

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 18/06/2020.

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

**Estudo *in vivo* do extrato das glândulas salivares de carrapatos
Rhipicephalus sanguineus (Latreille, 1806) em ratos Wistar e citotoxicidade *in vitro* dos acaricidas timol e carvacrol em células da linhagem RML-15.**

NATALIA RUBIO CLARET PEREIRA

Orientadora: Profa. Dra. Maria Izabel Souza Camargo

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

Rio Claro - SP
2019

NATALIA RUBIO CLARET PEREIRA

Estudo *in vivo* do extrato das glândulas salivares de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) em ratos Wistar e citotoxicidade *in vitro* dos acaricidas timol e carvacrol em células da linhagem RML-15.

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

Orientadora: Dra. Maria Izabel Souza Camargo

**Rio Claro – SP
2019**

P436e

Pereira, Natalia Rubio Claret

Estudo in vivo do extrato das glândulas salivares de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) em ratos Wistar e citotoxicidade in vitro dos acaricidas timol e carvacrol em células da linhagem RML-15. / Natalia Rubio Claret Pereira. -- Rio Claro, 2019
138 p.

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

Orientadora: Maria Izabel Souza Camargo

1. Carrapato do cão. 2. Lesão pré-neoplásica. 3. Hepatotoxicidade.
4. Cultura de células. 5. Acaricidas. I. Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO


TÍTULO DA TESE: Estudo *in vivo* do extrato das glândulas salivares de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) em ratos Wistar e citotoxicidade *in vitro* dos acaricidas timol e carvacrol em células da linhagem RML-15

AUTORA: NATALIA RUBIO CLARET PEREIRA

ORIENTADORA: MARIA IZABEL SOUZA CAMARGO

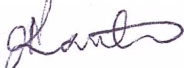
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR), pela Comissão Examinadora:


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


Profa. Dra. KAREN CRISTIANE MARTINEZ DE MORAES
Departamento de Biologia / IB Rio Claro


Prof. Dr. PABLO HENRIQUE NUNES
Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza / UNILA


Profa. Dra. RENATA DA SILVA MATOS
Pós-Doutoranda do Instituto de Ciências Biológicas / Universidade Federal de Juiz de Fora


Profa. Dra. LORENA DO NASCIMENTO PANTALEÃO
x / Instituto Racine

Rio Claro, 18 de junho de 2019

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES).

À minha orientadora Profa. Dra. Maria Izabel Souza Camargo pela oportunidade, paciência, confiança, amizade, conselhos e, principalmente, pela ajuda a tornar esse trabalho possível. Serei eternamente grata e muito orgulhosa de poder trabalhar com essa mulher tão forte e determinada.

Aos meus pais, irmãos, amigos e amigas pelo apoio e confiança depositadas em mim.

À Dra. Lesley Bell-Sakyi, que me recebeu de braços abertos em seu laboratório. E aos membros do *Tick Cell Biobank* e do *Department of Infection Biology* da Universidade de Liverpool, Reino Unido, pelo acolhimento.

Aos membros da *Brazilian Central of Studies on Ticks Morphology* – BCSTM, UNESP – Rio Claro, SP, Brasil, pelo acolhimento e apoio, especialmente aos meus amigos do coração Renata, Marina, Elen, Luis Adriano, Melissa, Rusleyd e Ribamar

Ao técnico do Laboratório de Histologia, Gerson de Mello Souza por seu apoio e aos funcionários do Departamento de Biologia, da UNESP de Rio Claro.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito tóxico e terapêutico do extrato da glândula salivar (EGS) de fêmeas de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae), alimentadas por 2 dias em hospedeiros, em diferentes concentrações, por meio de injeções intraperitoneais em ratas Wistar. Os resultados clínicos mostraram que na concentração de 10 µg/µL houve aumento da frequência de neutrófilos e diminuição da de linfócitos. Na análise histológica do fígado, observou-se que o extrato nessa concentração causou alguns efeitos tóxicos como vacuolização citoplasmática nos hepatócitos e desorganização estrutural dos cordões celulares. Nas concentrações de 40 e 80 µg/µL, as ratas ganharam peso corporal e tiveram o peso relativo do fígado diminuído, evidenciando que essas concentrações causaram toxicidade sistêmica. Nesse trabalho foi também analisado o efeito do EGS apenas na concentração de 0,04µg/µL, sobre lesões pré-neoplásicas (LPN) no fígado de ratos Wistar e observou-se aumento no peso relativo apenas do fígado nos animais dos grupos LPN e LPN+EGS quando comparados ao controle. A histologia mostrou que os animais LPN, antes da injeção do extrato, foram os que tiveram o tecido hepático com maiores danos (desorganização dos cordões, aumento de tecido conjuntivo, vacuolização citoplasmática, células apoptóticas e aumento na frequência de células de Kupffer, células de defesa deste órgão) os quais foram reduzidos quando os ratos receberam o EGS. No presente estudo realizou-se ainda a avaliação *in vitro* do efeito dos acaricidas timol e carvacrol, sobre células RML-15, oriundas de carrapatos *R. sanguineus* s.l. e observou-se que o timol nas várias concentrações testadas não alterou a viabilidade das mesmas, ao contrário do carvacrol que na maior concentração (0,3 µL/mL) matou mais de 70% das células e na de 0,06µL/mL matou 23% delas. Morfológicamente as células expostas às menores concentrações de timol não apresentaram danos e as expostas as maiores concentrações sofreram: vacuolização citoplasmática, picnose e fragmentação nuclear. O carvacrol foi o composto que causou as maiores alterações morfológicas: perda dos limites celulares, picnose e fragmentação nuclear observadas já na exposição as menores concentrações. Na maior concentração houve 100% de morte das células e na de 0,012uL/mL as células entraram em apoptose, o que caracterizou o efeito citotóxico desse acaricida.

