
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

MELISSA CAROLINA PEREIRA

**EXPOSIÇÃO DE CÉLULAS DA LINHAGEM
TUMORAL J774 (MACRÓFAGO) AO
EXTRATO DAS GLÂNDULAS SALIVARES DE
FÊMEAS DE CARRAPATOS *Rhipicephalus
sanguineus* L. S. (ACARI: IXODIDAE).
AVALIAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA**

MELISSA CAROLINA PEREIRA

EXPOSIÇÃO DE CÉLULAS DA LINHAGEM TUMORAL J774
(MACRÓFAGO) AO EXTRATO DAS GLÂNDULAS SALIVARES DE
FÊMEAS DE CARRAPATOS *Rhipicephalus sanguineus* L. S. (ACARI:
IXODIDAE). AVALIAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA

Orientadora: Profa. Dra. Maria Izabel Souza Camargo

Co-orientadora: Dra. Elen Fernanda Nodari

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Instituto de Biociências da Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Campus de
Rio Claro, para obtenção do grau de Bacharela e
Licenciada em Ciências Biológicas.

Rio Claro
2018

P436e	Pereira, Melissa Carolina Exposição de células da linhagem tumoral J774 (macrófago) ao extrato das glândulas salivares de fêmeas de carrapatos <i>Rhipicephalus sanguineus</i> l. s. (Acari: Ixodidae). Avaliação morfofisiológica / Melissa Carolina Pereira. -- Rio Claro, 2018 82 p. : tabs., fotos + 1 CD-ROM Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado e licenciatura - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro Orientadora: Maria Izabel Souza Camargo Coorientadora: Elen Fernanda Nodari 1. Carrapatos. 2. Saliva. 3. Macrófagos. 4. Óxido nítrico. I. Título.
-------	---

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Márcia e Claudinei, e meu irmão Matheus, pelo amor incondicional, compreensão, paciência, apoio, confiança e motivação que dividiram comigo todos os dias, mesmo e principalmente naqueles em que estávamos separados por muitos quilômetros, e sem os quais eu não seria capaz de seguir esse sonho e concluí-lo. Obrigada por se orgulharem tanto de mim, as minhas conquistas são também de vocês e para vocês, pois são a minha base e eu os amo mais do que minha própria vida.

À toda a minha família, por me acompanharem de perto nesta caminhada e pelo amor e carinho que sempre demonstraram por mim, sempre torcendo pelas minhas conquistas, em especial à minha vó Nely, meus padrinhos Carlos e Jane, e primos-irmãos Letícia, Mariana e Luiz Felipe.

Aos amigos que conquistei nessa caminhada, a minha família em Rio Claro, em especial às minhas irmãs de alma Ana Elisa e Mileni, para as quais nunca serei capaz de expressar o meu amor e a minha gratidão por estarem ao meu lado em todos os momentos e muitas vezes serem um dos motivos que me fizeram não desistir. A nossa amizade é para a vida toda e não importa para onde ela nos leve a partir daqui, estarei sempre a uma ligação ou mensagem de distância pronta para o que precisarem! Agradeço também aos amigos Guilherme, Leonardo e Samantha por todas as risadas e trabalhos divididos ao longo desses 5 anos, obrigada por completarem o nosso grupo.

Aos meus amigos da Comissão de Formatura, Isabella, Domênica e Ruan com os quais eu compartilhei muitos momentos intensos neste último ano de graduação e que só permitiram que a nossa amizade se solidificasse. Obrigada por este encontro! Só nós quatro entendemos o amor e a sintonia que cresceram tão rápido entre nós mas de forma tão verdadeira.

À minha orientadora e amiga Profa. Dra. Maria Izabel Souza Camargo, por todo o carinho, paciência e confiança que depositou em mim durante estes 4 anos e que foram essenciais para a minha formação. Sou imensamente grata a você Bel, por ter me aberto todas as portas, acolhido e guiado nesse caminho acadêmico, apresentando tantas oportunidades quanto podia.

À minha co-orientadora e amiga, Elen Nodari, por todos os momentos compartilhados nestes anos, as longas horas dissecando carrapatinhos em frente ao microscópio, a orientação em todas as etapas deste projeto, as conversas no café, a companhia naquela nossa viagem inesquecível à Colômbia que ficará para sempre marcada. Obrigada por

me acompanhar nessa caminhada com tanto carinho e paciência, sempre disposta a me ajudar e aconselhar! Você também é parte essencial nessa minha conquista.

Ao meu grupo de pesquisa BCSTM por todo o apoio acadêmico, em especial aos amigos Marina, Natália, Renata e Luís Adriano pela companhia diária, pelas discussões acadêmicas que contribuíram muito na minha formação como pesquisadora e também por àquelas conversas não acadêmicas quase sempre regadas a café, comida e muitas risadas que aliviavam o estresse dos dias no laboratório. Também ao técnico de laboratório mais animado deste país, Gerson, e à nossa secretária Cris, obrigada por fazerem os dias no Departamento de Biologia mais leves e divertidos.

Às professoras doutoras Patrícia Ucelli Simioni e Wirla Cunha da Silva Tamashiro pela colaboração neste projeto, sem a qual não seria possível realizá-lo.

Finalmente agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento deste estudo e à Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – campus de Rio Claro, por ter se tornado a minha casa durante estes longos anos.

RESUMO

Os carrapatos são artrópodes, hematófagos e ectoparasitas (obrigatórios) de uma grande diversidade de organismos animais, incluindo o homem. A espécie *Rhipicephalus sanguineus* lato sensu (l. s.), popularmente conhecida como “carrapato do cão”, está geograficamente distribuída ao redor do globo e, tem adquirido destaque no cenário mundial por sua grande importância médico-veterinária agindo como principal vetor de diversos agentes patogênicos, tais como *Ehrlichia canis* e *Rickettsia rickettsii*. A saliva destes carrapatos, substância produzida e liberada pelas glândulas salivares é capaz de modular as respostas hemostática, inflamatória e imunológica do hospedeiro e, estudos recentes demonstraram ainda a ação antitumoral dos componentes da saliva de *R. sanguineus* l. s. o que vem corroborar a importância do estudo de seus efeitos. No presente trabalho foram avaliadas as ações imunomodulatórias de diferentes concentrações do extrato de glândulas salivares de fêmeas de *R. sanguineus* l. s. alimentadas por 2 (**EGS2**) (0.1, 0.5, 1 e 2 µg/mL) e 4 dias (**EGS4**) (0.1, 0.5, 1, 2, 4 e 8 µg/mL) sobre células da linhagem J774 (derivada de macrófagos) estimuladas com o composto lipopolissacarídeo (LPS; endotoxina capaz de ativar macrófagos in vitro por meio da indução do processo inflamatório). As possíveis alterações nas células decorrentes do estímulo inflamatório com LPS e do tratamento com os extratos foram analisadas através da medição da produção de óxido nítrico e da morfologia (hematoxilina e eosina aquosa). Os resultados aqui apresentados mostraram que o LPS foi capaz de estimular o aumento dos níveis de secreção de NO em comparação com o grupo controle, bem como sugerem que as altas taxas de NO no meio extracelular induziu efeitos pró-apoptóticos nas células J774. Os dados permitiram confirmar ainda o potencial modulador do **EGS2** nas concentrações de 0.1, 0.5, 1 e 2 µg/mL e do **EGS4** nas de 0.1, 0.5, 1, 2 e 4 µg/mL sobre a resposta inflamatória das células J774, concentrações estas que foram capazes de diminuir significativamente a taxa de produção de óxido nítrico em comparação às células que receberam apenas o estímulo inflamatório do LPS. Ao contrário das demais concentrações, o **EGS4** a 8 µg/mL não diminuiu as taxas de NO secretadas pelas células J774 e quando analisadas morfológicamente estas apresentaram características de morte apoptótica, o que sinalizou que o extrato nesta concentração provavelmente já seria tóxico.

Palavras-chave: carrapatos, saliva, macrófagos, óxido nítrico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	5
2. OBJETIVOS	10
2.1. Objetivo geral	10
2.2. Objetivos específicos	10
3. MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1. Material	12
3.1.1. Carrapatos <i>Rhipicephalus sanguineus</i> lato sensu	12
3.2. Métodos	12
3.2.1. Obtenção dos extratos das glândulas salivares	12
3.2.2. Cultura de células J774	13
3.2.3. Extrato das glândulas salivares de 2 dias	13
3.2.4. Extrato das glândulas salivares de 4 dias	13
3.2.5. Determinação da concentração de óxido nítrico (NO)	14
3.2.6. Análise morfológica	14
3.2.7. Análise estatística	15
4. RESULTADOS	17
Capítulo 1: Immunomodulatory potential of 2-day salivary gland extract from <i>Rhipicephalus sanguineus</i> s. l. (Acari: Ixodidae) ticks on the macrophage cell line J774	19
Capítulo 2: Ação do extrato das glândulas salivares de 4 dias de carrapatos <i>Rhipicephalus sanguineus</i> l. s. (Acari: Ixodidae) sobre a resposta inflamatória de células J774	43
5. DISCUSSÃO GERAL	69
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	74
REFERÊNCIAS	76
ANEXO A – PROTOCOLO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO ANIMAL (CEUA/UNESP)	82

INTRODUÇÃO



1. INTRODUÇÃO

Os carrapatos são artrópodes, hematófagos e ectoparasitas obrigatórios de uma grande diversidade de organismos incluindo desde vertebrados até outras espécies de carrapatos (LABRUNA, 2004). Constituem, depois dos mosquitos, um dos grupos de vetores mais importantes dentre os Arthropoda. Além disso, é o grupo com maior variedade de agentes patogênicos transmissíveis, incluindo fungos, bactérias, vírus e protozoários (DANTAS-TORRES, 2008).

O grande sucesso destes ectoparasitas se deve a presença de algumas características biológicas notáveis que incluem a capacidade de sobreviver por vários anos fora do hospedeiro (DANTAS-TORRES, 2008; SAUER et al., 1995); hematofagismo em todas as fases do desenvolvimento; fixação profunda nos hospedeiros; resistência à alterações climáticas e adaptabilidade em diversos tipos de ambientes, assegurando tempo e condições para proliferação dos patógenos (DANTAS-TORRES, 2008).

A espécie *Rhipicephalus sanguineus* l.s. (família Ixodidae) é popularmente conhecida como “carrapato do cão”, sendo este o seu principal hospedeiro (DANTAS-TORRES; OTRANTO, 2015) embora não o único, uma vez que há relatos de casos de parasitismo em outros mamíferos, incluindo o homem (DANTAS-TORRES, 2010). As altas taxas de migrações humanas que levam consigo o cão doméstico poderiam explicar o fato desta espécie de carrapato ser amplamente distribuída em todas as regiões do mundo (DANTAS-TORRES, 2008; WALKER; KEIRANS; HORAK, 2000).

Esta espécie tem adquirido cada vez mais destaque no cenário mundial, pela sua grande importância médico-veterinária agindo como principal vetor de diversos agentes patogênicos, dentre os quais os principais são *Ehrlichia canis*, *Babesia canis*, *Haemobartonella canis* e *Hapatozoon canis* em cães; e em humanos *Rickettsia conorii* na Europa e de *R. rickettsii* no Arizona – EUA (BORGES et al., 2007), além de terem sido registrados relatos de parasitismo por essa espécie no Brasil (DANTAS-TORRES; FIGUEREDO; BRANDÃO-FILHO, 2006).

Os representantes da família Ixodidae, grupo economicamente mais importante dentre as quatro famílias que compõem a subordem Ixodida, apresentam um eficiente e complexo aparelho bucal que associado à síntese de saliva pelas glândulas salivares formam um conjunto vital para o sucesso biológico do grupo, produzindo substâncias primordiais aos

processos de fixação e alimentação dos ixodídeos (BINNINGTON, 1978; WALKER; FLETCHER; GILL, 1985).

Fisiologicamente, as glândulas salivares são responsáveis pela produção da saliva, uma mistura complexa capaz de mediar e modular as respostas hemostática, inflamatória e imunológica do hospedeiro (SONENSHINE; ROE, 2014a) através do aumento do fluxo sanguíneo na região da picada, da inoculação de anticoagulantes que mantêm a fluidez do sangue, da inibição do processo inflamatório e da ação imunossupressora no momento da fixação, o que atrasa e dificulta a rejeição pelo hospedeiro (SAUER; ESSENBERG; BOWMAN, 2000). Estas glândulas podem, ainda, produzir outros elementos com variadas funções e atividades biológicas como, por exemplo, moléculas que tem potencial inibidor da coagulação e podem agir como estimuladoras da vasodilatação sendo indispensáveis para os processos de fixação e alimentação do carrapato. Além disso, podem sintetizar moléculas anti-inflamatórias e imunossupressoras atuantes fundamentais na redução das defesas do hospedeiro, garantindo assim o sucesso no processo de alimentação efetiva destes ectoparasitas (BROSSARD; WIKEL, 2004).

As glândulas salivares das diferentes espécies também apresentam diferentes antígenos, tanto em quantidades quanto em concentrações, da mesma forma que a secreção produzida por estas estruturas apresenta quantidades e concentrações diferentes de elementos imunomodulatórios considerando que, cada espécie possui características típicas no seu ciclo glandular (BINNINGTON, 1978; CAMARGO-MATHIAS; FURQUIM, 2013). No caso da espécie *R. sanguineus* a saliva apresenta variações quando considerados o início (2 dias), o meio (4 dias) e o final (6 dias) do seu ciclo secretor (CAMARGO-MATHIAS; FURQUIM, 2013), sendo que as variações mais pronunciadas dos elementos imunomodulatórios presentes na saliva desta espécie podem ser observadas nos períodos de 2 e 4 dias, devido ser essa fase aquela de maior consumo de sangue (CAMARGO-MATHIAS, 2013; CAMARGO-MATHIAS; FURQUIM; NUNES, 2011).

A saliva de algumas espécies de carrapatos pode inibir a função dos neutrófilos, incluindo sua atividade oxidativa e fagocitária (RIBEIRO; WEISS; TELFORD, 1990); afetar a proliferação de linfócitos (KOPECKY; KUTHEJLOVA; PECHOVA, 1999); inibir a atividade das células “natural killer-NK” (KUBES et al., 1994); reduzir o desenvolvimento da resposta primária por IgM (BROSSARD; WIKEL, 2004; FIVAZ, 1989; WIKEL, 1985); e diminuir a atividade oxidativa de macrófagos (KUTHEJLOVA et al., 2001). Além disto, a saliva dos carrapatos é uma rica fonte de moléculas bioativas que possuem propriedades

antitumorais e antiangiogênicas e ainda, o potencial dessas moléculas vem confirmar a importância da realização de mais investigações sobre estes ectoparasitas (SOUSA et al., 2015).

A linhagem celular J774 é originalmente isolada do sarcoma de células reticulares (neoplasia atualmente denominada sarcoma histiocítico) de camundongos BALB/c e tem sido muito utilizada no estudo *in vitro* do funcionamento de macrófagos por produzir agentes potenciadores de resposta imunológica (citocinas, NO, prostaglandinas, etc.) muito semelhantes àqueles sintetizados pelos macrófagos que dão origem a esta linhagem (JUSTO et al., 2015; WAKO; DENG, 2004). Além disso, macrófagos são facilmente ativados por uma grande diversidade de compostos, dentre os quais o lipopolissacarídeo (LPS), endotoxina extraída da parede celular de bactérias Gram-negativas (KOH et al., 2009) e que tem potencialidade de estimular a resposta inflamatória de células histiocíticas pela via clássica, uma das vias normais de ativação de macrófagos, com consequente liberação de óxido nítrico (NO) e citocinas pró-inflamatórias (IL1, IL6 e TNF- α) (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

Existem, ainda, alguns estudos prévios na literatura que exploram o potencial de inibição da produção de NO em cultura de macrófagos peritoneais pelo extrato das glândulas salivares da espécie *Ixodes ricinus* (KUTHEJLOVA et al., 2001) e *I. dammini* (URIOSTE et al., 1994). Assim, as células da linhagem J774 quando estimuladas por LPS tornam-se um excelente modelo biológico para se estudar os efeitos imunomodulatórios do extrato de glândulas salivares de carrapatos *R. sanguineus* l. s.

Muitas formas de controle de carrapatos têm sido estudadas, dados os prejuízos econômico-sanitários causados pelos mesmos. Com o auxílio da Biologia Molecular e da Imunologia, pode-se destacar a produção de vacinas que visam o desenvolvimento da resposta imune do hospedeiro como uma das possíveis formas de controle de carrapatos que vem se tornando eficiente. Diante disto, o estudo dos mecanismos de ação imunomodulatórios da saliva do carrapato no hospedeiro deve ser considerado de vital importância, de forma que não somente sirva como contribuição no desenvolvimento de novas formas de controle, mas também que sirva como referência para o entendimento dos processos que auxiliam os carrapatos na transmissão de patógenos – promovidos especialmente por que estes patógenos se beneficiam da ação modulatória da saliva do carrapato quando no sistema imune do hospedeiro, para que possam se instalar.

Diante disso, pouco ainda se conhece sobre a ação de extratos de glândulas salivares de carrapatos sobre a resposta inflamatória dos hospedeiros, apesar de existirem diversos trabalhos na literatura que abordaram o potencial da saliva nessa resposta, o que vem mais uma vez justificar a realização do presente estudo.

Levando-se ainda em consideração que a espécie *R. sanguineus* l.s. tem se destacado dentre as espécies de carrapatos de importância econômica e médico-veterinária, devido ao seu potencial de transmitir diversos patógenos (inclusive ao homem), e de estudos recentes que demonstraram a ação antitumoral dos componentes da saliva desta espécie de carrapato terem sido realizados recentemente (ABREU et al., 2014; ANHOLETO, 2014; ROCHA, 2014), o presente projeto vem propor a análise *in vitro* dos efeitos do extrato obtido a partir de glândulas salivares de fêmeas de *R. sanguineus* com 4 dias de alimentação sobre as células do sistema imune-inflamatório (linhagem tumoral J774 derivada de macrófagos) para observação de como ocorrem e quais são as alterações morfofisiológicas provocadas por essa exposição ao extrato.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Analisar *in vitro* a ação do extrato das glândulas salivares de fêmeas de carrapatos *R. sanguineus* l. s. alimentadas por 2 e 4 dias em coelhos hospedeiros sobre a morfofisiologia das células da linhagem tumoral J774 (derivada de macrófagos), verificando as possíveis alterações morfofisiológicas destas células causadas pela exposição ao extrato.

2.2. Objetivos específicos

2.2.1. Verificar *in vitro* o efeito do extrato glandular de 2 dias através de quantificação da produção de óxido nítrico liberado pelas células J774 estimuladas ou não com lipopolissacarídeo.

2.2.2. Verificar *in vitro* o efeito do extrato glandular de 4 dias através de quantificação da produção de óxido nítrico liberado pelas células J774 estimuladas ou não com lipopolissacarídeo.

2.2.3. Analisar possíveis alterações morfológicas nas células J774 estimuladas com lipopolissacarídeo e expostas aos extratos glandulares de 2 e 4 dias, por meio da aplicação de técnica histológica e coloração pela hematoxilina de Harris e eosina aquosa (adaptado de JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983) para posterior observação sob microscopia de luz de campo claro.

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

3.1.1. Carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* lato sensu

Para este estudo foram utilizadas 100 fêmeas de carrapatos *R. sanguineus* l. s. alimentadas por 4 dias em coelhos hospedeiros (Grupo Genético de Botucatu). Indivíduos em jejum provenientes da colônia mantida nos laboratórios da “Brazilian Central of Studies on Ticks Morphology” (BCSTM) instaladas em sala do Biotério do Instituto de Biociências da UNESP, campus de Rio Claro, SP, Brasil, foram mantidos em estufa BOD (Biological Oxygen Demand) Eletrolab EL 202 em condições controladas (29°C, 80% de umidade e fotoperíodo de 12 horas) até o momento de infestação nos coelhos hospedeiros.

