


---

Ciências Biológicas

---

**Marina Rodrigues de Abreu**

**ESTUDO DO EXTRATO DE GLÂNDULAS  
SALIVARES DE FÊMEAS DE CARRAPATOS  
*Rhipicephalus sanguineus* SOBRE A  
MORFOLOGIA DE CÉLULAS TUMORAIS  
DA LINHAGEM WALKER 256.**



Rio Claro  
2015

MARINA RODRIGUES DE ABREU

**ESTUDO DO EXTRATO DE GLÂNDULAS SALIVARES DE FÊMEAS DE  
CARRAPATOS *Rhipicephalus sanguineus* SOBRE A MORFOLOGIA DE  
CÉLULAS TUMORAIS DA LINHAGEM WALKER 256.**

Orientadora: Profa. Dra. Maria Izabel Camargo Mathias

Co-orientadora: Dra. Karim Christina Scopinho Furquim

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

Rio Claro  
2015

595.42 Abreu, Marina Rodrigues de  
A162e Estudo do extrato de glândulas salivares de fêmeas de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* sobre a morfologia de células tumorais da linhagem Walker 256 / Marina Rodrigues de Abreu. - Rio Claro, 2015  
38 f. : il., tabs., fots.

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro

Orientador: Maria Izabel Camargo Mathias

Coorientador: Karim Christina Scopinho Furquim

1. Ácaro. 2. Ratos Wistar. 3. Músculo. I. Título.

**Dedico este trabalho com muito  
carinho aos meus pais,  
Mauro e Elaine.**

## **Agradecimentos**

Agradeço meu pai Mauro Abreu e a minha mãe Elaine Jordão, aos meus irmãos Mauro e Mariana Abreu, por tudo que dividiram comigo durante esses anos de faculdade. Vocês foram meu apoio e motivação para a conclusão dessa etapa. Muito obrigada por ser essa família maravilhosa que acredita mais em mim do que eu mesma.

Agradeço meu namorado e amigo, Bruno Zumpano, por tanto amor e compreensão, por todo incentivo e confiança depositada, por tantas vezes guardar seus problemas no bolso e me ajudar a resolver os meus. Enfim, por estar sempre ao meu lado, não apenas nesse trabalho, mas em todos os aspectos possíveis de se estar com alguém, obrigada.

Aos meus amigos por serem meu escape, por me acompanharem no “ainda nem comecei” e me fazerem sentir melhor por sempre deixar tudo pra última hora. Agradeço pelas conversas e momentos extracurriculares e pelas amizades que levarei da faculdade. Obrigada em especial a Rafaela Constantini e Marina Silveira por estarem comigo em cada momento dessa etapa, sendo nas “neuras”, nas TPMs grupais, nos almoços ou nas fugas de final de semestre, sem vocês eu não teria conseguido.

A minha amiga de sempre Talita Minatel, por entender a minha constante falta de tempo e abrir brechas no seu cotidiano também agitado para ouvir meus anseios e tomar aquele “café”, obrigada por se orgulhar tanto de mim, mesmo quando nem eu entendo o motivo. Aos meus familiares, meus tios e tias que me acompanham a cada conquista, e principalmente aos meus primos tão presentes mesmo quando estão distantes, obrigada pelos finais de semana descontraídos, pelas discussões que fizeram parte da minha formação, e pelo carinho.

Agradeço ao meu grupo de pesquisa BCSTM (Brazilian Central of Studies on Ticks Morphology) por todo apoio acadêmico e por esclarecerem todas as minhas dúvidas. A minha querida orientadora professora doutora Maria Izabel Camargo Mathias, por todo carinho e paciência comigo, por me amparar e guiar exaustivamente a cada desafio e dificuldade, e principalmente por exigir o meu melhor. A minha coorientadora Karim Furquim por tanto tempo e paciência investido na minha formação como pesquisadora, e todo esforço para que este trabalho fosse concluído. Muito obrigada, vocês são meus melhores exemplos.

Agradeço de coração à doutora e amiga Fabiana Alonso pelas loucuras, atrasos, correria e parceria durante a realização dos nossos trabalhos, você foi fundamental para essa pesquisa e aprendi muito com os “xabus”. Ao Luís Adriano pelo companheirismo e por ser tão disposto a ajudar e me aconselhar em qualquer situação. E claro, ao técnico mais bem humorado e divertido que alguém poderia ser presenteado em seu laboratório, Gerson, obrigada por fazer os dias do Departamento de Biologia mais leves, musicais e hilários.

Cabe-me agradecer também a dois grupos muito especiais, que apesar de não terem contribuído diretamente para a realização desse trabalho, proporcionaram subsídios para a minha formação acadêmica e pessoal dentro da UNESP. Ao grupo PET Biologia, pelos dois anos de trabalho em grupo que me ensinaram entre tantas outras coisas, que a universidade é muito mais do que fazemos dentro da sala de aula, e sobre a grande importância de projetos de extensão. E ao Grupo Tomba-Latas que me proporcionou experiências indescritíveis e me mostrou como podemos fazer a diferença em pequenos atos.

Finalmente, ao CNPQ e a Prope pelo financiamento desse estudo.

A todos que mesmo não citados, contribuíram direta ou indiretamente na conquista dessa etapa, muito obrigada.

**“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original.”**

**Albert Einstein**

## Resumo

As glândulas salivares são órgãos vitais para o sucesso biológico dos carrapatos por serem responsáveis pela síntese e liberação da saliva, mistura cuja composição é rica em moléculas capazes de modular o sistema imune-inflamatório e hemostático dos hospedeiros. A saliva desses organismos tem sido amplamente estudada devido o interesse farmacológico por seus compostos bioativos, haja vista, o recente relato na literatura sobre a capacidade da saliva bruta de carrapatos da espécie *Amblyomma cajennense* de agir como desencadeadora do processo de morte em células da linhagem tumoral sem afetar os fibroblastos normais expostos à mesma saliva (SIMONS et al., 2011). Frente à diferença encontrada na composição das secreções salivares produzidas por diversos gêneros e espécies de carrapatos, e reconhecendo a importância de estudos que esclareçam o potencial antitumoral da saliva desses organismos, o presente estudo propôs a realização de uma investigação pormenorizada do potencial antitumoral do extrato obtido a partir de glândulas salivares de fêmeas de *Rhipicephalus sanguineus* (carrapato do cão) alimentadas por dois dias, sobre a morfologia do tumor de Walker 256, *in vivo*, objetivando demonstrar como e quais as concentrações do extrato afetam a morfologia das células tumorais no tecido, através de técnicas de microscopia. Para isso, foram avaliados os efeitos da injeção de duas concentrações diferentes (0,2 e 0,04 ug/uL) de extratos (uma ou duas aplicações) sobre a morfologia da musculatura de pernas posteriores de ratas Wistar inoculadas com células do tumor de Walker 256. Os resultados mostraram tanto na histologia quanto na microscopia eletrônica que a injeção única da menor concentração do extrato (0,04 ug/uL) foi mais efetiva na contenção da invasão tumoral, sugerindo que a injeção do extrato contribuiu para a manutenção da integridade do tecido muscular.

**Palavras chave:** carrapatos, extrato de glândula salivar, ratos Wistar, músculo, morfologia.



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>8</b>
Carrapato e Glândulas salivares .....	8
Câncer .....	10
Carcinossarcoma de Walker 256 .....	11
<b>2. OBJETIVO</b> .....	<b>14</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>15</b>
Materiais .....	15
Métodos .....	16
<b>3.1 Manutenção dos Carrapatos</b> .....	<b>16</b>
<b>3.1.1</b> Obtenção das larvas de <i>R. sanguineus</i> .....	16
<b>3.1.2</b> Confeção do inoculador e deposição dos ovos .....	16
<b>3.1.3</b> Obtenção das ninfas de <i>R. sanguineus</i> .....	16
<b>3.1.4</b> Confeção da Câmara Alimentadora .....	16
<b>3.1.5</b> Fixação da Câmara Alimentadora no Hospedeiro .....	17
<b>3.1.6</b> Obtenção das Fêmeas Adultas de <i>R. sanguineus</i> .....	17
<b>3.1.7</b> Obtenção das Glândulas Salivares e do Extrato (EGS2) .....	18
<b>3.2</b> Modelo de estudo tumoral <i>in vivo</i> .....	18
<b>3.2.1</b> Obtenção e manutenção das células do tumor de Walker 256 .....	19
<b>3.2.2</b> Implantação do tumor de Walker 256 na pata de ratas Wistar .....	19
<b>3.2.3</b> Injeção do extrato .....	20
<b>3.3</b> Métodos de análise microscópica.....	20
<b>3.3.1</b> Microscopia de Luz convencional .....	20
<b>3.3.2</b> Microscopia Eletrônica de Transmissão .....	21
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>23</b>
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	<b>32</b>
<b>6. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>35</b>

## 1. Introdução

### Carrapatos e Glândulas Salivares

Os carrapatos são ectoparasitas que atacam animais de diferentes grupos como: mamíferos, aves, répteis, anfíbios (KEIRANS; DURDEN, 2005; ANDERSON; MAGNARELLI, 2008) e ainda outros aracnídeos, como os próprios carrapatos (LABRUNA et al., 2007). Geograficamente, encontram-se amplamente distribuídos, podendo ser encontrados em todas as regiões do globo (KEIRANS; DURDEN, 2005; ANDERSON; MAGNARELLI, 2008).

São animais que pertencem ao filo Arthropoda, subfilo Chelicerata, classe Arachnida, subclasse Acari, ordem Parasitiformes e subordem Ixodida, estando subdivididos em quatro famílias: Ixodidae, Argasidae, Nutalliellidae e Laelaptidae, sendo a primeira a mais importante economicamente e abrigando um total aproximado de 878 espécies (ANDERSON; MAGNARELLI, 2008).

Os carrapatos são organismos de grande importância médico-veterinária, não só pelo fato de espoliarem seus hospedeiros, mas também por serem vetores de bactérias, vírus, protozoários e helmintos, em animais domésticos, silvestres e no próprio homem (DANTAS-TORRES et al., 2010). Tanto o processo espoliativo quanto a transmissão de agentes patogênicos ocorrem devido à ação imunossupressora da saliva, secretada pelas glândulas salivares, órgãos fundamentais para o sucesso biológico destes ectoparasitas.

As glândulas salivares localizam-se dorsolateralmente e aos pares na porção anterior do corpo do carrapato e são formadas por uma porção secretora (os ácinos) e uma excretora (o sistema de ductos) (FURQUIN; 2007). Nas fêmeas são observados três tipos de ácinos, I, II e III, sendo o primeiro agranular e os dois últimos granulares, ou seja, responsáveis pela síntese e secreção dos componentes da saliva. Em fêmeas de *Rhipicephalus sanguineus*, os ácinos II são constituídos por oito tipos celulares (**a**, **b**, **c1-c6**), e os III, por três tipos (**d**, **e** e **f**). As células **a**, **d** e **e** são responsáveis pela síntese de uma secreção de natureza lipoproteica, enquanto que as **b**, **c1-c6**, **d** e **f**, secretam componentes de natureza glicoproteica (CAMARGO-MATHIAS; FURQUIM, 2011).

Considerando o hábito dos carrapatos de permanecerem fixados e se alimentando em seus hospedeiros por períodos variáveis, esses ectoparasitas necessitam produzir uma saliva altamente eficiente, que garanta sua alimentação e sobrevivência (RIBEIRO et al. 1985; STEEN et al., 2006; FRANCISCHETTI et al., 2010).

Dentre os vários compostos da saliva dos carrapatos encontram-se moléculas multifuncionais que participam de diversos processos fisiológicos, como inflamatórios, imunológicos e coagulantes (MARITZ-OLIVIER, et. al. 2007; FRANCISCHETTI et al., 2010), além de outros bioativos de interesse farmacológico (BATISTA et al., 2010), capazes de modular os sistemas imune-inflamatório e hemostático dos hospedeiros (WIKEL; BERGMAN, 1997; STEEN et al., 2006; HAJNICKÁ et al., 2011). Desta forma, a saliva destes organismos vem sendo objeto de estudo em diferentes linhas de pesquisa tratando principalmente da identificação e isolamento destes bioativos com ação vasodilatadora, antiinflamatória e imunossupressora (OLIVEIRA et al., 2010).

Os bioativos já descritos na saliva dos carrapatos são de natureza glico e/ou lipoproteica (BINNINGTON, 1978; WHEELER et al., 1991; SHIPLEY et al., 1993), e estão representados pelas fosfatases ácidas, esterases, aminopeptidases, metaloproteases, prostaglandinas, lipocalinas e calreticulinas (BINNINGTON, 1978; MULENGA et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2011) e outras com propriedades ainda desconhecidas.

A saliva dos carrapatos, além da complexa composição, apresenta variações quantitativa e qualitativa quando considerados os diferentes períodos do ciclo glandular das espécies (BINNINGTON, 1978; FURQUIM, 2007; XIANG et al. 2009). No caso do carrapato *Rhipicephalus sanguineus* a secreção produzida pelas glândulas salivares apresenta características distintas quando considerados o início (2 dias), o meio (4 dias) e o final (6 dias) do seu ciclo secretor (CAMARGO-MATHIAS; FURQUIM, 2013). Isso pode ser explicado pela tentativa destes organismos em driblar os sistemas de defesa do hospedeiro conforme as suas necessidades, ou seja, primeiramente modular o sistema imune-inflamatório, e posteriormente o hemostático para garantir o processo contínuo de consumo sanguíneo.

