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

**AVALIAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA E IMUNOLÓGICA *IN VITRO* DOS EFEITOS
DOS EXTRATOS SALIVARES DE CARRAPATOS *Rhipicephalus sanguineus*
SENSU LATO (ACARI: IXODIDAE)**

Marina Rodrigues de Abreu

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

Agosto - 2017

**AVALIAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA E IMUNOLÓGICA *IN VITRO* DOS EFEITOS
DOS EXTRATOS SALIVARES DE CARRAPATOS *Rhipicephalus sanguineus*
SENSU LATO (ACARI: IXODIDAE)**

Marina Rodrigues de Abreu

Orientadora: Profa. Dra. Maria Izabel Souza Camargo

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

Agosto - 2017

595.42 Abreu, Marina Rodrigues de
A162a Avaliação morfofisiológica e imunológica in vitro dos
efeitos dos extratos salivares de carrapatos *Rhipicephalus*
sanguineus sensu lato (Acari: Ixodidae) / Marina Rodrigues
de Abreu. - Rio Claro, 2017
153 f. : il., figs., gráfs., tabs., fots.

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

1. Ácaro. 2. Morfologia. 3. Imunologia. 4. Glândulas
salivares. 5. Macrófagos. 6. Imunomodulação. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: ANÁLISE MORFOFISIOLÓGICA IN VITRO DA AÇÃO DE EXTRATOS DE GLÂNDULAS SALIVARES DE FÊMEAS DE CARRAPATOS *Rhipicephalus sanguineus* (ACARI: IXODIDAE) SOBRE A LINHAGEM J774 E MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS BALB/C

AUTORA: MARINA RODRIGUES DE ABREU

ORIENTADORA: MARIA IZABEL SOUZA CAMARGO

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


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


Profa. Dra. FABIANA ALONSO ROCHA
x / x


Profa. Dra. PATRICIA UCELLI SIMIONI
Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes / UNICAMP

Rio Claro, 31 de agosto de 2017

Título alterado para: "Avaliação morfofisiológica e imunológica *in vitro* dos efeitos dos extratos salivares de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* (Acari: Ixodidae)"

**Dedico esse trabalho à minha
amada família e ao meu
companheiro de todas as
horas, Bruno.**

Agradecimentos

Gostaria de agradecer primeiramente a minha família, aos meus pais e meus irmãos, por todo apoio e confiança que vocês têm em mim, que foram a motivação para a conclusão dessa etapa. Um obrigada especial à minha mãe que dividiu comigo todas as alegrias e dificuldades dessa fase, você é incrível mãe.

Agradeço imensamente ao meu amigo e companheiro Bruno, por tanto amor, compreensão e paciência durante esse trabalho, por compartilhar todos os momentos de empolgação e frustração também, sem você para me amparar eu não teria conseguido.

À todos meus amigos, pelos necessários momentos de distração, pelas conversas e por partilharem das minhas angústias e aspirações, em especial às minhas amigas Rafaela e Marina, obrigada por estarem sempre presentes na minha vida e disponíveis a me ouvir.

Agradeço ao meu grupo de pesquisa BCSTM (Brazilian Central of Studies on Ticks Morphology) por todo apoio acadêmico e trabalho em equipe, sou muito grata por pertencer a esse grupo tão competente. Obrigada à todos pelas conversas no café ou no laboratório e por todo apoio nessa caminhada.

À minha orientadora Profa. Dra. Maria Izabel Camargo Mathias, pela oportunidade, confiança, e principalmente pela paciência em me auxiliar na conclusão desse trabalho. Bel você é meu exemplo de profissional e de força feminina, serei sempre grata e orgulhosa de ser sua orientada.

Agradeço a colaboração da Dra. Patrícia Ucelli Simioni, pelo conhecimento compartilhado, por toda a dedicação em me assessorar no desenvolvimento desse trabalho e pela paciência e empenho para a conclusão do mesmo.

À minha companheira de mestrado Lisiery, por me acompanhar nessa caminhada da pós-graduação, desde as disciplinas, feirinhas de quarta e até seu local de trabalho, obrigada por me receber tão bem e me ajudar tanto.

Ao suporte técnico mais bem humorado e divertido, Gerson, obrigada por fazer os dias do Departamento de Biologia mais felizes. Agradeço também à Cris por sempre estar disponível a nos auxiliar na secretaria e resolver qualquer problema.

Finalmente, a CAPES e a Prope pelo financiamento desse estudo.

E a todos que contribuíram direta ou indiretamente na conquista dessa etapa, muito obrigada.

RESUMO

A espécie *Rhipicephalus sanguineus* s. l., mais conhecida como “carrapato do cão”, possui uma grande importância médico-veterinária, não só por espoliar seus hospedeiros, mas também por ser um potencial vetor de agentes patogênicos. O sucesso biológico desses ectoparasitas deve-se à produção de uma saliva complexa produzida pelas glândulas salivares, cujos compostos são capazes de modular o sistema imune-inflamatório e hemostático dos hospedeiros. No entanto, mesmo com o conhecimento adquirido sobre o potencial da saliva no sistema imune-inflamatório dos hospedeiros, pouco se estudou sobre os mecanismos de ação dos extratos glandulares nessa resposta, e as alterações morfofisiológicas envolvidas. Desta forma, o presente projeto propôs a análise dos efeitos *in vitro* de extratos de glândulas salivares de fêmeas de carrapatos *R. sanguineus* s. l. com 2 e 4 dias de alimentação (**EG2** e **EG4**) sobre macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e células da linhagem J774, observando possíveis variações na atividade e na morfofisiologia destas células em função das diferentes exposições ao extrato. Os resultados demonstraram que apenas a concentração de 4 µg/mL do extrato **EG2** apresentou citotoxicidade sobre células da linhagem J774 quando expostas por 48 horas; as concentrações de 4 e 2 µg/mL de ambos os extratos estimularam perfis pró-inflamatórios em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c; a concentração de 2 µg/mL no tempo de 48 horas de exposição e 1 µg/mL no de 24 horas de exposição do **EG2** e as concentrações 2 e 1 µg/mL o **EG4** em 48 horas de exposição também estimularam atividade pró-inflamatória de células da linhagem J774; as demais concentrações dos extratos **EG2** e **EG4** tiveram atividade imunomodulatória sobre ambas linhagens, como demonstrado pela diminuição de liberação de NO, concomitante com a diminuição da secreção de citocinas pró-inflamatórias (IL2, IL-6 e TNF- α), aumento da síntese de IL-10, e confirmada pela análise morfológica sob microscopia de luz e varredura.

Sumário

INTRODUÇÃO	5
1. Carrapatos.....	5
2. <i>Rhipicephalus sanguineus</i> sensu lato	7
3. Glândulas Salivares	8
4. Saliva	10
5. Imunobiologia dos Extratos de Glândulas Salivares e da Saliva de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> s. l.....	14
6. Macrófagos	16
OBJETIVOS	18
MATERIAL E MÉTODOS	19
1. Obtenção e Manutenção dos Carrapatos	19
2. Produção dos Extrato das Glândulas Salivares (EG2 e EG4)	21
3. Bioensaios <i>in vitro</i>	23
4. Análise Morfológica	28
RESULTADOS	31
CAPÍTULO 1.....	32
CAPÍTULO 2.....	75
DISCUSSÃO GERAL	133
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	138
REFERÊNCIAS.....	140

INTRODUÇÃO

1. Carrapatos

1.1. Biologia Geral

Os carrapatos são artrópodes ectoparasitas obrigatórios e de hábito hematófago, que parasitam grande diversidade de hospedeiros vertebrados durante a sua ontogenia (ANDERSON; MAGNARELLI, 2008). Esses animais são também conhecidos pela capacidade de transmitir inúmeros patógenos, como fungos, bactérias, protozoários e vírus responsáveis pela transmissão de doenças aos seus hospedeiros (LABRUNA et al., 2007).

O ciclo de vida dos carrapatos apresenta quatro estágios: ovo, larva, ninfa e adulto, os quais podem ocorrer em um único hospedeiro, como no caso das espécies monoxenas ou em mais de um, como nas espécies trioxenas (três hospedeiros), que se alimentam em hospedeiros diferentes em cada uma das fases do seu desenvolvimento (DENARDI et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2003; SONENSHINE; ROE, 2014). Além disso, durante o seu ciclo biológico, os carrapatos podem sobreviver por longos períodos fora dos hospedeiros, quando ficam abrigados entre a vegetação e as fendas no solo (WALKER, 1994).

Para completar o desenvolvimento e garantir seu sucesso reprodutivo, os carrapatos desenvolveram, ao longo da evolução, estratégias para detectar parâmetros essenciais de estímulos como odor, vibração, aparência visual e temperaturas radiadas (SONENSHINE; ROE, 2014). A seleção do local de fixação no hospedeiro, por exemplo, é realizada pelos quimiorreceptores presentes nos palpos e nas quelíceras, estes últimos utilizados para “provar” o hospedeiro. Após perfurar a epiderme e a derme do mesmo com as quelíceras, o hipostômio é introduzido na pele e permanece fixando o carrapato, por meio também da produção e secreção de uma substância proteica denominada

cimento, sintetizada pelas glândulas salivares e que tem como função auxiliar na fixação do aparelho bucal. Instalado esse canal de alimentação, começa a ser liberada a saliva do carrapato para o hospedeiro, bem como os fluidos sanguíneos do hospedeiro para os carrapatos (ANDERSON; MAGNARELLI, 2008).

Para que a fêmea possa alcançar o completo ingurgitamento (ingestão de sangue, podendo aumentar em até 100 vezes o seu tamanho original) concomitante ao seu processo de ovogênese, é necessário que ocorra a cópula com o macho. Uma vez ingurgitada completamente, a fêmea se solta do hospedeiro e inicia o processo de oviposição, que na família Ixodidae chega a alguns milhares de ovos, sendo o recorde registrado o de 36.206 ovos para a espécie *Amblyomma variegatum* (SONENSHINE; ROE, 2014). Em seguida, a fêmea morre e os ovos ficam em incubação (cerca de 20 dias, dependendo das condições ambientais) até a eclosão das larvas que sairão em busca de um hospedeiro para alimentar-se e então sofrer a ecdise para ninfas, que por sua vez também necessitarão se alimentar em hospedeiros para sofrer a ecdise final para tornar-se adultos (SONENSHINE; ROE, 2014).

1.2. Taxonomia e Sistemática

Os carrapatos pertencem ao Filo Arthropoda, Classe Arachnida, Subclasse Acari, Ordem Parasiformes, Subordem Ixodida (BARKER; MURRELL, 2004). Estima-se que atualmente existam cerca de 899 espécies divididas entre as famílias Nuttalliellidae, Argasidae e Ixodidae (ANDERSON; MAGNARELLI, 2008; DANTAS-TORRES, 2008; NAVA et al., 2015).

A família Ixodidae atualmente é composta por 702 espécies descritas e conhecida por abrigar os “carrapatos de corpo duro” (do inglês “hard ticks”), pois os indivíduos apresentam um escudo dorsal quitinoso, que nos machos recobre quase toda a superfície dorsal e nas fêmeas apenas a metade anterior desta mesma região, o que possibilita a

expansão do corpo durante o processo de ingurgitamento. Existe, portanto, nesses carrapatos um dimorfismo sexual na fase adulta (GUGLIELMONE et al., 2014). Esses indivíduos apresentam também peças bucais inseridas na região anterior e proximal do corpo, e a água obtida do sangue do hospedeiro é secretada pelas próprias glândulas salivares durante o processo de alimentação (SONENSHINE; ROE, 2014).

A extensa quantidade de espécies e a ampla distribuição geográfica dos carrapatos da família Ixodidae podem ser atribuídas: à diversidade de hospedeiros, que varia desde mamíferos, aves, répteis, anfíbios e ainda outros aracnídeos, como os próprios carrapatos e até mesmo o homem (LABRUNA et al., 2007); bem como ao seu lento processo de ingurgitamento, permitindo que estes sejam transportados pelo hospedeiro por longas distâncias (ANDERSON; MAGNARELLI, 2008). Consequentemente, esta característica alimentar favorece a transmissão de patógenos para os hospedeiros e, portanto, a família Ixodidae é a que abriga as espécies que possuem maior importância econômica e médico-veterinária (DANTAS-TORRES, 2010).

2. *Rhipicephalus sanguineus sensu lato*

Dentro da família Ixodidae, encontram-se quatro subfamílias, dentre elas, a subfamília Rhipicephalinae, abrigando o gênero *Rhipicephalus* que conta com cerca de 79 espécies descritas (DANTAS-TORRES, 2010).

A espécie *R. sanguineus sensu stricto* (s. s.) foi descrita pela primeira vez em 1806 por Latreille. Atualmente, trata-se de um grupo com definição morfológica incerta e ainda, estudos moleculares recentes demonstraram que *R. sanguineus sensu lato* (s. l.) consiste, na verdade, em um complexo de espécies (aproximadamente 17). Porém, esse ainda é assunto que encontra-se em discussão pelos taxonomistas (DANTAS-TORRES; OTRANTO, 2015).

Os carrapatos *R. sanguineus* s. l. tem como hospedeiro preferencial o cão doméstico e por isso são conhecidos popularmente como “carrapato marrom do cão”, mas podem parasitar também outros animais de estimação e até mesmo seres humanos (DANTAS-TORRES; FIGUEREDO; BRANDÃO-FILHO, 2006; GRAY et al., 2013).

Esse ectoparasita é considerado de grande importância médico-veterinária, não só pelo fato de espoliar seus hospedeiros, mas também por ser considerado vetor de bactérias, vírus e protozoários, sendo as principais doenças relacionadas a esses carrapatos (em cães) a Erliquiose (*Ehrlichia canis*), Babesiose (*Babesia canis*) e Hemobartonelose (*Haemobartonella canis*), e ainda, há suspeitas de serem vetores em humanos de *Rickettsia conorii* na Europa e da *R. rickettsii* no México (DANTAS-TORRES, 2008, 2010). Dessa forma, esses ectoparasitas representam grande preocupação pelos prejuízos causados não só aos animais de estimação, mas também a saúde pública.

3. Glândulas Salivares

Tanto o processo espoliativo quanto a transmissão de agentes patogênicos ocorrem devido à ação imunossupressora da saliva, secretada pelas glândulas salivares, órgãos complexos e essenciais para o sucesso biológico destes ectoparasitas. Elas se localizam dorsolateralmente e aos pares na porção anterior do corpo do carrapato e são formadas por uma porção secretora (ácinos) e uma excretora (sistema de dutos) (CAMARGO-MATHIAS, 2013; FURQUIM; BECHARA; CAMARGO-MATHIAS, 2010).

Nas fêmeas de *R. sanguineus* s. l. a porção secretora é composta por três tipos de ácinos: I, II e III, sendo o primeiro agranular (envolvido no processo de osmorregulação)

e os dois últimos granulares, responsáveis pela síntese e secreção dos componentes bioativos da saliva (CAMARGO-MATHIAS, 2013).

O ácino I é agranular e pode ser encontrado em todas as fases do desenvolvimento dos carrapatos *R. sanguineus* s. l. Morfologicamente, apresenta ligação direta com o duto principal da glândula salivar. As células desse ácino apresentam sua região basal com extenso labirinto membranoso, que além de aumentar a superfície de contato com a hemolinfa, abriga grande quantidade de mitocôndrias, importantes organelas que participam do transporte ativo nos processos do equilíbrio de balanço hídrico durante o processo de alimentação (carrapato-sangue do hospedeiro) e também no jejum (carrapato-ambiente). Além disso, acredita-se que esse ácino contribua na produção do cemento (substância que auxilia na fixação do carrapato ao hospedeiro durante a alimentação) (SONENSHINE; ROE, 2014).

Assim, as glândulas salivares têm papel importante na manutenção do balanço hídrico eliminando o excesso de íons durante a ingestão de sangue, evitando o desencadeamento de um estresse osmótico para o carrapato. Ademais, durante o período de jejum do carrapato, essas glândulas também produzem uma secreção hiperosmótica para que esse obtenha água através de gotículas de vapor do ar, garantindo sua sobrevivência durante o período de privação hídrica (GRAY et al., 2013; YODER et al., 2006).

Os ácinos II (granulares), segundo Furquim et al. (2011), em fêmeas de *R. sanguineus* s. l., são constituídos por oito tipos celulares (**a**, **b**, **c1-c6**), e os ácinos III (granulares), por três tipos (**d**, **e** e **f**), sendo as células **a**, **d** e **e** as responsáveis pela síntese de secreção de natureza lipoproteica, enquanto as **b**, **c1-c6**, **d** e **f**, pela síntese de componentes de natureza glicoproteica (CAMARGO-MATHIAS; FURQUIM; NUNES, 2011).

Nos machos de carrapatos em geral, assim como naqueles da espécie *R. sanguineus* s. l. existe ainda o ácino IV, constituído apenas por células **g** (BINNINGTON, 1978; FURQUIM; BECHARA; CAMARGO-MATHIAS, 2010). Acredita-se que este ácino esteja relacionado com a lubrificação e transferência do espermatóforo para a fêmea durante a cópula, sugerindo função restrita na reprodução (SONENSHINE; ROE, 2014).

E finalmente, para que todo o produto sintetizado pela glândula possa chegar ao seu destino final (cavidade oral) existe a porção excretora que é formada por um sistema de dutos ramificados e interligados, com diâmetros variados. Os dutos acinares são aqueles de menor calibre e que tem a função de coletar a secreção do ácino e liberá-la nos dutos intermediários ou secundários (de diâmetro maior que os acinares) que se conectam ao duto excretor comum (maior diâmetro) que, por sua vez, leva a secreção até a cavidade oral do carrapato (CAMARGO-MATHIAS; FURQUIM; NUNES, 2011).

4. Saliva

A saliva nos carrapatos é uma mistura complexa e com funções também complexas que incluem a capacidade de modular os processos hemostático, inflamatório e imunológico do hospedeiro: I) aumentando o fluxo sanguíneo na região da fixação no hospedeiro, por meio da secreção de agentes vasodilatadores; II) inoculando anticoagulantes que mantêm o sangue do hospedeiro fluido; III) inibindo o processo inflamatório no hospedeiro agindo como imunossupressor, possibilitando a fixação do ectoparasita e dificultando a rejeição do mesmo pelo hospedeiro (BOWMAN; DILLWITH; SAUER, 1996). A modulação dos sistemas imune-inflamatório e hemostático dos hospedeiros, não só garante o sucesso biológico desses indivíduos, possibilitando seu longo período de alimentação, mas também facilita o papel de vetor de patógenos, permitindo a transmissão de microrganismos que encontram menos obstáculos

à sua penetração e instalação no hospedeiro (FRANCISCHETTI et al., 2009; NUTTALL; LABUDA, 2004).