Os hospedeiros não tiveram contato prévio com os ectoparasitas e foram mantidos em gaiolas de contenção em sala alocada no mesmo Biotério, onde foram alimentados com ração e água *ad libitum*.

Os procedimentos de fixação e de construção das câmaras de alimentação, e a infestação e controle dos carrapatos nestas câmaras, foram realizados segundo protocolo descrito por Bechara et al. (1995) e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA-IB-UNESP/Rio Claro), protocolo nº 35/2015.

A coleta das fêmeas no tempo exato de 4 dias de alimentação foi garantida através de observações subsequentes que ocorreram a cada 3 horas após a fixação dos carrapatos nos hospedeiros.

3.2. Métodos

3.2.1. Obtenção dos extratos das glândulas salivares

As fêmeas com 2 e 4 dias de alimentação foram retiradas dos hospedeiros pela região do hipostômio, com auxílio de pinça cirúrgica, através de movimentos circulares. A seguir, foram posicionadas em placas de Petri contendo solução salina (7,5 g de NaCl, 2,38 g de Na₂HPO₄, 2,72 g de KH₂PO₄ e 1000 mL de água destilada) para imediata dissecação e retirada das glândulas salivares.

Após a retirada das glândulas salivares, as mesmas foram colocadas separadamente em criotubos contendo 200 µL de tampão fosfato pH 7.4 e então maceradas. Na sequência, os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 1500 rpm, os sobrenadantes recolhidos depositados em eppendorfs estéreis e encaminhados para a dosagem de proteínas, segundo metodologia descrita por Sedmak & Grossberg (1977) (método de Bradford).

Após a determinação do conteúdo proteico, no interior de uma capela de fluxo laminar vertical pré-estéril, os extratos foram 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 à seringas hipodérmicas. Depois, os extratos foram aliquotados e armazenados em criotubos estéreis em freezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a utilização.

3.2.2. Cultura de células J774

Nas dependências do Laboratório de Biologia Molecular pertencente ao Departamento de Biologia localizado no Instituto de Biociências da UNESP/Rio Claro, a linhagem de macrófagos J774 foi cultivada em meio RPMI 1640 contendo HEPES (ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-piperazin-1-il]-etanossulfônico) (25 mM) e Bicarbonato de Sódio (2g/L), 2 $\mu\text{L/L}$ de 2-Me e 10% de SFB (soro fetal bovino) até semi-confluência em estufa incubadora, em condições de cultura com 5% de CO_2 e 37°C .

Após o cultivo por período mínimo de 14 dias, as células J774 foram removidas dos frascos de cultivo com auxílio de *cell scraper* estéril, semeadas em uma densidade de 2×10^5 células/poço (180 $\mu\text{L/poço}$) em placa de 96 poços e cultivadas durante 24 horas em condições de esterilidade. Após esse período, as células não aderentes e os debris foram removidos por lavagem com meio RPMI completo.

3.2.3. Extrato das glândulas salivares de 2 dias

Em uma placa de 96 poços contendo as células aderidas serão adicionados 10 μL de extrato das glândulas salivares de 2 dias (**EGS2**) nas diferentes concentrações propostas (0.05, 0.1, 0.5, 1 e 2 $\mu\text{g/mL}$). Em uma segunda placa, serão adicionados 10 μL de lipopolissacarídeo (LPS) diluído em meio RPMI e 10 μL de extrato das glândulas salivares de 2 dias (**EGS2**) nas diferentes concentrações propostas (0.05, 0.1, 0.5, 1 e 2 $\mu\text{g/mL}$). Para os controles, poços de cultura com as células J774 e com as células J774 + LPS serão mantidos sem estímulo com os extratos. O ensaio será realizado em triplicatas para cada grupo.

3.2.4. Extrato das glândulas salivares de 4 dias

Em uma placa de 96 poços contendo as células aderidas serão adicionados 10 μL de extrato das glândulas salivares de 4 dias (**EGS4**) nas diferentes concentrações propostas (0.1, 0.5, 1, 2, 4 e 8 $\mu\text{g/mL}$). Em uma segunda placa, serão adicionados 10 μL de lipopolissacarídeo (LPS) diluído em meio RPMI e 10 μL de extrato das glândulas salivares de 4 dias (**EGS4**) nas diferentes concentrações propostas (0.1, 0.5, 1, 2, 4 e 8 $\mu\text{g/mL}$). Para os

controles, poços de cultura com as células J774 e com as células J774 + LPS serão mantidos sem estímulo com os extratos. O ensaio será realizado em triplicatas para cada grupo.

3.2.5. Determinação da concentração de óxido nítrico (NO)

A dosagem de óxido nítrico (NO) liberado nos sobrenadantes das células J774, cultivadas como descrito no item 3.2.2. foi realizada através de ensaio colorimétrico quantitativo segundo protocolo descrito por Griess e Bemerkungen (1879).

Em placas de 96 poços, alíquotas de 50 µL do sobrenadante de células (controles e expostas ao **EGS2** e **EGS4**) foram incubadas com 50 µL do reagente de Griess — composto por 1% de sulfanilamida, 0,1% de N- (1-naphthylethylenediamine) dihydrochloride e 2,5% de ácido fosfórico. Após 10 min em temperatura ambiente, a absorbância dos composto foi lida em uma leitora de microplacas EZ Read 400 Research (Biochrom, Cambridge, UK) a 540 nm. Os valores foram expressos em µM de nitrito/ 2×10^5 células e calculados em comparação com os valores da curva padrão obtida com soluções estoque de nitrito de sódio. O ensaio foi realizado em triplicata para cada concentração de **EGS2** e **EGS4**.

3.2.6. Análise morfológica

As células J774 foram semeadas em placas de 24 poços contendo lamínulas estéreis, a uma densidade de 1×10^6 células/poço (500µL/poço), e incubadas nas mesmas condições do item 2.1.3. Após 24 horas, em uma das placas foram adicionados 50 µL de LPS e 50 µL de **EGS2** nas diferentes concentrações propostas (0.1, 0.5, 1 e 2 µg/mL) a cada poço em cultura e as placas incubadas por 24 horas nas condições previamente descritas no item 3.2.2. Em outra placa foram adicionados 50 µL de LPS e 50 µL de **EGS4** nas diferentes concentrações propostas (0.1, 0.5, 1, 2, 4 e 8 µg/mL) a cada poço em cultura e as placas incubadas por 24 horas nas condições previamente descritas.

Após 24 horas, o sobrenadante de cultura das células foi descartado, substituído por 300 µL de fixador (paraformaldeído 4%) e as placas foram armazenadas em geladeira (2 a 8° C) por 2 horas. Após esse período, o fixador foi retirado e o material armazenado em solução tampão fosfato-salino (PBS) pH 7,2 por 24 horas.

As lamínulas contendo células aderentes foram desidratadas em série crescente de etanol 70, 75, 80, 85, 90 e 95% por 10 minutos cada. Em seguida, as mesmas foram coradas com hematoxilina de Harris por 2 minutos, lavadas em água destilada por 30 segundos para retirada do excesso de corante e novamente coradas com eosina aquosa por 30 segundos. As lamínulas coradas, após secagem, foram montadas em lâminas em preparação permanente

com Entellan® (Merck Millipore) e imediatamente fotodocumentadas em fotomicroscópio de luz de campo claro LEICA DM750.

3.2.7. Análise estatística

Os resultados obtidos com a leitura das absorbâncias das amostras (dosagem de NO) foram analisados utilizando os métodos estatísticos de Análise de Variância (*one way* ANOVA) e Teste de Tukey. Apenas diferenças de $p < 0,05$ foram consideradas significativas para todas as concentrações testadas.

RESULTADOS



4. RESULTADOS

Os resultados obtidos estão sendo apresentados sob a forma de capítulos que correspondem a um artigo submetido em periódico internacional (Capítulo 1) e um artigo em preparação (Capítulo 2).

Capítulo 1: Immunomodulatory potential of two-day salivary gland extract from *Rhipicephalus sanguineus* s. l. (Acari: Ixodidae) ticks on the macrophage cell line J774

Status: submetido à Parasitology Research.

Capítulo 2: Ação do extrato das glândulas salivares de 4 dias de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* l. s. (Acari: Ixodidae) sobre a resposta inflamatória de células J774

Status: Em preparação.

CAPÍTULO 1

Immunomodulatory potential of two-day salivary gland extract from *Rhipicephalus sanguineus* s. l. (Acari: Ixodidae) ticks on the macrophage cell line J774

Melissa Carolina Pereira¹, Elen Fernanda Nodari¹, Marina Rodrigues de Abreu¹, Lisiery Negrini Paiatto², Patrícia Ucelli Simioni² & Maria Izabel Camargo-Mathias^{1,*}

¹São Paulo State University – UNESP, Department of Biology - Institute of Biosciences, 13506-900, Rio Claro, SP, Brazil

²University of Campinas – UNICAMP, Department of Genetics, Evolution and Bioagents - Institute of Biology, 13083-970, Campinas, SP, Brazil.

*Correspondent author: +55-19-35264151; E-mail address: micm@rc.unesp.br; <https://orcid.org/0000-0002-9418-8934>

Acknowledgments

The authors are grateful to the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP (Grants: 2015/20745-6; 2015/10275-2; 2014/02843-8) and to the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq (Grant: 300625/2012-0), M.I. Camargo-Mathias academic carrier research fellowship for the financial support. The authors would like to thank Dr. Wirla Maria da Silva Cunha Tamashiro for granting the laboratory and the necessary equipment to carry out the immunological tests and to Mr. Gerson de Mello Sousa for technical support.

Abstract

The species *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (s. l.), popularly known as “dog tick”, has deserved special attention worldwide, once it is the main vector of several pathogens, affecting human beings and other animals as well. These pathogenic agents benefit from the anticoagulant, antiplatelet, anti-inflammatory and immunomodulatory action of the compounds present in the tick saliva in order to penetrate the host organism. The nitric oxide (NO) secretion is considered a regulatory factor of great importance in the processes of inflammation, apoptosis and immune system modulation. Thus, the present study evaluated the *in vitro* activity of *R. sanguineus* s. l. female 2-day salivary gland extract on the immune-inflammatory system cells, specifically on the macrophage-derived J774 cell line, with and without lipopolysaccharide (LPS) stimulation. The cultures were evaluated to check possible morphological alterations caused by the exposure to the extract. The extract showed no cytotoxic action at the concentrations tested nor inhibited the NO secretory response in the non-LPS-stimulated cells. On the other hand, the extract presented modulatory action in the cultures of LPS-stimulated cells particularly at the concentration of 0.1 µg/mL, possibly by the regulation of macrophage activation pathways and a significant decrease in NO secretion, corroborating the literature, which confirms its modulatory potential. Therefore, these results can contribute with further studies on the role of salivary gland extracts of *R. sanguineus* s. l. females in the modulation of immune-inflammatory system cells.

Keywords: ticks, nitric oxide, saliva

1. INTRODUCTION

Ticks are obligatory hematophagous ectoparasites of several organisms, including vertebrate and even other tick species (LABRUNA, 2004). These arthropods are responsible for transmitting a vast array of pathogenic agents, such as fungi, viruses and protozoa (DANTAS-TORRES, 2008).

The species *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (s. l.), popularly known as “dog tick”, has the dog as preferential host (DANTAS-TORRES, 2010); however, the species has been reported to parasite other mammals, including the human beings (DANTAS-TORRES, 2010). Therefore, *R. sanguineus* s. l. ticks have deserved special attention for being considered the main vector of several important pathogenic agents, such as *Ehrlichia canis*, *Babesia canis*, *Haemobartonella canis* and *Hapatozoon canis* in dogs; and *Rickettsia conorii* (Europe) and *R. rickettsii* (Arizona – USA) in human beings (BORGES et al., 2007).

The family Ixodidae, suborder Ixodida, constitutes the most economically important group. In addition to having an efficient feeding apparatus, their salivary glands constitute a vital tool for their biological success, synthesizing and releasing substances for the processes of fixation and feeding (BINNINGTON, 1978; SONENSHINE; ROE, 2014a). Physiologically, the salivary glands are responsible for the production of the saliva, a complex mixture with the function of mediating and modulating the hemostatic, inflammatory and immunological responses of the host by enhancing blood flow in the region of the feeding lesion, inoculating anticoagulants and inhibiting the inflammatory process (SAUER; ESSENBERG; BOWMAN, 2000; SONENSHINE; ROE, 2014a). It is known that the saliva of *R. sanguineus* s. l. expresses particular variations when different stages of the feeding process are considered, namely the beginning (2 days), the middle (4 days) and the end (6 days) of the secretory cycle (CAMARGO-MATHIAS; FURQUIM, 2013).

Ticks have a potent arsenal of bioactive molecules with anticoagulant, antiplatelet and immunomodulatory functions to overcome the host biological response and ensure the success of their blood meal, namely glyco- and lipoprotein, calreticulin, acid phosphatase, esterase, aminopeptidase, metalloproteinase, lipocalin and prostaglandin, among others (ABREU et al., 2014; BROSSARD; WIKEL, 2004; DANTAS-TORRES, 2010; OLIVEIRA et al., 2011; STEEN et al., 2006). These bioactive molecules have the potential to inhibit the action of the neutrophils (including their oxidative and phagocytic activities) (RIBEIRO et al., 1990); affect the proliferation of lymphocytes (KOPECKY et al., 1999); inhibit the activity of “natural killer” (NK) cells (KUBES et al., 1994); prevent the development of the primary humoral response mediated by isotype IgM antibodies IgM (FIVAZ, 1989; WIKEL, 1985) and decrease macrophage oxidative activity (KUTHEJLOVA et al., 2001).

Macrophages are phagocytic cells of the innate immunity and represent the first defense line against the entrance of pathogens into the organism. Once they are activated by unspecific mechanisms, they are able to produce several types of cytokines, as the interleukins IL-1, IL-6, IL-12, which interact with the receptors of other immune system cells (WAKO; DENG, 2004), and synthesize potent microbicide substances, such as proteolytic enzymes and the nitric oxide (NO) (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015), the latter considered a regulatory molecule of great importance in the processes of inflammation, apoptosis and immune system modulation (TOLEDO et al., 2012).

This phagocytic cells can be easily activated by a vast array of compounds, and the lipopolysaccharide (LPS), an endotoxin extracted from the cell wall of Gram-negative

bacteria is the most widely used (KOH et al., 2009). The LPS stimulates the inflammatory response of histiocyte cells by the classical pathway (macrophage activation), releasing NO and proinflammatory cytokines (IL1, IL6 and TNF- α) (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

The J774 cell line, originally isolated from mice reticulum cell sarcoma (currently named histiocyte sarcoma), has been widely used in *in vitro* studies on macrophage physiology and immunology, once it produces agents that are able to enhance the immunological response, such as cytokine, NO, and prostaglandin (JUSTO et al., 2015; WAKO; DENG, 2004). For these particular characteristics, this cell line represents an excellent biological model for studies on the immunomodulatory effects of the extract obtained from the salivary glands of *R. sanguineus* s.l. females.

Considering all these data, the ongoing search for sustainable strategies to control ticks (including the development of vaccines to trigger host immune response), and the increasing concern with the sanitary and economical losses caused by these ectoparasites, the present study evaluated the effects of salivary gland extracts obtained from 2-day fed *R. sanguineus* s.l. females at the concentrations of 2, 1, 0.5, 0.1 and 0.05 $\mu\text{g/mL}$ on J774 cells, with and without LPS stimulation. The concentrations were determined through a pilot assay. The study had the objective to detect possible alterations in morphology and NO secretion following exposure to the salivary gland extract.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Obtaining salivary glands and SGE2 extracts

To perform this study, salivary glands of 122 adults *R. sanguineus* l.s. females were subjected to infestation on Grupo Genético de Botucatu rabbit hosts, following Bechara et al. (1995) protocol, and collected after 2 days of feeding. These ticks were obtained from colonies kept by “Brazilian Central of Studies on Ticks Morphology” (BCSTM) in the Animal Facilities of the Department of Biology, UNESP, campus Rio Claro, SP, Brazil, and maintained under controlled conditions (28°C, 80% humidity, 14h photoperiod) in BOD incubator.

Females feeding since 2 days after prior infestation were removed from the hosts using circular movements with surgical forceps in the hypostome region. Then, these specimens were placed in Petri dishes containing saline solution for dissection (7.5 g de NaCl, 2.38 g de Na_2HPO_4 , 2.72 g de KH_2PO_4 and 1000 mL of distilled water) to remove the salivary glands. All procedures used in this study were performed in accordance with the Ethics

Committee for Animal Experimentation (CEUA/UNESP), Rio Claro, SP, Brazil, protocol number 35/2015.

The salivary glands were placed into microcentrifuge tubes containing 200 μ L of phosphate buffer, pH 7.4, macerated and centrifuged for 15 minutes at 8000xg. Within the pre-sterile vertical laminar flow chamber, the supernatants were filtered with the aid of 0.22 μ m and 13 mm diameter sterile filter units (JBR610303 disposable filter unit, Millex GV Durapore PVDF membrane, Millipore, MilliUni) attached to hypodermic syringes. Then, a protein dosage with the 2-day salivary gland extracts (SGE2) was performed, according Sedmark and Grossberg (1977) protocol (Bradford method).

The SGE2 extracts were diluted with sodium phosphate buffer, pH 7.4, to obtain concentrations of 2, 1, 0.5, 0.1 and 0.05 μ g/mL and stored at -80°C until further use.

2.2. Cell culture and addition of stimuli

The J774 cell line (ATCC) was cultured until semi-confluence in RPMI 1640 medium supplemented with 25 mM of HEPES (2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid), 2 g/L of Sodium hydrogen carbonate, 2 μ L/L of 2-Me and 10% fetal bovine serum (complete medium), in a humidified incubator at a 5 % CO₂ and 37°C.

After cultivation for a minimum period of 14 days in cell culture flasks, the J774 cells were counted using a Neubauer chamber and their concentration were adjusted to 1×10^6 cells/mL with RPMI complete medium. Next, the cells were seeded at a density of 2×10^5 cells/well in two 96-well plates to perform the bioassays in the absence (2×10^5 cells/well; 190 μ L/well) or presence (2×10^5 cells/well; 180 μ L/well) of lipopolysaccharide (LPS). Cells were incubated for 24 h under sterile conditions in humidified incubator at a 5 % CO₂ and 37°C. Dead cells and debris were removed by washing with RPMI medium.

For the assay in the absence of LPS, 10 μ L/well of SGE2 at the concentrations of 0.05, 0.1, 0.5, 1 and 2 μ g/mL were added to a first plate to analyze the extract influence on the non-stimulated cells. Following, 10 μ L/well of LPS (diluted with RPMI medium) and 10 μ L/well of SGE2 at the concentrations of 0.1, 0.1, 0.5, 1 and 2 μ g/mL were added to a second plate to verify the *in vitro* modulatory effects of the extracts on the J774 cells under inflammatory conditions (presence of LPS). Wells without SGE2 were used for the control groups.

The plates were incubated under controlled conditions (at a 5 % CO₂ and 37°C) for 24 h before being used for the viability and NO assays. All experiments were performed in quadruplicates.

2.3. Cell viability (MTT assay)

To verify the cell viability under the SGE2 and the LPS influence, after 24 h incubation, 10 μ L of 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT reagent) were added to the J774 cells maintained as previously described in section 2.2. and incubated for 4 h.

Next, the formazan crystals formed by MTT reduction by living cells were dissolved in 100 μ L of 5% Sodium dodecyl sulfate (SDS) in 0.01N HCl solution and the plate were incubated for a further 24 h. After incubation, the optical density was measured using a Multiskan MS microplate reader at 540 nm.

2.4. Measurement of nitric oxide (NO) secretion

Nitric oxide (NO) released by J774 cells was determined using a quantitative colorimetric assay based on Griess reaction (GRIESS; BEMERKUNGEN, 1879).