Durante a obtenção do sangue, novas proteínas são expressas na glândula salivar do carrapato. Pela exploração dessas proteínas encontraram-se sequências similares às desintegrinas e metaloproteases (KAZIMIROVÁ et. al. 2006), moléculas cujos efeitos biológicos envolvem ligações a receptores celulares conhecidos como integrinas e são potentes inibidores de agregação plaquetária e de adesão celular (SOUZA, et. al. 2009), indicando que os peptídeos presentes na saliva podem estar envolvidos na, interação da matriz celular e nos processos de metástase. Alguns estudos atribuem ainda outras funções a saliva, como modulador negativo de angiogênese (FRANCISCHETTI, et al 2005, FUKUMOTO et. al. 2006).

A literatura disponível já registrou a capacidade da saliva bruta de carrapatos da espécie *Amblyomma cajennense* de agir como desencadeadora do processo de apoptose em células da linhagem tumoral SK-MEL-28 (melanoma humano) e MIA PaCa-2 (carcinoma pancreático humano), sem contudo afetar os fibroblastos humanos normais expostos a mesma saliva (SIMONS et al., 2011).

Outros estudos com extrato de glândula salivar de *Amblyomma variegatum* registraram a ocorrência de apoptose e inibição da proliferação de células Hela. No entanto, a saliva não se mostrou citotóxica às culturas de células consideradas normais (BROSSARD et al. 2004), impedindo apenas o crescimento de células Hela, sugerindo que o efeito inibitório do extrato está mais relacionado à supressão da proliferação do que ao efeito citotóxico ou citolítico do mesmo (KAZIMIROVÁ et al. 2006).

Na saliva da espécie *R. sanguineus* foram encontradas proteínas conhecidas como calreticulinas que auxiliam na ação imunossupressora e antihemostática, facilitando o processo de alimentação do carrapato (BROSSARD et al. 2004). Além disso, essas proteínas têm a capacidade de inibir a proliferação de células endoteliais apresentando, portanto, ação anti-angiogênica, o que possibilita alterar a taxa do crescimento tumoral (JAWORSKI et al., 1995; PIKE et al., 1999). Sua potencial ação anti-tumoral, justifica a importância de estudos referentes a saliva desse carrapato e a investigação de métodos a fim de poder utilizá-la na terapia do câncer.

Muitos produtos naturais advindos de plantas, animais e outros organismos já se mostraram eficazes como potenciais drogas anticâncer e opções alternativas aos caros e desgastantes tratamentos convencionais. Os carrapatos, portadores de uma saliva tão complexa com todos os componentes biológicos de propriedades farmacológicas citadas anteriormente, poderiam ser utilizados como recurso de produtos naturais processados para obtenção de novas drogas (MARITZ-OLIVIER et al. 2007).

## **Câncer**

O câncer corresponde a um conjunto de doenças cujos fatores biológicos compartilham características em comum, como a proliferação celular excessiva e a invasão tecidual (PISTILLI, 2009) resultado de uma série progressiva de mutações genéticas ou epigenéticas (alterações que comprometem o produto da expressão gênica sem afetar o DNA, que se mantém intacto) (PISTILLI, 2009).

As alterações celulares que dão origem ao câncer advém de uma série de condições provenientes de dois tipos de fatores, o iniciador e os promotores. O fator

iniciador é primordial e essencial ao tumor e antecipado sempre aos fatores promotores, promovendo mutações no DNA como deleções, translocações e inversões gênicas, por intermédio de carcinógenos químicos, oncovírus ou radiação. Fatores promotores somam-se ao fator iniciador, ou promovendo mais mutações na célula, ou acrescentando a esta apenas as alterações epigênicas, ou ainda ambas. A célula transformada difere da célula normal por vários aspectos sendo, um dos mais notáveis, sua capacidade de escapar de mecanismos de controle do ciclo celular, da apoptose e da ativação imunológica do seu meio ambiente, o que favorece a proliferação descontrolada. Essa célula adquire então o potencial, através de sucessivas divisões celulares e posteriores mutações, de dar origem a um conjunto de células tumorais, no caso de um tumor sólido (PISTILLI, 2009).

Nesse ponto, o crescimento do tumor torna-se limitado, pois depende de difusão para receber oxigênio e nutrientes e para eliminar seus produtos de excreção. Como consequência, as células, no centro da massa tumoral tendem a morrer por necrose ou apoptose. Para que o desenvolvimento persista, o tumor precisa adquirir novas mutações, dentre elas a relacionada à indução da angiogênese (AUSPRUNK; FOLKMAN, 1977). Segundo Kerbel e Folkman (2002), o crescimento tumoral é estritamente dependente de angiogênese, a qual se torna possível porque as células que compõem o câncer passam a produzir fatores pró-angiogênicos, que induzem as células endoteliais dos vasos sanguíneos mais próximos a degradar sua lâmina basal e a migrar em direção ao tumor.

Uma vez que o tumor passa a ter um suprimento sanguíneo, ele se tornará invasivo, adquirindo potencial para metástase. Esse processo depende, além de 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).

### **Carcinossarcoma de Walker 256**

O carcinossarcoma de Walker 256, tumor em análise neste trabalho, é considerado uma neoplasia que já encontra-se bem caracterizada na literatura, sendo comumente implantado e mantido *in vivo*, devido ao seu crescimento rápido e comportamento biológico agressivo, com desenvolvimento de metástases frequentes, via circulações sanguínea e linfática (MORAES et al., 2000).

A origem desse tumor é descrita como o aparecimento de um tumor espontâneo numa rata albina preta do Biotério do Prof. George Walker da Escola de Medicina da Universidade Johns Hopkins em 1928. A massa tumoral observada na época foi descrita como um adenocarcinoma mamário, o qual, no entanto sofria regressões quando as ratas estavam em períodos de lactação e retomava seu crescimento após o desmame. Essas observações foram importantes para que os pesquisadores começassem a utilizar esse tipo de câncer como um modelo biológico, cuja massa tumoral começou então a ser transplantada em animais da mesma linhagem para realização de estudos que esclarecessem melhor a biologia desse tumor (FELIX, 2001).

Com a evolução dos estudos, foram estabelecidas linhagens celulares as quais foram mantidas em culturas *in vitro*. Na empresa *American Type Culture Collection*<sup>®</sup>, a linhagem LLCWRC256 encontra-se hoje disponível e apresentando características imunofenotípicas de carcinoma indiferenciado, ou seja, de células tumorais que perderam a maioria ou todas as características do tecido de origem (HAY et al, 1994).

A transplantabilidade do tumor de Walker 256 tem sido confirmada e demonstrada por meio de diversas técnicas como: a) inserção de fragmentos tumorais (EARLE, 1935), b) suspensão celular obtida a partir de tumores sólidos (EARLE, 1935; SCHREK; AVERY, 1937), c) suspensão celular obtida a partir de cultura *in vitro* e d) suspensão celular obtida a partir da forma ascítica do tumor. Nessa perspectiva também foram desenvolvidas diversas vias e sítios de inoculação tais como: a) subcutânea (EARLE, 1935; TALALAY et al, 1952; JENSEN; MUNTZING, 1970), intramuscular (EARLE, 1935; TALALAY et al, 1952; MORAES FILHO et al, 1980), intraperitoneal, intrapleurial e endovenosa.

Os estudos *in vivo* realizados com esse tumor demonstraram que uma vez implantado, o mesmo pode ser detectado uma semana após a inoculação, desenvolvendo-se rapidamente e levando os animais à morte num período de 6 semanas. Após 15 dias da implantação, o tumor já pode ser descrito como uma massa firme, esférica, lobulada e parcialmente encapsulada, a qual sofre metástases detectadas principalmente nos linfonodos pulmonares (DUNN, 1945; LIKELY et al., 1952; MIDER et al., 1948; McCOY; NEUMAN, 1956).

As células do tumor de Walker 256 *in vitro* tem características próprias tais como: a) hipertrofia, b) contornos irregulares, c) pleomorfismo (variação no tamanho e na forma) e d) mais de um núcleo. Estes últimos caracteristicamente apresentam forma irregular, frequentemente podem apresentar-se lobulados, possuem uma relação

núcleo/citoplasma elevada, a cromatina encontra-se condensada e os nucléolos são evidentes. Além disso, as mitoses são frequentes e atípicas, originando células multinucleadas (ARMANI, 2007).

## 2. Objetivo

O presente projeto de pesquisa teve como objetivo avaliar o potencial do extrato de glândulas salivares de fêmeas de *R. sanguineus* com 2 dias de alimentação **(EGS2)** de alterar a morfologia do músculo das patas traseiras de ratas Wistar submetidas a implantação do tumor de Walker 256, *in vivo*, por meio de aplicações de técnicas de microscopia.



### 3. Material e Métodos

#### Materiais

Para a realização deste trabalho foram utilizados os seguintes materiais biológicos:

1) Fêmeas de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* alimentadas por 2 dias em hospedeiros (coelhos New Zealand White) para posterior remoção das glândulas salivares e obtenção do extrato **EGS2** (extrato de glândulas salivares de fêmeas com 2 dias de alimentação).

2) Trinta e cinco (35) ratos Wistar fêmeas com peso médio de 450g a 500g e idade aproximada de 100 dias, para estudo do tumor de Walker 256 (modelo de estudo tumoral *in vivo*). Estes animais foram distribuídos nos seguintes grupos de estudo: a) Controle 1 (**GC1**) (5 indivíduos sadios), b) Controle 2 (**GC2**) (5 indivíduos apenas com tumor), c) Controle 3 (**GC3**) (5 indivíduos com tumor e tratados com tampão fosfato de sódio, pH7,4) d) Tratamento 1 (**GT1**) (5 indivíduos com tumor tratados com uma injeção do extrato **EGS2** na concentração de 0,04µg/µL), e) Tratamento 2 (**GT2**) (5 indivíduos com tumor tratados com duas injeções do extrato **EGS2** na concentração de 0,04µg/µL), f) Tratamento 3 (**GT3**) (5 indivíduos com tumor tratados com uma injeção do extrato **EGS2** na concentração de 0,2µg/µL) e g) Tratamento 4 (**GT4**) (5 indivíduos com tumor tratados com duas injeções do extrato **EGS2** na concentração de 0,2µg/µL).

Para obtenção das fêmeas com 2 dias de alimentação utilizou-se carrapatos machos e fêmeas em jejum, os quais foram obtidos a partir de colônias de *R. sanguineus* mantidas, especialmente para o desenvolvimento deste estudo, em estufa BOD em condições controladas (29°C, 80% de umidade e fotoperíodo de 12 horas) em sala do Biotério do Departamento de Biologia da UNESP de Rio Claro (SP). Essa colônia foi iniciada a partir de quatro fêmeas (matrizes) completamente ingurgitadas, oriundas de colônia mantida em laboratório no Departamento de Patologia Veterinária da UNESP de Jaboticabal (SP), as quais foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Gervásio Henrique Bechara do Departamento de Patologia Veterinária, UNESP de Jaboticabal (SP).

## **Métodos**

### **3.1. Manutenção dos Carrapatos**

#### **3.1.1 Obtenção das Larvas de *R. sanguineus***

As fêmeas de *R. sanguineus* completamente ingurgitadas foram mantidas em tubos plásticos (com tampa com pequenos orifícios para oxigenação), para oviporem, o que ocorreu em 15 dias a partir do completo ingurgitamento das mesmas.

Os ovos foram recolhidos e depositados no interior de um inoculador, desenvolvido pelo próprio Prof. Dr. Gervásio Henrique Bechara, para facilitar a deposição das larvas recém-eclodidas no hospedeiro (coelho).

#### **3.1.2. Confeção do Inoculador e Deposição dos Ovos**

Para a inoculação dos ovos, seringas de 3 mL tiveram 2 cm de suas extremidades removidas e vedadas com algodão. O êmbolo foi removido e a massa de ovos foi depositada no interior da seringa, a abertura do êmbolo também foi vedada com algodão levemente umedecido e o êmbolo encaixado parcialmente. Deste modo, a eclosão das larvas ocorreu já no inoculador, facilitando assim a deposição destas no hospedeiro.

O inoculador foi acondicionado em estufa BOD (29°C, 80% de umidade e fotoperíodo de 12 horas), até a eclosão das larvas, que ocorreu em média após 15 dias.

#### **3.1.3. Obtenção das Ninfas de *R. sanguineus***

As larvas que eclodiram no interior do inoculador foram alocadas (1 inoculador/hospedeiro) no interior das câmaras alimentadoras fixadas nos coelhos virgens de infestação.

#### **3.1.4. Confeção da Câmara Alimentadora (BECHARA et al., 1995)**

Para a confeção da câmara alimentadora utilizou-se: a) um círculo de borracha fina de 9 cm de diâmetro cortado e com uma das faces revestida com tecido de algodão. Essa face revestida de tecido é a parte da câmara que entra em contato com a pele do coelho hospedeiro; b) um círculo de 3,5 cm de diâmetro retirado do centro do círculo de 9 cm; c) um tubo plástico (tipo coletor universal) com a parte inferior removida, de

altura final de 2 cm e d) fixação com cola plástica do tubo coletor já recortado na borda do círculo de 3,5 cm, sendo que a região de contato entre a borracha do círculo e o tubo vedada internamente com a mesma cola e externamente com esparadrapo, para impedir a fuga dos carrapatos. Além disso, a região do tubo plástico contendo a rosca para encaixe da tampa ficou voltada para cima, assim, depois de fixada no hospedeiro a câmara pode ser fechada com a própria tampa do tubo coletor, na qual foram feitos pequenos orifícios para que os carrapatos fossem supridos com ar.

