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

**Ação do extrato de glândulas salivares de fêmeas do carrapato
Rhipicephalus sanguineus (Latreille, 1806) sobre a inibição da
proliferação de células de linhagem tumoral**

LUÍS ADRIANO ANHOLETO

Dissertação apresentada ao
Instituto de Biociências do Campus
de Rio Claro, Universidade
Estadual Paulista, como parte dos
requisitos para obtenção do título
de mestre em Ciências Biológicas.
Área de Concentração: Biologia
Celular e Molecular.

**Fevereiro
2015**

**Ação do extrato de glândulas salivares de fêmeas do carrapato
Rhipicephalus sanguineus (Latreille, 1806) sobre a inibição da
proliferação de células de linhagem tumoral**

LUÍS ADRIANO ANHOLETO

Orientadora: Profa. Dra. Maria Izabel Souza Camargo

Co-orientadora: Profa. Dra. Karen Cristiane Martinez de Moraes

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

Rio Claro - SP

2015

595.42 Anholeto, Luís Adriano
A596a Ação do extrato de glândulas salivares de fêmeas do carrapato *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) sobre a inibição da proliferação de células de linhagem tumoral / Luís Adriano Anholeto. - Rio Claro, 2015
114 f. : il., figs., tabs.

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

1. Ácaro. 2. Neoplasia. 2. Ixodídeos. 3. Morfologia. 4. mRNA. I. Título.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE RIO CLARO
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE RIO CLARO

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Ação do extrato de glândulas salivares de fêmeas do carrapato *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) sobre a inibição da proliferação de células de linhagem tumoral

AUTOR: LUÍS ADRIANO ANHOLETO

ORIENTADORA: Profa. Dra. MARIA IZABEL SOUZA CAMARGO

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. KAREN CRISTIANE MARTINEZ DE MORAES

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR), pela Comissão Examinadora:


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


Prof. Dr. FLAVIO HENRIQUE CAETANO
Departamento de Biologia / Instituto de Biociências de Rio Claro


Prof. Dr. EDSON LUIS MAISTRO
Departamento de Fonoaudiologia / Faculdade de Filosofia e Ciências de Marília

Data da realização: 27 de fevereiro de 2015.

*Dedico esse trabalho a todos
que, direta ou indiretamente,
estiveram envolvidos com ele
e/ou contribuíram para
minha formação.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente aos meus pais, avós, tios e primos por todo apoio e confiança que depositaram em mim.

À minha orientadora Profa. Dra. Maria Izabel Souza Camargo pela oportunidade, confiança, paciência, amizade, conselhos e, principalmente, por acreditar no meu potencial e tornar esse trabalho possível. Serei eternamente grato.

À minha co-orientadora Profa. Dra. Karen Cristiane Martinez de Moraes por ter me acompanhado ao longo desse trabalho, pelos ensinamentos, discussões, esclarecimentos e por me permitir conhecer novas áreas da biologia.

À Dra. Patrícia Brigatte pela parceria e apoio.

À Dra. Sandra Coccuzzo do Instituto Butantan – SP, por me receber em seu laboratório e à sua aluna Luciana Pimenta por me acompanhar nos experimentos.

Aos meus amigos e membros *do Brazilian Central of Studies on Ticks Morphology* – BCSTM, UNESP – Rio Claro, SP, Brasil, pelo acolhimento e apoio, especialmente ao Dr. Rafael Neodini Remédio pelas orientações, pelos conselhos e por estar sempre disposto a ajudar, à Dra. Patrícia Rosa Oliveira e Dra. Karim Christina Scopinho Furquim por terem me ajudado em tudo que precisei.

Agradeço aos técnicos do Laboratório de Microscopia Eletrônica, em especial ao Dr. Pablo Henrique Nunes por suas orientações e conselhos.

Ao técnico do Laboratório de Histologia Gerson Mello Souza por seu apoio e momentos de descontração.

A todos os professores que estiveram envolvidos direta ou indiretamente com a minha vida acadêmica e partilharam seus conhecimentos, os quais com certeza foram essenciais para a minha formação pessoal e profissional.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (2013/00654-0) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro cedido para o desenvolvimento do projeto.

Agradeço a todos do Departamento de Biologia do Instituto de Biociências da UNESP de Rio Claro pelo acolhimento e amizade.

Agradeço especialmente aos meus amigos Allison, Rafael, Mariana e Luiza pelos segredos confidenciais, pelos sorrisos compartilhados, pelas lágrimas enxugadas e por estarem sempre presentes. Amo vocês.

Aos meus amigos Beatriz, Alessandra, Débora, Raphael, Mariana, Thelma, Maria, Amanda, que mesmo distantes fisicamente estão ao meu lado, dentro do meu coração.

Ao meu amigo e companheiro Daniel. Obrigado por tudo.

Finalmente agradeço a todos que participaram direta ou indiretamente da minha formação profissional e pessoal e que, por ventura, possa ter esquecido de citar. Muito obrigado.

RESUMO

Os carrapatos, ectoparasitas hematófagos, produzem uma saliva em cuja composição encontram-se moléculas capazes de modular o sistema imune-inflamatório e hemostático do hospedeiro. No presente estudo, foi realizada a caracterização do extrato de glândulas salivares de fêmeas do carrapato *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) alimentadas por quatro dias em coelhos hospedeiros, por meio de espectrometria de massas (LCMS—IT-TOF) pela estratégia de *Shotgun*, que identificou 14 proteínas, com as mais diversas funções como componentes estruturais de junções celulares, do citoesqueleto, do nucleossomo, além de proteínas com ações anticoagulante e anti-inflamatória corroborando os dados presentes na literatura. Neste trabalho buscou-se, ainda, analisar o potencial antitumoral desse extrato em células das linhagens tumorais SK-HEP-1 e HEP-G2, por meio de ensaios de MTT; análise, por técnicas de Microscopia de Confocal de Varredura a Laser, do núcleo e citoesqueleto; e análise do padrão de transcrição de mRNAs envolvidos nos eventos ou mecanismos de morte celular por apoptose, incluindo os produtos dos genes *Bax*, *Bcl-2*, *Caspases 3 e 9*, *Fas* e *Interleucina 1 α* . Os resultados obtidos mostraram que o extrato na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ inibiu significativamente a proliferação celular das duas linhagens testadas. Pela análise dos núcleos e filamentos de actina das células expostas, não foram verificadas características morfológicas que indicassem processos de morte celular por apoptose. Já a análise do padrão de transcrição de mRNAs envolvidos nos mecanismos de morte celular por apoptose, evidenciou a expressão significativa de alguns genes anti e pró-apotóticos nas células tratadas quando comparadas às do grupo controle, sugerindo que a ação do extrato pode causar o desbalanço na homeostase celular, que pode desencadear processos de morte celular por apoptose, corroborando os dados apresentados na literatura.

Palavras-chave: Ácaro; Neoplasia; Ixodídeos; Morfologia; mRNA

ABSTRACT

Ticks, hematophagous ectoparasites produces saliva that presents molecules capable of modulating the immune-inflammatory and hemostatic system of the host. The present study was performed to characterize the salivary gland extract of female *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) fed for four days in rabbits by mass spectrometry (LCMS-IT-TOF) by shotgun strategy, which identified 14 proteins with diverse functions: as structural components of cell junctions, cytoskeleton, the nucleosome, and protein with anticoagulant and anti-inflammatory actions corroborating data in the literature. In this study, we attempted to also examine the antitumor potential of this extract on tumor cell lines SK HEP-1 and HEP-G2, by MTT assay; analysis by Laser Scanning Confocal Microscopy techniques, and pattern analysis of mRNA transcription involved in cell death by apoptosis, including the products of genes *Bax*, *Bcl-2*, *Caspases 3 and 9* *Fas* and *Interleukin-1 α* . The results showed that the extract obtained in concentration of 50 $\mu\text{g/ml}$ significantly inhibited the proliferation of both cell lines tested. In the analysis of cores and actin filaments, of the treated cells were not observed morphological characteristics that indicate cell death processes by apoptosis. The analysis of the pattern of transcription of mRNAs involved in mechanisms of cell death by apoptosis, showed a significant expression of some apoptotic genes, in treated cells compared to the control group, suggesting that the action of the extract can cause an unbalance homeostasis in the cell, which can trigger processes of cell death by apoptosis, confirming the data presented in the literature.

Keywords: Mite; Neoplasia; Ixodidae; Morphology; mRNA

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1. Estágios imaturos e adultos de <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	18
FIGURA 2. Montagem total de glândulas salivares de macho de <i>R. sanguineus</i> , marcadas pela técnica da fosfatase ácida	21
FIGURA 3. Microscopia Eletrônica de Varredura de glândulas salivares (sq) de fêmeas do carrapato <i>Amblyomma cajennense</i> semi-ingurgitadas mostrando detalhes dos ácinos (ac) e ductos (dt)	24
FIGURA 4. Disposição dos grupos controle e tratamento na microplaca de 96 poços.	71
FIGURA 5. Comparação da viabilidade celular fazendo uso da técnica do MTT, entre as linhagens SK-HEP-1 (A) e HEP-G2 (B).....	77
FIGURA 6. Imagem obtida pela técnica de Microscopia Confocal de células SK-HEP-1 expostas e não expostas ao EGS4	79
FIGURA 7. Imagem obtida pela técnica de Microscopia Confocal de células HEP-G2 expostas e não expostas ao EGS4	80
FIGURA 8. Amplificação de β -actina obtida do cDNA sintetizado a partir de RNA total extraído de células SK-HEP 1 (A) e HEP-G2 (B)	81
FIGURA 9. Expressão relativa de mRNAs envolvidos com o processo de morte celular por apoptose das células SK-HEP-1 expostas ao EGS4 na concentração de 50 μ g/mL por 96 horas e não expostas (controle).....	83

FIGURA 10. Expressão relativa de mRNAs envolvidos com o processo de morte celular por apoptose, das células HEP-G2 expostas ao EGS4 na concentração de 50 µg/mL por 96 horas e não expostas (controle).....	85
FIGURA 11. Esquema mostrando as vias de sinalização dos mecanismos de apoptose	89

TABELAS

1. Proteínas identificadas por meio da espectrometria de massas (LCMS-IT-TOF) pela estratégia de <i>Shotgun</i> , presentes no extrato de glândulas salivares de fêmeas de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> alimentadas por quatro dias em coelhos hospedeiros. Os nomes das proteínas estão em inglês, conforme obtido nos bancos de dados. MM = massa molecular, PI = ponto isoeletrico.....	54
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A. americanum: *Amblyomma americanum*

Ac: ácidos

ADP: adenosina difosfato

ATCC: *American Type Culture Collection*

ATP: adenosina trifosfato

BSA: albumina bovina

CEIS: Centro de Estudos de Insetos Sociais

CL50: concentração letal de 50%

CN: controle negativo

CP: controle positivo

DMSO: dimetilsulfóxido

Dt: ductos

Ed: ducto excretor

EDTA: *ethylenediamine tetraacetic acid*

EGS4: extrato de glândulas salivares de fêmeas de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* alimentadas por quatro dias em coelho hospedeiro.

ETC: complexo tenase extrínseco

Fig.: figura

HPLC: cromatografia líquida de alta resolução

I. ricinus: *Ixodes ricinus*

IAA: iodoacetamina

LBEZ: Laboratório de Biologia Estrutural e Zooquímica

MEM: *Minimum Essential Medium Eagle*

MM: massa molecular

MS/MS: espectrometria de massas sequencial

MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

NCBI: *National Center for Biotechnology Information*

NK: *natural killer*

O. moubata: *Ornithodoros moubata*

O. savignyi: *Ornithodoros savignyi*

PBS: tampão fosfato-salino

PCR: reação em cadeia da polimerase

PI: ponto isoelétrico

R. (Boophilus) calcaratus: *Rhipicephalus (Boophilus) calcaratus*

R. rickettsii: *Rickettsia rickettsii*

R. sanguineus: *Rhipicephalus sanguineus*

Sg: glândulas salivares

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA.....	16
1.1.	Carrapatos	16
1.2.	Glândulas salivares dos carrapatos	20
1.3.	Composição e funções da saliva dos carrapatos	25
1.3.1.	Hemostase do hospedeiro	27
1.3.2.	Vasodilatadores	28
1.3.3.	Inibidores de agregação plaquetária.....	29
1.3.4.	Inibidores da cascata de coagulação sanguínea	30
1.3.5.	Ações anti-inflamatórias	32
1.3.6.	Modulação imune do hospedeiro	33
1.3.7.	Agentes patogênicos.....	36
1.3.8.	Cimento.....	36
1.3.9.	Excreção e balanço hídrico.....	37
1.4.	Neoplasia	37
2.	OBJETIVOS.....	41
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	42
3.1.	Infestação para obtenção do extrato de glândulas salivares.....	42
3.2.	Obtenção do extrato de glândulas salivares	43
3.3.	Quantificação de proteínas	43
4.	RESULTADOS.....	44
	CAPÍTULO 1:.....	45

Caracterização do extrato de glândulas salivares de fêmeas de carrapato *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) alimentadas por quatro dias em coelhos hospedeiros. 45

RESUMO 45

1. INTRODUÇÃO 46

2. OBJETIVO 48

3. MATERIAIS E MÉTODOS 49

3.1. Digestão de proteínas em solução para estratégia Shotgun. 49

3.2. Espectrometria de massas (LCMS-IT-TOF)..... 50

3.3. Identificação das Proteínas 51

4. RESULTADOS..... 53

5. DISCUSSÃO 56

REFERÊNCIAS 60

CAPÍTULO 2:..... 64

Ação do extrato de glândulas salivares de fêmeas de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) sobre a inibição da proliferação de células de linhagem tumoral. 64

RESUMO 64

1. INTRODUÇÃO 65

2. OBJETIVOS..... 69

3. MATERIAIS E MÉTODOS 70

3.1. Cultura de células de linhagem tumoral 70

3.2. Ensaio de viabilidade celular 70

3.3. Microscopia Confocal de Varredura a Laser..... 72

3.4. Análise do padrão de transcrição de mRNAs envolvidos na morte celular por apoptose..... 73

3.4.1.	Extração de RNA total	73
3.4.2.	Obtenção do cDNA	74
3.4.3.	Técnica da PCR semi-quantitativa	75
4.	RESULTADOS.....	76
4.1.	Viabilidade celular.....	76
4.2.	Microscopia Confocal de Varredura a Laser.....	78
4.3.	Análise do padrão de transcrição de mRNAs envolvidos na morte celular por apoptose.....	81
4.3.1.	Avaliação do cDNA	81
4.3.2.	Técnica da PCR semi-quantitativa	82
5.	DISCUSSÃO	86
	REFERÊNCIAS	96
5.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	100
	ANEXO A - FOLHA DE APROVAÇÃO DO CEUA.....	114

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

1.1. Carrapatos

Os carrapatos são artrópodes ectoparasitas que apresentam redução da segmentação do corpo, tendo cabeça, tórax e abdome fundidos (STORER; USINGER, 2000). Muitas espécies podem viver por longos períodos sem se alimentar e, ainda, são animais resistentes à dessecação por possuírem o tegumento recoberto por cera (WALKER, 1994; RUPPERT et al., 2005).

Esses animais são classificados em três famílias: Ixodidae, Argasidae e Nuttalliellidae (ANDERSON, 2002; NAVA, 2009). O corpo dos indivíduos pertencentes aos Ixodidae é recoberto por uma grande placa quitinosa dorsal denominada escudo, que pode ter sua superfície ornamentada por manchas, depressões e desenhos (REY, 1973), e é onde se encontram as peças bucais localizadas na região frontal, enquanto que, naqueles Argasidae essa placa dura está ausente e as peças bucais localizam-se ventralmente (WALKER, 1994; WALL; SHEARER, 1997). Já a família Nuttalliellidae abriga apenas a espécie *Nuttalliella namaqua*, que apresenta uma combinação de características das duas outras famílias, como a presença de integumento corrugado e pequena placa na região dorsal anterior, entre outras (SAUER et al., 2000; ANDERSON; MAGNARELLI, 2008).

Dentre os artrópodes, os carrapatos constituem um grupo de considerável importância médico-veterinária, uma vez que, provocam lesões no hospedeiro, seja no processo de repasto sanguíneo ou devido a transmissão de agentes patogênicos. São hematófagos e vetores de arboviroses, rickettsioses,

espiroquetoses e protozoários tanto para o homem quanto para os animais domésticos ou silvestres (KAUFMAN, 1989, SONENSHINE, 1991; DANTAS-TORRES, 2010). Esse parasitismo compromete todo o desenvolvimento do hospedeiro pela espoliação direta causada pelo hematofagismo, que permite, ainda, a entrada de organismos responsáveis por infecções secundárias, como miíases cutâneas, fatores estes que influenciam negativamente no desenvolvimento do hospedeiro e refletem até mesmo na comercialização de seus produtos como a carne, o couro e o leite no caso dos bovinos (WALL; SHEARER, 1997).

Segundo Harwood e James (1979), o sucesso dos carrapatos como vetores de microrganismos deve-se às características biológicas que estes apresentam, dentre as quais destacam-se: hematofagismo em todas as fases do desenvolvimento; fixação profunda nos hospedeiros, o que dificulta sua remoção; ingurgitamento lento, havendo tempo para inoculação de patógenos; adaptação a diferentes espécies de hospedeiros; resistência à adversidade climática devido à grande esclerotização e também longevidade nos ambientes, propiciando tempo para multiplicação dos patógenos.

Um exemplo de carrapato ixodídeo é o da espécie *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (**Fig. 1**), distribuído em todos os continentes do planeta, parasitando principalmente o cão doméstico. Embora tenha se originado na região Afrotropical, sua distribuição se deve às migrações humanas pelo mundo, carregando consigo o cão (WALKER et al., 2000).

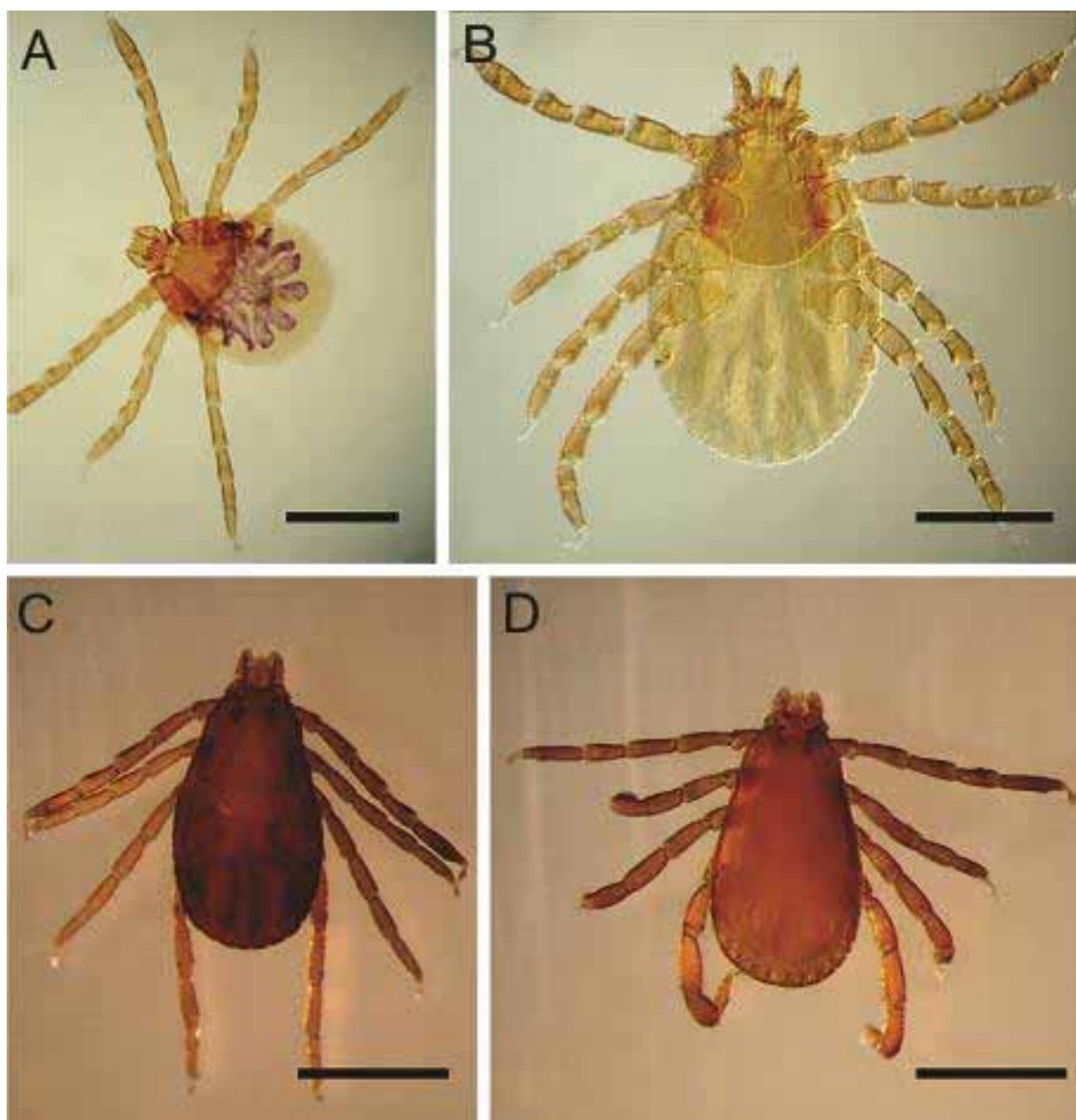


FIGURA 1. Estágios imaturos e adultos de *Rhipicephalus sanguineus*. A: larva (montado em meio Hoyer; barra = 400 μ m). B: ninfa (montado em meio Hoyer; barra = 0,5 mm). C: fêmea adulta (barra = 1mm). D: macho adulto (barra = 1 mm) (DANTAS-TORRES, 2010).

O *R. sanguineus* apresenta três estágios parasitários dentro de seu ciclo de vida: larva, ninfa e adulto, sendo esta última a única com dimorfismo sexual. Cada estágio parasita o hospedeiro por alguns dias (3 a 7 para larvas e ninfas, 5 a 10 para fêmeas adultas e mais de 15 para machos adultos), período este que é quando se alimenta principalmente de sangue, mas também de linfa e de restos tissulares da epiderme e/ou da derme lisada via diversas enzimas proteolíticas secretadas na sua saliva (LABRUNA, 2004; ANDERSON; MAGNARELLI, 2008). No final do período parasitário, as larvas e as ninfas ingurgitadas se desprendem do hospedeiro para realizar a ecdise (muda) passando para os próximos estágios de vida. As fêmeas ingurgitadas, depois de fecundadas e ainda no hospedeiro, se desprendem para fazerem a postura dos ovos no solo, cerca de 1000 a 3000, que depois de incubados por algumas semanas, originam as larvas. Os machos que ainda ficam sobre o hospedeiro (por vários dias ou semanas), não ingurgitam e, portanto, não aumentam exageradamente de tamanho, podendo fecundar várias fêmeas neste período (LABRUNA, 2004).

O carrapato *R. sanguineus* é considerado ser no Brasil o principal ectoparasita de cães e tem assumido cada vez mais um papel relevante entre as espécies de importância mundial, fato este ressaltado pela grande atenção com que a indústria farmacêutica veterinária trata esta espécie. Nos cães, além dos danos diretos, ele é ainda responsável pela transmissão de *Ehrlichia canis*, *Babesia canis*, *Haemobartonella canis* e *Hepatozoon canis*. Nos humanos esta espécie também é vetora da *Rickettsia conorii* na Europa e da *R. rickettsii* no Arizona – EUA (BORGES et al., 2007). No Brasil é considerado ser um potencial

transmissor deste último agente, o que o torna especialmente importante, uma vez que há relatos no Brasil de parasitismo humano por este carrapato (DANTAS-TORRES et al., 2006).

Considerando que durante o período de alimentação os carrapatos necessitam permanecer fixados aos seus hospedeiros por períodos variáveis, estes animais precisam produzir um grande, diversificado e eficaz arsenal farmacológico, o que se dá por meio da produção de saliva a qual garantirá sua alimentação (via fixação) e sobrevivência (RIBEIRO et al. 1985; WIKEL; BERGMAN, 1997; STEEN et al., 2006; FRANCISCHETTI et al., 2010).

1.2. Glândulas salivares dos carrapatos

As glândulas salivares (**Fig. 2**) são órgãos vitais para o sucesso biológico dos carrapatos. Apresentam diversas funções, tais como a produção de substâncias necessárias à fixação no hospedeiro e à alimentação destes ectoparasitas (CAMARGO-MATHIAS, 2013), bem como podem ser sítios de armazenamento de patógenos, os quais serão transmitidos via inoculação da saliva (SONENSHINE, 1991).

