita, parasitando principalmente o cão doméstico (WALKER; KEIRANS; HORAK, 2000). Na América Latina o grupo *R. sanguineus* l. s. é representado por duas linhagens distintas, denominadas de tropical, distribuída do México ao Brasil, e de temperada, restrita ao cone sul da América (MORAES-FILHO et al., 2011).

Atualmente, as alterações climáticas tem promovido além do aumento populacional de algumas espécies de carrapatos, alteração na sua distribuição geográfica, o que tem consequentemente promovido o aumento do contato destes com os humanos, bem como aumentado o risco de transmissão de doenças (CAMARGO-MATHIAS, 2018; ESTRADA-PEÑA et al., 2013). No Brasil, já foi confirmada no carrapato *R. sanguineus* l. s. a presença de *Rickettsia rickettsii* e de *R. parkeri*, bactérias causadoras da febre maculosa (BARBOSA SILVA et al., 2017; DE OLIVEIRA et al., 2016; LABRUNA, 2009; PADDOCK et al., 2017), bem como o envolvimento desse ectoparasita no ciclo endêmico da doença (MOERBECK et al., 2016), o que eleva a espécie *R. sanguineus* l. s. ao status de potencial transmissora da febre maculosa, tornando prioritário o controle desses vetores, uma vez que afetam a saúde pública.

Os métodos de controle convencional (químico sintético), além de serem onerosos devido ao alto custo da aplicação e da mão de obra, promovem a seleção de populações de carrapatos resistentes, além de causarem danos ao meio ambiente e à saúde pública (FREITAS; POHL; VAZ, 2005). Desta forma há uma busca por métodos de controle alternativo, como o biológico, acaricidas naturais, e por meio de vacinas (ANHOLETO et al., 2017; MATOS et al., 2014; ROMA et al., 2013; SABADIN et al., 2017; VENDRAMINI et al., 2012a, 2012b). Segundo Parizi et al. (2012), o controle imunológico de carrapatos por meio da aplicação de vacinas, seria uma estratégia economicamente viável e benéfica, e que fomentaria a busca por potenciais antígenos, obtidos desde extratos proteicos de órgãos dos carrapatos, (FURQUIM et al., 2011; JITTAPALAPONG et al., 2008) até de proteínas isoladas (PARIZI et al., 2009, 2012; SABADIN et al., 2017).

Dentre os potenciais alvos para a produção de vacinas está a calreticulina que se destaca por possuir funções importantes, tais como a de ser facilitadora da alimentação, de participar

na hemostasia e na imunomodulação dos hospedeiros (BROSSARD; WIKEL, 2004; JAWORSKI et al., 1995; JITTAPALAPONG et al., 2008; RADULOVIĆ et al., 2014; STEEN; BARKER; ALEWOOD, 2006). Por ser uma proteína ligante de cálcio e estar presente em vários sistemas do carrapato (na secreção salivar, nas glândulas salivares, além de em outros órgãos) ela está altamente conservada nas diferentes espécies consideradas, tendo se tornado cada vez mais atrativa para o desenvolvimento de vacinas (ANTUNES et al., 2015; FERREIRA et al., 2002; PARIZI et al., 2009).

Diante desse cenário, o presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial antigênico da proteína calreticulina (clonada de carrapatos *Haemaphysalis longicornis*), em coelhos hospedeiros, bem como detectar a reatividade cruzada com os carrapatos *R. sanguineus* l. s. Foi também realizada uma avaliação do efeito da imunização dos hospedeiros sobre a morfologia das glândulas salivares de fêmeas do carrapato *R. sanguineus* l. s. alimentados por 4 dias, fazendo para tanto o uso de técnicas histológicas, de expressão de genes relacionados à apoptose e da detecção tanto da fosfatase ácida, quanto da calreticulina.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

2.1.1. Carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* l. s. (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae)

Foram utilizadas fêmeas adultas de carrapatos *R. sanguineus* l. s., linhagem tropical, alimentadas por 2 e 4 dias em hospedeiros (coelhos Grupo Genético Botucatu) do grupo controle (sem imunização) e em hospedeiros do grupo imunizado com a proteína calreticulina (CRT-HI).

Esse experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) UNESP – Rio Claro, SP, protocolo nº 11/2014.

2.2 Métodos

2.2.1 Análises *in silico*

O alinhamento das sequências de aminoácidos das CRTs (*H. longicornis* FJ536258, *R. sanguineus* AAR29961) foi realizado através do software BioEdit, versão 7.2.6.1. As regiões imunogênicas da CRT foram preditas pelo algoritmo de Jameson Wolf, utilizando o software

Laser gene versão 7.0.0.

2.2.2 Expressão e purificação da calreticulina recombinante de *Haemaphysalis longicornis* (CRT-HI)

A CRT-HI foi expressa em *Escherichia coli* AD494 (DE) e purificada como previamente descrito por Parizi et al., (2009). A proteína recombinante CRT-HI foi clonada com cauda de histidina e purificada através de coluna HisTrap FF (GE Healthcare), e a concentração foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

2.2.3 Extrato das glândulas salivares de *R. sanguineus* l. s. de 2 e 4 dias de alimentação (EGS2 e EGS4)

As fêmeas com 2 e 4 dias de alimentação foram dissecadas e tiveram suas glândulas salivares removidas que na sequência foram maceradas em PBS pH 7,4, centrifugadas por 15 minutos a 8.000 x g, tiveram os sobrenadantes recolhidos e filtrados 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. Depois foram encaminhados para a dosagem de proteínas totais pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

2.2.4 Avaliação da reatividade cruzada *in vitro*

A avaliação da reatividade cruzada dos anticorpos anti-CRT-HI contra a CRT nativa do carrapato *R. sanguineus* l. s. foi realizada através da metodologia do Western Blot. As amostras de EGS2, EGS4 e da própria CRT-HI, a 1 µg/canaleta, foram aplicadas no gel de poliacrilamida 12% e transferidas para membrana de nitrocelulose. As membranas foram bloqueadas com 0,1M Trisma base, 0,9 NaCl, pH 7,6 (TBS) + 2% de BSA (Sigma Aldrich, USA) por 1 hora em temperatura ambiente e sob agitação constante, incubadas com soro de coelhos controle, anti-EGS2, anti-EGS4 e anti-CRT-HI (1:500) (diluídas em TBS-0,1% Tween + 2% de leite desnatado - Molico) por 16 horas em temperatura ambiente. Após foram incubadas por 1 hora a temperatura ambiente com anticorpo secundário anti-IGg de coelho conjugado com fosfatase alcalina (1: 10.000, Sigma Aldrich, USA) e revelado com tampão de revelação com solução de substrato-cromógeno de BCIP/NBT.

2.2.5 Inoculação nos hospedeiros

Em sala do Biotério do Departamento de Biologia do Instituto de Biociências da UNESP de Rio Claro (SP) coelhas virgens de infestação por carrapatos tiveram sua região dorsolateral tosada e, subcutaneamente com seringa hipodérmica, foram inoculadas com a proteína CRT-HI (200 µg de proteína em 70 µL) e com o adjuvante de Freund completo (70 µL, referência nº F 5881, Sigma Aldrich, USA) por três vezes a intervalos de 21 dias. Após 15 dias da última inoculação os hospedeiros foram infestados com casais de *R. sanguineus* l. s (50 casais/hospedeiro). Os coelhos controle foram inoculados com o mesmo volume de PBS + adjuvante de Freund. As amostras de sangue dos hospedeiros foram recolhidas após 7 dias de cada inoculação, e o soro foi separado por centrifugação (5000g por 10 minutos) e armazenados a -20° C para posterior análise.

2.2.6 Análise sorológica pelo método de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

A análise da resposta humoral dos coelhos foi realizada pelo método de ELISA, previamente descrito por Parizi et al. (2009). Foi utilizado como anticorpo primário o soro dos coelhos do grupo controle e do experimental (1:50 a 1:256000), como anticorpo secundário anti-IGg de coelho conjugado com a peroxidase (1:5000) (Sigma Aldrich, USA) e placas de alta afinidade (Jet Biofil®). A absorbância foi mensurada em 492 nm em leitor espectrofotômetro de microplaca (EZ Read 400 Microplate Reader, Biochrom). Os resultados obtidos foram apresentados como média ± e.p.m. e submetido estatisticamente a análise de variância com comparações múltiplas (ANOVA), seguido do teste Bonferroni (duas vias), com significância de $P > 0,0001$. O programa GraphPad Prisma (GraphPad Prism Software Inc, 2007) foi utilizado para conduzir as análises.

2.2.7 Detecção da calreticulina por imunofluorescência (adaptado de ANTUNES et al., 2015)

As glândulas salivares das fêmeas alimentadas por 4 dias em coelhos hospedeiros controle e imunizados (CRT) foram fixadas em RNA later (Sigma Aldrich, USA) e armazenados em freezer -80° C. Após foram lavadas em PBS (pH 7,4) por 10 minutos (2x) e pós-fixadas em formaldeído 3,7% em PBS por 2 horas. As glândulas foram novamente lavadas em PBS, permeabilizadas com Triton-X100 0,5% (Sigma Aldrich, USA) em PBS por 30 minutos, lavadas em PBS para retirar o excesso e foram bloqueados os sítios inespecíficos com

BSA 3% (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) a 4° C por 16 horas. Foram lavadas em PBS, e incubadas com soro de coelho imunizado com a CRT-HI diluído em PBS (1:50) em solução de bloqueio por 1 hora a 37°C, lavados em PBS, e incubados com anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com FITC (488 green) (Rhea Biotech- Brasil) diluído (1:100) em solução de bloqueio por 1 hora a 37°C. Após a lavagem final com PBS, as glândulas salivares foram submetidas a montagem total em meio ProLong® Gold Antifade com DAPI (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) e cobertas com lamínulas. As imagens foram adquiridas em microscópio de varredura a laser confocal Leica TCS-SP5 II, com ganho de 1000, offset -1,0% e potência de laser à 19%. Os padrões foram estabelecidos para comparação da emissão de fluorescência das glândulas salivares do grupo controle com os imunizados.

2.2.8 Análise histológica

As fêmeas de *R. sanguineus* l. s. alimentadas por 4 dias em coelhos do grupo controle e do experimental depois de anestesiadas por choque térmico (30 segundos à 0° C) foram dissecadas para retirada das glândulas salivares, os quais foram na sequência fixados em formalina neutra tamponada 10% por 24 horas, desidratados em soluções crescentes de etanol (70, 80, 90 e 95%) em intervalos de 15 minutos cada. Logo após, foram transferidos para solução de resina Leica sem catalisador, durante 24 horas e colocados em geladeira. Posteriormente, o material foi transferido para moldes plásticos previamente preenchidos com resina contendo catalisador. Depois de polimerizados os blocos foram seccionados e as secções com 3 µm de espessura foram hidratadas, recolhidas em lâminas de vidro, coradas pela hematoxilina de Harris e eosina aquosa (HE)(JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013), secas e montadas em Entellan® para observação e fotodocumentação em fotomicroscópio Leica DM750.

2.2.9 Detecção da atividade da fosfatase ácida (HUSSEIN; BOWEN; LEWIS, 1990)

Para a realização desta técnica as glândulas salivares foram fixadas em formalina neutra tamponada 10% (pH 7- 7.4), durante 1 hora e 30 minutos, a 4° C. Na sequência foram lavadas em tampão acetato de sódio (0.05M, pH 4.8) e incubadas por 45 minutos a 37° C em: naftol AS-TR fosfato, DMSO (dimetil sulfóxido), tampão acetato de sódio (0.05M, pH 4.8), MnCl₂.4H₂O 10% e sal vermelho violeta. Para o controle o substrato (3 mg de naftol AS-TR

fosfato) foi excluído do meio de incubação. Na sequência, foi realizada a desidratação em concentrações crescentes de álcool (70%, 80%, 90% e 95%) em banhos de 15 minutos e se transferiu o material para resina de embebição e de inclusão (resina Leica). Posteriormente o material foi seccionado, com 7 µm de espessura. As secções foram recolhidas em lâminas de vidro e contra-coradas com hematoxilina de Harris por 3 segundos. Então, as lâminas depois de secas foram montadas em Etelan[®] para observação e fotodocumentação em fotomicroscópio Leica DM750.

2.2.10 Extração do RNA e síntese de cDNA

Para extração do RNA das glândulas salivares das fêmeas alimentadas por 4 dias em hospedeiros imunizados com a CRT-HI e em hospedeiros não imunizados (10 pares de glândulas por grupo), utilizou-se a solução monofásica de isotiocianato de guanidina e fenol, Trizol (Invitrogen Life Technologies, Estados Unidos), segundo protocolo do fabricante, com pequenas modificações. Após adição de 100 µL do reagente Trizol a cada amostra, estas foram maceradas e homogeneizadas com pistilo mecânico e em seguida incubadas por 16 horas a 4°C. Na sequência, adicionaram-se a cada tubo 20 µL de clorofórmio e procedeu-se a centrifugação a 12.000 x g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante, contendo o RNA, foi transferido para um novo tubo com auxílio de micropipeta, sendo adicionados 50 µL de álcool isopropílico à 4°C. Após incubação à temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugação a 12.000 x g por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi removido e o sedimento lavado com 100 µL de etanol a 75%. Após nova centrifugação a 7.500 x g por 5 minutos a 4°C, o etanol foi retirado, os microtubos foram mantidos abertos em temperatura ambiente por 10 minutos para secagem e o sedimento ressuspenso com água livre de DNases e RNases. A concentração de RNA total foi estimada em espectrofotômetro (NanoDrop ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer, NanoDrop Technologies) usando absorbância a 260 nm, e sua qualidade foi verificada por eletroforese em gel desnaturante de agarose (1%) corado com brometo de etídio.