In 96-wells plate, 50 μ L of the cell culture supernatants collected before being used for the MTT assay were incubated with 50 μ L of Griess reagent (1 % sulfanilamide, 0.1 % N-(1-naphthylethylenediamine) dihydrochloride and 2.5 % ortho-phosphoric acid). After 10 minutes at room temperature, the optical density was measured using Multiskan MS microplate reader at 540 nm. NO concentrations (μ M nitrite/ 1×10^6 cells) were calculated by comparison to a standard curve obtained with sodium nitrite stock solutions.

2.5. Morphological analysis of LPS – stimulated J774 cells

To verify possible alterations in J774 cells morphology by the influence of SGE2 and LPS stimuli, a Harris' hematoxilin and aqueous eosin technique was performed and adapted from Junqueira and Junqueira (1983) histological protocol.

The J774 cells were seeded at a density of 1×10^6 cells/well (500 μ L/well) in 24-well plate containing a round coverslip on each well and incubated for 24 h. Following, 50 μ L of LPS and 50 μ L of SGE2 at the concentrations of 0.1, 0.5, 1 and 2 μ g/mL were added to the adherent cells. Wells without SGE2 were used for the control groups.

After a further 24 h incubation, the supernatants were discarded, replaced by 300 μ L of 4% paraformaldehyde (fixative) and the plate was stored for 2 h at 8°C. Next, the fixative was discarded and 300 μ L of phosphate buffer solution, pH 7.2, was added. After 24 h, the round coverslips containing adherent cells were dehydrated in graded ethanol series at 70, 80, 90 and 95% (10 min each bath) and stained with Harris' hematoxilin for 1 min. Next, the

round coverslips were washed in distilled water, stained with aqueous eosin for 30 sec and washed again in distilled water.

The stained round coverslips were allowed to air dry, covered with etelan and mounted on glass slides. The permanent slides were analyzed and photo documented using bright field light microscope LEICA DM750.

3. RESULTS

3.1 Cell viability and production of nitric oxide (NO) in J774 macrophages without inflammatory stimulation

Five concentrations of the 2-day salivary gland extract (**SGE2**) were tested (0.05, 0.1, 0.5, 1 and 2 $\mu\text{g/mL}$) on non-LPS-stimulated J774 cells to evaluate cytotoxic effect and determine the concentrations to be used in the experiment.

The statistical analysis of the cell viability evaluation using MTT test revealed that none of the **SGE2** concentrations was able to affect cell viability. The values ranged from 91.3% of viable cells for the highest concentration (2 $\mu\text{g/mL}$) to 98.5% for the lowest (0.05 $\mu\text{g/mL}$) (**Fig. 1A**), suggesting that the extract at the concentrations initially tested does not present significant cytotoxic effect on J774 cells.

The evaluation of nitric oxide production provided similar values for NO secretion in the five concentrations tested: 29.6 μM of NO for the highest concentration of the extract (2 $\mu\text{g/mL}$) and 27.8 μM for the lowest one (0.05 $\mu\text{g/mL}$) (**Fig. 1A**); i.e., the **SGE2** did not have the potential to induce or reduce inflammation on the J774 cells tested. The results are summarized in **Table 1**.

3.2. Cell viability and production of nitric oxide (NO) in LPS-stimulated J774 macrophages

For the analysis of the *in vitro* immunomodulatory effect of the 2-day salivary gland extract, J774 cells were stimulated with LPS, an endotoxin extracted from the cell wall of Gram-negative bacteria with the capacity of activating macrophages by inducing inflammatory mediators. After LPS stimulation, the cells were exposed to the **SGE2** concentrations (0.1, 0.5, 1 and 2 $\mu\text{g/mL}$).

The cell viability test (MTT) applied on the cells exposed to different concentrations of the extract + LPS revealed viability values between 100.4% (2 $\mu\text{g/mL}$) and 104.1% (0.1 $\mu\text{g/mL}$) (**Fig. 1B**). Therefore, compared with the control group (non-LPS-stimulated), the **SGE2** concentrations tested did not induce cell death at statistically significant levels. A

second control group comprising only J774 cells + LPS was used to evaluate the cytotoxic potential of the lipopolysaccharide compound, once it is an endotoxin, able to induce cell death at specific concentrations. The results revealed that the addition of LPS did not affect cell viability, with a rate of 99.5% (**Fig. 1B**).

The NO production was drastically increased under LPS stimulation in comparison with the control group cultures using only J774 cells. The secretion value tripled, i.e., the control wells presented a level of 23.8 μM , while a value of 65.1 μM was found for the wells containing cells + LPS (**Fig. 1B**).

Consequently, and contrarily to what was observed in item 4.1 (assays using non-LPS-stimulated cells), all the **SGE2** concentrations were able to inhibit the nitric oxide secretion synthesized by the activated macrophages, which proves the immunomodulatory potential of the 2-day extract. This result was especially evident in the lowest concentration (0.1 $\mu\text{g/mL}$), where the concentration of NO was of 11.5 μM (**Fig. 1B**), i.e., the nitric oxide released in the supernatant of the cells J774 + LPS + 0.1 $\mu\text{g/mL}$ **SGE2** was approximately 80 times lower than the one reported for the cells J774 + LPS. In the other **SGE2** concentrations, 2, 1 and 0.5 $\mu\text{g/mL}$, NO secretion was significantly inhibited in comparison with the wells containing cells J774 + LPS, reporting values of 26.5 μM , 26.4 μM and 18.5 μM of NO, respectively. (**Fig. 1B**). The results are summarized in **Table 2**.

3.3. Morphological analysis of LPS-stimulated J774 cells

3.3.1 Group I (Control without LPS stimulation)

The morphological analysis of the J774 cells belonging to the control group without LPS stimulation (**Fig. 2 B1-4**) revealed the same characteristics reported in the literature (AFFOLTER; MOORE, 2002; GROSS et al., 2006; GOLDSCHMIDT; HENDRICK, 2008; RASKIN; MEYER, 2011) for histiocytic sarcoma neoplastic cells.

Considering that this cell line was isolated from histiocytic sarcoma, i.e., a neoplasm associated with macrophages and/or dendritic cells, its main characteristics are summarized as follows: a) pleomorphic cells and, in this *in vitro* culture, mostly round or fusiform with cytoplasmic elongations (**Fig. 2 B1-4**); b) single and/or multiple nuclei, round, oval or reniform, usually hyperchromatic (**Fig. 2 B1-4**); c) moderate to abundant basophilic cytoplasm, with or without fine cytoplasmic granulation (**Fig. 2 B1-4**); d) anisochariosis, i.e., variation in the size of nuclei and cytoplasm (**Fig. 2 B1-4**); e) presence of giant multinucleated cells (**Fig. 2 B1**), cell atypia (**Fig. 2 B2**) and mitosis (**Fig. 2 B3-4**).

3.3.2. Group II (Control with LPS)

The histiocytic cells belonging to this group (**Fig. 2 C1-4**) showed the same main characteristics described for the previous control; however, these characteristics were enhanced due to the LPS stimulation and consequent activation of macrophages.

These J774 cells were more fusiform than the ones belonging to the previous group, with cytoplasmic elongations and moderate basophilic cytoplasm (**Fig. 2 C1-4**). Cells presented characteristics of apoptotic death, e.g., condensed and marginalized chromatin (**Fig. 2 C1-2**). Several mitosis figures were observed (**Fig. 2 C3-4**), many of which aberrant (**Fig. 2 C4**).

3.3.3. Group III (treated with 0.1 µg/mL of SGE2)

The J774 cells belonging to group III (**Fig. 2 D1-4**) were morphologically similar to those of group I (control) and showed fewer multinucleated giant cells (**Fig. 2 D1**), predominating over the fusiform mononucleated ones and even bi- or multinucleated atypic cells with eosinophilic cytoplasm (**Fig. 2 D2**). In addition, the cells displayed several mitotic figures (some of them aberrant) (**Fig. 2 D3-4**). No evidence of apoptotic death was observed.

3.4.4. Group IV (treated with 0.5 µg/mL of SGE2)

The macrophages J774 treated with the concentration of 0.5 µg/mL of SGE2 (**Fig. 2 E1-4**) showed characteristics similar to those of groups I and III: a) most cells were round or fusiform with cytoplasmic elongations (**Fig. 2 E1**); b) hyperchromatic, round or oval, nuclei (**Fig. 2 E1-2**); and c) presence of mitotic figures (**Fig. 2 E3-4**), some of them aberrant (**Fig. 2 E4**). No evidence of cell death was observed.

3.3.5. Group V (treated with 1 µg/mL of SGE2)

The cells from this treatment group (**Fig. 2 F1-4**) were mostly round or fusiform, with cytoplasmic elongations, round or oval nuclei, varied levels of hyperchromasia, and basophilic cytoplasm with moderate or abundant granular aspect (**Fig. 2 F1-2**), corroborating the characteristics showed in the control group (Group I). As in the previous treatments, the cells displayed several mitotic figures (some of them aberrant) (**Fig. 2 F3-4**) and no evidence of cell death was observed.

3.4.6. Group VI (treated with 2 µg/mL of SGE2)

The analyzes of these treated cells (**Fig 2. G1-4**) showed similar characteristics to those from the control and previous treatments groups. In addition, no evidence of apoptotic death was observed.

4. DISCUSSION

The tick saliva comprises an efficient arsenal of bioactive molecules with anticoagulant, antiplatelet, anti-inflammatory and immunomodulatory functions, which inhibit and/or impair the activity of the several cell types that constitute the immune system, in an attempt to overcome the immunological response of the hosts and ensure feeding and reproductive success. Previous studies have addressed the potential of the tick saliva in the host inflammatory response (CAMARGO-MATHIAS; FURQUIM; NUNES, 2011; KAZIMÍROVÁ; ŠTIBRÁNIOVÁ, 2013; KOTÁL et al., 2015), aiming to develop new control strategies and evaluate its antitumor action on some cell lineages (SIMONS et al., 2011; ABREU et al., 2014; SOUSA et al., 2015; CHUDZINSKI-TAVASSI et al., 2016).

However, little is known about the immunomodulatory mechanisms of the tick saliva on the hosts. Thus, the present study analyzed these mechanisms *in vitro*, exposing cells of the tumoral lineage J774 to the salivary gland extract obtained from *Rhipicephalus sanguineus* s. l. female ticks fed for 2 days (**SGE2**), aiming to evaluate the occurrence of possible morphological alterations with or without stimulation with lipopolysaccharide (LPS), and the action of the extract on the cell viability (MTT) and on the production of nitric oxide (NO) as well.

The results of the MTT assay and oxidative activity to determine viability showed that the **SGE2** did not have significant cytotoxic or NO inhibiting effects at the concentrations initially tested (0.05, 0.1, 0.5, 1 and 2 µg/mL) in the non-LPS-stimulated J774 cells. Abreu et al. (2014) performed *in vivo* studies on Walker 256 tumor induced in female Wistar rats treated with **SGE2** from *R. sanguineus* s. l, and verified that the concentrations of 0.04 µg/mL and 0.2 µg/mL significantly affected the tumor cells, as well as induced the apoptotic death of the neoplastic cells. These data indicate that the J774 macrophages studied here would be more resistant to the glandular extract components when compared with other lineages, once these cells did not present evidence of cell death when exposed to concentrations similar to those applied in the previous study.

However, when stimulated with LPS, the J774 macrophages showed relevant morphophysiological alterations. The NO secretion levels reported were very high in the cultures with cells J774 + LPS, corroborating the well-established description of the wide

macrophage activation by this compound, which occurs through classical pathway activation, where the macrophages differentiate into phenotype M1. These macrophages are known for their capacity to destroy tumor cells (*in vitro* and *in vivo*) through the same mechanisms used to eliminate infectious organisms, i.e., the secretion of a large number of proinflammatory cytokines (IL-1, IL-6, TNF- α) and reactive compounds, such as the NO, generated by an isoenzyme (nitric oxide synthase – NOS) expressed by the enzymatic catalysis of the amino acid L-arginine, an oxidative agent (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015). The enzyme NOS plays a critical role in the physiological processes and in the control of several infections, presenting antibacterial, antiparasitic, antiviral and antitumor activities, the latter when released in normal levels (THOMSEN et al., 1994; ABBAS et al., 2015).

The morphological analyses showed that the cells belonging to the control group J774 + LPS (group II), presented nuclei with condensed and/or marginalized chromatin, which indicate that these cells would be undergoing a process of apoptotic death. According to Li et al. (1991), who studied the lineage M-5076 isolated from histiocytic sarcoma, the NO plays an important role in the lysis of tumor cells. This would explain the apoptotic death evidence found in the present study for the cells belonging to group II (J774 + LPS), once this group displayed high levels of NO secretion, which could have induced proapoptotic effects.

These data also corroborate Brune (2003), who reported that, although the NOS enzyme plays a role in the organisms defense against several neoplasias, the synthesis of NO under inflammatory conditions, depending on the amount generated, would influence gene expression and contribute with the cell death by affecting apoptosis. The diversity of effects is associated with the NO concentrations generated, with the individual sensitivity of the cells and the duration of the phenomenon, creating a widely discussed paradox over the NO role in the organisms, once it can affect cell decisions over life and death, either activating or blocking apoptotic pathways (BRÜNE, 2003; THOMSEN et al., 1994)

The comparison of NO production between the LPS-stimulated cells + **SGE2** and those stimulated only with LPS showed that all the extract concentrations were able to inhibit NO production in the activated cells, confirming the immunomodulatory and anti-inflammatory potential of the 2-day extract. Similar results were found in previous studies on the inhibition of NO production by the salivary gland extract obtained from *Ixodes ricinus* in BALB/c mice peritoneal macrophages (KUTHEJLOVA et al., 2001), from *I. dammini* on LPS-stimulated macrophages (URIOSTE et al., 1994) and from *R. sanguineus* s. l. (crude saliva) on INF- γ -stimulated macrophages (FERREIRA; SILVA, 1998).

The morphological analyses of the J774 cells exposed to LPS + **SGE2** corroborate the results of the previous tests, showing that the extract was able to minimize cell damage, which occurred due to the NO release in response to LPS-induced cell activation, once the groups exposed to **SGE2** + LPS showed no evidence of cell death. Li et al. (1991) reported a high level of NO production and significant lysis in the tumor cells in co-culture of mice pulmonary endothelial cells with reticulum cell sarcoma (histiocytic sarcoma) activated by INF- γ and TNF- α . The addition of an NO inhibitor reduced tumor cell lysis and NO synthesis in 48%. The same could be applied to cells J774 treated with **SGE2** + LPS, suggesting that, in such conditions, the extract would inhibit the effects of LPS. Furthermore, the extract has modulatory action in the immune response, preventing the apoptosis induced by the presence of high NO concentrations in the extracellular space.

The mechanisms through which the tick saliva acts on the hosts have not been thoroughly clarified; however, the data presented hereby will certainly help further investigations and signalize the **SGE2**, in inflammatory conditions, has the potential to modulate the immune system, possibly by regulating one of the macrophage activation pathways (classical pathway) through the decrease of NO synthesis, an essential compound for the physiological processes and for the control of several infections. This effectively affects the host responses against the ectoparasite, exposing the organism to several infections caused by pathogens that benefit from the modulatory action of the saliva on the host immune system.

Thus, the data presented hereby corroborate the literature, confirming the capacity of the extract to minimize macrophage oxidative activity (URIESTE et al., 1994, FERREIRA; SILVA, 1998; KUTHEJLOVA et al., 2001), and signalized that further studies are needed to determinate the extract components with anti-inflammatory and immunomodulatory capacity. Such information allow the comprehension of the immunosuppressant mechanisms of the female *R. sanguineus* s. l. salivary gland compounds and can help the development of new strategies to control ticks, such as vaccines using the immunosuppressant components of the saliva, in addition to providing grounds for studies on the role of nitric oxide in the immune system.

Conflicts of Interest

The authors declare that there are no conflicts of interests.

References

Melissa Carolina Pereira

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Basic immunology: functions and disorders of the immune system**. 5th. ed. Philadelphia: Elsevier Inc., 2015.
- ABREU, M. R. DE et al. Salivary glands of female ticks *Rhipicephalus sanguineus* like a potential source of molecules with inhibitory action: *In vivo* study with Walker 256 tumor cells. **Journal of Pharmaceutical Care & Health Systems**, v. 1, n. 14, p. 121, 2014.
- AFFOLTER, V. K.; MOORE, P. F. Localized and disseminated histiocytic sarcoma of dendritic cell origin in dogs. **Veterinary pathology**, v. 39, n. 1, p. 74–83, jan. 2002.
- AMANO, F.; AKAMATSU, Y. A lipopolysaccharide (LPS)-resistant mutant isolated from a macrophagelike cell line, J774.1, exhibits an altered activated-macrophage phenotype in response to LPS. **Infection and immunity**, v. 59, n. 6, p. 2166–74, jun. 1991.
- ANHOLETO, L. A. **Ação do extrato de glândulas salivares de fêmeas do carrapato *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) sobre a inibição da proliferação de células de linhagem tumoral**. [s.l.] Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - campus de Rio Claro/SP, 2014.
- BECHARA, G. H. et al. *Rhipicephalus sanguineus* tick in Brazil: feeding and reproductive aspects under laboratorial conditions. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 4, n. 2, p. 61–66, 1995.
- BINNINGTON, K. C. Sequential changes in salivary gland structure during attachment and feeding of the cattle tick *Boophilus microplus*. **International Journal for Parasitology**, v. 8, p. 97–115, 1978.
- BORGES, L. M. F. et al. Resistência carrapaticida em larvas de *Rhipicephalus sanguineus*(Acari: Ixodidae) de Goiânia-GO, Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, v. 36, p. 87–95, 2007.
- BROSSARD, M.; WIKEL, S. K. Tick immunobiology. **Parasitology**, v. 129 Suppl, p. S161-76, 2004.
- BRÜNE, B. Nitric oxide: NO apoptosis or turning it ON? **Cell Death and Differentiation**, v. 10, n. 8, p. 864–869, ago. 2003.
- CALABRESE, E. J. Hormesis : Why It Is Important To Toxicology and Toxicologists. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 27, n. 7, p. 1451–1474, 2008.
- CAMARGO-MATHIAS, M. I. **Guia básico de morfologia interna de carrapatos ixodídeos**. São Paulo: Editora Unesp, 2013.
- 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**. New York: Nova Science Publishers, Inc., 2013. v. 5p. 167–191.
- 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.
- CAVASSANI, K. A. et al. Tick saliva inhibits differentiation, maturation and function of murine bone-marrow-derived dendritic cells. **Immunology**, v. 114, n. 2, p. 235–245, 1 fev. 2005.
- CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M. et al. Tick salivary gland as potential natural source for the discovery of promising antitumor drug candidates. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 77, p. 14–19, fev. 2016.
- COSTA, M. T. et al. Diferentes papéis do óxido nítrico com ênfase nas neoplasias. **Ciência Rural**, v. 33, n. 5, p. 967–974, 2003.
- DANTAS-TORRES, F. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): From taxonomy to control. **Veterinary Parasitology**, v. 152, p. 173–185, 2008.
- DANTAS-TORRES, F. Biology and ecology of the brown dog tick , *Rhipicephalus sanguineus*. **Parasites & Vectors**, v. 3, p. 1–11, 2010.
- DANTAS-TORRES, F. .; FIGUEREDO, L. A. .; BRANDÃO-FILHO, S. P. *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae), the brown dog tick, parasitizing humans in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, p. 64–67, 2006.
- DANTAS-TORRES, F.; OTRANTO, D. Further thoughts on the taxonomy and vector role of *Rhipicephalus sanguineus* group ticks. **Veterinary Parasitology**, v. 208, p. 9–13, 2015.
- FERREIRA, B. R.; SILVA, J. S. Saliva of *Rhipicephalus sanguineus* tick impairs T cell proliferation and IFN-gamma-induced macrophage microbicidal activity. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 64, n. 3, p. 279–93, 31 jul. 1998.
- FIVAZ, B. H. Immune suppression induced by the brown ear tick *Rhipicephalus appendiculatus* Neumann, 1901. **The Journal of Parasitology**, v. 75, n. 6, p. 946–52, dez. 1989.
- 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**, v. 109, n. 1, p. 147–162, 11 jul.

2011.

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, 2014.