Palavras-chave: Carrapato do cão, Lesões pré-neoplásicas (LPN), hepatotoxicidade, cultura de células, carrapatos, acaricidas.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the toxic and pharmacological effect of salivary gland extract (SGE) of female ticks *Rhipicephalus sanguineus* in different concentrations through intraperitoneal injections in Wistar rats. Clinical results showed that at the concentration of 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ there was an increase in neutrophil frequency and a decrease in lymphocytes. It was also observed that in the liver histological analysis, the extract at this concentration caused some toxic effects: cytoplasmic vacuolization in the hepatocytes and structural disorganization in the cellular cords. At concentrations of 40 and 80 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, rats body weight increased, and relative liver weight decreased, showing that these concentrations caused systemic toxicity. In this study, was analysed the effect of SGE in the concentration of 0.04 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ on the pre-neoplastic lesions (PNL) in the liver of Wistar rats, and there was an increase in the relative weight of the liver in the groups PNL and PNL + SGE. The histology showed that the PNL animals had the hepatic tissue with the biggest damage (cord disorganization, increase of connective tissue, cytoplasmic vacuolization, apoptotic cells and increased Kupffer cell quantity, indicating immune response), those alterations were reduced when the mice received the SGE as treatment. In the study about the *in vitro* evaluation of the acaricides effect of thymol and carvacrol on RML-15 cells from *R. sanguineus* s.l. ticks were carried out. Thymol at all tested concentrations did not alter the cells viability, unlike carvacrol that at the highest concentration (0.3 $\mu\text{L}/\text{mL}$) killed more than 70% of the cells and at 0.06 $\mu\text{L}/\text{mL}$ it killed 23% of the cells. Morphologically, the cells exposed to the lowest concentrations of thymol presented no damage and the ones exposed to the highest concentrations had cytoplasmic vacuolization, pyknose and nuclear fragmentation. Carvacrol was the compound that caused the highest morphological changes: loss of cell boundaries, pyknosis and nuclear fragmentation observed at the lowest concentrations. At the highest concentration there was 100% cell death, at 0.012 $\mu\text{L}/\text{mL}$ the cells entered apoptosis, which characterized the cytotoxic effect of this acaricide.

Keywords: *Dog tick*, preneoplastic lesions (PNL), hepatotoxicity, cell culture, ticks, acaricides.

LISTA ABREVIATURAS E SIGLAS

2-AAF	2-acetilaminofluoreno
BCSTM	<i>Brazilian Central of Studies on Ticks Morphology</i>
CEUA	Comitê de Ética em Uso Animal
DEN	Dietilnitrosamina
DMSO	Dimetilsulfóxido
EGS	Extrato da Glândula Salivar
BOD	Biochemical Oxygen Demand
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
<i>R. sanguineus</i>	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>
s. l.	sensu lato
s. s.	sensu stricto
GC	Grupo Controle
HCC	Hepatocarcinoma
HE	Hematoxilina e Eosina
LPN	Lesão pré-neoplásica
MEM	<i>Minimal Essential Medium</i>
NaCl	Cloreto de Sódio
OECD	<i>Organization for Economic Co-Operation and Development</i>
OM	Óleo de Milho
PAS	Ácido Periódico- Schiff
PNL	<i>Pre neoplastic lesions</i>
HR	Hepatócito Resistente
RML-15	Linhagem celular <i>Rocky Mountain Lab</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
SGE	<i>Salivary Gland Extract</i>
TPB	<i>Tryptose phosphate broth</i>