### **3.1.5. Fixação da Câmara Alimentadora no Hospedeiro (BECHARA et al., 1995)**

O hospedeiro, coelho virgem de infestação, teve uma área de sua região dorsal tosada, para facilitar a fixação da câmara alimentadora. Espalhou-se nessa região uma camada de cola não tóxica, à base de gelatina incolor, assim como na região revestida por tecido da câmara alimentadora. Em seguida, procedeu-se a fixação da câmara na pele do coelho, envolta por uma camada de esparadrapo para otimizar a fixação.

A câmara permaneceu vinte e quatro horas destampada para secagem da cola, para então serem depositados os carrapatos na fase larval.

Após a alocação das larvas, a primeira observação ocorreu após 8 horas (tempo necessário para a acomodação dos ectoparasitas), e a partir disso, as observações se sucederam a cada 5 horas.

O completo ingurgitamento das larvas ocorreu no prazo de sete dias. Após este período as mesmas foram coletadas e armazenadas nos inoculadores que foram mantidos em condições controladas (29°C, 80% de umidade e fotoperíodo de 12 horas) em estufa BOD, para a ecdise das ninfas, que ocorreu em média depois de 15 dias.

### **3.1.6. Obtenção das Fêmeas Adultas de *R. sanguineus***

As ninfas foram alocadas em câmaras alimentadoras fixadas em coelhos virgens de infestação para ingurgitamento, segundo metodologia descrita por Bechara et al. (1995). A primeira observação ocorreu também 8 horas após, e as observações seguintes deram-se a cada 5 horas.

Em cinco dias as ninfas completaram seu ingurgitamento, foram coletadas e depositadas em tubos plásticos para sofrerem ecdise para o estágio adulto (15 dias).

Estes indivíduos adultos em jejum foram então utilizados na infestação, segundo procedimento descrito por Bechara et al. (1995), em sala do Biotério do Departamento de Biologia do Instituto de Biociências da UNESP de Rio Claro (SP).

A infestação foi realizada em 10 coelhas virgens de infestação utilizando-se 25 casais de *R. sanguineus*/câmara alimentadora. Após a deposição destes indivíduos no interior das câmaras de alimentação, procederam-se as observações.

Foram coletadas 600 fêmeas de carrapatos com 2 dias de alimentação, as quais foram utilizadas para retirada das glândulas salivares posteriormente utilizadas para a preparação do extrato glandular (EGS2).

### **3.1.7. Obtenção das Glândulas Salivares e do Extrato (EGS2)**

As fêmeas com 2 dias de alimentação oriundas da infestação foram retiradas dos hospedeiros pela região do hipostômio com o auxílio de pinça cirúrgica por meio de movimentos circulares. A seguir, esses indivíduos foram dessecados em placas de Petri contendo solução salina (7,5 g de NaCl, 2,38 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,72 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 1000 mL de água destilada), para a remoção das glândulas salivares.

Nas dependências do Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Biologia da UNESP Rio Claro (SP) as glândulas salivares foram colocadas em tubos Eppendorfs contendo 50 µL de tampão fosfato pH 7.4, onde foram maceradas. Na sequência os tubos foram centrifugados por 30 minutos a 10.000 xg e os sobrenadantes recolhidos foram depositados em eppendorfs esterilizados.

No interior de capela de fluxo laminar vertical pré-estéril, o extrato foi filtrado com auxílio de unidades filtrantes estéreis (JBR610303, unidade filtrante descartável Millex GV, membrana durapore PVDF, Millipore, MilliUni), de 0.22 µm e diâmetro de 13 mm, acopladas a seringas hipodérmicas e então, encaminhado para a dosagem de proteínas, segundo metodologia descrita por Sedmark and Grossberg (1977) (método de Bradford), obtendo-se a concentração proteica de 5,513 µg/mL.

A seguir, o extrato foi diluído para se obter as concentrações de 0,2 µg/µL e 0,04 µg/µL, as quais foram definidas por estudos prévios, e então armazenado em freezer a -20 °C para posteriormente ser encaminhado a aplicação nas patas de ratas Wistar portadoras de tumor de Walker 256.

## **3.2. Modelo de Estudo Tumoral *in vivo***

### **3.2.1. Obtenção e manutenção das células do tumor de Walker 256**

As células de tumor de Walker 256 foram cedidas gentilmente pela Profa. Dra. Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes Supervisora do Laboratório de Nutrição e Câncer do Departamento de Fisiologia IB/UNICAMP/SP. O animal portador do tumor foi sacrificado, o tecido tumoral retirado foi colocado em placa de Petri contendo solução salina á 0,9% e fragmentado. A seguir, foi filtrado em gaze e o líquido coletado foi transferido para tubos Falcon de 50 mL e centrifugados a 4°C, por 10 minutos, a 3000 rpm. Todos os procedimentos foram realizados em gelo. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuscitado em solução salina á 0,9% obtendo-se dessa forma uma suspensão celular concentrada.

Para a contagem das células, realizou-se uma diluição de 1:100, ou seja, utilizou-se uma parte dessa suspensão concentrada e 100 partes de solução salina 0,9%. Na sequência, uma mistura de 200µL da suspensão diluída com 200µL do corante azul de Tripán 1% foram levados para contagem das células em câmara de Neubauer no microscópio de luz. A viabilidade celular foi determinada considerando que as células viáveis seriam as refringentes à luz.

Após a contagem, 1 mL da solução contendo  $1 \times 10^7$  células/mL foi injetado, via intraperitoneal, na região abdominal de ratas Wistar adultas para obtenção de tumor líquido (ascite). Decorridos aproximadamente 15 dias da inoculação das células de Walker 256 nas ratas, o líquido ascítico foi extraído.

### **3.2.2 Implantação do tumor de Walker 256 na pata de ratas Wistar**

O modelo de câncer utilizado no presente estudo foi descrito por Brigatte et al. (2007). Os ratos com ascite foram eutanasiados utilizando-se a mistura dos anestésicos quetamina e xilasina, até que os animais entrassem em óbito. Na sequência, o líquido ascítico foi coletado e colocado em tubo de ensaio contendo EDTA. O líquido foi diluído na proporção 1:100 em tampão fosfato de sódio, pH 7,4. Procedeu-se novamente a contagem de células utilizando-se o corante azul de Tripán, em câmara de Neubauer no microscópio de luz.

O volume de 300 µL de suspensão contendo  $1 \times 10^6$  células/mL, foi introduzido nas patas (direita) posteriores das ratas por via intraplantar. Durante o período de desenvolvimento do tumor, os animais foram observados diariamente e tratados com

alimentação e água. Todos os grupos foram submetidos às mesmas condições experimentais.

Após 15 dias da inoculação das células tumorais, os animais portadores do tumor foram submetidos aos respectivos tratamentos do extrato.

### **3.2.3. Injeção do extrato**

Os extratos de glândula salivar (**EGS2**) de fêmeas de carrapato *Rhipicephalus sanguineus* foram obtidos como descrito no item **3.1.7**.

A primeira injeção dos extratos ocorreu no período de 15 dias após a inoculação das células tumorais nas patas (direita) posteriores das ratas Wistar adultas, nos seguintes grupos: Grupo de Tratamento 1 (**GT1**) com o extrato **EGS2** na concentração de 0,04µg/µL, Grupo de Tratamento 2 (**GT2**) com o extrato **EGS2** na concentração de 0,04µg/µL, Grupo de Tratamento 3 (**GT3**) com o extrato **EGS2** na concentração de 0,2µg/µL e Grupo de Tratamento 4 (**GT4**) com extrato **EGS2** na concentração de 0,2µg/µL;

Nesse mesmo dia foi realizada a única injeção de tampão fosfato de sódio, pH 7,4, no Grupo Controle 3 (**GC3**)

A segunda injeção dos extratos foi realizada 4 dias após a primeira, nos grupos: Grupo de Tratamento 2 (**GT2**) com o extrato **EGS2** na concentração de 0,04µg/µL e Grupo de Tratamento 4 (**GT4**) com extrato **EGS2** na concentração de 0,2µg/µL.

Após 21 dias da inoculação das células tumorais nas patas das ratas, e finalizados os devidos tratamentos, os animais foram eutanasiados utilizando-se a mistura dos anestésicos quetamina e xilasina em excesso, até que estes viessem a óbito.

Em seguida em ambiente esterilizado os músculos foram retirados e preparados para análise.

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as normas do Comitê de Ética e em Uso Animal (CEUA - protocolo aprovado nº 3537) da UNESP de Rio Claro, SP.

## **3.3. Métodos de Análise Microscópica**

### **3.3.1. Microscopia de Luz Convencional**

- Técnica da hematoxilina de Harris e eosina aquosa (**JUNQUEIRA, 1983**)

Os materiais obtidos foram fixados com paraformaldeído 4% em microtubos de plástico de 1.5mL, deixado no fixador por 48 horas. As amostras foram, em seguida, lavadas por três vezes com tampão fosfato de sódio 0.1M, pH 7.4. A desidratação do material ocorreu em série crescente de álcool etílico a 70%, 80%, 90% e 95% (banhos de 30 minutos cada). Posteriormente, o material embebido em resina LEICA por uma semana e incluído em moldes plásticos contendo resina mais polimerizador, deixados em estufa 37°C até que os blocos endurecessem.

Após esse processo, os blocos foram seccionados com espessura de 3µm, recolhidos em lâminas de vidro.

As lâminas contendo cerca de seis secções cada, foram armazenadas em estufa e posteriormente coradas com hematoxilina durante sete minutos. Depois de lavadas por quatro minutos em água corrente, foram coradas pela eosina aquosa no decorrer de cinco minutos e lavadas em água corrente novamente. Após secagem, as lâminas foram mergulhadas rapidamente em xilol e, em seguida, cobertas com bálsamo sintético do Canadá e lamínula.

As lâminas obtidas foram examinadas e fotografadas em microscópio de luz.

### **3.3.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão**

Adicionalmente às técnicas de microscopia de luz realizou-se também a de Microscopia Eletrônica de Transmissão (M.E.T.), onde os fragmentos de músculo foram fixados em glutaraldeído 2.5% em tampão cacodilato de sódio 0,1M (pH 7.2) durante 24 horas, à temperatura ambiente. Em seguida, foram feitas duas lavagens no mesmo tampão (15 minutos cada lavagem) e, logo depois, efetuou-se a pós-fixação em solução de tetróxido de ósmio (OsO<sub>4</sub>) 1% durante 2 horas. As amostras foram novamente lavadas em tampão cacodilato de sódio 0.1M por duas vezes (15 minutos cada lavagem). O material passou por um banho de álcool etílico 10% durante 15 minutos, e foi contrastado em solução de acetato de uranila a 1%, dissolvido em álcool 10%, por 2 horas, no escuro. Procedeu-se com a desidratação em série crescente de álcool etílico (70% a 100%, com duração de 15 minutos cada solução) e em acetona pura, com duração de 15 minutos. O material foi embebido em resina mais acetona, na proporção de 1:1, por 24 horas e incluído em resina pura. Em seguida, levado à estufa por 72 horas, a 60°C, para polimerização.

Os blocos foram seccionados em ultra-micrótomo, as secções colocadas em grades de cobre e contrastadas em solução de acetato de uranila, durante 45 minutos. Na

sequência as mesmas foram lavadas em água e contrastadas em citrato de chumbo por 15 minutos sendo novamente lavadas em água e em solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,02M (adaptado de REYNOLDS, 1963).

Após esses procedimentos o material foi analisado e fotografado em Microscópio Eletrônico de Transmissão (MET) Philips CM100 alocado no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Biologia, IB-UNESP, campus de Rio Claro-SP.



#### 4. Resultados

Os resultados obtidos da realização deste trabalho estão sendo apresentados sob a forma de artigo publicado em periódico internacional e especializado na área.

**ABREU, M. R.**, 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. **Phamaceutical Care and Health Systems**, 2014, 1:121, doi: 10.4172/2376-0419.1000121.