Em razão de toda essa complexidade estrutural e funcional, a saliva e as glândulas salivares destes organismos vem sendo alvo de estudos em diferentes linhas de pesquisa, buscando principalmente identificar e isolar os bioativos com ação vasodilatadora, anti-inflamatória, analgésica e imunomodulatória (OLIVEIRA et al., 2010). Os bioativos já descritos na saliva dos carrapatos são de natureza glico e/ou lipoproteica (BINNINGTON, 1978; WHEELER; COLEMAN; BENACH, 1991) e estão representados pelas fosfatases ácidas, esterases, aminopeptidases, metaloproteases, prostaglandinas, lipocalinas e calreticulinas (BINNINGTON, 1978; MULENGA; BLANDON; KHUMTHONG, 2007; OLIVEIRA et al., 2011) e outras com propriedades ainda desconhecidas.

Além da sua complexa composição, a saliva apresenta variações quantitativa e qualitativa quando são considerados os diferentes períodos do ciclo glandular e as diferentes espécies de carrapatos (CAMARGO-MATHIAS, 2013; XIANG et al., 2009). No caso da espécie *R. sanguineus* s. l. 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; NUNES, 2011).

O ciclo de secreção da glândula salivar de *R. sanguineus* s. l. e seu processo degenerativo foi bem caracterizado por Furquim et al. (2010). Segundo os autores, os ácinos do tipo I não sofrem alterações morfológicas no decorrer da alimentação e adquirem características degenerativas somente após o término do ingurgitamento. Os indivíduos em jejum possuem as glândulas salivares com as células **a**, **c1**, **c3**, **d** e **e** ativas, já aqueles com dois dias de alimentação têm as células **b**, **c2**, **c4**, **c5**, **c6** e **f** ativas, os com 4 dias tem as, as células **a**, **b**, **c1-c4** e **c6** ativas, porém, as **c5** e **f** encontram-se em período

de inatividade e, finalmente os indivíduos com 7 dias de alimentação têm inativação das células **c6**, sendo que nesse último período começa-se observar processos de degradação das glândulas salivares.

Os mesmos autores demonstraram que as alterações degenerativas das glândulas salivares foram observadas com mais intensidade nas fêmeas do que nos machos e apresentavam características de mais de um tipo de morte celular (apoptose e morte autofágica), caracterizando assim uma apoptose atípica (FURQUIM et al., 2014; FURQUIM; BECHARA; CAMARGO-MATHIAS, 2008; FURQUIM; BECHARA; CAMARGO-MATHIAS, 2010). Segundo Sonenshine et al. (2014), acredita-se que a degeneração e perda de função da glândula salivar após o ingurgitamento ocorre devido a interferência do “fator de macho” ou “fator de ingurgitamento”, transferido para a fêmea durante a cópula concomitante ao seu período de alimentação, que induz a degeneração das glândulas salivares e estimula o desenvolvimento do ovário para que ocorra o processo de oviposição (WEISS; KAUFMAN, 2004).

Ainda, segundo Furquim et al. (2014), o comportamento secretor das glândulas salivares das fêmeas de *R. sanguineus* s. l. durante o período de alimentação se modificaria de acordo com a resistência do hospedeiro (no caso deste estar imunizado, ou seja, já ter sido anteriormente exposto à saliva do carrapato por uma ou mais vezes). Foi observado pelos autores uma significativa modificação na produção de componentes da saliva tais como de: proteínas, lipídios, polissacarídeos, fosfatase acida e cálcio, demonstrando a variação da complexidade bioquímica da saliva produzida por esses carrapatos diante da alteração imunológica do hospedeiro. Isso ocorreria devido ao sistema imune do hospedeiro e os componentes da saliva dos carrapatos terem coevoluído, resultando numa interação que poderia ser comparada a uma “corrida

armamentista” entre os mecanismos de defesa de um e do poder de invasão do outro (KOTÁL et al., 2015).

Em relação a ação anti-hemostática da saliva, algumas proteínas anticoagulantes importantes já foram identificadas como: a TAP (*tick anticoagulant peptide*) e a Moubatin isoladas da saliva de *Ornithodoros moubata* (FRANCISCHETTI; MATHER; RIBEIRO, 2005; WAXMAN; CONNOLLY, 1993); a Americanin encontrada no *Amblyomma americanum* (ZHU et al., 1997); a Variabilin purificada das glândulas salivares de *Dermacentor variabilis* (WANG et al., 1996); Boophilin e Microphilin da saliva de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (CIPRANDI et al., 2006; MACEDO-RIBEIRO et al., 2008); e apirases descritas em *Ixodes scapularis*, *O. moubata* (RIBEIRO et al., 1985) e *Ornithodoros savignyi* (MANS et al., 2002); todas com capacidade de inibir a agregação plaquetária e, portanto, com perspectiva de serem utilizadas no tratamento de doenças como a trombose, por exemplo.

Quanto a ação anti-inflamatória da saliva dos carrapatos, atribui-se principalmente a alta concentração de prostaglandinas presente na secreção salivar (SAUER; ESSENBERG; BOWMAN, 2000). Inibição da agregação plaquetária, vasodilatação e supressão da produção de interleucinas, como a IL-2, e o interferon IFN- γ , são atribuídas a elas (SA-NUNES et al., 2007).

Apesar do potencial já conhecido sobre a ação anti-hemostática, anticoagulante e anti-inflamatória da saliva dos carrapatos, novos estudos vêm sendo desenvolvidos buscando esclarecer as diversas facetas que envolvem o arsenal farmacológico da saliva dos carrapatos e os resultados tem demonstrado que esses ectoparasitas podem ser ótimos aliados em terapias alternativas de diversas doenças, como por exemplo neoplasias (ABREU et al., 2014; CHUDZINSKI-TAVASSI et al., 2010; SIMONS et al., 2011). Segundo a literatura, a saliva de diferentes espécies de carrapatos teria ainda a capacidade

de inibir a proliferação de células endoteliais apresentando ações anti-angiogênica (FRANCISCHETTI et al., 2009) e anti-tumoral (ABREU, 2014; KAZIMÍROVÁ; ŠTIBRÁNIOVÁ, 2013; SIMONS et al., 2011).

No que se refere a ação imunossupressora da secreção salivar, diversos estudos visando o melhor entendimento dos complexos mecanismos fisiológicos e bioquímicos envolvidos na relação hospedeiro-carrapato mostraram que a saliva bruta de diversas espécies de carrapatos possuiria o potencial de: afetar a proliferação de linfócitos T (KOPECKY; KUTHEJLOVA; PECHOVA, 1999; SCHOELER; WIKEL, 2001); inibir a função dos neutrófilos, incluindo sua atividade oxidativa e fagocitária (RIBEIRO; WEIS; TELFORD, 1990); diminuir a atividade das células “natural killer” (KUBES et al., 1994); diminuir a atividade oxidativa de macrófagos (KUTHEJLOVA et al., 2001); suprimir a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-2 e IFN- γ) e aumentar a produção de citocinas (IL-4, IL-5 e IL-10) relacionadas com a produção de anticorpos IgE e reações imunes mediadas por eosinófilos e mastócitos contra alérgenos (características da indução de linfócitos do tipo Th2) (BROSSARD; WIKEL, 2004; WIKEL, 1999). No entanto, esses mecanismos parecem distinguir-se de acordo com as diferentes espécies e ainda quando considerado a saliva bruta ou o extrato de glândula salivar (KOTÁL et al., 2015).

5. Imunobiologia dos Extratos de Glândulas Salivares e da Saliva de *Rhipicephalus sanguineus* s. l.

Devido a sua importância médico veterinária e econômica, a maioria dos trabalhos disponíveis na literatura referentes a estudos utilizando extratos de glândulas salivares de *R. sanguineus* s. l. tratam das propriedades imunomodulatórias da saliva ou do desenvolvimento da resposta imune inflamatória do hospedeiro, visando entender melhor a relação imunobiológica estabelecida na interface carrapato-hospedeiro e buscando

novas maneiras de controle desses ectoparasitas, como por exemplo a produção de vacinas.

Segundo Ferreira e Silva (1998;1999), a saliva dessa espécie de carrapato teria efeito na inibição da proliferação de células T, diminuição da produção da citocina IL-2, IL-12 e INF- γ , aumento na produção de citocinas IL-4, IL-10 e TGF- β , inibição da atividade fagocíticas de macrófagos frente a exposição de *Trypanossoma cruzi* e redução das taxas de óxido nítrico.

Recentemente, a prostaglandina E₂ e a adenosina da saliva de *R. sanguineus* s. l. foram identificadas como os compostos responsáveis pela modulação da função de células dendríticas (células apresentadoras de antígenos), inibindo a produção de citocinas IL-12p40 e TNF- α e expressão de CD40, e aumentando a produção de IL-10. Porém, apenas a prostaglandina E₂ demonstrou capacidade de inibir a maturação de células dendríticas (OLIVEIRA et al., 2011).

Além disso, o extrato da glândula salivar de carrapatos *R. sanguineus* s. l. suprimiu a produção de IgG2 e a expressão de DNAm de IL-2, IL-5 e IFN- γ de maneira dose-dependente, e não interferiu na expressão de DNAm de IL-4 (MATSUMOTO et al., 2003).

Ainda, quando comparados organismos capazes de desenvolver resistência a infestações de carrapatos (*guinea pigs*) e aqueles que não a apresentam (cães e camundongos), observou-se que os resistentes diferem dos demais principalmente por apresentar aumento na produção de células T após infestação por carrapatos, e pelo aumento de basófilos e células monucleadas (linfócitos, macrófagos e células NK) no local da fixação do ectoparasita, ao contrário dos organismos não resistentes que apresentam inibição da produção de células T e infiltrados de eosinófilos e neutrófilos no local da ferida (FERREIRA et al., 2003).

No entanto, injeções de extratos de glândulas salivares de *R. sanguineus* s. l. com 2, 4 e 6 dias de alimentação estimularam o aparecimento de sinais de sensibilização em coelhos hospedeiros (diminuindo a infestação por esses ectoparasitas e até reduzindo a reprodutividade dos mesmos), demonstrando uma intensa resposta imune-inflamatória dos hospedeiros, especialmente ao extrato de 4 dias, sugerindo que as moléculas presentes no extrato de glândulas salivares de *R. sanguineus* s. l. possuiriam imunogenicidade distinta de acordo com o período do ciclo glandular e que a reação imune decorrente da presença desse extrato poderia ser mais forte do que a ação imunomoduladora (HEBLING; CMARGO-MATHIAS; FURQUIM, 2011).

Dessa forma, mesmo com o conhecimento da ação imunossupressora da saliva da espécie *R. sanguineus* s. l., ainda há muito a se esclarecer sobre os mecanismos envolvidos na modulação do sistema imune do hospedeiro, como quais seriam os fatores que estariam sendo ativados ou inativados para promover tal resposta imunológica, e ainda, levando-se em conta as diferentes necessidades imunomodulatórias conforme o ciclo glandular, ou seja, no início (2 dias), meio (4 dias) e fim (6 dias) do processo de alimentação, quais seriam as diferentes reações imunológicas entre esses períodos.

6. Macrófagos

Os macrófagos, considerados os maiores leucócitos do sistema imune, são produzidos na medula óssea em formato de monócitos que circulam no sangue e migram para os tecidos onde se diferenciam. São considerados células apresentadoras de antígeno profissionais, podendo ser ativados na presença de diferentes antígenos em contato com seus complexos receptores de membrana, e posteriormente, apresentando-os aos linfócitos T. Os mesmos são responsáveis também pela eliminação e fagocitose de microrganismos invasores, assim como pela secreção de proteínas sinalizadoras

(citocinas) que ativam e recrutam outras células do sistema imune, papel fundamental na indução da inflamação e no sucesso da resposta imune (MURPHY et al., 2010).

As citocinas são proteínas mediadoras do sistema imune, produzidas pelos macrófagos em resposta a presença de microorganismos e de outros antígenos, e são responsáveis pela regulação dos processos inflamatórios e imunomodulatórios, sendo capazes de estimular a proliferação e diferenciação de linfócitos, ativação de células efetoras, e até mesmo por influenciar na síntese e ação de outras citocinas (ABBAS et al., 2007; MURPHY et al., 2010).

Além das citocinas, os macrófagos ativados produzem intermediários reativos de nitrogênio como o óxido nítrico (NO), através da ação da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS), ativada por sua vez pela presença de produtos microbianos, como por exemplo o lipopolissacarídeo (LPS) extraído da parede celular de bactérias Gram-negativas (MACRI et al., 2009). O óxido nítrico liberado tem importante papel na destruição e eliminação de microorganismos patogênicos e é um ótimo indicador da intensidade de ativação de macrófagos (ABBAS et al. 2007).

As células da linhagem J774 são macrófagos de ratos originalmente isoladas de sarcoma histiocístico e descritas primeiramente por Ralph e Nakoinz (1977). Essa linhagem celular consiste basicamente em macrófagos aderentes e de migração lenta com a capacidade de fagocitose e liberação de mediadores do sistema imune, tais como as citocinas e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, como o óxido nítrico, por exemplo (RALPH; NAKOINZ, 1977). Devido essa geração de indicadores de resposta imunológica semelhantes as células de origem dessa linhagem (como produção e modulação de citocinas, indução da síntese de óxido nítrico, regulação de prostaglandinas, resposta pró-inflamatória e interação e infecção de microorganismos), a mesma tem sido frequentemente utilizada como modelo efetivo em estudos *in vitro* relacionados a

imunorregulação e atividade anti-inflamatória de macrófagos (D' ACQUISTO et al., 1997; JUSTO et al., 2015; MAROTTA; SAUTEBIN; ROSA, 1992).

OBJETIVOS

Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo analisar *in vitro* a ação dos extratos de glândulas salivares extraídas de fêmeas de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* s. l. alimentadas por 2 e 4 dias em coelhas hospedeiras do Grupo Genético de Botucatu, sobre células da linhagem J774 e das linhagens primárias de macrófagos (obtidas de lavado peritoneal de camundongos BALB/c) verificando a ocorrência de possíveis alterações morfofisiológicas nestas células quando expostas aos extratos.

Objetivos específicos:

1. Quantificar a produção de óxido nítrico pelas células da linhagem J774 e da linhagem primária de macrófagos quando expostas aos extratos glandulares de 2 e 4 dias, por meio de ensaio colorimétrico quantitativo.
2. Dosar as citocinas (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, IFN- γ e TNF) liberadas pelas linhagens celulares após exposição aos extratos glandulares de 2 e 4 dias, utilizando-se do método CBA (Cytometric Bead Array) de citometria de fluxo.
3. Demonstrar quais foram as alterações morfofisiológicas ocorridas nessas células após a exposição aos extratos de 2 e 4 dias, fazendo para tanto uso de técnicas histológicas de microscopia de luz e eletrônica de varredura.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Obtenção e Manutenção dos Carrapatos

Para a realização deste trabalho foram utilizadas fêmeas adultas de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* s. l. alimentadas em coelhas hospedeiras do Grupo Genético de Botucatu, obtidas do Biotério Central de Botucatu, UNESP, *campus* Botucatu. Os carrapatos (fêmeas e machos) adultos em jejum foram obtidos de colônia desta mesma espécie mantidas 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.

1.1 Obtenção das Larvas de *R. sanguineus* s. l.

As fêmeas de *R. sanguineus* s. l. depois de completamente ingurgitadas foram mantidas em tubos plásticos (com tampa com pequenos orifícios para oxigenação), para oviporem, (15 dias a partir do completo ingurgitamento das mesmas). Os ovos foram recolhidos e depositados no interior de um inoculador (descrição a seguir) para facilitar a deposição das larvas recém-eclodidas nas coelhas hospedeiras.

1.2 Confecção do Inoculador

Os inoculadores foram confeccionados a partir de seringas de 3 mL que tiveram 2 cm de suas extremidades removidas e vedadas com algodão, além da remoção do êmbolo. A massa de ovos foi então depositada no interior da mesma e a abertura do êmbolo também foi vedada com algodão levemente umedecido para reencaixe do mesmo. Deste modo, a eclosão das larvas ocorreu no interior do inoculador que foi posteriormente

acondicionado em estufa BOD (29°C, 80% de umidade e fotoperíodo de 12 horas), até a eclosão das larvas (período médio de 15 dias).

1.3 Obtenção das Ninfas de *R. sanguineus* s. l.

As larvas que eclodiram no interior do inoculador foram retiradas deste e realocadas (1 inoculador/hospedeira) no interior das câmaras alimentadoras fixadas no dorso das coelhas hospedeiras virgens de infestação.

1.4 Confeção da Câmara Alimentadora (BECHARA et al., 1995)

Para a confecção da câmara alimentadora foram utilizados: a) um círculo de borracha fina de 9 cm de diâmetro e com uma das faces revestida com tecido de algodão para não lesar a pele da coelha hospedeira; b) deste primeiro círculo foi retirado um círculo central de 3,5 cm de diâmetro; e c) um tubo plástico tipo coletor universal teve 2 cm da parte inferior removida e sua região contendo a rosca para encaixe da tampa ficou voltada para cima, permitindo que após fixação na coelha hospedeira a câmara pudesse ser aberta e fechada de acordo com a necessidade do experimento. Ressalte-se que na tampa foram realizados pequenos orifícios para oxigenação dos carrapatos.

1.5 Fixação da Câmara Alimentadora nas Coelhas Hospedeiras (BECHARA et al., 1995)

As coelhas hospedeiras tiveram a região dorsal tosada para facilitar a fixação da câmara alimentadora. Nessa região foi espalhada uma camada de cola não tóxica, à base de gelatina incolor, assim como na região da câmara alimentadora revestida por tecido. Em seguida, procedeu-se a fixação da câmara (envolta por uma camada de esparadrapo)

na coelha. A câmara permaneceu 24 horas destampada para secagem da cola, e só após esse período foram depositadas as larvas dos carrapatos. Após a alocação das larvas, foram realizadas observações subsequentes a cada seis horas. O completo ingurgitamento das larvas ocorreu no prazo de sete dias. Após as mesmas foram coletadas e armazenadas nos inoculadores que foram mantidos em estufa BOD, para a ecdise das ninfas.