Para a síntese do cDNA, as amostras foram normalizadas, diluindo-se cada uma delas para uma concentração final de 265 ng/µL. O cDNA foi sintetizado utilizando-se o kit iScript cDNA synthesis (Bio-rad Laboratories, California, Estados Unidos), de acordo com recomendações do fabricante. Para a síntese de 20 µL de cDNA foram utilizados 15 µL da amostra de RNA normalizada, 4 µL da mix 5x iScript reaction e 1 µL da transcriptase reversa iScript. As reações foram realizadas em termociclador T100 (Bio-rad Laboratories, California, Estados Unidos), utilizando-se uma etapa de preparação de 5 minutos a 25° C, seguida pela

etapa da transcrição reversa a 46° C durante 20 minutos e finalmente, procedeu-se a inativação da transcriptase reversa mantendo-se a temperatura de 95° C por 1 minuto. O cDNA produzido foi armazenado a -20° C para posterior utilização nas reações da polimerase em cadeia em tempo real (qPCR).

2.2.11 Amplificação de genes relacionados à morte celular por PCR em tempo real

A avaliação da expressão de alguns genes foi utilizada para mensurar o efeito dos tratamentos no processo de morte celular. Foram utilizados neste estudo genes que codificam proteínas envolvidas na via intrínseca da morte celular, como BaX (**B** cell leukemia/lymphoma-2 associated **X**) e citocromo C, bem como o gene que codifica a caspase-8, envolvida na via extrínseca do processo de morte celular. Oligonucleotídeos iniciadores específicos foram desenhados com o auxílio do software Primer 3 versão 0.4.0, a partir de sequências depositadas em base de dados como UniProt, utilizando-se a plataforma Blast2GO. A reação foi padronizada a fim de garantir a melhor temperatura e a concentração ideal dos oligonucleotídeos iniciadores, e o produto da PCR foi sequenciado através do método Sanger, feito pela STABVIDA Portugal, garantindo a amplificação do alvo correto. Os genes que codificam a proteína ribossomal 16S rRNA, a β -tubulina e o fator de alongação 1 (ELF1) foram utilizados como genes de referência, os quais foram escolhidos com base na literatura (FERROLHO et al., 2017; ZIVKOVIC et al., 2010). Os oligonucleotídeos iniciadores e as condições ideais utilizadas na qPCR são apresentadas na **Tabela 1**, sendo que para determinar a temperatura de anelamento foi realizado um gradiente de temperatura de 55°C a 95°C com acréscimo de 0,5°C por 5 segundos e utilizando diferentes concentrações dos oligonucleotídios iniciadores (de 0,1; 0,2 e 0,5 μ M). Os ensaios de amplificação foram realizados em triplicata utilizando uma reação de volume total final de 10 μ L, contendo uma mistura de 1 μ L do cDNA-amostra, 5 μ L de tampão iQ SYBR Green Supermix (BioRad, California, USA), 0,2 μ M de cada oligonucleotídeo iniciador para a caspase e 0,5 μ M para os demais genes, e água ultrapura esterilizada (VWR, Alfragide, Portugal) q.s.p. 10 μ L. As reações de amplificação foram conduzidas em placas de PCR de padrão baixo do tipo “multiplate unskirted” (Bio-rad Laboratories, California, Estados Unidos) contendo 96 poços, em aparelho termociclador CFX96 Thermal Cycler (Bio-Rad, Califórnia, Estados Unidos). Adicionalmente, foram realizadas análises de sensibilidade das reações de qPCR, utilizando 6 diluições em série (de 10⁻¹ a 10⁻⁶) com cDNA de *R. sanguineus* l. s. para os genes de referência e com fragmentos

sintetizados (gBlock) para os genes relacionados com a morte celular. A eficiência de amplificação foi calculada a partir da inclinação da curva padrão em cada corrida, utilizando a seguinte fórmula ($E = 10^{-1} / \text{inclinação}$) (BUSTIN et al., 2009). Todas as análises foram realizadas obedecendo às normas estabelecidas pelo MIQE (Minimum Information for publication of Quantitative real-time PCR Experiments) (**Tabela 2**) (BUSTIN et al., 2009). Água ultra-pura esterilizada (VWR, Alfragide, Portugal) foi utilizada como controle negativo nos ensaios de qPCR.

2.2.10 Análise da expressão dos genes relacionados à morte celular

A análise da expressão dos genes relacionados ao processo de morte celular foi conduzida utilizando-se o programa Bio-Rad CFX Manager™ (Bio-rad Laboratories, California, Estados Unidos). Os níveis de expressão destes genes foram normalizados com os genes de referência 16S rRNA, β -tubulina e ELF1. O cálculo da expressão normalizada relativa de cada gene foi calculada pelo método do $2^{-\Delta\Delta Cq}$, que calcula a diferença entre os valores de Cq do gene alvo e dos genes de referência (ΔCq) e compara estes valores. Os genes foram considerados diferencialmente expressos para cima ou para baixo considerando um limiar de 1,3 vezes e intervalo de confiança de 95% ($P < 0,05$).

3 RESULTADOS

3.1 Identidade, antigenicidade e reconhecimento das CRTs

A predição da sequência de aminoácidos da calreticulina de *H. longicornis* foi 87% idêntica à da CRT de *R. sanguineus* l. s. O alinhamento das proteínas mostrou que as duas sequências de CRT possuem regiões conservadas, e o mapeamento *in silico* revelou que a maioria das regiões conservadas também são antigênicas (**Fig.1**). As amostras de soro dos hospedeiros imunizados com os extratos das glândulas salivares de *R. sanguineus* l. s. foram capazes de reconhecer a CRT-HI, bem como observou-se que houve reação sorológica cruzada entre a CRT nativa dos extratos de glândulas salivares de *R. sanguineus* l. s., principalmente de fêmeas alimentadas por 4 dias (**Fig. 2**), ao contrário do observado com o soro dos animais pré-imunes.

3.2 Imunogenicidade da CRT-HI

A aplicação do método ELISA mostrou os níveis detectáveis de IgG anti-CRT-HI no soro dos coelhos imunizados com a CRT-HI e controle (**Fig. 3**). Após 3 inoculações da proteína CRT-HI, as amostras de soro dos coelhos imunizados reconheceram essa proteína, além do que os níveis encontrados estavam muito acima daqueles observados no grupo controle, sugerindo que a CRT-HI foi imunogênica em coelhos.

3.3 Detecção da calreticulina

Os resultados obtidos da aplicação da técnica para detecção da calreticulina (CRT) nas glândulas salivares de fêmeas do carrapato *R. sanguineus* l. s. estão mostrados na figura 4. Nas glândulas do grupo controle observa-se a presença de marcação positiva nas fêmeas alimentadas por 4 dias, comprovando que a CRT é constituinte original da glândula salivar (**Figs. 4A-B**). No grupo teste, onde as fêmeas foram alimentadas em hospedeiros imunizados via inoculação da proteína calreticulina recombinante de *Haemaphysalis longicornis* (CRT-HI), nas glândulas salivares de fêmeas alimentadas por 4 dias foi possível observar uma redução significativa na marcação para CRT (**Figs. 4C-D**).

3.4 Análise histológica

Realizou-se a avaliação histológica das glândulas salivares de fêmeas alimentadas por 4 dias em hospedeiros imunizados com a CRT-HI, com o objetivo de se verificar a ação dos anticorpos anti-CRT-HI produzidos pelos mesmos.

Os resultados obtidos mostraram que as glândulas salivares das fêmeas alimentadas no hospedeiro controle mantiveram sua morfologia original íntegra, podendo ser observados os diversos tipos de ácinos, com forma arredondada, assim como anteriormente descrito por Furquim et al. (2008) (**Figs. 5A-C**). Nas fêmeas alimentadas em coelhos imunizados com CRT-HI, as glândulas apresentaram indícios de alterações morfológicas, tais como a perda da forma arredondada dos ácinos, o que os tornou irregulares (**Figs. 5D-G**), bem como a presença de ácinos rompidos e com características de ácinos indeterminados (**Fig. 5G**).

Os resultados mostraram também a presença de células acinares as quais estavam com seus núcleos morfológicamente alterados, ou seja, com cromatina condensada e marginalizada (**Fig. 5D**).

3.5 Detecção da fosfatase ácida

Os efeitos da imunização dos hospedeiros sobre as fêmeas de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* l. s. alimentadas por 4 dias nos mesmos foram obtidos via aplicação da técnica para detecção da fosfatase ácida. As fêmeas do grupo controle, alimentadas em hospedeiros não imunizados apresentaram marcação positiva para a fosfatase ácida na região próxima ao lúmen dos ácinos II e III, o que era esperado, visto essa enzima ser parte constituinte da secreção glandular (**Figs. 6A-C**). Quando analisadas as glândulas das fêmeas alimentadas em coelhos imunizados com CRT-HI, observou-se um aumento na intensidade de marcação para a fosfatase ácida, principalmente nas células dos ácinos II e III (**Figs. 6E-G**), além de terem sido detectadas alterações morfológicas (ácinos irregulares) e a presença de ácinos indeterminados e fragmentados (**Figs. 6E-G**). Os ácinos I desses indivíduos não sofreram alterações (**Fig. 6D**).

3.6 Expressão dos genes envolvidos na morte celular

Os resultados da expressão dos genes relacionados à morte celular nas glândulas salivares de fêmeas de *R. sanguineus* l. s. alimentadas por 4 dias em hospedeiros imunizados com CRT-HI, estão representados na figura 7, onde observa-se que houve um aumento na expressão do gene BaX (up-regulation), entretanto, este não foi significativo quando comparado ao grupo controle. A expressão do gene citocromo C não sofreu alteração.

A expressão da caspase-8, ao contrário dos outros genes teve um aumento significativo (up-regulation) quando se comparou aos resultados obtidos do grupo controle, o que indicou a ocorrência de morte apoptótica pela via extrínseca.

Tabela 1 - Conjunto de oligonucleotídeos iniciadores e as condições utilizadas na qPCR

Gene	Primers	Condições
Citocromo C	F: 5'- GTC TCA TTG GAC GCA AGA CA -3' R: 5'- TAA GGC CAG CAA AAA CCA TC - 3'	95°C por 3 min, 45 ciclos de 95°C por 15 seg, anelamento 60°C por 30 seg e 55°C à 95°C com acréscimo de 0,5°C por 5 seg.
BaX	F: 5'- ACT CGG GAC AAC CTC ACA AC -3' R: 5'- TCG CTG CAG AAG AAG AAG AA - 3'	95°C por 3 min, 45 ciclos de 95°C por 15 seg, anelamento 60°C por 30 seg e 55°C à 95°C com acréscimo de 0,5°C por 5 seg
Caspase 8	F: 5'- TGC GAA AGT TCG AGC CCA TG -3' R: 5'- GAA GTG CCT TGA GAT CTC CG - 3'	95°C por 3 min, 45 ciclos de 95°C por 15 seg, anelamento 60°C por 30 seg e 55°C à 95°C com acréscimo de 0,5°C por 5 seg
16S Ticks	F: 5'- GAC AAG AAG ACC CTA -3' R: 5'- ATC CAA CAT CGA GGT - 3' (ZIVKOVIC et al., 2010)	95°C por 3 min, 45 ciclos de 95°C por 15 seg, anelamento 57,2°C por 30 seg e 55°C à 95°C com acréscimo de 0,5°C por 5 seg.
ELF	F: 5'- CGT CTA CAA GAT TGG TGG CAT T -3' R: 5'- CTC AGT GGT CAG GTT GGC AG - 3' (FERROLHO et al., 2017)	95°C por 3 min, 45 ciclos de 95°C por 15 seg, anelamento 57,2°C por 30 seg e 55°C à 95°C com acréscimo de 0,5°C por 5 seg.
β-tubulina	F: 5'- AAC ATG GTG CCC TTC CCA CG -3' R: 5'- GCA GCC ATC ATG TTC TTT GC - 3' (FERROLHO et al., 2017)	95°C por 3 min, 45 ciclos de 95°C por 15 seg, anelamento 58°C por 30 seg e 55°C à 95°C com acréscimo de 0,5°C por 5 seg.

Tabela 2: Parâmetros da reação para os genes das glândulas salivares de fêmeas alimentadas em hospedeiros controle e imunizados com CRT

Genes	Eficiência	R²	Inclinação	y-Intercepção
Citocromo C	99,5%	0,997	-3,334	3,771
BaX	90,8%	0,984	-3,566	3,613
Caspase 8	113,6%	0,996	-3,033	8,451
16S Ticks	96,4%	0,993	-3,410	20,634
ELF	101,8%	0,994	-3,280	24,738
β-tubulina	80,8%	0,983	-3,888	25,689

FIGURAS

Figura 1 - Comparação entre as regiões conservadas e antigênicas das CRTs de *H. longicornis* (CRT-HI) e *R. sanguineus* l. s. (CRT-Rs). Plots de índice antigênico das CRTs utilizando algoritmo Jameson-Wolf. O aumento gráfico positivo mostra os locais antigênicos. O alinhamento mostra regiões altamente conservadas entre as CRTs de *H. longicornis* e *R. sanguineus* l. s. Regiões com alta antigenicidade e similaridade estão destacadas em retângulos.