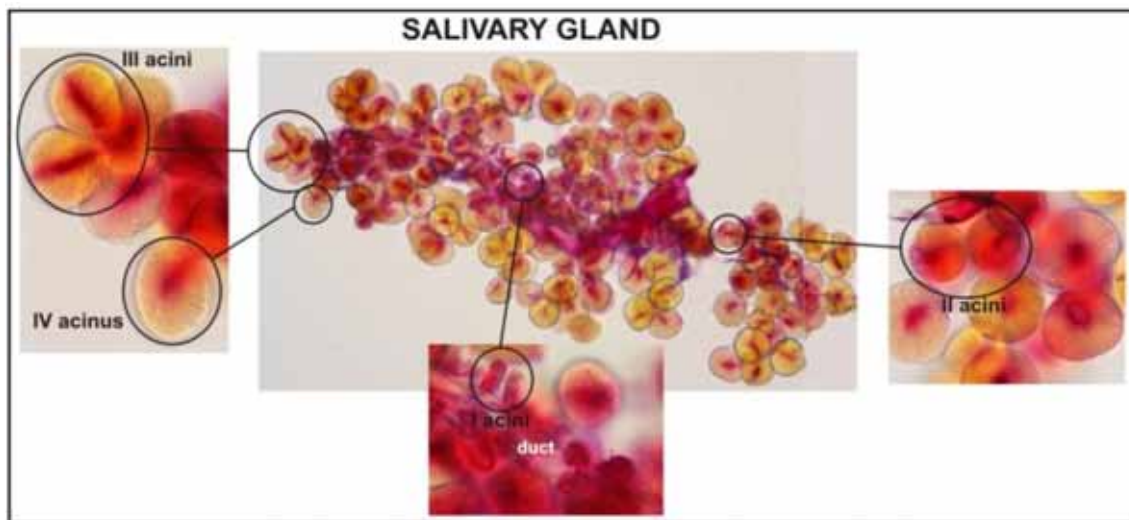


FIGURA 2. Montagem total de glândulas salivares de macho de *R. sanguineus*, marcadas pela técnica da fosfatase ácida (FURQUIM; CAMARGO-MATHIAS, 2013).

Elas estão presentes tanto nos machos como nas fêmeas, como estruturas pares localizadas ao longo da porção ventral do corpo, nas regiões anterolaterais, abrindo-se na cavidade oral (BOWMAN AND SAUER, 2004; FURQUIM; BECHARA; CAMARGO-MATHIAS, 2010; CAMARGO-MATHIAS; FURQUIM, 2013). Estes órgãos são formados por uma porção secretora (ácinos arredondados e de vários tipos, compostos por células secretoras conforme descrito por FURQUIM (2007)) e por uma excretora (conjunto de ductos transportadores da secreção). São ainda desprovidos de reservatório para armazenamento da secreção final (CAMARGO-MATHIAS; FURQUIM, 2013).

A porção secretora é formada por ácinos com composição histológica diferente, classificados como sendo dos tipos I, II, III e IV, sendo o IV encontrado exclusivamente nos machos (BOWMAN; SAUER, 2004; FURQUIM, 2007).

Segundo Sonenshine (1991) e Olivieri e Serra-Freire (1992), os ácinos do tipo I são denominados agranulares pela ausência de grânulos de secreção nas suas células. Acredita-se que esses ácinos estejam relacionados com a absorção de água da atmosfera (em carrapatos não alimentados) por meio da secreção higroscópica de sais, fato este que permite o balanço hídrico do artrópode (BOWMAN; SAUER, 2004). Aqueles do tipo II, III, IV, por outro lado, são denominados de granulares, visto serem compostos por células sintetizadoras e secretoras de diversos elementos, daí a presença de grande quantidade de grânulos de secreção de diferentes tamanhos e composição, distribuídos no citoplasma das mesmas (SONENSHINE, 1991; BOWMAN; SAUER, 2004; FURQUIM, 2007). Esta secreção atuará no processo de fixação, alimentação do carrapato (SONENSHINE, 1991; BOWMAN; SAUER, 2004; FURQUIM, 2007).

As glândulas salivares da espécie *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) têm sido estudadas por Furquim desde 2007, que tem demonstrado que este órgão apresenta extrema complexidade morfofisiológica e, além disso, estabeleceu uma nova classificação para as células glandulares, agregando um número maior de tipos no ácino II das glândulas tanto de fêmeas quanto de machos. Especificamente nas fêmeas as glândulas salivares são compostas por ácinos dos tipos I, II e III (FURQUIM, 2007; CAMARGO-MATHIAS; FURQUIM, 2013) e nos machos pelos I, II, III e IV (FURQUIM;

BECHARA; CAMARGO-MATHIAS, 2008; 2010). Os do tipo I são agranulares e estão envolvidos com o balanço hídrico do ectoparasita, enquanto os II e III, granulares, atuam no processo de fixação, alimentação e de osmorregulação na fase de grande consumo de sangue (FURQUIM, 2007). Já os do tipo IV (granulares), segundo a literatura não têm ainda sua função bem estabelecida, porém, parecem atuar na reprodução dos ectoparasitas (FELDMAN-MESHAM et al., 1970). Segundo Furquim (2007), nas fêmeas de *R. sanguineus* os ácinos II são constituídos pelas células secretoras dos tipos *a*, *b*, *c1*, *c2*, *c3*, *c4*, *c5* e *c6*, enquanto que os III pelos tipos *d*, *e* e *f*; e nos machos há presença das células *c7* e *c8* nos ácinos II. Os ácinos IV são formados exclusivamente pelas células *g* (FURQUIM; BECHARA; CAMARGO-MATHIAS, 2008; 2010).

A porção excretora das glândulas salivares é composta por um sistema de ductos ramificados que se iniciam em pequenos canalículos (ductos acinares) (**Fig. 3**) sendo responsáveis pela coleta daquela secreção que é produzida diretamente nos ácinos (**Fig. 2, 3**). Estes se conectam ao ducto principal ou excretor comum, por meio dos ductos intermediários (**Fig. 3**), os quais possuem diâmetro maior que os ductos acinares.

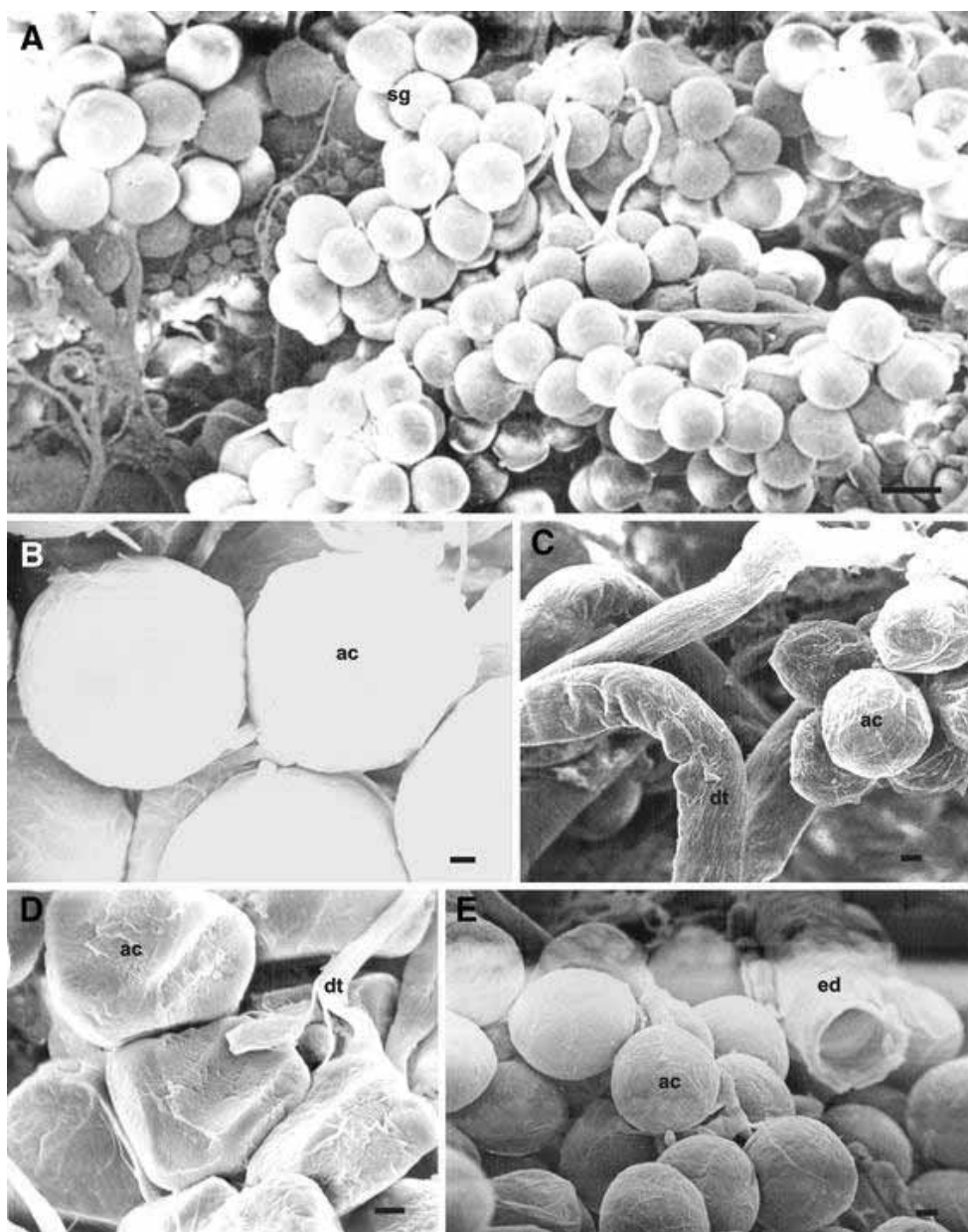


FIGURA 3. Microscopia Eletrônica de Varredura de glândulas salivares (sg) de fêmeas do carrapato *Amblyomma cajennense* semi-ingurgitadas mostrando detalhes dos ácinos e ductos. ac= ácinos; dt=ductos; ed = ducto excretor. Barras: A = 200 μ m; B, D = 20 μ m; C, E = 40 μ m (DENARDI et al., 2011).

O ducto principal abre-se na porção anterior do animal para eliminar a secreção na sua cavidade bucal, sendo aquele que possui o maior diâmetro (TILL, 1961; BALASHOV, 1979; WALKER et al., 1985; FAWCETT et al., 1986; SCHUMAKER; SERRA-FREIRE, 1991).

As glândulas salivares dos carrapatos apresentam ciclo secretor bem definido, marcado por uma fase de desenvolvimento e outra de regressão ou degeneração, ciclo este determinado pelo estado fisiológico em que o carrapato se encontra (jejum ou alimentado). O desenvolvimento completo desse órgão não ocorre até que o carrapato inicie sua alimentação (WALKER; FLETCHER; GILL, 1985). Na maioria das espécies, a degeneração das glândulas salivares inicia-se após a completa alimentação das fêmeas, quando ocorre o desprendimento voluntário destas do hospedeiro, momento este que é quando caem ao solo para ovipositar, e quando as glândulas salivares degeneram por completo (WALKER; FLETCHER; GILL, 1985; FURQUIM, 2007; FURQUIM; BECHARA; CAMARGO-MATHIAS, 2008; CAMARGO-MATHIAS, 2013).

1.3. Composição e funções da saliva dos carrapatos

Para poderem se alimentar, os carrapatos inserem seu especializado aparelho bucal na pele do hospedeiro e, no caso dos ixodídeos, utilizam-se do cemento produzido pelas suas glândulas salivares para ancorá-los (SONENSHINE, 1991). A penetração do aparelho bucal no hospedeiro provoca danos nos capilares e pequenos vasos sanguíneos na região da lesão, com

consequente formação do local ideal para a realização do processo de alimentação do carrapato (SAUER et al., 1995).

Os danos causados na pele e a presença do carrapato em processo de alimentação, leva o hospedeiro a reagir com a formação de um tampão hemostático, ativação de uma cascata de coagulação, vasoconstrição, respostas imune-inflamatórias, entre outras, que tem como objetivo reparar o tecido lesado. Tais processos provocam a diminuição na eficácia da alimentação e trazem efeitos negativos na viabilidade da reprodução desses hematófagos. Contudo, os carrapatos são hábeis em driblar as respostas biológicas de seus hospedeiros, por meio da produção de um grande, diversificado e eficaz arsenal de moléculas biologicamente ativas pelas suas glândulas salivares, com ações anticoagulante, antiplaquetária, vasodilatadora, anti-inflamatória e imunomoduladora (RIBEIRO et al. 1985; WIKEL; BERGMAN, 1997; STEEN et al., 2006; FRANCISCHETTI et al., 2009). Sugere-se que essas moléculas tenham co-evoluído ao longo da relação parasita-hospedeiro e que as mesmas seriam cruciais para superar as barreiras biológicas do hospedeiro, permitindo que o carrapato tivesse garantida sua completa alimentação e desenvolvimento (KAZIMIROVÁ; STIBRANIOVÁ, 2013).

Segundo Sonenshine (1991), a saliva dos carrapatos seria uma mistura complexa de moléculas, que variaria de acordo com: a interação parasita-hospedeiro, com o estado fisiológico do carrapato e seria, ainda, espécie-específica (RIBEIRO; FRANCISCHETTI, 2003; KAZIMIROVÁ; STIBRANIOVÁ, 2013).

Dentre os elementos presentes na saliva dos carrapatos destacam-se os componentes de origem glicoprotéica, lipoprotéica e lipídica (CAMARGO-MATHIAS et al., 2011), como calreticulina, fosfatase ácida, esterases, aminopeptidases, metaloproteinases, lipocalinas e prostaglandinas (BROSSARD; WIKEL, 2004; STEEN et al., 2006; MULENGA et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2011; CAMARGO-MATHIAS et al., 2011), entre muitas outras, com propriedades farmacológicas, atuando numa variedade de funções durante os períodos de parasitismo e de não parasitismo, a saber:

1.3.1. Hemostase do hospedeiro

Os carrapatos são capazes de modular o sistema hemostático de seus hospedeiros liberando na corrente sanguínea destes, moléculas vasodilatadoras, antiplaquetárias e anticoagulantes.

A hemostase é um complexo e eficiente mecanismo que controla a perda de sangue após dano vascular, por meio de uma série de eventos fisiológicos: a) coagulação que leva a produção de coágulos de fibrina, b) formação do trombo e cicatrização mediada por agregação plaquetária e c) vasoconstrição, que leva a diminuição da circulação sanguínea em vasos danificados (MONROE; HOFFMAN, 2006; CHMELAR et al., 2012).

Kazimírová (2007), Francischetti et al. (2009), Koh e Kini (2009) e Chmelar et al. (2012) estudaram os mecanismos pelos quais os carrapatos inibem a hemostase de seus hospedeiros e detectaram e caracterizaram diversos

componentes com atividades biológicas complexas, com potencial para o desenvolvimento de fármacos.

1.3.2. Vasodilatadores

Após a lesão dos vasos sanguíneos que é provocada pela inserção das peças bucais do carrapato na pele do hospedeiro, o ácido araquidônico é convertido em tromboxano A₂, um membro da família de lipídeos chamada de eicosanoides, substância que auxilia na agregação e degranulação plaquetária e ainda possui ação vasoconstritora (KAZIMÍROVÁ; STIBRÁNIOVÁ, 2013). Plaquetas ativadas liberam, ainda, serotonina que, junto com o tromboxano A₂, são responsáveis pela rápida vasoconstrição no local da inflamação causada pela injúria ao tecido. Para antagonizar a ação dos vasoconstritores produzidos pelo hospedeiro no local da lesão do tecido, vasodilatadores são secretados pelo carrapato, para facilitar a sucção do sangue durante seu processo de alimentação (KAZIMÍROVÁ; STIBRÁNIOVÁ, 2013). Compostos proteicos e não proteicos com ações vasodilatadoras já foram identificados na saliva dos carrapatos e incluem derivados de lipídios como prostaciclina e prostaglandinas (RIBEIRO et al., 1988, 1991; BOWMAN et al., 1996). Contudo, um fator de liberação de histamina (tHRF), secretado na saliva de *Ixodes scapularis* (DAI et al., 2010) e um inibidor de serina protease (IRS-s), e das catepsina G e quimase (CHMELAR et al., 2011), provavelmente atuam como moduladores da permeabilidade vascular (CHMELAR et al., 2012).

1.3.3. Inibidores de agregação plaquetária

Após o dano vascular causado pelos carrapatos, plaquetas aderem ao tecido subendotelial e se tornam ativas por agonistas como colágeno, trombina, adenosina difosfato (ADP) e tromboxano A₂. Agonistas ligam-se a receptores específicos na membrana das plaquetas e tem início uma longa e altamente complexa cadeia de reações químicas intracelulares que levam a agregação plaquetária e a formação de um tampão hemostático (KAZIMÍROVÁ; STIBRÁNIOVÁ, 2013). A cascata de reações da agregação plaquetária é alvo das substâncias produzidas pelo carrapato em diversos estágios (FRANCISCHETTI, 2010). Uma das estratégias utilizadas por esses artrópodes consiste em atacar o ADP, importante agonista para a conclusão da agregação plaquetária, pela liberação da apirase, uma enzima adenosina trifosfato (ATP) – difosfohidrolase, que hidrolisa as ligações de fosfodiéster do ATP e ADP (KAZIMÍROVÁ; STIBRÁNIOVÁ, 2013). A presença da atividade do tipo apirase já foi identificada nos carrapatos argasídeos *Ornithodoros moubata* (RIBEIRO et al., 1991), *O. savignyi* (MANS et al, 1998; 2002) e no ixodídeo *I. scapularis* (RIBEIRO, 1995).

Alguns derivados da saliva de carrapato apresentam inibidores de agregação plaquetária que interferem na interação colágeno/receptores plaquetários. A ativação de plaquetas pelo colágeno é inibida pela moubatina, proteína produzida pelo *O. moubata*, pertencente à família das lipocalinas (KAZIMÍROVÁ; STIBRÁNIOVÁ, 2013). Cheng et al., 1999, estudaram a ação da

longicornina, isolada do carrapato *Haemaphysalis longicornis* que também interage com o colágeno.

Outra enzima chave relacionada com a trombose e hemostase é a trombina, que participa da formação do coágulo de fibrina e induz a agregação plaquetária. Sua principal função é converter fibrinogênio em fibrina, desempenhando papel fundamental na coagulação (CHMELAR et al., 2011). Antitrombinas, como a serpina IRS-2 do carrapato *I. ricinus*, foram detectadas na saliva desses ixodídeos e acredita-se estarem envolvidas com a inibição da trombina e da cascata de coagulação (CHMELAR et al., 2011).

Alguns carrapatos utilizam, ainda, um mecanismo de inibição plaquetária bastante refinado, que consiste na secreção salivar de antagonistas de receptores de fibrinogênio na superfície da plaqueta, a glicoproteína tipo integrina (MANS et al., 2002). Estes antagonistas de receptores do tipo integrina são comumente designados como desintegrinas. Mans et al. (2002) estudaram a desintegrina savignygrina, secretada pelo carrapato *O. savignyi* inibidora da ligação plaqueta/fibrinogênio.

1.3.4. Inibidores da cascata de coagulação sanguínea

A coagulação sanguínea envolve uma série de reações enzimáticas em que uma proenzima inativa (fator de coagulação) é convertida em ativa, que interage com a próxima proenzima, em uma cascata de reações (KOH; KINI, 2009). Os carrapatos desenvolveram poderosas ferramentas que previnem ou prolongam a coagulação sanguínea para garantirem sua alimentação. Uma

diversidade de inibidores de serina proteases que estão envolvidas com a cascata de coagulação sanguínea foram identificadas e caracterizadas na saliva de carrapatos (KOH; KINI, 2009; KAZIMIROVÁ et al., 2010). Baseado no mecanismo de ação, anticoagulantes podem ser classificados em: inibidores de trombina, inibidores de ativação do fator X (FXa), inibidores do complexo tenase extrínseco (ETC), sendo a trombina e FXa os alvos mais comuns (KOH; KINI, 2009).

Vários inibidores de trombina derivados da saliva de carrapatos já foram identificados, tais como a americanina de *A. americanum* (ZHU et al., 1997), a madanina de *H. longicornis* (IWANAGA et al., 2003), a savignyina de *O. savignyi* (NIENABER et al., 1999), a calcarina de *R. (Boophilus) calcaratus* (MOTOYASHIKI et al., 2003) entre outros.

Os inibidores de proteases do tipo Kunitz interagem com diversas serinoproteases, levando a inibição da atividade enzimática do fator Xa, interrompendo a via do fator tissular e, conseqüentemente, a cascata de reações da coagulação sanguínea (PETERSEN et al., 1996). Entre estes inibidores, destacam-se o ixolaris e o penthalaris, isolados do carrapato *I. scapularis* (FRANCISCHETTI et al. 2002; 2004). O ixolaris tem ação antitrombótica e seu mecanismo é via ligação ao fator X e Xa, inibindo o complexo iniciador da via do fator tissular e complexo protrombinase (FRANCISCHETTI et al., 2002).

1.3.5. Ações anti-inflamatórias

Além de inibir as respostas de vasoconstrição e hemostasia, que são desencadeadas em função da lesão provocada pelas peças bucais, os carrapatos necessitam modular a inflamação, resposta inata e rápida a uma agressão ao hospedeiro. Com o rompimento dos vasos sanguíneos pelas peças bucais do carrapato, são produzidos e liberados componentes que exercem o recrutamento de mediadores inflamatórios humorais e celulares (ABBAS et al., 2008). A lesão vascular expõe os tecidos adjacentes, bem como fragmentos celulares, que por sua vez ativam uma série de reações inflamatórias. Nesse sentido, os carrapatos apresentam mecanismos anti-inflamatórios como, por exemplo, enzimas capazes de hidrolisar BK (cininases) (RIBEIRO; MATHER, 1998; BASTIANI et al., 2002), proteínas que se ligam e sequestram aminas biogênicas (histamina e serotonina) (SANGAMNATDEJ et al., 2002; MANS et al., 2008), inibidores de proteases envolvidas na resposta inflamatória (KOTSYFAKIS et al., 2006; PREVOT et al., 2009).

O endotélio vascular, contrapondo-se ao conceito inicial de que as células endoteliais atuavam como uma simples barreira mecânica inerte entre sangue e tecidos, participa ativamente nos distúrbios inflamatórios (BEHLING-KELLY; CZUPRYNSKI, 2007). Desse modo, Maxwell e colaboradores (2005) demonstraram que o extrato de glândulas salivares de *Dermacentor andersoni* e de *I. scapularis* reduziram a expressão de adesinas e selectinas na superfície de células endoteliais, proteínas essenciais nos processos de recrutamento e infiltração de células inflamatórias. Já Francischetti et al. (2005) observaram que

a saliva de *I. scapularis* teria atividade anti-angiogênica, modulando negativamente a cicatrização e o reparo tecidual, favorecendo o parasitismo hematófago de longa duração em algumas espécies de carrapatos.

1.3.6. Modulação imune do hospedeiro

A saliva dos carrapatos contém substâncias que são secretadas na corrente sanguínea dos hospedeiros que são capazes de induzir respostas imunes do tipo humoral e celular (WIKEL; ALLEN, 1977)

A resposta imunológica dos hospedeiros contra carrapatos envolve células apresentadoras de antígenos, citocinas, linfócitos B e T, granulócitos, entre outras células e moléculas (WIKEL; ALLEN, 1977).

Os linfócitos são as células que reconhecem e respondem especificamente a antígenos estranhos e são, conseqüentemente, os mediadores da imunidade humoral e celular (ABBAS et al., 2008). Os linfócitos B são as únicas células capazes de produzir anticorpos e que reconhecem antígenos extracelulares (incluindo os que se encontram na superfície celular) e se diferenciam em células secretoras de anticorpos, funcionando, assim, como mediadores da imunidade humoral (ABBAS et al., 2008). Os linfócitos T, células da imunidade celular, reconhecem os antígenos de agentes intracelulares, destruindo-os ou destruindo as células infectadas (ABBAS et al., 2008). Essas células não produzem anticorpos e seus receptores de antígenos são moléculas presentes na membrana, distintas dos anticorpos, mas estruturalmente relacionadas a eles (ABBAS et al., 2008). Há vários sub-grupos de linfócitos T,

como as células T auxiliares, os linfócitos T citolíticos ou citotóxicos, os reguladores e os *natural killer* (ABBAS et al., 2008). Em resposta à estimulação antigênica, as células T auxiliares secretam proteínas chamadas citocinas, cuja função é estimular a proliferação e diferenciação de células T, assim como a ativação de outras células, incluindo as células B, os macrófagos e outros leucócitos (ABBAS et al., 2008). As células *natural killer* (NK), estão envolvidas na imunidade natural contra os vírus e outros microorganismos extracelulares (ABBAS et al., 2008).