## Salivary Glands of Female Ticks *Rhipicephalus sanguineus* Like a Potential Source of Molecules with Inhibitory Action: *In vivo* study with Walker 256 Tumor Cells

Marina Rodrigues de Abreu, Fabiana Alonso Rocha, Karim C. S. Furquim, Luis Adriano Anholetto, Fabiana Cristina Fuzaro Novaes, Maria José Morsoleto and Maria Izabel Camargo-Mathias\*

Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho Rio Claro, Sao Paulo, Brazil

### Abstract

This study evaluated the effects of one or two injection of different concentrations (0.2 and 0.04 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) of extracts obtained from the salivary glands of female ticks *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) (Latreille, 1806) also called "brown dog tick" fed for 2 days on the rabbit hosts on the morpho-physiology of the leg musculature of female Wistar rats inoculated with Walker 256 tumor cells. The number of leukocytes and the creatinine levels were quantified for individuals from all groups. The results of both histology and electron microscopy revealed that a single, low-concentration injection of the extract (0.04 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) was more effective in containing tumor invasion and caused less 'collateral damage' to the muscle tissue, which was the object of this study. The results also revealed that creatinine levels were higher in rats subjected to both one and two injections of the extract at a concentration of 0.04 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  than in those subjected to one and two injections of the extract at the higher concentration (0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ), suggesting that in the first group, injection of the extract contributed to maintaining the integrity of the muscle tissue. With regard to the number of leukocytes, the results suggested that in all the inoculated rats (Walker 256 cells), there was a significant increase in the total number of leukocytes. The inoculated rats that received both one and two injections of the extract at a concentration of 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  experienced a significant increase in the number of leukocytes compared with those inoculated but not exposed to the extract; this result can be explained by the fact that beyond the tumor cells, the extract itself acted to boost the defense response at this concentration. However, inoculated rats subjected to injections (one and two) of the extract at a concentration of 0.04 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  showed a significant decrease in the total number of leukocytes compared with rats that were only inoculated and those inoculated and injected with the extract at a concentration of 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . These results reinforced that the extract at the 0.04 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  concentration not only acted more effectively to inhibit Walker 256 tumor cells but also did not act as a stressor, because the number of leukocytes was lower. Therefore, the data obtained here indicated that the same molecules or a pool of molecules produced by the salivary glands of ticks belonging to this species have the ability to inhibit tumor growth, while minimizing 'collateral damage' to the body.

**Keywords:** Ticks; Salivary gland extracts; Wistar rats; Muscle; Morphophysiology

### Introduction

The saliva of ticks is a complex mixture and is considered to be a large and effective pharmacological arsenal that guarantees the nutrition and survival of these ectoparasites [1,2] through the production of substances with diverse actions. Within this secretion are found bioactive agents that can operate mainly by modulating the immune, inflammatory and hemostatic systems of the host [1,3]. Among these, it is possible to highlight the presence of components of glycoproteins and lipoproteins origin, in addition to lipid components [4], calreticulin, acid phosphatase, esterases, amino peptidases, metalloproteinase, lipocalins and prostaglandins [1,4-7]. For this reason, the saliva of ticks in general has been the subject of various studies, mainly because of the great interest in the composition and mode of action of these bioactive agents, some of which have been previously described as vasodilators, anticoagulants, immunosuppressant [8] and, more recently, anti-angiogenic [2,9] and anti-tumor agents [10-13].

With specific regard to the dog brown tick belonging to the species *Rhipicephalus sanguineus*, studies have demonstrated that the biochemical complexity of the saliva undergoes changes as the blood feeding progresses because of the need of ectoparasites to modulate the homeostatic system of the host, allowing the ectoparasites to be biologically successful. This mixture that makes up the saliva of *R. sanguineus* ticks can undergo both quantitative and qualitative variations considering specific periods of their glandular cycle, such as

its beginning at 2 days of feeding, the middle at 4 days, and the end at 6 days [14,15].

The literature brings previous studies that found a protein participating in coagulation processes that has cytotoxic activity on tumor cell lines in the saliva of *Amblyomma cajennense* ticks, which prefer horses as their hosts [11]. In addition, studies by [10] have demonstrated that different molecules present in extracts from the salivary glands of other tick species have the capacity to inhibit the growth of HeLa lineage cells either by inducing apoptosis (*R. appendiculatus* and *A. variegatum*) or because of their anti-proliferative action (*Ixodes Ricinus*, *R. appendiculatus*, *Dermacentor reticulatus* and *A. variegatum*). Furthermore, [12] also reported that the final saliva of some species of ticks can act as an *in vitro* control for tumor cells,

\*Corresponding author: Maria Izabel Camargo-Mathias, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho Rio Claro, Sao Paulo, BRAZIL, Tel: +55 19 35340009; E-mail: micm@rc.unesp.br

Received November 15 2014; Accepted December 01, 2014; Published December 04, 2014

Citation: Abreu MR, Rocha FA, Furquim KCS, Anholetto LA, Novaes FCF, et al. (2014) Salivary Glands of Female Ticks *Rhipicephalus sanguineus* Like a Potential Source of Molecules with Inhibitory Action: *In vivo* study with Walker 256 Tumor Cells. J Pharma Care Health Sys 1: 121. doi:10.4172/2376-0419.1000121

Copyright: © 2014 Abreu MR, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

which begin to die as a result of exposure. Finally, [16] reported the inhibitory effects of tick saliva on the migratory and invasive capacity of MDA-MB-231 cells.

The above information is the product of a new perspective on the study of ticks, which no longer considers them pests and harmful organisms but an important source of bioactive agents with the potential to impact the control of tumor cell line development and, consequently, tumor growth [17,18]. However, many studies on this topic have yet to be undertaken using the diverse technical tools that are now available.

Therefore, taking this into consideration, the present study aimed to analyze the effects of the extract obtained from the salivary glands of female *R. sanguineus* ticks fed for 2 days on rabbit hosts on the morpho-physiology of the hind leg musculature of Wistar rats previously inoculated with Walker 256 tumor cells *in vivo*.

## Materials and Methods

### *In vivo* tumor model study

This *in vivo* study used 35 female Wistar rats with an average weight of 450 g–500 g and aged 90–120 days old. The rats were distributed into the following study groups: a) Control 1 (CG1; 5 healthy individuals), b) Control 2 (CG2; 5 individuals with a tumor treated with sodium phosphate buffer, pH 7.4), c) Control 3 (CG3; 5 individuals with a tumor only), d) Test 1 (TG1; 5 individuals with a tumor, treated with an injection of the extract SGE2 at a concentration of 0.04µg/µL), e) Test 2 (TG2; 5 individuals with a tumor, treated with two injections of the extract SGE2 at a concentration of 0.04µg/µL), f) Test 3 (TG3; 5 individuals with a tumor, treated with an injection of the extract SGE2 at a concentration of 0.2µg/µL) and g) Test 4 (TG4; 5 individuals with a tumor, treated with two injections of the extract SGE2 at a concentration of 0.2µg/µL).

### Collection and maintenance of walker 256 tumor cells

The Walker 256 tumor cells were kindly provided by Professor Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes, PhD, Supervisor of the Laboratory of Nutrition and Cancer, Department of Physiology IB/UNICAMP, Campinas, SP, Brazil. The rats inoculated with the cells were euthanized, the tumor tissue was fragmented and filtered in gauze and the collected liquid was transferred into 50 mL Falcon tubes, which were centrifuged at 4°C for 10 min at 3000 rpm. All procedures were performed at 4°C. After centrifugation, the supernatant was discarded and the precipitate resuspended in 0.9% saline solution, thereby forming a concentrated cell suspension.

To count the cells, a 1:100 dilution was made using 0.9% saline solutions. Next, 200µL of the diluted suspension was mixed with 200µL of 1% trypan blue dye. The cells were counted using a light microscope in a Neubauer chamber. Cell viability was determined considering the fact that viable cells would be refractive to light. The number of cells in the working suspension was  $1 \times 10^7$  cells/mL.

After counting the cells, 1 mL of the working suspension was inoculated intraperitoneally into the abdominal region of three adult Wistar rats to obtain the tumor liquid (ascites). After approximately 15 days of inoculation, the ascites was collected from the abdomens of these rats.

### Implantation of walker 256 tumor cells

The cancer model used in this study was described by [19]. In

this model, the rats with ascites were euthanized using a mixture of ketamine and xylazine. After the ascitic fluid was collected, it was placed in tubes containing EDTA and diluted to a ratio of 1:100 in sodium phosphate buffer, pH 7.4. The cells were then counted using trypan blue dye, as described previously. The suspension, with  $1 \times 10^6$  cells/mL, was then inoculated in the right intraplantar posterior leg (300µL suspension/paw).

### Obtaining salivary glands and SGE2 glandular extracts

To obtain female ticks after 2 days of feeding, male and female fasting ticks were used; these were obtained from *R. sanguineus* colonies that were kept especially for the purpose of this study in a BOD chamber under controlled conditions (29°C, 80% humidity and a 12 h photoperiod) in the Animal Facility in the Department of Biology, UNESP, Rio Claro, SP- Brazil.

Females feeding since 2 days after prior infestation were removed from the hosts using circular movements with surgical forceps in the hypostome region. Next, these individuals were placed in Petri dishes containing saline for dissection (7.5 g NaCl, 2.38 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.72 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and 1000 mL of distilled water) to remove the salivary glands.

The salivary glands were placed into Eppendorf tubes containing 50µL of phosphate buffer, pH 7.4, and macerated. The tubes were then centrifuged for 30 min at 10,000×g, and the collected supernatants were placed into previously sterilized Eppendorf tubes.

Within the pre-sterile vertical laminar flow chamber, the extract was filtered with the aid of 0.22µm and 13 mm diameter sterile filter units (JBR610303 disposable filter unit, Millex GV Durapore PVDF membrane, Millipore, MilliUni) attached to hypodermic syringes, following which proteins were dosed (Bradford method).

Next, the concentrated extract was stored at –20°C until further use.

### Injection of Salivary Gland Extract SGE2 into Wistar Rats Inoculated with Walker 256 Tumor Cells

The SGE2 extracts were diluted with sodium phosphate buffer, pH 7.4, to obtain concentrations of 0.04µg/µL and 0.2mg/µL.

The procedure for injecting different concentrations of the SGE2 extract was conducted in a closed and sterile area in the Animal Facility of the Department of Biology, Institute of Biosciences at UNESP campus, Rio Claro, SP- Brazil.

The first injection of different concentrations of the SGE2 extract was administered 15 days after tumor cell inoculation, with the 0.04µg/µL extract injected into Test groups 1 (TG1) and 2 (TG2) and the 0.2µg/µL extract injected into Test groups 3 (TG3) and 4 (TG4).

On the same day, a single application of sodium phosphate buffer, pH 7.4, was injected into Control group 3 (CG3).

The second injection of extracts was administered 4 days after the first, only in Test group 2 (TG2), with the SGE2 0.04µg/µL extract, and Test group 4 (TG4), with the SGE2 0.2µg/µL extract.

On day 21 after inoculation of the tumor cells and injection of the extract, the animals were euthanized using an overdose of ketamine and xylazine.

Next, in a sterile environment, the muscle was removed and prepared for analysis.

## Methods of Analysis

### Conventional light microscopy

**Harris haematoxylin and aqueous eosin technique:** The materials were fixed with 4% paraformaldehyde in 1.5 mL plastic micro tubes for a period of 24 h. The samples were then washed three times with 0.1M sodium phosphate buffers, pH 7.4. Dehydration occurred in an ascending ethanol series of 70%, 80%, 90% and 95% (baths, 30 min each). Subsequently, the material was soaked in resin for 24 h and embedded in plastic molds containing polymerizing resin until the blocks hardened.

After this process, the blocks were sectioned on a microtome to obtain 3- $\mu$ m-thick sections, which were then collected on glass slides.

The slides, which contained approximately six sections each, were stored in an oven and subsequently stained with haematoxylin for 7 min. After washing for 4 min in running water, they were then stained with aqueous eosin for 5 min and washed in running water again. After air-drying, the slides were quickly dipped in xylene, covered with Canada balsam and mounted with a cover slip.

The slides obtained were examined and photographed under a light microscope.

### Transmission Electron Microscopy (TEM)

To perform routine TEM analysis, muscle fragments were fixed in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate (pH 7.2) buffer for 2 h at room temperature. Then, two washes were performed in 0.1 M sodium cacodylate buffer for 15 min each, and the fragments were immediately post-fixed in a solution of 1% osmium tetroxide ( $\text{OsO}_4$ ) for 2 h. The samples were then washed twice for 15 min in 0.1 M sodium cacodylate buffer. The material was washed in 10% ethyl alcohol for 15 min, contrasted in 1% uranyl acetate solution and dissolved in 10% alcohol for 2 h in the dark. This was followed by dehydration in a graded series of ethanol (70%–100%, lasting 15 min each) and pure acetone (lasting 15 min). The material was embedded in resin + acetone at a 1:1 ratio for 24 h and embedded in pure resin. It was then placed in a 60°C oven for 72 h for polymerization.

The blocks were sectioned on an ultra-microtome and the sections were placed on copper grids. They were subsequently contrasted in uranyl acetate solution for 45 min, rinsed in water and contrasted in lead citrate for 15 min and washed again in water and 0.02 M sodium hydroxide (NaOH) (adapted from (20)).

After the procedure, the material was examined under the Philips CM 100 Transmission Electron Microscope at the Laboratory of Electron Microscopy, Department of Biology, IB-UNESP, Rio Claro, SP- Brazil.

### Clinical examinations

For the clinical examination, blood was collected from animals at the time they were euthanized. This blood was stored in heparinized tubes and later sent for laboratory analysis of the following parameters: quantification of leukocytes and creatinine levels.

The values obtained for these parameters were statistically analyzed by ANOVA with Tukey's post hoc test, and differences with  $p < 0.05$  were considered statistically significant.

This study was submitted to the Institute of Biosciences, UNESP, Rio Claro, SP- Brazil, Ethics Committee on Animal Use (CEUA) and was duly approved with process number 3537.