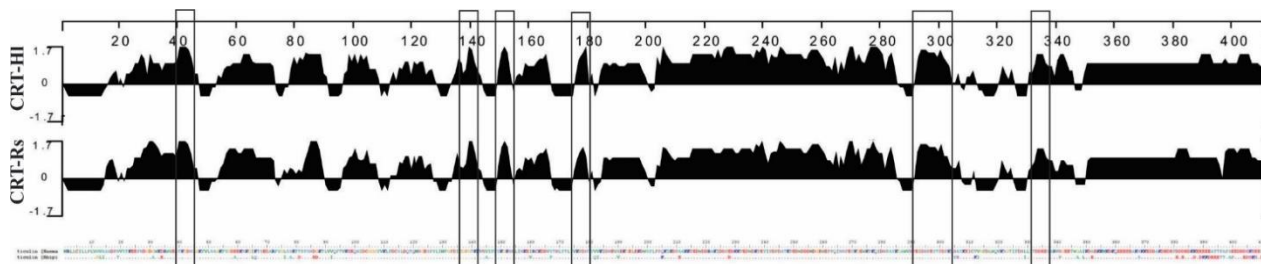


Figura 2 - Western blot dos soros dos hospedeiros controle (C) e imunizados com extrato de glândulas salivares de 2 (EGS2), de 4 dias (EGS4) e com a proteína CRT-HI. **(1)** Peso molecular padrão; **(2)** EGS2; **(3)** EGS4; **(4)** CRT-HI. Houve reatividade cruzada da CRT nativa presente nos extratos das glândulas salivares de fêmeas de *R. sanguineus* l. s., com a proteína CRT recombinante de *H. longicornis*, indicando que os hospedeiros imunizados com os extratos (CRT nativa) produziram anticorpos que reconheceram a CRT-HI. Peso molecular aproximado das CRTs 55-60 kDa (▶).

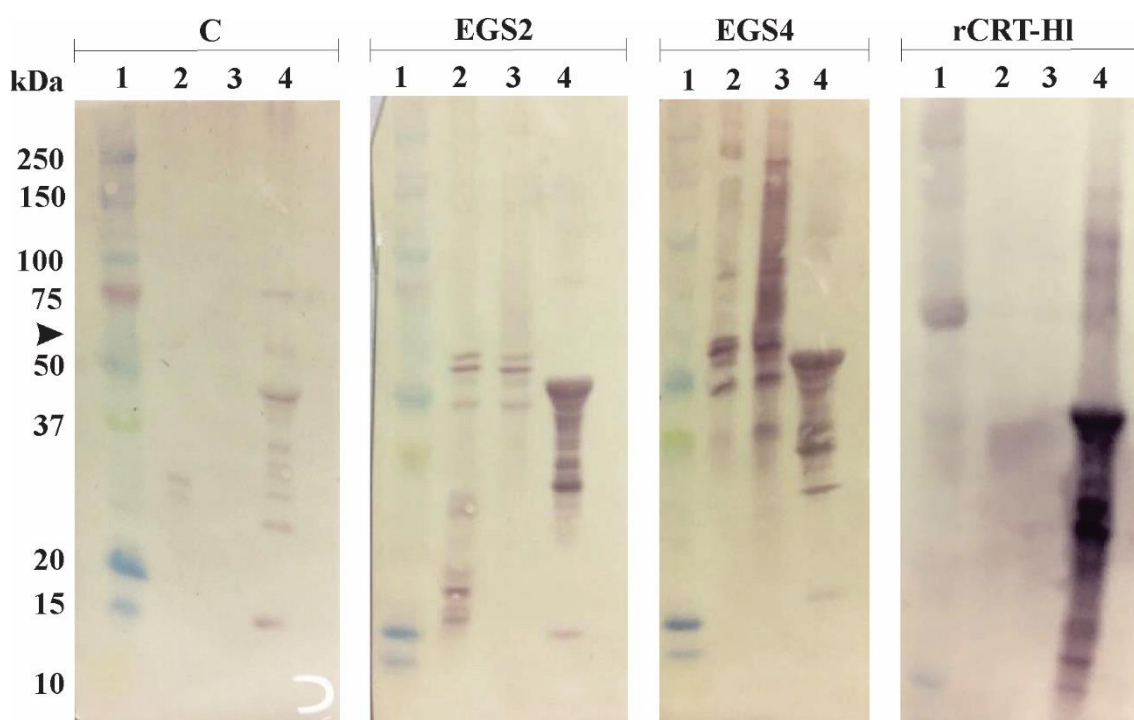


Figura 3 - Resposta imune humoral dos coelhos imunizados com a proteína CRT-HI (ImuCRT) e coelhos do grupo controle (PBS) analisados por ELISA com antígeno recombinante de CRT. A linha tracejada representa 10x a média de D.O. dos controles. O asterisco mostra a diferença significativa ($P < 0,001$) entre os grupos controle ($n=2$) e imunizado ($n=2$).

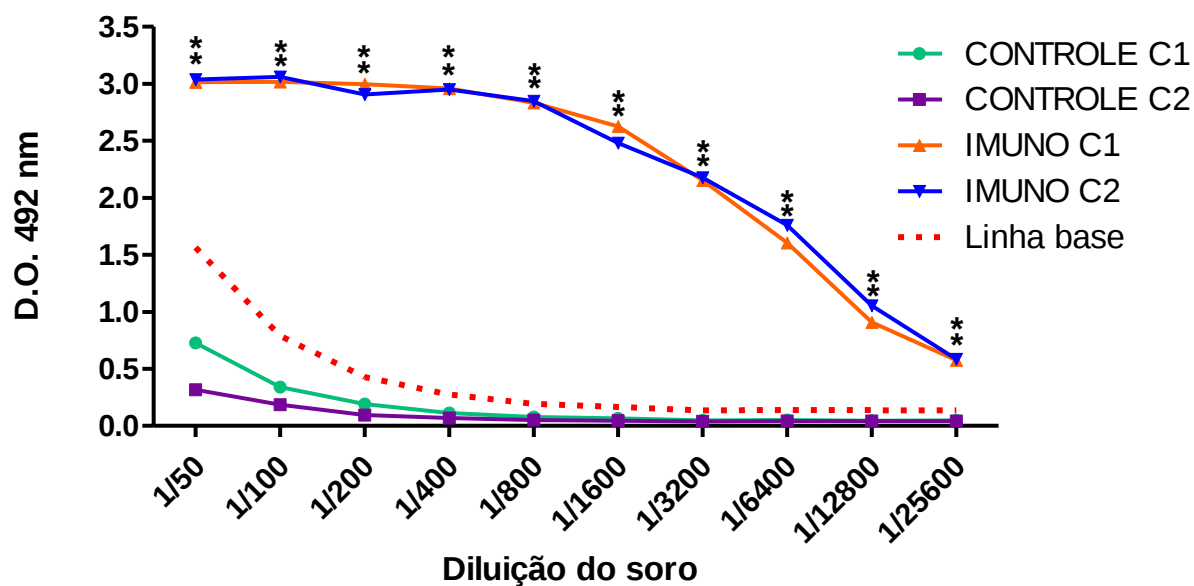


Figura 4 - Imunofluorescência das glândulas salivares de fêmeas do carrapato *R. sanguineus* l. s. alimentadas por 4 dias. **(A-B)** Glândula de fêmea alimentada por 4 dias em hospedeiro sem imunização (controle). **(C-D)** Glândula de fêmea alimentada por 4 dias em hospedeiro imunizado com CRT-HI. **Verde**= marcação para a CRT; **Azul**= núcleos. **Barras**= 50 μ m.

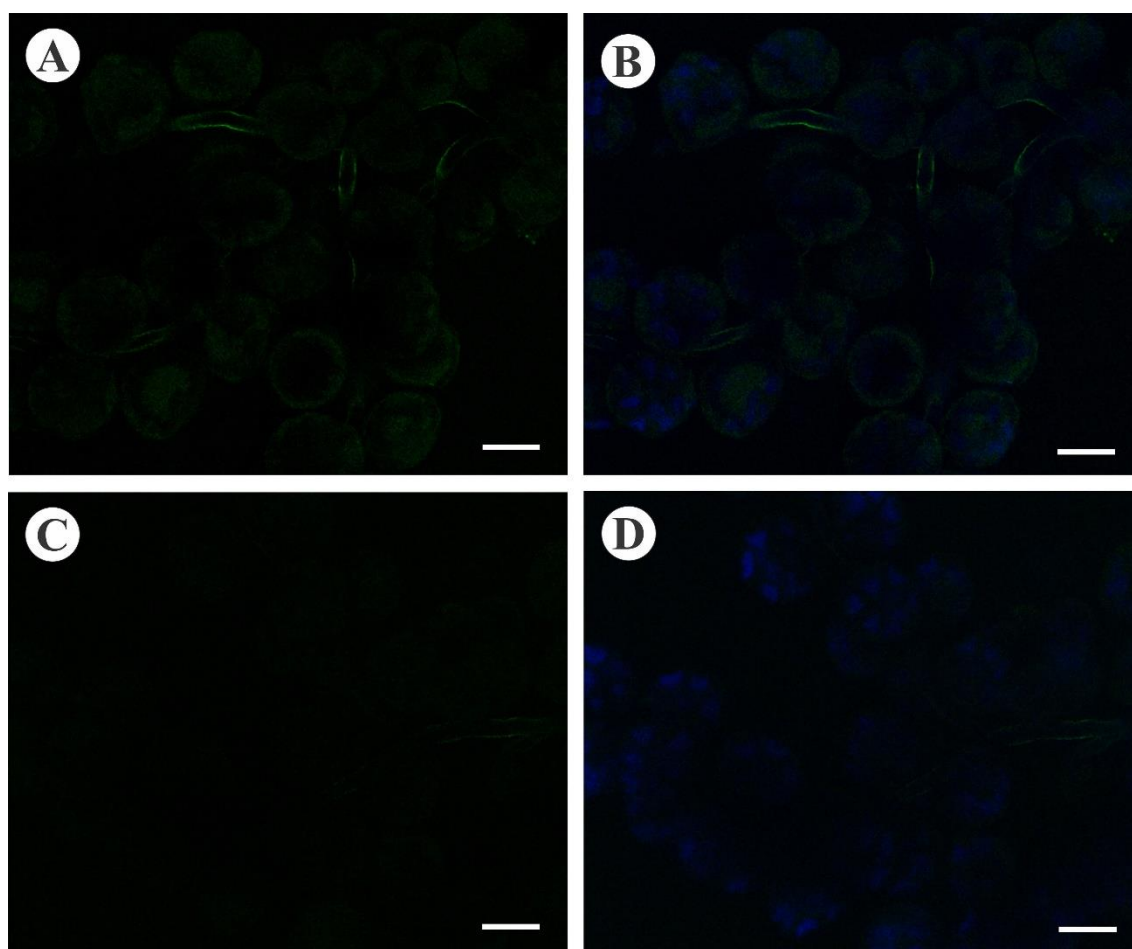


Figura 5 - Seções histológicas das glândulas salivares de fêmeas alimentadas por 4 dias em hospedeiros controle (A-C) e em hospedeiros imunizados com CRT-HI (D-G) coradas com HE. (A-C) ácidos I (I), II (II) e III (III) com morfologia íntegra, apresentando forma arredondada, bem como núcleos íntegros; (D) Ácidos I (I) com morfologia irregular, com sinais de vacuolização (v) e núcleos com início de condensação (cc) e marginalização da cromatina (mc). (E) Ácidos II (II) com morfologia irregular, apresentando dutos acinares dilatados (dt). (F-G) Ácidos III (III) com morfologia irregular, núcleos com alteração da forma, bem como aparecimento de ácidos indeterminados (Ind) e fragmentados (seta). Barras: 50 µm.