1.6 Obtenção das Fêmeas Adultas de *R. sanguineus* s. l.

As ninfas alocadas em inoculadores na BOD sofreram ecdise para o estágio adulto após 15 dias. Os adultos em jejum foram então separados em tubos plásticos (com tampa com pequenos orifícios para oxigenação) contendo 25 casais (25 fêmeas e 25 machos para possibilitar a realização da cópula) que 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).

1.7 Infestações

As infestações com os indivíduos adultos foram realizadas no interior da câmara alimentadora fixada na região dorsal tosada das coelhas hospedeiras (25 casais/hospedeira), para posterior aquisição de fêmeas com 2 e 4 dias de alimentação. Estas foram na sequência anestesiadas e tiveram suas glândulas salivares retiradas para produção dos extratos **EG2** e **EG4** (extrato glandular de fêmeas com 2 e 4 dias de alimentação, respectivamente).

2. Produção dos Extrato das Glândulas Salivares (EG2 e EG4)

2.1 Obtenção das Glândulas Salivares

Após 2 e 4 dias de alimentação (período este garantido através de observações subsequentes dos carrapatos fixados), as fêmeas dos carrapatos foram retiradas das hospedeiras pela região do hipostômio com auxílio de pinça cirúrgica e por meio de movimentos circulares.

Em seguida, nas dependências do Laboratório de Histologia do Departamento de Biologia da UNESP Rio Claro (SP) as fêmeas foram colocadas em placas de Petri contendo solução salina (7,5 g de NaCl, 2,38 g de Na₂HPO₄, 2,72 g de KH₂PO₄ e 1000 mL de água destilada) para dissecação, e retirada das glândulas salivares, que depois foram colocadas em tubos eppendorfs contendo 200 µL de tampão fosfato pH 7.4 (separadas pelo tempo de alimentação) e mantidas em gelo. Posteriormente, foram lavadas 2 vezes no mesmo tampão, e armazenadas em biofreezer -80°C até o momento da preparação do extrato.

2.2 Preparação dos Extratos EG2 e EG4

Para a preparação dos extratos, os eppendorfs contendo as glândulas salivares separadas por períodos de alimentação (2 e 4 dias) foram descongelados e centrifugados por 10 minutos a 2500 rpm para retirada do excesso de tampão fosfato pH 7.4, em seguida, as glândulas foram delicadamente maceradas com auxílio de bastão de vidro. Na sequência, os tubos foram novamente centrifugados por 5 minutos a 2500 rpm, os sobrenadantes recolhidos em fluxo laminar estéril, filtrados em unidades filtrantes descartável (JBR610303, Millex GV, membrana durapore PVDF, Millipore®, MilliUni), de 0.22 µm e diâmetro de 13 mm, acopladas à seringas hipodérmicas e depositados em eppendorfs estéreis encaminhados para a dosagem de proteínas, segundo metodologia descrita por Sedmark and Grossberg (1977) (método de Bradford).

Após a determinação do conteúdo proteico, no interior do fluxo laminar estéril, os extratos foram diluídos em tampão fosfato pH 7.4 autoclavado para se obter as concentrações pré-determinadas para realização dos bioensaios (4, 2, 1, 0,5 e 0,1 µg/mL). Os extratos glandulares **EG2** e **EG4** foram então aliquotados (1000 µL) e armazenados em eppendorfs estéreis em freezer -80°C até o momento de sua utilização.

3. Bioensaios *in vitro*

As linhagens de células J774 e de macrófagos peritoneais foram gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Patricia Ucelli Simioni do Laboratório de Inflamação e Imunologia Celular (LIIC) do Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes da UNICAMP, Campinas, SP, a qual também é colaboradora deste trabalho.

3.1 Cultura de Células

Nas dependências do Biotério do Laboratório de Inflamação e Imunologia Celular (LIIC) do Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes da UNICAMP, Campinas, SP, foram mantidos camundongos BALB/c em condições estéreis e com água e ração *ad libitum* (com cerca de 8 semanas de idade), dos quais foram obtidos os macrófagos colhidos do lavado peritoneal, após 5 dias da injeção de 2 mL de tioglicolato de sódio 3%. As células foram transferidas em gelo, para um tubo Falcon que foi centrifugado a 1500 rpm durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi recolhido e o sedimento ressuspensionado em meio RPMI 1640 Sigma® (R6504) contendo HEPES (ácido etanosulfônico 4,2 hidroxietil piperazina) (2,97 g/L), bicarbonato de sódio (2 g/L), 2-Mercaptoetanol (2 µL/L) e suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). Em seguida, uma alíquota foi retirada para contagem de células em câmara de Neubauer com

azul de tripan (1:2). Após a contagem, a suspensão foi ajustada a 1×10^6 células/mL em meio RPMI (10% de SFB).

Já as células J774 foram cultivadas até semiconfluência em garrafas de cultura mantidas em incubador (5% de CO₂ e 37°C) também em meio RPMI 1640 Sigma® (R6504) contendo HEPES (2,97 g/L), bicarbonato de sódio (2 g/L), 2-Mercaptoetanol (2 µL/L) e suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). Em seguida, elas foram colhidas da garrafa com o auxílio de *cell scraper*, lavadas com meio RPMI e centrifugadas em tubo Falcon a 1500 rpm durante 10 minutos a 4°C. O sedimento foi ressuspensionado em meio RPMI novamente e a procedeu-se contagem das células em câmara de Neubauer com azul de tripan (1:2) para o ajuste de 1×10^6 células/mL.

Tanto os macrófagos peritoneais quanto as células J774 foram semeadas a uma densidade de 2×10^5 células/poço em placas de 96 poços sendo divididos nos seguintes grupos:

Grupo 1 (macrófagos peritoneais expostos a **EG2** por 24 horas),

Grupo 2 (macrófagos peritoneais expostos a **EG4** por 24 horas),

Grupo 3 (J774 exposta a **EG2** por 24 horas),

Grupo 4 (J774 exposta a **EG4** por 24 horas),

Grupo 5 (J774 exposta a **EG2** por 48 horas) e

Grupo 6 (J774 exposta a **EG4** por 48 horas).

Todas as placas foram cultivadas durante 24 horas em incubador (5% de CO₂ e 37°C) e as células não aderentes foram removidas por lavagem com meio RPMI.

3.2 Adição dos Estímulos

Após 24 horas de cultivo das células nas placas, foram adicionados a cada poço 10 µL do composto lipopolissacarídeo (LPS) (10 µL de LPS 25000 ng + 12,40 mL de

meio RPMI) como estímulo inflamatório, e em seguida adicionados 10 µL/poço do extrato (**EG2** ou **EG4**) nas diferentes concentrações (4, 2, 1, 0,5 e 0,1 µg/mL) de acordo com as respectivas placas. As placas foram incubadas nas mesmas condições de cultura durante 24 horas (**Placas 1- 4**) ou durante 48 horas (**Placas 5-6**).

Como controle positivo, nos poços contendo apenas as células em cultura, foram adicionados mais 20 µL de meio e para o controle negativo, foram utilizados poços apenas com meio de cultura RPMI.

Todos os bioensaios foram realizados em triplicatas.

3.3 Teste de Viabilidade Celular (MTT)

Após o período de incubação (24 ou 48 horas) as placas foram submetidas ao teste de viabilidade celular utilizando-se 10 µL de MTT na concentração 5 mg/mL (dissolvido em solução salina tamponada com fosfato, pH 7.4) que foram adicionados a cada poço. As placas foram incubadas por mais 4 horas em incubador (5% de CO₂ e 37°C), e em seguida foram adicionados 200 µL de álcool isopropílico contendo 0,04 N de HCL para dissolver os cristais. As placas foram levadas ao leitor de microplacas Multiskan MS (Labsystems Oy, Helsink, Finlândia) e a leitura foi realizada a 570 nm.

Este ensaio foi realizado em triplicatas.

3.4 Avaliação da Produção de Óxido Nítrico (NO)

A dosagem de óxido nítrico (NO) liberado nos sobrenadantes das células J774 e dos macrófagos peritoneais, foi realizada através de ensaio colorimétrico quantitativo descrito por Griess e Bemerkungen (1879).

Primeiramente, realizou-se a curva padrão de nitrito de 320 à 0 $\mu\text{M/L}$ (diluições realizadas a partir da solução estoque de 320.000 $\mu\text{M/L}$ com meio de cultura RPMI com 10% de SFB) a qual foi utilizada como base para a quantificação das amostras.

Os sobrenadantes recolhidos (50 μL) das culturas de macrófagos peritoneais e das células J774 após a exposição destas às diferentes concentrações dos extratos **EG2** e **EG4** ou somente ao meio, no caso dos grupos controle (só células e só meio), foram transferidos para placas de cultura de 96 poços e em seguida, adicionados 50 μL do reagente de Griess/poço (1% de sulfanilamida, 0,1% de N- (1-naphthylethylenediamine) dihydrochloride e 2,5% de ácido fosfórico). Após 10 minutos em temperatura ambiente, foi realizada a leitura da placa no leitor Multiskan MS (Labsystems Oy, Helsinki, Finland) à 570 nm.

Este bioensaio também foi realizado em triplicata.

3.5 Dosagem de Citocinas

A dosagem de citocinas foi realizada a partir da coleta dos sobrenadantes (50 μL) das culturas das células J774 (**Grupos 3-6**) após exposição às diferentes concentrações dos extratos **EG2** e **EG4**. Os grupos controle (só células e só meio) foram expostos somente ao meio de cultura.

Os sobrenadantes recolhidos foram submetidos ao ensaio CBA (Cytometric Bead Array) utilizando-se kits comerciais (BD- Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit; BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA) seguindo recomendações do fabricante, para a determinação de citocinas: IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, IFN- γ e TNF.

Inicialmente, realizou-se a curva de calibração, onde os *beads* da curva padrão foram transferidos para um tubo Falcon de 15 mL e reconstituídos com 2mL de tampão

diluyente fornecido pelo kit (top standard), após 15 minutos de repouso em temperatura ambiente, ocorreu a diluição seriada dos tubos da curva padrão (1:2; 1:4; 1:8; 1:16; 1:32; 1:64; 1:128; 1:256) misturando 150 µL de tampão diluyente + 150 µL do tubo anterior, e no caso do tubo “branco”, foram adicionados apenas 300 µL de tampão diluyente, totalizando 10 tubos da curva.

As *beads* de captura fornecidas pelo kit foram ressuspensas e acopladas num único tubo Falcon gerando um mix de *beads* de captura. Em seguida, foram adicionados 25 µL do mix de *beads* aos tubos da curva padrão e a cada tubo contendo 50 µL de amostra. Posteriormente foram adicionados também 25 µL do reagente de detecção *Mouse Th1/Th2/Th17 PE* do kit a cada tubo. Procedeu-se a incubação de todos os tubos por 3 horas em temperatura ambiente e protegidos da luz.

Após a incubação, foram adicionados 1 mL de *wash buffer* a cada tubo, que foram centrifugados a 200 g por 5 minutos. Os sobrenadantes foram descartados e o pellet ressuspensado em 300 µL de *wash buffer*. Imediatamente os tubos foram analisados em citômetro de fluxo BD FACSCalibur™ (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA) e os resultados foram gerados pelo software BD CBA Analysis Software.

A análise dos dados foi realizada no Laboratório de Inflamação e Imunologia Celular (LIIC) do Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes da UNICAMP, Campinas, SP, sob a supervisão da Profa. Dra. Patricia Ucelli Simioni.

O limite de detecção de cada citocina está representado na **Tabela 1**.

Tabela 1: Limites de detecção das citocinas do Kit BD Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine

Citocinas	Limite de detecção (pg/mL)
IL-2	0,1
IL-4	0,03
IL-6	1,4
IFN- γ	0,5
TNF	0,9
IL-17A	0,8
Il-10	16,8

3.6 Análise Estatística

A análise dos dados e confecção de gráficos foram realizados no software Graphpad Prism 5.0, utilizado o teste de variância “ANOVA”, sendo os valores de $p < 0,05$ considerados significativos.

4. Análise Morfológica

As células J774 e os macrófagos peritoneais foram semeados na densidade de 2×10^5 células/poço (500 μ L) sobre lamínulas de vidro estéreis em placas de 24 poços e cultivadas durante 24 horas em meio RPMI suplementado com 10% de SFB em incubador (5% de CO_2 e 37°C). Posteriormente, foram adicionados 50 μ L de LPS em cada poço + 50 μ L das diferentes concentrações dos extratos **EG2** e **EG4** (4, 2, 1, 0,5, 0,1 $\mu\text{g/mL}$), sendo que os poços controles (só células e só células com LPS) receberam apenas 100 μ L de meio RPMI e 50 μ L de LPS + 50 μ L de meio RPMI, respectivamente, e então foram

incubadas nas mesmas condições de cultura durante 24 horas (placa com macrófagos peritoneais e J774 - 24h) ou 48 horas (J774 - 48h). Após a incubação, as células foram preparadas para a análise morfológica sob microscopia de luz e eletrônica de varredura, ambas realizadas no Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, UNESP, *campus* de Rio Claro, São Paulo.

4.1 Microscopia de Luz

Após incubação, o sobrenadante das células foi descartado e foram adicionados à cada placa de cultivo 500 µL/poço de fixador paraformaldeído 4% e as placas foram mantidas em geladeira *over night*. Após a fixação das células, o fixador foi retirado e sucedeu-se a lavagem dos poços com tampão fosfato pH 7,4 estéril (300 µL/poço). Em seguida, iniciou-se o processo de desidratação em série crescente de etanol 70, 80, 90, 95 e 100% com banhos de 5 minutos.

Para a coloração das células foram adicionados 300 µL/poços de hematoxilina de Harris durante 1 minuto, retirado o excesso do corante e lavado com água da torneira durante 5 minutos e com água destilada durante 30 segundos. Posteriormente, foram adicionados 300 µL/poço de eosina aquosa por 1 minuto e retirado, lavando com água destilada por mais 30 segundos.

Após secagem, as lamínulas de vidro contendo as células coradas foram retiradas das placas de 24 poços, banhadas em xilol, montadas em lâminas previamente limpas contendo Entellan® (Merck Millipore) e armazenadas em estufa até completa secagem. As lâminas foram fotodocumentadas em fotomicroscópio de luz de campo claro LEICA DM750.

4.2 Microscopia Eletrônica de Varredura

Após a incubação, foi retirado o sobrenadante das células, adicionados 500 µL/poço de fixador glutaraldeído 2,5% e as placas foram mantidas em geladeira *overnight*. Após esta etapa, o fixador foi retirado e foram adicionados 300 µL/poço de tampão fosfato pH 7,4 estéril e as placas foram deixadas em geladeira por mais 24 horas. Em seguida, iniciou-se o processo de desidratação em série crescente de acetona 50, 75, 90, 95 e 100% (duas vezes) com banhos de 5 minutos.

Posteriormente as lamínulas foram levadas a ponto crítico para completar a desidratação. Em seguida, o material foi colado com auxílio de fita adesiva dupla face em suportes de alumínio (*stubs*), e metalizado com ouro. As lamínulas foram examinadas e fotodocumentadas em microscópio eletrônico de varredura PHILIPS SEM 505.

RESULTADOS

Os resultados obtidos no presente trabalho serão aqui apresentados sob a forma de dois capítulos, sendo cada um composto por artigo científico que será submetido em periódico internacional e especializado.

CAPÍTULO 1

Título: “Análise morfofisiológica e imunológica da ação de extratos de glândulas salivares de fêmeas de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae) sobre macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c *in vitro*”

Autores: Marina Rodrigues de Abreu, Melissa Carolina Pereira, Patrícia Ucelli Simioni, Elen Fernanda Nodari, Lisiery Negrini Paiatto, Maria Izabel Camargo-Mathias

Status: Encaminhado para tradução

CAPÍTULO 2

Título: “Avaliação *in vitro* dos efeitos imunomoduladores e morfofisiológicos dos extratos de glândulas salivares de fêmeas de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae) sobre as células da linhagem J774”

Autores: Marina Rodrigues de Abreu, Melissa Carolina Pereira, Patrícia Ucelli Simioni, Elen Fernanda Nodari, Lisiery Negrini Paiatto, Maria Izabel Camargo-Mathias

Status: Encaminhado para tradução

CAPÍTULO 1

Título: “Análise morfofisiológica e imunológica da ação de extratos de glândulas salivares de fêmeas de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae) sobre macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c *in vitro*”

Marina Rodrigues de Abreu¹, Melissa Carolina Pereira¹, Patrícia Ucelli Simioni², Elen Fernanda Nodari¹, Lisiery Negrini Paiatto¹, Maria Izabel Camargo-Mathias^{1*}

¹Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista

“Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Avenida 24 A, 1515, 13506-900 - Rio Claro, SP, Brasil.

²Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes, Instituto de Biologia, Universidade

Estadual de Campinas, UNICAMP, Rua Monteiro Lobato, 255, CP 6109, 13083-970 – Campinas, SP, Brasil.

*Autor correspondente: micm@rc.unesp.br

INTRODUÇÃO

Os carrapatos pertencem ao Filo Arthropoda, Classe Arachnida, Subclasse Acari, Ordem Parasiformes, Subordem Ixodida (BARKER; MURRELL, 2004) e são ectoparasitas obrigatórios e de hábito hematófago que parasitam grande diversidade de hospedeiros vertebrados durante seu ciclo biológico (ANDERSON; MAGNARELLI, 2008).

A espécie *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (s. l.) é conhecida popularmente como “carrapato marrom do cão”, por ter o cão doméstico como seu hospedeiro preferencial, mas pode parasitar também outros vertebrados e até mesmo seres humanos (DANTAS-TORRES; FIGUEREDO; BRANDÃO-FILHO, 2006; GRAY et al., 2013). Esse ectoparasita é considerado de grande importância médico-veterinária não só por espoliar seus hospedeiros, mas também por ser vetor de bactérias, vírus e protozoários, sendo as principais doenças relacionadas a essa espécie (em cães) a Erliquiose (*Ehrlichia canis*), Babesiose (*Babesia canis*) e Hemobartonelose (*Haemobartonella canis*), e ainda, há suspeitas de serem vetores em humanos de *Rickettsia conorii* na Europa e da *R. rickettsii* no México (DANTAS-TORRES, 2008, 2010).

Tanto o processo espoliativo quanto a transmissão de agentes patogênicos ocorrem devido à ação imunossupressora da saliva, secretada pelas glândulas salivares, órgãos complexos e essenciais para o sucesso biológico destes animais. Elas se localizam dorsolateralmente e aos pares na porção anterior do corpo do carrapato e são formadas por uma porção secretora (ácinos) e uma excretora (sistema de dutos) (CAMARGO-MATHIAS, 2013; FURQUIM; BECHARA; CAMARGO-MATHIAS, 2010).