SUMARIO

INTRODUÇÃO.....	7
Extrato de glândulas salivares de carrapatos <i>Rhipicephalus sanguineus</i> s. l.....	7
Hepatocarcinoma	7
Modelo experimental de lesões pré-neoplásicas (LPN).....	8
Efeito terapêutico do extrato de glândulas salivares de carrapatos.....	8
Cultura de células de carrapatos	9
OBJETIVOS GERAIS	11
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	11
MATERIAL E MÉTODOS.....	12
Carrapatos	12
Obtenção do Extrato da Glândula Salivar (EGS) de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> s. l. ...	12
Ensaio <i>in vivo</i>	12
Ensaio de Toxicidade: Aplicação dos Compostos	13
Avaliação do efeito do EGS em Lesões Pré-Neoplásicas (LPN)	13
Indução das LPN	13
Aplicação do EGS	14
Análise hematológica	15
Análises Histológicas.....	15
Coloração pela hematoxilina e eosina (HE).....	15
Técnica do PAS (Ácido Periódico- Schiff) (McMANUS, 1946)	16
Ensaio <i>in vitro</i>	16
Manutenção da linhagem de células de carrapatos: RML-15 (Rocky Mountain Lab).....	16
Exposição da linhagem celular RML-15 ao timol e ao carvacrol.....	17
Análise da viabilidade celular e da confluência das células.....	17
Análise morfológica das células RML-15.....	18

Quantificação de células apoptóticas	18
Análise estatística.....	18
RESULTADOS	19
ARTIGO 1	19
ARTIGO 2	47
ARTIGO 3	69
CAPÍTULOS DE LIVRO	95
DISCUSSÃO GERAL.....	19
CONCLUSÕES	132
REFERÊNCIAS	133

INTRODUÇÃO

Extrato de glândulas salivares de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* s. l.

Os carrapatos da espécie *R. sanguineus* s. l. tem como hospedeiro preferencial o cão doméstico e por isso são conhecidos popularmente como “carrapato marrom do cão”, podendo, no entanto, parasitar outros animais de estimação e até mesmo os seres humanos (DANTAS-TORRES; FIGUEREDO; BRANDÃO-FILHO, 2006; GRAY et al., 2013). Trata-se de um ectoparasita de grande importância médico-veterinária por ser também o principal vetor de bactérias, vírus e protozoários em animais domésticos, causando nestes doenças como a Erliquiose (*Ehrlichia canis*), Babesiose (*Babesia canis*) e Hemobartonelose (*Haemobartonella canis*) em cães, e ainda, em humanos transmitindo as *Rickettsia conorii* e *R. rickettsii*, causadoras da febre botonosa e maculosa, respectivamente (DANTAS-TORRES, 2008, 2010).

A alimentação nos carrapatos dá-se basicamente devido à ação combinada das suas estruturas bucais e da liberação da saliva produzida nas glândulas salivares, mistura complexa de vários bioativos capazes de modular o sistema imune dos hospedeiros (CAMARGO-MATHIAS, 2013). Nesses podem ser encontradas as moléculas: fosfatases ácidas, esterases, aminopeptidases, metaloproteases, prostaglandinas, lipocalinas e calreticulinas, além de outras com propriedades ainda desconhecidas (BINNINGTON, 1978; MULENGA; BLANDON; KHUMTHONG, 2007; OLIVEIRA et al., 2011). Aquelas já conhecidas tem papel importante nos processos de: vasodilatação, angiogênese, diminuição da coagulação, aumento da fibrinólise, inibição da agregação plaquetária, e imunomodulação (DREWES et al., 2012; HOVIUS; LEVI; FIKRIG, 2008; SAUER; ESSENBERG; BOWMAN, 2000).

Hepatocarcinoma

O fígado dos mamíferos é o órgão responsável pelos processos de metabolização e neutralização de compostos, regulação da homeostase sanguínea e desintoxicação do organismo, via células hepáticas (hepatócitos), as quais encontram-se dispostas em cordões nos lóbulos, estes permeados por vasos sanguíneos que possibilitam as trocas de macromoléculas entre o sangue e as células (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017). É no fígado que os agentes tóxicos como por exemplo os carcinógenos são processados (HASCHEK; ROUSSEAU; WALLIG, 2010).

Segundo dados disponíveis, o câncer é considerado como um dos principais causadores de mortes em pessoas com menos de 70 anos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017).

Segundo a IARC (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER) em 2018 haveria 12 milhões de novos casos com 9,6 milhões de mortes. Ainda segundo os dados, os tipos de câncer que mais frequentemente acometem os humanos nos países em desenvolvimento são: o de fígado (hepatocarcinoma), o de pulmão (carcinoma espinocelular e adenocarcinoma) e o de estômago (adenocarcinoma) (SCHRAUF et al., 2009).

O hepatocarcinoma (HCC) é um tipo agressivo que ocorre no fígado e geralmente é: a) decorrente de inflamações crônicas causadas pelo desenvolvimento de cirrose hepática, b) devido a infecção por vírus das hepatites B ou C, c) devido ao consumo de álcool a longo prazo e d) pela exposição à toxinas carcinogênicas (TANNAPFEL; WITTEKIND, 2002; YU; YUAN, 2004). Na maioria dos casos é diagnosticado em estágio tardio, pois os sintomas clínicos são silenciosos e, sendo assim, os tratamentos disponíveis têm sido pouco eficazes (DÍAZ-GONZÁLEZ et al., 2016; LOPEZ; VILLANUEVA; LLOVET, 2006).