GOLDSCHMIDT, M. H.; HENDRICK, M. J. Tumors of the Skin and Soft Tissues. In: MEUTEN, D. J. (Ed.). . **Tumors in Domestic Animals**. Ames, Iowa, USA: Iowa State Press, 2008. p. 45–117.

GOTOH, T. et al. Nitric oxide-induced apoptosis in RAW 264.7 macrophages is mediated by endoplasmic reticulum stress pathway involving ATF6 and CHOP. **The Journal of biological chemistry**, v. 277, n. 14, p. 12343–50, 5 abr. 2002.

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

GROSS, T. L. et al. **Skin diseases of the dog and cat: clinical and histopathologic diagnosis**. 2nd. ed. Ames, Iowa, USA: Blackwell Publishing, 2006.

GWAKISA, P. et al. Salivary gland extract of *Rhipicephalus appendiculatus* ticks inhibits in vitro transcription and secretion of cytokines and production of nitric oxide by LPS-stimulated JA-4 cells. **Veterinary Parasitology**, v. 99, n. 1, p. 53–61, 31 jul. 2001.

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**, v. 112, n. 2, p. 577–584, 15 fev. 2013.

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

JUSTO, O. R. et al. Evaluation of in vitro anti-inflammatory effects of crude ginger and rosemary extracts obtained through supercritical CO₂ extraction on macrophage and tumor cell line: the influence of vehicle type. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, p. 390, 2015.

KAZIMÍROVÁ, M.; ŠTIBRÁNIOVÁ, I. Tick salivary compounds: their role in modulation of host defences and pathogen transmission. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 3, p. 43, 2013.

KOH, E. et al. Modulation of macrophage functions by compounds isolated from *Zingiber officinale*. **Planta Medica**, v. 75, n. 02, p. 148–151, 24 fev. 2009.

KOPECKY, J.; KUTHEJLOVA, M.; PECHOVA, J. Salivary gland extract from *Ixodes*

- ricinus* ticks inhibits production of interferon-gama by the upregulation of interleukin-10. **Parasite Immunology**, v. 21, p. 351–356, 1999.
- KOTÁL, J. et al. Modulation of host immunity by tick saliva. **Journal of proteomics**, v. 128, p. 58–68, 14 out. 2015.
- KUBES, M. et al. Salivary gland extracts of partially fed *Dermacentor reticulatus* ticks decrease natural killer cell activity in vitro. **Immunology**, v. 82, p. 113–116, 1994.
- KUTHEJLOVA, M. et al. Salivary gland extract inhibits killing of *Borrelia afzelli* spirochetes by mouse macrophages. **Infection and Immunity**, v. 69, p. 575–578, 2001.
- KUTHEJLOVÁ, M. et al. Tick salivary gland extract inhibits killing of *Borrelia afzelii* spirochetes by mouse macrophages. **Infection and immunity**, v. 69, n. 1, p. 575–8, jan. 2001.
- LABRUNA, M. B. Biologia-ecologia de *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). **Rev. Bras. Parasitol.Vet**, v. 13, n. 1, p. 123–124, 2004.
- LI, L. et al. Role of Nitric Oxide in Lysis of Tumor Cells by Cytokine-activated Endothelial Cells'. **Cancer Research**, v. 51, p. 2531–2535, 1991.
- OLIVEIRA, C. J. F. et al. Deconstructing tick saliva: non-protein molecules with potent immunomodulatory properties. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 13, p. 10960–9, 1 abr. 2011.
- RASKIN, R. E.; MEYER, D. J. **Citologia clínica de cães e gatos: Atlas colorido e guia de interpretação**. 2nd ed. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.
- RIBEIRO, J. M. C.; WEISS, J. J.; TELFORD, S. R. Saliva of the tick *Ixodes dammini* inhibits neutrophil function. **Experimental Parasitology**, v. 70, p. 382–388, 1990.
- ROCHA, F. A. **Efeitos *in vitro* e *in vivo* do extrato de glândulas salivares de fêmeas de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* com 2 dias de alimentação sobre modelos tumorais**. [s.l.] UNESP, 2014.
- SANCHES, G. S. et al. Molecular , biological , and morphometric comparisons between different geographical populations of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari : Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 215, p. 78–87, 2016.
- SAUER, J. R. et al. Tick salivary gland physiology. **Annual Review of Entomology**, v. 40, p. 245–267, 1995.
- SAUER, J. R.; ESSENBERG, R. C.; BOWMAN, A. S. Salivary glands in ixodid ticks: control and mechanism of secretion. **Journal of Insect Physiology**, v. 46, n. 7, p. 1069–1078, 1 jul. 2000.
- SEDMAK, J. J.; GROSSBERG, S. E. A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using

-
- Coomassie brilliant blue G250. **Analytical biochemistry**, v. 79, n. 1–2, p. 544–52, 1 maio 1977.
- ŠIMO, L. et al. The Essential Role of Tick Salivary Glands and Saliva in Tick Feeding and Pathogen Transmission. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 7, p. 281, 2017.
- SIMONS, S. M. et al. The action of *Amblyomma cajennense* tick saliva in compounds of the hemostatic system and cytotoxicity in tumor cell lines. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 65, n. 6, p. 443–450, set. 2011.
- SONENSHINE, D. E.; ROE, R. M. **Biology of ticks (vol. 1)**. vol. 1 ed. New York: Oxford University Press, 2014a.
- SONENSHINE, D. E.; ROE, R. M. **Biology of ticks (vol. 2)**. vol. 2 ed. New York: Oxford University Press, 2014b.
- SOUSA, A. C. P. et al. Exploring the anti-tumoral effects of tick saliva and derived components. **Toxicon**, v. 102, p. 69–73, ago. 2015.
- SOUTHAM, C. M.; ERLICH, J. Effects of extracts of western red-cedar heartwood on certain wood-decaying fungi in culture. **Phytopathology**, v. 33, p. 517–524, 1943.
- STEEN, N. A.; BARKER, S. C.; ALEWOOD, P. F. Proteins in the saliva of the Ixodida (ticks): pharmacological features and biological significance. **Toxicon**, v. 47, n. 1, p. 1–20, jan. 2006.
- THOMSEN, L. L. et al. Nitric oxide synthase activity in human gynecological cancer. **Cancer Research**, v. 54, n. 5, p. 1352–1354, 1994.
- TOLEDO, C. E. P. et al. Cellular viability and nitric oxide (NO) production by J774 macrophages in the presence of orthodontic archwires. **Journal of Biomedical Science and Engineering**, v. 5, p. 255–262, 2012.
- URIOSTE, S. et al. Saliva of the Lyme disease vector, *Ixodes dammini*, blocks cell activation by a nonprostaglandin E2-dependent mechanism. **The Journal of experimental medicine**, v. 180, n. 3, p. 1077–85, 1 set. 1994.
- WAKO, H.; DENG, H. Chinese Medicine and Immunity. In: YAMAGUCHI, N.; COOPER, E. . (Eds.). . **Complementary and alternative approaches to biomedicine**. New York: Springer US, 2004. p. 167–169.
- 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**, v. 15, n. 1, p. 81–100, 1985.

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

WIKEL, S. K. Effects of tick infestation on the plaque-forming cell response to a thymic dependent antigen. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 79, n. 2, p. 195–8, abr. 1985.

XAUS, J. et al. LPS induces apoptosis in macrophages mostly through the autocrine production of TNF- α . **Blood**, v. 95, p. 3823–3831, 2000.

Table 1 Results obtained from cell viability and nitric oxid secretion assays on J774 culture cell line non-stimulated by LPS and exposed to different concentrations of salivary glands extract from 2-day fed *Rhipicephalus sanguineus* s. l. female ticks.

	Control (J774)	2 µg/mL	1 µg/mL	0,5 µg/mL	0,1 µg/mL	0,05 µg/mL
Cell viability (%)	113,5	91,3	94,5	94,4	96,1	98,5
Oxid nitric secretion (µM)	26,2	29,6	27,2	27,4	28,1	27,8

All values represent means $\pm$ SEM (Standart Error of the Mean) of data obtained from quadruplicates.

Table 2 Results obtained from cell viability and nitric oxid secretion assays on J774 culture cell line stimulated by LPS and exposed to different concentrations of salivary glands extract from 2-day fed *R. sanguineus* s. l. female ticks

	Control (J774)	(J774 + LPS)	2 µg/mL	1 µg/mL	0,5 µg/mL	0,1 µg/mL
Cell viability (%)	103,4	99,5	100,4	101,4	103,3	104,1
Oxid nitric secretion (µM)	23,8*	65,1	26,5*	26,4*	18,5*	11,5*

All values represent means $\pm$ SEM (Standart Error of the Mean) of data obtained from quadruplicates.

(*) P < 0.05 compared to J774 + LPS.

Fig. 1 Results obtained from cell viability and nitric oxid secretion assays on J774 culture cell line stimulated and non-stimulated by LPS and exposed to different concentrations of salivary glands extract from 2-day fed *Rhipicephalus sanguineus* s. l. female ticks (**SGE2**). **(A)**: LPS non-stimulated cells treated with 0.05, 0.1, 0.5, 1 and 2 µg/mL of **SGE2**. **(B)**: LPS-stimulated cells treated with 0.1, 0.5, 1 and 2 µg/mL of **SGE2**. Cell viability was determined by MTT assay. The amount of NO released by J774 cells is expressed as nitrite. The columns represent the means $\pm$ SEM (Standart Error of the Mean) of data obtained from quadruplicate tests. (*) Indicates data statistically significantly different ($p < 0.05$) in comparison with J774+LPS group (**SGE2** no-treated cells)

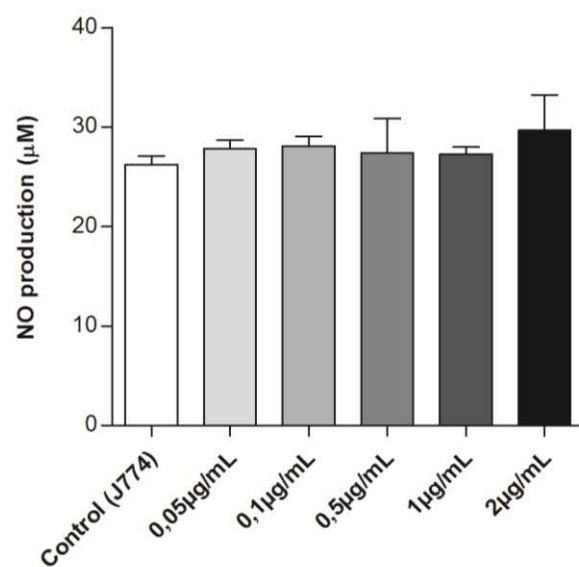
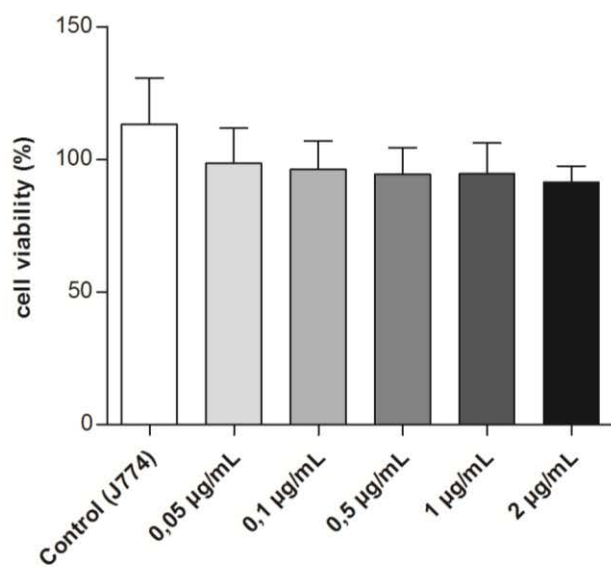
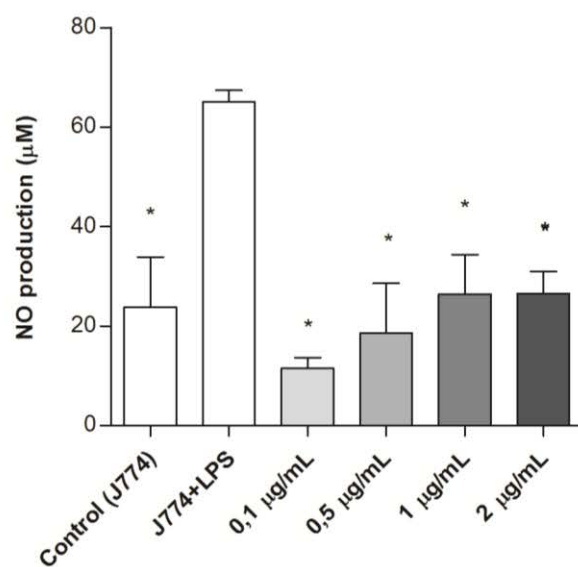
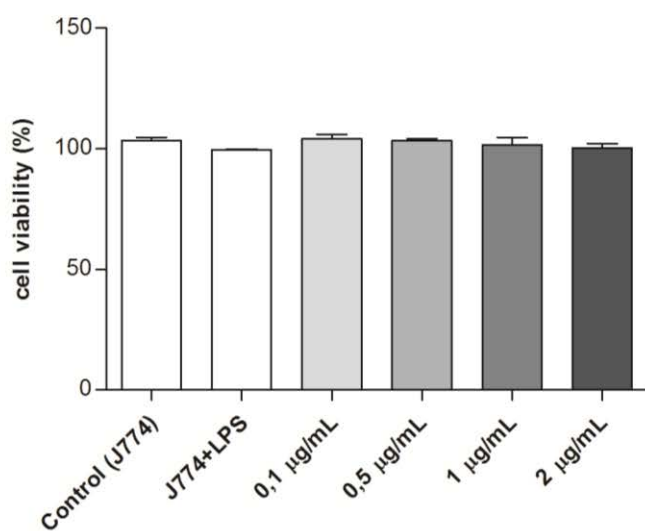
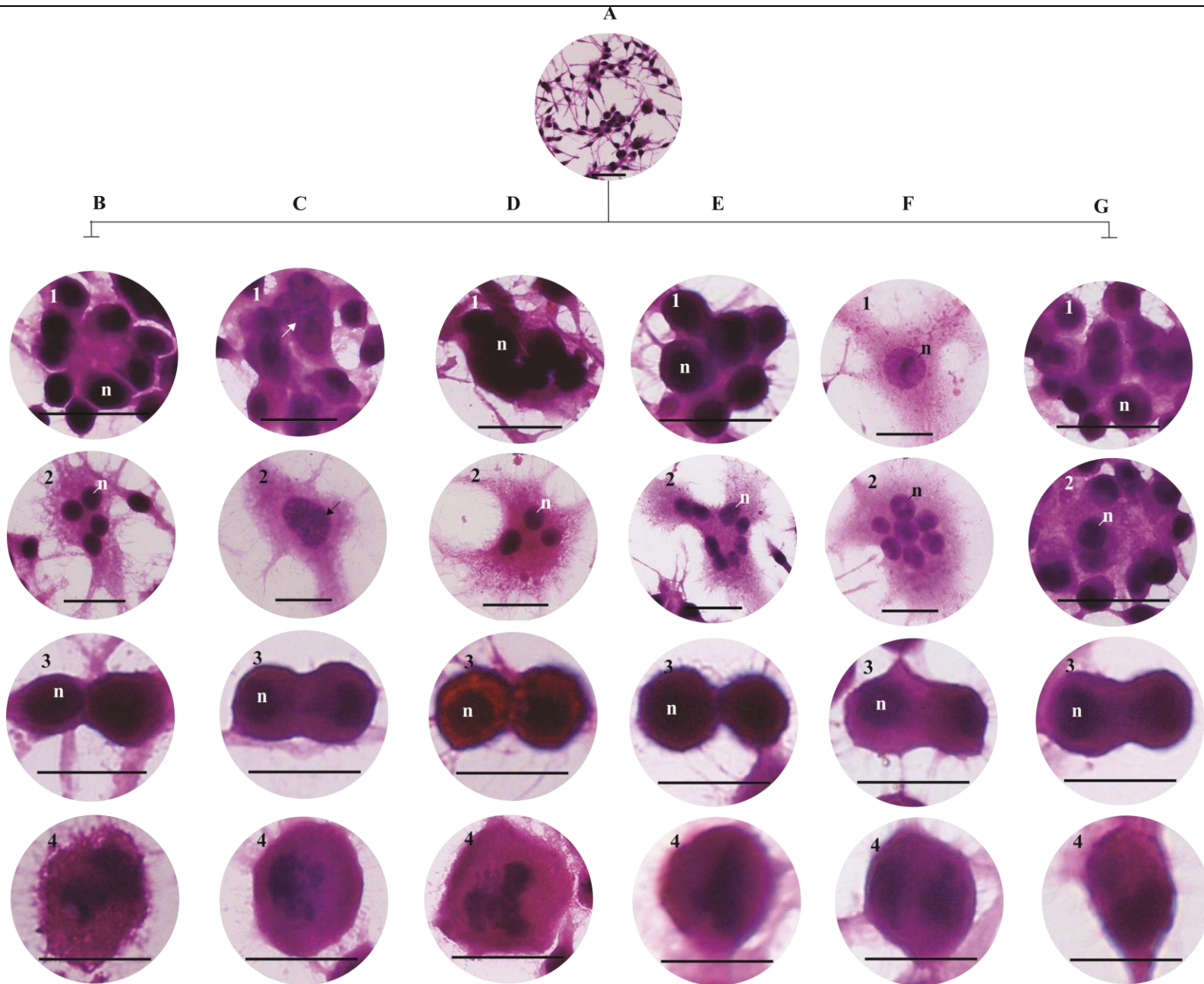
A**B**

Fig. 2 LPS-stimulated J774 cells exposed to different concentrations of 2-day salivary gland extract from *Rhipicephalus sanguineus* s. l. female ticks. Cells stained with hematoxylin and eosin technique. **A**: General view. **B**: Group I (control); Details of giant multinucleated cells (**B1**), atypic cell (**B2**), mitotic (**B3**) and aberrant-mitotic figures (**B4**). **C**: Group II (LPS control); Details of giant multinucleated cells (**C1**), atypic cell (**C2**), mitotic (**C3**) and aberrant-mitotic figures (**C4**). **D**: Group III (0,1 µg/mL); Details of giant multinucleated cells (**D1**), atypic cell (**D2**), mitotic (**D3**) and aberrant-mitotic figures (**D4**). **E**: Group IV (0,5 µg/mL); Details of giant multinucleated cells (**E1**), atypic cell (**E2**), mitotic (**E3**) and aberrant-mitotic figures (**E4**). **F**: Group V (1 µg/mL); Details of giant multinucleated cells (**F1**), atypic cell (**F2**), mitotic (**F3**) and aberrant-mitotic figures (**F4**). **G**: Group VI (2 µg/mL); Detail of giant multinucleated cells (**D1**), atypic cell (**D2**), mitotic (**D3**) and aberrant-mitotic figures (**D4**).

n: nuclei, **white arrow**: marginalized chromatin, **black arrow**: condensed chromatin

Bars (A): 50 µm; (**B1-4, C1-4, D1-4, E1-4, F1-4, G1-4**): 20 µm



CAPÍTULO 2

Ação do extrato das glândulas salivares de 4 dias de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* l. s. (Acari: Ixodidae) sobre a resposta inflamatória de células J774

Melissa Carolina Pereira¹, Elen Fernanda Nodari¹, Marina Rodrigues de Abreu¹, Patrícia Ucelli Simioni² & Maria Izabel Camargo-Mathias^{1,*}

¹Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Avenida 24 A, 1515, 13506-900 - Rio Claro, SP, Brasil

²Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes, Instituto de Biologia, Rua Monteiro Lobato, 255, CP 6109, 13083-970 – Campinas, SP, Brasil

*Autor correspondente: Tel.: +55-19-35264151, Fax: +55-19-35340009. E-mail address: micm@rc.unesp.br

Resumo

Os carrapatos são hematófagos e ectoparasitas obrigatórios que devido ao seu hábito de vida parasitário e sua alimentação por via sanguínea são vetores de diversos patógenos que se beneficiam da ação anti-inflamatória e imunossupressora presente na saliva dos carrapatos para infectarem os hospedeiros. A busca por novas estratégias de controle de carrapatos tem estimulado cada vez mais os estudos dos mecanismos pelos quais a saliva dos carrapatos age no organismo dos hospedeiros, principalmente com o objetivo de desenvolver vacinas. Assim, o presente estudo avaliou *in vitro* a ação de diferentes concentrações do extrato das glândulas salivares de fêmeas semi-ingurgitadas de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* l. s. (“carrapato do cão”) sobre a resposta inflamatória de células derivadas do sistema imune-inflamatório, especificamente a linhagem J774 derivada de macrófagos estimulada com lipopolissacarídeo. As possíveis alterações nas células foram avaliadas através da medição da produção de óxido nítrico e de técnica histológica (hematoxilina e eosina aquosa). Os resultados sinalizaram que nas culturas de células estimuladas com LPS, o extrato possui ação modulatória nas concentrações de 0.1, 0.5, 1, 2 e 4 µg/mL através da redução significativa na produção de óxido nítrico. Nas análises morfológicas, o grupo de células estimuladas com LPS e sem adição de extrato glandular apresentou características de morte apoptótica, possivelmente decorrente de estresse oxidativo, enquanto que nas células estimuladas com LPS e expostas ao extrato nas concentrações de 0.1, 0.5, 1, 2 e 4 µg/mL houve diminuição destes efeitos deletérios. Considerando estes resultados é possível concluir que a saliva produzida pelos carrapatos da espécie *R. sanguineus* l. s., demonstrado aqui com os efeitos do extrato das glândulas salivares sobre as células da linhagem J774, teria potencial para modular e suprimir o sistema imune-inflamatório dos hospedeiros.