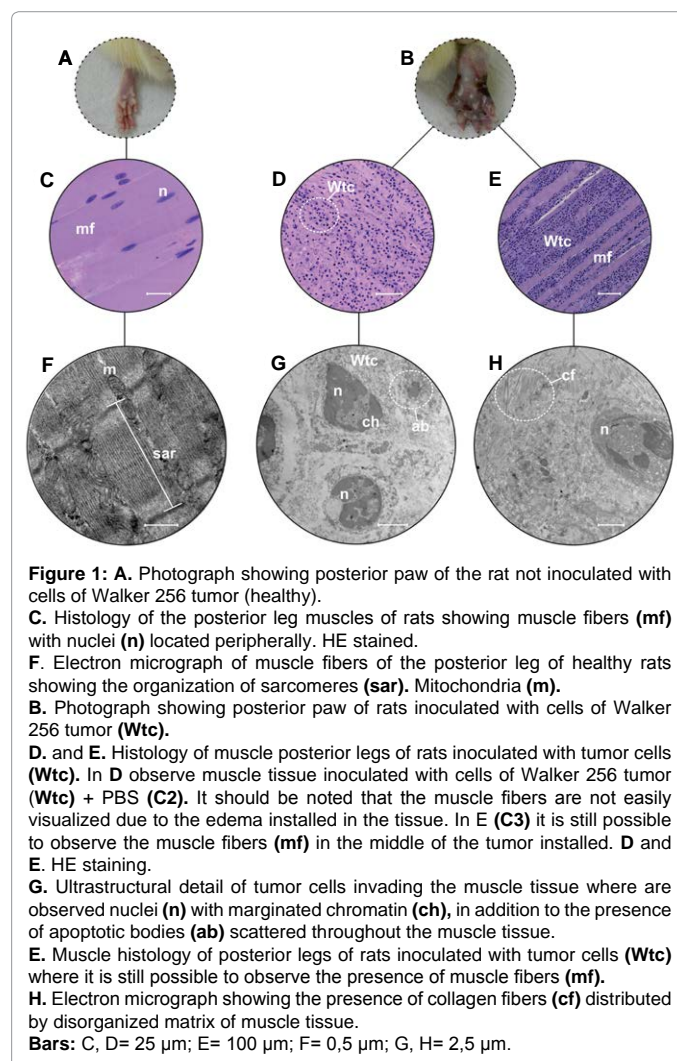
## Results

### Microscopic evaluation of the *in vivo* action of the extracts on the tumor model

**Haematoxylin-Eosin staining technique control group 1:** To compare the results obtained herein, the control subjects, i.e., those not inoculated with tumor cells (Figure 1A, C), served as a model for the description of the histological organization of skeletal muscle under normal conditions. Descriptions by [21] were also considered.

Histologically, this type of muscle was composed of elongated cells, also called muscle fibers, which were characteristically multinucleate with peripheral nuclei and a flattened and fusiform morphology (Figure 1C). In the cytoplasm of these cells, it was possible to observe striations in both the longitudinal and transverse directions, with the former corresponding to the arrangement of the myofibrils and the latter corresponding to the organization of the thick and thin myofilaments, thus forming the sarcomeres, which are considered the contractile units of muscle fibers (Figure 1C, F).

Still related to the histological organization of this type of muscle, each cell or muscle fiber was surrounded by thin connective tissue called the endomysium. This set of cells then formed the muscle bundle covered externally by the perimysium, a layer of connective tissue



comprising collagen and elastin that grouped the muscle fibers, and finally, the grouped bundles formed the muscles, which were in turn coated externally with the epimysium, a layer of connective tissue containing interlaced collagen fiber bundles.

This same histological pattern was observed in the muscles of the right posterior leg of the individuals in the Control 1 group, i.e. animals not subjected to inoculation with tumor cells that showed the same histological type, i.e. elongated and multinucleate fibers presenting both longitudinal and transverse striations (Figure 1C). The presence of conjunctive tissue was observed between the muscle fibers. The nuclei present here were also fusiform and were arranged in the periphery of the fibers (Figure 1C).

Confirming the histological results, Figure 1F shows the organization of the striated skeletal muscle at the electron microscope level, where the sarcomeres are evident, mainly by the presence of transverse striations (arrangement of thick and thin myofilaments). Furthermore, fusiform, flattened and peripheral nuclei show uncondensed chromatin.

### Control group 2

The individuals in this group were inoculated with cells from the Walker 256 tumor lineage + PBS. In the right posterior leg muscle tissue, extensive invasion of cells was seen. These cells were histologically characterized by hypertrophy, irregular borders, pleomorphism (variation in size and shape) and the presence of more than one nucleus, which in turn were irregular in shape, were very large in size and contained condensed chromatin (Figure 1D). These tumor cells filled practically all the space formerly occupied by the connective tissue between the muscle fibers, leaving these indistinguishable in histological sections and characterizing total disruption of this tissue (Figure 1D). In the ultra structural level, the morphology of these tumor cells can be observed, primarily highlighting the nucleus/cytoplasm ratio of these cells (Figure 1G). The injected PBS probably also caused changes in the extracellular matrix, swelling the tissue as can be seen in Figure 1D.

In general, after performing these procedures, it was observed that the muscle tissue exhibited complete histological disorganization and also showed the presence of eosinophilic masses as a result of the large number of tumor cells, the morphological characteristics of which were previously described above (Figure 1D). Another feature in this group was the histological observation (confirmed by electron microscopy) of tumor cells with strongly stained irregular nuclei and with nuclei in the process of chromatin marginalization (1G). Electron microscopy also showed the presence of nuclei in the process of fragmentation as well as apoptotic bodies (Figures 1G).

### Control group 3

The results obtained from the individuals in this study group, which underwent only inoculation with the Walker 256 tumor cell line, showed an intermediate histology between that observed in individuals from the Control 1 and 2. This means that there was extensive invasion of tumor cells in muscle tissue, mostly in the extracellular matrix, which led to extensive disruption of the tissue (Figure 1E). However, although this disruption is quite apparent, it is possible to observe muscle fibers, a situation contrary to that observed in the Control 2 group.

In the intercellular regions, cells with pleomorphic characteristics, pyknotic nuclei and irregular shapes were observed (Figure 1H). In these same regions, collagen fibers could be clearly observed by

electron microscopy to have not only disrupted but also undergone fragmentation, thus differing from the typical aspect of the intercellular matrix observed in skeletal muscle (Figure 1H).

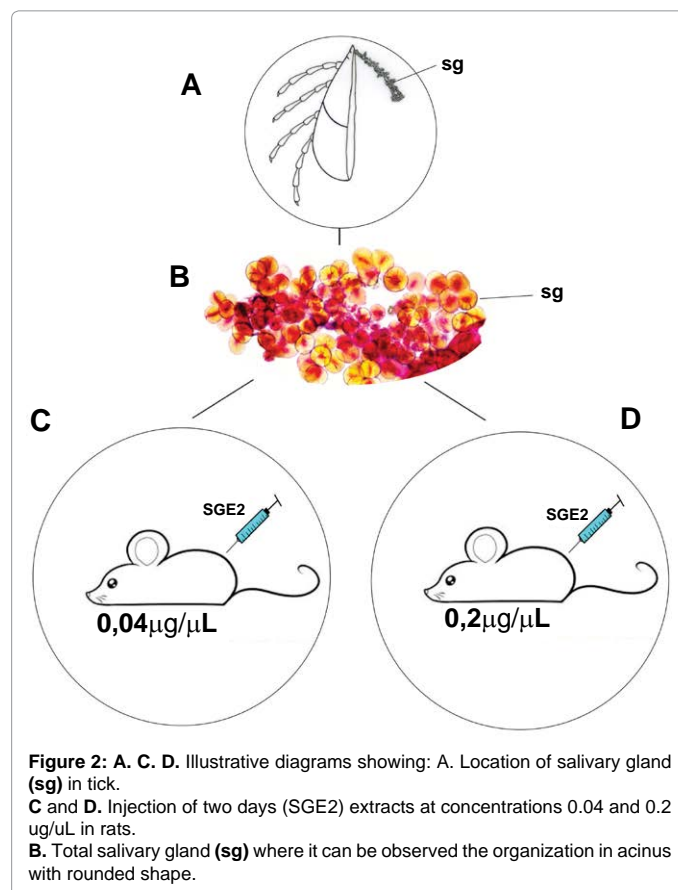
In addition, it was no longer possible to view the typical transverse striations of the muscle fibers in the histological sections, indicating disorganization as a result of neoplastic invasion (Figure 1E).

### Test group 1

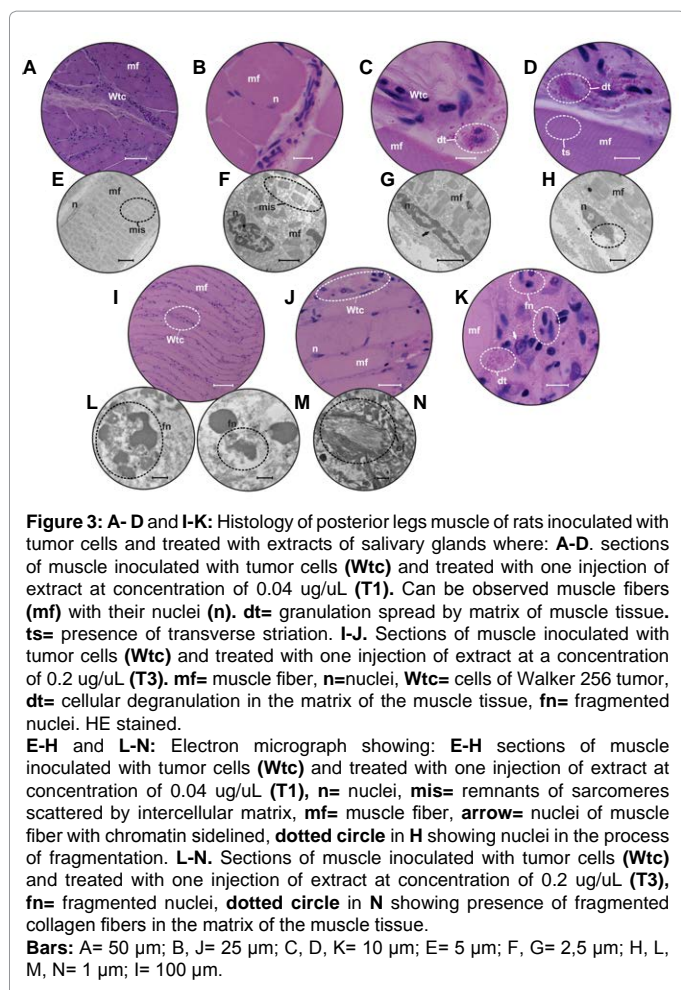
Individuals in this group, in addition to inoculation with tumor cells from the Walker 256 lineage, also received an injection of SGE2 extract at a concentration of 0.04 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  (Figure 2). The results showed that the fibers, although still histologically disorganized, show certain integrity. Unlike the previous situation, they can be observed in a parallel arrangement among themselves, with their nuclei located peripherally, and even feature the presence of transverse striations (Figure 3A–D). In the previously described group, i.e., Control 3, besides the histological disorganization, the muscle fibers themselves were internally disrupted, a fact confirmed by the absence of transverse striations as well as the presence of pyknotic nuclei and, in some cases, nuclei in the process of fragmentation (Figure 1E, H).

One detail observed very often in this study group was the presence of cells in the process of degranulation (Figure 3C, D), most likely because of the presence of the toxic element in the muscle. This degranulation was quite similar to that occurring with mast cells in cases of immediate hypersensitivity reactions.

Electron microscopy observations showed that when the frequency of tumor cell invasion decreased, it did not prevent the muscle fibers



**Figure 2:** A. C. D. Illustrative diagrams showing: A. Location of salivary gland (sg) in tick. C and D. Injection of two days (SGE2) extracts at concentrations 0.04 and 0.2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  in rats. B. Total salivary gland (sg) where it can be observed the organization in acinus with rounded shape.



**Figure 3:** A-D and I-K: Histology of posterior legs muscle of rats inoculated with tumor cells and treated with extracts of salivary glands where: A-D. sections of muscle inoculated with tumor cells (Wtc) and treated with one injection of extract at concentration of 0.04 ug/uL (T1). Can be observed muscle fibers (mf) with their nuclei (n). dt= granulation spread by matrix of muscle tissue. ts= presence of transverse striation. I-J. Sections of muscle inoculated with tumor cells (Wtc) and treated with one injection of extract at a concentration of 0.2 ug/uL (T3). mf= muscle fiber, n=nuclei, Wtc= cells of Walker 256 tumor, dt= cellular degranulation in the matrix of the muscle tissue, fn= fragmented nuclei. HE stained. E-H and L-N: Electron micrograph showing: E-H sections of muscle inoculated with tumor cells (Wtc) and treated with one injection of extract at concentration of 0.04 ug/uL (T1), n= nuclei, mis= remnants of sarcomeres scattered by intercellular matrix, mf= muscle fiber, arrow= nuclei of muscle fiber with chromatin sidelined, dotted circle in H showing nuclei in the process of fragmentation. L-N. Sections of muscle inoculated with tumor cells (Wtc) and treated with one injection of extract at concentration of 0.2 ug/uL (T3), fn= fragmented nuclei, dotted circle in N showing presence of fragmented collagen fibers in the matrix of the muscle tissue. Bars: A= 50 µm; B, J= 25 µm; C, D, K= 10 µm; E= 5 µm; F, G= 2,5 µm; H, L, M, N= 1 µm; I= 100 µm.

from damage (Figure 3E-H). In this sense, the damage was primarily related to misalignment of the sarcomeres (Figure 3E, F), changing the morpho-physiology of the tissue as a whole. Besides the fibers, the nuclei also underwent changes such as chromatin marginalization and, most likely, the beginning of fragmentation (Figure 3F-H).