Em um estudo realizado por Paesen et al. (1999), foram encontradas proteínas na saliva do carrapato *R. appendiculatus*, que se ligam à histamina e a IgG, um dos principais anticorpos nas respostas imunes secundárias, subvertendo o sistema de defesa do hospedeiro.

Turni et al. (2007) verificaram que o extrato de glândula salivar de *R. (Boophilus) microplus* inibiu a proliferação de células T de bovinos em cultura, que foram estimuladas com mitógenos. Já Michalak et al. (1999) evidenciaram que a saliva bruta e o extrato de glândulas salivares *I. ricinus* tiveram efeito supressivo na resposta imune inata em camundongos BALB/c.

Foi identificada na saliva de *I. scapularis* uma proteína (Salp15) capaz de reprimir a produção de interleucina-2 (IL-2), que induziria a maturação de linfócitos B e T durante o desenvolvimento da resposta imune. Acredita-se que essa proteína modularia a resposta imunológica do hospedeiro, pela ligação específica com moléculas CD4 de células T. Nas células T, a glicoproteína CD4 funciona com um co-receptor do receptor de células T (TCR), amplificando o sinal gerado pelo TCR recrutando Lck, essencial para a ativação de muitas

moléculas envolvidas na cascata de sinalização de células T ativadas (JUNCADELLA et al., 2007). Essa interação entre Salp15 e CD4 causa a redução na produção de IL-2 durante o estímulo das células T (JUNCADELLA et al., 2007).

A fixação do carrapato ao seu hospedeiro pode resultar em uma rápida ativação do sistema complemento do mesmo devido à lesão causada em seus tecidos pelas peças bucais do ectoparasita. Lawrice et al. (1999), observaram que a saliva de carrapatos *I. ricinus*, *I. hexagonus*, *I. uriae* e *I. scapularis* modularam o sistema complemento tanto em animais em jejum quanto em alimentados e que a atividade anticomplemento das espécies da família Ixodidae seria espécie-específica para parasita-hospedeiro, sugerindo diferentes alvos de atividades anticomplemento entre as diferentes espécies dessa família de carrapatos, sendo que fatores ecológicos e fisiológicos exerceriam também um papel na determinação da suscetibilidade de um hospedeiro para uma espécie de carrapato em particular (NOLAN, 1985).

A proteína OmCI do sistema complemento, pertencente à família das lipocalinas, foi descrita no carrapato *O. moubata* e sua ação foi relacionada com a não ativação de moléculas essenciais da cascata de ativação do sistema complemento.

Outros estudos mostraram que a calreticulina, uma proteína que possui participação em diversas funções celulares como na ligação ao cálcio e está presente na saliva de algumas espécies de carrapatos (FERREIRA et al., 2002) apresenta atividade anticomplemento (JAWORSKI et al., 1995; MICHALAK et al., 1999; JOHNSON et al., 2001).

1.3.7. Agentes patogênicos

Devido às particularidades dos seus hábitos alimentares, os carrapatos são considerados como importantes vetores de patógenos (vírus, bactérias, protozoários e helmintos) para os animais silvestres, domésticos e para o homem (SONENSHINE, 1991). A transmissão de patógenos do carrapato para o hospedeiro dá-se também por meio da saliva, que exerce fundamental importância no sítio de inoculação, ao minimizar as reações imunológicas do hospedeiro contra o patógeno inoculado (SONENSHINE, 1991).

1.3.8. Cimento

Algumas espécies de carrapatos Ixodídeos secretam um material branco leitoso que sofre endurecimento, formando um cone que liga o hipostômio do carrapato à região da lesão na pele do hospedeiro. Tal estrutura é conhecida como cone de cimento e é formado por substâncias produzidas pelas glândulas salivares que garantem a forte fixação do ectoparasita, para realizar o processo de alimentação (SONENSHINE, 1991). A composição do cimento consiste em uma mistura de proteínas antigênicas e não antigênicas, além de lipídios e carboidratos (COWDRY; DANKS, 1933; FAWCETT et al., 1986; SONENSHINE, 1991).

1.3.9. Excreção e balanço hídrico

Os carrapatos excretam, na corrente sanguínea do hospedeiro, o excesso de água e íons acumulados durante o processo de alimentação, promovendo assim a concentração do sangue ingerido, com consequente diminuição do volume de alimento a ser digerido (GREGSON, 1960; 1967). Para manter a hidratação nos períodos de não parasitismo e seca, esses hematófagos secretam, ainda, uma solução higroscópica de sais, que é depositada na sua região bucal com função de absorção da água atmosférica (GREGSON, 1960; 1967).

1.4. Neoplasia

Mutações genéticas ou epigenéticas (alterações que comprometem o produto da expressão gênica sem afetar o DNA) em células normais podem resultar na produção de linhagens com um conjunto de alterações que pode levar a prejuízos fisiológicos, no sentido de torná-las incompetentes para desempenhar as mesmas funções daquelas consideradas normais. Dentre essas alterações estão aquelas que dizem respeito diretamente aos programas de crescimento celular, o que no caso de falhas levaria ao surgimento de populações fora dos padrões de construção e manutenção de um tecido normal, processo esse que daria origem à neoplasia (WEINBERG, 2008; PISTILLI, 2009). O agrupamento de células neoplásicas, por sua vez, originaria uma massa tecidual displásica, conhecida como tumor. As células displásicas são, na maioria das vezes, morfofisiologicamente distintas das sadias e apresentam

alterações que incluem aquelas no tamanho e na forma dos núcleos, aumento da relação de tamanho núcleo/citoplasma e aumento da atividade mitótica (WEINBERG, 2008).

As mudanças que ocorrem numa célula são consequência de mutações pontuais ou uma série progressiva de alterações oriundas de diversos fatores, e dois grupos de genes correlacionam-se diretamente com essas alterações:

1) os proto-oncogenes, que atuam diretamente no controle do ciclo celular e que quando mutados e/ou modificados aumentam sua expressão, acelerando a proliferação celular (LUO, 2008).

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

As células transformadas possuem a capacidade de driblar os mecanismos de controle do ciclo celular, da apoptose e da ativação imunológica do seu meio ambiente, o que favorece a proliferação descontrolada. Elas adquirem então potencial, através de sucessivas divisões celulares, para dar origem a um conjunto de células (aproximadamente um milhão delas) no caso de um tumor (PISTILLI, 2009).

Os tumores são classificados em quatro grandes grupos de acordo com sua origem: a) epitelial, b) mesenquimal, c) hematopoiético e d) neuroectodermal). A

maioria dos tumores se desenvolve a partir de tecidos epiteliais e são denominados de carcinomas, podendo ser considerados as neoplasias mais comuns em humanos (WEINBERG, 2008). O restante dos tumores malignos se desenvolve a partir de tecidos não-epiteliais do organismo, sendo que a principal classe de neoplasias não-epiteliais, os sarcomas, derivam dos diversos tecidos conjuntivos, que possuem como origem o mesoderma do embrião (WEINBERG, 2008). Um segundo grupo de tumor não-epitelial se desenvolve a partir das células que constituem os tecidos formadores de sangue (hematopoiético) e as do sistema imune (WEINBERG, 2008). Já o terceiro e último dos maiores grupos de tumores não-epiteliais se desenvolve a partir de células que formam os diversos componentes do sistema nervoso central e periférico e são comumente denominados de tumores neuroectodermais, por sua origem ser na camada celular externa do embrião recém-formado (WEINBERG, 2008).

O crescimento do tumor pode ser limitado por ser dependente, inicialmente, de processos de difusão para receber oxigênio e nutrientes, bem como para eliminar produtos de excreção (FOLKMAN, 1985; GASTL et al, 1997; LIU et al., 2015). Portanto, para o sucesso do desenvolvimento, o tumor induz a neoangiogênese (AUSPRUNK; FOLKMAN, 1977; LIU et al., 2015). Segundo Kerbel e Folkman (2002), o crescimento tumoral seria estritamente dependente da angiogênese, sendo que as células que compõem o tumor passariam a produzir fatores pró-angiogênicos, que induzem as células endoteliais a degradar a lâmina basal dos vasos localizados ao redor do tumor (KNIES-BAMFORTH et al., 2004).

A angiogênese é um processo complexo orquestrado por citocinas e fatores de crescimento, e que tem início com a estimulação de células endoteliais em quiescência, evoluindo para o estado de rápida proliferação e migração, terminando com a re-diferenciação de células endoteliais ativadas em tubos vasculares (FOLKMAN, 2006; LIU et al., 2015). A célula endotelial reveste internamente a parede dos vasos sanguíneos além de controlar o tônus vascular, a coagulação, a trombólise, a remodelação vascular e as respostas imune e inflamatória (RAMOS, 2008).

Uma vez que o tumor passa a ter suprimento sanguíneo, ele poderá adquirir a capacidade de invadir e colonizar regiões distantes daquela de origem, processo esse denominado de metástase, o mais temido e menos entendido aspecto da neoplasia (ENNS et al., 2004; WEINBERG, 2008). Esta capacidade depende, além dos fatores angiogênicos, da expressão de moléculas de adesão como as integrinas e as selectinas, permitindo a disseminação de células tumorais através dos vasos sanguíneos (ENNS et al., 2004).

2. OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivo analisar o comportamento morfofisiológico de células de linhagem tumoral SK-HEP-1 (*American Type Culture Collection* (ATCC): HTB-52) e HEP-G2 (ATCC: HB-8065) frente exposições ao extrato de glândulas salivares de fêmeas do carrapato *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) alimentadas por quatro dias em coelhos hospedeiros. Para tanto realizou-se:

1 - Caracterização do extrato por meio de espectrometria de massas (LCMS-IT-TOF), utilizando a estratégia *Shotgun*.

2 - Análise do potencial citotóxico do extrato sobre células das linhagens tumorais SK-HEP-1 e HEP-G2, por meio de ensaios de MTT;

3 - Verificação das possíveis alterações nas células SK-HEP-1 e HEP-G2 expostas ao extrato, por meio de técnicas de Microscopia de Confocal de Varredura a Laser específicas para o núcleo e filamentos de actina;

4 - Análise do padrão de transcrição de mRNAs envolvidos nos eventos ou mecanismos de morte celular por apoptose, incluindo os produtos dos genes *Bax*, *Bcl-2*, *Caspases 3 e 9*, *Fas* e *Interleucina 1 α* (*IL-1 α*), das células das linhagens tumorais SK-HEP-1 e HEP-G2 expostas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Infestação para obtenção do extrato de glândulas salivares

Para a obtenção do extrato de glândulas salivares foram utilizadas fêmeas adultas do carrapato *R. sanguineus* (Latreille, 1806), mantidas em colônia em sala do Biotério do Instituto de Biociências - IB, da UNESP, Rio Claro - SP, Brasil, sendo que nas fases de não parasitismo as mesmas foram mantidas em estufa BOD em condições controladas (28°C, 80% de umidade e fotoperíodo de 12 horas). Para a alimentação dos carrapatos, foram utilizados como hospedeiros coelhos *New Zealand White* pesando cerca de 1.5 Kg que receberam ração apropriada e água *ad libitum*.

As infestações dos carrapatos foram realizadas conforme metodologia descrita por Bechara et al. (1995), em coelhos não imunizados (sem contato prévio com carrapatos) para aquisição de fêmeas com quatro dias de alimentação e para obtenção do extrato de glândulas salivares. O período de quatro dias foi escolhido com base no estudo do ciclo glandular de *R. sanguineus*, visto ser este o período de rápido ingurgitamento (grande consumo de sangue), quando as glândulas salivares exibem maior atividade de síntese e secreção de substâncias envolvidas com a fixação do carrapato no hospedeiro e com o consumo de sangue (FURQUIM, 2007).

Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animal – CEUA da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Rio Claro – SP, protocolo nº 6269, decisão nº 21/2013 (**Anexo A**).

3.2. Obtenção do extrato de glândulas salivares

Foram utilizadas 1000 fêmeas adultas de *R. sanguineus* alimentadas por quatro dias, retiradas do hospedeiro pela região do hipostômio com auxílio de pinça entomológica, com a aplicação de movimentos circulares. A seguir, os carrapatos foram colocados em placas de Petri contendo tampão fosfato-salino (PBS) (8,0 g de NaCl, 0,2 g de KCl, 1,14 g de Na₂HPO₄, 0,2 g de KH₂PO₄ e 1000 mL de água ultrapura) para a remoção das glândulas salivares.

Para o preparo do extrato, as glândulas foram maceradas em microtubos de 1,5 mL contendo 200 µL de PBS e estes foram centrifugados por 15 minutos a 8.000 rpm. O sobrenadante recolhido foi filtrado utilizando-se uma unidade filtrante HV em PE com membrana durapore 0,45U de poro, 13 mm, não estéril (MILLIPORE) e depositado em novos microtubos de 1,5 mL. Os extratos foram armazenados em freezer a -80°C.

3.3. Quantificação de proteínas

A quantificação de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), utilizando albumina bovina (BSA) como padrão. As leituras das absorbâncias foram realizadas em espectrofotômetro Thermo BioMate 3 (Madison, EUA).

4. RESULTADOS

Os resultados desse trabalho estão sendo apresentados na forma de capítulos, sendo:

- **Capítulo 1:** Caracterização do extrato de glândulas salivares de fêmeas de carrapato *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) alimentadas por quatro dias em coelhos hospedeiros.
- **Capítulo 2:** Ação do extrato de glândulas salivares de fêmeas de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) sobre a inibição da proliferação de células de linhagem tumoral.

CAPÍTULO 1:

Caracterização do extrato de glândulas salivares de fêmeas de carrapato *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) alimentadas por quatro dias em coelhos hospedeiros.

RESUMO

Os carrapatos são ectoparasitas hematófagos de grande importância médico-veterinária, por serem vetores de inúmeras doenças. Esses artrópodes produzem uma saliva que garante sua alimentação e sobrevivência, em cuja composição encontram-se moléculas capazes de modular o sistema imuno-inflamatório e hemostático do hospedeiro. Essa complexa mistura tem sido estudada e tem se mostrado importante, principalmente devido a presença de bioativos com ações vasodilatadora, anti-inflamatória, anticoagulante e imunossupressora. No presente estudo, foi realizada a caracterização do extrato de glândulas salivares de fêmeas do carrapato *R. sanguineus* alimentadas por quatro dias em coelhos hospedeiros, por meio de espectrometria de massas (LCMS—IT-TOF) pela estratégia de *Shotgun*. Para tanto, fêmeas adultas alimentadas por quatro dias em coelhos *New Zealand White* não imunizados foram coletadas e tiveram suas glândulas salivares removidas para obtenção de extrato, que posteriormente foi submetido para análise em espectrômetro de massas (LCMS-IT-TOF). A partir dos dados obtidos pela espectrometria e utilização das ferramentas de bioinformática proteômica foram identificadas 14 proteínas, com diversas funções tais como: componentes estruturais de junções celulares, do citoesqueleto, do nucleossomo das glândulas salivares, além da presença de proteínas com ações anticoagulante e anti-inflamatória.

Palavras-chave: carrapato, saliva, proteômica, proteínas, bioinformática.

1. INTRODUÇÃO

Os carrapatos formam um grupo de grande importância entre os artrópodes, visto serem ectoparasitas hematófagos com grande relevância epidemiológica por serem vetores de vírus, bactérias, protozoários e helmintos que atacam animais domésticos, silvestres e o próprio homem (SONENSHINE, 1991; DANTAS-TORRES, 2010). Esses ácaros parasitam animais de diferentes grupos como mamíferos, aves, répteis e anfíbios, possuem ampla distribuição geográfica (SONENSHINE, 1991; KEIRANS; DURDEN, 2005) e tem o *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806), popularmente conhecido como carrapato vermelho do cão, como uma das espécies importantes do ponto de vista médico-veterinário (LABRUNA, 2004; DANTAS-TORRES et al., 2010).

Considerando que durante a alimentação os carrapatos necessitam permanecer fixados aos seus hospedeiros por períodos variáveis, estes animais precisam produzir um grande, diversificado e eficaz arsenal farmacológico, o que se dá por meio da produção da saliva a qual garante sua alimentação (via fixação) e sobrevivência (RIBEIRO et al. 1985; WIKEL; BERGMAN, 1997; STEEN et al., 2006; FRANCISCHETTI et al., 2010). A saliva dos carrapatos geralmente contém substâncias de natureza proteica, glicoproteica e lipoproteica (BINNINGTON, 1978; WHEELER et al., 1991; SHIPLEY et al., 1993), representadas por compostos como: fosfatases ácidas, esterases, aminopeptidases, metaloproteases, calreticulinas, prostaglandinas, lipocalinas (BINNINGTON, 1978; JAWORSKY et al., 1995; STEEN et al., 2006; HARNOI et al., 2007; MULENGA et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2011), entre outras, que tem

potencial de modular o sistema imune-inflamatório e hemostático dos hospedeiros (WIKEL; BERGMAN, 1997; STEEN et al., 2006; HAJNICKÁ et al., 2011).

Considerando a complexidade dos compostos da saliva destes animais, diferentes pesquisas têm buscado a identificação e isolamento de moléculas bioativas com ações diversas, tais como: vasodilatadora, anti-inflamatória, anticoagulante e imunossupressora (FRANCISCHETTI et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2010; SIMONS et al., 2011). Ainda dentre as funções atribuídas à saliva dos carrapatos, a de agente atenuante da angiogênese (FRANCISCHETTI et al., 2002) tem sido demonstrada, bem como a de agente antitumoral (SIMONS et al., 2011).

A análise proteômica por *Shotgun* é um método amplamente utilizado para identificar proteínas consideradas menos abundantes ou até mesmo pouco representadas em uma amostra complexa, utilizando uma combinação analítica: cromatográfica líquida de alta resolução (HPLC) e espectrometria de massas (PALMA, 2013). Nessa abordagem, as proteínas são digeridas por uma enzima proteolítica e os peptídeos resultantes são separados por HPLC. Em seguida, esses peptídeos são analisados por espectrometria de massas sequencial (MS/MS) para posterior identificação das sequências dos peptídeos utilizando-se ferramentas da bioinformática proteômica (PALMA, 2013).

2. OBJETIVO

Este estudo teve como objetivo principal caracterizar o extrato de glândulas salivares de fêmeas de carrapatos *R. sanguineus* (Latreille, 1806) alimentadas por quatro dias em coelhos hospedeiros, por meio da análise proteômica por espectrometria de massas (LCMS-IT-TOF), utilizando a estratégia *Shotgun*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Para o desenvolvimento deste trabalho foram utilizados os equipamentos disponíveis no Laboratório de Biologia Estrutural e Zooquímica (LBEZ) do Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) do Instituto de Biociências da UNESP de Rio Claro – SP, o qual tem como coordenador o Prof. Dr. Mario Sérgio Palma. Para a realização das técnicas houve o auxílio direto da Ms. Nathalia Baptista Dias.

3.1. Digestão de proteínas em solução para estratégia *Shotgun*.

As proteínas presentes no extrato de glândulas salivares de fêmeas de carrapatos *R. sanguineus* com quatro dias de alimentação em coelhos hospedeiros, foram solubilizadas em 50 µL de bicarbonato de amônio 50 mM, pH 7.9 contendo 7.5 M ureia, durante 1 h à 37°C e então reduzidas com DTT 10mM à 37°C durante 1 h. Após este tratamento, as proteínas foram alquiladas com iodoacetamida (IAA) 40 mM à 25°C, durante 1 h na ausência de luz. As amostras foram diluídas cinco vezes com bicarbonato de amônio 100 mM, pH 7,8, e cloreto de cálcio na concentração de 1 mM. Foi adicionada tripsina (Promega) à solução de proteína desnaturada (1:50 w/w de tripsina: proteína) por um período de 18 h, a 37 ° C. A reação foi descontinuada com a adição de 5 µL de ácido fórmico. As amostras digeridas foram dessalinizadas utilizando-se uma coluna Sep-pak tc 18 1cc Vac Cartridge (Waters). Os peptídeos tripticos foram solubilizados em 50% MeCN e submetidos à análise em sistema LC-IT-TOF/MS e MSn.

3.2. Espectrometria de massas (LCMS-IT-TOF)

As amostras provenientes da digestão em solução, foram analisadas com a utilização do sistema LCMS-IT-TOF. Foi utilizado o sistema UFLC (Shimadzu) acoplado diretamente (*on line*) ao espectrômetro de massas, contendo duas bombas LC-20AD, detector de arranjo de diodos SPD-M20A, amostrador automático SIL-20AHT e forno para coluna CTO-20A. A análise foi realizada sob gradiente de acetonitrila de 5 a 90% (v/v), contendo 0.05% de TFA (v/v), por 90 min., utilizando-se uma coluna C-18 Shim-pack XR-ODS (3x100 mm), com poros de 120 Å, com partículas de 2,2 µm (Shimadzu). A eluição dos componentes foi monitorada por absorbância ultravioleta a 214 nm através do sistema UFLC (Shimadzu), com fluxo de 0,2 mL/min, durante 90 minutos. Os eluentes foram analisados no modo positivo (ESI+) contínuo, durante todo o experimento.

A obtenção dos espectros de massa foi realizada em um Espectrômetro de Massas com fonte ESI, do tipo “*Ion Trap - Time of Flight*” (IT-TOF Shimadzu). O *software LCMS solution* (Shimadzu) foi utilizado para controle de aquisição e análise de dados. Durante todos os experimentos a temperatura do CDL e da interface foi mantida a 200°C, a voltagem na agulha a 4.5 kV e a voltagem no cone a 3.5V. O fluxo de gás secante (Nitrogênio) foi de 100 L/h e o fluxo de gás nebulizador (Nitrogênio) de 1.5 L/h. A detecção no espectrômetro foi realizada com varreduras em intervalos de m/z 200 a 4000, com resolução de aproximadamente 15000; o sistema de aquisição de dados foi operado em modo positivo contínuo.

Os experimentos de espectrometria de massas sequenciais, ou seja, de fragmentação peptídica (MS2) foram realizados utilizando-se os mesmos parâmetros dos experimentos de MS. Foi utilizado Argônio como gás de colisão a uma pressão de 100 kPa. Os íons produzidos através dos experimentos MS/MS foram aprisionados e acumulados durante 50 milissegundos no *Ion Trap*, utilizando-se energia de colisão de 50% e frequência de 30 kHz.

Os espectros de massas obtidos foram analisados primeiramente com as ferramentas do *software LCMS solution* (Shimadzu), utilizado para controle de aquisição e análise de dados.

3.3. Identificação das Proteínas

Para a identificação das proteínas foram utilizados os bancos de dados: *Protein Data Bank* (PDB), *Swissprot* (Uniprot, 2012) e o *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Os dados de MS e MS/MS foram submetidos à ferramenta “*Mascot protein engine search*” (<http://www.matrixscience.com>) baseando-se no “*National Center for Biotechnology Information*” (NCBI) com buscas abertas a todos os organismos e buscas restritas à taxonomia de Metazoa.

Os parâmetros utilizados para a busca nos bancos de dados foram a tolerância de massa do peptídeo de 0,5 Da e a tolerância da massa dos fragmentos peptídicos de 0,8 Da e o número de clivagens faltante igual a 1. Para modificações dos peptídeos, foram consideradas: carbamidometilação e oxidação da metionina e do triptofano. Os valores de “*ion score*” e “*protein score*”

considerados significantes foram os valores pré-estabelecidos pela ferramenta de bioinformática utilizada. A comparação entre as massas moleculares (MM) teóricas e experimentais e os valores de PI (ponto isoelétrico) também foram considerados para as identificações.

4. RESULTADOS

A análise do extrato de glândulas salivares de fêmeas do carrapato *R. sanguineus* alimentadas por quatro dias em coelhos hospedeiros, por meio das técnicas de espectrometria de massas (LCMS-IT-TOF) pela estratégia de *Shotgun* e a utilização de ferramentas da bioinformática proteômica, permitiram a identificação de um total de 14 proteínas com função e atuação específica, as quais encontram-se relacionadas na **Tabela 1**, com: **a)** o nome da proteína identificada, **b)** o seu número de acesso no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), **c)** a massa molecular (MM) e **d)** o ponto isoelétrico (PI). Nesta tabela também é possível observar a porcentagem de coberturas das sequências de aminoácidos que as proteínas deste estudo obtiveram ao serem comparadas e identificadas com as sequências daquelas já depositadas nos bancos de dados, também estão descritas sequências de aminoácidos dos fragmentos das proteínas que serviram de referência para a identificação.