Modelo experimental de lesões pré-neoplásicas (LPN)

O desenvolvimento do HCC passa por diferentes estágios que envolvem múltiplas alterações induzidas por agentes físicos, químicos ou biológicos, capazes de gerar danos no DNA, comprometendo o sistema de reparo e ainda estimulando a proliferação celular pois, na formação da neoplasia, há a conversão do dano em alteração herdável (FARBER; SARMA, 1987; MARTINEZ et al., 2003; PITOT, 2001).

Um modelo que vem sendo utilizado para o estudo da hepatocarcinogênese em ratos é aquele do Hepatócito Resistente (HR) descrito em 1976 e modificado em 1987 o qual consiste na administração única do agente DEN (dietilnitrosamina), seguido da administração do 2-AAF (2-acetilanimofluoreno) (SEMPLE-ROBERTS et al., 1987; SOLT; FARBER, 1976). Esse modelo postula que o 2-AAF é capaz de inibir a proliferação dos hepatócitos normais, mas não dos “hepatócitos resistentes” os quais seriam resultados da aplicação do DEN e causariam lesões pré-neoplásicas (LPN) (SCOLASTICI et al., 2014), estas utilizadas na identificação de marcadores neoplásicos, no estudo da progressão tumoral e de estratégias preventivas (PÉREZ-CARREÓN et al., 2006).

Efeito terapêutico do extrato de glândulas salivares de carrapatos

Além das ações anti-hemostática, anticoagulante e anti-inflamatória da saliva dos carrapatos já serem bem conhecidas, novos estudos vêm buscando esclarecer os mecanismos envolvidos na síntese e na utilização do arsenal farmacológico das glândulas salivares dos carrapatos. Os resultados têm demonstrado que os bioativos sintetizados por esses animais

podem ser ótimos aliados em terapias alternativas de diversas doenças, bem como de neoplasias (ABREU, 2014; CHUDZINSKI-TAVASSI et al., 2010; SIMONS et al., 2011).

Segundo a literatura, a saliva de diferentes espécies de carrapatos teria também a capacidade de inibir a proliferação de células endoteliais (FRANCISCHETTI et al., 2009) e dados de Kazimírová e Stibraniova (2013) e Simons et al. (2011) mostraram que a substância Amblyomin-X, por exemplo, extraído da saliva bruta da espécie *Amblyomma cajennense*, teria efeitos tóxicos *in vitro* sobre células tumorais de melanoma, adenocarcinoma pancreático e em células murinas de adenocarcinoma renal levando-as à morte por apoptose, porém, sem afetar os fibroblastos saudáveis (AKAGI et al., 2012). Ainda, o extrato de glândulas salivares obtido de fêmeas de carrapatos *R. sanguineus* alimentados por 2 dias demonstrou potencial de inibir a invasão de células de tumor de Walker 256 instalado na musculatura da pata de ratas Wistar *in vivo*, sem, no entanto, provocar outros danos no organismo (ABREU et al., 2014).

Apesar de diversos pesquisadores já terem evidenciado a ação anti-tumoral da saliva/extrato de glândulas salivares de carrapatos, novos estudos com diferentes modelos tumorais devem ser realizados a fim de se ampliar o conhecimento sobre o possível efeito terapêutico destas substâncias. Além disso, no caso do extrato, a avaliação da sua toxicidade é de importância fundamental, uma vez que o mesmo é composto por substâncias com propriedades biológicas tanto conhecidas quanto ainda nem tão conhecidas e que podem, eventualmente desencadear reações sistêmicas no organismo.

Cultura de células de carrapatos

Estudos com a morfofisiologia de carrapatos vem sendo amplamente desenvolvidos por pesquisadores do grupo *Brazilian Central of Studies on Ticks Morphology* (BCSTM) através de bioensaios com os carrapatos (CAMARGO-MATHIAS, 2013). No entanto, trabalhos que abordem os efeitos desses bioativos sobre células obtidas dos próprios ectoparasitas, na condição *in vitro*, ainda são escassos. Diante disso, testar *in vitro* o potencial acaricida de dois bioativos: o timol extraído de plantas das famílias Lamiaceae e Verbanaceae e o carvacrol extraído de plantas das famílias Apiacea, Lamiacea e Verbenaceae (DE OLIVEIRA-CRUZ et al., 2013; KOC et al., 2013; LAGE et al., 2013) fazendo para tanto o uso de linhagens celulares ao invés de hospedeiros *in vivo*, seria uma estratégia muito interessante para se obter informações sobre a toxicidade dessas substâncias, que embora potentes acaricidas, não teriam ainda totalmente esclarecidos seus efeitos sobre os organismos a elas expostas. Nessa direção é que foi elaborada esta proposta, cujos resultados obtidos *in vitro* serão de extrema importância

no sentido de se propor estratégias de controle desses ectoparasitas sem fazer uso de animais (hospedeiros) *in vivo*.