Palavras-chave: carrapatos, saliva, linhagem J774, estresse oxidativo

1. INTRODUÇÃO

Os carrapatos são hematófagos e ectoparasitas obrigatórios de ampla distribuição geográfica e habilidade de parasitar os mais diversos grupos de animais, incluindo o homem (DANTAS-TORRES, 2010; LABRUNA, 2004; SONENSHINE; ROE, 2014b). Devido ao seu hábito de vida parasitária e sua alimentação por via sanguínea, estes ectoparasitas são conhecidos por serem vetores de diversos agentes patogênicos responsáveis por doenças tais como *Ehrlichia canis*, *Babesia bovis* e *Rickettsia rickettsii*, as quais além de causar danos severos aos animais também são responsáveis por perdas econômicas significativas,

principalmente na indústria agropecuária (DANTAS-TORRES; OTRANTO, 2015; SANCHES et al., 2016; SONENSHINE; ROE, 2014b).

Como consequência do processo de alimentação por via sanguínea, que requer que os carrapatos (especialmente as fêmeas) permaneçam fixados aos seus hospedeiros por dias ou semanas até completar o ingurgitamento, e da necessidade de modular a resposta do sistema imunológico do hospedeiro para garantir que a alimentação seja eficiente, os carrapatos inoculam a saliva, uma mistura complexa sintetizada pelas glândulas salivares e que contém um amplo arsenal de moléculas bioativas de potencial farmacológico (BINNINGTON, 1978; BROSSARD; WIKEL, 2004; CAMARGO-MATHIAS, 2013; CAMARGO-MATHIAS; FURQUIM; NUNES, 2011; KOTÁL et al., 2015; ŠIMO et al., 2017; SONENSHINE; ROE, 2014a). No caso da espécie *Rhipicephalus sanguineus* l. s. (popularmente conhecida como “carrapato do cão”) já é reportado na literatura que a saliva expressa variações particulares quando considerados o início (2 dias), o meio (4 dias) e o fim (6 dias) do seu ciclo secretor (CAMARGO-MATHIAS; FURQUIM, 2013).

Dentre estas moléculas já foram reportadas na literatura a presença de glicoproteínas e lipoproteínas, calreticulinas, fosfatases ácidas, esterases, aminopeptidases, metaloproteinases, lipocalinas e prostaglandinas, entre outras, e as quais tem ações diversas: anticoagulante, antiplaquetária, anti-inflamatória, imunomodulatória e anti-tumoral (ABREU et al., 2014; CAMARGO-MATHIAS; FURQUIM; NUNES, 2011; CHUDZINSKI-TAVASSI et al., 2016; FURQUIM et al., 2014; KOTÁL et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2011), podendo afetar a atividade de diversas células que compõe o sistema imune, incluindo macrófagos (FERREIRA; SILVA, 1998; KOPECKY; KUTHEJLOVA; PECHOVA, 1999; KUTHEJLOVA et al., 2001; URIOSTE et al., 1994).

Segundo Abbas et al. (2015), os macrófagos representam a primeira linha de defesa do organismo contra a entrada de patógenos (imunidade inata), sendo responsáveis por sintetizar potentes agentes microbicidas como enzimas proteolíticas e o óxido nítrico (NO), considerados essenciais para a regulação dos processos de inflamação e modulação do sistema imune. Os mesmos autores reportam ainda que estas células fagocitárias podem ser ativadas por uma grande diversidade de compostos através de ligações inespecíficas que estimulam a resposta inflamatória por duas vias de ativação: a clássica e a alternativa, sendo a primeira a mais frequente e na qual ocorre a liberação de NO e citocinas pró-inflamatórias (IL1, IL6 e TNF- α). Dentre os compostos capazes de realizar esta ativação clássica dos macrófagos, a endotoxina lipopolissacarídeo (LPS), extraída da parede celular de bactérias Gram-negativas,

é considerada a mais eficiente em estudos *in vitro* (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015; KOH et al., 2009).

Diante disto e considerando ainda que a busca por novas estratégias de controle de carrapatos para reduzir a dependência de acaricidas e encontrar uma alternativa que seja ambientalmente mais segura e menos provável a selecionar cepas resistentes tem estimulado cada vez mais os estudos dos mecanismos pelos quais a saliva dos carrapatos age no organismo dos hospedeiros, principalmente com o objetivo de desenvolver vacinas baseadas em componentes imunossupressores presentes na saliva (ŠIMO et al., 2017), o presente trabalho teve por objetivo avaliar *in vitro* possíveis alterações morfofisiológicas em células da linhagem J774 (derivada de macrófagos) decorrentes do estímulo com LPS e da exposição ao extrato das glândulas salivares de fêmeas de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* l. s.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1.1 Carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* lato sensu

Para este estudo foram utilizadas 100 fêmeas semi-ingurgitadas (4 dias em coelhos hospedeiros do Grupo Genético de Botucatu) de carrapatos *R. sanguineus* l. s. . Indivíduos em jejum provenientes da colônia mantida nos laboratórios da “Brazilian Central of Studies on Ticks Morphology” (BCSTM) instaladas em sala do Biotério do Instituto de Biociências da UNESP, campus de Rio Claro, SP, Brasil, foram mantidos em estufa BOD (Biological Oxygen Demand) Eletrolab EL 202 em condições controladas (29°C, 80% de umidade e fotoperíodo de 12 horas) até o momento de infestação nos coelhos hospedeiros.

Os hospedeiros não tiveram contato prévio com os ectoparasitas e foram mantidos em gaiolas de contenção em sala alocada no mesmo Biotério, onde foram alimentados com ração e água *ad libitum*.

Os procedimentos de fixação e de construção das câmaras de alimentação, e a infestação e controle dos carrapatos nestas câmaras, foram realizados segundo protocolo descrito por Bechara et al. (1995) e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA-IB-UNESP/Rio Claro), protocolo nº 35/2015.

A coleta das fêmeas no tempo exato de 4 dias de alimentação foi garantida através de observações subsequentes que ocorreram a cada 3 horas após a fixação dos carrapatos nos hospedeiros.

2.1.2. Obtenção dos extratos das glândulas salivares de 4 dias

As fêmeas com 4 dias de alimentação foram retiradas dos hospedeiros pela região do hipostômio, com auxílio de pinça cirúrgica, através de movimentos circulares. A seguir, foram posicionadas em placas de Petri contendo solução salina (7,5 g de NaCl, 2,38 g de Na_2HPO_4 , 2,72 g de KH_2PO_4 e 1000 mL de água destilada) para imediata dissecação e retirada das glândulas salivares.

Após a retirada das glândulas salivares, as mesmas foram colocadas separadamente em criotubos contendo 200 μL de tampão fosfato pH 7.4 e então maceradas. Na sequência, os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 1500 rpm, os sobrenadantes recolhidos foram depositados em eppendorfs estéreis e encaminhados para a dosagem de proteínas, segundo metodologia descrita por Sedmak & Grossberg (1977) (método de Bradford).

Após a determinação do conteúdo proteico, no interior de uma capela de fluxo laminar vertical pré-estéril, o extrato foi filtrado com auxílio de unidades filtrantes estéreis (JBR610303, unidade filtrante descartável Millex GV, membrana durapore PVDF, Millipore, MilliUni), de 0.22 μm e diâmetro de 13 mm, acopladas à seringas hipodérmicas. Depois, o extrato foi aliquotado e armazenado em criotubos estéreis em freezer a -80°C até posterior utilização.

2.1.3. Cultura celular e adição de estímulos inflamatórios

Nas dependências do Laboratório de Biologia Molecular pertencente ao Departamento de Biologia localizado no Instituto de Biociências da UNESP/Rio Claro, a linhagem de macrófagos J774 foi cultivada em meio RPMI 1640 contendo HEPES (ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-piperazin-1-il]-etanossulfônico) (25 mM) e Bicarbonato de Sódio (2g/L), 2 $\mu\text{L/L}$ de 2-Me e 10% de SFB (soro fetal bovino) até semi-confluência em estufa incubadora, em condições de cultura com 5% de CO_2 e 37°C .

Após o cultivo por período mínimo de 14 dias, as células J774 foram removidas dos frascos de cultivo com auxílio de *cell scraper* estéril, semeadas em uma densidade de 2×10^5 células/poço (180 μL /poço) em placa de 96 poços e cultivadas durante 24 horas em condições de esterilidade. Após esse período, as células não aderentes e os debris foram removidos por lavagem com meio RPMI completo.

Na placa de 96 poços contendo as células aderidas foram adicionados 10 μL de lipopolissacarídeo (LPS) diluído em meio RPMI e 10 μL de extrato das glândulas salivares de 4 dias (**EGS4**) nas diferentes concentrações propostas (0.1, 0.5, 1, 2, 4 e 8 $\mu\text{g/mL}$). Para os controles, poços de cultura com as células J774 e com as células J774 + LPS foram mantidos sem estímulo com os extratos. O ensaio foi realizado em triplicatas para cada grupo.

2.1.4 Método de determinação da concentração de óxido nítrico (NO)

A dosagem de óxido nítrico (NO) liberado nos sobrenadantes das células J774, cultivadas como descrito no item 2.1.3 foi realizada através de ensaio colorimétrico quantitativo segundo protocolo descrito por Griess e Bemerkungen (1879).

Em placa de 96 poços, alíquotas de 50 µL do sobrenadante de células (controles e expostas ao **EGS4**) foram incubados com 50 µL do reagente de Griess — composto por 1% de sulfanilamida, 0,1% de N- (1-naphthylethylenediamine) dihydrochloride e 2,5% de ácido fosfórico. Após 10 min em temperatura ambiente, a absorbância do composto foi lida em uma leitora de microplacas EZ Read 400 Research (Biochrom, Cambridge, UK) a 540 nm. Os valores foram expressos em µM de nitrito/ 1×10^6 células e calculados em comparação com os valores da curva padrão obtida com soluções estoque de nitrito de sódio. O ensaio foi realizado em triplicata para cada concentração de **EGS4**.

2.1.5 Análise morfológica (hematoxilina de Harris e eosina aquosa) das células J774 estimuladas por LPS e expostas ao EGS4

As células J774 foram semeadas em placa de 24 poços contendo lamínulas estéreis, a uma densidade de 1×10^6 células/poço (500µL/poço), e incubadas nas mesmas condições do item 2.1.3. Após 24 horas, 50 µL de LPS e 50 µL de **EGS4** nas diferentes concentrações propostas (0.1, 0.5, 1, 2, 4 e 8 µg/mL) foram adicionados a cada poço em cultura e as placas incubadas por 24 horas nas condições previamente descritas.

Após 24 horas, o sobrenadante de cultura das células foi descartado, substituído por 300 µL de fixador (paraformaldeído 4%) e a placa foi armazenada em geladeira (2 a 8° C) por 2 horas. Após esse período, o fixador foi retirado e o material foi armazenado em solução tampão fosfato-salino (PBS) pH 7,2 por 24 horas.

As lamínulas contendo células aderentes foram desidratadas em série crescente de etanol 70, 75, 80, 85, 90 e 95% por 10 minutos cada. Em seguida, as mesmas foram coradas com hematoxilina de Harris por 2 minutos, lavadas em água destilada por 30 segundos para retirada do excesso de corante e novamente coradas com eosina aquosa por 30 segundos. As lamínulas coradas, após secagem, foram montadas em lâminas em preparação permanente com Entellan® (Merck Millipore) e imediatamente fotodocumentadas em fotomicroscópio de luz de campo claro LEICA DM750.

2.1.6 Análise estatística

Os resultados obtidos com a leitura das absorvâncias das amostras (dosagem de NO) foram analisados utilizando os métodos estatísticos de Análise de Variância (*one way* ANOVA) e Teste de Tukey. Apenas diferenças de $p < 0,05$ foram consideradas significativas para todas as concentrações testadas.

3. RESULTADOS

3.1. Produção de óxido nítrico (NO)

Com o objetivo de realizar uma avaliação *in vitro* da ação imunomodulatória do extrato das glândulas salivares de 4 dias (**EGS4**), células J774 foram estimuladas com lipopolissacarídeo (LPS), conhecido por promover a liberação de mediadores inflamatórios em macrófagos ativados *in vitro*, e submetidos a diferentes concentrações de **EGS4** (8, 4, 2, 1, 0.5 e 0,1 $\mu\text{g/mL}$).

Quando analisados os sobrenadantes das células estimuladas apenas com LPS, ou seja, sem adição do extrato glandular, foi possível observar que as taxas de produção de NO dobraram em comparação ao grupo controle, elevando significativamente a secreção deste composto de 11,1 μM de nitrito nos poços contendo apenas células para 21,7 μM nos poços contendo células + LPS (**Fig. 1**).

Já para os poços contendo células estimuladas com LPS e tratadas com o **EGS4**, 5 das 6 concentrações testadas foram eficientes em diminuir significativamente a secreção de NO pelos macrófagos J774 ativados, comprovando o potencial imunomodulatório deste extrato glandular. Este resultado ficou evidente especialmente na concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$, que mostrou valores de 3,94 μM de nitrito (**Fig. 1**), tendo, portanto, sido capaz de diminuir em aproximadamente 5 vezes o NO liberado pelas células J774 para o meio extracelular em comparação ao resultado obtido das células expostas apenas ao LPS.

Dentre os grupos expostos ao **EGS4**, aquele contendo 8 $\mu\text{g/mL}$ de extrato glandular foi o único que não mostrou valores significativos registrando secreção de 18,1 μM de nitrito e, portanto, não foi efetivo em modular a ação inflamatória do LPS nas células J774.

Para melhor visualização dos resultados obtidos os mesmos encontram-se resumidos na **Tabela 1**.

3.2. Análise morfológica de macrófagos J774 estimulados com LPS e expostos ao EGS4

A aplicação das técnicas histológicas em células da linhagem J774 pertencentes do grupo controle confirmou as principais características já descritas na literatura (AFFOLTER; MOORE, 2002; GOLDSCHMIDT; HENDRICK, 2008; GROSS et al., 2006; RASKIN;

MEYER, 2011) para as mesmas e, considerando ser esta de origem macrofágica e/ou dendrítica, além de tumorais elas tem como características: a) pleomorfismo, suas formas variam entre arredondadas e fusiformes, ambas com muitos prolongamentos citoplasmáticos (**Fig. 2 A1**); b) mono ou polinucleadas, com núcleos geralmente marcados com forte intensidade (hipercromáticos) (**Fig. 2 A1**); c) abundante ou moderado citoplasma basofílico, apresentando ou não fina granulação citoplasmática; d) anisocariose, ou seja, apresentando variação entre a proporção de tamanho dos núcleos e do citoplasma; e) presença de células gigantes multinucleadas (**Fig. 2 A2**), atipia celular (**Fig. 2 A3**) e várias figuras de mitose (normal e aberrante) (**Fig. 2 A4 -A5**).

Quando analisadas as células do grupo exposto ao LPS foi observou-se que estas apresentaram todas as características descritas acima para o controle. Em sua maioria eram fusiformes com longos prolongamentos citoplasmáticos, citoplasma basofílico com fina granulação, principalmente nas células atípicas, e núcleos redondos ou ovalados, sendo que dentre estes, foi possível observar a perda de hipercromasia (**Fig. 3 B1 – B4**). As células apresentaram ainda algumas particularidades tais como condensação e marginalização da cromatina (**Fig. 3 B3**), fragmentação nuclear (**Fig. 3 B2; B4**) e núcleos irregulares, possíveis indicativos de morte celular apoptótica.

Nos grupos contendo células também estimuladas por LPS, porém, expostas posteriormente às diferentes concentrações de **EGS4** (0.1, 0.5, 1, 2, 4 e 8 µg/mL), observou-se que as células estavam com características muito semelhantes às do grupo controle, principalmente quanto à forma, ao citoplasma, a presença de mitoses e de células gigantes multinucleadas e células atípicas (**Fig. 4 C1 – C6**). Entretanto, em comparação ao grupo exposto apenas ao LPS não foram observados indicativos da ocorrência de morte celular nos grupos expostos às concentrações de 0.1, 0.5, 1, 2 e 4 µg/mL de **EGS4** (**Fig. 4 C1 – C6**), sinalizando que as características de morte por apoptose encontradas no grupo LPS seriam decorrentes do super estímulo inflamatório gerado por este composto e que, desta forma estas concentrações do **EGS4** estariam atuando na diminuição dos danos causados pela inflamação.

A concentração de 8 µg/mL, entretanto, alterou morfológicamente as células, no sentido de que as mesmas apresentaram algumas características de morte apoptótica, tais como marginalização e condensação da cromatina (**Fig. 4 C6**), sinalizando que esta concentração não foi eficiente em diminuir os danos celulares decorrentes da inflamação pelo LPS ou ainda que o próprio **EGS4** a 8 µg/mL seria pouco tóxico para estas células.

4. DISCUSSÃO

A saliva dos carrapatos é uma mistura complexa sintetizada pelas glândulas salivares e composta por um arsenal de moléculas bioativas que são essenciais para o ectoparasita driblar a resposta imunológica do hospedeiro garantindo assim que os processos de fixação, alimentação e reprodução sejam eficientes, agindo sobre as funções antiplaquetária, anti-inflamatória, anticoagulante e imunomoduladora (CAMARGO-MATHIAS; FURQUIM; NUNES, 2011; KAZIMÍROVÁ; ŠTIBRÁNIOVÁ, 2013; KOTÁL et al., 2015; ŠIMO et al., 2017).

Nesse sentido, no presente trabalho analisou-se *in vitro* os efeitos de diferentes concentrações do extrato das glândulas salivares de fêmeas de carrapatos da espécie *Rhipicephalus sanguineus* l. s. alimentadas por 4 dias (**EGS4**) sobre a linhagem J774 (derivada de macrófagos) estimulada com lipopolissacarídeo (LPS), com ênfase nas possíveis alterações morfológicas decorridas da exposição ao extrato e, ainda, na ação do **EGS4** sob condições inflamatórias em ensaio de estresse oxidativo via medição da produção de óxido nítrico (NO).