### Test group 2

In this group, individuals were inoculated with tumor cells and also received two injections of SGE2 extract at a concentration of 0.04µg/µL (Figure 2). The muscle histology of these individuals also shows an apparent disorganization of the muscle fibers, which can be observed parallel to each other, with peripheral nuclei that are fusiform and distinct (Figure 4A-D). However, unlike the previous group, the presence of transverse striations was rare, and longitudinal arrangements characterizing the parallel arrangements of the myofibrils also presented severe changes, because they seemed to be separated from each other by a space (not stained by the technique applied) as well as the consequent formation of vacuole-like structures (Figure 4C, D). Compared with that in the individuals from the previous group (Figure 3A-D), the intensity in the cells in the process of degranulation was less frequent; these cells were located between the spaces in the extracellular matrix (Figure 4D).

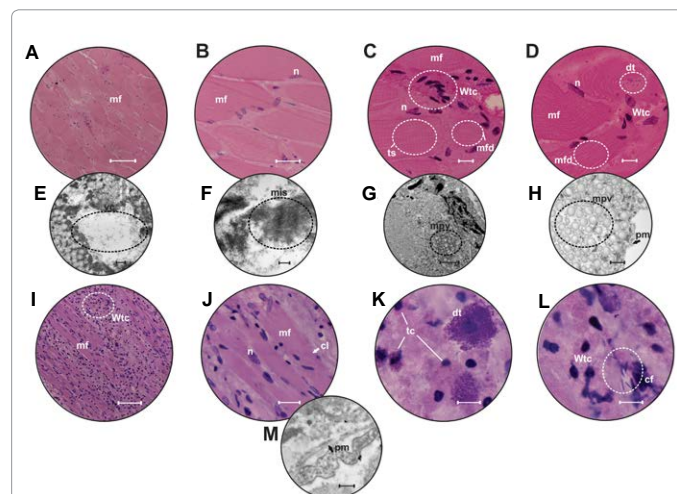
The areas invaded by the neoplastic cells were less frequent than those observed in Test Group 1 (Figure 4A-D). In these areas, the eosinophilic masses persisted, and it was impossible to observe the

limits of the cells, only irregular nuclei and cells in the process of fragmentation (Figure 4C).

Although the neoplastic invasion was decreased, ultra structural analysis showed severe damage to the fibers and intercellular matrix. This damage could be translated into the presence of extensive areas of cytoplasmic degradation (Figure 4E), the presence of fragments of sarcomeres resulting from misalignment and fragmentation of these structures (Figure4F). With regard to the alterations, the membrane of the fibers was completely disorganized and the cytoplasm filled with micropynocytic vesicles (Figure 4G,H) namely, portions of the extracellular fluid that were encompassed and brought into the cell. Furthermore, granular and electron dense material was observed between the vesicles (Figure 4 E,H).

### Test group 3

In this group, the individuals were inoculated with tumor cells and also received one injection of SGE2 extract at a concentration of 0.2µg/µL (Figure 2). The histology of the muscle tissue of these individuals showed that, even in the presence of the extract, major invasion of tumor cells existed throughout the muscle fibers (Figure 3I-K), which was also confirmed by ultra-structural analyses (Figure 3L-M). However, these fibers still maintained their parallel arrangement (Figure 3I-J). Transversal and longitudinal striations could not be



**Figure 4:** A-D and I-L: Histology of muscle of posterior legs of rats inoculated (Wtc) and treated with extracts of salivary glands where: A-D. sections of muscle inoculated with tumor cells (Wtc) and treated with two injections of the extract at a concentration of 0.04 ug/uL (T2). Observe muscle fibers (mf) with their nuclei (n). dt= granulation spread by matrix of muscle tissue. mfd= myofibrils disorganized inside muscle fibers, dt= cellular degranulation in the matrix of the muscle tissue. I-L: Sections of muscle of posterior legs of rats inoculated with tumor cells (Wtc) and treated with two injections of the extract at a concentration of 0.2 ug/uL (T4). mf= muscle fiber, n=nuclei, tc= tumor cells, dt= cell in process of degranulation in the matrix of the muscle tissue, cf= collagen fibers in disorganized matrix of muscle tissue, cl= cell limit. HE stained. E-H and M: Electron micrographs showing: E-H. sections of muscle inoculated with tumor cells (Wtc) and treated with two injections of extract at concentration of 0.04 ug/uL (T2). Inside dotted circle note the presence of a large vacuolated region in the cytoplasm of the muscle fiber. In F (mis) observe the presence of remnants of sarcomeres, resulting from the disruption of the muscle tissue. In M section of posterior leg of rats inoculated with tumor cells (Wtc) and treated with two injections of the extract at a concentration of 0.2 ug/uL (T4), note the disorganization of the plasmatic membrane showing disrupted regions (arrow pm). Bars: A, I= 100 µm; B, J= 25 µm; C, D, K, L= 10 µm; E, H, M= 0,5 µm; F= 250 nm; G= 2,5 µm.

observed (Figure3J), and the nuclei of the muscle fibers appeared with condensed chromatin (Figure 3I-J); furthermore, in some regions, these nuclei appeared to be undergoing fragmentation (Figure 3K).

The neoplastic cells were observed with greater frequency than that in the Test groups described above and occurred in the intercellular matrix (Figure 3L-M). Here, cells forming an eosinophilic mass could also be observed, where the cells were pleomorphic, featured pyknotic nuclei and chromatin marginalization, and were in the process of fragmentation (Figure 3K). Ultra structurally, it was possible to observe complete disorganization of the intercellular matrix, where beside this fragmented collagen fibers (Figure3N), the presence of very electron dense nuclear fragments could be observed (Figure3L-M).

In this group, the presence of granules distributed by the intercellular matrix could also be observed, probably the result of cell degranulation (Figure3K).

#### Test group 4

The individuals in this group were inoculated with tumor cells and also received two injections of SGE2 extract at a concentration of 0.2µg/µL (Figure 2). In general, the histological results showed muscular tissue completely invaded by the tumor cells (intercellular matrix), which disorganize the fibers (Figure 4I-J). This histology was similar to that observed in the individuals inoculated with the tumor cells but not subjected to extract injection. The muscle fibers did not present the typical arrangement; i.e., transverse striations were not seen (Figure 4J), and the histology suggested that the membrane (endomysium) of these fibers was altered, in the sense that in some regions, detachment from the peripheral cytoplasm (Figure4J) could be observed (results corroborated by ultra structural analysis- Figure 4M).

Furthermore, the nuclei, which should be arranged peripherally, now seemed to change their location on the basis of the disorganization exhibited by these cells (Figure 4J). Many of these muscle cells featured accentuated pyknosis, but some seemed to have dispersed chromatin (Figure 4J). Neoplastic areas were more frequent (Figure 4I-L) in comparison with those in specimens from Test Group 3. Within this mass, neoplastic cells with characteristics of mast cells undergoing degranulation were also observed (Figure 4K).

In the intercellular matrix, it was also possible to observe the presence of very small eosinophilic structures resembling short filaments, which were probably collagen fibers, distributed among the tumor cells (Figure 4L).

#### Statistical analysis of blood parameters of the rats

The results obtained from clinical analysis of the blood of the rats

used in this study showed that creatinine levels were significantly increased ( $1.15 \pm 0.07$ ) in rats subjected to one and two injections of the extract at a concentration of 0.04 µg/uL compared with those in rats subjected to one and two injections of the extract at a concentration of 0.2 µg/uL ( $0.45$  and  $0.55$ , respectively,  $\pm 0.071$ )  $p < 0.01$  (Table 1 and Figure 5).

The results related to the quantity of leukocytes showed that in all the rats inoculated with the tumor cells ( $12699.5$ ;  $7699.5$ ;  $6299.5$ ;  $21699.5$ ;  $26599.5 \pm 0.7$ ), there was a significant increase in the total number of leukocytes compared with the healthy rats ( $5899.5 \pm 0.7$ ), while there was a significant increase in rats inoculated and subjected to one ( $21699.5 \pm 0.7$ ) and two ( $26599.5 \pm 0.7$ ) injections of the extract at a concentration of 0.2 µg/uL compared with those that were only inoculated ( $12699.5 \pm 0.7$ )  $p < 0.01$  (Table 1; Figure 6).

#### Discussion

The search for substances that have an inhibitory action on the growth of tumor cells has generally been ongoing, because these cells have morphological and physiological characteristics that make them special and difficult to control. On the other hand, the scarcity of information available in the literature with respect to the countless differences found in the salivary secretions produced by the various genera and species of ticks. Reinforcing these information the *in vitro* study performed by Furquim et al (personal information) showed that gland extracts compromised the viability of tumor cells of lines DH 82 and HL-60 by inducing apoptosis as well as their proliferation rate. In this sense these factors were determinating to motivated us to perform this study, which was primarily focused on demonstrating the potential action of salivary gland extracts from female *R. sanguineus* ticks fed for 2 days on rabbits hosts on Walker 256 tumor cells inoculated *in vivo* into the right posterior leg of Wistar rats.

The results obtained in the present study demonstrated that the invasion of tumor cells via inoculation was very aggressive, and in a matter of 2 days, because of the high rate of proliferation of these cells, almost the entire intercellular inter fibers space (the muscle cells are also called muscle fibers, because they are long rather than wide) of the targeted musculature was occupied. This occupation led to significant morphological alterations in the muscle, such as disorganization of both the tissue as well as the muscle fibers themselves, which certainly damaged the physiology of this muscle. It was evident that the muscle fibers themselves lost their typical morphological characteristic, namely the repeated sequence of uniform bands along the length of the cells [22], which is the origin of both the transverse striations (arrangement of sarcomeres) and the longitudinal striations (arrangement of contractile filaments), which have already been comprehensively described in the literature [21].

Parameters	Control 1	Control 2	SGE2			
	Healthy	With tumor and submitted to 1 injection of PBS	0,04µg/µL		0,2µg/µL	
			1 injection	2 injections	1 injection	2 injections
Creatinine (mg/dL)	0,75 ± 0.0707	0,95 ± 0.0707	1,15 ± 0.0707 <sup>(*,**,(1))</sup>	1,15 ± 0.0707 <sup>(*,(1))</sup>	0,45 ± 0.0707 <sup>(*,(2))</sup>	0,55 ± 0.0707 <sup>(**,1)</sup>
Leukocytes (n°/µL)	5899.5 ± 0.7071	12699.5 ± 0.7071 <sup>(*,1)</sup>	7699.5 ± 0.7071 <sup>(**,**,1)</sup>	6299.5 ± 0.7071 <sup>(**,**,1)</sup>	21699.5 ± 0.7071 <sup>(**,**,1)</sup>	26599.5 ± 0.7071 <sup>(**,**,1)</sup>

Values= mean ± standard deviation

**Control 1- Healthy group:** individuals not inoculated with Walker 256 cells.

**Control 2- With tumor and submitted to 1 injection of PBS:** individuals inoculated with Walker 256 cells and submitted to 1 injection of PBS

(\*)= significantly different from **Control 1**.

(\*\*)= significantly different from **Control 2**.

(1)=  $p < 0,01$

(2)=  $p < 0,05$

**Table 1:** Results of biological parameters: creatinine level and leukocytes count.

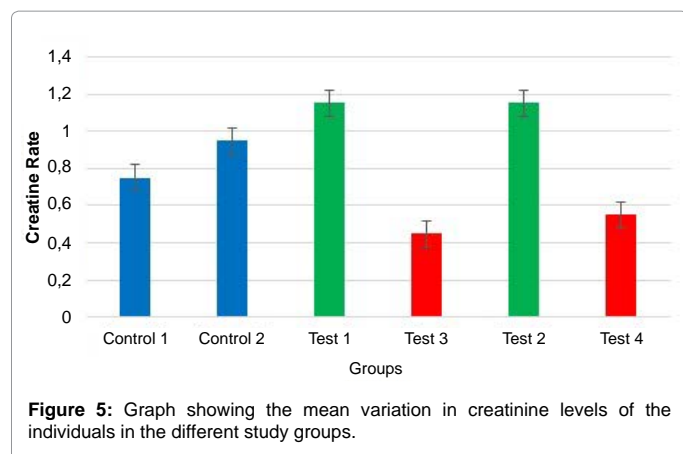


Figure 5: Graph showing the mean variation in creatinine levels of the individuals in the different study groups.

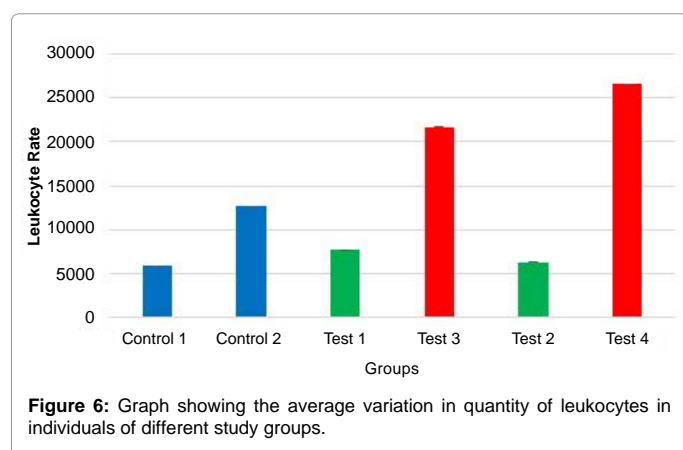


Figure 6: Graph showing the average variation in quantity of leukocytes in individuals of different study groups.