CONCLUSÕES

- a) A exposição aguda de ratas Wistar ao extrato (EGS) obtido a partir de glândulas salivares de fêmeas de carrapatos *R. sanguineus* s. l. na concentração de 10 µg/µL não causou toxicidade sistêmica nos animais, mas causou hepatotoxicidade (alterações morfológicas no fígado) e alterações hematológicas (aumento de neutrófilos e diminuição de linfócitos).
- b) A exposição aguda das ratas ao EGS de fêmeas de carrapatos *R. sanguineus* s. l. nas concentrações de 40 e de 80 µg/µL causou toxicidade sistêmica nos animais detectada por meio do aumento do peso relativo do fígado e da presença de alterações morfohistológicas.
- c) A concentração de 80 µg/µL do EGS foi a mais tóxica, inclusive aumentando o recrutamento de células de Kupffer.
- d) O EGS à concentração de 0,04 µg/µL reduziu os danos no fígado dos ratos LPN positivos.
- e) O timol alterou, *in vitro*, a morfologia das células da linhagem RML-15.
- f) O carvacrol foi citotóxico *in vitro*, para as células RML-15 e induziu a apoptose destas.

REFERÊNCIAS

- ABREU, M. R. DE; ROCHA, F. A.; FURQUIM, K. C. S.; ANHOLETO, L. A.; NOVAES, F. C. F.; MORSOLETO, M. J.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Salivary Glands of Female Ticks *Rhipicephalus sanguineus* Like a Potential Source of Molecules with Inhibitory Action: In vivo study with Walker 256 Tumor Cells. **Journal of Pharmaceutical Care & Health Systems**, v. 01, n. 04, p. 1–8, 2014..
- ABREU, R. M. M.; DE ABREU, M. R.; SANTOS, J. P.; HEBLING, L. M. G. F.; ANHOLETO, L. A.; DE SOUZA, J. R. L.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Morphological evaluation of the liver in Wistar rats inoculated with *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) salivary gland extracts. **Microscopy Research and Technique**, v. 81, n. 11, p. 1332–1338, 2018.
- AKAGI, E. M.; JÚNIOR, P. L. DE S.; SIMONS, S. M.; BELLINI, M. H.; BARRETO, S. A.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M. Pro-apoptotic effects of Amblyomin-X in murine renal cell carcinoma “in vitro”. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 66, p. 64–69, 2012.
- BELL-SAKYI, L.; ZWEYGARTH, E.; BLOUIN, E. F.; GOULD, E. A.; JONGEJAN, F. Tick cell lines: tools for tick and tick-borne disease research. **Trends in Parasitology**, v. 23, n. 9, p. 450–457, 1 set. 2007.
- BINNINGTON, K. C. Sequential changes in salivary gland structure during attachment and feeding of the cattle tick, *Boophilus microplus*. **International Journal for Parasitology**, v. 8, n. 2, p. 97–115, 1978.
- BOWMAN, A. S.; DILLWITH, J. W.; SAUER, J. R. Tick salivary prostaglandins: Presence, origin and significance. **Parasitology Today**, v. 12, n. 10, p. 388–396, 1996.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.
- BRASIL. **Resolução Normativa N 33, de 18 de novembro de 2016** Brasília, DFCONCEA Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicação., 2016. Disponível em: <http://www.mctic.gov.br/mctic/export/sites/institucional/institucional/concea/arquivos/legislaacao/resolucoes_normativas/Resolucao-Normativa-CONCEA-n-33-de-18.11.2016-D.O.U.-de-21.11.2016-Secao-I-Pag.-05.pdf>. Acesso em: 20 maio. 2019
- CAMARGO-MATHIAS, M. I. **Guia básico de morfologia interna de carrapatos ixodídeos**. 1ª ed. São Paulo: Editora UNESP, 2013.
- CAMARGO-MATHIAS, M. I. **Inside Ticks: Morphophysiology, toxicology and therapeutic perspectives**. 1ª ed. São Paulo: Editora UNESP, 2018.
- CAPERUCCI, D.; CAMARGO-MATHIAS, M. I.; BECHARA, G. H. Histopathology and Ultrastructure Features of the Midgut of Adult Females of the Tick *Amblyomma cajennense* Fabricius, 1787 (Acari: Ixodidae) in Various Feeding Stages and Submitted to Three Infestations. **Ultrastructural Pathology**, v. 33, n. 6, p. 249–259, 20 jan. 2009.
- CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M.; DE-SÁ-JÚNIOR, P. L.; SIMONS, S. M.; MARIA, D. A.; DE SOUZA VENTURA, J.; DE FÁTIMA CORREIA BATISTA, I.; FARIA, F.; DURÃES, E.; REIS, E. M.; DEMASI, M. 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.

CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M.; MORAIS, K. L. P.; PACHECO, M. T. F.; PASQUALOTO, K. F. M.; DE SOUZA, J. G. Tick salivary gland as potential natural source for the discovery of promising antitumor drug candidates. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 77, p. 14–19, 2016.

DANTAS-TORRES, F. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): From taxonomy to control. **Veterinary Parasitology**, v. 152, n. 3, p. 173–185, 2008.

DANTAS-TORRES, F. Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. **Parasites & vectors**, v. 3, n. 26, p. 1–11, 2010.

DANTAS-TORRES, F.; FIGUEREDO, L. A.; BRANDÃO-FILHO, S. P. *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae), the brown dog tick, parasitizing humans in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 1, p. 64–67, fev. 2006.

DE OLIVEIRA-CRUZ, E. M.; COSTA-JUNIOR, L. M.; PINTO, J. A. O.; SANTOS, D. DE A.; ARAÚJO, S. A.; FÁTIMA, A.-B. M. DE; BACCI, L.; ALVES, P. B.; CAVALCANTI, S. C. DE H.; BLANK, A. F. Acaricidal activity of *Lippia gracilis* essential oil and its major constituents on the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 195, n. 1–2, p. 198–202, 2013.

DÍAZ-GONZÁLEZ, Á.; FORNER, A.; RODRÍGUEZ-DE-LOPE, C.; VARELA, M. New challenges in clinical research on hepatocellular carcinoma. **Rev esp enfeRm dig**, v. 108, p. 485–493, 2016.

DREWES, C. C.; DIAS, R. Y. S.; HEBEDA, C. B.; SIMONS, S. M.; BARRETO, S. A.; FERREIRA, J. M.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M.; FARSKY, S. H. P. Actions of the Kunitz-type serine protease inhibitor Amblyomin-X on VEGF-A-induced angiogenesis. **Toxicon**, 2012.

FARBER, E.; SARMA, D. S. Hepatocarcinogenesis: a dynamic cellular perspective. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, v. 56, n. 1, p. 4–22, jan. 1987.

FRANCISCHETTI, I. M. B.; SA-NUNES, A.; MANS, B. J.; SANTOS, I. M.; RIBEIRO, J. M. C. The role of saliva in tick feeding. **Frontiers in Bioscience (Landmark edition)**, v. 14, p. 2051–88, jan. 2009.

FURTADO, K. S.; PIRES, P. W.; JUSTULIN, L. A.; RODRIGUES, M. A. M.; FELISBINO, S. L.; BARBISAN, L. F. Metalloproteinases 2 and -9 activity during promotion and progression stages of rat liver carcinogenesis. **Journal of Molecular Histology**, 2009.

GOMES, G. A.; MONTEIRO, C. M. O.; JULIÃO, L. DE S.; MATURANO, R.; SENRA, T. O. S.; ZERINGÓTA, V.; CALMON, F.; MATOS, R. DA S.; DAEMON, E.; CARVALHO, M. G. DE. Acaricidal activity of essential oil from *Lippia sidoides* on unengorged larvae and nymphs of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) and *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). **Experimental Parasitology**, v. 137, p. 41–45, 1 fev. 2014.

GROOS, J.; BANNASCH, P.; SCHWARZ, M.; KOPP-SCHNEIDER, A. Comparison of mode of action of four hepatocarcinogens: A model-based approach. **Toxicological Sciences**,

v. 99, n. 2, p. 446–454, 2007.

HASCHEK, W. M.; ROUSSEAU, C. G.; WALLIG, M. A. **Fundamentals of toxicologic pathology**. 2nd. ed. Boston: Elsevier Inc., 2010.

HOVIUS, J. W. R.; LEVI, M.; FIKRIG, E. Salivating for Knowledge: Potential Pharmacological Agents in Tick Saliva. **Plos Medicine**, v. 5, n. 2, p. 202–208, 2008a.

HOVIUS, J. W. R.; LEVI, M.; FIKRIG, E. Salivating for Knowledge: Potential Pharmacological Agents in Tick Saliva. **PLoS Medicine**, v. 5, n. 2, p. e43, fev. 2008b.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK294452/>>. Acesso em: 21 maio. 2019.

ITO, T.; SHIRAKI, K.; SUGIMOTO, K.; YAMANAKA, T.; FUJIKAWA, K.; ITO, M.; TAKASE, K.; MORIYAMA, M.; KAWANO, H.; HAYASHIDA, M.; NAKANO, T.; SUZUKI, A. Survivin promotes cell proliferation in human hepatocellular carcinoma. **Hepatology**, v. 31, n. 5, p. 1080–1085, maio 2000.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 13^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

KAUFMAN, W. R. Organ culture of ixodid-tick salivary glands. **Experimental and Applied Acarology**, 1990.

KAZIMIROVA, M.; STIBRANIOVA, I. Tick salivary compounds their role in modulation of host defences and pathogen transmission. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 3, n. 43, 2013.