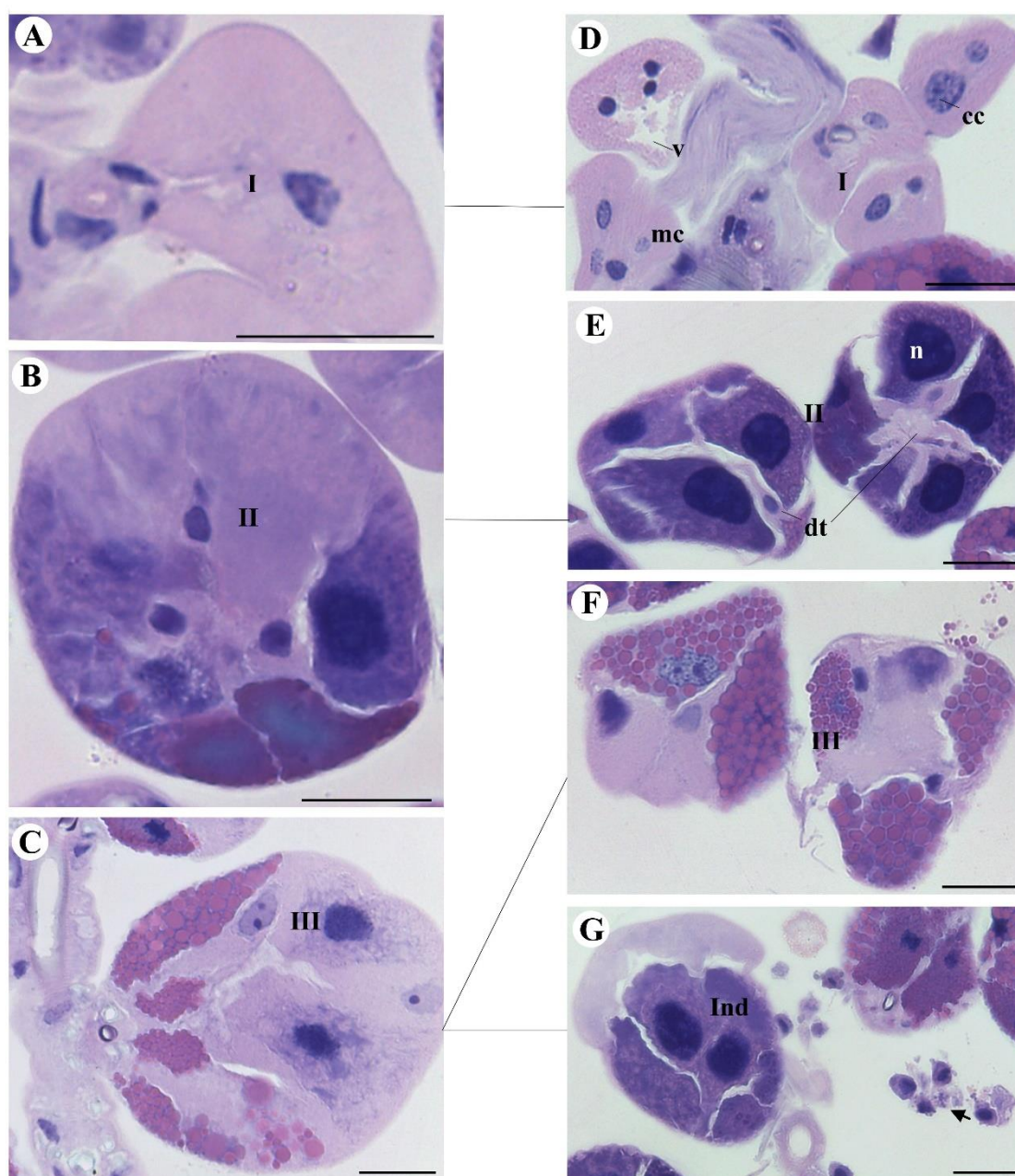


Figura 6 - (A-C) Secções histológicas das glândulas salivares de fêmeas alimentadas por 4 dias em hospedeiros controle onde observa-se ácinos I (**I**) com fraca marcação para a fosfatase ácida (**A**) e ácinos II (**II**) e III (**III**) com moderada marcação para a fosfatase ácida principalmente na região do lúmen acinar (**B-C**); (**D-H**) Secções histológicas das glândulas salivares de fêmeas alimentadas por 4 dias em hospedeiros imunizados com CRT-HI, onde observa-se ácinos I (**I**) com fraca marcação para a fosfatase ácida (**D**), ácinos II (**II**) e III (**III**) com morfologia irregular, apresentando intensa marcação para a fosfatase ácida, bem como com a presença de ácinos indeterminados (**Ind**), fragmentados (*) e ainda células com núcleo com marginalização da cromatina (seta) (**E-H**). Barras: 25 µm.

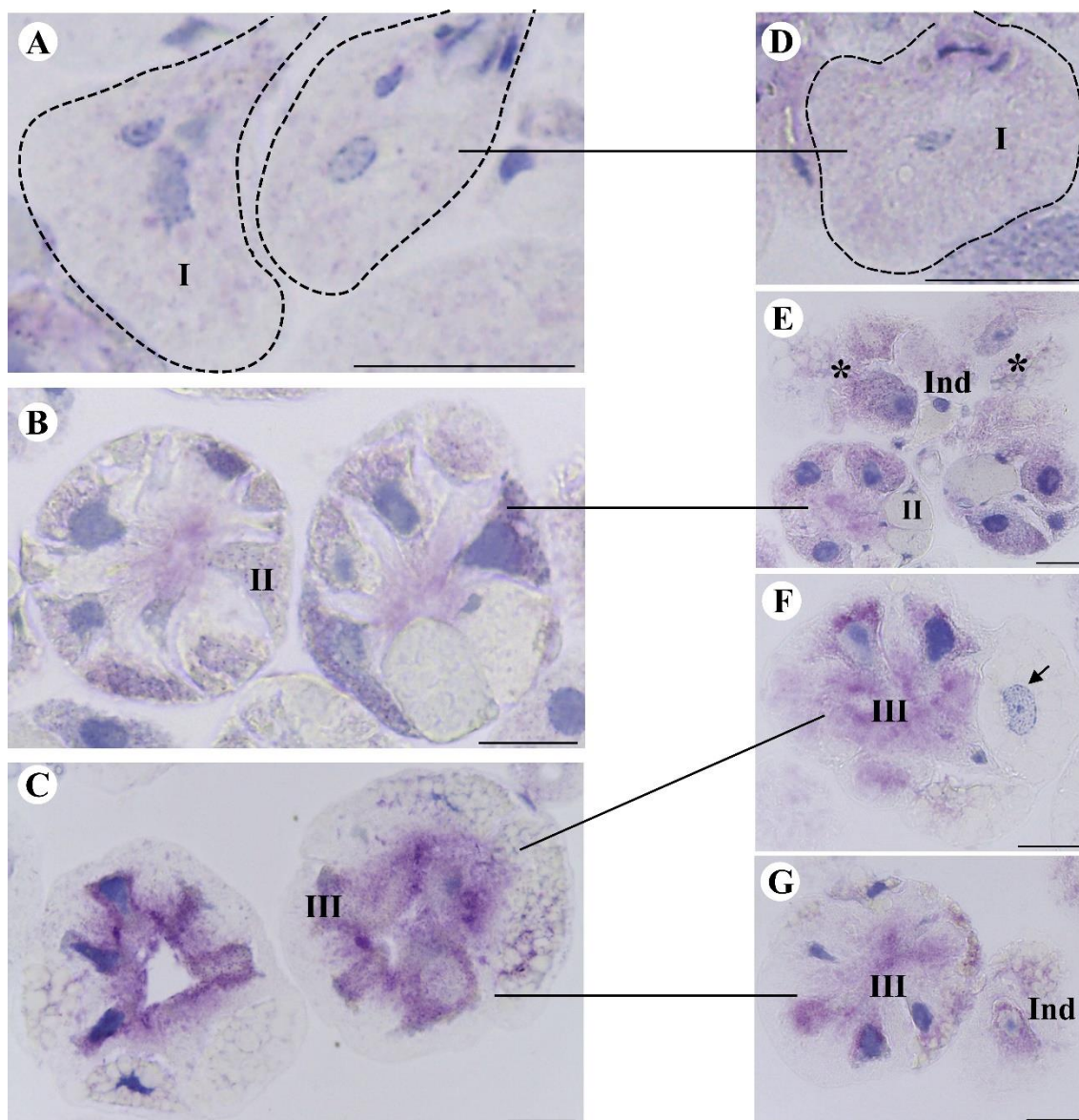
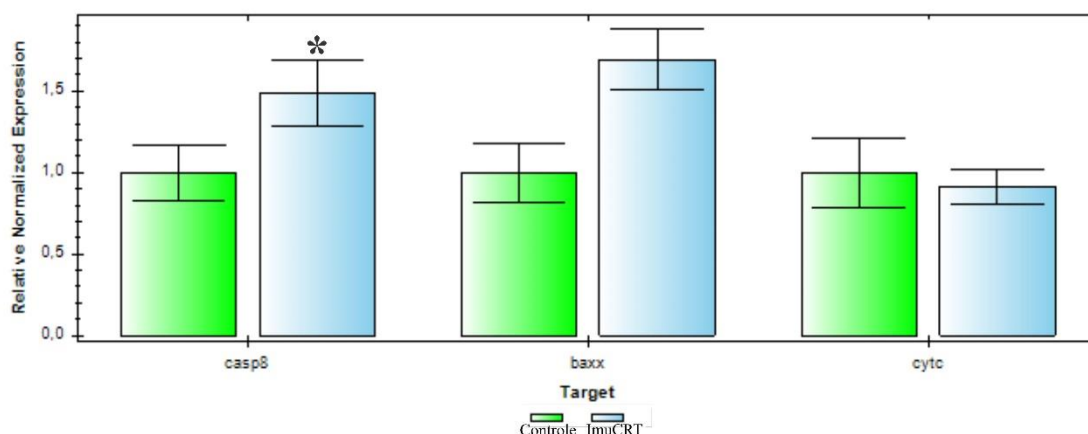


Figura 7 - Expressão dos genes envolvidos na morte celular nas glândulas salivares de fêmeas de *R. sanguineus* l. s. alimentadas por 4 dias em hospedeiros controle e imunizado com CRT-HI. Foram analisados os genes que codificam as proteínas da via intrínseca: BaX (baxx) e citocromo C (cytc) e da via extrínseca: caspase-8 (casp8). Os dados foram normalizados com a expressão dos genes que codificam a proteína ribossomal 16S rRNA, a β -tubulina e o fator de alongação 1 (ELF1). Observa-se a variação na expressão dos diferentes genes, entretanto apenas a caspase-8 teve aumento significativo (*) em sua expressão (up-regulation).



4 DISCUSSÃO

Tem-se atualmente buscado novas estratégias de controle de carrapatos em contrapartida ao uso dos acaricidas químicos, os quais vem provocando o surgimento de resistência, além de estarem causando danos ao meio ambiente e à saúde pública, visto liberarem resíduos químicos (FREITAS; POHL; VAZ, 2005). Dentro dessa nova perspectiva, segundo Parizi et al. (2012), o controle imunológico de carrapatos utilizando vacinas, é uma estratégia economicamente viável e benéfica ao meio ambiente, o que estimula a busca por potenciais antígenos, dentre eles desde extratos proteicos produzidos a partir de órgãos dos carrapatos, (FURQUIM et al., 2011; JITTAPALAPONG et al., 2008) até proteínas isoladas (ANTUNES et al., 2015; PARIZI et al., 2009, 2012; SABADIN et al., 2017). Ressalte-se aqui que são características importantes para a seleção desses antígenos a alta reatividade cruzada entre as espécies de carrapatos e a presença de regiões antigênicas conservadas (ANTUNES et al., 2015).

Entre as moléculas consideradas como potenciais antígenos, destaca-se a calreticulina, proteína de ligação ao cálcio secretada na saliva dos carrapatos (FERREIRA et al., 2002; JAWORSKI et al., 1995), com papel no processo de alimentação desse ectoparasita, bem como na imunomodulação e na atividade anti-hemostática do hospedeiro (BROSSARD; WIKEL, 2004; JAWORSKI et al., 1995; JITTAPALAPONG et al., 2008; RADULOVIĆ et al., 2014; STEEN; BARKER; ALEWOOD, 2006).

Diante desse cenário, no presente estudo foram analisados os epítomos conservados entre as calreticulinas das espécies *Rhipicephalus sanguineus* l. s. e *Haemaphysalis longicornis* *in silico*, bem como testada a imunogenicidade e reatividade cruzada entre a calreticulina dessas duas espécies. Os resultados aqui obtidos demonstraram regiões muito conservadas entre as CRTs, com predição da reatividade cruzada da análise *in silico*, resultado que corroborou aqueles obtidos via aplicação da técnica de Western Blot, isto é, que mostrou que o soro dos hospedeiros imunizados com a CRT de *H. longicornis* reconheceria a CRT nativa presente nos extratos das glândulas salivares de *R. sanguineus* l. s., além de comprovar que a CRT seria altamente conservada entre as espécies de carrapatos (ANTUNES et al., 2015; PARIZI et al., 2009). Em estudos anteriores desenvolvidos por Parizi et al. (2009) a reatividade cruzada da CRT em análises *in silico* e *in vitro* entre as espécies *H. longicornis* e *R. microplus* também foi registrada.

Quando analisou-se o potencial imunogênico dessa proteína através da titulação de anticorpos detectáveis no soro dos hospedeiros imunizados e comparou-se os resultados com

aqueles obtidos de hospedeiros não imunizados, observou-se sensibilização do sistema imune do hospedeiro confirmada pela produção de anticorpos contra a CRT-HI, diferentemente do observado por Antunes et al. (2015), que relataram que a calreticulina seria fracamente imunogênica. Resultados discordantes poderiam ser explicados devido ao emprego de diferentes metodologias, uso de adjuvantes e ainda pelas próprias características genéticas dos hospedeiros (ANTUNES et al., 2015). No entanto, com os resultados obtidos no presente estudo fica estabelecido que a CRT tem potencial para ser um candidato a vacina, visto sua capacidade de induzir imunidade no hospedeiro e de sua comprovada reatividade cruzada entre as espécies.

A reatividade cruzada também pôde ser comprovada através de efeitos deletérios em *R. sanguineus* l. s. alimentados em hospedeiros imunizados com a CRT-HI, o que foi observado pela análise morfofisiológica e pelos genes envolvidos no processo de morte celular nas glândulas salivares de fêmeas alimentadas por 4 dias nesses hospedeiros. Nos resultados de detecção da CRT, pôde-se comprovar que os anticorpos produzidos contra a CRT-HI reconheceram a CRT nas glândulas salivares (grupo controle), bem como interferiram na atividade dessa proteína nas fêmeas alimentadas em hospedeiros imunizados, diminuindo-a, o que consequentemente estaria interferindo nas suas funções de facilitadora do processo de alimentação e na imunomodulação no local de fixação no hospedeiro (BROSSARD; WIKEL, 2004; JAWORSKI et al., 1995; JITTAPALAPONG et al., 2008; RADULOVIĆ et al., 2014; STEEN; BARKER; ALEWOOD, 2006). Além disso, a diminuição da CRT nas células das glândulas salivares estaria interferindo na homeostase do cálcio, íon este importante em uma variedade de funções intracelulares, tais como a do metabolismo citoplasmático e mitocondrial, síntese proteica, progressão do ciclo celular, apoptose, entre outras (MICHALAK et al., 1999).

A interferência da imunização no processo de alimentação foi aqui corroborada pelas análises histológicas, representada pelas alterações celulares e teciduais nas glândulas salivares. Entre elas observou-se a perda da forma arredondada dos ácinos, que se tornaram irregulares, presença de ácinos fragmentados e indeterminados, bem como células com alterações nucleares (com condensação e marginalização da cromatina), características que identificam o processo de degeneração precoce e que corrobora Furquim et al. (2011) e Jittapalapong et al. (2008), que também observaram alterações nas glândulas salivares de fêmeas de *R. sanguineus* l. s. e de *R. microplus*, respectivamente, alimentadas em hospedeiros imunizados com extratos das glândulas salivares.