The invasion of tumor cells in the muscle tissue promoted the emergence of eosinophilic masses, which pushed and shifted the muscle fibers from their place of origin. Because movements to contract and relax the muscles must be synchronized, this disorganization certainly makes it impossible for the dynamics of muscular physiology to occur with precision.

The assays performed in this study resulted in different answers according to the concentrations of the extracts used (0.2 and 0.04 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) and the number of injections (one or two) administered. The results showed that animals receiving only one injection of the 0.04 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  extract had a lower rate of tumor cell invasion, because the inter fibers spaces held smaller and less frequent eosinophilic masses, as well as the presence of defense cells (leukocytes in general) and active mast cells (degranulation). The presence of active mast cells in tissue invaded by tumor cells, according to [23] and [21], would indicate that this process, when in inflammatory exudates, would mediate the cellular and vascular responses of the tissue, and in different microenvironments, it would have effects both promoting and inhibiting tumors [24]. In addition, according to other authors, mast cells would be closely associated to tumor progression via promotion of angiogenesis [25].

In general, the results obtained with this concentration of extract were very similar to those for Control Group 1 (healthy rats). On the other hand, animals that received two injections of the extract at this same concentration presented, in addition to an increased number of tumor cells, clear disorganization of the muscle fibers (which were already visible at the light microscopy level) represented by the absence or small presence of transverse striations, meaning that the sarcomeres

had been disorganized and the presence of inter myofibrillar spaces, which certainly compromised the physiology of the muscle tissue.

With regard to the results obtained for the 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  concentration (regardless of the number of injections), it was found that in both situations, there were significant morphological and physiological changes in the muscle tissue, with the following observations: intense invasion of tumor cells in the intercellular matrix and extensive disorganization of the muscle fibers. It should be noted that despite the fact that two tests detected damage to the tissue, where the animals were subjected to two extract injections, the areas of invasion of tumor cells were much larger, showing that the extract was unable to contain them.

Therefore, the results obtained here indicated that, although 'collateral damage' was detected, the injection of different concentrations of extracts from the salivary glands of female *R. sanguineus* ticks fed for 2 days on rabbit hosts promoted a decrease in the rate of invasion of Walker 256 lineage cells in the musculature of Wistar rats *in vivo*, representing a possible strategy for controlling the disordered growth of tumor cells.

It was clear that the single, lower-concentration injection of the extract was more effective in containing tumor invasion and caused less 'collateral damage' to the muscle tissue, which was the object of this study.

Alongside the morphological and histological bioassays, the following parameters were also clinically evaluated in the blood of the animals: creatinine levels and quantification of leukocytes. The former was evaluated because there is a direct relationship between creatinine kinase (enzyme responsible for the degradation of creatinine) levels and muscle injuries [23,26- 28], while the latter was evaluated because of the involvement of leukocytes in the inhibition of tumor cells (defense behavior).

The results revealed that creatinine levels were higher in rats subjected to one and two injections of the extract at a concentration of 0.04 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  compared with those in rats subjected to one and two injections of the extract at 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , suggesting that in the first group, the injection of the extract contributed to maintaining the integrity of the muscle tissue. This hypothesis is supported by the fact that there was no statistically significant difference in the parameter in question when comparing the results of rats that received injections of 0.04 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  and those only inoculated with tumor cells, demonstrating that the extract did not affect the muscular morphology and physiology.

With regard to the increase/decrease in the number of leukocytes, the results suggested that, in all the rats inoculated with tumor cells, there was a significant increase in the total number of leukocytes, because neoplastic cells acted as an antigen stimulating the defense response. Furthermore, in the inoculated rats receiving injections (one and two) of the extract at a concentration of 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , there was a significant increase in the number of leukocytes compared with that in rats only inoculated and not exposed to the extract. This result can be explained by the fact that beyond the tumor cells, the extract itself acted to boost the defense response at this concentration. However, inoculated rats subjected to injections (one and two) of the extract at a concentration of 0.04 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  showed a significant decrease in the total number of leukocytes compared with rats that were only inoculated and those inoculated and injected with the extract at a concentration of 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . These results reinforced that the 0.04 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  concentrations was not only more effective in inhibiting the tumor cells but also did not act as a stressor, because the number of leukocytes was lower.



Therefore, the data obtained in this study through *in vivo* tests using Walker 256 tumor cells and exposing them to different concentrations of extracts obtained from the salivary glands of female *R. sanguineus* ticks with 2 days of feeding on rabbit hosts indicated that molecules produced by the salivary glands of this species of ticks have the ability to inhibit tumor growth, as well as minimize collateral damage to the organism. It should be noted here that *in vivo* study models, unlike *in vitro* models, introduce the variable of the body's physiological response when exposed to stressors (in this case, tumor cells and salivary gland extracts) and that tick saliva in general is considered to be a reservoir of bioactive modulators of the immune-inflammatory system.

## References

1. Steen NA, Barker SC, Alewood PF (2006) Proteins in the saliva of the Ixodida (ticks): pharmacological features and biological significance. *Toxicol* 49: 1-20.
2. Francischetti IM, Sa-Nunes A, Mans BJ, Santos IM, Ribeiro JM (2009) The role of saliva in tick feeding. *Front Biosci (Landmark Ed)* 14: 2051-2088.
3. Hajnická V, Vaná ovĀĵ-Ā tibrĀĵiniovĀĵĵ I, SlovĀĵk M, KocĀĵkovĀĵĵ P, Nuttall PA (2011) Ixodid tick salivary gland products target host wound healing growth factors. *Int J Parasitol* 41: 213-223.
4. Camargo-Mathias MI (2011) Immunomodulatory effects of tick saliva. *Invertebrate Survival Journal* 8: 231-240.
5. Brossard M, Wikel SK (2004) Tick immunobiology. *Parasitology* 129 Suppl: S161-176.
6. Mulenga A, Blandon M, Khumthong R (2007) The molecular basis of the Amblyomma americanum tick attachment phase. *Exp Appl Acarol* 41: 267-287.
7. Oliveira CJ, Sá-Nunes A, Francischetti IM, Carregaro V, Anatriello E, et al. (2011) Deconstructing tick saliva: non-protein molecules with potent immunomodulatory properties. *J Biol Chem* 286: 10960-10969.
8. Oliveira CJ, Carvalho WA, Garcia GR, Gutierrez FR, de Miranda Santos IK, et al. (2010) Tick saliva induces regulatory dendritic cells: MAP-kinases and Toll-like receptor-2 expression as potential targets. *Vet Parasitol* 167: 288-297.
9. Drewes CC, Dias RY, Hebeda CB, Simons SM, Barreto SA, et al. (2012) Actions of the Kunitz-type serine protease inhibitor Amblyomin-X on VEGF-A-induced angiogenesis. *Toxicol* 60: 333-340.
10. Kazimírová M, Dovinová I, Rolníková T, Tóthová L, Hunáková L (2006) Anti-proliferative activity and apoptotic effect of tick salivary gland extracts on human HeLa cells. *Neuro Endocrinol Lett* 27 Suppl 2: 48-52.
11. Chudzinski-Tavassi AM, De-Sá-Júnior PL, Simons SM, Maria DA, de Souza Ventura J, et al. (2010) 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. *Toxicol* 56: 1145-1154.
12. Simons SM, Júnior PL, Faria F, Batista IF, Barros-Battesti DM, et al. (2011) The action of Amblyomma cajennense tick saliva in compounds of the hemostatic system and cytotoxicity in tumor cell lines. *Biomed Pharmacother* 65: 443-450.
13. Akagi EM, Júnior PL, Simons SM, Bellini MH, Barreto SA, et al. (2012) Pro-apoptotic effects of Amblyomin-X in murine renal cell carcinoma "in vitro". *Biomed Pharmacother* 66: 64-69.
14. Furquim KCS, Bechara GH, Camargo Mathias MI (2010) Morpho-histochemical characterization of salivary gland cells of males of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) at different feeding stages: description of new cell types. *Experimental and Applied Acarology* 50: 59-70.
15. Kazimírová M (2007) Bioactive compounds in ticks acting on host thrombohemostasis. *Thrombohemostatic Disease Research*, Nova Science Publishers, New York.
16. Poole NM, Nyindodo-Ogari L, Kramer C, Coons LB, Cole JA (2013) Effects of tick saliva on the migratory and invasive activity of Saos-2 osteosarcoma and MDA-MB-231 breast cancer cells. *Ticks Tick Borne Dis* 4: 120-127.
17. Shafi G, Munshi A, Hasan TN, Alshatwi AA, Jyothy A, et al. (2009) Induction of apoptosis in HeLa cells by chloroform fraction of seed extracts of *Nigella sativa*. *Cancer Cell Int* 9: 29.
18. Morris J, Dobson J (2007) *Oncologia em pequenos animais*. Editora Roca LTDA, São Paulo.
19. Brigatte P, Sampaio SC, Gutierrez VP, Guerra JL, Sinhorini IL, et al. (2007) Walker 256 tumor-bearing rats as a model to study cancer pain. *J Pain* 8: 412-421.
20. Reynolds ES (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* 17: 208-212.
21. Junqueira LCU, Carneiro J (2013) *Histologia Básica*. (Edn 12) Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
22. Gartner LP, Hiatt JL (2014) *Atlas Colorido de Histologia*. (Edn 6) Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
23. Jonas F (2000) Adenovirus-mediated overexpression of p15INK4B inhibits human glioma cell growth, induces replicative senescence, and inhibits telomerase activity similarly to p16INK4A. *Cell Growth Differ* 11: 373-384.
24. Oliveira-Neto HH, Leite AF, Costa NL, Alencar RC, Lara VS, et al. (2007) Decrease in mast cells in oral squamous cell carcinoma: possible failure in the migration of these cells. *Oral Oncol* 43: 484-490.
25. Elpek GO, Gelen T, Aksoy NH, ErdoĀĵyan A, Dertsiz L, et al. (2001) The prognostic relevance of angiogenesis and mast cells in squamous cell carcinoma of the oesophagus. *J Clin Pathol* 54: 940-944.
26. Kopp J, Loos B, Spilker G, Horch RE (2004) Correlation between serum creatinine kinase levels and extent of muscle damage in electrical burns. *Burns* 30: 680-683.
27. Neto A, Ferreira JM (2008) Níveis comparativos de estresse oxidativo em camundongos em duas situações do limite orgânico: overreaching induzido por treinamento de natação e câncer. *Rev bras med esporte* 14: 548-552.
28. Horjus DL, Oudman I, van Montfrans GA, Brewster LM (2011) Creatine and creatine analogues in hypertension and cardiovascular disease. *Cochrane Database Syst Rev* : CD005184.

**Citation:** Abreu MR, Rocha FA, Furquim KCS, Anholetto LA, Novaes FCF, et al. (2014) Salivary Glands of Female Ticks *Rhipicephalus sanguineus* Like a Potential Source of Molecules with Inhibitory Action: *In vivo* study with Walker 256 Tumor Cells. J Pharma Care Health Sys 1: 121. doi:10.4172/2376-0419.1000121

## Submit your next manuscript and get advantages of OMICS Group submissions

### Unique features:

- User friendly/feasible website-translation of your paper to 50 world's leading languages
- Audio Version of published paper
- Digital articles to share and explore

### Special features:

- 400 Open Access Journals
- 30,000 editorial team
- 21 days rapid review process
- Quality and quick editorial, review and publication processing
- Indexing at PubMed (partial), Scopus, EBSCO, Index Copernicus and Google Scholar etc
- Sharing Option: Social Networking Enabled
- Authors, Reviewers and Editors rewarded with online Scientific Credits
- Better discount for your subsequent articles

Submit your manuscript at: <http://www.scholarscentral.com/>

## 5. Discussão

A constante procura por substâncias com potencial de inibição sobre o desenvolvimento e proliferação de células tumorais, devido à já mencionada importância e impacto social promovido pela doença, somado a lacuna na literatura no que diz respeito às inúmeras diferenças encontradas nas secreções salivares produzidas pelos diversos gêneros e espécies de carrapatos, e ainda a falta de estudos realizados *in vivo* testando a ação do extrato glandular de carrapatos, reforçaram o interesse no desenvolvimento deste trabalho o qual teve como principal foco demonstrar o potencial de ação do extrato de glândulas salivares de fêmeas de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* alimentadas por dois dias em coelhos hospedeiros sobre tumor de Walker 256, inoculado *in vivo* nas pernas posteriores direitas de ratas Wistar.

Os resultados obtidos nesse estudo demonstraram que a invasão das células tumorais via inoculação foi bastante agressiva e em questão de poucos dias, devido à alta taxa de proliferação das mesmas, elas ocuparam praticamente todo o espaço intercelular ou interfibrilar da musculatura alvo. Essa ocupação provocou no músculo grandes alterações morfológicas tais como a desorganização tanto do tecido quanto das próprias fibras musculares, o que certamente trouxe prejuízos para a fisiologia do músculo. Ficou evidente que as próprias fibras musculares perderam sua característica morfológica típica, ou seja, a sequencia repetida de bandas uniformes ao longo do comprimento das células (GARTNER et al, 2014), o que dá origem as estriações tanto transversal (arranjo dos sarcômeros) quanto longitudinal (disposição dos miofilamentos contráteis) (JUNQUEIRA et al, 2013).