Em comparação ao grupo controle, as células J774 expostas somente ao LPS sofreram grandes alterações morfofisiológicas. Os resultados do ensaio de estresse oxidativo demonstraram que nas células J774 + LPS, os níveis de produção de NO foram muito elevados em comparação ao grupo controle, corroborando informações já estabelecidas na literatura de que este composto seria capaz de ativar macrófagos pela via clássica, em resposta a algum estímulo inflamatório, liberando uma grande quantidade de citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, TNF- α) e de compostos reativos de oxigênio, inclusive o óxido nítrico considerado o principal agente oxidativo e que é gerado via reação de catálise enzimática do aminoácido L-arginina pela isoenzima óxido nítrico sintase (iNOS) (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

Quando analisada a morfologia das células J774 + LPS foi possível observar que além das características já descritas para esta linhagem e confirmadas no grupo controle, núcleos irregulares, com cromatina condensada e/ou marginalizada, além de fragmentação nuclear foram observados em várias células sinalizando morte celular apoptótica. Brüne (2003) reportou em seu trabalho que muito embora o óxido nítrico tenha papel importante na defesa do organismo contra agentes infecciosos, sua síntese em grandes quantidades pode influenciar na expressão gênica e contribuir para a morte celular por apoptose.

Segundo dados da literatura (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015; GOTOH et al., 2002; THOMSEN et al., 1994; XAUS et al., 2000) ficou confirmada que a secreção do NO

pode atuar como um dos mediadores da apoptose durante o choque oxidativo associado aos efeitos deletérios do LPS e que a diversidade de seus efeitos no organismo está relacionada não só com a quantidade gerada, mas também com a sensibilidade individual das células e a duração da exposição. Os resultados encontrados nos ensaios de morfologia e produção de NO podem indicar, portanto, que o estresse oxidativo causado pela presença de altas quantidades de NO no meio celular induziu efeitos pró-apoptóticos nas células.

Por outro lado, ao contrário do encontrado para o grupo exposto somente ao LPS, as células que receberam o estímulo também do **EGS4** registraram níveis de secreção de NO significativamente mais baixos nas concentrações de 0.1, 0.5, 1, 2 e 4 µg/mL, confirmando o potencial imunomodulador e anti-inflamatório deste extrato. O efeito aqui apresentado do extrato de glândulas salivares de carrapatos *R. sanguineus* l. s. na diminuição das taxas de NO sintetizadas por macrófagos em condições inflamatórias, também foi reportado na literatura para o extrato de outras espécies tais como *Ixodes ricinus* (KUTHEJLOVÁ et al., 2001) e *I. dammini* (URIOSSTE et al., 1994).

Notavelmente, os resultados da morfologia também corroboraram aqueles do estresse oxidativo, uma vez que nenhuma das concentrações que foram eficientes em diminuir as altas taxas de NO estimuladas pelo LPS mostrou indício de morte celular, indicando que o **EGS4** poderia agir como um inibidor do efeito causado pelo LPS, regulando a resposta inflamatória e impedindo a lise celular.

Ao contrário das demais concentrações testadas, os resultados obtidos com o **EGS4** a 8 µg/mL não foram estatisticamente significativos para indicar sua eficiência na diminuição das taxas de NO secretadas pelas células J774. Ainda, quando analisadas morfologicamente, algumas células deste grupo apresentaram características de morte apoptótica, tais como marginalização e condensação da cromatina, sinalizando que esta concentração não minimizaria os danos decorrentes da inflamação pelo LPS ou ainda, que o extrato nesta concentração já seria tóxico para as células. Entretanto, estudos que tratem das avaliações sobre a toxicidade do **EGS4** ainda são escassos na literatura e para que estas hipóteses se confirmem há a necessidade da realização de outros estudos.

Desta forma os resultados, embora preliminares e que estão sendo aqui apresentados já indicam que os mesmos poderão auxiliar na compreensão de um dos possíveis mecanismos de ação da saliva produzida pelos carrapatos da espécie *R. sanguineus* l. s., demonstrado aqui com os efeitos do **EGS4** sobre as células da linhagem J774, e que esta saliva teria potencial para modular e suprimir o sistema imune-inflamatório dos hospedeiros, muito provavelmente

atuando via regulação da secreção de óxido nítrico durante a ativação clássica de macrófagos. Esta ação modulatória comprometeria a capacidade do hospedeiro de responder de maneira eficaz contra os ectoparasitas, uma vez que a contaminação por agentes patogênicos seria favorecida pela ação imunossupressora da saliva do carrapato quando no sistema imune do hospedeiro, expondo-o à diversas infecções e contribuindo para o aumento na disseminação de doenças que podem afetar outros animais, incluindo o homem.

Conflitos de interesse

Os autores declaram que não existem conflitos de interesse.

Agradecimentos

Os autores são gratos a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Processos nº 2015/20745-6; 2014/02843-8; 2013/20258-2) e CNPq (Processo nº 300625/2012-0) pelo suporte financeiro.

Os autores gostariam de agradecer ainda à Profa. Dra. Wirla Maria da Silva Cunha Tamashiro, por ceder o espaço físico (Laboratório de Inflamação e Imunologia Celular (LIIC), Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes da UNICAMP – Campinas/SP) e os equipamentos necessários para as análises imunológicas, e ao Sr. Gerson de Mello Souza pelo apoio técnico.

Referências

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Basic immunology: functions and disorders of the immune system**. 5th. ed. Philadelphia: Elsevier Inc., 2015.
- ABREU, M. R. DE et al. Salivary glands of female ticks *Rhipicephalus sanguineus* like a potential source of molecules with inhibitory action: *In vivo* study with Walker 256 tumor cells. **Journal of Pharmaceutical Care & Health Systems**, v. 1, n. 14, p. 121, 2014.
- AFFOLTER, V. K.; MOORE, P. F. Localized and disseminated histiocytic sarcoma of dendritic cell origin in dogs. **Veterinary pathology**, v. 39, n. 1, p. 74–83, jan. 2002.
- AMANO, F.; AKAMATSU, Y. A lipopolysaccharide (LPS)-resistant mutant isolated from a macrophagelike cell line, J774.1, exhibits an altered activated-macrophage phenotype in response to LPS. **Infection and immunity**, v. 59, n. 6, p. 2166–74, jun. 1991.
- ANHOLETO, L. A. **Ação do extrato de glândulas salivares de fêmeas do carrapato *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) sobre a inibição da proliferação de células de linhagem tumoral**. [s.l.] Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - campus de Rio Claro/SP, 2014.

- BECHARA, G. H. et al. *Rhipicephalus sanguineus* tick in Brazil: feeding and reproductive aspects under laboratorial conditions. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 4, n. 2, p. 61–66, 1995.
- BINNINGTON, K. C. Sequential changes in salivary gland structure during attachment and feeding of the cattle tick *Boophilus microplus*. **International Journal for Parasitology**, v. 8, p. 97–115, 1978.
- BORGES, L. M. F. et al. Resistência carrapaticida em larvas de *Rhipicephalus sanguineus*(Acari: Ixodidae) de Goiânia-GO, Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, v. 36, p. 87–95, 2007.
- BROSSARD, M.; WIKEL, S. K. Tick immunobiology. **Parasitology**, v. 129 Suppl, p. S161–76, 2004.
- BRÜNE, B. Nitric oxide: NO apoptosis or turning it ON? **Cell Death and Differentiation**, v. 10, n. 8, p. 864–869, ago. 2003.
- CALABRESE, E. J. Hormesis : Why It Is Important To Toxicology and Toxicologists. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 27, n. 7, p. 1451–1474, 2008.
- CAMARGO-MATHIAS, M. I. **Guia básico de morfologia interna de carrapatos ixodídeos**. São Paulo: Editora Unesp, 2013.
- 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**. New York: Nova Science Publishers, Inc., 2013. v. 5p. 167–191.
- 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.
- CAVASSANI, K. A. et al. Tick saliva inhibits differentiation, maturation and function of murine bone-marrow-derived dendritic cells. **Immunology**, v. 114, n. 2, p. 235–245, 1 fev. 2005.
- CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M. et al. Tick salivary gland as potential natural source for the discovery of promising antitumor drug candidates. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 77, p. 14–19, fev. 2016.
- COSTA, M. T. et al. Diferentes papéis do óxido nítrico com ênfase nas neoplasias. **Ciência Rural**, v. 33, n. 5, p. 967–974, 2003.

- DANTAS-TORRES, F. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): From taxonomy to control. **Veterinary Parasitology**, v. 152, p. 173–185, 2008.
- DANTAS-TORRES, F. Biology and ecology of the brown dog tick , *Rhipicephalus sanguineus*. **Parasites & Vectors**, v. 3, p. 1–11, 2010.
- DANTAS-TORRES, F. .; FIGUEREDO, L. A. .; BRANDÃO-FILHO, S. P. *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae), the brown dog tick, parasitizing humans in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, p. 64–67, 2006.
- DANTAS-TORRES, F.; OTRANTO, D. Further thoughts on the taxonomy and vector role of *Rhipicephalus sanguineus* group ticks. **Veterinary Parasitology**, v. 208, p. 9–13, 2015.
- FERREIRA, B. R.; SILVA, J. S. Saliva of *Rhipicephalus sanguineus* tick impairs T cell proliferation and IFN-gamma-induced macrophage microbicidal activity. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 64, n. 3, p. 279–93, 31 jul. 1998.
- FIVAZ, B. H. Immune suppression induced by the brown ear tick *Rhipicephalus appendiculatus* Neumann, 1901. **The Journal of Parasitology**, v. 75, n. 6, p. 946–52, dez. 1989.
- 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**, v. 109, n. 1, p. 147–162, 11 jul. 2011.
- 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, 2014.
- GOLDSCHMIDT, M. H.; HENDRICK, M. J. Tumors of the Skin and Soft Tissues. In: MEUTEN, D. J. (Ed.). . **Tumors in Domestic Animals**. Ames, Iowa, USA: Iowa State Press, 2008. p. 45–117.
- GOTOH, T. et al. Nitric oxide-induced apoptosis in RAW 264.7 macrophages is mediated by endoplasmic reticulum stress pathway involving ATF6 and CHOP. **The Journal of biological chemistry**, v. 277, n. 14, p. 12343–50, 5 abr. 2002.
- GRIESS, J. P.; BEMERKUNGEN, Z. A. H. H. Über einige Azoverbindungen. **Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft**, v. 12, p. 426–428, 1879.
- GROSS, T. L. et al. **Skin diseases of the dog and cat: clinical and histopathologic diagnosis**. 2nd. ed. Ames, Iowa, USA: Blackwell Publishing, 2006.

- GWAKISA, P. et al. Salivary gland extract of *Rhipicephalus appendiculatus* ticks inhibits in vitro transcription and secretion of cytokines and production of nitric oxide by LPS-stimulated JA-4 cells. **Veterinary Parasitology**, v. 99, n. 1, p. 53–61, 31 jul. 2001.
- 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**, v. 112, n. 2, p. 577–584, 15 fev. 2013.
- JUNQUEIRA, L. C. U.; JUNQUEIRA, L. M. M. S. **Técnicas básicas de citologia e histologia**. São Paulo: Livraria Editora Santos, 1983.
- JUSTO, O. R. et al. Evaluation of in vitro anti-inflammatory effects of crude ginger and rosemary extracts obtained through supercritical CO₂ extraction on macrophage and tumor cell line: the influence of vehicle type. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, p. 390, 2015.
- KAZIMÍROVÁ, M.; ŠTIBRÁNIOVÁ, I. Tick salivary compounds: their role in modulation of host defences and pathogen transmission. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 3, p. 43, 2013.
- KOH, E. et al. Modulation of macrophage functions by compounds isolated from *Zingiber officinale*. **Planta Medica**, v. 75, n. 02, p. 148–151, 24 fev. 2009.
- KOPECKY, J.; KUTHEJLOVA, M.; PECHOVA, J. Salivary gland extract from *Ixodes ricinus* ticks inhibits production of interferon-gama by the upregulation of interleukin-10. **Parasite Immunology**, v. 21, p. 351–356, 1999.
- KOTÁL, J. et al. Modulation of host immunity by tick saliva. **Journal of proteomics**, v. 128, p. 58–68, 14 out. 2015.
- KUBES, M. et al. Salivary gland extracts of partially fed *Dermacentor reticulatus* ticks decrease natural killer cell activity in vitro. **Immunology**, v. 82, p. 113–116, 1994.
- KUTHEJLOVA, M. et al. Salivary gland extract inhibits killing of *Borrelia afzelii* spirochetes by mouse macrophages. **Infection and Immunity**, v. 69, p. 575–578, 2001.
- KUTHEJLOVÁ, M. et al. Tick salivary gland extract inhibits killing of *Borrelia afzelii* spirochetes by mouse macrophages. **Infection and immunity**, v. 69, n. 1, p. 575–8, jan. 2001.
- LABRUNA, M. B. Biologia-ecologia de *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). **Rev. Bras. Parasitol.Vet**, v. 13, n. 1, p. 123–124, 2004.
- LI, L. et al. Role of Nitric Oxide in Lysis of Tumor Cells by Cytokine-activated Endothelial Cells'. **Cancer Research**, v. 51, p. 2531–2535, 1991.

- OLIVEIRA, C. J. F. et al. Deconstructing tick saliva: non-protein molecules with potent immunomodulatory properties. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 13, p. 10960–9, 1 abr. 2011.
- RASKIN, R. E.; MEYER, D. J. **Citologia clínica de cães e gatos: Atlas colorido e guia de interpretação**. 2nd ed. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.
- RIBEIRO, J. M. C.; WEISS, J. J.; TELFORD, S. R. Saliva of the tick *Ixodes dammini* inhibits neutrophil function. **Experimental Parasitology**, v. 70, p. 382–388, 1990.
- ROCHA, F. A. **Efeitos *in vitro* e *in vivo* do extrato de glândulas salivares de fêmeas de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* com 2 dias de alimentação sobre modelos tumorais**. [s.l.] UNESP, 2014.
- SANCHES, G. S. et al. Molecular , biological , and morphometric comparisons between different geographical populations of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari : Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 215, p. 78–87, 2016.
- SAUER, J. R. et al. Tick salivary gland physiology. **Annual Review of Entomology**, v. 40, p. 245–267, 1995.
- SAUER, J. R.; ESSENBERG, R. C.; BOWMAN, A. S. Salivary glands in ixodid ticks: control and mechanism of secretion. **Journal of Insect Physiology**, v. 46, n. 7, p. 1069–1078, 1 jul. 2000.
- SEDMAN, J. J.; GROSSBERG, S. E. A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G250. **Analytical biochemistry**, v. 79, n. 1–2, p. 544–52, 1 maio 1977.
- ŠIMO, L. et al. The Essential Role of Tick Salivary Glands and Saliva in Tick Feeding and Pathogen Transmission. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 7, p. 281, 2017.
- SIMONS, S. M. et al. The action of Amblyomma cajennense tick saliva in compounds of the hemostatic system and cytotoxicity in tumor cell lines. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 65, n. 6, p. 443–450, set. 2011.
- SONENSHINE, D. E.; ROE, R. M. **Biology of ticks (vol. 1)**. vol. 1 ed. New York: Oxford University Press, 2014a.
- SONENSHINE, D. E.; ROE, R. M. **Biology of ticks (vol. 2)**. vol. 2 ed. New York: Oxford University Press, 2014b.
- SOUSA, A. C. P. et al. Exploring the anti-tumoral effects of tick saliva and derived components. **Toxicon**, v. 102, p. 69–73, ago. 2015.

- SOUTHAM, C. M.; ERLICH, J. Effects of extracts of western red-cedar heartwood on certain wood-decaying fungi in culture. **Phytopathology**, v. 33, p. 517–524, 1943.
- STEEN, N. A.; BARKER, S. C.; ALEWOOD, P. F. Proteins in the saliva of the Ixodida (ticks): pharmacological features and biological significance. **Toxicon**, v. 47, n. 1, p. 1–20, jan. 2006.
- THOMSEN, L. L. et al. Nitric oxide synthase activity in human gynecological cancer. **Cancer Research**, v. 54, n. 5, p. 1352–1354, 1994.
- TOLEDO, C. E. P. et al. Cellular viability and nitric oxide (NO) production by J774 macrophages in the presence of orthodontic archwires. **Journal of Biomedical Science and Engineering**, v. 5, p. 255–262, 2012.
- URIOSTE, S. et al. Saliva of the Lyme disease vector, *Ixodes dammini*, blocks cell activation by a nonprostaglandin E2-dependent mechanism. **The Journal of experimental medicine**, v. 180, n. 3, p. 1077–85, 1 set. 1994.
- WAKO, H.; DENG, H. Chinese Medicine and Immunity. In: YAMAGUCHI, N.; COOPER, E. . (Eds.). . **Complementary and alternative approaches to biomedicine**. New York: Springer US, 2004. p. 167–169.
- 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**, v. 15, n. 1, p. 81–100, 1985.
- WALKER, J. B. .; KEIRANS, J. E. .; HORAK, I. G. **The genus *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). A Guide to the Brown Ticks of the World**. London: Cambridge University Press, 2000.
- WIKEL, S. K. Effects of tick infestation on the plaque-forming cell response to a thymic dependent antigen. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 79, n. 2, p. 195–8, abr. 1985.
- XAUS, J. et al. LPS induces apoptosis in macrophages mostly through the autocrine production of TNF- α . **Blood**, v. 95, p. 3823–3831, 2000.

Tabela 1: Resultados da produção de óxido nítrico por linhagem tumoral J774 (derivada de macrófagos) estimulada por LPS e exposta a diferentes concentrações do extrato de glândulas salivares de fêmeas de carrapatos *R. sanguineus* l. s. com 4 dias de alimentação (**EGS4**)

	Controle (J774)	Controle (J774 + LPS)	0,1 µg/mL	0,5 µg/mL	1 µg/mL	2 µg/mL	4 µg/mL	8 µg/mL
Produção de óxido nítrico (µM)	11,1*	21,7	6,7*	4,5*	3,9*	5,5*	8,4*	18,1

Todos os valores representam as médias $\pm$ SEM dos dados obtidos pelas quadruplicatas dos testes.

(*) Dados estatisticamente significativos ($p < 0.05$) em comparação ao grupo Controle (J774 + LPS).