A saliva nos carrapatos produzida pelas glândulas salivares é uma mistura complexa e com múltiplas funções, dentre elas, a capacidade de modular os processos hemostático, inflamatório e imunológico do hospedeiro (BOWMAN; DILLWITH;

SAUER, 1996), modulação esta que além de garantir o sucesso biológico desses indivíduos (possibilitando seu longo período de alimentação), também facilita o papel de vetor de patógenos, permitindo a transmissão de microrganismos que encontram menores dificuldades para sua entrada (FRANCISCHETTI et al., 2009; NUTTALL; LABUDA, 2004). Além da sua complexa composição, a saliva apresenta variações quantitativas e qualitativas quando considerados os diferentes períodos do ciclo glandular e as diferentes espécies de carrapatos (CAMARGO-MATHIAS, 2013; XIANG et al., 2009). No caso da espécie *R. sanguineus* s. l. 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; NUNES, 2011).

No que se refere a ação imunossupressora, a secreção salivar de diversas espécies de carrapatos possuem o potencial de: afetar a proliferação de linfócitos T (KOPECKY; KUTHEJLOVA; PECHOVA, 1999; SCHOELER; WIKEL, 2001); inibir a função dos neutrófilos, incluindo sua atividade oxidativa e fagocitária (RIBEIRO; WEIS; TELFORD, 1990); diminuir a atividade das células “natural killer” (KUBES et al., 1994); diminuir a atividade oxidativa de macrófagos (KUTHEJLOVA et al., 2001); suprimir a produção de citocinas próinflamatórias (IL-2 e IFN- γ) e aumentar a produção de citocinas (IL-4, IL-5 e IL-10) relacionadas a reações imunes mediadas contra alérgenos (BROSSARD; WIKEL, 2004; WIKEL, 1999). No entanto, esses mecanismos parecem distinguir-se de acordo com as diferentes espécies e ainda quando considerados a saliva bruta ou o extrato de glândula salivar (KOTÁL et al., 2015).

Segundo a literatura, os efeitos imunobiológicos da saliva de *R. sanguineus* s. l. especificamente, estariam associados as prostaglandinas E_2 e a adenosina presentes na secreção salivar e identificadas como os compostos responsáveis pela modulação da função de células dendríticas, inibindo a produção de citocinas IL-12p40 e TNF- α e

expressão de CD40, e aumentando a produção de IL-10 (OLIVEIRA et al., 2011). Além disso, a saliva dessa espécie demonstrou potencial na inibição da proliferação de células T, diminuição da produção da citocina IL-2, IL-12 e INF- γ , aumento na produção de citocinas IL-4, e TGF- β , inibição da atividade fagocíticas de macrófagos frente a exposição de *Trypanosoma cruzi* e redução das taxas de NO (FERREIRA; SILVA, 1999).

Os macrófagos são células apresentadoras de antígeno, responsáveis também pela eliminação e fagocitose de microrganismos invasores, assim como pela secreção de proteínas sinalizadoras (citocinas) que ativam e recrutam outras células do sistema imune, papel fundamental na indução da inflamação e no sucesso da resposta imune (MURPHY et al., 2010). Além das citocinas, os macrófagos ativados produzem reativos intermediários de nitrogênio como o óxido nítrico (NO), através da ação da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS), ativada por sua vez pela presença de produtos microbianos, como por exemplo o lipopolissacarídeo (LPS) extraído da parede celular de bactérias Gram-negativas (MACRI et al., 2009). O óxido nítrico liberado tem importante papel na destruição e eliminação de microorganismos patogênicos e é um ótimo indicador da intensidade de ativação de macrófagos (ABBAS et al. 2007).

Dessa forma, mesmo com o conhecimento da ação imunossupressora da saliva da espécie *R. sanguineus* s. l., ainda há muito a se esclarecer sobre os mecanismos envolvidos na modulação do sistema imune do hospedeiro, como quais seriam os fatores que estariam sendo ativados ou inativados para promover tal resposta imunológica, e ainda, levando-se em conta as diferentes necessidades imunomodulatórias conforme o ciclo glandular, ou seja, no início (2 dias), meio (4 dias) e fim (6 dias) do processo de alimentação, saber quais seriam as diferentes reações imunológicas entre esses períodos.

Diante disso, o presente trabalho teve por objetivo analisar *in vitro* a ação imunomoduladora dos extratos de glândulas salivares extraídas de fêmeas de carrapatos *R. sanguineus* s. l. alimentadas por 2 (**EG2**) e 4 dias (**EG4**) em coelhas hospedeiras, sobre linhagens primárias de macrófagos (obtidas de lavado peritoneal de camundongos BALB/c) verificando ainda a ocorrência de possíveis alterações morfofisiológicas nestas células quando expostas as diferentes concentrações dos extratos.

MATERIAL E MÉTODOS

A) Manutenção dos Carrapatos *R. sanguineus* s. l.

Para a realização deste trabalho foram utilizadas 200 fêmeas adultas de *R. sanguineus* s. l. alimentadas em coelhas hospedeiras do Grupo Genético de Botucatu, obtidas do Biotério Central de Botucatu (UNESP, *campus* Botucatu) naives. Para obtenção das fêmeas ingurgitadas, foram colocados casais (machos e fêmeas), uma vez que a fêmea só completa seu ingurgitamento depois da cópula. Os carrapatos adultos em jejum foram obtidos de colônia desta mesma espécie mantidas 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 - *campus* Rio Claro, SP.

As infestações nas coelhas hospedeiras foram realizadas no interior de câmara alimentadora fixada na região dorsal tosada das mesmas (25 casais/hospedeira), para posterior aquisição de fêmeas com 2 e 4 dias de alimentação (período este garantido através de observações subsequentes dos carrapatos fixados). As fêmeas foram na sequência anestesiadas por choque térmico e tiveram suas glândulas salivares retiradas para a produção dos extratos **EG2** e **EG4**. Tanto os procedimentos de infestação quanto os de fixação das câmaras alimentadoras foram realizados segundo o protocolo descrito por Bechara et al. (1995) e sob a aprovação do Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA, Instituto de Biociências, UNESP – *campus* Rio Claro) nº 04/2016.

B) Produção dos Extrato das Glândulas Salivares (EG2 e EG4)

Após o período de alimentação (2 ou 4 dias), as fêmeas foram retiradas das hospedeiras pela região do hipostômio com auxílio de pinça cirúrgica e por meio de movimentos circulares. Em seguida, nas dependências do Laboratório de Histologia do Departamento de Biologia da UNESP Rio Claro (SP) foram colocadas em placas de Petri contendo solução salina (7,5 g de NaCl, 2,38 g de Na₂HPO₄, 2,72 g de KH₂PO₄ e 1000 mL de água destilada) para dissecação, bem como para retirada das glândulas salivares, que depois foram colocadas em tubos eppendorfs contendo 200 µL de tampão fosfato pH 7.4 (separadas pelo tempo de alimentação) e mantidas em gelo.

Posteriormente, as glândulas foram lavadas 2 vezes no mesmo tampão fosfato pH 7.4, centrifugadas por 10 minutos a 2500 rpm para retirada do excesso de tampão, em seguida, as mesmas foram delicadamente maceradas com auxílio de bastão de vidro. Na sequência, os tubos foram novamente centrifugados por 5 minutos a 2500 rpm, os sobrenadantes recolhidos em fluxo laminar estéril, filtrados em unidades filtrantes descartável (JBR610303, Millex GV, membrana durapore PVDF, Millipore®, MilliUni), de 0.22 µm e diâmetro de 13 mm, acopladas à seringas hipodérmicas e depositados em eppendorfs estéreis encaminhados para a dosagem de proteínas, segundo metodologia descrita por Sedmark and Grossberg (1977) (método de Bradford).

Após a determinação do conteúdo proteico, no interior do fluxo laminar estéril, os extratos foram diluídos em tampão fosfato pH 7.4 autoclavado para se obter as concentrações pré-determinadas para realização dos bioensaios (4, 2, 1, 0,5 e 0,1 µg/mL). Os extratos glandulares **EG2** e **EG4** foram então aliquotados (1000 µL) e armazenados em eppendorfs estéreis em freezer -80°C até o momento de sua utilização.

C) Obtenção e Cultura de Macrófagos Peritoneais de Camundongos BALB/c

Nas dependências do Biotério do Laboratório de Inflamação e Imunologia Celular (LIIC) do Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes da UNICAMP, Campinas, SP, foram mantidos camundongos BALB/c em condições estéreis e com água e ração *ad libitum* (com cerca de 8 semanas de idade), dos quais foram obtidos os macrófagos colhidos via intraperitoneal, após 5 dias da injeção de 2 mL de tioglicolato de sódio 3%. As células foram transferidas em gelo, para um tubo Falcon que foi centrifugado a 1500 rpm durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi recolhido e o sedimento ressuspendido em meio RPMI 1640 Sigma® (R6504) contendo HEPES (2,97 g/L), bicarbonato de sódio (2 g/L), 2-Mercaptoetanol (2 µL/L) e suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). Em seguida, uma alíquota foi retirada para contagem de células em câmara de Neubauer com azul de tripan (1:2). Após a contagem, a suspensão foi ajustada a 1×10^6 células/mL em meio RPMI (10% de SFB).

Os macrófagos peritoneais foram então semeados a uma densidade de 2×10^5 células/poço em placas de 96 poços sendo: **Estímulo 1** (macrófagos peritoneais expostos ao **EG2**) e **Estímulo 2** (macrófagos peritoneais expostos ao **EG4**). Ambas as placas foram cultivadas durante 24 horas em estufa incubadora de CO₂ (5% de CO₂ e 37°C) e as células não aderentes foram removidas por lavagem com meio RPMI.

Posteriormente, em cada placa foram adicionados 10 µL/poço do composto lipopolissacarídeo (LPS) (10 µL de LPS 25000 ng + 12,40 mL de meio RPMI) como estímulo inflamatório, e em seguida adicionados 10 µL/poço das diferentes concentrações (4, 2, 1, 0,5 e 0,1 µg/mL) do extrato **EG2 (Placa 1)** ou **EG4 (Placa 2)**. Os grupos controle foram divididos em: **Grupo Controle Negativo** (composto por células expostas apenas

ao meio RPMI) e **Grupo Controle** (células submetidas ao LPS). As placas foram incubadas nas mesmas condições de cultura durante 24 horas.

D) Teste de Viabilidade Celular (MTT)

Após o período de incubação de 24 horas as placas foram submetidas à avaliação de viabilidade celular utilizando-se 10 µL de MTT na concentração 5 mg/mL (dissolvido em solução salina tamponada com fosfato, pH 7.4) que foram adicionados a cada poço. As placas foram incubadas por mais 4 horas em incubador (5% de CO₂ e 37°C), e em seguida foram adicionados 200 µL de álcool isopropílico contendo 0,04 N de HCL para dissolver os cristais. As placas foram levadas ao leitor de microplacas Multiskan MS (Labsystems Oy, Helsink, Finlândia) e a leitura foi realizada a 570 nm. Este ensaio foi realizado em triplicatas.

E) Avaliação da Produção de Óxido Nítrico (NO)

A dosagem de óxido nítrico (NO) liberado nos sobrenadantes dos macrófagos peritoneais foi realizada através de ensaio colorimétrico quantitativo descrito por Griess e Bemerkungen (1879).

Primeiramente, realizou-se a curva padrão de nitrito de 320 à 0 µM/L (diluições realizadas a partir da solução estoque de 320.000 µM/L com meio de cultura RPMI com 10% de SFB) a qual foi utilizada como base para a quantificação das amostras.

Os sobrenadantes recolhidos (50µL) das culturas de macrófagos peritoneais após a exposição às diferentes concentrações dos extratos **EG2** e **EG4**, foram transferidos para placas de cultura de 96 poços e em seguida, adicionados 50 µL do reagente de Griess/poço (1% de sulfanilamida, 0,1% de N- (1-naphthylethylenediamine) dihydrochloride e 2,5% de ácido fosfórico). Após 10 minutos em temperatura ambiente, foi realizada a leitura da

placa no leitor Multiskan MS (Labsystems Oy, Helsinki, Finland) à 570 nm. Este bioensaio também foi realizado em triplicata.

F) Análise Estatística

A análise estatística dos dados e confecção de gráficos foram realizados no software Graphpad Prism 5.0, utilizado o teste de variância “ANOVA” seguido do teste de Turkey, sendo os valores de $p < 0,05$ considerados significativos.

G) Análise Morfofisiológica

Os macrófagos peritoneais foram semeados na densidade de 2×10^5 células/poço (500 μ L) sobre lamínulas de vidro estéreis em placas de 24 poços e cultivadas durante 24 horas em meio RPMI suplementado com 10% de SFB em incubador (5% de CO_2 e 37°C). Posteriormente, foram adicionados 50 μ L de LPS em cada poço + 50 μ L das diferentes concentrações dos extratos **EG2** e **EG4** (4, 2, 1, 0,5, 0,1 $\mu\text{g/mL}$), sendo que os poços controles (só células e só células com LPS) receberam apenas 100 μ L de meio RPMI e 50 μ L de LPS + 50 μ L de meio RPMI, respectivamente, e então foram incubadas nas mesmas condições de cultura durante 24 horas. Após a incubação, as células foram preparadas para a análise morfológica sob microscopia de luz e eletrônica de varredura, ambas realizadas no Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, UNESP, *campus* de Rio Claro, São Paulo.

- Microscopia de Luz

Após incubação, o sobrenadante das células foi descartado e foram adicionados à cada placa de cultivo 500 μ L/poço de fixador paraformaldeído 4% e as placas foram mantidas em geladeira *over night*. Após a fixação das células, o fixador foi retirado e

sucedeu-se a lavagem dos poços com tampão fosfato pH 7,4 estéril (300 µL/poço). Em seguida, iniciou-se o processo de desidratação em série crescente de etanol 70, 80, 90, 95 e 100% com banhos de 5 minutos.

Para a coloração das células foram adicionados 300 µL/poços de hematoxilina de Harris durante 1 minuto, retirado o excesso do corante e lavado com água da torneira durante 5 minutos e com água destilada durante 30 segundos. Posteriormente, foram adicionados 300 µL/poço de eosina aquosa por 1 minuto e retirado, lavando com água destilada por mais 30 segundos.

Após secagem, as lamínulas de vidro contendo as células coradas foram retiradas das placas de 24 poços, banhadas em xilol, montadas em lâminas previamente limpas contendo Entellan® (Merck Millipore) e armazenadas em estufa até completa secagem. As lâminas foram fotodocumentadas em fotomicroscópio de luz de campo claro LEICA DM750.

- Microscopia Eletrônica de Varredura

Após a incubação, foi retirado o sobrenadante das células, adicionados 500 µL/poço de fixador glutaraldeído 2,5% e as placas foram mantidas em geladeira *overnight*. Após esta etapa, o fixador foi retirado e foram adicionados 300 µL/poço de tampão fosfato pH 7,4 estéril e as placas foram deixadas em geladeira por mais 24 horas. Em seguida, iniciou-se o processo de desidratação em série crescente de acetona 50, 75, 90, 95 e 100% (duas vezes) com banhos de 5 minutos.

Posteriormente as lamínulas foram levadas a ponto crítico para completar a desidratação. Em seguida, o material foi colado com auxílio de fita adesiva dupla face em suportes de alumínio (*stubs*), e metalizado com ouro. As lamínulas foram examinadas e fotodocumentadas em microscópio eletrônico de varredura PHILIPS SEM 505.

RESULTADOS

1. Análise de Viabilidade Celular (MTT)

O teste de viabilidade celular foi realizado sobre os macrófagos peritoneais expostos ao **EG2** e ao **EG4** por 24 horas com o intuito de se verificar a atividade citotóxica dos extratos nas diferentes concentrações (4, 2, 1, 0,5, 0,1 µg/mL) sobre essas células (**Gráficos 1 e 3**). Foi considerado 100% de viabilidade celular os valores de MTT daquelas células não expostas a nenhum estímulo (**Grupo Controle Negativo**).

A análise estatística dos resultados demonstrou que no **EG2** nenhuma concentração foi significativamente citotóxica quando comparada ao Grupo Controle (células expostas ao LPS). No entanto, foi observada maior taxa de morte celular nos grupos celulares submetidos as concentrações 4 e 2 µg/mL (78,80% e 79,95% de células viáveis, respectivamente) quando comparados ao Grupo Controle (82,47 % de células viáveis) (**Gráfico 1**). Enquanto as menores concentrações conservaram mais células viáveis em comparação ao mesmo controle (1 µg/mL= 84,85%; 0,5 µg/mL= 83,50% e 0,1 µg/mL= 84,00% de células viáveis) (**Gráfico 1**).

O extrato **EG4** também não revelou valor significativo de aumento na taxa de morte celular nas diferentes concentrações quando comparado ao Grupo Controle (células expostas ao LPS) (**Gráfico 3**). Porém, as células submetidas a concentração de 4 µg/mL e 0,1 µg/mL apresentaram menor porcentagem de células viáveis (80,27% e 79,62%, respectivamente) quando comparadas ao Grupo Controle (82,80%), e ainda aquelas expostas as concentrações 2, 1 e 0,5 µg/mL mostraram, por sua vez, maior porcentagem de células viáveis em comparação ao controle (86,50%, 96,20% e 83,95, respectivamente) (**Gráfico 3**).

Apesar das variações observadas entre as concentrações, os resultados estatísticos de viabilidade celular sugeriram que ambos os extratos (**EG2** e **EG4**) não possuem ação citotóxica em macrófagos peritoneais nessas concentrações.

As médias dos dados de viabilidade celular encontram-se representadas na **Tabela 1**.

2. Avaliação da Produção de Óxido Nítrico (NO)

A dosagem de produção de NO pelas células expostas ao extrato **EG2** nas diferentes concentrações indicou que as maiores concentrações (4 e 2 µg/mL) e a menor concentração (0,1 µg/mL) do extrato estimularam o aumento na produção de NO (16,94 µM de nitrito, 17,16 µM e 16,53 µM de nitrito, respectivamente) tanto em relação ao Grupo Controle (células expostas ao LPS) que apresentou produção de 14,71 µM de nitrito, quanto ao Grupo Controle Negativo (só células) que registrou nível de 11,68 µM de nitrito. Porém, esses valores só foram significativos em relação ao Grupo Controle Negativo (**Gráfico 2**). As células expostas as concentrações 1 e 0,5 µg/mL apresentaram valores de NO, semelhantes ao Grupo Controle (14,33 e 14,41 µM de nitrito, respectivamente) (**Gráfico 2**).