KOC, S.; OZ, E.; CINBILGEL, I.; AYDIN, L.; CETIN, H. Acaricidal activity of *Origanum bilgeri* P.H. Davis (Lamiaceae) essential oil and its major component, carvacrol against adults *Rhipicephalus turanicus* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 193, n. 1–3, p. 316–9, 31 mar. 2013.

LAGE, T. C. D. A.; MONTANARI, R. M.; FERNANDES, S. A.; DE OLIVEIRA MONTEIRO, C. M.; DE OLIVEIRA SOUZA SENRA, T.; ZERINGOTA, V.; CALMON, F.; DA SILVA MATOS, R.; DAEMON, E. Activity of essential oil of *Lippia triplinervis* Gardner (Verbenaceae) on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v. 112, n. 2, p. 863–9, fev. 2013.

LECOEUR, H.; DE OLIVEIRA-PINTO, L. M.; GOUGEON, M.-L. Multiparametric flow cytometric analysis of biochemical and functional events associated with apoptosis and oncosis using the 7-aminoactinomycin D assay. **Journal of immunological methods**, v. 265, n. 1–2, p. 81–96, 1 jul. 2002.

LIMA DE SOUZA, J. R.; OLIVEIRA, P. R. DE; ANHOLETO, L. A.; ARNOSTI, A.; DAEMON, E.; REMEDIO, R. N.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Effects of carvacrol on oocyte development in semi-engorged *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* females ticks (Acari: Ixodidae). **Micron**, v. 116, n. June 2018, p. 66–72, 2019.

LOPEZ, P. M.; VILLANUEVA, A.; LLOVET, J. M. Systematic review: evidence-based management of hepatocellular carcinoma – an updated analysis of randomized controlled trials. **Aliment Pharmacol Ther Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 23, p.

1535–1547, 2006.

MANGIA, C.; VISMARRA, A.; GENCHI, M.; EPIS, S.; BANDI, C.; GRANDI, G.; BELL-SAKYI, L.; OTRANTO, D.; PASSERI, B.; KRAMER, L. Exposure to amitraz, fipronil and permethrin affects cell viability and ABC transporter gene expression in an *Ixodes ricinus* cell line. **Parasites & Vectors**, v. 11, n. 1, p. 437, 31 dez. 2018.

MARTINEZ, G. R.; LOUREIRO, A. P. M.; MARQUES, S. A.; MIYAMOTO, S.; YAMAGUCHI, L. F.; ONUKI, J.; ALMEIDA, E. A.; GARCIA, C. C. M.; BARBOSA, L. F.; MEDEIROS, M. H. G.; DI MASCIO, P. Oxidative and alkylating damage in DNA. **Mutation research**, v. 544, n. 2–3, p. 115–27, nov. 2003.

MATOS, R. S.; DAEMON, E.; CAMARGO-MATHIAS, M. I.; FURQUIM, K. C. S.; SAMPIERI, B. R.; REMÉDIO, R. N.; ARAÚJO, L. X.; NOVATO, T. P. L. Histopathological study of ovaries of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) exposed to different thymol concentrations. **Parasitology Research**, v. 113, n. 12, p. 4555–65, dez. 2014.

MATOS, R. S.; DAEMON, E.; DE OLIVEIRA MONTEIRO, C. M.; SAMPIERI, B. R.; MARCHESINI, P. B. C.; DELMONTE, C.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Thymol action on cells and tissues of the synganglia and salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato females (Acari: Ixodidae). **Ticks and Tick-borne Diseases**, 2018.

MCMANUS, J. F. A. **Histological demonstration of mucin after Periodic Acid Nature**, 1946.

MICHAEL, B.; YANO, B.; SELLERS, R. S.; PERRY, R.; MORTON, D.; ROOME, N.; JOHNSON, J. K.; SCHAFER, K. Evaluation of Organ Weights for Rodent and Non-Rodent Toxicity Studies: A Review of Regulatory Guidelines and a Survey of Current Practices. **Toxicologic Pathology**, v. 35, n. 5, p. 742–750, 6 ago. 2007.

MORENO, F. S.; RIZZI, M. B. S. L.; DAGLI, M. L. Z.; PENTEADO, M. V. C. Inhibitory effects of β -carotene on preneoplastic lesions induced in Wistar rats by the resistant hepatocyte model. **Carcinogenesis**, v. 12, n. 10, p. 1817–1822, 1 out. 1991.

MULENGA, A.; BLANDON, M.; KHUMTHONG, R. The molecular basis of the *Amblyomma americanum* tick attachment phase. **Experimental and Applied Acarology**, v. 41, n. 4, p. 267–287, 2 maio 2007.

OECD. OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method INTRODUCTION. 2001.

OLIVEIRA, C. J. F.; SÁ-NUNES, A.; FRANCISCHETTI, I. M. B.; CARREGARO, V.; ANATRIELLO, E.; SILVA, J. S.; SANTOS, I. K. F. M.; RIBEIRO, J. M. C.; FERREIRA, B. R. Deconstructing tick saliva: Non-protein molecules with potent immunomodulatory properties. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, p. 10960–10969, 2011.