Os valores de *Mascot Score* e de *Ion Score* obtidos indicaram o grau de acertos e de aproximações, entre os valores experimentais e teóricos depositados nos bancos, ou seja, a proteína considerada a mais provável foi aquela que apresentou o maior número de acertos (pontos na classificação ou *score*).

Tabela 1. Proteínas identificadas por meio da espectrometria de massas (LCMS-IT-TOF) pela estratégia de *Shotgun*, presentes no extrato de glândulas salivares de fêmeas de *Rhipicephalus sanguineus* alimentadas por quatro dias em coelhos hospedeiros. Os nomes das proteínas estão em inglês, conforme obtido nos bancos de dados. MM = massa molecular, PI = ponto isoelétrico.

Identificação	Nº de acesso	MM	PI	% de		Mascot	Sequência	Íon score
				cobertura da	sequência			
<i>Afadin</i>	XP_002404205.1	207702	6.06	1	19	K.LGIYVKSVVK.G		19
<i>AT11330p</i>	AAO41490.1	95605	5.86	1	21	R.MMGHDEMAENDGDMRR.E		21
<i>ATP-dependent RNA helicase, putative</i>	XP_002408280.1	74680	5.39	1	19	R.AERLNAR.L		19
<i>Beta-actin</i>	ACK77780.1	42143	5.31	13	25	K.DLYSNVVLSGGSTMYPGIADR.M		25
<i>Charged multivesicular body protein 2b</i>	BAM20561.1	23935	8.79	3	19	K.KMAKAGNK.D		19

Conserved	hypothetical	XP_002403178.1	46338	5.93	1	19	K.KVIGWYR.F	19
Enolase		ABY55696.1	46702	6.28	6	24	K.LGANAILGVSLAWCKAGAAEKGLPLYK.Y	24
ETS	transcription factor	AAM33363.1	63280	6.06	2	20	R.EATGGGNSGEK.S	20
E74A								
Histone 2A		XP_002403498.1	13352	10.90	23	44	R.VGAGAPVYLAADVLEYLAAEVLELAGNAAR.D	44
Histone H2B		XP_002402621.1	21971	10.71	7	26	K.AMGIMNSFLNDIFER.I	26
Hypothetical	protein	ERL83643.1	80523	6.72	1	19	R.APGRASRPK.K	19
D910_00785								
Kruppel-like protein 1		AGT57869.1	105639	7.33	0	19	R.TSSTRDR.L	19
NudE, isoform D		NP_001137930.1	36330	5.10	5	21	K.QSIIKDLTAKLTMFER.E	21
Thioredoxin peroxidase		AAQ23082.1	21952	5.52	4	19	K.DIKLSDYK.G	19

5. DISCUSSÃO

Os carrapatos, artrópodes ectoparasitas, constituem um dos mais importantes grupos dos pontos de vista médico e veterinário, uma vez que provocam lesões nos hospedeiros, seja no processo de repasto sanguíneo ou pela transmissão de agentes patogênicos como arboviroses, rickettsioses, espiroquetoses, protozoários, entre outros (KAUFMAN, 1989).

Os carrapatos são animais que necessitam permanecer fixados aos seus hospedeiros para alimentação e, para tanto, precisam produzir e secretar um arsenal farmacológico, via saliva, que tenha potencial de garantir esse processo de alimentação e consequentemente garantir a sobrevivência do animal (RIBEIRO et al. 1985; WIKEL; BERGMAN, 1997; STEEN et al., 2006; FRANCISCHETTI et al., 2010). Dados da literatura tem demonstrado que nesta saliva podem ser encontradas moléculas das mais variadas naturezas e funções, inclusive atuando na modulação do sistema imune-inflamatório e hemostático dos hospedeiros (STEEN et al., 2006; HAJNICKÁ et al., 2011) sendo, portanto, considerada um reservatório de moléculas multifuncionais, onde estão presentes bioativos de grande interesse (BATISTA et al., 2010).

Nesse sentido a proposta do presente estudo foi a de caracterizar o extrato de glândulas salivares de fêmeas de carrapatos *R. sanguineus* com quatro dias de alimentação em coelhos hospedeiros, por meio da análise proteômica por espectrometria de massas (LCMS-IT-TOF), utilizando a estratégia *Shotgun* e ferramentas de bioinformática proteômica, técnicas estas que permitiram a identificação de um total de 14 proteínas presentes nesse extrato (**Tabela 1**).

Os resultados aqui obtidos revelaram a presença da afadina, componente de junções celulares; beta-actina, componente do citoesqueleto, e histonas H2A e H2B, que compõem o nucleossomo. A presença dessas proteínas já era um resultado esperado, visto que as mesmas fazem parte de estruturas celulares das glândulas salivares dos carrapatos, utilizadas para a obtenção do extrato. Além destas, enzimas como a RNA helicase dependente de ATP, envolvidas no metabolismo de RNAs, e fatores de transcrição e regulação de expressão gênica como a *AT11330p*, *ETS transcription fator E74A*, *Kruppel-like protein 1*, foram identificadas no extrato, estando as mesmas envolvidas com os mecanismos de divisão celular (IKEDA et al., 1999). Foi identificada, ainda, a *Charged multivesicular body protein 2b*, que compõe o sistema de transporte do endossomo, para a formação dos corpos multivesiculares (endossomos tardios) e a *NudE, isoform D*, que participa da formação dos fusos mitóticos, componentes esses das estruturas celulares das glândulas salivares (BODON et al., 2011).

A análise do extrato de glândulas salivares de *R. sanguineus* aqui realizada mostrou a presença de uma proteína com ação anti-hemostática, a enolase, também conhecida como fosfopiruvato hidratase (PANCHOLI, 2001). A produção dessa proteína é um dos mecanismos pelo qual os carrapatos dessa espécie utilizam para driblar a coagulação sanguínea dos hospedeiros, visto que essa proteína é uma enzima glicolítica multifuncional conhecida por agir nos receptores de plasminogênio das membranas celulares promovendo a fibrinólise, processo através do qual um coágulo de fibrina (produto da coagulação do sangue) é degradado depois de cumprida sua função (coagulação sanguínea) (DÍAZ-MARTIN et al., 2013). A hemostase é um complexo e eficiente mecanismo que controla a perda de sangue

após dano vascular, por meio de uma série de eventos fisiológicos: a) a coagulação que leva a produção de coágulos de fibrina, b) a formação do trombo e cicatrização mediada por agregação plaquetária e c) a vasoconstrição, que leva a diminuição da circulação sanguínea em vasos danificados (MONROE; HOFFMAN, 2006; CHMELAR et al., 2012).

Kazimírová (2007), Francischetti et al. (2009), Koh e Kini (2009) e Chmelar et al. (2012) estudaram os mecanismos pelos quais os carrapatos inibem a hemostase de seus hospedeiros, resultados que levaram a descoberta e caracterização de diversos componentes com atividades biológicas complexas, com potencial para o desenvolvimento de fármacos. Assim a detecção dessa proteína no extrato aqui analisado vem confirmar a necessidade de mecanismos e de estruturas que evitem a coagulação do sangue do hospedeiro durante a alimentação do carrapato, permitindo assim que o mesmo possa continuar ou mesmo concluir seu processo de alimentação (SONENSHINE, 1991).

Os dados aqui obtidos permitiram ainda identificar a presença da *Thioredoxin peroxidase*, uma proteína antioxidante que funciona como peroxidase (ZHANG et al., 1997), e que já foi descrita por Ribeiro et al. (2006) no carrapato *Ixodes scapularis* com função de prevenir reações oxidantes provenientes das respostas inflamatórias na região de fixação do carrapato no hospedeiro. Durante o processo inflamatório ocorre a geração de radicais livres como parte do processo fisiológico do metabolismo aeróbico, contudo a peroxidase atua na desintoxicação celular ao eliminar o peróxido de hidrogênio (RIBEIRO et al., 2006), permitindo assim, a diminuição das respostas inflamatórias e, conseqüentemente, garantindo a alimentação do ectoparasita. Diversas proteínas presentes na saliva de carrapatos apresentam mecanismos que

agem como anti-inflamatórios como, por exemplo, as enzimas capazes de hidrolisar BK (cininases) (RIBEIRO; MATHER, 1998; BASTIANI et al., 2002), que se ligam e sequestram aminas biogênicas (histamina e serotonina) (SANGAMNATDEJ et al., 2002; MANS et al., 2008), inibidores de proteases envolvidas na resposta inflamatória (KOTSYFAKIS et al., 2006; PREVOT et al., 2009), entre outras.

Dessa forma, pelos dados obtidos pela espectrometria de massas (LCMS-IT-TOF), utilizando a estratégia *Shotgun* e pelas ferramentas de bioinformática proteômica, ficou evidente que o extrato de glândulas salivares de carrapatos *R. sanguineus* é uma mistura complexa de moléculas onde podem ser encontrados elementos com potencial farmacológico, que no caso tem potencial de agir como anticoagulantes e anti-inflamatórios (RIBEIRO et al. 1985; WIKEL; BERGMAN, 1997; STEEN et al., 2006; FRANCISCHETTI et al., 2009), funções estas que permitem que os indivíduos dessa espécie driblem as respostas biológicas de seus hospedeiros, e assim garantam sua completa alimentação e desenvolvimento (KAZIMIROVÁ; STIBRANIOVÁ, 2013).

Sendo assim, esse estudo vem fornecer as primeiras informações sobre a composição proteica do extrato aqui estudado, sinalizando que o mesmo tem potencial para ser testado em estudos que tratem das ações anticoagulante e anti-inflamatória, com o intuito de se isolar moléculas de interesse farmacêutico.

REFERÊNCIAS

- BASTIANI, M.; HILLEBRAND, S.; HORN, F.; KIST, T.B; GUIMARÃES, J.A.; TERMIGNONI, C. Cattle tick *Boophilus microplus* salivary gland contains a thiol-activated metalloendopeptidase displaying kininase activity. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 32, p.1439-1446, 2002.
- BATISTA, I.F.; RAMOS, O.H.; VENTURA, J.S.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I.L.; HO, P,L.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A.M. A new factor Xa inhibitor from *Amblyomma cajennense* with a unique domain composition. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, United States, v. 493, p.151–156, 2010.
- BINNINGTON, K.C. Sequential changes in salivary gland structure during attachment and feeding of the cattle tick *Boophilus microplus*. **International Journal for Parasitology**, United Kingdom, v. 8, p. 97-115, 1978.
- BODON, G.; CHASSEFEYRE, R.; PERNET-GALLERY, K.; MARTINELLI, N.; EFFANTIN, G.; HULSIK, D.L; BELLY, A.; GOLDBERG, Y.; CHATELLARD-CAUSSE, C.; BLOT, B.; SCHOEHN, G.; WEISSENHORN, W.; SADOUL, R. Charged multivesicular body protein 2B (CHMP2B) of the endosomal sorting complex required for transport-III (ESCRT-III) polymerizes into helical structures deforming the plasma membrane. **J Biol Chem**, v. 46, p. 40276-86, 2011.
- CHMELAR J.; CALVO, E.; PEDRA, J.H.F.; FRANCISCHETTI, I.M.B.; KOTSYFAKIS, M. Tick salivary secretion as a source of antihemostatics. **Journal of Proteomics**, v. 75, p. 3842–3854, 2012.
- DANTAS-TORRES, F. Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. **Parasites & Vectors**. United Kingdom v.3, p. 1-11, 2010.
- DIAZ-MARTIN, V.; MANZANO-ROMÁN, R.; OLEAGA, A.; ENCINAS-GRANDES, A.; PÉREZ-SÁNCHEZ, R. Cloning and characterization of a plasminogen-binding enolase from the saliva of the argasid tick *Ornithodoros moubata*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 191, p. 301-314, 2013.
- FRANCISCHETTI, I.M.; VALENZUELA, J.G.; ANDERSON, J.F.; MATHER, T.N.; RIBEIRO, J.M. Ixolaris, a novel recombinant tissue factor pathway inhibitor (TFPI) from the salivary gland of the tick *Ixodes scapularis* identification of factor X and factors Xa as scaffolds for the inhibition of factor VIIa/tissue factor complex. **Blood**, United States, v. 99, p. 3602-3612, 2002.
- FRANCISCHETTI, I.M.B.; SÁ-NUNES, A.; MANS, B.J.; SANTOS, I.M.; RIBEIRO, J.M.C. The role of saliva in tick feeding. **Frontiers in Bioscience**, United States, v.14, p. 2051-2088, 2010.
- FRANCISCHETTI, I.M.B.; SÁ-NUNES, A.; MANS, B.J.; SANTOS, I.M.; RIBEIRO, J.M.C. The role of saliva in tick feeding. **Frontiers in Bioscience**, v.14, p. 2051–2088, 2009

HAJNICKÁ, V.; VANCOVÁ, I.; SLOVÁK, M.; KOCÁKOVÁ, P.; NUTTALL, P.A. Ixodid tick salivary gland products target host wound healing growth factors. **International Journal for Parasitology**, United Kingdom, v.41, p. 213-223, 2011.

HARNNOY, T.; SAKAGUCHI, T.; NISHIKAWA, Y.; XUAN, X.; FUJISAKI, K. Molecular characterization and comparative study of 6 salivary gland metalloproteases from the hardy tick, *Haemaphysalis longicornis*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, United States, v. 147B, p. 93-101, 2007.

IKEDA, W.; NAKANISHI, H.; MIYOSHI, J.; ISHIZAKI, H.; TANAKA, M.; TOGAWA, A.; TAKAHASHI, K.; NISHIOKA, H.; YOSHIDA, H.; MIZOGUCHI, A.; NISHIWAKA, S.; TAKAI, Y. Afadin: A key molecule essential for structural organization of cell-cell junctions of polarized epithelia during embryogenesis. **Journal of Cell Biology**. New York, US, v. 146, n. 5, p. 1117-1132, 1999.

JAWORSKI, D.C.; SIMMEN, F.A.; LAMOREAUX, W.; COONS, L.B.; MULLER, M.T.; NEEDHAM, G.R. A secreted calreticulin protein in ixodid tick (*Amblyomma americanum*) saliva. **Journal of Insect Physiology**, United Kingdom, v. 41, p. 369-375, 1995.

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

KAZIMÍROVÁ, M. Bioactive compounds in ticks acting on host thrombohemostasis, In: WIWANITKIT, V. (Ed.). **Thrombohemostatic Disease Research**, New York: Nova Science Publishers Inc, 2007, p. 95–113

KAZIMÍROVÁ, M.; STIBRANIOVÁ, I. Tick salivary compounds: their role in modulation host defenses and pathogen transmission. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, p. 3-43, 2013.

KEIRANS, J.E.; DURDEN, L.A. Tick systematics and identification. In: Goodman JL, Dennis DT, Sonenshine DE (eds), **Tick-borne diseases of humans**, ASM Press, pp 123-140, 2005.

KOH, C.Y.; KINI, R.M. Molecular diversity of anticoagulants from haematophagous animals. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 102, p. 437–453, 2009.

KOTSYFAKIS, M.; SÁ-NUNES, A.; FRANCISCHETTI, I.M.; MATHER, T.N.; ANDERSEN, J.F.; RIBEIRO, J.M. Antiinflammatory and immunosuppressive activity of sialostatin L, a salivary cystatin from the tick *Ixodes scapularis*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, p.26298-26307, 2006.

LABRUNA, M.B. Biologia-ecologia de *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 13, n. 1, p. 123-124, 2004.

MANS, B.J.; RIBEIRO, J.M.; ANDERSEN, J.F. Structure, function, and evolution of biogenic amine-binding proteins in soft ticks. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 283, p.18721-18733, 2008.

MONROE, D.M.; HOFFMAN, M. What does it take to make the perfect clot? **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v.26, p.41-48, 2006.

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

OLIVEIRA, C.J.; CARVALHO, W.A.; GARCIA, G.R.; GUTIERREZ, F.R.; DE MIRANDA SANTOS, I.K.; SILVA, J.S.; FERREIRA, B. R. Tick saliva induces regulatory dendritic cells: MAP-kinases and Toll-like receptor-2 expression as potential targets. **Veterinary Parasitology**. Netherlands v.167, p. 288-297, 2010.

OLIVEIRA, J.C.; SÁ-NUNES, A.; FRANCISCHETTI, I.M.B.; CARREGARO, V.; ANATRIELLO, E.; SILVA, J.S.; *et al.* Deconstructing saliva. Non-protein Molecules with potente immunomodulatory properties. **The Journal of Biological Chemistry**, United States, v. 286, p.10960-10969, 2011.

PALMA, M. **Análise Proteômica** (material não publicado). 2013.

PANCHOLI, V. Multifunctional alpha-enolase: its role in diseases. **Cell and Molecular Life Sciences**, Switzerland, v. 58, p. 902-920, 2001.

PREVOT, P.P.; BESCHIN, A.; LINS, L.; BEAUFAYS, J.; GROSJEAN, A.; BRUYS, L.; ADAM, B.; BROSSARD, M.; BRASSEUR, R.; ZOUAOU BOUDJELTIA, K.; VANHAMME, L.; GODFROID, E. Exosites mediate the anti-inflammatory effects of a multifunctional serpin from the saliva of the tick *Ixodes ricinus*. **FEBS Journal**, v.276, p.3235-3246, 2009.

RIBEIRO, J. M. C.; ALARCON-CHAIDEZ, F.; FRANCISCHETTI, I. M. B.; MANS, B. J.; MATHER, T. N.; VALENZUELA, J. G.; WIKEL, S. K. An annotated catalog of salivary gland transcripts from *Ixodes scapularis* ticks. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. Oxford, v. 36, p. 111-129, 2006.

RIBEIRO, J.M.; FRANCISCHETTI, I.M. Role of arthropod saliva in blood-feeding: sialome and post-sialome perspectives. **Annual Reviews of Entomology**, v.48, p.73-88, 2003.

RIBEIRO, J.M.C.; MAKOUL, G.T.; LEVINE, J.; ROBINSON, D.K.; SPILMAN, A. Antihaemostatic, anti-inflammatory and immunosuppressive properties of the saliva of a tick, *Ixodes dammini*. **The Journal of Experimental Medicine**. United States, v. 161, p. 332-344, 1985.

RIBEIRO, J.M.C.; MATHER, T.N. *Ixodes scapularis*: salivary kininase activity is a metallo dipeptidyl carboxypeptidase. **Experimental Parasitology**, v. 89, p. 213–221, 1998.

SANGAMNATDEJ, S.; PAESEN, G.C.; SLOVAK, M.; NUTTALL, P.A. A high affinity serotonin and histamine-binding lipocalin from tick saliva. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 11, p.79-86, 2002.

SHIPLEY, M.M.; DILLWITH, J.W.; BOWMAN, A.S.; ESSEMBERG, R.C.; SAUER, J.R. Changes in lipids of the salivary glands of the lone star tick, *Amblyomma americanum*, during feeding. **Journal of Parasitology**, United States, v. 79, p. 834-842, 1993.

SIMONS, S.M.; SÁ-JÚNIOR, P.L.; FARIA, F.; BATISTA, I.F.C.; BARROS –BATTESTI, D.M.; LABRUNA, M.B.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A.M. The action of *Amblyomma cajennense* tick saliva in compounds of hemostatic system and cytotoxicity in tumor cell lines. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, United States, v. 65, p. 443-450, 2011

SONENSHINE, D.E. The female reproductive system. In: SONENSHINE, D.E. (Org.). **Biology of Ticks**. New York: Oxford University Press, 1991. p. 280-304.

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

WHEELER, C.M.; COLEMAN, J.L.; BENACH, J.L. Salivary gland antigens of *Ixodes dammini* are glycoproteins that have interspecies cross-reactivity **Journal of Parasitology**, United States. v. 77, p. 965-973, 1991.

WIKEL, S.K.; BERGMAN, D.K. Tick host immunology: Significant advances and challenging opportunities. **Parasitology Today**, United Kingdom, v. 13, p. 383-389, 1997.

ZHANG, P.; LIU, B.; KANG, S. W.; SEO, M. S.; RHEE, S. G.; OBEID, L. M. Thioredoxin Peroxidase is a novel inhibitor of apoptosis with a mechanism distinct from that of Bcl-2. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 272, p. 30615-30618, 1997.

CAPÍTULO 2:

Ação do extrato de glândulas salivares de fêmeas de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) sobre a inibição da proliferação de células de linhagem tumoral.

RESUMO

A saliva dos carrapatos é composta por moléculas bioativas com ações vasodilatadora, anti-inflamatória, anticoagulante e imunossupressora. Estudos recentes demonstraram que a saliva desses artrópodes apresenta moléculas capazes de atenuar a angiogênese, bem como apresentam atividade antitumoral para certas linhagens celulares. Neste trabalho, buscou-se analisar o potencial antitumoral do extrato de glândulas salivares de fêmeas de carrapatos *R. sanguineus* com quatro dias de alimentação em coelhos hospedeiros em células das linhagens tumorais SK-HEP-1 e HEP-G2, por meio de ensaios de MTT; análise do núcleo e da organização e distribuição dos filamentos de actina, utilizando-se técnicas de Microscopia Confocal de Varredura a Laser; e análise do padrão de transcrição de mRNAs envolvidos nos eventos ou mecanismos de morte celular por apoptose, incluindo os produtos dos genes *Bax*, *Bcl-2*, *Caspases 3 e 9*, *Fas* e *interleucina 1*. Os resultados obtidos mostraram que o extrato na concentração de 50 µg/mL inibiu significativamente a proliferação celular das duas linhagens testadas. Pela análise dos núcleos e filamentos de actina das células expostas, não foram verificadas características morfológicas que indicassem processos de morte celular por apoptose. Porém a análise do padrão de transcrição de alguns mRNAs envolvidos nos mecanismos de morte celular por apoptose, evidenciou a expressão significativa de genes anti e pró-apotóticos nas células tratadas em relação ao grupo controle, sugerindo que a ação do extrato pode causar o desbalanço na homeostase celular, podendo desencadear processos de morte celular por apoptose, corroborando com dados apresentados na literatura.

Palavras-chave: carrapatos; saliva; apoptose; morfologia; mRNA

1. INTRODUÇÃO

Os carrapatos são animais que pertencem a um dos grupos de maior importância entre os artrópodes, devido ao seu hábito hematófago, o que lhe garante grande importância epidemiológica, visto serem vetores de vírus, bactérias, protozoários e helmintos (SONENSHINE, 1991; DANTAS-TORRES, 2010), que afetam aves, répteis, anfíbios e mamíferos.

Pertencentes ao Filo Arthropoda, Classe Arachnida, Subclasse Acari e classificados em três famílias (Ixodidae, Argasidae e Nuttalliellidae) esses artrópodes apresentam ampla distribuição geográfica e podem parasitar grande variedade de vertebrados selvagens e domésticos, tais como aves, répteis, anfíbios e mamíferos (inclusive o homem) (CRAMPTON, 1996; SAUER et al., 1996; NAVA et al., 2009).

Segundo Harwood e James (1979), o sucesso biológico dos carrapatos como vetores de microrganismos deve-se principalmente às características biológicas que estes apresentam, dentre as quais destacam-se o hematofagismo em todas as fases do desenvolvimento; fixação profunda nos hospedeiros, o que dificulta sua remoção; ingurgitamento lento, havendo tempo para inoculação de patógenos; adaptação a diferentes espécies de hospedeiros; resistência à adversidade climática devido à grande esclerotização e também longevidade nos diferentes ambientes, propiciando tempo para multiplicação destes patógenos.

A saliva dos carrapatos tem sido descrita como uma mistura complexa e considerada um grande, diversificado e eficaz arsenal farmacológico que garante a alimentação e a sobrevivência dos carrapatos (STEEN et al., 2006; FRANCISCHETTI et al., 2010; CAMARGO-MATHIAS et al., 2011). Nesta saliva encontram-se moléculas das mais variadas naturezas com papel na modulação do sistema imune-inflamatório

e hemostático dos hospedeiros (STEEN et al., 2006; HAJNICKÁ et al., 2011), sendo considerada praticamente um reservatório em potencial de moléculas multifuncionais contendo bioativos de grande interesse (BATISTA et al., 2010). Por esta razão, a saliva destes animais vem sendo objeto de diferentes estudos devido, principalmente, ao grande interesse na identificação e isolamento de suas moléculas, as quais podem agir como: vasodilatadoras, antiinflamatórias, anticoagulantes e imunossupressoras (OLIVEIRA et al., 2010).