Além disso, os resultados da aplicação da técnica para a detecção da fosfatase ácida, mostrou a ocorrência de alterações nas glândulas salivares, confirmada pelo aumento na intensidade da marcação dessa enzima em fêmeas alimentadas em hospedeiros imunizados.

Segundo Furquim, Bechara e Camargo-Mathias (2008), a fosfatase ácida participaria no processo de apoptose atípica das glândulas salivares, removendo restos citoplasmáticos e contribuindo na fragmentação celular, processo esse que normalmente ocorreria apenas no final do processo de ingurgitamento.

As alterações morfológicas que são características da morte celular, bem como o aumento da fosfatase ácida e a diminuição da CRT, sinalizam que as células das glândulas salivares das fêmeas alimentadas em hospedeiro imunizado com a CRT-HI, estariam entrando precocemente em morte, corroborando dados obtidos da análise da expressão da caspase-8, que mostraram um aumento (up-regulation), gene envolvido com a via extrínseca na morte celular apoptótica. Aumento na expressão da caspase-8 também foi observado por Yu et al. (2015) em células das glândulas salivares de fêmeas de *Rhipicephalus haemaphysaloides* completamente ingurgitadas, período esse em que as glândulas salivares estão em processo natural de degeneração.

Segundo estudos recentes, a caspase-8 possui diversas funções relacionadas a via extrínseca da apoptose, como na regulação da inflamação e no papel anti-inflamatório (KAISER et al., 2011; YU et al., 2015). Acredita-se que os carrapatos possuam um sistema imunológico inato, que desempenharia papéis importantes no seu ciclo de vida, o que levou Yu et al. (2015) a postularem que o aumento da caspase no pós-ingurgitamento das fêmeas poderia ser consequência do processo de alimentação, no qual os carrapatos estariam repletos de sangue do hospedeiro e contendo citocinas e que a caspase-8 desencadearia a imunidade inata juntamente com a caspase-1 com a função de defender os sistemas dos carrapatos contra efeitos nocivos dos anticorpos presentes no sangue do hospedeiro.

Assim, nas fêmeas aqui analisadas, além da função de iniciadora na morte celular apoptótica pela via extrínseca, o aumento da caspase-8 poderia resultar da tentativa do sistema imune do carrapato de driblar os anticorpos presentes no sangue dos hospedeiros. Entretanto, por ser um sistema imune adaptativo, as células das glândulas salivares entrariam precocemente em processo de morte.

Portanto, os resultados aqui obtidos comprovam o potencial imunogênico da CRT, bem como o seu potencial de reatividade cruzada entre diferentes espécies. Além disso demonstra que a imunização dos hospedeiros com essa proteína tem potencial para interferir na morfofisiologia das glândulas salivares levando-as a um processo degenerativo precoce, e consequentemente interferindo na alimentação dos carrapatos, por meio da redução da sua capacidade de síntese e secreção de elementos da saliva, e indiretamente diminuindo a ingestão de sangue e a oviposição das fêmeas. Esses resultados vêm fortemente sugerir que a

calreticulina seria um potencial antígeno candidato no desenvolvimento de vacinas para o controle de carrapatos.

AGRADECIMENTOS

Autores agradecem à FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo nº 2014/02843-8), e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (Processo nº 300625/2012-0 e M.I. Camargo Mathias Bolsas de pesquisas acadêmicas) pelo suporte financeiro e Sr. Gérson de Mello Sousa e Dra. Priscila Cintra Socolowski pelo suporte técnico.

REFERÊNCIAS

ANHOLETO, L. A. et al. Potential action of extract of *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen to control *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) ticks. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 8, n. 1, p. 65–72, 2017.

ANTUNES, S. et al. Artificial feeding of *Rhipicephalus microplus* female ticks with anti calreticulin serum do not influence tick and *Babesia bigemina* acquisition. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 6, n. 1, p. 47–55, 2015.

BARBOSA SILVA, A. et al. *Rickettsia rickettsii* infecting *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Latreille 1806), in high altitude atlantic forest fragments, Ceara State, Brazil. **Acta Tropica**, Basel, v. 173, p. 30–33, 2017.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.

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

BUSTIN, S. A. et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**, Baltimore, v. 55, n. 4, p. 611–622, 2009.

CAMARGO-MATHIAS, M. I. **Inside ticks: Morphophysiology, toxicology and therapeutic perspectives**. 1. ed. São Paulo: Editora Unesp, 2018.

DE OLIVEIRA, S. V. et al. An update on the epidemiological situation of spotted fever in Brazil. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, Botucatu, v. 22, n. 1, p. 22, 2016.

ESTRADA-PEÑA, A. et al. Association of environmental traits with the geographic ranges of ticks (Acari: Ixodidae) of medical and veterinary importance in the western Palearctic. A

digital data set. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 59, n. 3, p. 351–366, 2013.

FERREIRA, C. A. S. et al. Cloning and partial characterization of a *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) calreticulin. **Experimental Parasitology**, San Diego, v. 101, p. 25–34, 2002.

FERROLHO, J. et al. Ferritin 1 silencing effect in *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae) during experimental infection with *Ehrlichia canis*. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 8, n. 1, p. 174–184, 2017.

FREITAS, D. R. DE; POHL, P. C.; VAZ, I. S. Caracterização da resistência para acaricidas no carrapato *Boophilus microplus**. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 33, n. 2, p. 109–117, 2005.

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**, Berlin, v. 109, n. 1, p. 147–162, 2011.

FURQUIM, K. C. S.; BECHARA, G. H.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Death by apoptosis in salivary glands of females of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). **Experimental Parasitology**, San Diego, v. 119, n. 1, p. 152–163, 2008.

JAWORSKI, D. C. et al. A secreted calreticulin protein in ixodid tick (*Amblyomma americanum*) saliva. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 41, n. 4, p. 369–375, 1995.

JITTAPALAPONG, S. et al. Immunization with tick salivary gland extracts. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 1149, p. 200–4, 2008.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

KAISER, W. J. et al. RIP3 mediates the embryonic lethality of caspase-8-deficient mice. **Nature**, London, v. 471, n. 7338, p. 368–372, 2011.

KAUFMAN, W. R. Tick-host interaction: a synthesis of current concepts. **Parasitology today**, Amsterdam, v. 5, n. 2, p. 47–56, 1989.

LABRUNA, M. B. Ecology of Rickettsia in South America. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 1166, n. 1, p. 156–166, 2009.

MATOS, R. DA S. et al. Histopathological study of ovaries of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) exposed to different thymol concentrations. **Parasitology Research**, Berlin, v. 113, n. 12, p. 4555–4565, 2014.

MICHALAK, M. et al. Calreticulin : one protein, one gene, many functions. **The Biochemical Journal**, London, v. 344, p. 281–292, 1999.

MOERBECK, L. et al. *Rickettsia* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) Vector Biodiversity in High

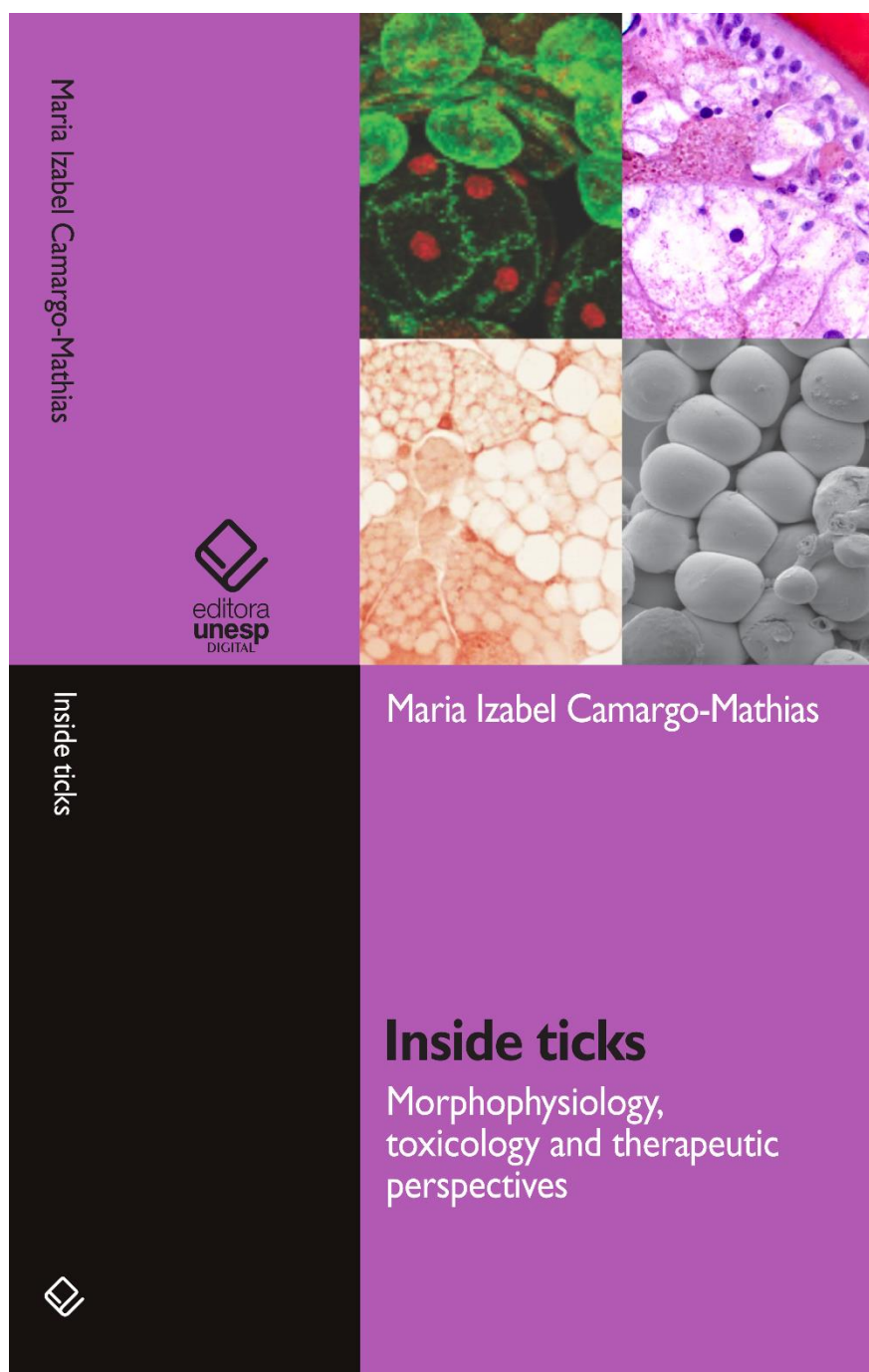
- Altitude Atlantic Forest Fragments Within a Semiarid Climate: A New Endemic Area of Spotted-Fever in Brazil. **Journal of Medical Entomology**, Laham, v. 53, n. 6, p. 1458–1466, 2016.
- MORAES-FILHO, J. et al. Genetic analysis of ticks belonging to the *Rhipicephalus sanguineus* group in Latin America. **Acta Tropica**, Basel, v. 117, n. 1, p. 51–55, 2011.
- PADDOCK, C. D. et al. Unique Strain of *Rickettsia parkeri* Associated with the Hard Tick *Dermacentor parumapertus* Neumann in the Western United States. **Applied and environmental microbiology**, Washington, v. 83, n. 9, p. e03463-16, 2017.
- PARIZI, L. F. et al. Comparative immunogenicity of *Haemaphysalis longicornis* and *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* calreticulins. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 164, n. 2–4, p. 282–290, 2009.
- PARIZI, L. F. et al. The quest for a universal vaccine against ticks: Cross-immunity insights. **The Veterinary Journal**, London, v. 194, n. 2, p. 158–165, 2012.
- RADULOVIĆ, Ž. M. et al. A 24–48 h fed *Amblyomma americanum* tick saliva immuno-proteome. **BMC Genomics**, v. 15, p. 518–548, 2014.
- ROMA, G. C. et al. Morphological and cytochemical changes in synganglion of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) female ticks from exposure of andiroba oil (*Carapa guianensis*). **Microscopy Research and Technique**, New York, v. 76, n. 7, p. 687–696, 2013.
- SABADIN, G. A. et al. Effect of recombinant glutathione S-transferase as vaccine antigen against *Rhipicephalus appendiculatus* and *Rhipicephalus sanguineus* infestation. **Vaccine**, Kidlington, v. 35, n. 48, p. 6649–6656, 2017.
- STEEN, N. A.; BARKER, S. C.; ALEWOOD, P. F. Proteins in the saliva of the Ixodida (ticks): Pharmacological features and biological significance. **Toxicon**, Elmsford, v. 47, n. 1, p. 1–20, 2006.
- VENDRAMINI, M. C. R. et al. Cytotoxic effects of andiroba oil (*Carapa guianensis*) in reproductive system of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) semi-engorged females. **Parasitology Research**, Berlin, v. 111, n. 5, p. 1885–1894, 2012a.
- VENDRAMINI, M. C. R. et al. Action of andiroba oil (*Carapa guianensis*) on *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) semi-engorged females: Morphophysiological evaluation of reproductive system. **Microscopy Research and Technique**, New York, v. 75, n. 12, p. 1745–1754, 2012b.
- WALKER, J. B.; KEIRANS, J. E.; HORAK, I. G. **The Genus Rhipicephalus (Acari, Ixodidae): a Guide to the Brown Ticks of the World**. Cambridge: Cambridge University Press, 2000.
- YU, X. et al. Differential sialotranscriptomes of unfed and fed *Rhipicephalus haemaphysaloides*, with particular regard to differentially expressed genes of cysteine proteases. **Parasites & vectors**, v. 8, p. 597–609, 2015.