Figura 1: Produção de óxido nítrico (NO) em células da linhagem tumoral J774 (derivada de macrófagos) expostas às diferentes concentrações do extrato de glândulas salivares de fêmeas de carrapatos *R. sanguineus* l. s. com 4 dias de alimentação (**EGS4**). Os valores obtidos para secreção de NO foram expressos em μM de nitrito. As colunas representam as médias $\pm$ SEM (*Standard Error of the Mean* ou Desvio Padrão da Média) dos dados obtidos pelas quadruplicatas dos testes. (*) Indica os dados estatisticamente significativos ($p < 0.05$) em comparação ao grupo Controle (J774 + LPS)

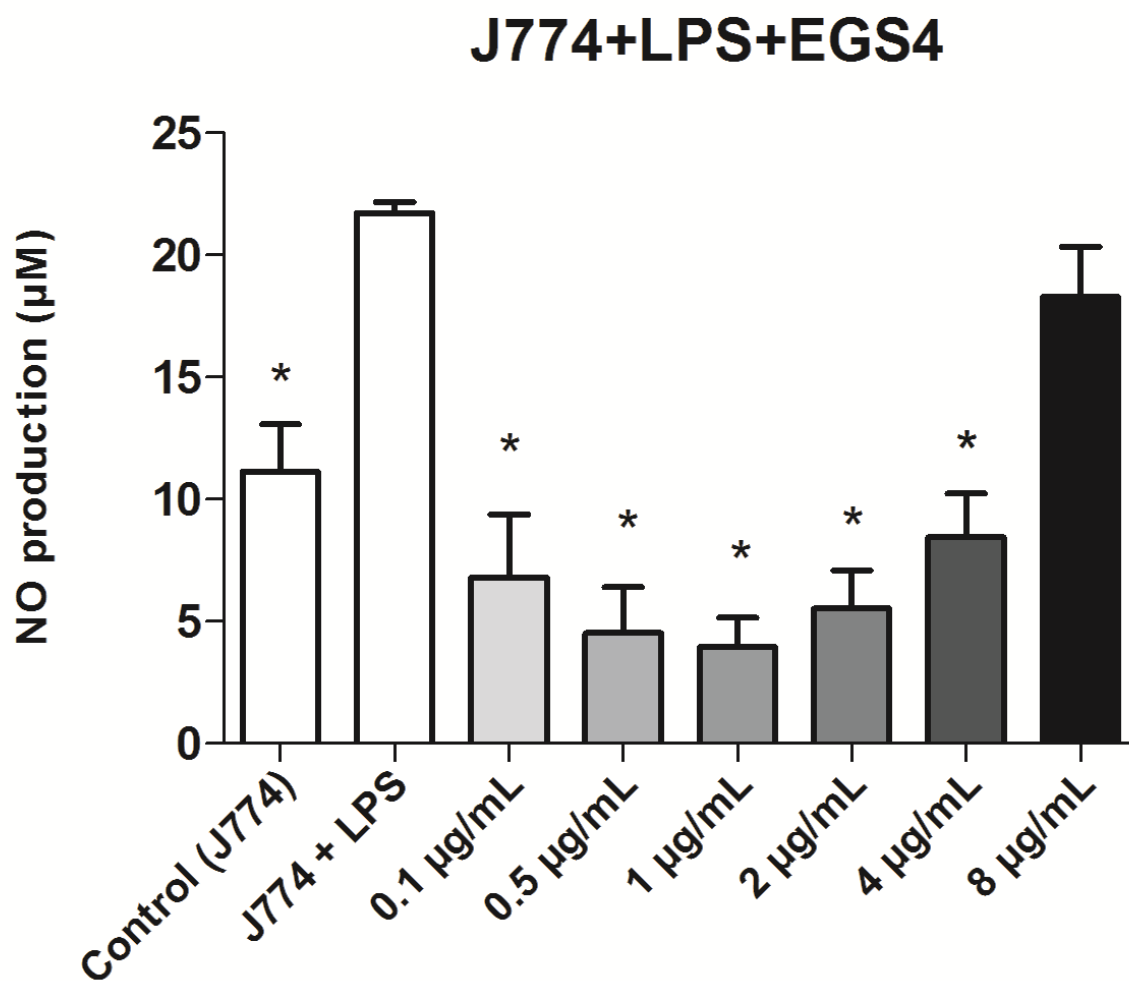


Figura 2: Células J774 do grupo controle, ou seja, sem adição de lipopolissacarídeo e sem exposição ao extrato de glândulas salivares de fêmeas de carrapatos *R. sanguineus* l. s. com 4 dias de alimentação (**EGS4**), coradas com hematoxilina e eosina aquosa (HE). Visão geral (**A1**), detalhes das células com núcleos hipercromáticos (**n**) e presença de células gigantes multinucleadas (**gc**) (**A2**), células atípicas (**ac**) (**A3**) e mitoses do tipo normal (**A4**) e aberrante (**A5**).

Barras: (**A1-3; A5**): 50 µm; (**A4**): 20 µm

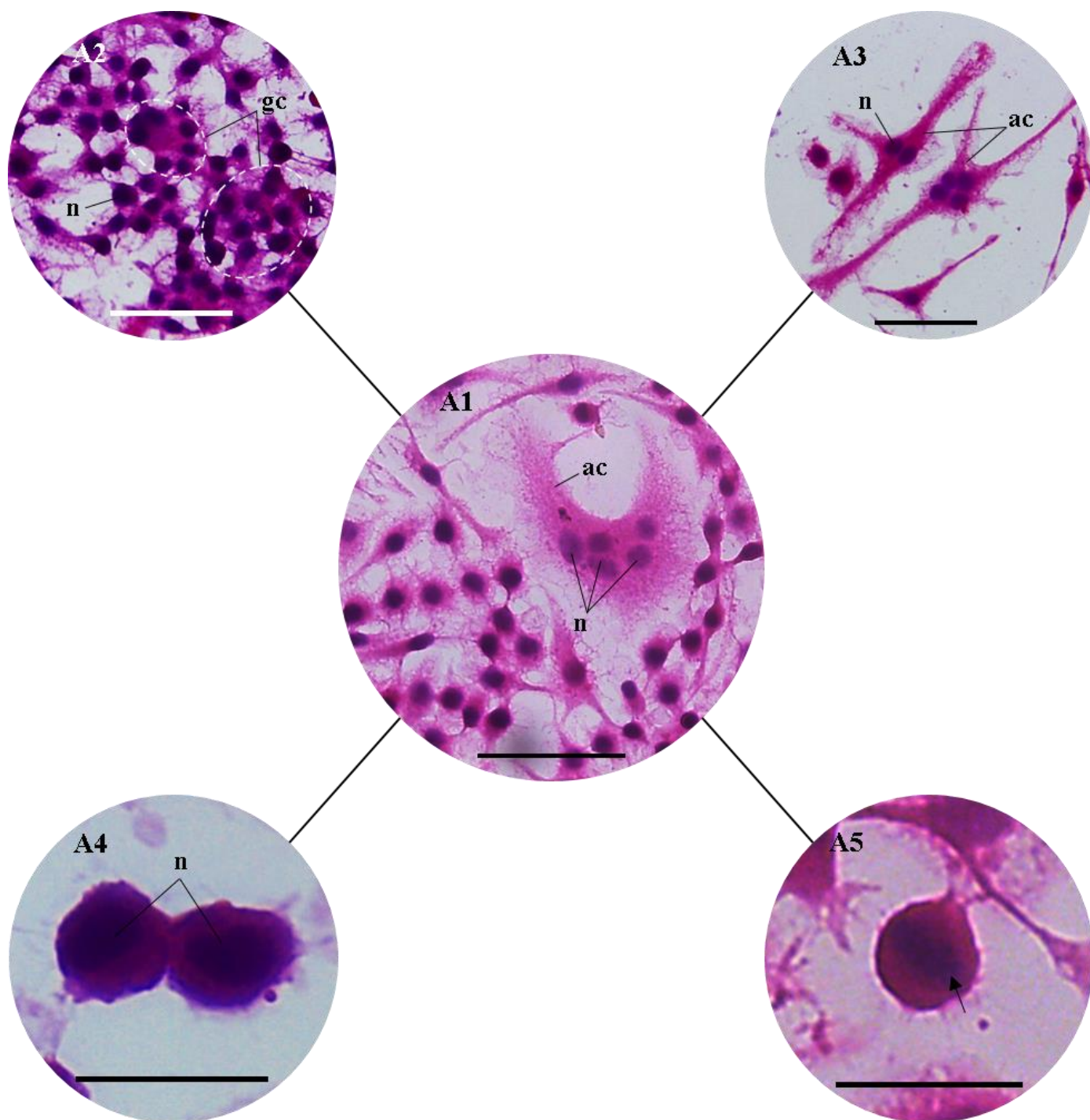


Figura 3: Células J774 estimuladas apenas com lipopolissacarídeo e coradas com hematoxilina e eosina aquosa (HE). Visão geral (**B1**) e detalhes de células apoptóticas (**apt**) e em estágios iniciais de apoptose como condensação e marginalização da cromatina (**seta branca**) (**B3**) e fragmentação nuclear (**fg**) (**B2; B5**).

Barras: 50 μm

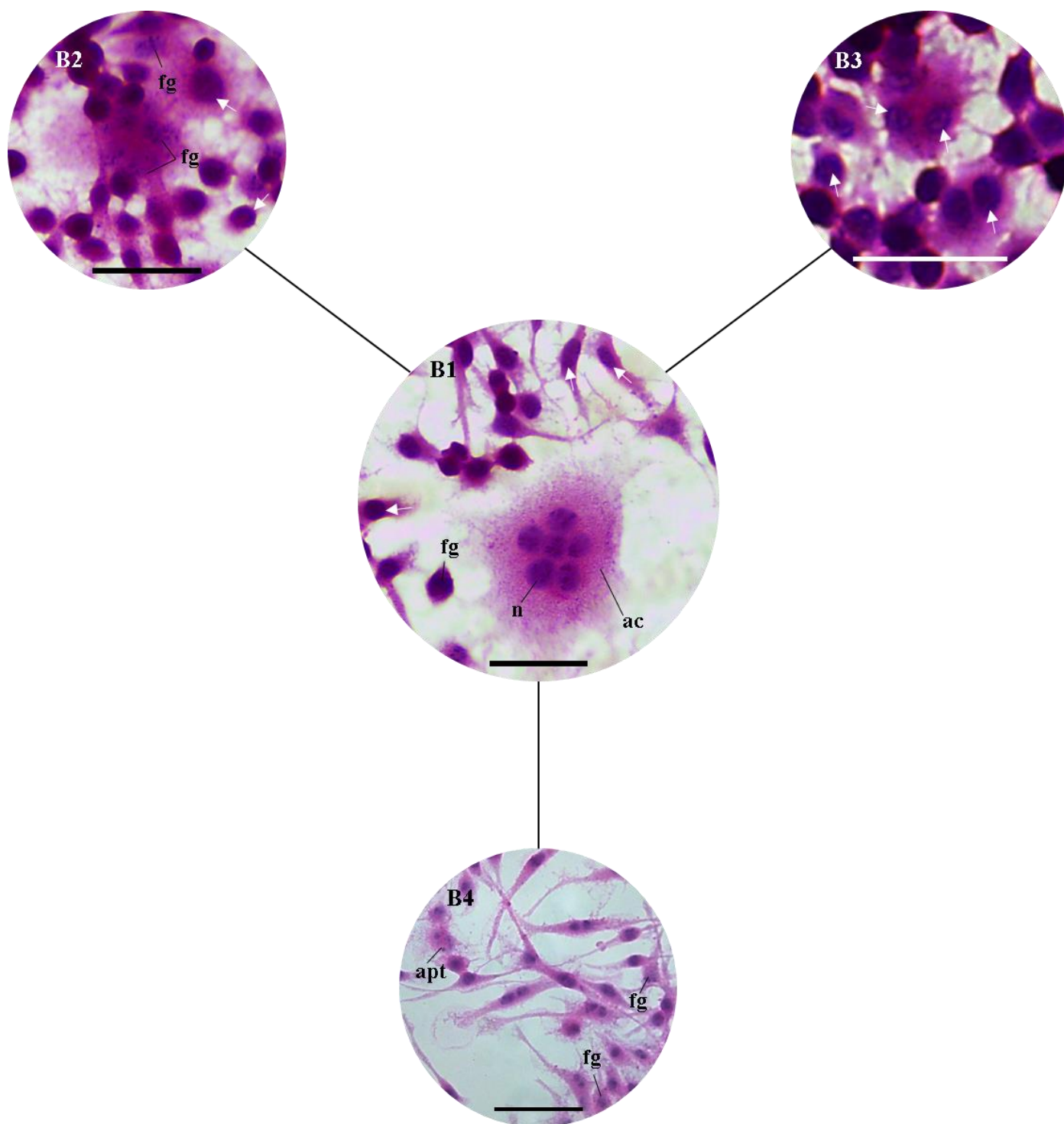
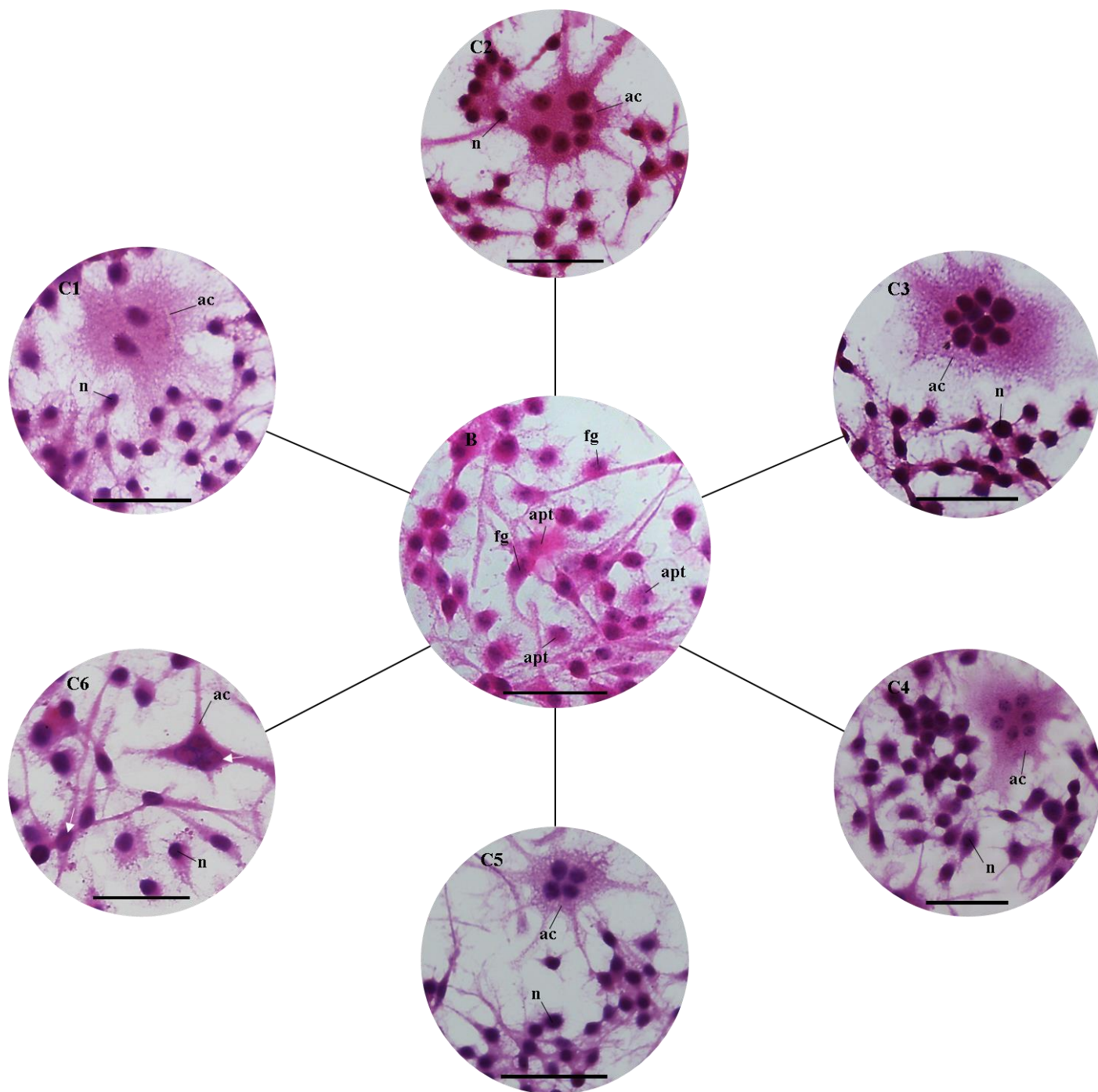


Figura 4: Células J774 estimuladas com lipopolissacarídeo (LPS) e expostas às diferentes concentrações do extrato das glândulas salivares de fêmeas de carrapatos *R. sanguineus* l. s. com 4 dias de alimentação (**EGS4**) (**C1 — C6**) em comparação às mesmas células expostas somente ao LPS (**B**). Coloração com hematoxilina e eosina aquosa (HE). (**B**) Detalhes das células J774 + LPS apresentando características de morte celular condensação e marginalização da cromatina (**seta branca**) e fragmentação nuclear (**fg**) e algumas células já apoptóticas (**apt**). (**C1**) Células J774 + LPS + 0.1 µg/mL **EGS4**; (**C2**) Células J774 + LPS + 0.5 µg/mL **EGS4**; (**C3**) Células J774 + LPS + 1 µg/mL **EGS4**; (**C4**) Células J774 + LPS + 2 µg/mL **EGS4**; (**C5**) Células J774 + LPS + 4 µg/mL **EGS4**; (**C6**) Células J774 + LPS + 8 µg/mL **EGS4**.

Barras: 50 µm



DISCUSSÃO GERAL

5. DISCUSSÃO GERAL

O presente estudo analisou o potencial imunomodulador e anti-inflamatório de diferentes concentrações dos extratos das glândulas salivares de fêmeas de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* l. s. alimentadas por 2 e 4 dias (**EGS2** e **EGS4**, respectivamente) sobre a linhagem de células J774 (derivada de macrófagos) estimulada com lipopolissacarídeo (LPS). Para o **EGS2** foram testadas as concentrações de 0.1, 0.5, 1 e 2 µg/mL e para o **EGS4** as de 0.1, 0.5, 1, 2, 4 e 8 µg/mL. O presente trabalho teve como objetivo principal demonstrar que os carrapatos, embora ocupando atualmente o status de pragas de importância médica e veterinária, são organismos que, através de suas glândulas salivares conseguem sintetizar um rico arsenal de bioativos, os quais, segundo diversos estudos, já mostraram ter a capacidade de atuar em diversos mecanismos do metabolismo dos vertebrados, inclusive inibindo o desenvolvimento de células tumorais (ABREU et al., 2014; ANHOLETO, 2014; CAMARGO-MATHIAS, 2018; CAMARGO-MATHIAS; FURQUIM; NUNES, 2011; CAVASSANI et al., 2005; CHUDZINSKI-TAVASSI et al., 2016; FURQUIM et al., 2011; GWAKISA et al., 2001; ROCHA, 2014; ŠIMO et al., 2017; SIMONS et al., 2011).

Segundo Abbas et al. (2015), os macrófagos representam a primeira linha de defesa do organismo contra a entrada de patógenos (imunidade inata), sendo responsáveis por sintetizar potentes agentes microbicidas como enzimas proteolíticas e o óxido nítrico (NO), considerados essenciais para a regulação dos processos de inflamação e modulação do sistema imune. Os mesmos autores reportam ainda que estas células fagocitárias podem ser ativadas por uma grande diversidade de compostos através de ligações inespecíficas que estimulam a resposta inflamatória por duas vias de ativação: a clássica e a alternativa, sendo a primeira a mais frequente na qual ocorre a liberação de citocinas pró-inflamatórias (IL1, IL6 e TNF-α), bem como de compostos reativos como o óxido nítrico (NO) (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015). O NO é gerado por uma isoenzima (óxido nítrico sintetase – iNOS) expressa através da catálise enzimática do aminoácido L-arginina, e vem sendo considerado o principal agente oxidativo do sistema imune, podendo destruir tumores *in vitro* e *in vivo* (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015)

Dessa forma, os resultados aqui obtidos revelaram que a linhagem celular J774, por ser derivada de macrófagos, sofre significativas alterações morfofisiológicas quando estimulada com lipopolissacarídeo (LPS), uma endotoxina extraída da parede celular de bactérias Gram-negativas (AMANO; AKAMATSU, 1991; GOTOH et al., 2002; GWAKISA et al., 2001; XAUS et al., 2000). Neste trabalho foi observado que o LPS foi capaz de estimular o aumento dos níveis de secreção de NO em comparação com o grupo controle,

corroborando estudos que mostraram que o LPS seria considerado um dos compostos mais eficientes em induzir a ativação clássica de macrófagos *in vitro* (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015; AMANO; AKAMATSU, 1991; KOH et al., 2009; URIOSTE et al., 1994; XAUS et al., 2000).

Morfológicamente as células J774 que foram expostas ao estímulo inflamatório do LPS apresentaram, além das características já descritas na literatura para esta linhagem (AFFOLTER; MOORE, 2002; GOLDSCHMIDT; HENDRICK, 2008; GROSS et al., 2006; RASKIN; MEYER, 2011), núcleos com cromatina condensada e/ou marginalizada, além de alguns deles estarem se fragmentando. Esse dado sugeriu que os altos níveis de NO secretados no meio extracelular desencadearam um processo de estresse oxidativo que culminou na morte destas células por apoptose, corroborando Brüne (2003) que reportou que, muito embora o óxido nítrico atuasse na defesa do organismo contra agentes infecciosos, sua síntese em grandes quantidades poderia influenciar na expressão gênica e contribuiria para a morte celular apoptótica.