Segundo dados da literatura, tem sido identificadas na saliva dos carrapatos proteínas anticoagulantes, como o peptídeo anticoagulante do carrapato (TAP) obtido a partir da saliva de *Ornithodoros moubata* (WAXMAN et al., 1990), a boophilina, de *R. (Boophilus) microplus* (MACEDO-RIBEIRO et al., 2008), ixolaris e penthalaris de *Ixodes scapularis* (FRANCISCETTI et al., 2002; FRANCISCETTI et al., 2004) e o *Amblyomin-X*, de *Amblyomma cajennense* (BATISTA et al., 2010; CHUDZINSKI-TAVASSI et al., 2010), que teriam potencial no tratamento de doenças como a trombose.

Além disso, componentes da saliva de diferentes espécies de carrapatos, dentre elas a de *R. sanguineus* (carrapato do cão), são capazes de modular diferentes passos da biologia das células dendríticas, como por exemplo sua maturação (OLIVEIRA et al., 2008; 2010), inibir a proliferação de células endoteliais e apresentar ações anti-angiogênica (FRANCISCETTI et al., 2010; DREWES et al., 2012) e antitumoral (KAZIMÍROVÁ et al., 2006; CHUDZINSKI-TAVASSI et al., 2010; SIMONS et al., 2011; AKAGI et al., 2012).

Ainda com relação às moléculas bioativas com potencial antitumoral presentes na saliva dos carrapatos, uma proteína encontrada na saliva de *A. cajennense*, com

ação no processo de coagulação, apresentou atividade citotóxica em diferentes linhagens de células tumorais (CHUDZINSKI-TAVASSI et al., 2010). Kazimírová et al. (2006) demonstraram que moléculas presentes em extratos de glândulas salivares de diferentes espécies de carrapatos foram capazes de inibir o crescimento de células HeLa (ATCC) por indução de apoptose (*R. appendiculatus* e *A. variegatum*), bem como devida a sua ação anti-proliferativa (*Ixodes ricinus*, *R. appendiculatus*, *Dermacentor reticulatus* e *A. variegatum*). Somando-se a isso Simons et al. (2011) relataram os efeitos da saliva bruta de carrapatos sobre as células tumorais, visto as mesmas terem entrado em processo de morte. Além disso, Poole et al. (2013) relataram o efeito inibidor da saliva de carrapatos sobre as capacidades migratória e invasiva de células neoplásicas de mama (MDA-MB-231; ATCC).

O fígado é considerado a maior glândula do corpo humano, sendo responsável pela metabolização de substâncias e armazenamento de moléculas como o glicogênio e vitamina A (KIERSZEMBAUM, 2004). O hepatocarcinoma representa uma das mais frequentes neoplasias no mundo e, segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (2015) ele não está entre os dez mais incidentes no Brasil, contudo no sudeste da Ásia, Japão e África do Sul apresenta incidência particularmente alta, enquanto que nos Estados Unidos, Grã Bretanha e região norte da Europa é raro encontrar este tipo de tumor. Segundo dados do mesmo Instituto (2015), cerca de 50% dos pacientes com hepatocarcinoma apresentam cirrose hepática, que pode estar associada ao alcoolismo ou a hepatite crônica, cujo fator etiológico é a infecção pelos vírus da hepatite B e C, relacionados ao desenvolvimento dessa neoplasia.

Assim, para o estudo dessa neoplasia, diversos modelos biológicos podem ser utilizados como a cultura celular de SK-HEP-1 e HEP-G2, por serem metabolizadoras

e biotransformadoras de algumas substâncias como fármacos e outras drogas (KATO et al., 2014).

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve por objetivo analisar o efeito do extrato de glândulas salivares de carrapatos *R. sanguineus* alimentadas por quatro dias em coelhos hospedeiros (**EGS4**) nas linhagens tumorais SK-HEP-1 (ATCC: HTB-52) e HEP-G2 (ATCC: HB-8065), por meio de ensaios de MTT; Microscopia Confocal de Varredura a Laser para as análises do núcleo e da organização dos filamentos de actina; e análises do padrão de transcrição de mRNAs envolvidos nos eventos ou nos mecanismos de morte celular por apoptose, incluindo os produtos dos genes *Bax*, *Bcl-2*, *Caspases 3 e 9*, *Fas* e *IL-1 α* .

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Cultura de células de linhagem tumoral

As linhagens de células tumorais humanas SK-HEP-1 (ATCC), oriundas do fígado e coletadas do líquido ascítico, e HEP-G2 (ATCC), oriundas do fígado, foram gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Karen Cristiane Martinez de Moraes do Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Biologia da UNESP, I.B., Rio Claro – SP. As células aderentes foram crescidas em garrafas de 75 cm³ em meio *Minimum Essential Medium Eagle* (MEM) (Cultilab®), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab®), 100 unidades (U)/mL de antibiótico e antimicótico (Gibco®: CN 15240-062) a 37°C e em atmosfera contendo 5% de CO₂ em incubadora (TE-399, Tecnal®).

3.2. Ensaios de viabilidade celular

Para a determinação da concentração de trabalho capaz de inibir a proliferação celular em aproximadamente 50% em relação ao grupo controle (CL50) bem como o período de tempo de exposição mais adequado (24, 48 ou 96 horas), foi realizado o teste do MTT (*3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*), que baseia-se na redução dos sais amarelos de tetrazólio por redutases mitocondriais de células metabolicamente ativas. Nesse ensaio, há a formação de cristais azuis dentro das células viáveis que são solubilizados e posteriormente analisados por espectrofotometria. Deste modo, quanto menor for a viabilidade celular, menor será a redução do MTT e menor será o sinal espectrofotométrico. A determinação da viabilidade celular foi realizada adaptando-se a metodologia descrita por Mosman et al. (1983)

O teste do MTT foi realizado em microplacas de 96 poços, sendo os tratamentos dispostos de acordo com o seguinte esquema (**Fig. 4**):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B	CN	CN	CN	CN	CN	B	CN	CN	CN	CN	CN
B	B	CP	CP	CP	CP	CP	B	CP	CP	CP	CP	CP
C	B	[1]	[1]	[1]	[1]	[1]	B	[1]	[1]	[1]	[1]	[1]
D	B	[2]	[2]	[2]	[2]	[2]	B	[2]	[2]	[2]	[2]	[2]
E	B	[3]	[3]	[3]	[3]	[3]	B	[3]	[3]	[3]	[3]	[3]
F	B	[4]	[4]	[4]	[4]	[4]	B	[4]	[4]	[4]	[4]	[4]
G	B	[5]	[5]	[5]	[5]	[5]	B	[5]	[5]	[5]	[5]	[5]
H	B	[6]	[6]	[6]	[6]	[6]	B	[6]	[6]	[6]	[6]	[6]

FIGURA 4. Disposição dos grupos controle e tratamento na microplaca de 96 poços. B = branco (somente meio de cultura, sem presença de células); CN = controle negativo (somente meio de cultura e células); CP = controle positivo (meio de cultura e Triton X-100 1%); [1] = 50 µg/mL de extrato de glândula salivar (**EGS4**); [2] = 40 µg/mL de **EGS4**; [3] = 25 µg/mL de **EGS4**; [4] = 10 µg/mL de **EGS4**; [5] = 5 µg/mL de **EGS4** e [6] = poço vazio.

Foram plaqueadas 10^4 células por poço, em um volume total de 100 µL de meio de cultura com soro e incubadas a 37°C a 5% de CO₂ por 24 horas. Decorridas 24 horas, o meio foi retirado e foi adicionado novo meio de cultura (grupo controle negativo), juntamente com o grupo controle positivo (meio de cultura e Triton X-100 1%) e os tratamentos (concentrações de 50, 40, 25, 10, 5 µg/mL de extrato de glândulas salivares), em um volume total de 200 µL por poço. Os tratamentos

permaneceram nos poços pelos períodos de 24, 48 e 96 horas (sendo os mesmos renovados a cada 24 horas) e, posteriormente, foram retirados e substituídos por 150 µL de MTT 0,05 mg/mL diluído em meio de cultura. Depois de adicionado o MTT, a placa foi incubada por 4 horas em estufa a 37°C. Após este tempo, a solução de MTT foi descartada e foram adicionados, em cada poço, 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) e os cristais de formazam foram solubilizados por 30 minutos sob agitação. As placas foram lidas em leitora de microplacas (EZ READ 400 Resech, Biochrom, Analítica®) a 570 nm. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas e os dados submetidos ao teste estatístico ANOVA, seguido pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), utilizando *software GraphPad Prism 6v*.

3.3. Microscopia Confocal de Varredura a Laser

Cerca de $1,5 \times 10^4$ células SK-HEP-1 e de HEP-G2 foram cultivadas em lamínulas redondas de 13 mm em placas de 24 poços próprias para cultivo celular. Após 24 horas, o meio de cultura foi removido e, no caso do grupo controle, substituído por 500 µL de novo meio de cultura. Já nos tratamentos foram adicionados 50 µg/mL de extrato de glândulas salivares, diluído em meio de cultura em um volume final de 500 µL por poço. Após 96 horas, o meio foi removido e as células foram lavadas com 500 µL tampão fosfato salino (PBS) (8,0 g de NaCl, 0,2 g de KCl, 1,14 g de Na_2HPO_4 , 0,2 g de KH_2PO_4 e 1000 mL de água ultrapura) e, em seguida, fixadas com paraformaldeído 4% por 5 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente, o material foi lavado 3 vezes por 5 minutos com PBS. Em seguida, as lamínulas foram lavadas com Triton X-100 0,1% diluído em PBS por 5 minutos. Depois, foram incubadas com 150 µL por poço de solução de faloidina (*Alexa Fluor® 488, Life*

Tecnologies®) e albumina do soro bovino (BSA) na proporção de 5 µL de faloidina, 200 µL de PBS e 2 µL de BSA, por 40 minutos. Logo após, as lamínulas foram lavadas com PBS duas vezes por 5 minutos cada e foram adicionados 150 µL da solução de DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride) (*Life Technologies*®) na proporção de 2 µL BSA e 200 µL de PBS, por 10 minutos. Imediatamente, as lamínulas foram lavadas com PBS três vezes por 5 minutos cada e as lâminas foram montadas com meio de montagem (Vectashield®, *Vector Laboratories*) e analisadas em Microscópio Confocal de Varredura a Laser LEICA TCS-SP5 II.

3.4. Análise do padrão de transcrição de mRNAs envolvidos na morte celular por apoptose

3.4.1. Extração de RNA total

Células das linhagens SK-HEP-1 e HEP-G2 foram crescidas em garrafas de cultura de 25 cm³ conforme descrito anteriormente, até atingirem 70% de confluência. Em seguida, as garrafas do grupo controle receberam novo meio de cultura, enquanto que nos tratamentos foram adicionados 50 µg/mL de extrato de glândulas salivares diluído em meio de cultura. Após 96 horas (todos os tratamentos foram renovados a cada 24 horas), as células foram coletadas e depositadas em microtubos de 1,5 mL. O RNA total destas foi extraído utilizando-se 700 µL de *TRIzol*® *Reagent* (*Life Technologies*®) por tubo. Após 5 minutos de incubação para a completa dissociação dos complexos de nucleoproteínas, foram adicionados 140 µL de clorofórmio (*Sigma, St. Louis, Mo, USA*) e os microtubos foram agitados por 15 segundos e, em seguida, incubados por 3 minutos em temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas

por 12.000 x g por 15 minutos a 4°C e a fase aquosa transferida para novos microtubos de 1,5 mL. Para a precipitação do RNA, foram adicionados 350 µL de isopropanol 100% e a mistura foi incubada por 10 minutos em temperatura ambiente e, posteriormente, centrifugada a 12.000 x g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi removido do microtubo e o precipitado contendo o RNA foi lavado com 700 µL de etanol 75% e centrifugado a 7.500 x g por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi então removido e o *pellet* seco a temperatura ambiente por 5 minutos. O RNA foi, então, ressuspenso em 20 µL de água livre de RNase e a pureza e a quantificação dos RNAs foram determinadas utilizando-se espectrofotômetro *NanoDrop* (NanoVue Plus, GE), por meio da análise das relações entre os comprimentos de onda 160/280 nm e 260/230 nm, indicativos de pureza da amostra.

3.4.2. Obtenção do cDNA

O cDNA foi sintetizado utilizando-se 1 µg do RNA total extraído e o *Kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystem®), seguindo as recomendações do fabricante. Para cada reação, foi utilizada mistura de 2 µg de RNA total (volume de 10 µL), 0,8 µL de 10x *RT Buffer*, 100 mM (25 x dNTP Mix), 2 µL 10x *RT Random Primers*, 1 U da enzima *MultiScribe™ Reverse Transcriptase*, 0,5 µL de *RNase Inhibitor* e água livre de RNase para um volume final de 10 µL. A mistura foi incubada a 25°C por 10 minutos, seguidos de 120 minutos a 37°C e 85°C por 5 minutos com auxílio de termociclador (Eppendorf Mastercycler proS, Eppendorf).

Para se verificar a qualidade dos RNAs extraídos, foram realizadas, também, reações em cadeia da polimerase (PCR) para o gene normalizador β -actina, utilizando-se uma alíquota das amostras.

3.4.3. Técnica da PCR semi-quantitativa

A técnica da PCR semi-quantitativa foi utilizada para verificar o perfil da expressão relativa dos genes relacionados aos processos de morte por apoptose das células expostas e não expostas ao extrato de glândulas salivares. Para isto, foram utilizados oligonucleotídeos específicos para os genes *Bax*, *Bcl-2*, *Caspases 3 e 9*, *Fas* e *IL-1 α* . As reações de PCR foram realizadas em volume final de 10 μ L utilizando 2 μ L do cDNA, 0,6 μ M de cada oligonucleotídeo, 1,5 mM de $MgCl_2$, solução tampão para PCR (1x), 200 μ M de dNTP e 1,25 U da enzima Taq DNA polimerase (Unitaq-500, Uniscience). A amplificação foi realizada em termociclador (Eppendorf Mastercycler proS, Eppendorf) com o programa: 95°C por 3 minutos uma vez, 31 ciclos de: 95° por 50 segundos, seguido da temperatura de anelamento específica de cada *primer* utilizado por 50 segundos, seguido de 72° C por 50 segundos e um ciclo de 72° C por 8 minutos. Os produtos amplificados foram analisados baseando-se no padrão eletroforético gerado após corrida em gel de agarose 1%, corado com GelRed (20x) (*Molecular Probes*), utilizando-se tampão de carregamento *DNA Loading Dye Buffer* (6x) (Uniscience) e visualizado e registado em transiluminador de luz ultravioleta (DNR Bio-Imaging Systems MiniBis Pro). As imagens dos géis foram analisadas por densitometria óptica pelo *software* gratuito *ImageJ* 1.48v (*National Institutes of Health, USA*, disponível em <<http://rsb.info.nih.gov/ij/>> acesso em 08 de jan. 2015). Todos os ensaios foram realizados em triplicatas e os dados submetidos ao teste estatístico ANOVA, seguido pelo teste de Dunnett ($p < 0,05$), utilizando *software GraphPad Prism* 6v.

4. RESULTADOS

4.1. Viabilidade celular

As células das linhagens SK-HEP-1 e HEP-G2 foram incubadas pelos períodos de 24, 48 e 96 horas na presença de diferentes concentrações (5, 10, 25, 40 e 50 µg/mL) do extrato obtido de glândulas salivares de fêmeas de *R. sanguineus* alimentadas por quatro dias em coelhos hospedeiros. A **Figura 5** mostra os resultados que foram obtidos nos ensaios de viabilidade celular pelo método de MTT e demonstra que a concentração de 50 µg/mL de extrato foi aquela capaz de inibir a proliferação celular em 50% em relação ao grupo controle, isso ocorrendo nas duas linhagens celulares testadas (diferença estatisticamente significativa, * = $p < 0,05$). Além disso, o período de tempo de exposição de 96 horas foi aquele mais efetivo em inibir a proliferação celular em relação aos outros tempos (24 e 48 horas) testados.

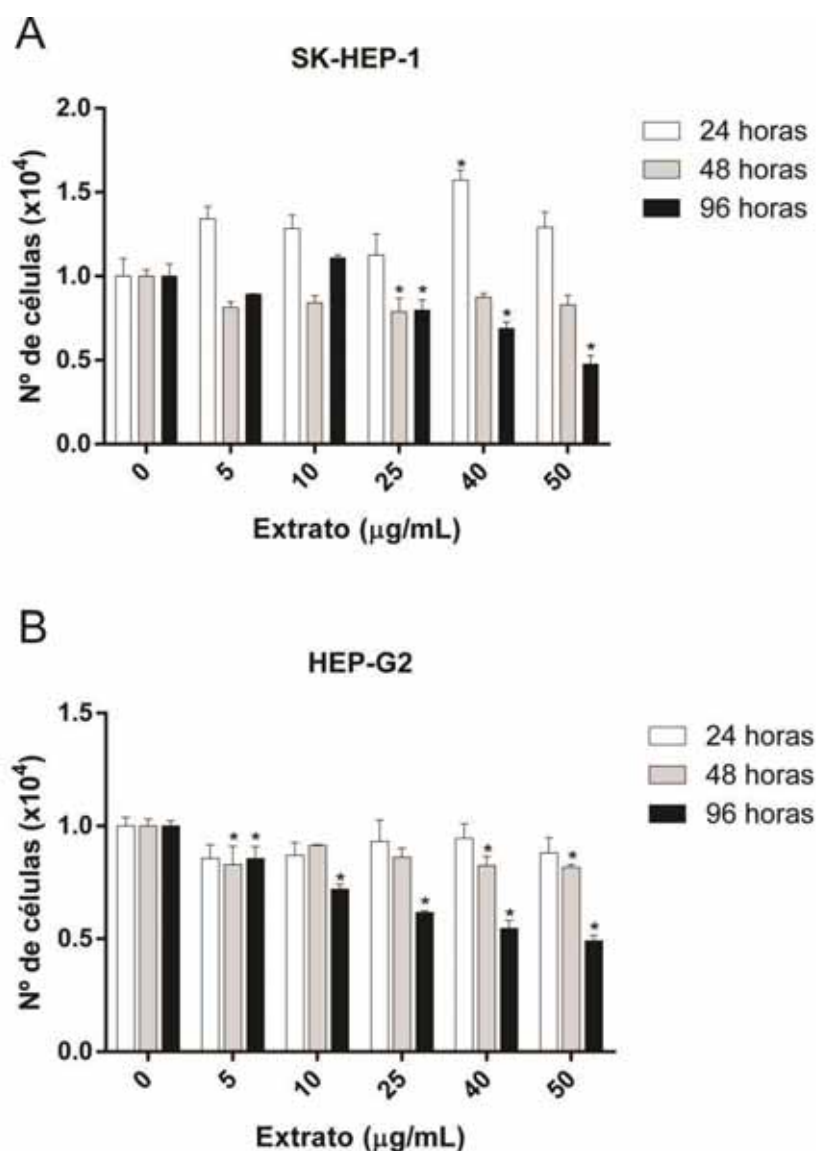


FIGURA 5. Comparação da viabilidade celular fazendo uso da técnica do MTT, entre as linhagens SK-HEP-1 (A) e HEP-G2 (B), expostas e não expostas (0=controle) ao extrato de glândulas salivares de fêmeas de *R. sanguineus* alimentadas por quatro dias em coelhos hospedeiros. As barras representam as médias das triplicatas com correspondente erro padrão. A análise estatística foi realizada pelo teste *one-way* ANOVA, seguido pelo teste de Dunnett. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

4.2. Microscopia Confocal de Varredura a Laser

Foi realizada a Microscopia Confocal de Varredura a Laser, para analisar a morfologia dos núcleos e o citoesqueleto das células SK-HEP-1 e HEP-G2 expostas à concentração de trabalho de 50 µg/mL do extrato de glândulas salivares, pelo período de exposição de 96 horas.

Nos resultados obtidos nas duas linhagens celulares analisadas, não foram observadas diferenças significativas na morfologia dos núcleos do grupo exposto ao extrato quando comparados aos dos grupos não expostos (controle). Os mesmos não mostraram sinais morfológicos de ocorrência de morte celular por apoptose (**Figs. 6, 7A-F**), tais como condensação de cromatina e fragmentação do núcleo.

Além disso, não foram observadas alterações nos elementos do citoesqueleto nos grupos expostos e não expostos ao **EGS4** nas linhagens celulares analisadas (**Figs. 6, 7A-F**).

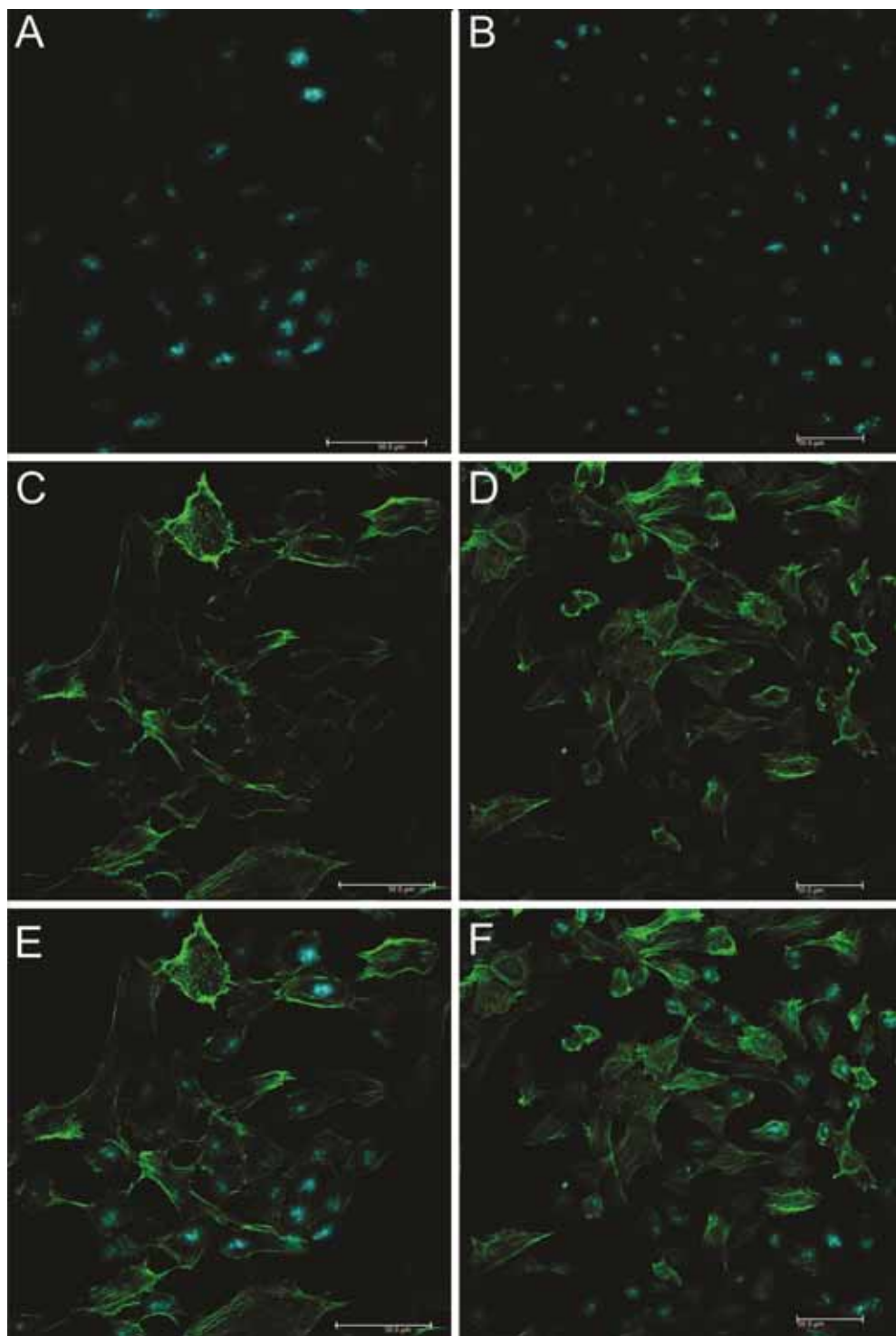


FIGURA 6. Imagem obtida pela técnica de Microscopia Confocal de células SK-HEP-1 expostas e não expostas ao EGS4. **[A;C;E]** Células não expostas ao EGS4 (grupo controle). **[A]** Núcleo (DAPI). **[C]** Actina F. **[E]** Sobreposição. **[B;D;F]** Células expostas ao EGS4 na concentração de 50 µg/mL por 96 horas. **[D]** Núcleo (DAPI). **[E]** Actina F. **[F]** Sobreposição. Barras = 40µm.