ZIVKOVIC, Z. et al. Subolesin expression in response to pathogen infection in ticks. **BMC Immunology**, v. 11, n. 7, p. 1–12, 2010.

Capítulo 5

CAPÍTULO 5

Capítulo de livro intitulado “**Tick feeding process (digestory system)**” publicado no livro “**Inside ticks: Morphophysiology, toxicology and therapeutic perspectives**” organizado pela Dra. Maria Izabel Camargo-Mathias e publicado pela Editora Unesp, 2018 e de autoria de: Elen Fernanda Nodari, Melissa Carolina Pereira e Maria Izabel Camargo-Mathias.



5

Tick feeding process (digestory system)

*Elen Fernanda Nodari, Melissa Carolina
Pereira, Maria Izabel Camargo-Mathias*

Ticks, obligatory hematophagous ectoparasites, are arthropods that have the digestory system involved in the digestion of a single type of food, the blood, having the hemoglobin as main source of nutrients (Caperucci; Costa; Camargo-Mathias, 2013; Sonenshine; Roe, 2014). The midgut, the main organ of the digestory system of the ticks, is of the utmost importance for their success, in addition to being the site for the development of several endoparasites and representing the major physical barrier between the tick and the immunological response of the host (Higuchi, 1987; Kocan et al., 1987).

The digestory system of the ticks is divided into three regions: a) foregut (stomodeum), constituted of the pre-oral cavity, mouth, pharynx and esophagus, with the function of transporting the food to the midgut (Caperucci; Costa; Camargo-Mathias, 2013; Sonenshine; Roe, 2014); b) midgut (mesenteron), the largest organ of the body and responsible for the entire digestive

process and nutrient absorption (Sonenshine; Roe, 2014), comprised of a central ventriculus (stomach), numerous diverticula (ceca) branching towards all the regions of the body, and a small posterior tube that conducts waste residues to the posterior region; and c) hindgut (proctodeum), divided into anal atrium and anus, with the function of eliminating the residues from the body.

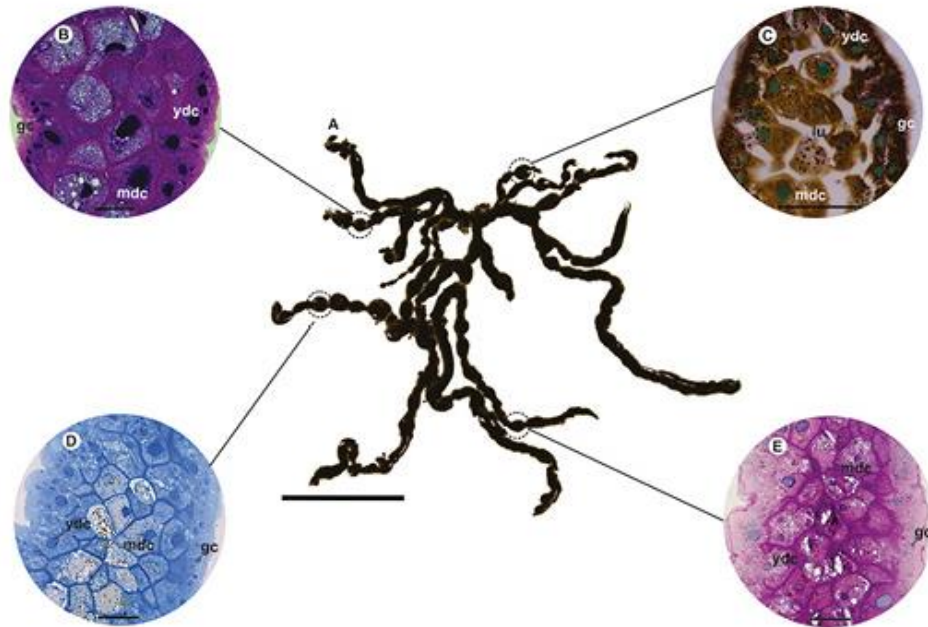
The digestion in ticks is a controversial theme. Some authors point that it would be strictly intracellular (Anderson; Sonenshine; Valenzuela, 2008; Lara; Bechara; Oliveira, 2005; Sonenshine; Roe, 2014), while others report that it would start in the midgut lumen, through a holocrine secretion, which is synthesized by the digestive/secretory cells and would perform the lysis of the red blood cells. Additionally, the digestion of the blood proteins and other molecules would occur in the interior of the epithelial cells, being therefore considered extra- and intracellular digestion (Agyei; Herbert; Runham, 1991; Agyei; Runham; Blackstock, 1992; Nodari et al., 2016).

During the digestive process, the different midgut cells undergo alterations according to how long the feeding period lasts and the stages of the ectoparasite biologic cycle, i.e., larva, nymph and adult (Agbede; Kemp, 1985; Agyei; Runham, 1995; Caperucci; Costa; Camargo-Mathias, 2013; Caperucci; Camargo-Mathias; Bechara, 2009; Coons; Alberti, 1999; Coons; Rosell-Davis; Tarnowski, 1986; Remedio et al., 2013; Sonenshine; Roe, 2014; Walker; Fletcher, 1987).

In general, the midgut is internally covered by a simple or pseudostratified epithelium supported by a basal membrane, underlain by an outer layer of muscle fibers (Sonenshine; Roe, 2014). The epithelial cells are classified into three types: a) generative; b) digestive and c) secretory (Figure 22) (Agbede; Kemp, 1985; Agyei; Runham, 1995; Balashov, 1972a; Caperucci; Camargo-Mathias; Bechara, 2009; Sonenshine; Roe, 2014; Walker; Fletcher, 1987).

Figure 22 – Photomicrography (A) and histological sections (B-E) of the midgut of *R. sanguineus* s. l. females fed for 4 days stained with different techniques to observe the young digestive (ydc),

the mature digestive (mdc) and the generative cells (gc) in the lumen (lu). (A) Photomicrography of the midgut. (B) Hematoxylin-eosin technique. (C) Acid phosphatase detection. (D) Bromophenol blue staining. (E) PAS detection



Bars: (A) 2mm; (B, D-E) 50 μ m; (C) 100 μ m

In addition to these types, basophilic cells have been reported in the literature (Agbede; Kemp, 1985), as well as endocrine and vitellogenic cells (Coons; Alberti, 1999). Agyei et al. (1991, 1992) suggested that the secretory cells described by other authors would actually be digestive cells.

The generative cells – undifferentiated cells – are spindle-shaped and present small areas with microvillousities towards the lumen, forming a simple cuboidal epithelium, or pseudostratified (Figure 22 B-E) (Agbede; Kemp, 1985; Caperucci; Bechara; Camargo-Mathias, 2010; Walker; Fletcher, 1987). These cells originate the digestive and secretory ones (Agbede; Kemp, 1985; Walker; Fletcher, 1987) and, according to the literature, are not involved in the digestive process itself; however, they accumulate lipids (reserves) in the cytoplasm. The generative cells are found in the initial phase of each instar, as well as in the stage known as ‘slow feeding’, and are less frequent in the post-engorgement stages (Agbede; Kemp, 1985; Walker; Fletcher, 1987).

The digestive cells are regarded the main cells of the midgut epithelium (Figure 22 B-E), once they play a key role in the synthesis and secretion of digestive enzymes and are responsible for the absorption of water and other substances digested by the tick (Coons; Alberti, 1999). This type of cell, according to some authors, can undergo morphological and physiological modifications as the digestive process develops, characterizing the occurrence of specific physiological and morphological moments (Agyei; Runham, 1995).

The secretory cells are the most polemic, once they occur less frequently and have been reported for some species, in addition to presenting a morphology little distinct from the digestive ones, suggesting that digestive and secretory cells would actually be the same type. However, these cells similarities are observed in different physiological states, implying that digestive cells undergo different stages, with morphological and physiological alterations, and can be regarded multifunctional cells (Agyei; Runham; Blackstock, 1992; Nodari et al., 2016).

Ultrastructurally, the midgut epithelial cells present a relative structural complexity, having different organelles and several cytoplasmic inclusions, confirming the hypothesis that they are multifunctional (Caperucci; Bechara; Camargo-Mathias, 2010; Caperucci; Costa; Camargo-Mathias, 2013; Nodari et al., 2016).

In summary, in addition to the digestive function, the tick midgut cells can act as nutrient reservoir, which is demonstrated by the presence of intracellular inclusions. Moreover, these cells can store proteins, carbohydrates and lipids (Balashov, 1972a; Caperucci; Costa; Camargo-Mathias, 2013), indispensable reserves for the production of eggs, which require nutrients to develop vitellogenesis and, consequently, ensure the preservation of the offspring.

Discussão Geral

5 DISCUSSÃO GERAL

No presente estudo foram avaliadas as alterações que ocorrem nas glândulas salivares e no intestino de fêmeas de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* l. s. frente a resposta imunológica de hospedeiros imunizados com extratos de glândulas salivares (EGS2 e EGS4) da mesma espécie e, com a calreticulina. A imunização com os extratos das glândulas salivares demonstraram que as proteínas neles presentes foram imunogênicas e induziram a resposta imunológica do hospedeiro, sendo o EGS4 mais eficiente, corroborando os achados de Hebling et al. (2013), que relataram que a resposta inflamatória teria menor intensidade nos hospedeiros imunizados com EGS2 e maior intensidade naqueles imunizados com o EGS4. Além disso, já é conhecido que glândulas salivares de fêmeas de *R. sanguineus* l. s. alimentadas por 4 dias estariam mais ativas do que aquelas alimentadas por 2 dias (HEBLING et al., 2013) e ainda, que nas primeiras haveria disponibilidade maior de moléculas imunogênicas.

A proteína CRT é considerada facilitadora do processo de alimentação nos carrapatos em geral (STEEN; BARKER; ALEWOOD, 2006). Os dados aqui obtidos mostraram que tanto as glândulas quanto os intestinos das fêmeas alimentadas por 2 e 4 dias em hospedeiro não imunizado apresentaram marcação positiva para a CRT, corroborando outros autores (ANTUNES et al., 2015; FERREIRA et al., 2002). Aqui foi observado também que a CRT nas glândulas salivares não foi alterada quando se fez a comparação entre o grupo controle e os imunizados com EGS, sugerindo que, embora presente, a mesma ainda não seria eficiente para sensibilizar o sistema imune do hospedeiro a ponto deste produzir anticorpos em quantidade que fosse suficiente para ocorrer a sensibilização e afetar as glândulas salivares. Esses dados corroboraram os de Antunes et al. (2015). Já no intestino dos indivíduos alimentados por 2 dias em hospedeiros imunizados com EGS2, houve alteração da CRT em todos os tipos celulares, enquanto nas fêmeas alimentadas em hospedeiro imunizado com EGS4 não houve alteração significativa. Nas fêmeas alimentadas por 4 dias (período de transição da alimentação entre a fase lenta e a rápida), essa proteína, embora presente, esteve menos ativa, dado que corroborou Agyei e Runham (1995) que relataram a inibição da atividade celular no final do processo preparatório para a digestão (lenta), e aumento da presença de células digestivas no início da segunda fase de alimentação (rápida), quando conteria maior teor de enzimas lisossomais para o processo de digestão do sangue, e menor quantidade de proteínas com funções imunomodulatórias (AGYEI; HERBERT; RUNHAM, 1991; NODARI et al., 2016). Nos indivíduos alimentados por 4 dias nos hospedeiros imunizados com EGS4 não foram

observadas alterações na marcação para CRT, enquanto que nos imunizados com EGS2 detectou-se um leve aumento na marcação. Essa variação na marcação nos diferentes períodos de alimentação, sugeriu que essa proteína atuaria diferentemente durante o ciclo de alimentação do ectoparasita, sugerindo que a mesma participaria da imunomodulação e/ou da anti-hemostase do hospedeiro no início, meio e fim do processo de alimentação (JAWORSKI et al., 1995).

O presente estudo mostrou também que a marcação para a fosfatase ácida nas glândulas das fêmeas alimentadas em hospedeiros não imunizados foi positiva, corroborando outros autores que estudaram essa enzima em glândulas salivares também de fêmeas de *R. sanguineus* l. s. (FURQUIM; BECHARA; CAMARGO-MATHIAS, 2008). Nas alimentadas em hospedeiros imunizados com os extratos, detectaram sinais de degeneração da glândula, representados pela perda da forma original dos ácinos, a presença de ácinos indeterminados, assim como o aumento na intensidade da marcação para a fosfatase ácida, características estas que estariam sugerindo a instalação precoce do processo de morte celular apoptótica atípica, no qual, segundo a literatura, haveria a participação da fosfatase ácida que atuaria na remoção de restos citoplasmáticos deixados pela degeneração. Isso indicaria que o EGS2 e o EGS4 induziriam o desenvolvimento de resistência no hospedeiro, confirmado aqui também pela análise do soro dos hospedeiros e corroborando Furquim et al. (2011, 2014a, 2014b) e Jittapalapong et al. (2008) que relataram que a imunização de hospedeiros com extrato da glândula salivar afetaria diretamente esse órgão quando os indivíduos tivessem sido alimentados nos mesmos, diminuindo, portanto, a eficiência do seu processo de alimentação.

A análise dos genes, especificamente daqueles presentes nas glândulas de fêmeas alimentadas por 4 dias em hospedeiro imunizado com EGS4, indicou que houve aumento (significativo) na expressão do BaX e do citocromo C, ambos relacionados a via intrínseca da morte celular apoptótica. Esses achados permitiram sugerir que o processo de morte celular nas glândulas ocorreria por essa via (MAES; SCHLAMP; NICKELLS, 2017) e, ainda, confirmaria os resultados aqui obtidos quando da observação de características de degeneração precoce e presença de morte apoptótica da glândula salivar dessas fêmeas.