PÉREZ-CARREÓN, J. I.; LÓPEZ-GARCÍA, C.; FATTEL-FAZENDA, S.; ARCE-POPOCA, E.; ALEMÁN-LAZARINI, L.; HERNÁNDEZ-GARCÍA, S.; LE BERRE, V.; SOKOL, S.; FRANCOIS, J. M.; VILLA-TREVIÑO, S. Gene expression profile related to the progression of preneoplastic nodules toward hepatocellular carcinoma in rats. **Neoplasia (New York, N.Y.)**, v. 8, n. 5, p. 373–83, maio 2006.

PITOT, H. C. Animal models of neoplastic development. **Developments in biologicals**, v. 106, p. 53–7; discussion 57–9, 143–60, 2001.

REY, L. **Parasitologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2008.

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

SCHRAUF, S.; MANDL, C. W.; BELL-SAKYI, L.; SKERN, T. Extension of Flavivirus Protein C Differentially Affects Early RNA Synthesis and Growth in Mammalian and Arthropod Host Cells. *Journal of Virology*, v. 83, n. 21, p. 11201–11210, 2009.

SCOLASTICI, C.; DE CONTI, A.; TESTONI CARDOZO, M.; PRATES ONG, T.; PURGATTO, E.; ADERUZA HORST, M.; HEIDOR, R.; SILVA FURTADO, K.; KEMPFER BASSOLI, B.; SALVADOR MORENO, F. β -Ionone Inhibits Persistent Preneoplastic Lesions During the Early Promotion Phase of Rat Hepatocarcinogenesis: TGF- α , NF- κ B, and p53 as Cellular Targets. *Nutrition and Cancer*, v. 66, n. 2, p. 234–241, 2014.

SEMPLE-ROBERTS, E.; HAYES, M. A.; ARMSTRONG, D.; BECKER, R. A.; RACZ, W. J.; FARBER, E. Alternative methods of selecting rat hepatocellular nodules resistant to 2-acetylaminofluorene. *International journal of cancer*, v. 40, n. 5, p. 643–5, 15 nov. 1987.

SIMONS, S. M.; JÚNIOR, P. L. DE S.; FARIA, F.; BATISTA, I. DE F. C.; BARROS-BATTESTI, D. M.; LABRUNA, M. B.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M. The action of *Amblyomma cajennense* tick saliva in compounds of the hemostatic system and cytotoxicity in tumor cell lines. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, v. 65, n. 6, p. 443–450, 2011.

SOLT, D.; FARBER, E. New principle for the analysis of chemical carcinogenesis. *Nature*, v. 263, p. 701–703, 1976.

SONESHINE, D. E.; ROE, M. R. **Biology of Ticks Vol. 1**. 2nd. ed. New York: Oxford University Press, 2014.

SOUZA, A. C. P.; SZABÓ, M. P. J.; OLIVEIRA, C. J. F.; SILVA, M. J. B. Exploring the anti-tumoral effects of tick saliva and derived components. *Toxicon*, v. 102, p. 69–73, 2015.

TANNAPFEL, A.; WITTEKIND, C. Genes involved in hepatocellular carcinoma: deregulation in cell cycling and apoptosis. *Virchows Archiv*, v. 440, n. 4, p. 345–352, 6 abr. 2002.

TSUCHIYA, N.; SAWADA, Y.; ENDO, I.; SAITO, K.; UEMURA, Y.; NAKATSURA, T. Biomarkers for the early diagnosis of hepatocellular carcinoma. *World Journal of Gastroenterology*, v. 21, n. 37, p. 10573, 7 out. 2015.

WALKER, A. R.; FLETCHER, J. D.; GILL, H. S. Structural and histochemical changes in the salivary glands of *Rhipicephalus appendiculatus* during feeding. *International Journal for Parasitology*, 1985a.

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

WALLIG, M. A.; HASCHEK, W. M.; ROUSSEAU, C. G.; BOLON, B. **Fundamentals of Toxicologic Pathology**. 3rd. ed. London: Elsevier, 2017.

WILLIAMS, G. M.; IATROPOULOS, M. J.; WANG, C. X.; JEFFREY, A. M.; THOMPSON, S.; PITTMAN, B.; PALASCH, M.; GEBHARDT, R. Nonlinearities in 2-

Acetylaminofluorene Exposure Responses for Genotoxic and Epigenetic Effects Leading to Initiation of Carcinogenesis in Rat Liver. **Toxicological Sciences**, v. 45, n. 2, p. 152–161, out. 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guide to early cancer diagnosis**. [s.l: s.n.].

YU, M. C.; YUAN, J.-M. Environmental factors and risk for hepatocellular carcinoma. **Gastroenterology**, v. 127, n. 5 Suppl 1, p. S72-8, nov. 2004.