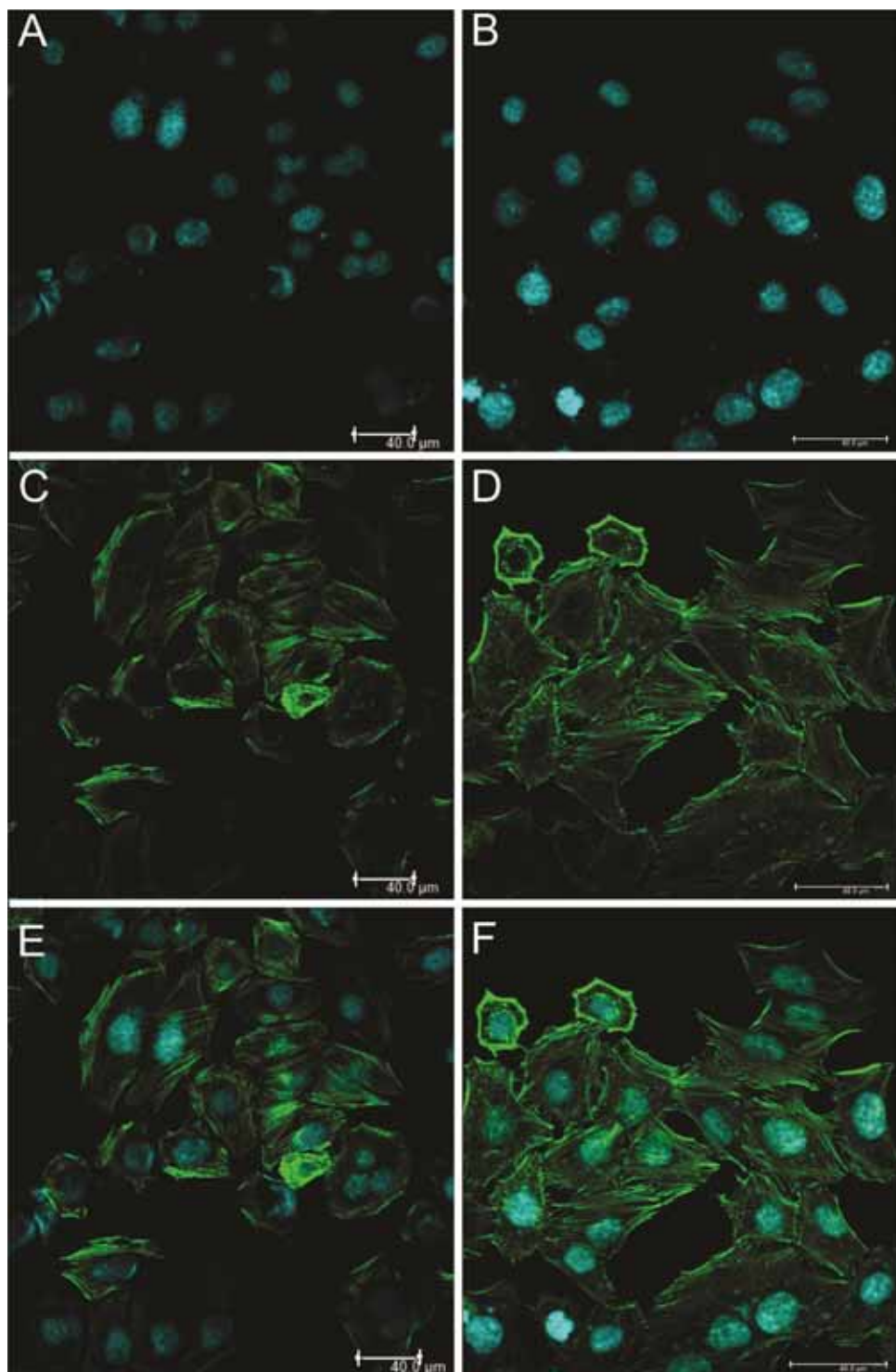


FIGURA 7. Imagem obtida pela técnica de Microscopia Confocal de células HEP-G2 expostas e não expostas ao EGS4. [A;C;E] Células não expostas ao EGS4 (grupo controle). [A] Núcleo (DAPI). [C] Actina F. [E] Sobreposição. [B;D;F] Células expostas ao EGS4 na concentração de 50 µg/mL por 96 horas. [B] Núcleo (DAPI). [D] Actina F. [F] Sobreposição. Barras = 50µm.

4.3. Análise do padrão de transcrição de mRNAs envolvidos na morte celular por apoptose

4.3.1. Avaliação do cDNA

Além dos parâmetros avaliados no espectrofotômetro, foram realizadas reações em cadeia da polimerase (PCR) para o gene normalizador β -actina, utilizando-se o cDNA sintetizado a partir das amostras de RNAs extraídos das células SK-HEP-1 e HEP-G2 expostas e não expostas à concentração de 50 μ g/mL do **EGS4** pelo período de 96 horas. A **Figura 8** apresenta o produto da amplificação após eletroforese em gel de agarose a 1%. O padrão de expressão equitativo do normalizador assegura a qualidade e integridade dos cDNAs preparados.

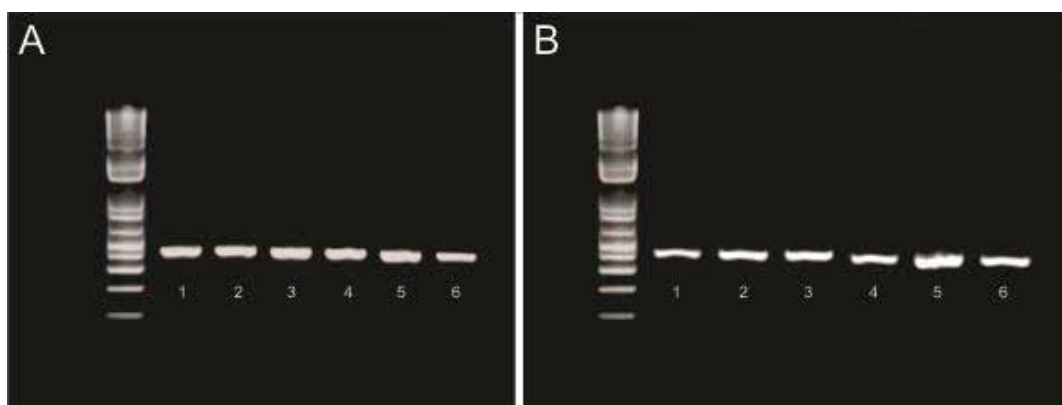


FIGURA 8. Amplificação de cDNA do gene β -actina obtida do cDNA sintetizado a partir de RNA total extraído de células SK-HEP 1 (A) e HEP-G2 (B). [1-3] Células não expostas ao **EGS4** (controle). [4-6] Células expostas ao **EGS4** na concentração de 50 μ g/mL por 96 horas.

4.3.2. Técnica da PCR semi-quantitativa

4.3.2.1. Linhagem celular tumoral SK-HEP-1

A análise da expressão relativa de mRNAs de genes relacionados ao processo de morte celular por apoptose foi realizada pela técnica da PCR semi-quantitativa, utilizando cDNAs preparados a partir de amostras de RNA das células SK-HEP-1 expostas ao **EGS4** na concentração de 50 µg/mL pelo período de 96 horas. A **Figura 9A-F** traz os gráficos da expressão de genes correlacionados com mecanismos de morte celular na linhagem celular SK-HEP-1.

Os genes *Bax* (**Fig. 9A**), *Caspase 3* (**Fig. 9B**), *Caspase 9* (**Fig. 9C**) e *Fas* (**Fig. 9E**) nas células expostas ao **EGS4**, não apresentaram expressão relativa diferente das células não expostas ao extrato (controle). *Bcl-2* apresentou um sutil aumento da sua expressão relativa nas células expostas ao extrato (**Fig. 9D**), semelhante à *IL-1 α* (**Fig. 9F**).

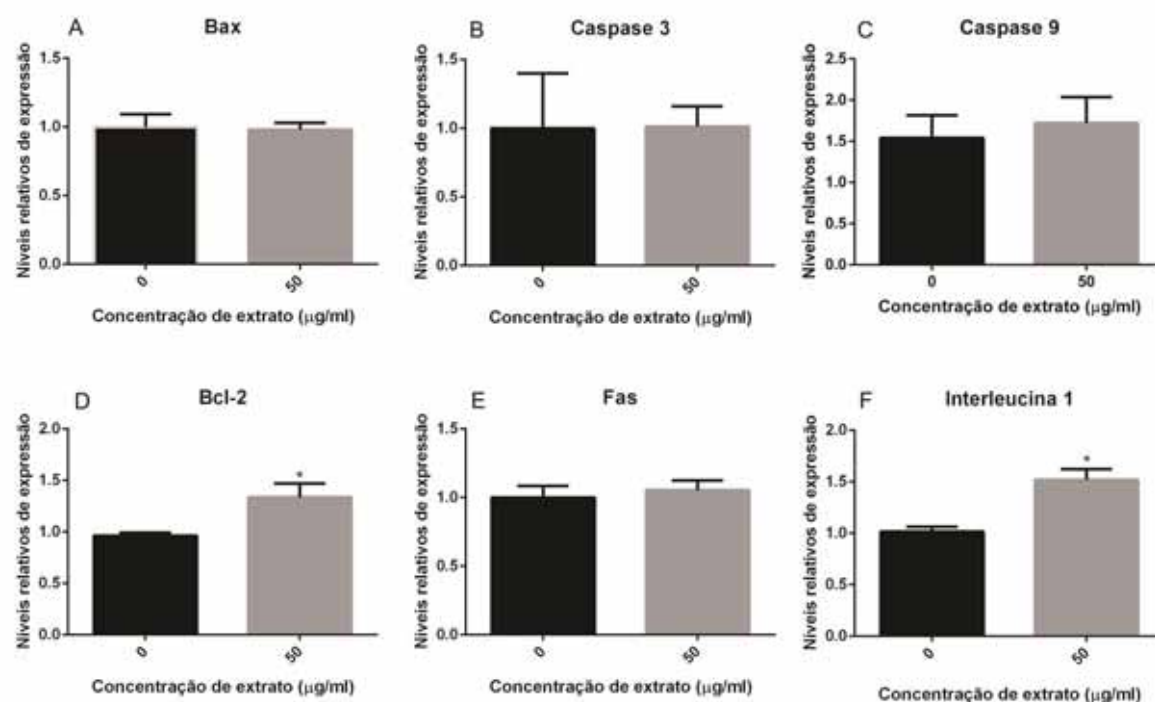


FIGURA 9. Expressão relativa de mRNAs envolvidos com o processo de morte celular por apoptose das células SK-HEP-1 expostas ao EGS4 na concentração de 50 µg/mL por 96 horas e não expostas (controle). [A] *Bax*, [B] *Caspase 3*, [C] *Caspase 9*, [D] *Bcl-2*, [E] *Fas*, [F] *IL-1 α*. As barras representam as médias das triplicatas com correspondente erro padrão. A análise estatística foi realizada pelo teste *one-way* ANOVA, seguido pelo teste de Dunnett. *=p<0,05 em relação ao controle.

4.3.2.2. Linhagem celular tumoral HEP-G2

A análise da expressão relativa de mRNAs de genes relacionados ao processo de morte celular por apoptose foi realizada pela técnica da PCR semi-quantitativa, utilizando cDNAs preparados a partir de amostras de RNA das células HEP-G2 expostas ao **EGS4** na concentração de 50 µg/mL pelo período de 96 horas. A **Figura 10A-F** traz os gráficos da expressão de genes correlacionados com mecanismos de morte celular na linhagem celular HEP- G2.

Os genes *Caspase 9* (**Fig. 10C**), *Fas* (**Fig. 10E**) e *IL-1 α* (**Fig. 10F**) nas células expostas ao **EGS4**, não apresentaram expressão relativa diferente das células não expostas ao extrato (controle). Por outro lado, *Bax* (**Fig. 10A**) e a *Caspase 3* (**Fig. 10B**) mostraram, nas células expostas, um sutil aumento significativo na sua expressão relativa em relação ao grupo controle. Já o *Bcl-2* apresentou um significativo aumento em relação ao grupo controle, da sua expressão relativa nas células expostas ao extrato (**Fig. 10D**).

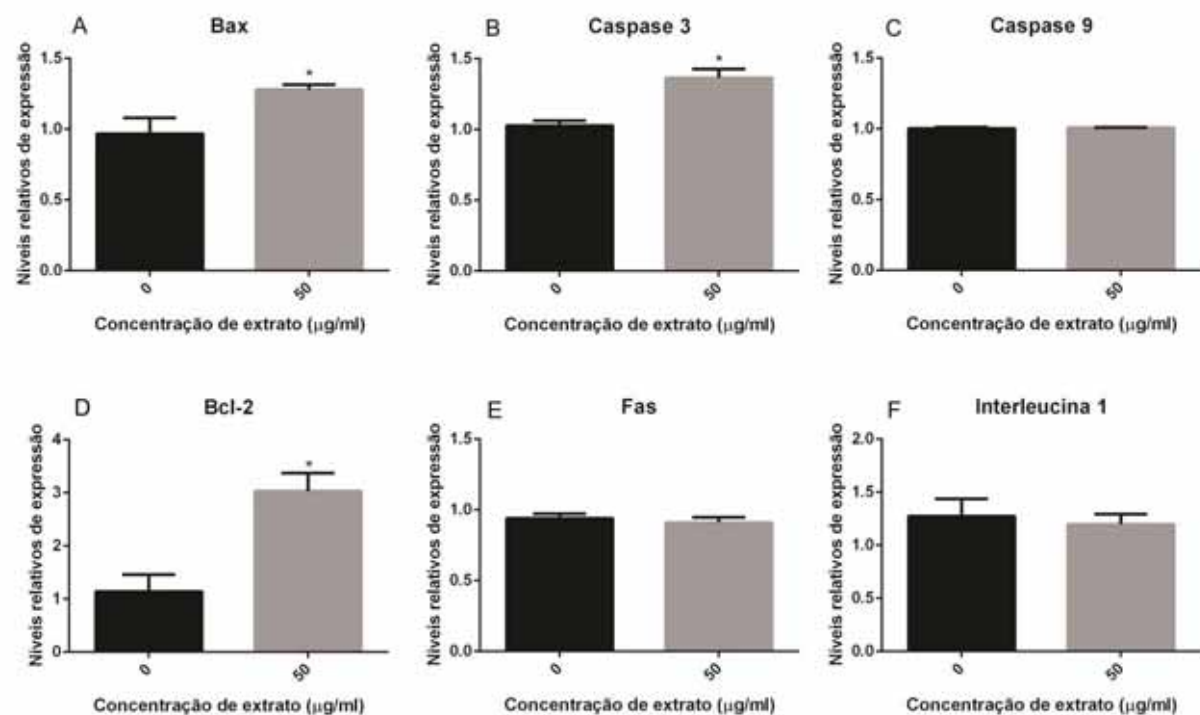


FIGURA 10. Expressão relativa de mRNAs envolvidos com o processo de morte celular por apoptose, das células HEP-G2 expostas ao EGS4 na concentração de 50 µg/mL por 96 horas e não expostas (controle). [A] *Bax*, [B] *Caspase 3*, [C] *Caspase 9*, [D] *Bcl-2*, [E] *Fas*, [F] *IL-1 α*. As barras representam as médias das triplicatas com correspondente erro padrão. A análise estatística foi realizada pelo teste *one-way* ANOVA, seguido pelo teste de Dunnett. * $p < 0,05$ em relação ao controle.

5. DISCUSSÃO

Os carrapatos são um dos mais importantes grupos de Arthropoda do ponto de vista médico e veterinário, por causarem lesões nos hospedeiros, seja no processo de repasto sanguíneo ou por transmitirem a estes agentes patogênicos como arboviroses, rickettsioses, espiroquetoses e protozoários (KAUFMAN, 1989).

Nesse sentido, a principal temática dos trabalhos que vem sendo atualmente desenvolvidos com esses animais tem abordado alternativas para o seu controle, por meio do uso de substâncias com potencial acaricida, estudos estes que deixam de lado o aspecto morfológico e conseqüentemente o entendimento da fisiologia desses animais, bem como suas relações com seus diferentes hospedeiros (CAMARGO-MATHIAS, 2013).

Tais ectoparasitas necessitam permanecer fixados aos seus hospedeiros para que a alimentação ocorra, precisando para tanto, produzir e secretar um arsenal farmacológico, via saliva, que tenha potencial de garantir esse processo de alimentação e conseqüentemente a sua sobrevivência (RIBEIRO et al. 1985; WIKEL; BERGMAN, 1997; STEEN et al., 2006; FRANCISCETTI et al., 2010). Dados da literatura tem demonstrado que nesta saliva encontram-se moléculas das mais variadas naturezas e funções, inclusive com ação sobre a modulação do sistema imune-inflamatório e hemostático dos hospedeiros (STEEN et al., 2006; HAJNICKÁ et al., 2011) sendo, portanto, considerada um reservatório de moléculas multifuncionais, onde estão presentes bioativos de grande interesse (BATISTA et al., 2010).

Nesse sentido a proposta do presente estudo foi a de analisar a morfofisiologia de células das linhagens tumorais SK-HEP-1 e HEP-G2 frente a exposição ao extrato de

glândulas salivares de fêmeas de carrapatos *R. sanguineus* alimentadas por quatro dias em coelhos hospedeiros.

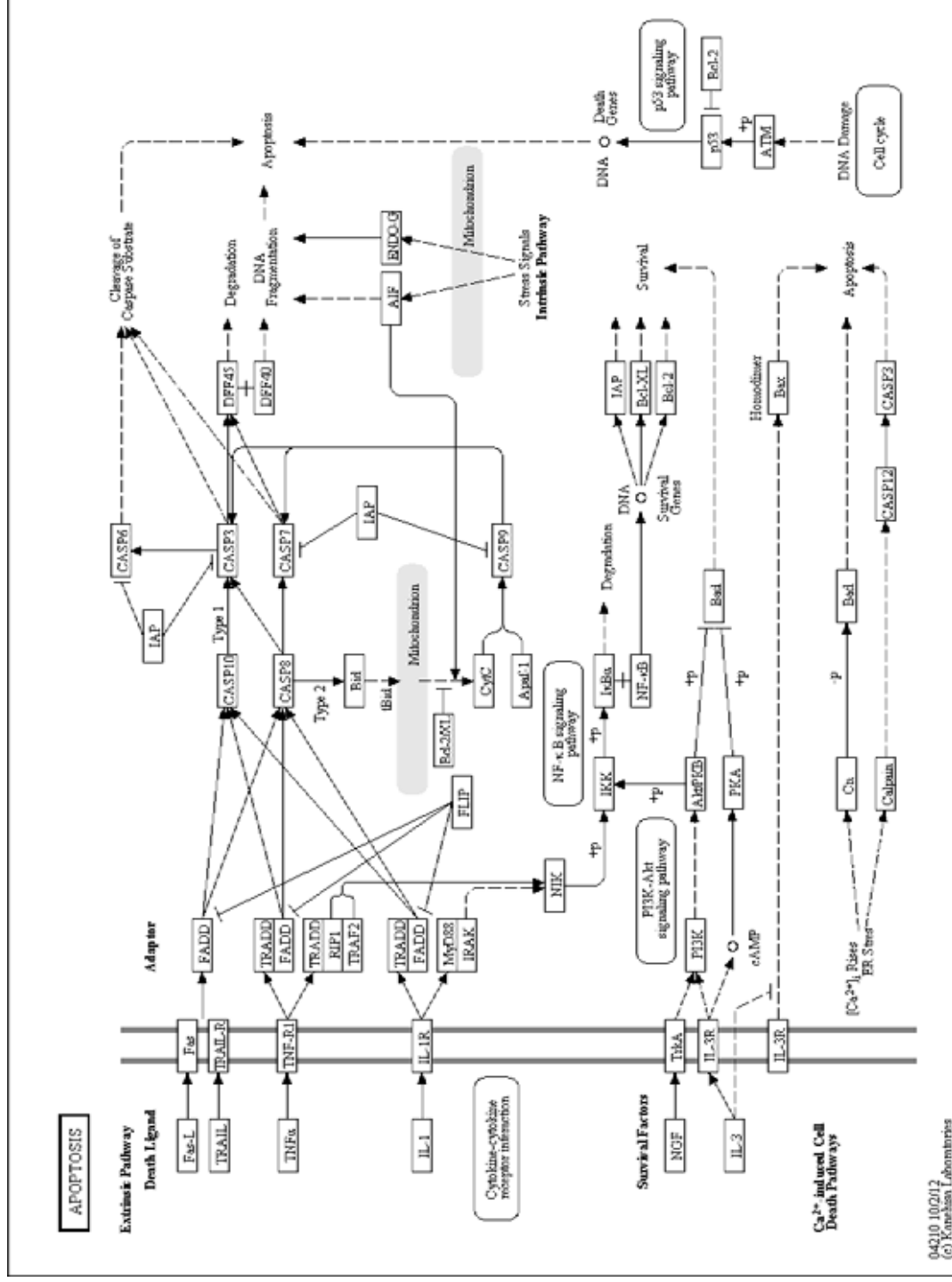
Assim os resultados aqui obtidos pelos ensaios de MTT evidenciaram que as alterações relacionadas à proliferação celular variaram em função: a) da concentração do extrato utilizado, sendo que a de 50 µg/mL foi capaz de causar maior inibição da proliferação das linhagens celulares expostas e b) do tempo de exposição das células ao extrato (**Fig. 5AB**), sendo que o tempo de 96 horas foi o que mais afetou a proliferação. Essas análises preliminares corroboraram àquelas apresentadas por Kazimirová et al. (2006), quando estudaram o potencial antitumoral de extratos de glândulas salivares de diferentes espécies de carrapatos em diferentes períodos de alimentação (inclusive em jejum) sobre células da linhagem HeLa (ATCC: CCL-2). Estes dados demonstraram, ainda, que o extrato teria potencial de agir ou inibindo a proliferação celular ou induzindo as células a entrarem em apoptose, processos estes de extrema importância na busca por alternativas para o controle de neoplasias, além de terem confirmado os resultados obtidos por Chudzinski-Tavassi et al. (2011), que verificaram a ação citotóxica de uma proteína recombinante (*Amblyomin-X*) presente na saliva de carrapatos *A. cajennense*, sobre linhagens de células tumorais (MIA PaCa-2 e SK-MEL-28). Os mesmos autores também estabeleceram que essa ação seria tanto dose-dependente, como tempo-dependente.

Apoptose é um termo que foi introduzido por Kerr (HOCKENBERY et al., 1990; ALBERTS, 2010), para denominar o processo de morte celular programada, um tipo de morte celular, distinto da necrose, que é caracterizado como sendo um conjunto de alterações morfofisiológicas e bioquímicas que inclui a condensação da cromatina, a fragmentação do DNA e as alterações na superfície celular, o que possibilita o rápido

reconhecimento e englobamento das células apoptóticas pelas células fagocitárias, evitando-se reações patológicas como a inflamação (KUAN; KUIDA, 2003; ALBERTS, 2010).

A apoptose é importante uma vez que participa da regulação do número de células durante o desenvolvimento do indivíduo, da renovação celular do indivíduo adulto e em outras situações na eliminação de células com danos genômicos ou celulares (MITTLER; SHULAEV, 2003). Os processos de apoptose envolvem duas vias: a intrínseca e a extrínseca, podendo a primeira ser estimulada por diferentes sinais (irradiação, quimioterápicos, vírus etc), os quais geram estresses intracelulares ativando proteínas que vão induzir apoptose pela via mitocondrial (MITTLER; SHULAEV, 2003), enquanto que a segunda é mediada pelos “receptores de morte”, os quais encontram-se na superfície celular, que quando ativados por seus ligantes transmitem o sinal para o desencadeamento das vias apoptóticas (MITTLER; SHULAEV, 2003).

A **Figura 11** apresenta resumidamente as vias de sinalização dos mecanismos de apoptose.



As neoplasias são descritas como o resultado de uma série progressiva de alterações que ocorrem numa célula sadia e que modificam vários mecanismos correlatos à regulação da expressão gênica e dois grupos de genes atuam nesse processo: 1) os proto-oncogenes, que atuam diretamente no controle do ciclo celular e que quando mutados e/ou modificados aumentam sua expressão, acelerando a proliferação celular (LUO, 2008); e 2) os genes supressores tumorais, que também se correlacionam com o controle do ciclo celular, e estão relacionados à indução de morte celular, como o *p53*, cujo produto da sua expressão, a proteína p53, interrompe a divisão celular quando encontra defeitos no DNA (KERBEL; FOLKMAN, 2002). Mutações que comprometam a expressão do gene *p53*, além de acionar o fenótipo angiogênico, levam à superexpressão de *Bcl-2*, gene antiapoptótico, e de *Bax*, gene pró-apoptótico.