A invasão das células tumorais no tecido muscular promoveu o surgimento de massas eosinofílicas, as quais empurraram e deslocaram as fibras musculares do seu local de origem. Como os movimentos de contração e de relaxamento dos músculos devem ser sincronizados e uma vez que o tecido muscular assim funciona, essa desorganização certamente impossibilitou a dinâmica da fisiologia muscular de ocorrer com precisão.

Os tratamentos realizados neste trabalho produziram respostas distintas tanto de acordo com as concentrações dos extratos utilizados (0,2 e 0,04 $\mu$ g/ $\mu$ L) quanto ao número de injeções aplicadas (uma ou duas) nos animais modelo.

Os resultados mostraram que os animais submetidos a apenas uma injeção do extrato na concentração de  $0,04\mu\text{g}/\mu\text{L}$  tiveram a invasão de células tumorais reduzida, visto que os espaços interfibrilares abrigaram massas eosinofílicas menores e com rara frequência, além da presença de células de defesa e de mastócitos em atividade (evidenciada pelas degranulações). A presença de mastócitos em atividade em tecidos invadidos por células tumorais, segundo Jonas et al (2000) e Junqueira et al (2013) poderia ser indicativo de que esse processo quando em exsudatos inflamatórios mediará as respostas celulares e vasculares do tecido, e nos diferentes microambientes teriam efeitos sobre os tumores (OLIVEIRA-NETO et al, 2007).

De forma geral o resultado obtido com essa concentração de extrato foi muito semelhante aquele encontrado no Grupo Controle 1 (ratas saudáveis). Por outro lado, aqueles animais que foram submetidos a duas injeções do extrato nesta mesma concentração apresentaram além de maior invasão de células tumorais, alta desorganização das fibras musculares representadas por: a) ausência ou pouca presença de estriações transversais, significando que os sarcômeros se desalinham e b) presença de espaços intermiofibrilares, o que certamente comprometeu a fisiologia do tecido muscular.

Em relação aos resultados obtidos para a concentração de  $0,2\mu\text{g}/\mu\text{L}$  (independente do número de injeções do extrato) verificou-se que em ambas as situações houve grandes alterações morfológicas no tecido muscular, uma vez que observou-se: a) intensa invasão de células tumorais na matriz intercelular e b) extensa desorganização das fibras musculares. Ressalte-se que embora nos dois ensaios tenham sido detectados prejuízos ao tecido, naquele onde os animais foram submetidos a duas injeções do extrato, as áreas de invasão de células tumorais foram muito maiores, mostrando que o extrato não foi capaz de contê-las.

Dessa forma, os resultados aqui apresentados sinalizaram que, embora tenham sido detectados alguns danos ao tecido, a injeção de diferentes concentrações de extratos de glândulas salivares de fêmeas de carrapatos *R. sanguineus* alimentadas por dois dias em coelhos hospedeiros, promoveu a redução da invasão de células da linhagem Walker 256 em bioensaios realizados na musculatura de ratas Wistar *in vivo*, representando uma possível estratégia para controlar o crescimento desordenado de células tumorais.

Ficou claro que a injeção única da menor concentração do extrato ( $0,04\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) foi mais efetiva na contenção da invasão tumoral, bem como causou menos prejuízos ao tecido muscular, objeto deste estudo.

Ressalte-se aqui que estudos realizados em modelos *in vivo*, ao contrário daqueles realizados *in vitro* apresentam a variável “resposta fisiológica do organismo” quando submetido a exposição a agentes estressores (no caso células tumorais e extrato de glândula salivar), e ainda toda a complexidade de outros sistemas integrados a esta resposta. Além disso, é importante destacar a presença de bioativos moduladores do sistema imune-inflamatório, excretados pela glândula salivar desses carrapatos.

Desta forma, os dados obtidos no presente trabalho por meio da realização de ensaios *in vivo*, fazendo uso de células do tumor de Walker 256 e exposição das mesmas a diferentes concentrações de extratos obtidos de glândulas salivares de fêmeas de *R. sanguineus* com dois dias de alimentação, sinalizaram que moléculas produzidas pelas glândulas salivares desses carrapatos teriam capacidade de inibir o crescimento tumoral, além de minimizar os danos colaterais ao organismo.

## 6. Referências Bibliográficas

ANDERSON, J. F.; MAGNARELLI, L. A. Biology of ticks. **Infect. Dis. Clin. North. Am.** v. 22, p. 95-215, 2008.

ARMANI, A. L. C. **Atlas de patologia geral**. Universidade Estadual de Londrina, 2007.

AUSPRUNK, D. H.; FOLKMAN, J. Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. **Microvascular Research**, v. 14, p. 53-65, 1977.

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. **Arch Biochem Biophys**. v. 493, p.151–156, 2010.

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.

BINNINGTON, K.C. Sequential changes in salivary gland structure during attachment and feeding of the cattle tick *Boophilus microplus*. **Int. J. Parasitol.** v. 8, p. 97-115, 1978.

BRIGATTE, P.; KONNO, K.; GUTIERREZ, V. P.; SAMPAIO, S. C.; ZAMBELLI, V. O.; CURI, R.; CURY, Y. Walker 256 tumor-bearing rats as a model to study cancer pain. **J Pain**, v. 8, p. 412-21, 2007.

BROSSARD, M.; WIKEL, S.K. Tick immunobiology. **Parasitology** v. 129, p. 76-161, 2004.

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

CAMARGO-MATIAS, M.I., FURQUIM, K.C.S. The Histology as a Tool for the Understanding of the Morphophysiology of the Brown Dog Tick (*Rhipicephalus sanguineus*). In: JENKINS, O.P. (ed.). **Advances in Zoology Research**, New York, v. 5. Nova Science Publishers, Inc, p. 167-191, 2013.

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

DUNN , T . B. Morphology and histogenesis of mammary tumors . **A . A . S . Publication**, v. 22 , p. 13 - 38 ,1945.

EARLE, W. R. A study of the Walker rat mammary carcinoma 256, in vivo and in vitro. **Am. J. Cancer**, n.24 p.566-612. 1935.

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.

FELIX, F. H. C. MODELO DE IMPLANTE DE TUMOR DE WALKER NO CÉREBRO DE RATOS. 2001. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Ceará.

FRANCISCHETTI, I.M.; MATHER, T.N.; RIBEIRO, J.M.C.; Tick saliva is a potent inhibitor of endothelial cell proliferation and angiogenesis. **Thrombosis Haemostasis**. v. 94, p. 74-167, 2005.

FRANCISCHETTI, I. M. ET AL. The role of saliva in tick feeding. **Frontiers in Bioscience**, v. 14, p. 2051-2088, 2010.

FUKUMOTO, S.; SAKAGUCHI, T.; YOU, M.; XUAN, X.; FUJISAKI, K. Tick troponin I-like molecule is a potent inhibitor for angiogenesis. **Microvasc Res**. V 71, p. 21–218, 2006.

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.

FURQUIM, K.C.S.; CAMARGO-MATHIAS, M.I.; HEBLING, L.M.G.F.; ROMA, G.C.; BECHARA, G.H. Ticks' response to feeding on host immunized with glandular extracts of *Rhipicephalus sanguineus* females fed for 2, 4, and 6 days. I. Inactivity or early degeneration of salivary glands. **Parasitol. Res**. v. 109, p. 147-162, 2011.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Atlas Colorido de Histologia**. 6. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014, p. 512.

HAJNICKÁ, V.; VANCOVÁ, I.; SLOVÁK, M.; KOCÁKOVÁ, P.; NUTTALL, P.A. Ixodid tick salivary gland products target host wound healing growth factors. **Int. J. Parasitol**. v.41, p. 213-223, 2011.

HAY, R.; CAPUTO, J.; CHEN, T.R.; et al. ATCC Cell Lines and Hybridomas. 8 ed. USA: American Type Culture Collection, 1994.

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.

JENSEN, G.; Muntzing, J., Differences in the growth of the Walker carcinoma in Sprague-Dawley and Wistar rats. **Z. Krebsforsch**, 74, 55–8, 1970.

JONAS, F. ET AL. Adenovirus-mediated overexpression of p15INK4B inhibits human glioma cell growth, induces replicative senescence, and inhibits telomerase activity similarly to p16INK4A. **Cell growth & differentiation: the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research**, v. 11, n. 7, p. 373-384, 2000.

JUNQUEIRA, L. C. U.; JUNQUEIRA, L. M. M. S. **Técnicas básicas de citologia e histologia**. São Paulo: Editora Santos, 1983. 123 p.

JUNQUEIRA, L. C. U. & CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 12. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. 556p.

KAZIMIROVÁ, M.; DOVINOVA, I.; ROLNÍKOVAL, T.; TÓTHOVÁ, L.; HUNÁKOVÁ, L. Anti-proliferative activity and apoptotic effect of tick salivary gland extracts on human HeLa cells. **Neuroendocrinology Letters** v.27, p.48-52, 2006.

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.

LIKELY, G. D.; SANFORD, K. K.; EARLE, W. R. Further studies on de proliferation in vitro of single isolated tissue cells. **J. Nat. Cancer Inst.**, v. 13, p. 177 - 184, 1952.

MARITZ-OLIVIER, C.; STUTZER, C.; JONGEJAN, F.; NEITZ, A. W.; GASPAR, A. R. Tick anti-hemostatics: targets for future vaccines and therapeutics. **Trends Parasitol** v. 23 p.397-407, 2007.

McCOY, T. A. & NEUMAN, R. E. The cultivation of Walker carcinoma 256 in vitro from cell suspensions. **J. Nat. Cancer Inst.**, v.16, p. 1221 - 1229, 1956.

MIDER, G. B.; TESLUK, H.; MORTON, J. J. Effects of Walker carcinoma 256 on food intake, body weight and nitrogen metabolism of growing rats. **Acta UnioInternat.Canc.** Louvain.v. 6, p. 409 -420, 1948.

MORAES, S.P., CUNHA, A., REIS NETO, J. A., BARBOSA, H., RONCOLATTO, C.A.P., DUARTE, R. F., Modelo experimental de tumor de Walker. **Acta Cirúrgica Brasileira** [serial on line], v.15, n. 4. Oct-dec.2000.

MORAES FILHO, M. O. Efeitos antineoplásticos do cróton micronifolius no carcinossarcoma 256 de Walker. Dissertação de Mestrado. UFC. 1980.

MULENGA, A.; BLANDON, M.; KHUMTHONG, R. The molecular basis of the *Amblyomma americanum* tick attachment phase. **Exp. Appl. Acarol.** 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.; Tick saliva induces regulatory dendritic cells: MAP-kinases and Toll-like receptor-2 expression as potential targets. **Vet. Parasitol.** 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. **J. Biol. Chem.** v. 286, p.10960-10969, 2011.

OLIVEIRA-NETO, H. H.; LEITE, A. F.; COSTA N. L.; ALENCAR, R.C.; LARA, V. S., SILVA, T. A. ET AL. Decrease in mast cells in oral squamous cell carcinoma: possible failure in the migration of these cells. **Oral Oncol.** v. 43, p. 484-90, 2007.

PIKE, S.E.; YAO, L.; SETSUDA, J.; JONES, K.D.; CHERNEY, B.; APPELLA, E.; SAKAGUCHI, K.; NAKHASI, H.; ATREYA, C.D.; TERUYA-FELDSTEIN, J.; WIRTH, P.; GUPTA, G.; TOSATO, G. Calreticulin and calreticulin fragments are endothelial cell inhibitors that suppress tumor growth. **Blood**, 94: 2461–2468, 1999.

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

RIBEIRO, J.M.C.; MAKOUL, G.T.; LEVINE, J.; ROBINSON, D.K.; SPILMAN, A. Antihemostatic, anti-inflammatory and immunosuppressive properties of the saliva of a tick, *Ixodes dammini*. **J. Exp. Med.** v. 161, p. 332-344, 1985.

SCHREK, R.; AVERY, R.C. Histological observation on transplantable rat and rabbit tumors cultivated in the chorio-allantoic membrane of chick embryos, with special reference to the walker rat tumor 256. **Am. J. Pathol.** v. 13, p. 45, 1937.

SEDMAK, J.J.; GROSSBERG, S.E. A rapid, sensitive and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G250. **Anal. Biochem.** v. 79, p. 544-552, 1977.

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**, 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. **Biomed. Pharmacother.** v. 65, p. 443-450, 2011.

SOUZA, D.H.F. Estudos bioquímicos e estruturais de desintegrinas e metaloproteinases/desintegrinas. Tese de doutorado. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, Brasil, 2009.

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

TALALAY, P.; TAKANO, E.M.V.; HUGHINS. Studies on the walker tumor. I. Standardization of growth of a transplantable tumor. **Cancer Res.** v. 12, p. 834-837, 1952.



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

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

XIANG, F.; ZHANG, J.; ZHOU, Y.; LI, Z.; GONG, H.; ZHOU, J. Proteomic analysis of proteins in the salivary glands of the fed and unfed female tick *Rhipicephalus haemaphysaloides*. **Agricultural Sciences in China.** v. 8, p. 121-127, 2009.