A análise estatística referente ao **EG4** indicou que as maiores concentrações do extrato (4 e 2 µg/mL) estimulou a produção de maiores taxas de NO quando comparadas ao Grupo Controle (células com LPS) e as demais concentrações, sendo que o grupo exposto a 2 µg/mL registrou 19,02 µM de nitrito, aumento significativo comparado ao Grupo Controle que apresentou 14,6 µM de nitrito (**Gráfico 4**). As células expostas as menores concentrações, ou seja, 1, 0,5 e 0,1 µg/mL mostraram produção de NO menor do que a do Grupo Controle (13,63 µM; 13,15 µM e 13,07 µM de nitrito, respectivamente) (**Gráfico 4**).

Os resultados sugeriram que ambos os extratos (**EG2** e **EG4**) possuem atividade inflamatória nessas maiores concentrações (4 e 2 µg/mL).

As médias dos dados de produção de NO encontram-se representadas na **Tabela 2**.

3. Análise morfofisiológica

Grupo Controle Negativo (só células)

O Grupo Controle Negativo composto por células não expostas aos extratos, quando coradas com hematoxilina de Harris e eosina aquosa (HE) e observadas em microscópio de luz, demonstrou características morfofisiológicas semelhantes às aquelas descritas por Junqueira et al. (2013) para macrófagos, tais como: a) núcleo geralmente ovóide e excêntrico (**Fig. 1 e 2 A1-2**); b) presença de dois ou três nucléolos bem definidos (**Fig. 1 A1 e 2 A1-2**); c) citoplasma moderadamente basofílico (**Fig. 1 e 2 A1-2**); d) pouca granulação citoplasmática (**Fig. 1 e 2 A1-2**) e e) pequenos prolongamentos citoplasmáticos (**Fig. 1 e 2 A1-2**). Além dessas características já descritas, foi possível observar nesse grupo polimorfismo celular, com presença de células de diferentes tamanhos e de diferentes formas (**Fig. 1 e 2 A1-2**).

A análise morfológica sob microscopia eletrônica de varredura (MEV) confirmou os resultados obtidos sob microscopia de luz, ou seja, foram identificadas células com citoplasma disperso (**Fig. 1 A3 e 2 A3-4**) e com a presença de pequenos prolongamentos citoplasmáticos (**Fig. 1 A4 e 2 A3**).

Grupo Controle (células + LPS)

O Grupo Controle de células expostas ao estímulo inflamatório LPS quando coradas com HE e observadas sob microscopia de luz apresentou morfofisiologia

semelhante àquela do Grupo Controle Negativo (só células), porém, com algumas características intensificadas, como por exemplo: a) citoplasma mais basofílico e disperso (**Fig. 1 e 2 B1-2**); b) aumento da granulação citoplasmática (**Fig. 1 e 2 B1-2**); c) maiores prolongamentos citoplasmáticos (**Fig. 1 e 2 B1-2**); d) núcleos com formas variadas e hipercromáticos (**Fig. 1 e 2 B1-2**); e) nucléolos dificilmente identificados (**Fig. 1 e 2 B1-2**).

Sob microscopia eletrônica de varredura foram observados numerosos prolongamentos citoplasmáticos (**Fig. 1 e 2 B3-4**), e ainda, presença de grânulos superficiais em algumas células (**Fig. 1 B3-4**).

3.1 Macrófagos peritoneais expostos ao EG2

Grupo exposto a 4 µg/mL de EG2

As células expostas à concentração de 4 µg/mL do **EG2**, submetidas a coloração pela HE e observadas sob microscopia de luz, foram semelhantes ao grupo anterior, apresentando: citoplasma fortemente basofílico e disperso, com abundantes prolongamentos citoplasmáticos, porém menos granulocítico (**Fig. 1 C1-2**). Os núcleos estavam localizados na periferia da célula, com forma de meia lua e, em algumas células, mostraram-se hipercromáticos e até mesmo pouco definidos e fragmentados, sugerindo ocorrência de processo de morte celular (**Fig. 1 C1-2**).

A morfologia analisada sob MEV corroborou os resultados da microscopia de luz, mostrando abundantes prolongamentos citoplasmáticos e presença de algumas células alongadas (**Fig. 1 C3-4**).

Grupo exposto a 2 µg/mL de EG2

Esse grupo também apresentou células com características semelhantes às do Grupo Controle (expostas ao LPS) quando observadas sob microscopia de luz e coradas pela HE, como presença de citoplasma disperso, porém, mais eosinofílico e com de granulações citoplasmáticas (**Fig. 1 D1-2**). Os núcleos exibiram formas irregulares, alguns hipercromatínicos, e outros ainda com indícios de morte, como fragmentação ou desorganização (**Fig. 1 D1-2**). Além disso, nessa concentração observou-se mais células multinucleadas do que nos grupos anteriores, assim como presença de abundantes prolongamentos citoplasmáticos (**Fig. 1 D1-2**). A MEV confirmou a presença dos prolongamentos citoplasmáticos e também evidenciou células alongadas e com granulações superficiais (**Fig. 1 D3-4**).

Grupo exposto a 1 µg/mL de EG2,

Os resultados desse grupo exposto a concentração de 1 µg/mL do extrato **EG2** mostraram sob microscopia de luz (coloração HE) citoplasma muito disperso, sendo dificilmente identificado o limite celular, além de ampla granulação citoplasmática (**Fig. 1 E1-2**). Os núcleos apresentaram-se irregulares, variando entre hipertróficos, fusiformes e até mesmo hipercromatínicos (**Fig. 1 E1-2**). Já na avaliação morfológica sob MEV foram observadas mais células alongadas (**Fig. 1 E3**) e presença de granulações superficiais, embora em menor intensidade que no grupo anterior (**Fig. 1 E3-4**).

Grupo exposto a 0,5 µg/mL de EG2

As células desse grupo exibiram morfofisiologia semelhante a do grupo anterior, quando observadas sob microscopia de luz e com coloração pela HE, porém, estas revelaram citoplasma menos disperso, menor granulação e prolongamentos citoplasmáticos (**Fig. 1 F1-2**). Ademais, houve nesse grupo maior incidência de células

multinucleadas, ocorrendo em algumas células hipertrofia nuclear (**Fig. 1 F1-2**). Nesse grupo, a MEV revelou menor presença de prolongamentos citoplasmáticos quando comparados aos demais grupos, além de presença de células mais alongadas (**Fig. 1 F3-4**)

Grupo exposto a 0,1 µg/mL de EG2

Sob microscopia de luz (coloração HE) o grupo exposto a menor concentração do extrato **EG2** revelou presença de um citoplasma fortemente corado pela eosina, com prolongamentos citoplasmáticos bem definidos (**Fig. 1 G1-2**). As células multinucleadas com núcleos hipertróficos mostraram-se mais frequentes nesse grupo do que no anterior (**Fig. 1 G2**), além disso os nucléolos (2 ou 3) foram facilmente visualizados (**Fig. 1 G1**).

Assim como no grupo anterior, a MEV das células expostas a concentração de 0,1 µg/mL do **EG2** demonstrou menor presença de prolongamentos citoplasmáticos (**Fig. 1 G3**) e algumas células alongadas (**Fig. 1 G4**).

3.2 Macrófagos peritoneais expostos ao EG4

Grupo exposto a 4 µg/mL de EG4

As células expostas à concentração de 4 µg/mL do **EG4** e observadas sob microscopia de luz, coradas pela HE, apresentaram citoplasma basofílico, disperso, granulocítico e com prolongamentos abundantes, além de células alongadas (**Fig. 2 C1-2**). Os núcleos estavam irregulares e observou-se também algumas células multinucleadas (**Fig. 2 C2**). Foi possível visualizar também nesse grupo um macrófago fagocitando outra célula, pelo registro de seus restos nucleares sendo englobados, sugerindo assim, processo de morte celular (**Fig. 2 C1**).

Na análise sob MEV, foram observados numerosos prolongamentos citoplasmáticos, assim como presença de células alongadas e outras com grânulos superficiais (**Fig. 2 C3-4**).

Grupo exposto a 2 µg/mL de EG4

O grupo exposto a essa concentração do **EG4** analisado sob microscopia de luz (coloração HE) mostrou maiores agrupamentos celulares (**Fig. 2 D1**), além de células com citoplasma fortemente disperso e com granulação abundante (**Fig. 2 D1-2**). As células apresentaram também núcleos irregulares e hipercromáticos (**Fig. 2 D1-2**). Ademais, a avaliação morfológica sob MEV revelou células alongadas (**Fig. 2 D3**), presença de pequenos prolongamentos citoplasmáticos e granulação superficial (**Fig. 2 D3-4**).

Grupo exposto a 1 µg/mL de EG4

Nos macrófagos expostos a concentração de 1 µg/mL de **EG4**, corados pela HE e observados sob microscopia de luz foi observado citoplasma muito disperso e granulocítico comparado aos grupos anteriores (**Fig. 2 E1-2**). Foram visualizados prolongamentos citoplasmáticos mais abundantes (**Fig. 2 E1-2**), núcleos irregulares (**Fig. 2 E1-2**) e presença de células multinucleadas (**Fig. 2 E1**) e alongadas (**Fig. 2 E2**). A microscopia eletrônica de varredura confirmou esses resultados mostrando os prolongamentos citoplasmáticos e citoplasma disperso (**Fig. 2 E3-4**).

Grupo exposto a 0,5 µg/mL de EG4

Quando submetidos a coloração pela HE e observados sob microscopia de luz esse grupo de células expostas a concentração de 0,5 µg/mL apresentou citoplasma mais disperso e granular quando comparado a todos outros grupos submetidos ao **EG4** (**Fig. 2 F1-2**). Os núcleos permaneceram irregulares e em algumas células hipertróficos, sendo possível a identificação de nucléolos (**Fig. 2 F1-2**). Esse grupo mostrou também maiores quantidades de células multinucleadas e alongadas (**Fig. 2 F1-2**). A microscopia eletrônica de varredura, no entanto, mostrou presença de células com citoplasma disperso e com raros prolongamentos citoplasmáticos (**Fig. 2 F3-4**).

Grupo exposto a 0,1 µg/mL de EG4

As células desse grupo quando analisadas sob microscopia de luz, exibiram citoplasma disperso, menos basofílico, corado fortemente pela eosina e com muitos grânulos citoplasmáticos. Além disso, esse grupo apresentou células com núcleos irregulares e células alongadas (**Fig. 2 G1-2**), estas últimas também visualizadas sob MEV, bem como com poucos prolongamentos citoplasmáticos (**Fig. 2 G3-4**).

Tabela 1- Porcentagem de viabilidade celular de macrófagos peritoneais expostos a EG2 e EG4

Viabilidade celular (%)	4 µg/mL	2 µg/mL	1 µg/mL	0,5 µg/mL	0,1 µg/mL	Controle (células+LPS)
EG2	78,80	79,95	84,85	93,50	84,00	82,47
EG4	80,27	86,50	96,20	83,95	79,62	82,80

Os valores correspondem as médias $\pm$ SEM (*Standard Error of the Mean*) dos dados obtidos pelas quadruplicatas dos testes. **EG2**= Extrato Glandular de 2 dias e **EG4**= Extrato Glandular de 4 dias.

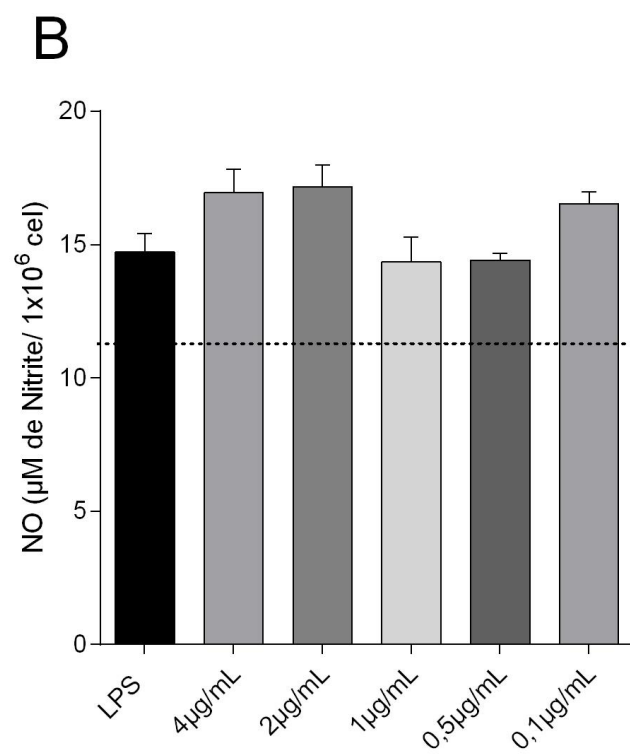
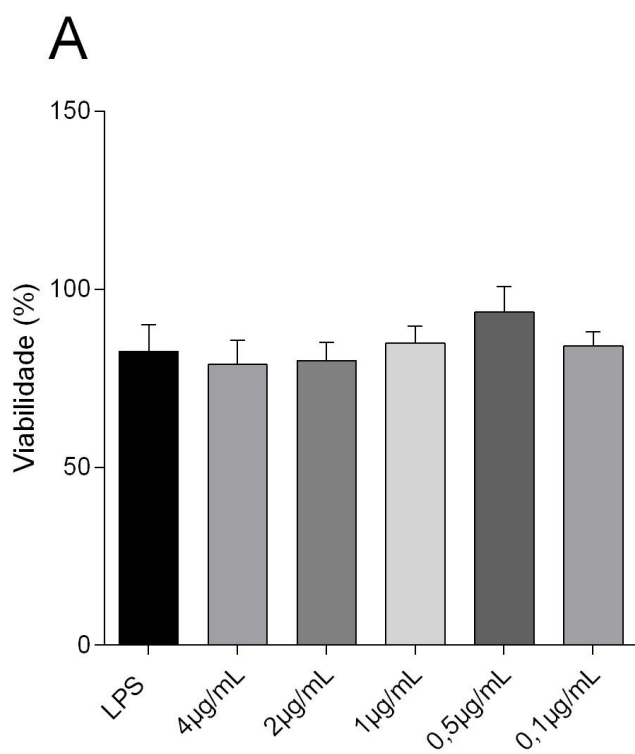
Tabela 2- Produção de óxido nítrico em macrófagos peritoneais expostos a EG2 e EG4

NO (µM de Nitrito/ 1×10^6 células)	4 µg/mL	2 µg/mL	1 µg/mL	0,5 µg/mL	0,1 µg/mL	Controle (células+LPS)	Controle negativo (só células)
EG2	16,94	17,16	14,33	14,41	16,53	14,71	11,68
EG4	15,80	19,02*	13,63	13,15	13,07	14,06	11,21

* Dados estatisticamente significativos ($p < 0,05$) em relação ao Grupo Controle (células+LPS). Os valores correspondem as médias $\pm$ SEM (*Standard Error of the Mean*) dos dados obtidos pelas quadruplicatas dos testes. **EG2**= Extrato Glandular de 2 dias e **EG4**= Extrato Glandular de 4 dias.

Gráficos 1-4: Análise estatística da viabilidade celular e da produção de NO em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c expostos as diferentes concentrações dos extratos de glândulas salivares de 2 dias (**EG2**) e 4 dias (**EG4**). As colunas representam as médias $\pm$ SEM (*Standard Error of the Mean*) dos dados obtidos pelas quadruplicatas dos testes. (*) Indica os dados estatisticamente significativos ($p < 0.05$) em comparação ao Grupo Controle (células + LPS).

EG2



EG4

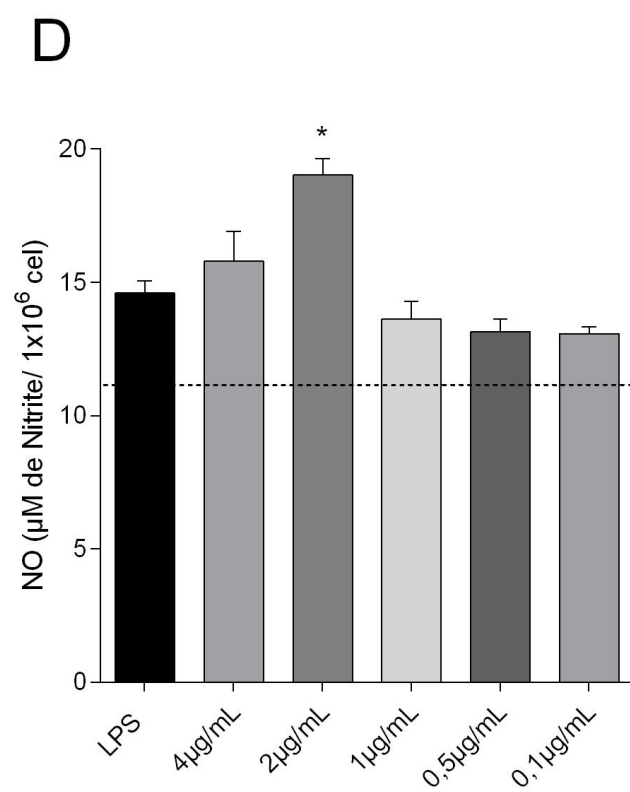
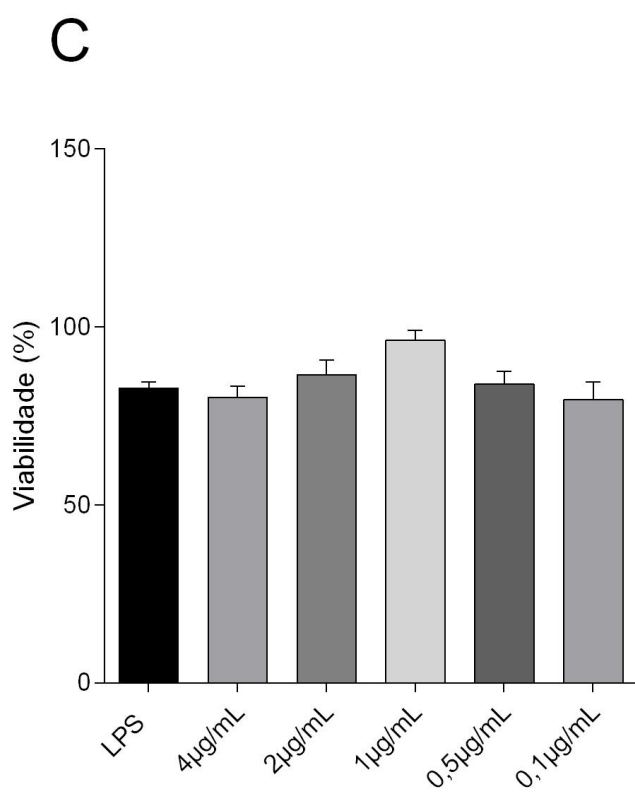


Figura 1: Análise morfofisiológica de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c expostos a diferentes concentrações do extrato de glândula salivar de fêmeas de carrapatos *R. sanguineus* s. l. alimentadas por dois dias (**EG2**), corados pela hematoxilina de Harris e eosina aquosa (HE) e observados sob microscopia de luz de campo claro (**1-2**) e sob microscopia eletrônica de varredura (MEV) (**3-4**). **A1-4:** Grupo Controle Negativo (só células); **B1-4:** Grupo Controle (células+LPS); **C1-4:** Células expostas a concentração de 4 µg/mL do EG2; **D1-4:** Células expostas a concentração de 2 µg/mL do EG2; **E1-4:** Células expostas a concentração de 1 µg/mL do EG2; **F1-4:** Células expostas a concentração de 0,5 µg/mL do EG2; **G1-4:** Células expostas a concentração de 0,1 µg/mL do EG2.

c= citoplasma; **ca**= célula alongada; **cm**= célula multinucleada; **g**= granulações citoplasmáticas; **gs**= granulações superficiais; **n**= núcleo; **nu**= nucléolo; **pc**= prolongamento citoplasmático.