As células transformadas possuem a capacidade de driblar os mecanismos de controle do ciclo celular, da apoptose e da ativação imunológica do seu meio ambiente, o que favorece a proliferação celular descontrolada (PISTILLI, 2009).

No presente estudo, com a finalidade de verificar possíveis efeitos citotóxicos ou citolíticos nas células de linhagens tumorais SK-HEP-1 e HEP-G2, foram realizados além dos ensaios de citotoxicidade (teste do MTT), técnicas de Microscopia Confocal de Varredura a Laser para análise dos núcleos e os filamentos de actina do citoesqueleto, e técnicas de PCR semi-quantitativa para análise do padrão de transcrição de mRNAs envolvidos nos mecanismos de morte celular por apoptose, nas células expostas e não expostas ao **EGS4**.

Os resultados aqui obtidos por meio da Microscopia Confocal para as células SK-HEP-1 e HEP-G2 submetidas à concentração de 50 µg/mL do **EGS4** expostas por 96

horas não mostraram diferenças significativas na morfologia das mesmas quando comparadas às do controle, diferindo dos registros da literatura que relataram que a saliva bruta dos carrapatos *Ixodes scapularis* e *Boophilus microplus* foi capaz de ocasionar alterações morfofisiológicas, tais como na forma do núcleo, ocorrência de retração do citoplasma e aparente perda de interação célula-célula, quando estudadas células endoteliais microvasculares de derme humana (MVEC) e células endoteliais umbilicais humanas (HUVEC) *in vitro* (FRANCISCHETTI et al, 2005).

Contudo os resultados obtidos no presente estudo via análise de PCR semi-quantitativa da expressão de mRNAs nas células HEP-G2 expostas ao **EGS4** mostraram que houve maior expressão relativa do gene *Bax* (**Fig. 10A**), codificador de moléculas que promovem a apoptose controlando, assim, o processo de morte celular (MIYASHITA; REED, 1995), sugerindo que houve o desbalanço na homeostasia celular, o que poderia levar à morte programada. Este dado corroborou os de Kazimírová et al. (2006) quando estudaram o potencial antitumoral de extratos de glândulas salivares de diferentes espécies de carrapatos sobre células da linhagem HeLa. Já nas células da linhagem SK-HEP-1 expostas ao extrato, não foram verificadas diferenças na expressão relativa desse gene (**Fig. 10B**).

A apoptose pode ser desencadeada pela ação das caspases (cisteíno-proteases), um grupo de enzimas proteolíticas sintetizadas na forma de pró-enzimas inativas que podem ser ativadas por estímulos específicos tais como irradiação, quimioterápicos, vírus, além da ativação dos “receptores de morte” (*Fas*, *IL-1R* etc) presentes na superfície celular (SAKAMAKI; SATOU, 2009). As caspases relacionadas com os processos de morte celular programada estão subdivididas em iniciadoras (que ativam outras caspases) e efetoras (que clivam seus substratos

levando à ativação da apoptose) (SAKAMAKI; SATOU, 2009). Sabe-se ainda que as caspases 2, 8, 9 e 10 atuam mais como iniciadoras e as 3, 6 e 7 como efetoras (MURPHY; MARTIM, 2003).

Os dados aqui obtidos revelaram maior expressão da *Caspase 3* nas células da linhagem HEP-G2 expostas ao **EGS4 (Fig. 10B)**, o que permitiu sugerir que esse extrato afetou a homeostasia celular, o que poderia induzir as células a entrarem em morte apoptótica, corroborando o dado de que a *Caspase 3* é a principal efetora, agindo na clivagem da maioria dos substratos nas células em apoptose e conduzindo à degradação das proteínas celulares necessárias para manter a sobrevivência e integridade das células (processada e ativada pelas caspases iniciadoras 8 e 9) (**Fig 11**) (FISCHER et al., 2003). Portanto, os dados aqui obtidos vieram reforçar àqueles encontrados anteriormente por Kazimirová et al. (2006), bem como por Chudzinski-Tavassi et al. (2010) e Simons et al. (2011) que mostraram que componentes da saliva do carrapato *A. cajennense*, assim como a proteína recombinante *Ambyomin-X* (obtida de biblioteca de c-DNA das glândulas salivares do carrapato *A. cajennense*) foram capazes de desencadear o processo de morte celular por apoptose em linhagens de células tumorais. Já, as células da linhagem SK-HEP-1 aqui estudadas, tratadas com o **EGS4** não apresentaram diferenças significativas na expressão desse gene, mostrando-se, portanto, possivelmente resistentes ao extrato visto que, segundo Chmieleck et al. (2011), diferentes linhagens celulares tumorais apresentam taxas de crescimento e de morte diferentes entre si e, portanto, apresentam resistências a quimioterápicos de forma diferenciada.

A *Caspase 9* desempenha reconhecidamente um importante papel na via de morte celular mediada por mitocôndria, ativando caspases efetoras na cascata de

reações, como as 7 e 3 (**Fig. 11**) (KUIDA et al., 1998). No presente trabalho a análise da expressão da *Caspase 9*, mostrou que não houve aumento de expressão para a células expostas ao **EGS4** das duas linhagens celulares (**Fig. 9C, 10C**), podendo ser um indicativo que a *Caspase 3* não seria ativada pela *Caspase 9*, mas sim pela *IL-1 α* , uma citocina capaz de desencadear a apoptose, corroborando dados também obtidos por Hogquist et al. (1991).

A via extrínseca da apoptose, ocorre por meio da interação de receptores de morte com seus respectivos ligantes, ou seja, através de sinais externos, podendo ter ou não a participação da mitocôndria (AMARANTE-MENDES; GREEN, 1999). O receptor *Fas* é uma proteína transmembrana pertencente à superfamília dos fatores de necrose tumoral. Ao interagir com seu ligante (*FasL*), ocorre a ativação das *Caspases 10 e 8*, que por sua vez ativam a 3, desencadeando então o processo de apoptose (**Fig. 11**) (AMARANTE-MENDES; GREEN, 1999). Nas células expostas ao **EGS4**, não se observou diferenças na expressão dos mRNAs desse receptor quando comparou-se ao grupo controle (**Fig. 9E, 10E**), permitindo sugerir que a ativação da via dos mecanismos de apoptose não acontece pelo receptor *Fas*, mas pela ativação do receptor de *IL-1* via interação com seu ligante (*IL-1 α*), o que desencadearia o processo de apoptose. Hogquist et al. (1991) mostraram que essa citocina participaria da ativação da apoptose em macrófagos em ratos.

A análise do mRNA da *IL-1 α* via PCR semi-quantitativa mostrou aumento significativo da expressão nas células da linhagem HEP-G2 expostas ao **EGS4** em relação às do grupo controle (**Fig. 10F**), fato esse não observado quando da exposição as células SK-HEP-1 (**Fig. 9F**). Sabe-se que essa citocina interage com seu receptor específico de membrana plasmática e participa da via extrínseca de ativação dos

mecanismos de apoptose (**Fig. 11**) (WEINBERG, 2008). Uma vez ativado via interação com o seu ligante (*IL-1 α*), o domínio de morte desse receptor ativa, além de outras proteínas, aquela associada denominada FADD (proteína de domínio de morte associado a *Fas*) presente no citoplasma (WEINBERG, 2008). O complexo resultante dessa ligação DISC (complexo de sinalização indutor de morte) é o responsável por ativar as formas inativas de pró-enzimas da *Caspase 8 e 10* encontradas no citoplasma, as quais ativam as *Caspases efetoras 3 e 7* (**Fig. 11**), convergindo assim na via de sinalização por meio da qual o programa apoptótico intrínseco atua (WEINBERG, 2008). Logo, os dados aqui obtidos podem indicar que a via de apoptose, para as células da linhagem HEP-G2, poderia ser ativada por meio da interação da *IL-1 α* com esse receptor.

Contudo, os resultados aqui obtidos pela análise da expressão de mRNAs para o gene *Bcl-2* (**FIGURA 9D e 10D**), mostraram maior expressão desse gene no grupo exposto ao **EGS4** quando comparado ao controle, indicando que o extrato interferiu na regulação do mesmo, numa tentativa de resistência à apoptose, visto que esse proto-oncogene têm por função suprimir a morte celular programada (HOCKENBERY et al., 1990; BATISTATOU et al., 1993; KANE et al., 1993; MARTINEZ-ARRIBAS et al., 2007).

Assim os dados aqui obtidos, sugeriram que o **EGS4** pode apresentar potencial antitumoral, uma vez que foi capaz de inibir a proliferação das células de linhagem tumoral SK-HEP-1 e HEP-G2. Pode-se sugerir, ainda, que o extrato interferiu na homeostasia celular, o que poderia desencadear o processo de morte celular por apoptose, mesmo que as alterações morfológicas características deste tipo de morte não tenham sido observadas na Microscopia Confocal. As vias extrínsecas pela

ligação da *IL-1 α* e a vias intrínsecas das *Caspases 3* possivelmente também estejam envolvidas nesse processo.

Dessa forma, os resultados aqui apresentados foram sinalizadores de que o extrato de glândulas salivares de fêmeas de *R. sanguineus* alimentadas por quatro dias em coelhos hospedeiros pode ser um candidato para atuar como inibidor da proliferação das células das linhagens tumorais SK-HEP-1 e HEP-G2, subsidiando a literatura com dados importantes para futuros estudos com neoplasias.

REFERÊNCIAS

- AKAGI, E. M. ET AL. Pro-apoptotic effects of Amblyomin-X in murine renal cell carcinoma “in vitro”. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 66, p. 64-69, 2012.
- ALBERTS, B. **Biologia Molecular da Célula**. 5 ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 2010. 1268p.
- AMARANTE-MENDES, G.P.; GREEN, D.R. The regulation of apoptotic cell death. **Braz J Med Bio Res**, v. 32, p.1053-61, 1999.
- BATISTA, I.F.; RAMOS, O.H.; VENTURA, J.S.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I.L.; HO, P,L.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A.M. A new factor Xa inhibitor from *Amblyomma cajennense* with a unique domain composition. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, United States, v. 493, p.151–156, 2010.
- BATISTATOU, A.; MERRY, D.E.; KORSMEYER, S.J.; GREENE, L.A. Bcl-2 affects survival but not neuronal differentiation of PC12 cells. **J Neurosci**, v.13, p.4422-8, 1993.
- BROSSARD, M., WIKEL, S.K. Tick immunobiology. **Parasitology**, Cambridge, v. 129, p. 161-176, 2004.
- CAMARGO-MATHIAS, M.I. et al. Immunomodulatory effects of tick saliva. **Invertebrate Survival Journal**, v. 8, p. 231-240, 2011.
- CAMARGO-MATHIAS, M.I. Guia básico de morfologia interna de carrapatos ixodídeos. São Paulo: Editora Unesp, 2013. P.120.
- CHMIELECKI, J. et al. Optimization of dosing for EGFR-mutant non-small cell lung cancer with evolutionary cancer modeling. **Sci Transl Med**, v. 90, p.1-24, 2011.
- CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M. ET AL. A new tick Kunitz type inhibitor, Amblyomin-X, induces tumor cell death by modulating genes related to the cell cycle and targeting the ubiquitin-proteasome system. **Toxicon**, v. 56, p. 1145-1154, 2010.
- CRAMPTON, A.; MCKAY, I.; BARKER, S.C. Phylogeny of ticks (Ixodida) inferred from nuclear ribosomal DNA. **International Journal for Parasitology**, United Kingdom. n. 5, p. 511-517, 1996.
- DANTAS-TORRES, F. Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. **Parasites & Vectors**. United Kingdom v.3, p. 1-11, 2010.
- DREWS, C. C. ET AL. Actions of the Kunitz-type serine protease inhibitor Amblyomin-X on VEGF-A-induced angiogenesis. **Toxicon**, v. 60, p. 333-340, 2012.
- ENNS, A. et al. Integrins can directly mediate metastatic tumor cell adhesion within the liver sinusoids. **Journal of Gastrointestinal Surgery**, v. 8, p. 1049-1060, 2004.

FISCHER, U.; JANICKE, R.U.; SCHULZE-OSTHOFF, K. Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. **Cell Death and Differentiation**, v. 10, p.76-100, 2003.

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

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

FRANCISCHETTI, I.M.B., MATHER, T.N. Tick saliva is a potent inhibitor of endothelial cell proliferation and angiogenesis. **Thrombosis and Haemostasis**, Stuttgart, v. 94, p. 167-174, 2005.

FRANCISCHETTI, I.M.B.; SÁ-NUNES, A.; MANS, B.J.; SANTOS, I.M.; RIBEIRO, J.M.C. The role of saliva in tick feeding. **Frontiers in Bioscience**, United States, v.14, p. 2051-2088, 2010.

HAJNICKÁ, V.; VANCOVÁ, I.; SLOVÁK, M.; KOCÁKOVÁ, P.; NUTTALL, P.A. Ixodid tick salivary gland products target host wound healing growth factors. **International Journal for Parasitology**, United Kingdom, v.41, p. 213-223, 2011.

HARWOOD, R.F.; JAMES, M.T. **Entomology in Human and Animal Health**. 7. ed. New York: Macmillan Publishing Co., 1979. 548p.

HOCKENBERY, D.; NUNEZ, G.; MILLIMAN, C.; SCHREIBER, R.D.; KORSMEYER, S.J. Bcl-2 is a inner mitochondrial membrane protein the blocks programmed cell death. **Nature**, v. 348, n. 6299, p.334-336, 1990.

HOGQUIST, H.; NETT, M.A.; UNANUE, E.R.; CHAPLIN, D.D. Interleukin 1 is processed and released during apoptosis. **Proc Natl Acad**, v.88, p. 8485-8489, 1991.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Câncer de fígado**. Disponível em: < http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=330>. Acesso em 28 jan de 2015.

KANE, D.J; SARAFIAN, T.A.; ANTON, R.; HAHN, H.; GRALLA, E.B.; VALENTINE, J.S.; ORD, T.; BREDSSEN, D.E. Bcl-2 inhibition of neural death: decreased generation of reactive oxygen species. **Science**, v.262, p.1274-7, 1993.

KATO, R.; SHIGEMOTO, K.; AKIYAMA, H.; IEDA, A.; IJJRJ, Y.; HAYASHI, T. Human hepatocarcinoma functional liver cell-4 cell line exhibits high expression of drug-metabolizing enzymes in three-dimensional culture. **Biol Pharm Bull**, v. 37, p.1783-1787, 2014.

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

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

KEEG. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. **KEGG Pathway**. Disponível em: < <http://www.genome.jp/kegg/>>. Acesso em 23 jan 2015.

KIERSZEMBAUM, A.L. **Histologia e Biologia Celular: uma introdução à patologia**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. p. 499-509.

KUAN, C.Y.; KUIDA, K. **Cell death in mammalian development**. In: YIN X.m.; DONG, Z. (ed.). **Essential of Apoptosis**. New Jersey: Humana Press Inc, 2003, p.163-175.

KUIDA, K.; HAYDAR, T.F.; KUAN, C.Y.; GU, Y.; TAYA, C.; KARASUAYAMA, H.; SU, M.S.; RAKIC, P. FLAVELL, R.A. Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9. **Cell**, v. 3, p.325-337, 1998.

LIU, Z.; HOU, J.; REN, L.; HE, J.; SUN, B.; SUN, L.Z.; WANG, S. Protein tyrosine phosphatase receptor type O expression in the tumorniche correlates with reduced tumor growth, angiogenesis, circulating tumor cells and metastasis of breast cancer. **Oncol Rep**, v.1, p.1-10, 2015.

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

MARTINEZ-ARRIBAS, F.; ALVAREZ, T.; VAL, G.D.; MATIN-GARBATO, E.; NUNEZ-VILLAR, M.J.; LUCAS, R.; SANCHEZ, J.; TEJERINA, A.; SCHNEIDER, J. Bcl-2 expression in breast câncer: a comparative study at the mRNA in protein level. **Anticancer Research**, v. 27, p.219-222, 2007.

MITTLER, R.; SHULAEV, V. **Apoptosis in plants, yeast, and bacteria**. In: YIN X.m.; DONG, Z. (ed.). **Essential of Apoptosis**. New Jersey: Humana Press Inc, 2003, p.125-133.

MIYASHITA, T.; REED, J.C. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. **Cell**, v. 80, p.293-9, 1995.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983

MURPHY, B.M.; MARTIM, S.J. **Caspases**. In: YIN X.m.; DONG, Z. (ed.). **Essential of Apoptosis**. New Jersey: Humana Press Inc, 2003, p.3-12.

NAVA, S, GUGLUELMONE, A. A, MANGOLD, A. J. An overview of systematics and evolution of ticks. **Frontiers in Bioscience**, United States, n. 14, p. 2857-2877, jan. 2009.

OLIVEIRA, C.J.; CARVALHO, W.A.; GARCIA, G.R.; GUTIERREZ, F.R.; DE MIRANDA SANTOS, I.K.; SILVA, J.S.; FERREIRA, B. R. Tick saliva induces regulatory dendritic cells: MAP-kinases and Toll-like receptor-2 expression as potential targets. **Veterinary Parasitology**. Netherlands v.167, p. 288-297, 2010.

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

RIBEIRO, J.M.C.; MAKOUL, G.T.; LEVINE, J.; ROBINSON, D.K.; SPILMAN, A. Antihaemostatic, anti-inflammatory and immunosuppressive properties of the saliva of a tick, *Ixodes dammini*. **The Journal of Experimental Medicine**. United States, v. 161, p. 332-344, 1985.

SAUER, J.R.; MCSWAIN, J.L.; BOWMAN, A.S.; ESSENBERG, R.C. Tick salivary gland physiology. **Annual Reviews of Entomology**, v. 40, p.245-267, 1995.

SAKAMAKI, K.; SATOU, Y. Caspases: evolutionary aspects of their functions in vertebrates. **Journal of Fish Biology**, v. 74, p.727-753, 2009.

SIMONS, S.M.; SÁ-JÚNIOR, P.L.; FARIA, F.; BATISTA, I.F.C.; BARROS –BATTESTI, D.M.; LABRUNA, M.B.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A.M. The action of *Amblyomma cajennense* tick saliva in compounds of hemostatic system and cytotoxicity in tumor cell lines. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, United States, v. 65, p. 443-450, 2011

SONENSHINE, D.E. The female reproductive system. In: SONENSHINE, D.E. (Org.). **Biology of Ticks**. New York: Oxford University Press, 1991. p. 280-304.

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

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

WIKEL, S.K.; BERGMAN, D.K. Tick host immunology: Significant advances and challenging opportunities. **Parasitology Today**, United Kingdom, v. 13, p. 383-389, 1997.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- O extrato de glândulas salivares de carrapatos *R. sanguineus* foi capaz de comprometer a viabilidade das células SK-HEP-1 e HEP-G2, por meio da redução da proliferação e da interferência na homeostase celular, o que poderia induzir o processo de apoptose, eventos que ocorreram em função: a) da concentração do extrato e b) do período de tempo de exposição das células tumorais ao extrato.
- O **EGS4** foi capaz de: 1) afetar negativamente a proliferação das células tumorais na concentração de 50 µg/mL, principalmente no tempo de exposição de 96 horas.
- O extrato foi capaz de interferir na homeostasia celular, o que poderia desencadear o processo de morte celular das linhagens SK-HEP-1 e HEP-G2. Contudo, serão necessárias técnicas de citometria de fluxo para se confirmar a morte por apoptose.
- As vias extrínsecas pela ligação da *IL-1 α* e as intrínsecas das *Caspases 3* poderiam estar envolvidas no processo de apoptose, que poderia ser desencadeado pelo desbalanço da homeostase das células expostas ao extrato.

- O extrato de glândulas salivares de fêmeas de *R. sanguineus* alimentadas por quatro dias em coelhos hospedeiros é um candidato para inibir a proliferação celular das linhagens tumorais SK-HEP-1 e HEP-G2.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008, p.564.
- AKAGI, E. M. ET AL. Pro-apoptotic effects of Amblyomin-X in murine renal cell carcinoma “in vitro”. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 66, p. 64-69, 2012.
- ALBERTS, B. **Biologia Molecular da Célula**. 5 ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 2010. 1268p.
- AMARANTE-MENDES, G.P.; GREEN, D.R. The regulation of apoptotic cell death. **Braz J Med Bio Res**, v. 32, p.1053-61, 1999.
- ANDERSON, J.F.; MAGNARELLI, L.A. Biology of the ticks. **Infectious Disease Clinics of North America**, Philadelphia, v. 22, p. 195-215, 2008.
- BALASHOV, Y.S. Bloodsucking ticks (Ixodoidea) – vectors of diseases of man and animals. **Miscellaneous Publications of the Entomological Society of America**, Lanham, v.8, p.161-376, 1972.
- BASTIANI, M.; HILLEBRAND, S.; HORN, F.; KIST, T.B; GUIMARÃES, J.A.; TERMIGNONI, C. Cattle tick *Boophilus microplus* salivary gland contains a thiol-activated metalloendopeptidase displaying kininase activity. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 32, p.1439-1446, 2002.
- BATISTA, I.F.; RAMOS, O.H.; VENTURA, J.S.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I.L.; HO, P,L.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A.M. A new factor Xa inhibitor from *Amblyomma cajennense* with a unique domain composition. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, United States, v. 493, p.151–156, 2010.
- BATISTATOU, A.; MERRY, D.E.; KORSMEYER, S.J.; GREENE, L.A. Bcl-2 affects survival but not neuronal differentiation of PC12 cells. **J Neurosci**, v.13, p.4422-8, 1993.
- BECHARA, G. H. ET AL. *Rhipicephalus sanguineus* tick in Brazil: feeding and reproductive aspects under laboratorial conditions. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 4, p. 61-66, 1995.
- BEHLING-KELLY, E.; CZUPRYNSKI, C.J. Endothelial cell as active participants in veterinary infections and inflammatory disorders. **Animal Health Research Reviews**, v. 8, p.47-58, 2007.
- BINNINGTON, K.C. Sequential changes in salivary gland structure during attachment and feeding of the cattle tick *Boophilus microplus*. **International Journal for Parasitology**, United Kingdom, v. 8, p. 97-115, 1978.

BODON, G.; CHASSEFEYRE, R.; PERNET-GALLARY, K.; MARTINELLI, N.; EFFANTIN, G.; HULSIK, D.L; BELLY, A.; GOLDBERG, Y.; CHATELLARD-CAUSSE, C.; BLOT, B.; SCHOEHN, G.; WEISSENHORN, W.; SADOUL, R. Charged multivesicular body protein 2B (CHMP2B) of the endosomal sorting complex required for transport-III (ESCRT-III) polymerizes into helical structures deforming the plasma membrane. **J Biol Chem**, v. 46, p. 40276-86, 2011.

BORGES, L.M.F.; SOARES, S.F.; FONSECA, I.N.; CHAVES, V.V.; LOULY, C.C.B. Resistência acaricida em larvas de *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) de Goiânia-GO, Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, Goiânia, v. 36, n. 1, p. 87-95, 2007.

BOWMAN, A.S.; DILLWITH, J.W.; SAUER, J.R. Tick salivary prostaglandins: presence, origin and significance. **Parasitology Today**, United Kingdom, v.12, p. 388–396, 1996.

BOWMAN, A.S.; SAUER, J.R. Tick salivary glands: function, physiology and future. **Parasitology**, United Kingdom, v. 129, p. 67-81, 2004.

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

BROSSARD, M., WIKEL, S.K. Tick immunobiology. **Parasitology**, Cambridge, v. 129, p. 161-176, 2004.

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

CAMARGO-MATHIAS, M.I. Guia básico de morfologia interna de carrapatos ixodídeos. São Paulo: Editora Unesp, 2013. P.120.

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**. USA: Nova Science Publishers Inc. cap.8, v.5., p. 167-191, 2013.

CHENG, Y.; WU, H.; LI, D. An inhibitor selective for collagen-stimulated platelet aggregation from the salivary glands of hard tick *Haemaphysalis longicornis* and its mechanism of action. **Science China Life Sciences**, v. 42, p. 457–464, 1999.

CHMELAR J.; CALVO, E.; PEDRA, J.H.F.; FRANCISCHETTI, I.M.B.; KOTSYFAKIS, M. Tick salivary secretion as a source of antihemostatics. **Journal of Proteomics**, v. 75, p. 3842–3854, 2012.