Foi aqui também detectada a diminuição da atividade da fosfatase ácida nas células intestinais de fêmeas de *R. sanguineus* l. s. alimentadas em hospedeiros imunizados com EGS. Provavelmente isso seria decorrente da resposta imune do hospedeiro e corroboraram Caperucci et al. (2010) e Veronez et al. (2010) que observaram alterações morfológicas nas células intestinais de fêmeas alimentadas em hospedeiros imunizados e/ou após sucessivas infestações,

bem como observaram a diminuição do metabolismo dessas células. Os dados aqui encontrados mostraram células digestivas com intensa vacuolização citoplasmática nos indivíduos alimentados por 4 dias, sugerindo uma inibição parcial ou paralisação total da ingestão de sangue (VERONEZ et al., 2010). Essas alterações poderiam ser o resultado do compartilhamento dos mesmos antígenos entre as glândulas salivares e o intestino, visto as partes bucais dos carrapatos ixodídeos serem adaptadas para durante a alimentação, impedir o regurgitamento do conteúdo intestinal, o que impediria o contato dos antígenos intestinais com o hospedeiro (SHAPIRO; VOIGT; FUJISAKI, 1986; WALKER; FLETCHER, 1987).

Dentre os antígenos presentes nas glândulas salivares e no intestino, a calreticulina destaca-se por ter importante função no processo de alimentação dos ectoparasitas (STEEN; BARKER; ALEWOOD, 2006). Assim, no presente estudo a avaliação do potencial imunogênico da calreticulina do carrapato *Haemaphysalis longicornis* (CRT-HI) contra *R. sanguineus* l. s. permitiu sugerir que as CRTs das duas espécies possuiriam regiões conservadas e imunogênicas quando comparadas entre si, comprovando a reatividade sorológica cruzada entre essas espécies, importante característica de antígenos candidatos a vacina (ANTUNES et al., 2015; PARIZI et al., 2012; SABADIN et al., 2017). Foram também observadas no presente estudo alterações morfofisiológicas nas glândulas salivares das fêmeas alimentadas por 4 dias nesses hospedeiros. Entre elas, a perda da forma arredondada dos ácinos, que se tornaram irregulares, presença de ácinos fragmentados e indeterminados, células com alterações nucleares (com condensação e marginalização da cromatina), bem como reagindo fracamente à CRT e fortemente à fosfatase ácida, sinalizando o início do processo de degeneração, precocemente nesse caso, uma vez que em condições naturais o mesmo ocorreria após 3 dias do final do período de ingurgitamento (FURQUIM; BECHARA; CAMARGO-MATHIAS, 2008). Esses dados foram também confirmados pelo aumento da expressão do gene da caspase-8, envolvido com a via extrínseca da morte celular apoptótica. Tais alterações, tanto morfofisiológicas quanto moleculares, corroboraram os resultados de Furquim et al. (2011), que também observaram alterações nas glândulas salivares de fêmeas de *R. sanguineus* l. s. alimentadas em hospedeiros imunizados, as quais estavam em processo de degeneração precoce.

De forma geral o presente estudo mostrou que as alterações na morfofisiologia das glândulas salivares e do intestino de fêmeas de carrapatos *R. sanguineus* l. s. alimentadas em diferentes períodos levam as glândulas salivares a entrarem precocemente em degeneração e levam o intestino a reduzir o seu metabolismo celular, o que interferiria negativamente na

alimentação e na digestão do ectoparasita. Assim, os resultados aqui obtidos permitiram sugerir que as proteínas presentes nas glândulas salivares, incluindo a CRT, poderiam ser considerados antígenos candidatos ao desenvolvimento de vacinas para o controle de carrapatos.

Conclusões

6 CONCLUSÕES

- 1) Extratos de glândulas salivares de fêmeas alimentadas por 2 e 4 dias são imunogênicos para coelhos hospedeiros e carregam proteínas que se apresentam como potenciais antígenos que poderiam ser utilizados no desenvolvimento de vacinas;
- 2) O EGS4 foi mais imunogênico do que o EGS2, visto as glândulas das fêmeas alimentadas por 4 dias estarem mais ativas e possuírem maior número de moléculas imunogênicas;
- 3) A marcação da CRT nas glândulas salivares das fêmeas alimentadas em hospedeiros imunizados com EGS não mostrou-se alterada nos diferentes grupos, sugerindo que esta não seria eficiente para sensibilizar o sistema imune do hospedeiro;
- 4) O EGS2 e o EGS4 interferiram na síntese e secreção da fosfatase ácida das glândulas salivares das fêmeas alimentadas em hospedeiros imunizados com esses extratos;
- 5) A degeneração precoce das glândulas salivares das fêmeas alimentadas por 4 dias em hospedeiros imunizados com EGS4 foi confirmada pelo aumento na expressão dos genes BaX e citocromo C, relacionados à via intrínseca da morte celular apoptótica;
- 6) A diminuição da marcação da fosfatase ácida e da CRT nas células do intestino das fêmeas alimentadas em hospedeiros imunizados se deu devido à presença dos antígenos no EGS;
- 7) A proteína CRT expressa em sistema heterólogo, por ter sido capaz de sensibilizar o sistema imune do hospedeiro quando aplicada isoladamente, pode ser considerada candidata para produção de vacina;
- 8) Anticorpos produzidos contra a CRT-HI reconheceram a CRT nas glândulas salivares (grupo controle), bem como interferiram na atividade dessa proteína nas fêmeas alimentadas em hospedeiros imunizados, os quais interferiram na alimentação e na imunomodulação do hospedeiro;
- 9) A imunização com a CRT-HI induziu a degeneração precoce das glândulas salivares de *R. sanguineus* l. s. pela via extrínseca da morte celular apoptótica.

Referências

Introdução

Material e Métodos

Discussão Geral

REFERÊNCIAS

- AGBEDE, R. I. S.; KEMP, D. H. Digestion in the cattle-tick *Boophilus microplus*: Light microscope study of the gut cells in nymphs and females. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 15, n. 2, p. 147–157, 1985.
- AGYEI, A. D.; HERBERT, I. V.; RUNHAM, N. W. Histochemical localisation of acid phosphatase and non-specific esterase in the midguts of two species of tick, *Boophilus microplus* and *Rhipicephalus appendiculatus*, as determined by light microscopy. **Parasitology Research**, Berlin, v. 77, p. 629–634, 1991.
- AGYEI, A. D.; RUNHAM, N. W. Studies on the morphological changes in the midguts of two ixodid tick species *Boophilus microplus* and *Rhipicephalus appendiculatus* during digestion of the blood meal. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 25, n. 1, p. 55–62, 1995.
- ANAZETTI, M. C.; MELO, P. S. Morte Celular por Apoptose : uma visão bioquímica e molecular. **Metrocamp Pesquisa**, Campinas, v. 1, n. 1, p. 37–58, 2007.
- ANHOLETO, L. A. et al. Potential action of extract of *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen to control *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) ticks. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 8, n. 1, p. 65–72, 2017.
- ANTUNES, S. et al. Artificial feeding of *Rhipicephalus microplus* female ticks with anti calreticulin serum do not influence tick and *Babesia bigemina* acquisition. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 6, n. 1, p. 47–55, 2015.
- BALASHOV, Y. 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.
- BARBOSA SILVA, A. et al. *Rickettsia rickettsii* infecting *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Latreille 1806), in high altitude atlantic forest fragments, Ceara State, Brazil. **Acta Tropica**, Basel, v. 173, p. 30–33, 2017.
- BECHARA, G. H. et al. *Rhipicephalus sanguineus* tick in Brazil: feeding and reproductive aspects under laboratorial conditions. **Brazilian Journal Veterinary Parasitology**, São Paulo, v. 4, n. 2, p. 61–66, 1995.
- BINNINGTON, K. C. Sequential changes in salivary gland structure and feeding of the cattle tick, *Boophilus microplus*. **International Journal of Parasitology**, Oxford, v. 8, p. 97–115, 1978.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.
- BROSSARD, M.; WIKEL, S. K. Tick immunobiology. **Parasitology**, Cambridge, v. 129 Suppl, n. 2004, p. S161–S176, 2004.
- BURLINI, L. et al. Molecular dissimilarities of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in Brazil and its relation with samples throughout the world: is there a geographical pattern? **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 50, n. 4, p. 361–374, 2010.
- BUSTIN, S. A. et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**, Baltimore, v. 55, n. 4, p. 611–622, 2009.

- CAMARGO-MATHIAS, M. I. **Inside ticks: Morphophysiology, toxicology and therapeutic perspectives**. 1. ed. São Paulo, Editora Unesp, 2018.
- CAMARGO-MATHIAS, 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**. 5. ed. New York: Nova Science Publishers, 2013. p. 167–192.
- CAMARGO-MATHIAS, M. I.; FURQUIM, K. C. S.; NUNES, P. H. Immunomodulatory effects of tick saliva. **Invertebrate Survival Journal**, v. 8, p. 231–240, 2011.
- CAPERUCCI, D.; BECHARA, G. H.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Ultrastructure features of the midgut of the female adult *Amblyomma cajennense* ticks Fabricius, 1787 (Acari: Ixodidae) in several feeding stages and subjected to three infestations. **Micron**, New York, v. 41, n. 7, p. 710–721, 2010.
- CAPERUCCI, D.; CAMARGO-MATHIAS, M. I.; BECHARA, G. H. Histopathology and Ultrastructure Features of the Midgut of Adult Females of the Tick *Amblyomma cajennense* Fabricius, 1787 (Acari: Ixodidae) in Various Feeding Stages and Submitted to Three Infestations. **Ultrastructural Pathology**, v. 33, n. 6, p. 249–259, 2009.
- CONTRERAS, M.; DE LA FUENTE, J. Control of *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus* tick infestations in rabbits vaccinated with the Q38 Subolesin/Akirin chimera. **Vaccine**, v. 34, n. 27, p. 3010–3013, 2016.
- COONS, L. B.; ALBERTI, G. The acari-ticks. In: HARRISON, F. W.; FOELIX, R. F. (Eds.). **Microscopic Anatomy of Invertebrates. Volume 8B:Chelicerata Arthropoda**. New York: Wiley-Liss, 1999. p. 267–514.
- COONS, L. B.; ROSELL-DAVIS, R.; TARNOWSKI, B. I. Blood meal digestion in ticks. In: SAUER, J. R.; HAIR, A. J. (Eds.). **Morphology, physiology and behavioral biology of ticks**. Chichester: Ellis Horwood Ltd, 1986. p. 248–279.
- COSTA, F. B. et al. *Rickettsia amblyommatis* infecting ticks and exposure of domestic dogs to *Rickettsia* spp. in an Amazon-Cerrado transition region of northeastern Brazil. **PLOS ONE**, v. 12, n. 6, p. 1–17, 2017.
- DANTAS-TORRES, F. et al. Morphological and genetic diversity of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato from the New and Old Worlds. **Parasites & vectors**, v. 6, p. 213, 2013.
- DANTAS-TORRES, F.; OTRANTO, D. Further thoughts on the taxonomy and vector role of *Rhipicephalus sanguineus* group ticks. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 208, n. 1–2, p. 9–13, 2015.
- DE OLIVEIRA, S. V. et al. An update on the epidemiological situation of spotted fever in Brazil. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, Botucatu, v. 22, n. 1, p. 22, 2016.
- ESTRADA-PENÑA, A. et al. Association of environmental traits with the geographic ranges of ticks (Acari: Ixodidae) of medical and veterinary importance in the western Palearctic. A digital data set. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 59, n. 3, p. 351–366, 2013.
- FERREIRA, C. A. S. et al. Cloning and partial characterization of a *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) calreticulin. **Experimental Parasitology**, San Diego, v. 101, p. 25–34, 2002.
- FERROLHO, J. et al. Ferritin 1 silencing effect in *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae) during experimental infection with *Ehrlichia canis*. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 8, n. 1, p. 174–184, 2017.