Foi aqui verificado que a exposição das células J774 estimuladas com LPS às diferentes concentrações do **EGS2** provocou alterações morfofisiológicas significativas, principalmente na exposição a concentração de 0.1 µg/mL. Esta foi potencialmente capaz de reduzir a secreção de NO em aproximadamente 80 vezes quando comparou-se aos resultados obtidos para as células que não foram expostas. As células expostas não apresentaram características de morte celular em nenhuma das concentrações de **EGS2**, resultado este que sugeriu que o extrato seria inibidor do estresse oxidativo gerado pelo LPS nas células. Li et al. (1991) verificaram que co-culturas de células endoteliais pulmonares de camundongos com linhagem de sarcoma de células reticulares (sarcoma histiocítico), quando ativadas por INF-γ e TNF-α, resultou em grande produção de NO e significativa lise das células tumorais. A adição de um inibidor de NO reduziu completamente a lise das células tumorais e a síntese de NO em 48%. O mesmo poderia estar acontecendo nas células J774 + LPS expostas ao **EGS2**, sugerindo que nestas condições o extrato agiria como agente inibidor do LPS, modulando a resposta imune e impedindo a apoptose induzida pela presença de altas concentrações de óxido nítrico no meio celular.

A exposição ao **EGS2** mostrou que o potencial imunomodulador deste extrato provavelmente estaria relacionado à fisiologia das glândulas salivares das fêmeas, visto as mesmas de onde o extrato foi obtido ter em sua constituição ácinos dos tipos I, II e III e ainda, cada um destes estar composto por diferentes tipos celulares também com diferentes e

específicas funções, sofrerem alterações à medida que o processo alimentar do ectoparasita progride (CAMARGO-MATHIAS, 2018; CAMARGO-MATHIAS; FURQUIM; NUNES, 2011; SONENSHINE; ROE, 2014a). Tais alterações ocorreriam especificamente no início do ciclo secretor, ou seja, nos primeiros 2 dias de alimentação no hospedeiro. Nesse período a maioria das células glandulares estariam ativas na síntese e secreção de substâncias que auxiliariam o carrapato a se fixar no hospedeiro, permitindo que o mesmo fosse bem sucedido no seu repasto sanguíneo. Dentre estas, as células **c1**, **c3**, **c4** e **c5** dos ácinos II e **d** e **f** dos III já foram anteriormente estudadas por Furquim et al. (2011) os quais demonstraram que as mesmas teriam papel na modulação do sistema imune do hospedeiro.

Quando as células J774 estimuladas com LPS foram expostas às diferentes concentrações de **EGS4**, elas também apresentaram alterações morfofisiológicas significativas nas concentrações de 0.1, 0.5, 1, 2 e 4 µg/mL. As mesmas produziram níveis de NO notavelmente mais baixos em comparação àquelas sem adição do extrato e, ainda, em nenhuma destas concentrações foi observado qualquer indício de ocorrência de morte celular, o que sinalizou que o **EGS4**, assim como o **EGS2**, poderia estar agindo como inibidor do LPS, regulando então a resposta inflamatória e impedindo consequentemente a lise celular. O efeito do **EGS4** na diminuição das taxas de NO sintetizadas por macrófagos em condições inflamatórias, já havia sido anteriormente reportado na literatura por Kuthejlová et al. (2001) e Urioste et al. (1994), em estudos com o **EGS4** das espécies de carrapatos *Ixodes ricinus* e *I. dammini*, respectivamente.

Ao contrário das demais concentrações, o **EGS4** a 8 µg/mL não diminuiu as taxas de NO secretadas pelas células J774. Ainda, quando analisadas morfológicamente, algumas células deste grupo apresentaram características de morte apoptótica, tais como marginalização e condensação da cromatina, o que somado ao resultado obtido no teste de NO, sinalizou que o extrato nesta concentração provavelmente já seria tóxico. A maior eficiência de compostos em baixas concentrações quando comparados as altas não é exclusiva do **EGS4** e já é bem reportada na literatura sob o termo “efeito hormesis”, ou seja, o efeito dose-resposta atingiria um limiar de saturação (ou limiar toxicológico) no organismo a partir do qual passaria a apresentar ação tóxica (CALABRESE, 2008; SOUTHAM; ERLICH, 1943). O mesmo poderia estar ocorrendo no caso das concentrações mais baixas (0.1, 0.5, 1, 2 e 4 µg/mL) deste extrato, as quais seriam mais eficientes em reduzir a secreção de NO pelas células J774.

De maneira geral, os dados obtidos com a realização deste trabalho demonstrou que o **EGS4** foi mais eficiente na redução da secreção de NO pelas células J774 estimuladas com LPS, quando comparou-se aos resultados obtidos para o **EGS2**. Isto provavelmente deva ter ocorrido pelo fato de que com 4 dias de alimentação, a fêmea dos carrapatos *R. sanguineus* l. s. entrariam na fase de maior consumo de sangue (fase rápida do engurgitamento) o que ativaria as células presentes nos ácinos secretores, que passariam então a produzir com muito maior intensidade a saliva, mistura rica principalmente em substâncias anti-inflamatórias e vasodiladoras, o que garantiria que o hematofagismo alcançasse o máximo de sua capacidade (BINNINGTON, 1978; CAMARGO-MATHIAS, 2018; CAMARGO-MATHIAS; FURQUIM; NUNES, 2011; FURQUIM et al., 2011; HEBLING et al., 2013; SONENSHINE; ROE, 2014a; STEEN; BARKER; ALEWOOD, 2006). Furquim et al. (2011, 2014) e Hebling et al. (2013) em seus estudos anteriores que avaliaram a ação de extratos glandulares de fêmeas de *R. sanguineus* l. s. em hospedeiros imunizados também já haviam reportado a ocorrência de imunogenicidade e eficácia comprovada do **EGS4** quando comparado com extratos de glândulas salivares de fêmeas alimentadas por 2 e 6 dias (**EGS2** e **EGS6** respectivamente) em hospedeiros também imunizados.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora exaustivamente estudados, os mecanismos de ação pelos quais a saliva dos carrapatos age nos hospedeiros ainda não foram completamente elucidados. Os resultados que foram obtidos no presente trabalho vem trazer à luz informações que num futuro próximo poderão auxiliar nesta compreensão, visto terem sinalizado que células derivadas do sistema imune que encontram-se sob condições inflamatórias, quando expostas aos extratos de glândulas salivares **EGS2** e **EGS4**, teriam potencial regulador de uma das vias de ativação de macrófagos (via clássica), reduzindo a síntese do óxido nítrico (NO), considerado um dos compostos essenciais nos processos fisiológicos, bem como controlando processos infecciosos nos organismos. A compreensão destes mecanismos de ação torna-se essencial, visto que a ação modulatória da saliva do carrapato compromete a capacidade do hospedeiro de responder de maneira eficaz expondo-os a infecções causadas por uma diversidade de patógenos, os quais, por sua vez estariam se beneficiando da ação modulatória da saliva do carrapato, quando no sistema imune do hospedeiro, para sua instalação.

Destaque-se ainda que os resultados até agora obtidos nesta temática poderão auxiliar no desenvolvimento de novas formas de controle de carrapatos, tais como na produção de vacinas cuja base molecular estariam nos componentes bioativos com propriedades anti-inflamatórias e imunossupressoras encontrados na saliva dos mesmos.

REFERÊNCIAS

Introdução

Material e Métodos

Discussão geral

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Basic immunology: functions and disorders of the immune system**. 5th. ed. Philadelphia: Elsevier Inc., 2015.
- ABREU, M. R. DE et al. Salivary glands of female ticks *Rhipicephalus sanguineus* like a potential source of molecules with inhibitory action: *In vivo* study with Walker 256 tumor cells. **Journal of Pharmaceutical Care & Health Systems**, v. 1, n. 14, p. 121, 2014.
- AFFOLTER, V. K.; MOORE, P. F. Localized and disseminated histiocytic sarcoma of dendritic cell origin in dogs. **Veterinary pathology**, v. 39, n. 1, p. 74–83, jan. 2002.
- AMANO, F.; AKAMATSU, Y. A lipopolysaccharide (LPS)-resistant mutant isolated from a macrophagelike cell line, J774.1, exhibits an altered activated-macrophage phenotype in response to LPS. **Infection and immunity**, v. 59, n. 6, p. 2166–74, jun. 1991.
- ANHOLETO, L. A. **Ação do extrato de glândulas salivares de fêmeas do carrapato *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) sobre a inibição da proliferação de células de linhagem tumoral**. [s.l.] Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - campus de Rio Claro/SP, 2014.
- BECHARA, G. H. et al. *Rhipicephalus sanguineus* tick in Brazil: feeding and reproductive aspects under laboratorial conditions. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 4, n. 2, p. 61–66, 1995.
- BINNINGTON, K. C. Sequential changes in salivary gland structure during attachment and feeding of the cattle tick *Boophilus microplus*. **International Journal for Parasitology**, v. 8, p. 97–115, 1978.
- BORGES, L. M. F. et al. Resistência carrapaticida em larvas de *Rhipicephalus sanguineus*(Acari: Ixodidae) de Goiânia-GO, Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, v. 36, p. 87–95, 2007.
- BROSSARD, M.; WIKEL, S. K. Tick immunobiology. **Parasitology**, v. 129 Suppl, p. S161–76, 2004.
- BRÜNE, B. Nitric oxide: NO apoptosis or turning it ON? **Cell Death and Differentiation**, v. 10, n. 8, p. 864–869, ago. 2003.
- CALABRESE, E. J. Hormesis : Why It Is Important To Toxicology and Toxicologists. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 27, n. 7, p. 1451–1474, 2008.
- CAMARGO-MATHIAS, M. I. **Guia básico de morfologia interna de carrapatos ixodídeos**. São Paulo: Editora Unesp, 2013.
- 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**. New York: Nova Science Publishers, Inc., 2013. v. 5p. 167–191.

- 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.
- CAVASSANI, K. A. et al. Tick saliva inhibits differentiation, maturation and function of murine bone-marrow-derived dendritic cells. **Immunology**, v. 114, n. 2, p. 235–245, 1 fev. 2005.
- CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M. et al. Tick salivary gland as potential natural source for the discovery of promising antitumor drug candidates. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 77, p. 14–19, fev. 2016.
- COSTA, M. T. et al. Diferentes papéis do óxido nítrico com ênfase nas neoplasias. **Ciência Rural**, v. 33, n. 5, p. 967–974, 2003.
- DANTAS-TORRES, F. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): From taxonomy to control. **Veterinary Parasitology**, v. 152, p. 173–185, 2008.
- DANTAS-TORRES, F. Biology and ecology of the brown dog tick , *Rhipicephalus sanguineus*. **Parasites & Vectors**, v. 3, p. 1–11, 2010.
- DANTAS-TORRES, F. ; FIGUEREDO, L. A. ; BRANDÃO-FILHO, S. P. *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae), the brown dog tick, parasitizing humans in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, p. 64–67, 2006.
- DANTAS-TORRES, F.; OTRANTO, D. Further thoughts on the taxonomy and vector role of *Rhipicephalus sanguineus* group ticks. **Veterinary Parasitology**, v. 208, p. 9–13, 2015.
- FERREIRA, B. R.; SILVA, J. S. Saliva of *Rhipicephalus sanguineus* tick impairs T cell proliferation and IFN-gamma-induced macrophage microbicidal activity. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 64, n. 3, p. 279–93, 31 jul. 1998.
- FIVAZ, B. H. Immune suppression induced by the brown ear tick *Rhipicephalus appendiculatus* Neumann, 1901. **The Journal of Parasitology**, v. 75, n. 6, p. 946–52, dez. 1989.
- 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**, v. 109, n. 1, p. 147–162, 11 jul. 2011.
- 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, 2014.
- GOLDSCHMIDT, M. H.; HENDRICK, M. J. Tumors of the Skin and Soft Tissues. In: MEUTEN, D. J. (Ed.). . **Tumors in Domestic Animals**. Ames, Iowa, USA: Iowa State Press, 2008. p. 45–117.
- GOTOH, T. et al. Nitric oxide-induced apoptosis in RAW 264.7 macrophages is mediated by endoplasmic reticulum stress pathway involving ATF6 and CHOP. **The Journal of biological chemistry**, v. 277, n. 14, p. 12343–50, 5 abr. 2002.
- GRIESS, J. P.; BEMERKUNGEN, Z. A. H. H. Über einige Azoverbindungen. **Berichte der**

Deutschen Chemischen Gesellschaft, v. 12, p. 426–428, 1879.

GROSS, T. L. et al. **Skin diseases of the dog and cat: clinical and histopathologic diagnosis**. 2nd. ed. Ames, Iowa, USA: Blackwell Publishing, 2006.

GWAKISA, P. et al. Salivary gland extract of *Rhipicephalus appendiculatus* ticks inhibits in vitro transcription and secretion of cytokines and production of nitric oxide by LPS-stimulated JA-4 cells. **Veterinary Parasitology**, v. 99, n. 1, p. 53–61, 31 jul. 2001.

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**, v. 112, n. 2, p. 577–584, 15 fev. 2013.

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

JUSTO, O. R. et al. Evaluation of in vitro anti-inflammatory effects of crude ginger and rosemary extracts obtained through supercritical CO₂ extraction on macrophage and tumor cell line: the influence of vehicle type. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, p. 390, 2015.

KAZIMÍROVÁ, M.; ŠTIBRÁNIOVÁ, I. Tick salivary compounds: their role in modulation of host defences and pathogen transmission. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 3, p. 43, 2013.

KOH, E. et al. Modulation of macrophage functions by compounds isolated from *Zingiber officinale*. **Planta Medica**, v. 75, n. 02, p. 148–151, 24 fev. 2009.

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

KOTÁL, J. et al. Modulation of host immunity by tick saliva. **Journal of proteomics**, v. 128, p. 58–68, 14 out. 2015.

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

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

KUTHEJLOVÁ, M. et al. Tick salivary gland extract inhibits killing of *Borrelia afzelii* spirochetes by mouse macrophages. **Infection and immunity**, v. 69, n. 1, p. 575–8, jan. 2001.

LABRUNA, M. B. Biologia-ecologia de *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 13, n. 1, p. 123–124, 2004.

LI, L. et al. Role of Nitric Oxide in Lysis of Tumor Cells by Cytokine-activated Endothelial Cells'. **Cancer Research**, v. 51, p. 2531–2535, 1991.

OLIVEIRA, C. J. F. et al. Deconstructing tick saliva: non-protein molecules with potent immunomodulatory properties. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 13, p. 10960–9, 1 abr. 2011.

- RASKIN, R. E.; MEYER, D. J. **Citologia clínica de cães e gatos: Atlas colorido e guia de interpretação**. 2nd ed. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.
- RIBEIRO, J. M. C.; WEISS, J. J.; TELFORD, S. R. Saliva of the tick *Ixodes dammini* inhibits neutrophil function. **Experimental Parasitology**, v. 70, p. 382–388, 1990.
- ROCHA, F. A. **Efeitos *in vitro* e *in vivo* do extrato de glândulas salivares de fêmeas de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* com 2 dias de alimentação sobre modelos tumorais**. [s.l.] UNESP, 2014.
- SANCHES, G. S. et al. Molecular , biological , and morphometric comparisons between different geographical populations of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari : Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 215, p. 78–87, 2016.
- SAUER, J. R. et al. Tick salivary gland physiology. **Annual Review of Entomology**, v. 40, p. 245–267, 1995.
- SAUER, J. R.; ESSENBERG, R. C.; BOWMAN, A. S. Salivary glands in ixodid ticks: control and mechanism of secretion. **Journal of Insect Physiology**, v. 46, n. 7, p. 1069–1078, 1 jul. 2000.
- SEDMAN, J. J.; GROSSBERG, S. E. A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G250. **Analytical biochemistry**, v. 79, n. 1–2, p. 544–52, 1 maio 1977.
- ŠIMO, L. et al. The Essential Role of Tick Salivary Glands and Saliva in Tick Feeding and Pathogen Transmission. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 7, p. 281, 2017.
- SIMONS, S. M. et al. The action of Amblyomma cajennense tick saliva in compounds of the hemostatic system and cytotoxicity in tumor cell lines. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 65, n. 6, p. 443–450, set. 2011.
- SONENSHINE, D. E.; ROE, R. M. **Biology of ticks (vol. 1)**. vol. 1 ed. New York: Oxford University Press, 2014a.
- SONENSHINE, D. E.; ROE, R. M. **Biology of ticks (vol. 2)**. vol. 2 ed. New York: Oxford University Press, 2014b.
- SOUSA, A. C. P. et al. Exploring the anti-tumoral effects of tick saliva and derived components. **Toxicon**, v. 102, p. 69–73, ago. 2015.
- SOUTHAM, C. M.; ERLICH, J. Effects of extracts of western red-cedar heartwood on certain wood-decaying fungi in culture. **Phytopathology**, v. 33, p. 517–524, 1943.
- STEEN, N. A.; BARKER, S. C.; ALEWOOD, P. F. Proteins in the saliva of the Ixodida (ticks): pharmacological features and biological significance. **Toxicon**, v. 47, n. 1, p. 1–20, jan. 2006.
- THOMSEN, L. L. et al. Nitric oxide synthase activity in human gynecological cancer. **Cancer Research**, v. 54, n. 5, p. 1352–1354, 1994.
- TOLEDO, C. E. P. et al. Cellular viability and nitric oxide (NO) production by J774 macrophages in the presence of orthodontic archwires. **Journal of Biomedical Science and**

Engineering, v. 5, p. 255–262, 2012.

URIESTE, S. et al. Saliva of the Lyme disease vector, *Ixodes dammini*, blocks cell activation by a nonprostaglandin E2-dependent mechanism. **The Journal of experimental medicine**, v. 180, n. 3, p. 1077–85, 1 set. 1994.

WAKO, H.; DENG, H. Chinese Medicine and Immunity. In: YAMAGUCHI, N.; COOPER, E. . (Eds.). . **Complementary and alternative approaches to biomedicine**. New York: Springer US, 2004. p. 167–169.

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**, v. 15, n. 1, p. 81–100, 1985.

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

WIKEL, S. K. Effects of tick infestation on the plaque-forming cell response to a thymic dependent antigen. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 79, n. 2, p. 195–8, abr. 1985.

XAUS, J. et al. LPS induces apoptosis in macrophages mostly through the autocrine production of TNF- α . **Blood**, v. 95, p. 3823–3831, 2000.

ANEXOS



ANEXO A – PROTOCOLO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO ANIMAL (CEUA/UNESP)



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 35/2015

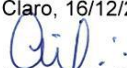
Instituição: UNESP – IB – CRC	Departamento: Biologia
Data de Registro CEUA: 29.09.15	
CERTIFICADO	
Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado “Exposição de células da linhagem tumoral J774 (macrófago) ao extrato das glândulas salivares de fêmeas de carrapatos <i>Rhipicephalus sanguineus</i> Ls (Acari: Ixodidae). Avaliação morfofisiológica”, protocolo nº 8183, sob responsabilidade de Maria Izabel Souza Camargo (Pesquisadora Responsável) e Melissa Carolina Pereira (Orientanda), que envolve a produção, manutenção e/ou a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 1676.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA).	
Subprojeto(s) vinculado(s): ==.==	

Colaboradores: Elen Fernanda Nodari	
A Comissão de Ética no Uso de Animal - CEUA do Instituto de Biociências da UNESP – Campus de Rio Claro, em sua 26ª reunião ordinária , realizada em 16.12.2015	
(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.

Vigência do Projeto: 01/10/2015 a 01/10/2016	
Espécie/linhagem: Coelhos New Zealand White	Número de animais: 09
Peso: 1,5 kg	Idade: 06 meses Sexo: fêmea
Origem dos animais (Informações sobre o fornecedor): Biotério Central de Botucatu	

Objetivo Acadêmico:	☐ TCC ☐ Mestrado ☐ Doutorado ☒ Outros – (Iniciação Científica)
---------------------	--

Rio Claro, 16/12/2015


Prof. Dr. Adriano Polican Ciena
 Presidente “ad hoc”

Melissa Carolina Pereira

Orientada

Profa. Dra. Maria Izabel Souza Camargo

Orientadora

Dra. Elen Fernanda Nodari

Co-Orientadora