CHMELAR, J.; OLIVEIRA, C.J.; REZACOVA, P.; FRANCISCHETTI, I.M.; KOVAROVA, Z.; PEJLER, G. A tick salivary protein targets cathepsin G and chymase and inhibits host inflammation and platelet aggregation. **Blood**, v. 117, p. 736–744, 2011.

CHMIELECKI, J. et al. Optimization of dosing for EGFR-mutant non-small cell lung cancer with evolutionary cancer modeling. **Sci Transl Med**, v. 90, p.1-24, 2011.

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

COWDRY, E. V. & DANKS, W. B. C. Studies on coast fever II. Behavior of the parasite and the development of distinctive lesions in susceptible animals. **Parasitology**, v.25, p.1-63, 1933.

CRAMPTON, A.; MCKAY, I.; BARKER, S.C. Phylogeny of ticks (Ixodida) inferred from nuclear ribosomal DNA. **International Journal for Parasitology**, United Kingdom. n. 5, p. 511-517, 1996.

DAI, J.; NARASHIMHAN, S.; ZHANG, L.; LIU, L.; WANG, P.; FIKRIG, E. Tick histamine release factor is critical for *Ixodes scapularis* engorgement and transmission of the lyme disease agent. **PLOS Pathogens**, v. 24, e1001205, 2010.

DANTAS-TORRES, F. Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. **Parasites & Vectors**. United Kingdom 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**, Rio de Janeiro, v. 39, p. 64-67, 2006.

DENARDI, S.E.; FURQUIM, K.C.S.; BECHARA, G.H.; CAMARGO-MATHIAS, M.I. Salivary glands of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae): a histological and an ultrastructural overview. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v.54, p.177-189, 2011.

DIAZ-MARTIN, V.; MANZANO-ROMÁN, R.; OLEAGA, A.; ENCINAS-GRANDES, A.; PÉREZ-SÁNCHEZ, R. Cloning and characterization of a plasminogen-binding enolase from the saliva of the argasid tick *Ornithodoros moubata*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 191, p. 301-314, 2013.

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

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

FAWCETT, D.W.; BINNINGTON, K.; VOIGT, W.P. The cell biology of the ixodid tick salivary gland. In: J.R. SAUER & J.A. HAIR (Eds). **Morphology, Physiology, and Behavioral Biology of Ticks**, Chichester, Great Britain: Ellis Horwood Ltda, 1986, p. 23-45.

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

FERREIRA, C. A. S., VAZ, I. D. S. Jr., DA SILVA, S. S., HAAG, K. L., VALENZUELA, J. G. & MASUDA, A. Cloning and partial characterization of a *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) calreticulin. **Experimental Parasitology**, v.101, p.25–34, 2002.

FISCHER, U.; JANICKE, R.U.; SCHULZE-OSTHOFF, K. Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. **Cell Death and Differentiation**, v. 10, p.76-100, 2003.

FOLKMAN, J. Angiogenesis. **Annual Review of Medicine**, Palo Alto, v. 57, p. 1-18, 2006.

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

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

FRANCISCETTI, I.M.; VALENZUELA, J.G.; ANDERSON, J.F.; MATHER, T.N.; RIBEIRO, J.M. Ixolaris, a novel recombinant tissue factor pathway inhibitor (TFPI) from the salivary gland of the tick *Ixodes scapularis* identification of factor X and factors Xa as scaffolds for the inhibition of factor VIIa/ tissue factor complex. **Blood**, United States, v. 99, p. 3602-3612, 2002.

FRANCISCETTI, I.M.B. Platelet aggregation inhibitors from hematophagous animals. **Toxicon**, v. 56, p. 1130–1144, 2010.

FRANCISCETTI, I.M.B., MATHER, T.N. Tick saliva is a potent inhibitor of endothelial cell proliferation and angiogenesis. **Thrombosis and Haemostasis**, Stuttgart, v. 94, p. 167-174, 2005.

FRANCISCETTI, I.M.B.; SÁ-NUNES, A.; MANS, B.J.; SANTOS, I.M.; RIBEIRO, J.M.C. The role of saliva in tick feeding. **Frontiers in Bioscience**, United States, v.14, p. 2051-2088, 2010.

FRANCISCETTI, I.M.B.; VALENZUELA, J.G.; ANDERSEN, J.F.; MATHER, T.N.; RIBEIRO, J.M.C. Ixolaris, a novel recombinant tissue factor pathway inhibitor (TFPI) from the salivary gland of the tick, *Ixodes scapularis*: identification of factor X and factor Xa as scaffolds for the inhibition of factor VIIa/Tissue factor complex. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 99, p. 3602–3612, 2002.

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

FURQUIM, K.C.S.; BECHARA, G.H.; CAMARGO-MATHIAS, M.I. Morpho-histochemical characterization of salivary gland cells of males of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari, Ixodidae). **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v.50, p.59-70, 2010.

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

GASTL, G.; HERMANN, T. STEURER, M.; ZMIJA, J.; GUNSILIUS, E.; UNGER, C.; KRAFT, A. Angiogenesis as a target for tumor treatment. **Oncology**, v. 54, p. 177-184, 1997.

GREGSON, J. D. Observations on the movement of fluids in the vicinity of the mouthparts of naturally feeding *Dermacentor andersoni* Stiles. **Parasitology**, v.57, p.1-8, 1967.

GREGSON, J.D. Morphology and functioning of the mouthparts of *Dermacentor andersoni* Stiles. Part I. The feeding mechanism in relation to the tick. **Acta Tropica**, v.17, p.48-72, 1960.

HAJNICKÁ, V.; VANCOVÁ, I.; SLOVÁK, M.; KOCÁKOVÁ, P.; NUTTALL, P.A. Ixodid tick salivary gland products target host wound healing growth factors. **International Journal for Parasitology**, United Kingdom, v.41, p. 213-223, 2011.

HARNNOY, T.; SAKAGUCHI, T.; NISHIKAWA, Y.; XUAN, X.; FUJISAKI, K. Molecular characterization and comparative study of 6 salivary gland metalloproteases from the hardy tick, *Haemaphysalis longicornis*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, United States, v. 147B, p. 93-101, 2007.

HARWOOD, R.F.; JAMES, M.T. **Entomology in Human and Animal Health**. 7. ed. New York: Macmillan Publishing Co., 1979. 548p.

HOCKENBERRY, D.; NUNEZ, G.; MILLIMAN, C.; SCHREIBER, R.D.; KORSMEYER, S.J. Bcl-2 is a inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. **Nature**, v. 348, n. 6299, p.334-336, 1990.

HOGQUIST, H.; NETT, M.A.; UNANUE, E.R.; CHAPLIN, D.D. Interleukin 1 is processed and released during apoptosis. **Proc Natl Acad**, v.88, p. 8485-8489, 1991.

IKEDA, W.; NAKANISHI, H.; MIYOSHI, J.; ISHIZAKI, H.; TANAKA, M.; TOGAWA, A.; TAKAHASHI, K.; NISHIOKA, H.; YOSHIDA, H.; MIZOGUCHI, A.; NISHIWAKA, S.; TAKAI, Y. Afadin: A key molecule essential for structural organization of cell-cell junctions of polarized epithelia during embryogenesis. **Journal of Cell Biology**. New York, US, v. 146, n. 5, p. 1117-1132, 1999.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Câncer de fígado**. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=330>. Acesso em 28 jan de 2015.

IWANAGA, S.; OKADA, M.; ISAWA, H.; MORITA, A.; YUDA, M.; CHINZEI, Y. Identification and characterization of novel salivary thrombin inhibitors from the ixodidae tick, *Haemaphysalis longicornis*. **European Journal of Biochemistry**, v. 270, p. 1926-1934, 2003.

JAWORSKI, D.C.; SIMMEN, F.A.; LAMOREAUX, W.; COONS, L.B.; MULLER, M.T.; NEEDHAM, G.R. A secreted calreticulin protein in ixodid tick (*Amblyomma americanum*) saliva. **Journal of Insect Physiology**, v.41, p.369-375, 1995.

JOHNSON, S.; MICHALAK, M.; OPAS, M.; EGGLETON, P. The ins and outs of calreticulin: from the ER lumen to the extracellular space. **Trends in Cell Biology**, v.11, p.122–129, 2001.

JUNCADELLA, I.J.; GARD, R.; ANANTHNARAYANAN, S.K.; YENGO, C.M.; ANGUITA, J. T-cell signaling pathways inhibited by the tick saliva immunosuppressor, Salp15. **Immunology and Medical Microbiology**, v. 49, p.433-438, 2007.

KANE, D.J; SARAFIAN, T.A.; ANTON, R.; HAHN, H.; GRALLA, E.B.; VALENTINE, J.S.; ORD, T.; BREDSSEN, D.E. Bcl-2 inhibition of neural death: decreased generation of reactive oxygen species. **Science**, v.262, p.1274-7, 1993.

KATO, R.; SHIGEMOTO, K.; AKIYAMA, H.; IEDA, A.; IJJRJ, Y.; HAYASHI, T. Human hepatocarcinoma functional liver cell-4 cell line exhibits high expression of drug-metabolizing enzymes in three-dimensional culture. **Biol Pharm Bull**, v. 37, p.1783-1787, 2014.

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

KAZIMÍROVÁ, M. Bioactive compounds in ticks acting on host thrombohemostasis, In: WIWANITKIT, V. (Ed.). **Thrombohemostatic Disease Research**, New York: Nova Science Publishers Inc, 2007, p. 95–113

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

KAZIMÍROVÁ, M.; STIBRANIOVÁ, I. Tick salivary compounds: their role in modulation host defenses and pathogen transmission. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, p. 3-43, 2013.

KEEG. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. **KEGG Pathway**. Disponível em: < <http://www.genome.jp/kegg/>>. Acesso em 23 jan 2015.

KEIRANS, J.E.; DURDEN, L.A. Tick systematics and identification. In: Goodman JL, Dennis DT, Sonenshine DE (eds), **Tick-borne diseases of humans**, ASM Press, pp 123-140, 2005.

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

KIERSZEMBAUM, A.L. **Histologia e Biologia Celular: uma introdução à patologia**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. p. 499-509.

KNIES-BAMFORTH, U.E.; FOX, S.B.; POULSOM, R.; EVAN, G.I.; HARRIS, A.L. C-myc interacts with hypoxia to induce angiogenesis *in vivo* by a vascular endothelial growth factor-dependente-mechanism. **Cancer Research**, v. 64, p. 6563-6570, 2004.

KOH, C.Y.; KINI, R.M. Molecular diversity of anticoagulants from haematophagous animals. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 102, p. 437–453, 2009.

KOTSYFAKIS, M.; SÁ-NUNES, A.; FRANCISCHETTI, I.M.; MATHER, T.N.; ANDERSEN, J.F.; RIBEIRO, J.M. Antiinflammatory and immunosuppressive activity of sialostatin L, a salivary cystatin from the tick *Ixodes scapularis*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, p.26298-26307, 2006.

KUAN, C.Y.; KUIDA, K. **Cell death in mammalian development**. In: YIN X.m.; DONG, Z. (ed.). *Essential of Apoptosis*. New Jersey: Humana Press Inc, 2003, p.163-175.

KUIDA, K.; HAYDAR, T.F.; KUAN, C.Y.; GU, Y.; TAYA, C.; KARASUAYAMA, H.; SU, M.S.; RAKIC, P. FLAVELL, R.A. Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9. **Cell**, v. 3, p.325-337, 1998.

LABRUNA, M.B. Biologia-ecologia de *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 13, n. 1, p. 123-124, 2004.

LAWRIE; C.H.; RANDOLPH, S.E.; NUTTALL, P.A. Ixodes ticks: serum species sensitivity of anti-complement activity. **Experimental Parasitology**, v.93, p.207–214, 1999.

LIU, Z.; HOU, J.; REN, L.; HE, J.; SUN, B.; SUN, L.Z.; WANG, S. Protein tyrosine phosphatase receptor type O expression in the tumorniche correlates with reduced tumor growth, angiogenesis, circulatingtumor cells and metastasis of breast cancer. **Oncol Rep**, v.1, p.1-10, 2015.

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

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

MARTINEZ-ARRIBAS, F.; ALVAREZ, T.; VAL, G.D.; MATIN-GARBATO, E.; NUNEZ-VILLAR, M.J.; LUCAS, R.; SANCHEZ, J.; TEJERINA, A.; SCHINEIDER, J. Bcl-e expression in breast câncer: a comparative study at the mRNA na protein level. **Anticancer Research**, v. 27, p.219-222, 2007.

MANS, B.J.; LOUW, A.I.; GASPAR, A.R.M.D.; NEITZ, A.W.H. Apyrase activity and platelet aggregation inhibitors in the tick *Ornithodoros savignyi*. **Experimental and Applied Acarology**, Netherlands, v. 22, p. 353–366, 1998.

MANS, B.J.; LOUW, A.I.; NEITZ, A.W.H. Savignygrin, a platelet aggregation inhibitor from the soft tick *Ornithodoros savignyi*, present the RGD integrin recognition motif on the Kunitz-BPTI fold. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 21371–21378, 2002.

MANS, B.J.; RIBEIRO, J.M.; ANDERSEN, J.F. Structure, function, and evolution of biogenic amine-binding proteins in soft ticks. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 283, p.18721-18733, 2008.

MAXWELL, S.S.; STOKLASEK, T.A.; DASH, Y.; MACALUSO, K.R.; WIKEL, S.K. Tick modulation of the in-vitro expression of adhesion molecules by skin-derived endothelial cells. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v.99, p.661-672, 2005.

MICHALAK, M.; CORBETT, E.F.; MESAELI, N.; NAKAMURA, K.; OPAS, M. Calreticulin: one protein, one gene, many functions. **Biochemical Journal**, v.344, p.281-292, 1999.

MITTLER, R.; SHULAEV, V. **Apoptosis in plants, yeast, and bacteria**. In: YIN X.m.; DONG, Z. (ed.). Essential of Apoptosis. New Jersey: Humana Press Inc, 2003, p.125-133.

MIYASHITA, T.; REED, J.C. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. **Cell**, v. 80, p.293-9, 1995.

MONROE, D.M.; HOFFMAN, M. What does it take to make the perfect clot? **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v.26, p.41-48, 2006.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983

MOTOYASHIKI, T.; TU, A.T.; AYIMOV, D.A.; IBRAGIM, K. Isolation of anticoagulant from the venom of tick, *Boophilus calcaratus*, from Uzbekistan. **Thrombosis Research**, v. 110, p. 235–241, 2003.

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

MURPHY, B.M.; MARTIM, S.J. **Caspases**. In: YIN X.m.; DONG, Z. (ed.). Essential of Apoptosis. New Jersey: Humana Press Inc, 2003, p.3-12.

NAVA, S, GUGLUELMONE, A. A, MANGOLD, A. J. An overview of systematics and evolution of ticks. **Frontiers in Bioscience**, United States, n. 14, p. 2857-2877, jan. 2009.

NIENABER, J.; GASPAR, A.R.M.; NEITZ, A.W.H. Savignin, a potent thrombin inhibitor isolated from the salivary glands of the tick *Ornithodoros savignyi* (Acari: Argasidae). **Experimental Parasitology**, v. 93, p. 82–91, 1999.

NOLAN, J. Mechanisms of resistance to chemicals in arthropod parasites of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**, v. 18, p.155–166, 1985.

OLIVEIRA, C.J.; CARVALHO, W.A.; GARCIA, G.R.; GUTIERREZ, F.R.; DE MIRANDA SANTOS, I.K.; SILVA, J.S.; FERREIRA, B. R. Tick saliva induces regulatory dendritic cells: MAP-kinases and Toll-like receptor-2 expression as potential targets. **Veterinary Parasitology**. Netherlands v.167, p. 288-297, 2010.

OLIVEIRA, J.C.; SÁ-NUNES, A.; FRANCISCHETTI, I.M.B.; CARREGARO, V.; ANATRIELLO, E.; SILVA, J.S.; *et al.* Deconstructing saliva. Non-protein Molecules with potent immunomodulatory properties. **The Journal of Biological Chemistry**, United States, v. 286, p.10960-10969, 2011.

OLIVERI, J.A.; SERRA-FREIRE, N.M. Structure of the salivary glands of the unfed female tick *Amblyomma cajennense* (Fabricius) (Acarina: Ixodidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.87, suppl.1, p.167-74, 1992.

PAESEN, G.; ADAMS, P.L.; HARLOS, K.; NUTTALL, P.A.; STUART, D.I. Tick histamine-binding proteins: isolation, cloning, and threedimensional structure. **Molecular Cell**, v. 3, p. 661–671, 1999.

PALMA, M. **Análise Proteômica** (material não publicado). 2013.

PANCHOLI, V. Multifunctional alpha-enolase: its role in diseases. **Cell and Molecular Life Sciences**, Switzerland, v. 58, p. 902-920, 2001.

PETERSEN, L.C.; BIORN, S.E.; OLSEN, O.H.; NORDFANG, O.; NORRIS, F.; NORRIS, K. Inhibitory properties of separate recombinant Kunitz-type-protease-inhibitor domains from tissue-factor-pathway inhibitor. **European Journal of Biochemistry**, v.235, p.310-316, 1996.

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

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

PREVOT, P.P.; BESCHIN, A.; LINS, L.; BEAUFAYS, J.; GROSJEAN, A.; BRUYS, L.; ADAM, B.; BROSSARD, M.; BRASSEUR, R.; ZOUAOU BOUDJELTIA, K.; VANHAMME, L.; GODFROID, E. Exosites mediate the anti-inflammatory effects of a multifunctional serpin from the saliva of the tick *Ixodes ricinus*. **FEBS Journal**, v.276, p.3235-3246, 2009.

RAMOS, F. W. S. **Efeitos do hormônio de crescimento sobre as células endoteliais tímicas**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Alagoas, Alagoas, Brasil, 2008.

REY, L. **Parasitologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1973. 695p.

RIBEIRO, J. M. C.; ALARCON-CHAIDEZ, F.; FRANCISCHETTI, I. M. B.; MANS, B. J.; MATHER, T. N.; VALENZUELA, J. G.; WIKEL, S. K. An annotated catalog of salivary gland transcripts from *Ixodes scapularis* ticks. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. Oxford, v. 36, p. 111-129, 2006.

RIBEIRO, J.M.; FRANCISCHETTI, I.M. Role of arthropod saliva in blood-feeding: sialome and post-sialome perspectives. **Annual Reviews of Entomology**, v.48, p.73-88, 2003.

RIBEIRO, J.M.C. How ticks make a living. **Parasitology Today**, United Kingdom, v. 11, p. 91-93, 1995.

RIBEIRO, J.M.C.; ENDRIS, T.M.; ENDRIS, R. Saliva of the soft tick, *Ornithodoros moubata*, contains anti-platelet and apyrase activities. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, v. 100, p. 109-112, 1991.

RIBEIRO, J.M.C.; MAKOUL, G.T.; LEVINE, J.; ROBINSON, D.K.; SPILMAN, A. Antihaemostatic, anti-inflammatory and immunosuppressive properties of the saliva of a tick, *Ixodes dammini*. **The Journal of Experimental Medicine**. United States, v. 161, p. 332-344, 1985.

RIBEIRO, J.M.C.; MAKOUL, G.T.; ROBINSON, D.R. *Ixodes dammini*: evidence for salivary prostacyclin secretion. **Journal of Parasitology**, v. 74, p.1068-1069, 1988.

RIBEIRO, J.M.C.; MATHER, T.N. *Ixodes scapularis*: salivary kininase activity is a metallo dipeptidyl carboxypeptidase. **Experimental Parasitology**, v. 89, p. 213-221, 1998.

RUPPERT, E.E.; FOX, R.S.; BARNES, R.D. **Zoologia dos Invertebrados. Uma Abordagem Funcional-Evolutiva**. 7. ed. São Paulo: Roca, 2005. 1145p.

SAKAMAKI, K.; SATOU, Y. Caspases: evolutionary aspects of their functions in vertebrates. **Journal of Fish Biology**, v. 74, p.727-753, 2009.

SANGAMNATDEJ, S.; PAESEN, G.C.; SLOVAK, M.; NUTTALL, P.A. A high affinity serotonin and histamine-binding lipocalin from tick saliva. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 11, p.79-86, 2002.

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

SAUER, J.R.; MCSWAIN, J.L.; BOWMAN, A.S.; ESSENBERG, R.C. Tick salivary gland physiology. **Annual Reviews of Entomology**, v. 40, p.245-267, 1995.

SCHUMAKER, T.T., SERRA-FREIRE, N.M., Histologia das glândulas salivares de adultos de *Argas (Persicargas) miniatus* (Koch, 1844) (Ixodoidea: Argasidae) em jejum, em alimentação e alimentados. **Revista Brasileira de Entomologia**, São Paulo, v.35, p.49-72, 1991.

SHIPLEY, M.M.; DILLWITH, J.W.; BOWMAN, A.S.; ESSEMBERG, R.C.; SAUER, J.R. Changes in lipids of the salivary glands of the lone star tick, *Amblyomma americanum*, during feeding. **Journal of Parasitology**, United States, v. 79, p. 834-842, 1993.

SIMONS, S.M.; SÁ-JÚNIOR, P.L.; FARIA, F.; BATISTA, I.F.C.; BARROS –BATTESTI, D.M.; LABRUNA, M.B.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A.M. The action of *Amblyomma cajennense* tick saliva in compounds of hemostatic system and cytotoxicity in tumor cell lines. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, United States, v. 65, p. 443-450, 2011

SONENSHINE, D.E. The female reproductive system. In: SONENSHINE, D.E. (Org.). **Biology of Ticks**. New York: Oxford University Press, 1991. p. 280-304.

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

STORER, T.I.; USINGER, R.L. **Zoologia Geral**. 6. ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 2000. 816p.

TILL, W.M. A contribution to the anatomy and histology of the brown ear tick *Rhipicephalus appendiculatus* Neuman. **Memoirs of the Entomological Society of Southern Africa**, Pretoria, v.6, p.1-124, 1961.

TURNI, C.; LEE, R.P.; JACKSON, L.A. The effects of salivary gland extracts from *Boophilus microplus* ticks on mitogen-stimulated bovine lymphocytes. **Veterinary Research Communications**, v. 31, p.545-553, 2007.

WALKER, A. **The Arthropods of Humans and Domestic Animals. A Guide to Preliminary Identification**. London: Chapman and Hall, 1994. 213p.

WALKER, A.; FLETCHER, J.D.; GILL, H.S. Structural and histochemical changes in the salivary glands of *Rhipicephalus appendiculatus* during feeding. **International Journal of Parasitology**, Oxford, 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. 643p.

WALL, R.; SHEARER, D. **Veterinary Entomology**. London: Chapman and Hall, 1997. 338p.

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

WEINBERG, R.A. **A biologia do câncer**, ARTMED, Porto Alegre, 2008. 864p.

WHEELER, C.M.; COLEMAN, J.L.; BENACH, J.L. Salivary gland antigens of *Ixodes dammini* are glycoproteins that have interspecies cross-reactivity **Journal of Parasitology**, United States. v. 77, p. 965-973, 1991.

WIKEL, S.K.; ALLEN, J.R. Acquired resistance to ticks. III. Cobra venom factor and the resistance response, **Immunology**, v.32, p.457-465, 1977.

ZHANG, P.; LIU, B.; KANG, S. W.; SEO, M. S.; RHEE, S. G.; OBEID, L. M. Thioredoxin Peroxidase is a novel inhibitor of apoptosis with a mechanism distinct from that of Bcl-2. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 272, p. 30615-30618, 1997.

ZHU, K.; SAUER, J.R.; BOWMAN, A.S.; DILLWITH, J.W. Identification and characterization of anticoagulant activities in the saliva of the lone star tick, *Amblyomma americanum* (L.). **Journal of Parasitology**, v. 83, p.38-43, 1997.

ANEXO A - FOLHA DE APROVAÇÃO DO CEUA



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 021/2013

Instituição: UNESP – IB – CRC	Departamento: Biologia
Protocolo nº: 6269	Data de Registro CEUA: 30.9.2013
Projeto de Pesquisa: "Ação do extrato de glândulas salivares de fêmeas de carrapato <i>Rhipicephalus sanguineus</i> (Latreille, 1806) sobre a inibição e proliferação de células de linhagem tumoral".	
Subprojeto(s) vinculado(s): ==,==	

Pesquisador Responsável: Maria Izabel Souza Camargo

Orientando(a): Luis Adriano Anholetto

Colaborador(es): ==,==

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

A Comissão de Ética no Uso de Animal - CEUA do Instituto de Biociências da UNESP – Campus de Rio Claro, em sua **18ª reunião ordinária**, realizada em **8/11/2013**.

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

Rio Claro, 8 de novembro de 2013.
 Prof. Dr. Mário Sérgio Palma Coordenador da CEUA