- FREITAS, D. R. DE; POHL, P. C.; VAZ, I. S. Caracterização da resistência para acaricidas no carrapato *Boophilus microplus**. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 33, n. 2, p. 109–117, 2005.
- 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**, Berlin, v. 109, n. 1, p. 147–162, 2011.
- FURQUIM, K. C. S. et al. 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. 02, n. 02, p. 114–225, 2013.
- FURQUIM, K. C. S. et al. Secretory Behavior of Salivary Glands of *Rhipicephalus sanguineus* Fed on Immunized Rabbit Hosts. **Journal Cytology & Histology**, v. 4, p. 1–12, 2014a.
- FURQUIM, K. C. S. et al. Morphological Plasticity of Ticks' Salivary Glands and the Meaning of Hematophagy in Hosts Immunized with Glandular Extract of Females Fed for 4 Days. **Animal and Veterinary Sciences**, v. 2, n. 6, p. 194–207, 2014b.
- FURQUIM, K. C. S.; BECHARA, G. H.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Death by apoptosis in salivary glands of females of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). **Experimental Parasitology**, San Diego, v. 119, n. 1, p. 152–163, 2008.
- FURQUIM, K. C. S.; BECHARA, G. H.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Morpho-histochemical characterization of salivary gland cells of males of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodid. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 50, n. 1, p. 59–70, 2010.
- GILL, H. S.; BOID, R.; ROSS, C. A. Isolation and characterization of salivary antigens from *Hyalomma anatolicum anatolicum*. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 8, n. 1, p. 11–25, 1986.
- GILL, H. S.; WALKER, A. R. The salivary glands of *Hyalomma anatolicum anatolicum*: Structural changes during attachment and feeding. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 17, n. 8, p. 1381–1392, 1987.
- GRANDJEAN, O. Blood digestion in *Ornithodoros moubata* Murray *sensu stricto* Walton (Ixodoidea: Argasidae) females. I. Biochemical changes in the midgut lumen and ultrastructure of the midgut cell, related to intracellular digestion. **Acarologia**, Paris, v. 25, p. 147–165, 1984.
- GRIVICICH, I.; REGNER, A.; DA ROCHA, A. B. Morte Celular por Apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Rio de Janeiro, v. 53, n. 3, p. 335–343, 2007.
- HARNNOI, T. et al. Molecular characterization and comparative study of 6 salivary gland metalloproteases from the hard tick, *Haemaphysalis longicornis*. **Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology**, Oxford, v. 147, n. 1, p. 93–101, 2007.
- HARRISON, W. F.; FOELIX, R. F. **Microscopic Anatomy of Invertebrates. Volume 8B: Chelicerata Arthropoda**. New York: Wiley-Liss, 1999.
- HEBLING, L. M. G. F. et al. Inoculation of salivary gland extracts obtained from female of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari, Ixodidae) with 2, 4, and 6 days of feeding in rabbit: I - Histopathology of the feeding lesion. **Parasitology Research**, Berlin, v. 112, n. 2, p. 577–584, 2013.
- HIGUCHI, S. Development of *Theileria sergenti* in the midgut of the tick, *Haemaphysalis*

- longicornis*. **Nihon juigaku zasshi. The Japanese journal of veterinary science**, Tokyo, v. 49, n. 2, p. 341–347, 1987.
- HUSSEIN, M. A.; BOWEN, I. D.; LEWIS, G. H. J. 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**, London, v. 14, n. 9, p. 775–781, 1990.
- JAWORSKI, D. C. et al. A secreted calreticulin protein in ixodid tick (*Amblyomma americanum*) saliva. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 41, n. 4, p. 369–375, 1995.
- JERNIGAN, A. D. et al. Efficacy of selamectin against experimentally induced tick (*Rhipicephalus sanguineus* and *Dermacentor variabilis*) infestations on dogs. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 91, p. 359–375, 2000.
- JITTAPALAPONG, S. et al. Humoral immune response of dogs immunized with salivary gland, midgut, or repeated infestations with *Rhipicephalus sanguineus*. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 916, p. 283–288, 2000.
- JITTAPALAPONG, S. et al. Immunization with tick salivary gland extracts. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 1149, p. 200–4, 2008.
- KAUEWHOM, P. et al. Molecular analysis of calreticulin expressed in salivary glands of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* indigenous to Thailand. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 1149, p. 53–57, 2008.
- KAUFMAN, W. R. Tick-host interaction: a synthesis of current concepts. **Parasitology today**, Amsterdam, v. 5, n. 2, p. 47–56, 1989.
- KOCAN, K. M. et al. Demonstration of colonies of *Cowdria ruminantium* in midgut epithelial cells of *Amblyomma variegatum*. **American journal of veterinary research**, Chicago, v. 48, n. 3, p. 356–60, 1987.
- KONNAI, S. et al. Molecular identification and expression analysis of lipocalins from blood feeding taiga tick, *Ixodes persulcatus* Schulze. **Experimental Parasitology**, San Diego, v. 127, n. 2, p. 467–474, 2011.
- LABRUNA, M. B. et al. Hyperparasitism in *Amblyomma rotundatum* (Acari: Ixodidae). **The Journal of parasitology**, Lawrence, v. 93, n. 6, p. 1531–1532, 2007.
- LABRUNA, M. B. Ecology of *Rickettsia* in South America. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 1166, n. 1, p. 156–166, 2009.
- LEVIN, M. L. et al. Crossbreeding between different geographical populations of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). **Experimental and applied acarology**, Amsterdam, v. 58, n. 1, p. 51–68, 2012.
- LIU, G.-H. et al. Complete mitochondrial genome sequence data provides genetic evidence that the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) represents a species complex. **International journal of biological sciences**, Bethesda, v. 9, n. 4, p. 361–9, 2013.
- MAES, M. E.; SCHLAMP, C. L.; NICKELLS, R. W. BAX to basics: How the BCL2 gene family controls the death of retinal ganglion cells. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 57, p. 1–25, 2017.
- MATOS, R. DA S. et al. Histopathological study of ovaries of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) exposed to different thymol concentrations. **Parasitology Research**, Berlin, v. 113, n. 12, p. 4555–4565, 2014.
- MOERBECK, L. et al. *Rickettsia* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) Vector Biodiversity in High

- Altitude Atlantic Forest Fragments Within a Semiarid Climate: A New Endemic Area of Spotted-Fever in Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 53, n. 6, p. 1458–1466, 2016.
- MONTENEGRO, D. C. et al. Spotted Fever: Epidemiology and Vector-*Rickettsia*-Host Relationship in Rio de Janeiro State. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 505–515, 2017.
- MORAES-FILHO, J. et al. Genetic analysis of ticks belonging to the *Rhipicephalus sanguineus* group in Latin America. **Acta Tropica**, Basel, v. 117, n. 1, p. 51–55, 2011.
- MULENGA, A.; BLANDON, M.; KHUMTHONG, R. The molecular basis of the *Amblyomma americanum* tick attachment phase. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 41, n. 4, p. 267–287, 2007.
- NAVA, S. et al. The taxonomic status of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806). **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 208, n. 1–2, p. 2–8, 2015.
- NODARI, E. F. et al. Midgut of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae) females fed for 2 and 4 days: acid phosphatase detection and morphophysiology of epithelial cells. **Journal of Biochemistry International**, v. 3, n. 3, p. 85–91, 2016.
- NUNES, E. T. et al. Morphological, histological, and ultrastructural characterization of degenerating salivary glands in females of the cattle-tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (CANESTRINI, 1887) (Acari: Ixodidae). **Micron**, New York, v. 36, n. 5, p. 437–447, 2005.
- OLIVEIRA, C. J. F. et al. Deconstructing tick saliva: non-protein molecules with potent immunomodulatory properties. **The Journal of biological chemistry**, Baltimore, v. 286, n. 13, p. 10960–9, 2011.
- OLIVEIRA, P. R. et al. Comparison of the external morphology of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) ticks from Brazil and Argentina. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 129, n. 1–2, p. 139–147, 2005.
- OLIVIERI, J. A. et al. Structure of the salivary glands of the unfed female tick *Amblyomma cajennense* (Fabricius) (Acarina: Ixodidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 87, p. 167–174, 1992.
- PADDOCK, C. D. et al. Unique Strain of *Rickettsia parkeri* Associated with the Hard Tick *Dermacentor parumapertus* Neumann in the Western United States. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 83, n. 9, p. e03463-16, 2017.
- PAESEN, G. C. et al. Tick histamine-binding proteins: isolation, cloning, and three-dimensional structure. **Molecular cell**, Cambridge, v. 3, n. 5, p. 661–71, 1999.
- PARIZI, L. F. et al. Comparative immunogenicity of *Haemaphysalis longicornis* and *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* calreticulins. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 164, n. 2–4, p. 282–290, 2009.
- PARIZI, L. F. et al. The quest for a universal vaccine against ticks: Cross-immunity insights. **The Veterinary Journal**, v. 194, n. 2, p. 158–165, 2012.
- RADULOVIĆ, Ž. M. et al. A 24–48 h fed *Amblyomma americanum* tick saliva immuno-proteome. **BMC Genomics**, v. 15, p. 518–548, 2014.
- REMEDIÓ, R. N. et al. Morphology of the midgut of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) adult ticks in different feeding stages. **Parasitology Research**, Berlin, v. 112, n. 1, p. 415–425, 2013.
- RIBEIRO, J. M. C. Role of Saliva in Blood-Feeding by Arthropods. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 32, n. 1, p. 463–478, 1987.

- RIBEIRO, J. M.; MATHER, T. N. *Ixodes scapularis*: salivary kininase activity is a metallo dipeptidyl carboxypeptidase. **Experimental parasitology**, San Diego, v. 89, p. 213–221, 1998.
- ROMA, G. C. et al. Morphological and cytochemical changes in synganglion of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) female ticks from exposure of andiroba oil (*Carapa guianensis*). **Microscopy Research and Technique**, New York, v. 76, n. 7, p. 687–696, 2013.
- SABADIN, G. A. et al. Effect of recombinant glutathione S-transferase as vaccine antigen against *Rhipicephalus appendiculatus* and *Rhipicephalus sanguineus* infestation. **Vaccine**, Kidlington, v. 35, n. 48, p. 6649–6656, 2017.
- SANCHES, G. S. et al. Molecular, biological, and morphometric comparisons between different geographical populations of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 215, p. 78–87, 2016.
- SHAPIRO, S. Z.; VOIGT, W. P.; FUJISAKI, K. Tick antigens recognized by serum from a guinea pig resistant to infestation with the tick *Rhipicephalus appendiculatus*. **The Journal of parasitology**, v. 72, n. 3, p. 454–63, 1986.
- SONENSHINE, D. E.; ROE, R. . **Biology of ticks**. 2^a ed. New York: Oxford University Press, 2014.
- STEEN, N. A.; BARKER, S. C.; ALEWOOD, P. F. Proteins in the saliva of the Ixodida (ticks): Pharmacological features and biological significance. **Toxicon**, Elmsford, v. 47, n. 1, p. 1–20, 2006.
- SZABÓ, M. P. J. et al. Biological and DNA evidence of two dissimilar populations of the *Rhipicephalus sanguineus* tick group (Acari: Ixodidae) in South America. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 130, n. 1–2, p. 131–140, 2005.
- TAIT, S. W. G.; GREEN, D. R. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 11, n. 9, p. 621–632, 2010.
- TILL, W. M. **A Contribution to the Anatomy and Histology of the Brown Ear Tick: *Rhipicephalus Appendiculatus* Neumann Memoirs, Entomological Society of Southern Africa**. Johannesburg: University of the Witwatersrand, 1961.
- VENDRAMINI, M. C. R. et al. Cytotoxic effects of andiroba oil (*Carapa guianensis*) in reproductive system of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) semi-engorged females. **Parasitology Research**, Berlin, v. 111, n. 5, p. 1885–1894, 2012a.
- VENDRAMINI, M. C. R. et al. Action of andiroba oil (*Carapa guianensis*) on *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) semi-engorged females: Morphophysiological evaluation of reproductive system. **Microscopy Research and Technique**, New York, v. 75, n. 12, p. 1745–1754, 2012b.
- VERONEZ, V. A. et al. Histopathology of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) ticks fed on resistant hosts. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 50, n. 2, p. 151–161, 2010.
- WALKER, A. R.; FLETCHER, J. D. Histology of digestion in nymphs of *Rhipicephalus appendiculatus* fed on rabbits and cattle naive and resistant to the ticks. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 17, n. 8, p. 1393–1411, 1987.
- WALKER, A. R.; FLETCHER, J. D.; GILL, H. S. Structural and histochemical changes in the salivary glands of *Rhipicephalus appendiculatus* during feeding. **International Journal**

for Parasitology, Oxford, v. 15, n. 1, p. 81–100, 1985.

WALKER, J. B.; KEIRANS, J. E.; HORAK, I. G. **The Genus Rhipicephalus (Acari, Ixodidae): a Guide to the Brown Ticks of the World**. Cambridge, Cambridge University Press, 2000.

ZIVKOVIC, Z. et al. Subolesin expression in response to pathogen infection in ticks. **BMC Immunology**, v. 11, n. 7, p. 1–12, 2010.

Anexo

ANEXO

Aprovação da Comissão de Ética no Uso Animal – IB-UNESP-CRC



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Rio Claro

COMISSÃO DE ÉTICA
NO USO DE ANIMAL
CEUA – IB – UNESP - CRC

DECISÃO CEUA Nº 11/2014

Instituição: UNESP – IB – CRC	Departamento: Biologia
Protocolo nº: 925	Data de Registro CEUA: 18.2.2014
Projeto de Pesquisa: "Hematofagia em fêmeas de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> (Acari: Ixodidae) e suas relações: Bioquímicas (bioativos presentes em extratos) e Morfofisiológicas (glândulas salivares e intestino)"	
Subprojeto(s) vinculado(s): ==,==	

Pesquisador Responsável: **MARIA IZABEL DE SOUZA CAMARGO**

Orientando(a): **Elen Fernanda Nodari**

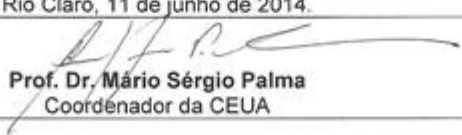
Colaborador(es): ==,==

Objetivo Acadêmico:	☐ TCC
	☐ Mestrado
	☒ Doutorado
	☐ Outros – (Especificar)

A Comissão de Ética no Uso de Animal - CEUA do Instituto de Biociências da UNESP – Campus de Rio Claro, em sua **20ª reunião ordinária**, realizada em **11/6/2014**:

☒ (X)	Aprovou o Projeto de Pesquisa acima citado, ratificando o parecer emitido pelo relator.
☐ ()	Desde que atendidas as pendências apontadas na reunião (vide anexo), aprova o Projeto de Pesquisa acima citado (prazo máximo de 30 dias).
☐ ()	Referendou o Projeto de Pesquisa acima citado, ratificando o parecer emitido pelo relator.
☐ ()	Aprovou retornar ao interessado para atendimento das pendências encontradas (prazo máximo de 30 dias).
☐ ()	Não Aprovou.
☐ ()	Retirou , devido à permanência das pendências.

Rio Claro, 11 de junho de 2014.


Prof. Dr. Mário Sérgio Palma
Coordenador da CEUA