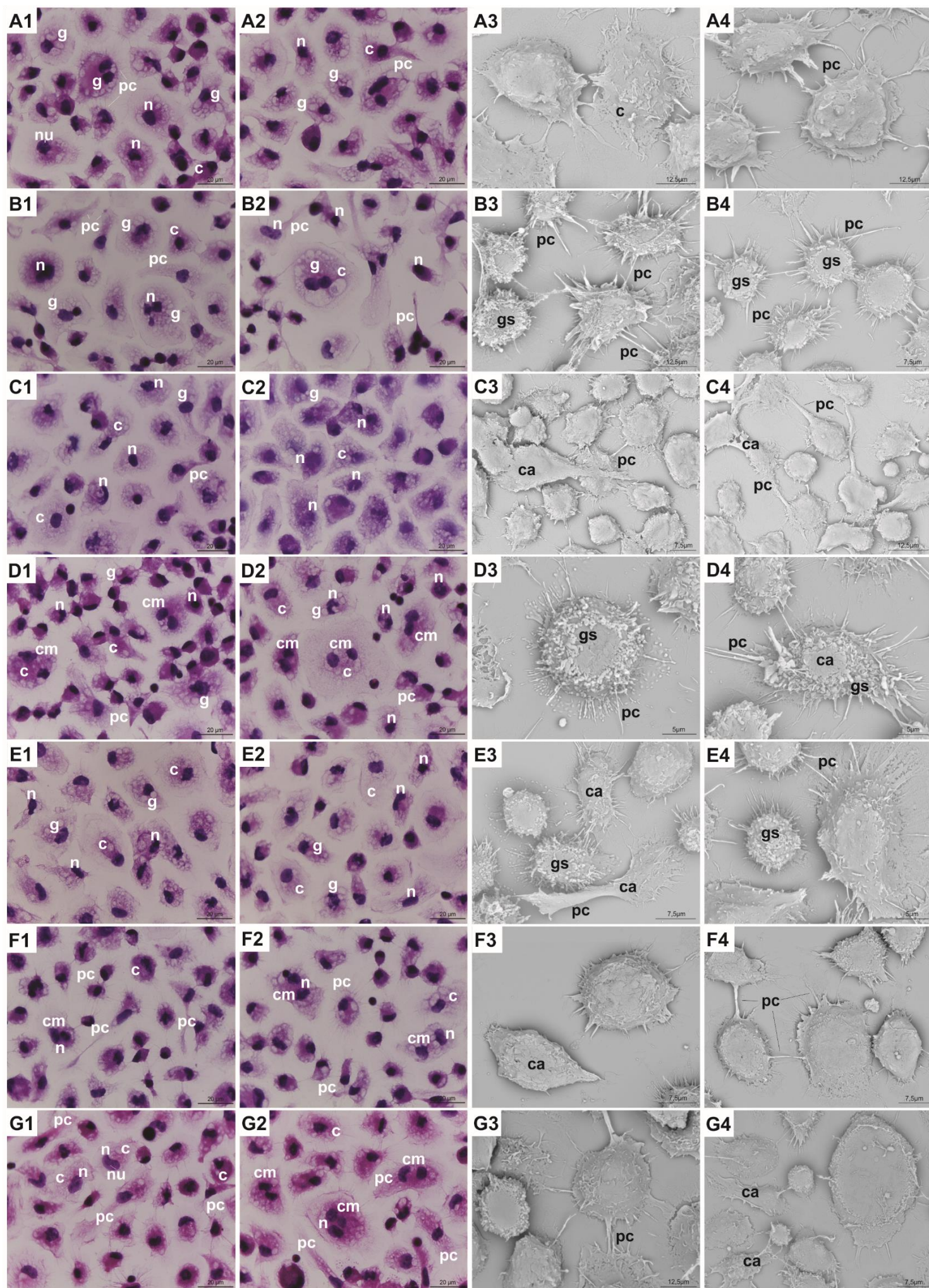
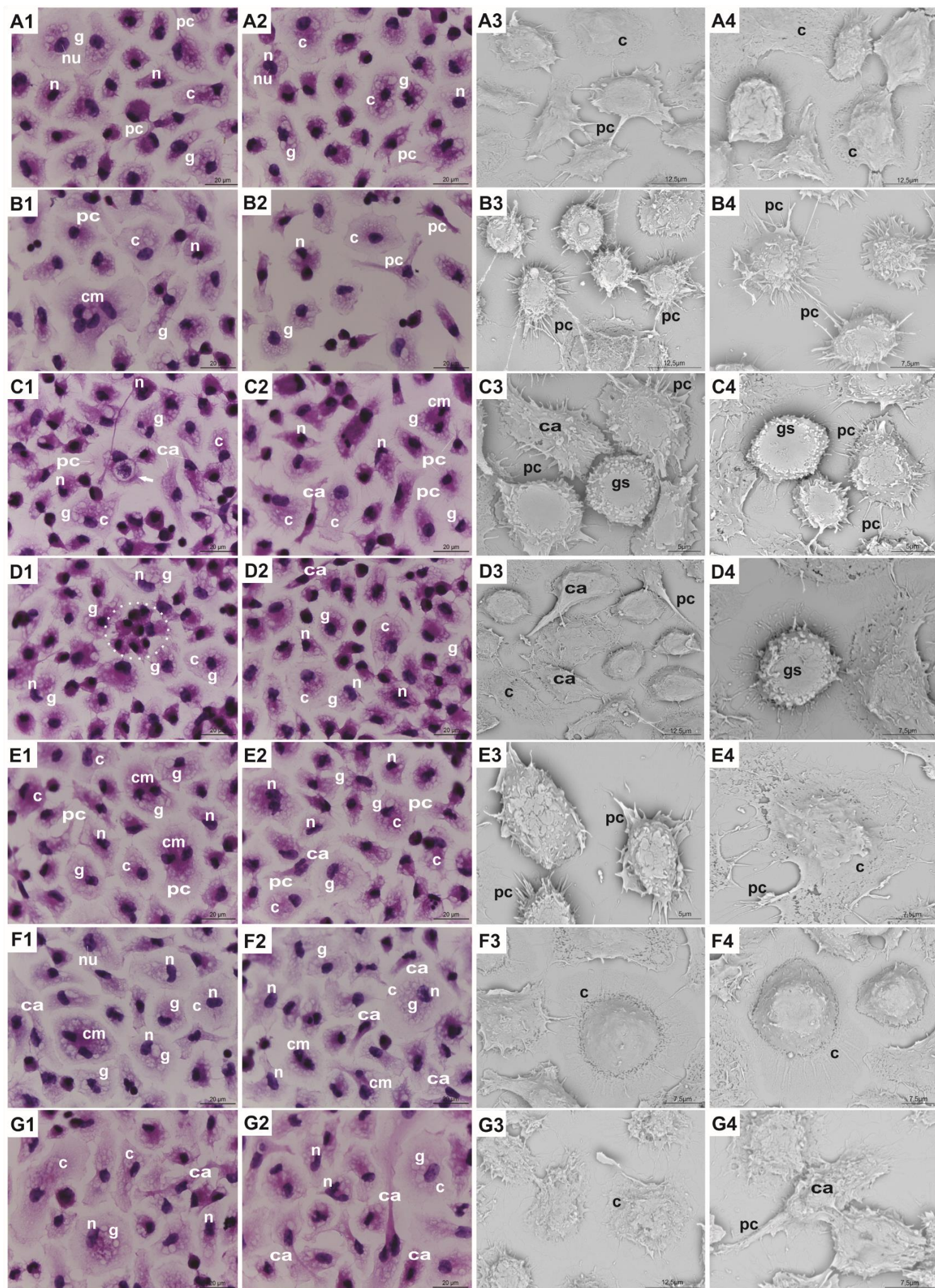


Figura 2: Análise morfofisiológica de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c expostos a diferentes concentrações do extrato de glândula salivar de fêmeas de carrapatos *R. sanguineus* s. l. alimentadas por quatro dias (**EG4**), corados pela hematoxilina de Harris e eosina aquosa (HE) e observados sob microscopia de luz de campo claro (**1-2**) e sob microscopia eletrônica de varredura (MEV) (**3-4**). **A1-4:** Grupo Controle Negativo (só células); **B1-4:** Grupo Controle (células+LPS); **C1-4:** Células expostas a concentração de 4 µg/mL do EG4; **D1-4:** Células expostas a concentração de 2 µg/mL do EG4; **E1-4:** Células expostas a concentração de 1 µg/mL do EG4; **F1-4:** Células expostas a concentração de 0,5 µg/mL do EG4; **G1-4:** Células expostas a concentração de 0,1 µg/mL do EG4.

c= citoplasma; **ca**= célula alongada; **cm**= célula multinucleada; **g**= granulações citoplasmáticas; **gs**= granulações superficiais; **n**= núcleo; **nu**= nucléolo; **pc**= prolongamento citoplasmático; **seta branca**= processo de fagocitose; **círculo fragmentado**= agrupamento celular.



DISCUSSÃO

A saliva dos carrapatos consiste em uma mistura complexa de bioativos representados pelas fosfatases ácidas, esterases, aminopeptidases, metaloproteases, prostaglandinas, lipocalinas e calreticulinas (BINNINGTON, 1978; MULENGA; BLANDON; KHUMTHONG, 2007; OLIVEIRA et al., 2011), com funções igualmente complexas capazes de desencadear ações vasodilatadoras, anti-inflamatórias, analgésicas, imunomodulatórias e outras com propriedades ainda desconhecidas (OLIVEIRA et al., 2010). Esse arsenal de bioativos tem capacidade de modular células de defesa do sistema imune do hospedeiro (como os macrófagos) com o propósito de imunossuprimir a resposta imune, permitindo que o ectoparasita permaneça fixado no hospedeiro e complete seu processo de alimentação.

No entanto, mesmo com o conhecimento da capacidade imunossupressora da saliva de carrapatos *R. sanguineus* s. l., ainda pouco se conhece sobre os mecanismos envolvidos na modulação do sistema imune hospedeiro, como quais fatores seriam ativados ou inativados, assim como quais seriam as alterações morfofisiológicas nas células expostas a essa saliva, levando-se em conta as diferentes composições da mesma durante o ciclo glandular, ou seja, no início (2 dias), meio (4 dias) e fim (6 dias) do processo de alimentação. Dessa forma, o presente trabalho visou elucidar a ação imunomoduladora *in vitro* do extrato de glândula salivar de *R. sanguineus* s. l. com 2 e 4 dias de alimentação em coelhas hospedeiras, sobre linhagens de macrófagos peritoneais retirados de camundongos BALB/c, observando as alterações morfofisiológicas desencadeadas nessas células uma vez expostas a diferentes concentrações dos extratos, por meio de bioensaios de viabilidade celular, dosagem de NO e avaliação morfológica sob microscopia de luz de campo claro (coloração de hematoxilina de Harris e eosina aquosa) e sob microscopia eletrônica de varredura.

Os resultados obtidos no teste de viabilidade celular (MTT), demonstraram que nenhuma das concentrações (4, 2, 1, 0,5 e 0,1 µg/mL) dos extratos (**EG2** e **EG4**) provocaram significativo aumento de porcentagem de morte celular em comparação ao Grupo Controle (células + LPS), o que sugere que os extratos de 2 e 4 dias de glândulas salivares de *R. sanguineus* s. l. nessas concentrações não apresenta atividade citotóxica aos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c. Entretanto, estudos anteriormente realizados com saliva da mesma espécie de carrapatos, em concentrações semelhantes (0,5 e 0,2 µg/mL) aplicadas *in vitro* em células da linhagem DH82 (sarcoma histiocítico) e HL-60 (leucemia promielítica aguda) exibiram potencial em inibir a proliferação celular causando morte apoptótica nessas células (ROCHA, 2014). A mesma capacidade antiproliferativa foi demonstrada em estudo com células da linhagem tumoral de Walker 256 *in vivo* expostas as concentrações de 0,2 e 0,04 µg/µL (ABREU et al., 2014). Desse modo, os resultados aqui obtidos sugeriram que os macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c seriam mais resistentes aos extratos glandulares **EG2** e **EG4**, quando comparados a outras linhagens celulares. Entretanto, foi observado que nas concentrações de 4 e 2 µg/mL do extrato **EG2** e nas concentrações de 4 e 0,1 µg/mL do **EG4**, houve um aumento da taxa de células mortas quando os resultados foram comparados com aqueles do Grupo Controle (células + LPS).

Os resultados obtidos da avaliação de produção de NO liberado pelos macrófagos peritoneais expostos as diferentes concentrações dos extratos **EG2** e **EG4**, mostraram que o extrato **EG4** apenas na concentração de 2 µg/mL foi capaz de provocar um aumento significativo na produção de NO quando comparou-se com o Grupo Controle (células + LPS), porém ambos os extratos (**EG2** e **EG4**) nas maiores concentrações (4 e 2 µg/mL) e o **EG2** na concentração de 0,1 µg/mL também causaram pequeno aumento na produção de NO quando comparado com o Grupo Controle, sugerindo haver uma correlação entre

a viabilidade celular e a dosagem de NO, visto que nas concentrações 4 e 2 µg/mL do **EG2** e na concentração de 4 µg/mL do **EG4** houve maiores porcentagens de morte celular concomitantemente a obtenção de maiores valores na produção de NO. Essa correlação corrobora resultados obtidos em estudos realizados com macrófagos peritoneais de murinos, que documentaram a relação entre aumento da liberação de NO e a morte celular apoptótica de macrófagos em cultura (ALBINA et al., 1993). O óxido nítrico (NO) é uma molécula gasosa e inorgânica liberada por macrófagos quando estimulados por IFN ou LPS e produzida pela isoforma induzida da enzima óxido nítrico sintase (iNOS) devido a conversão de L-arginina em L-citrulina (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2014). Sendo assim, o NO é considerado um importante mediador de respostas intra e extracelulares com atividade citotóxica, antitumoral e antiviral, desempenhando papel fundamental na resposta imune contra microrganismos e células tumorais, sendo um ótimo indicador de ativação de macrófagos (BUSSOLARO, 2009; OLIVEIRA, 2005). Dessa forma, os dados aqui obtidos sugeriram que as concentrações que apresentaram maiores taxas de NO foram aquelas que mais estimularam a ativação dos macrófagos, e por isso teriam perfil considerado pró-inflamatório (KOPECKY; KUTHEJLOVA; PECHOVA, 1999; OLIVEIRA et al., 2010; OLIVEIRA, 2005).

No estudo morfológico observou-se aqui que os macrófagos peritoneais apresentaram alterações morfológicas distintas conforme as diferentes concentrações (4, 2, 1, 0,5, 0,1 µg/mL) as quais foram submetidos, porém, houve semelhanças nos resultados obtidos entre os extratos **EG2** e **EG4**. A análise sob microscopia de luz evidenciada pela coloração pela hematoxilina de Harris e eosina aquosa, nas células do Grupo Controle Negativo (só células) revelou apenas presença de macrófagos residentes (não ativados), concordando com a morfologia descrita por Junqueira e Carneiro (2014) para macrófagos, ou seja, células com núcleo geralmente ovóide e excêntrico, com

presença de dois ou mais nucléolos, citoplasma moderadamente basofílico e pouca granulação citoplasmática, além de estarem presentes pequenos prolongamentos citoplasmáticos. A microscopia eletrônica de varredura, no entanto, demonstrou características semelhantes às aquelas descritas por North (1978) e Oliveira (2005) para macrófagos residentes, tais como: citoplasma moderadamente disperso, presença de pequenos filamentos citoplasmáticos e ainda aparecimento de células com forma alongada. Já as células do Grupo Controle (células expostas ao LPS) demonstraram alterações típicas de ativação de macrófagos, semelhantes às aquelas descritas também por North (1978): a) numerosas projeções citoplasmáticas; b) alta capacidade de adesão e de espalhamento do citoplasma, gerando aumento da capacidade fagocítica; c) maior incidência de grânulos ou fagolisossomos. Tais características de ativação já eram aqui esperadas uma vez que o LPS é a principal endotoxina da camada externa da parede celular de bactérias Gram-negativas (JUSTO et al., 2015) e por isso amplamente utilizada em estudos imunobiológicos devido sua ação na ativação de macrófagos e liberação de NO (GWAKISA et al., 2001; JUSTO et al., 2015; KOPECKY; KUTHEJLOVA; PECHOVA, 1999; OLIVEIRA et al., 2010).

Essas mesmas características de ativação de macrófagos foram observadas nas células expostas às maiores concentrações (4 e 2 µg/mL) dos extratos **EG2** e **EG4**, sendo, no entanto, mais intensas do que aquelas exibidas no Grupo Controle (células + LPS) ou seja, apresentando citoplasma ainda mais disperso, abundantes projeções e granulações citoplasmáticas, adicionadas a características morfológicas de morte celular apoptótica, ou seja a presença de núcleos hipercromáticos e fragmentados, vacuolização citoplasmática e corpos apoptóticos na região superficial das células, evidenciados pela microscopia eletrônica de varredura. A morte celular apoptótica nesse caso, poderia estar relacionada mais uma vez ao aumento da produção de óxido nítrico nessas concentrações.

Segundo Albina et al. (1993) essas características de morte celular apoptótica estariam relacionadas a alta liberação de NO pela superativação de macrófagos por fatores patogênicos ou microbióticos, e esse processo seria um mecanismo de controle de do sistema imune com o objetivo de evitar a superativação do mesmo.

Por outro lado, apesar das células expostas as demais concentrações (1, 0,5 e 0,1 µg/mL) dos extratos **EG2** e **EG4** exibirem morfofisiologia alterada, ou seja, com características de branda ativação de macrófagos (sobretudo, citoplasma amplamente disperso), uma vez que estas células também foram expostas ao agente estimulante LPS, tais alterações ocorreram em menor intensidade quando comparadas aquelas concentrações anteriormente citadas (sem evidências de morte celular ou superativação de macrófagos), sendo inclusive diferente do observado para o Grupo Controle (células + LPS), demonstrando características mais semelhantes aquelas apresentadas por macrófagos residentes sendo elas: diminuição do número de prolongamentos citoplasmáticos, aparecimento de células alongadas, presença de células com núcleos hipertróficos e nucléolos visíveis (ALBINA et al., 1993; OLIVEIRA, 2005). Esses resultados indicaram o potencial imunorregulatório dessas concentrações de ambos os extratos (**EG2** e **EG4**), o que reforçaria dados já bem descritos na literatura a respeito da ação da saliva de diferentes espécies de carrapatos (KOTÁL et al., 2015; MOR; FERREIRA; CAMPANELLI, 2006; OLIVEIRA et al., 2010, 2011).

Assim, diante dos resultados aqui obtidos pode-se concluir que: **a)** as concentrações (4, 2, 1, 0,5 e 0,1 µg/mL) dos extratos **EG2** e **EG4** de fêmeas de carrapatos *R. sanguineus* s. l. não apresentam citotoxicidade significativa em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c; **b)** as concentrações de 4 e 2 µg/mL de ambos os extratos (**EG2** e **EG4**) estimularam perfis pró-inflamatórios em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, confirmados pelos parâmetros de viabilidade celular e de

produção de NO, corroborando as análises morfofisiológicas sob microscopia de luz e eletrônica de varredura; **c)** as concentrações 1, 0,5 e 0,1 µg/mL dos extratos **EG2** e **EG4**, por sua vez, demonstraram perfis imunomodulatórios, confirmados principalmente pela análise morfológica sob microscopia de luz e eletrônica de varredura, mas não pela dosagem de NO, o que sugeriu que essa imunomodulação seria desencadeada por outros mediadores, possivelmente citocinas; **d)** não houve diferenças significativas entre as respostas imunogênicas dos diferentes períodos do ciclo glandular (2 e 4 dias).

Finalmente, sabe-se que ainda resta muito a se esclarecer sobre os mecanismos de ação imunomodulatória da saliva de fêmeas de carrapatos *R. sanguineus* s. l., bem como seus efeitos sobre a morfofisiologia de células do sistema imune. Contudo, acredita-se que estudos como esse tenham muito a acrescentar na elucidação dos processos imunobiológicos envolvidos na relação hospedeiro-carrapato, e na busca por novas formas de controle desses ectoparasitas. Além disso, destaca-se aqui que futuros estudos que abordem a modulação dessas células através da liberação de mediadores da resposta imunológica, como citocinas por exemplo, tem muito a agregar nesse cenário.

REFERÊNCIAS

ABBAS, Abul K.; LICHTMAN, Andrew HH; PILLAI, Shiv. **Cellular and Molecular Immunology E-Book**. Elsevier Health Sciences, 2014.

ABREU, M. R. et al. Salivary Glands of Female Ticks *Rhipicephalus sanguineus* Like a Potential Source of Molecules with Inhibitory Action: In vivo study with Walker 256 Tumor Cells. **Journal of Pharmaceutical Care & Health Systems**, v. 1, n. 4, p. 1–8, 2014.

ALBINA, J. E. et al. Nitric oxide-mediated apoptosis in murine peritoneal macrophages. **The Journal of Immunology**, v. 150, n. 11, p. 5080-5085, 1993.

ANDERSON, J. F.; MAGNARELLI, L. A. Biology of ticks. **Infectious disease clinics of North America**, v. 22, n. 2, p. 195–215, v. jun. 2008.

BARKER, S. C.; MURRELL, A. Systematics and evolution of ticks with a list of valid genus and species names. **Parasitology**, v. 129 Suppl, n. February, p. S15–S36, 2004.

BINNINGTON, K. C. Sequential changes in salivary gland structure during attachment and feeding of the cattle tick, *Boophilus microplus*. **International Journal for Parasitology**, v. 8, n. 2, p. 97–115, 1978.

BOWMAN, A. S.; DILLWITH, J. W.; SAUER, J. R. Tick salivary prostaglandins: Presence, origin and significance. **Parasitology Today**, 1996.

BRAKE, D. K.; PÉREZ DE LEÓN, A. A. Immunoregulation of bovine macrophages by factors in the salivary glands of *Rhipicephalus microplus*. **Parasites & vectors**, v. 5, p. 38, 2012.

BROSSARD, M.; WIKEL, S. K. Tick immunobiology. **Parasitology**, v. 129, n. 7, p. S161–S176, 2004.

BUSSOLARO, Daniel. **Efeitos in vitro do chumbo inorgânico [Pb (II)] na resposta imunitária de macrófagos peritoneais de camundongo**. 2009. 69p. Dissertação de Mestrado (Biologia Celular e Molecular)- Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná. 2009.

CAMARGO-MATHIAS, M.; FURQUIM, K. S.; NUNES, P. Immunomodulatory effects of tick saliva. **ISJ**, v. 8, p. 231–240, 2011.

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

CHEN, G. et al. Ixodes scapularis saliva mitigates inflammatory cytokine secretion during *Anaplasma phagocytophilum* stimulation of immune cells. **Parasites & vectors**, v. 5, n. 1, p. 229, 2012.

CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M. et al. A new tick Kunitz type inhibitor, Amblyomin-X, induces tumor cell death by modulating genes related to the cell cycle and targeting the ubiquitin-proteasome system. **Toxicon**, v. 56, n. 7, p. 1145–1154, 2010.

CIPRANDI, A. et al. *Boophilus microplus*: Its saliva contains microphilin, a small thrombin inhibitor. **Experimental Parasitology**, v. 114, n. 1, p. 40–46, 2006.

D'ACQUISTO, Fulvio et al. Involvement of NF- κ B in the regulation of cyclooxygenase-2 protein expression in LPS-stimulated J774 macrophages. **FEBS letters**, v. 418, n. 1-2, p. 175-178, 1997.

DANTAS-TORRES, F. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): From taxonomy to control. **Veterinary Parasitology**, 2008.

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

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

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

DENARDI, S. E. et al. Morphological characterization of the ovary and vitellogenesis dynamics in the tick *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 125, n. 3–4, p. 379–395, 2004.

FERREIRA, B. R. et al. Antigens from *Rhipicephalus sanguineus* ticks elicit potent cell-mediated immune responses in resistant but not in susceptible animals. **Veterinary Parasitology**, v. 115, n. 1, p. 35–48, 2003.

FERREIRA, B. R.; LIONI, L. M. Y. Expressão gênica de citocinas em cobaias resistentes a carrapatos *Rhipicephalus sanguineus*. **Medicina**, p. 1–77, 2005.

FERREIRA, B. R.; SILVA, J. S. Saliva of *Rhipicephalus sanguineus* tick impairs T cell proliferation and IFN- γ -induced macrophage microbicidal activity. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 64, n. 3, p. 279–293, 1998.

FERREIRA, B. R.; SILVA, J. S. Successive tick infestations selectively promote a T-helper 2 cytokine profile in mice. **Immunology**, v. 96, n. 3, p. 434–439, 1999.

FRANCISCHETTI, I. M. B. et al. The role of saliva in tick feeding. **Frontiers in bioscience (Landmark edition)**, v. 14, p. 2051–88, 2009.

FRANCISCHETTI, I. M. B.; MATHER, T. N.; RIBEIRO, J. M. C. Tick saliva is a potent inhibitor of endothelial cell proliferation and angiogenesis. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 94, n. 1, p. 167–174, 2005.

FURQUIM, K. C. S. et al. Cytology & Histology Secretory Behavior of Salivary Glands of *Rhipicephalus sanguineus* Fed on Immunized Rabbit Hosts. **J Cytol Histol**, v. 4, 2014.

FURQUIM, K. C. S.; BECHARA, G. H.; CAMARGO MATHIAS, M. I. Degeneration of salivary glands of males of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari, Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 154, n. 3–4, p. 325–335, 2008.

FURQUIM, K. C. S.; BECHARA, G. H.; MATHIAS, M. I. C. 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**, v. 50, n. 1, p. 59–70, 2010.

GRAY, J. et al. Systematics and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. **Ticks and Tick-borne Diseases**, 2013.

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

GUGLIELMONE, Alberto A. et al. The hard ticks of the world. **Springer**, Dordrecht. doi, v. 10, n. 1007, p. 978-94, 2014.

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

HEBLING, L. M. F. G.; CMARGO-MATHIAS, M. I.; FURQUIM, K. C. S. **Estudo dos efeitos de extratos de glândulas salivares de fêmeas de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari:Ixodidae) na resposta imunológica de hospedeiros pós**

inoculados. 2011. Dissertação de Mestrado (Biologia Celular e Molecular) Instituto de Biociências, UNESP, campus Rio claro, São Paulo. 2011.

JUNCADELLA, I. J. et al. T-cell signaling pathways inhibited by the tick saliva immunosuppressor, Salp15. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 49, n. 3, p. 433–438, 2007.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica** . 12^aed. 2014.

JUSTO, O. R. et al. Evaluation of in vitro anti-inflammatory effects of crude ginger and rosemary extracts obtained through supercritical CO₂ extraction on macrophage and tumor cell line : the influence of vehicle type. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, p. 1–15, 2015.

KOPECKY, J.; KUTHEJLOVA, M.; PECHOVA, J. Salivary gland extract from *Ixodes ricinus* ticks inhibits production of interferon-gamma by the upregulation of interleukin-10. **Parasite immunology**, v. 21, n. 7, p. 351–356, 1999.

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

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

KUTHEJLOVA, M. et al. Salivary gland extract inhibits killing of *Borrelia afzelli*

spirochetes by mouse macrophages. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 1, p. 575–578, 2001.

LABRUNA, M. B. et al. A preliminary investigation of *Ehrlichia* species in ticks, humans, dogs, and capybaras from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 143, n. 2, p. 189–195, 2007.

MACEDO-RIBEIRO, S. et al. Isolation, cloning and structural characterization of boophilin, a multifunctional Kunitz-type proteinase inhibitor from the cattle tick. **PLoS ONE**, v. 3, n. 2, p. 1–17, 2008.

MANS, B. J. et al. Pathogenic mechanisms of sand tampan toxicoses induced by the tick, *Ornithodoros savignyi*. **Toxicon**, v. 40, n. 7, p. 1007–1016, 2002.

MAROTTA, P.; SAUTEBIN, L.; ROSA, M. DI. Modulation of the induction of nitric oxide synthase by eicosanoids in the murine macrophage cell line J774. **British journal of pharmacology**, v. 107, n. 3, p. 640-641, 1992.

MATSUMOTO, K. et al. Effects of salivary gland extract from *Rhipicephalus sanguineus* on IgG subclass production and cytokine mRNA expression in mononuclear cells of canine peripheral blood. **The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science**, v. 65, n. 1, p. 137–40, 2003.

MOR, D. D.; FERREIRA, B. R.; CAMPANELLI, A. P. **Modulação da resposta imune pela saliva de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* : estudo do envolvimento de**

células T regulatórias. 2006. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

MORITA, Hirotugu et al. Cytokine production by the murine macrophage cell line J774. 1 after exposure to lactobacilli. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 66, n. 9, p. 1963-1966, 2002.

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

NAVA, S. et al. The taxonomic status of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806). **Veterinary Parasitology**, v. 208, n. 1–2, p. 2–8, 2015.

NORTH, Robert J. Opinions the concept of the activated macrophage. **The Journal of Immunology**, v. 121, n. 3, p. 806-809, 1978.

NUTTALL, P. A.; LABUDA, M. Tick-host interactions: saliva-activated transmission. **Parasitology**, v. 129, p. S177–S189, 2004.

OLIVEIRA, C. J. F. et al. Tick saliva induces regulatory dendritic cells: MAP-kinases and Toll-like receptor-2 expression as potential targets. **Veterinary Parasitology**, v. 167, n. 2–4, p. 288–297, 2010.

OLIVEIRA, C. J. F. et al. Deconstructing tick saliva: Non-protein molecules with potent

immunomodulatory properties. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 13, p. 10960–10969, 2011.

OLIVEIRA, P. R. et al. Seasonal dynamics of the Cayenne tick, *Amblyomma cajennense* on horses in Brazil. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 17, n. 4, p. 412–416, 2003.

OLIVEIRA, S. M. **Triagem de medicamentos homeopáticos que ativam macrófagos com detecção e quantificação de IFN- γ , IL-4 e NO**. 2005. Dissertação de Mestrado (Biologia Celular e Molecular) departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná. 2005.

OLSON, N.; VAN DER VLIET, A. Interactions between nitric oxide and hypoxia-inducible factor signaling pathways in inflammatory disease. **Nitric Oxide**, v. 25, n. 2, p. 125–137, 2012.

RALPH, P.; NAKOINZ, I. Direct Toxic Effects of Immunopotentiators on Monocytic, Myelomonocytic, and Histiocytic or Macrophage Tumor Cells in Culture. **Cancer Research**, v. 37, n. 2, p. 546–550, 1977.

RAMACHANDRA, R. N.; WIKEL, S. K. Modulation of host-immune responses by ticks (Acari: Ixodidae): effect of salivary gland extracts on host macrophages and lymphocyte cytokine production. **Journal of medical entomology**, v. 29, n. 5, p. 818–826, 1992.

RIBEIRO, J. C.; WEIS, J. J.; TELFORD, S. R. Saliva of the tick *Ixodes dammini* inhibits neutrophil function. **Experimental Parasitology**, v. 70, n. 4, p. 382–388, 1990.

RIBEIRO, J. M. et al. Antihemostatic, antiinflammatory, and immunosuppressive properties of the saliva of a tick, *Ixodes dammini*. **The Journal of experimental medicine**, v. 161, n. 2, p. 332–44, 1985.

ROCHA, F. A. **Efeitos in vitro e in vivo do extrato de glândulas salivares de fêmeas de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* com 2 dias de alimentação sobre modelos tumorais**. Tese de Doutorado, (Biologia Celular e Molecular) departamento de Biologia, Instituto de Biociencias, UNESP campus Rio Claro, são Pualo. 2014.

SA-NUNES, A. et al. Prostaglandin E2 Is a Major Inhibitor of Dendritic Cell Maturation and Function in *Ixodes scapularis* Saliva. **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 3, p. 1497–1505, 2007.

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

SCHOELER, G. B.; WIKEL, S. K. Modulation of host immunity by haematophagous arthropods. **Annals of tropical medicine and parasitology**, v. 95, n. 8, p. 755–771, 2001.

SIMONS, S. M. et al. The action of *Amblyomma cajennense* tick saliva in compounds of the hemostatic system and cytotoxicity in tumor cell lines. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 65, n. 6, p. 443–450, 2011.

SONENSHINE, D. E.; ROE, R. M. **Biology of ticks (vol. 1)**. vol. 1 ed. New York: Oxford University Press, 2014.

WALKER, A. R. **Arthropods of humans and domestic animals. A guide to preliminary identification**. Springer Science & Business Media, 1994

WANG, X. et al. Variabilin, a novel RGD-containing antagonist of glycoprotein IIb-IIIa and platelet aggregation inhibitor from the hard tick *Dermacentor variabilis*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 30, p. 17785–17790, 1996.

WAXMAN, L.; CONNOLLY, T. M. Isolation of an inhibitor selective for collagen-stimulated platelet aggregation from the soft tick *Ornithodoros moubata*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 8, p. 5445–5449, 1993.

WEISS, B. L.; KAUFMAN, W. R. Two feeding-induced proteins from the male gonad trigger engorgement of the female tick *Amblyomma hebraeum*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 16, p. 5874–9, 2004.

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, n. 6, p. 965–973, 1991.

WIKEL, Stephen K. Tick modulation of host immunity: an important factor in pathogen transmission. **International journal for parasitology**, v. 29, n. 6, p. 851-859, 1999.

XIANG, F. YU et al. Proteomic Analysis of Proteins in the Salivary Glands of the Fed and Unfed Female Tick *Rhipicephalus haemaphysaloides*. **Agricultural Sciences in China**, v. 8, n. 1, p. 121–127, 2009.

YODER, J. A. et al. Developmental profiles in tick water balance with a focus on the new Rocky Mountain spotted fever vector, *Rhipicephalus sanguineus*. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 20, n. 4, p. 365–372, 2006.

ZHU, K. et al. Isolation and characterization of americanin, a specific inhibitor of thrombin, from the salivary glands of the lone star tick *Amblyomma americanum* (L.). **Experimental parasitology**, v. 87, n. 1, p. 30–38, 1997.

CAPÍTULO 2

Título: “Avaliação *in vitro* dos efeitos imunomoduladores e morfofisiológicos dos extratos de glândulas salivares de fêmeas de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae) sobre as células da linhagem J774”

Marina Rodrigues de Abreu¹, Melissa Carolina Pereira¹, Patrícia Ucelli Simioni², Elen Fernanda Nodari¹, Lisiery Negrini Paiatto¹, Maria Izabel Camargo-Mathias^{1*}

¹Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista

“Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Avenida 24 A, 1515, 13506-900 - Rio Claro, SP, Brasil.

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

*Autor correspondente: micm@rc.unesp.br

INTRODUÇÃO

Os carrapatos são artrópodes, em sua maioria, ectoparasitas obrigatórios e de hábito hematófago, que parasitam grande diversidade de hospedeiros vertebrados durante a sua ontogenia (ANDERSON; MAGNARELLI, 2008). Esses animais são também importantes pela capacidade de transmitir inúmeros patógenos, como fungos, bactérias, protozoários e vírus responsáveis pela transmissão de doenças aos seus hospedeiros (LABRUNA et al., 2007) .

A espécie *Rhipicephalus sanguineus* s. l., popularmente conhecida como “carrapato do cão”, pode parasitar também outros mamíferos, inclusive o homem (DANTAS-TORRES; FIGUEREDO; BRANDÃO-FILHO, 2006; GRAY et al., 2013) e é considerada uma espécie de grande importância médico-veterinária devido ao seu papel como vetor de bactérias, vírus e protozoários, sendo as principais doenças transmitidas aos cães a Erliquiose (*Ehrlichia canis*), Babesiose (*Babesia canis*) e Hemobartonelose (*Haemobartonella canis*), e ainda, há suspeitas de serem vetores em humanos da *Rickettsia conorii* na Europa e da *R. rickettsii* no México (DANTAS-TORRES, 2008, 2010). Dessa forma, esses ectoparasitas representam grande preocupação pelos prejuízos causados não só aos animais de estimação, mas também à saúde pública.

O sucesso biológico dos carrapatos deve-se principalmente as glândulas salivares, órgãos responsáveis pela produção de substâncias que são imprescindíveis nos processos de fixação e alimentação, órgãos que sintetizam e liberam a saliva (WALKER, 1994), mistura complexa capaz de modular os processos hemostático, inflamatório e imunológico do hospedeiro: aumentando o fluxo sanguíneo na região do corpo onde ocorre a fixação no hospedeiro, por meio da secreção de agentes vasoativos; inoculando anticoagulantes que mantêm o sangue do hospedeiro fluido; inibindo o processo inflamatório e agindo como imunossupressor, possibilitando que o ectoparasita

permaneça se alimentando por longos períodos, dificultando sua rejeição (BOWMAN et al., 1996).

Além da complexa composição, a saliva apresenta variações quantitativa e qualitativa quando são considerados os diferentes períodos do ciclo glandular e as diferentes espécies (BINNINGTON, 1978; CAMARGO-MATHIAS; FURQUIM, 2013; XIANG et al. 2009). No caso da espécie *R. sanguineus* s. l. 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 ocorre devido ao sistema imune do hospedeiro e os componentes da saliva dos carrapatos terem coevoluído ao longo dos anos, resultando numa interação que pode ser comparada a uma “corrida armamentista” entre os mecanismos de defesa de um e de invasão do outro (KOTÁL, 2015).

No que se refere a ação imunossupressora da secreção salivar, a literatura registrou que a saliva bruta de diversas espécies de carrapatos possuiria o potencial de: afetar a proliferação de linfócitos T (KOPECKY; KUTHEJLOVA; PECHOVA, 1999; SCHOELER; WIKEL, 2001); inibir a função dos neutrófilos, incluindo sua atividade oxidativa e fagocitária (RIBEIRO; WEIS; TELFORD, 1990); diminuir a atividade das células “natural killer” (KUBES et al., 1994); diminuir a atividade oxidativa de macrófagos (KUTHEJLOVA et al., 2001); suprimir a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-2 e IFN- γ) e aumentar a produção de citocinas (IL-4, IL-5 e IL-10) relacionadas às reações imunes mediadas por eosinófilos e mastócitos contra alérgenos (características da indução de linfócitos do tipo Th2) (BROSSARD; WIKEL, 2004; WIKEL, 1999).

Os macrófagos são células apresentadoras de antígeno, também responsáveis pela eliminação e fagocitose de microrganismos invasores, assim como pela secreção de

proteínas sinalizadoras (citocinas) que atuam na intercomunicação celular sendo ainda responsáveis pela estimulação e supressão dos processos da resposta imune, desencadeando e coordenando a resposta inflamatória, processos de cicatrização e reorganização tecidual (ALVES, 2004). Além das citocinas, os macrófagos ativados produzem reativos intermediários de nitrogênio como o óxido nítrico (NO), através da ação da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS), ativada por sua vez pela presença de produtos microbianos, como por exemplo o lipopolissacarídeo (LPS) extraído da parede celular de bactérias Gram-negativas (MACRI et al., 2009). O óxido nítrico liberado tem importante papel na destruição e eliminação de microorganismos patogênicos e é um ótimo indicador da intensidade de ativação de macrófagos (ABBAS et al. 2014).

As células da linhagem J774 são macrófagos de ratos originalmente isoladas de sarcoma histiocístico e frequentemente utilizadas em estudos *in vitro* relacionados a imunorregulação de macrófagos devido a geração de indicadores de resposta imunológica semelhantes àqueles das células de origem dessa linhagem, tais como produção de citocinas, indução da síntese de NO, regulação de prostagandinas, resposta proinflamatória e interação com microorganismos (D'ACQUISTO et al., 1997; JUSTO et al., 2015; MAROTTA; SAUTEBIN; ROSA, 1992).

Apesar do conhecimento adquirido a respeito do potencial da saliva de carrapatos sobre o sistema imune-inflamatório dos hospedeiros, pouco ainda se estudou sobre a dinâmica dos mecanismos de ação que estão nela envolvidos e principalmente sobre os efeitos morfofisiológicos relacionados e provocados pela exposição do extrato glandular, levando-se em consideração os períodos do ciclo glandular, que, como já mencionado anteriormente, possuem características específicas e distintas ao longo do processo de alimentação. Além disso, acredita-se que estudos relacionados aos efeitos da saliva no

sistema imune inflamatório do hospedeiro representam perspectivas para a elaboração de novos métodos de controle que sejam mais efetivos, como a produção de vacinas que atinjam essa importante espécie de carrapato responsável por prejuízos médico-veterinários tão relevantes.

Diante disso, o presente trabalho teve por objetivo analisar a ação *in vitro* dos extratos de glândulas salivares extraídas de fêmeas de carrapatos *R. sanguineus* s. l. alimentadas por 2 (EG2) e 4 dias (EG4) em coelhas hospedeiras, sobre macrófagos da linhagem J774 verificando a ocorrência de possíveis alterações morfofisiológicas, bem como avaliar os efeitos imunomoduladores nestas células quando expostas as diferentes concentrações dos extratos.

MATERIAL E MÉTODOS

A) Manutenção dos Carrapatos *R. sanguineus* s. l.

Para a realização deste trabalho foram utilizadas 200 fêmeas adultas de *R. sanguineus* s. l. alimentadas em coelhas hospedeiras naives do Grupo Genético de Botucatu, obtidas do Biotério Central de Botucatu (UNESP, *campus* Botucatu, SP). Para obtenção das fêmeas com os períodos de alimentação desejados, houve necessidade de infestar as coelhas hospedeiras com fêmeas e machos adultos em jejum, uma vez que a fêmea só completa seu ingurgitamento após a cópula com o macho. Os carrapatos adultos foram obtidos de colônia desta mesma espécie mantidas 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 - *campus* Rio Claro, SP.

As infestações nas coelhas hospedeiras foram realizadas no interior de câmara alimentadora fixada na região dorsal tosada das mesmas (25 casais/hospedeira), para posterior aquisição de fêmeas com 2 e 4 dias de alimentação (período este garantido

através de observações subsequentes dos carrapatos fixados). Na sequência, as fêmeas foram anestesiadas com choque térmico e tiveram suas glândulas salivares retiradas para a produção dos extratos **EG2** e **EG4**. Tanto os procedimentos de infestação quanto os de fixação das câmaras alimentadoras foram realizados segundo o protocolo descrito por Bechara et al. (1995) e sob a aprovação do Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA, Instituto de Biociências, UNESP – *campus* Rio Claro) nº 9133/2016

B) Produção dos Extratos das Glândulas Salivares (EG2 e EG4)

Após o período de alimentação (2 ou 4 dias), as fêmeas foram retiradas das hospedeiras pela região do hipostômio com auxílio de pinça cirúrgica e por meio de movimentos circulares. Em seguida, nas dependências do Laboratório de Histologia do Departamento de Biologia da UNESP Rio Claro (SP) foram colocadas em placas de Petri contendo solução salina (7,5 g de NaCl, 2,38 g de Na₂HPO₄, 2,72 g de KH₂PO₄ e 1000 mL de água destilada) para dissecação, bem como para retirada das glândulas salivares, que depois foram colocadas em tubos eppendorfs contendo 200 µL de tampão fosfato pH 7.4 (separadas pelo tempo de alimentação) e mantidas em gelo.

Posteriormente, as glândulas foram lavadas 2 vezes no mesmo tampão fosfato pH 7.4, centrifugadas por 10 minutos a 2500 rpm para retirada do excesso de tampão, em seguida, as mesmas foram delicadamente maceradas com auxílio de bastão de vidro. Na sequência, os tubos foram novamente centrifugados por 5 minutos a 2500 rpm, os sobrenadantes recolhidos em fluxo laminar estéril, filtrados em unidades filtrantes descartável (JBR610303, Millex GV, membrana durapore PVDF, Millipore®, MilliUni), de 0.22 µm e diâmetro de 13 mm, acopladas à seringas hipodérmicas e depositados em eppendorfs estéreis encaminhados para a dosagem de proteínas, segundo metodologia descrita por Sedmark and Grossberg (1977) (método de Bradford).

Após a determinação do conteúdo proteico, no interior do fluxo laminar estéril, os extratos foram diluídos em tampão fosfato pH 7.4 autoclavado para se obter as concentrações pré-determinadas para realização dos bioensaios (4, 2, 1, 0,5 e 0,1 µg/mL). Os extratos glandulares **EG2** e **EG4** foram então aliquotados (1000 µL) e armazenados em eppendorfs estéreis em freezer -80°C até o momento de sua utilização.

C) Cultura Celular

As linhagens de células J774 foram gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Patricia Ucelli Simioni do Laboratório de Inflamação e Imunologia Celular (LIIC) do Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes da UNICAMP, Campinas, SP, a qual também é colaboradora deste trabalho.

As células J774 foram cultivadas até semiconfluência em garrafas de cultura mantidas em incubador (5% de CO₂ e 37°C) em meio RPMI 1640 Sigma® (R6504) contendo HEPES (2,97 g/L), bicarbonato de sódio (2 g/L), 2-Mercaptoetanol (2 µL/L) e suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). Em seguida, elas foram colhidas da garrafa com o auxílio de *cell scraper*, lavadas com meio RPMI e centrifugadas em tubo Falcon a 1500 rpm durante 10 minutos a 4°C. O sedimento foi ressuspensionado em meio RPMI novamente e procedeu-se contagem das células em câmara de Neubauer com azul de tripan (1:2) para o ajuste de 1x10⁶ células/mL.

Após contagem e ajuste, as células J774 foram semeadas a uma densidade de 2x10⁵ células/poço em placas de 96 poços sendo: **Estimulo 1** (J774 exposta a **EG2** por 24 horas), **Estimulo 2** (J774 exposta a **EG4** por 24 horas), **Estimulo 3** (J774 exposta a **EG2** por 48 horas) e **Estimulo 4** (J774 exposta a **EG4** por 48 horas).

Posteriormente, foram adicionados 10 µL/poço do composto lipopolissacarídeo (LPS) (10 µL de LPS 25000 ng + 12,40 mL de meio RPMI) como estímulo inflamatório,

e em seguida adicionados 10 µL/poço das diferentes concentrações (4, 2, 1, 0,5 e 0,1 µg/mL) do extrato **EG2 (Placa 1 e 3)** ou **EG4 (Placa 2 e 4)**. Os grupos controles foram: **Grupo Controle Negativo** (composto por células expostas apenas ao meio RPMI) e **Grupo Controle** (células submetidas ao LPS). As placas foram incubadas nas mesmas condições de cultura durante 24 (**Placa 1 e 2**) e 48 horas (**Placa 3 e 4**).

D) Teste de Viabilidade Celular (MTT)

Após o período de incubação as placas foram submetidas ao teste de viabilidade celular utilizando-se 10 µL de MTT na concentração 5 mg/mL (dissolvido em solução salina tamponada com fosfato, pH 7.4) que foram adicionados a cada poço, em seguida, as placas foram incubadas por mais 4 horas em incubador (5% de CO₂ e 37°C), e depois foram adicionados 200 µL de álcool isopropílico contendo 0,04 N de HCL para dissolver os cristais. As placas foram levadas ao leitor de microplacas Multiskan MS (Labsystems Oy, Helsinki, Finlândia) e a leitura foi realizada a 570 nm. Este ensaio foi realizado em triplicatas.

E) Avaliação da Produção de Óxido Nítrico (NO)

A dosagem de óxido nítrico (NO) liberado nos sobrenadantes das células J774 foi realizada através de ensaio colorimétrico quantitativo descrito por Griess e Bemerkungen (1879). Primeiramente, realizou-se a curva padrão de nitrito de 320 à 0 µM/L (diluições realizadas a partir da solução estoque de 320.000 µM/L com meio de cultura RPMI com 10% de SFB) a qual foi utilizada como base para a quantificação das amostras.

Os sobrenadantes recolhidos (50µL) das culturas de células J774 após a exposição às diferentes concentrações dos extratos **EG2** e **EG4**, foram transferidos para placas de cultura de 96 poços e em seguida, adicionados 50 µL do reagente de Griess/poço (1% de

sulfanilamida, 0,1% de N- (1-naphthylethylenediamine) dihydrochloride e 2,5% de ácido fosfórico). Após 10 minutos em temperatura ambiente, foi realizada a leitura da placa no leitor Multiskan MS (Labsystems Oy, Helsinki, Finland) à 570 nm. Este bioensaio também foi realizado em triplicata.

F) Dosagem de Citocinas

A dosagem de citocinas foi realizada a partir da coleta dos sobrenadantes (50 µL) das culturas das células J774. Após exposição às diferentes concentrações dos extratos **EG2** e **EG4**, os mesmos foram submetidos ao ensaio CBA (Cytometric Bead Array) utilizando-se kits comerciais (BD- Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit; BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA) seguindo recomendações do fabricante, para a determinação de citocinas: IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, IFN-γ e TNF.

Inicialmente, realizou-se a curva de calibração, onde os *beads* da curva padrão foram transferidos para um tubo Falcon de 15 mL e reconstituídos com 2mL de tampão diluente fornecido pelo kit (top standard), após 15 minutos de repouso em temperatura ambiente, ocorreu a diluição seriada dos tubos (1:2; 1:4; 1:8; 1:16; 1:32; 1:64; 1:128; 1:256) misturando 150 µL de tampão diluente + 150 µL do tubo anterior, e no caso do tubo “branco”, foram adicionados apenas 300 µL de tampão diluente, totalizando 10 pontos da curva.

As *beads* de captura fornecidas pelo kit foram ressuspensas e acopladas num único tubo Falcon gerando um mix de *beads* de captura. Em seguida, foram adicionados 25 µL do mix de *beads* aos tubos da curva padrão e a cada tubo contendo 50 µL de amostra. Posteriormente foram adicionados também 25 µL do reagente de detecção

Mouse Th1/Th2/Th17 PE do kit a cada tubo. Procedeu-se a incubação de todos os tubos por 3 horas em temperatura ambiente e protegidos da luz.

Após a incubação, foram adicionados 1 mL de *wash buffer* a cada tubo, que foram centrifugados a 200 g por 5 minutos. Os sobrenadantes foram descartados e o pellet ressuspensionado em 300 µL de *wash buffer*. Imediatamente os tubos foram analisados em citômetro de fluxo BD FACSCalibur™ (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA) do Laboratório de Inflamação e Imunologia Celular (LIIC) do Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes da UNICAMP, Campinas, SP e os resultados foram gerados pelo software BD CBA Analysis Software.

O limite de detecção de cada citocina está representado na **Tabela 1**.

Tabela 1: Limites de detecção das citocinas do Kit BD Cytometric Bead Array (CBA)

Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine

Citocinas	Limite de detecção (pg/mL)
IL-2	0,1
IL-4	0,03
IL-6	1,4
IFN- γ	0,5
TNF	0,9
IL-17A	0,8
IL-10	16,8

G) Análise Estatística

A análise estatística dos dados e confecção de gráficos foram realizados no software Graphpad Prism 5.0, utilizado o teste de variância “ANOVA” seguido do teste de Turkey, sendo os valores de $p < 0,05$ considerados significativos.

H) Análise Morfofisiológica

As células da linhagem J774 foram semeadas na densidade de 2×10^5 células/poço (500 μ L) sobre lamínulas de vidro estéreis em placas de 24 poços e cultivadas durante 24 horas em meio RPMI suplementado com 10% de SFB em incubador (5% de CO_2 e 37°C). Posteriormente, foram adicionados 50 μ L de LPS em cada poço + 50 μ L das diferentes concentrações dos extratos **EG2** e **EG4** (4, 2, 1, 0,5, 0,1 $\mu\text{g/mL}$), sendo que os poços controles (só células e só células com LPS) receberam apenas 100 μ L de meio RPMI e 50 μ L de LPS + 50 μ L de meio RPMI, respectivamente, e então foram incubadas nas mesmas condições de cultura durante 24 e 48 horas. Após a incubação, as células foram preparadas para análise morfológica sob microscopia de luz e eletrônica de varredura, ambas realizadas no Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, UNESP, *campus* de Rio Claro, SP.

- Microscopia de Luz

Após incubação, o sobrenadante das células foi descartado e foram adicionados à cada placa de cultivo 500 μ L/poço de fixador paraformaldeído 4%. As placas foram mantidas em geladeira *over night*. Após a fixação das células, o fixador foi retirado e sucedeu-se a lavagem dos poços com tampão fosfato pH 7,4 estéril (300 μ L/poço). Em seguida, iniciou-se o processo de desidratação em série crescente de etanol 70, 80, 90, 95 e 100% com banhos de 5 minutos.

Para a coloração das células foram adicionados 300 µL/poço de hematoxilina de Harris durante 1 minuto, retirado o excesso do corante e lavado com água da torneira durante 5 minutos e com água destilada durante 30 segundos. Posteriormente, foram adicionados 300 µL/poço de eosina aquosa por 1 minuto e retirado, lavando com água destilada por mais 30 segundos.

Após coloração e secagem, as lamínulas de vidro contendo as células foram retiradas das placas de 24 poços, banhadas em xilol, montadas em lâminas previamente limpas contendo Entellan® (Merck Millipore) e armazenadas em estufa até completa secagem. As lâminas foram fotodocumentadas em fotomicroscópio de luz de campo claro LEICA DM750.

RESULTADOS

1. Análise de Viabilidade Celular (MTT)

As placas contendo as células da linhagem J774 foram expostas ao estímulo LPS e posteriormente aos extratos **EG2** e **EG4** por 24 horas ou 48 horas e submetidas ao teste de viabilidade celular com o intuito de verificar a atividade citotóxica dos extratos nas diferentes concentrações (4; 2; 1; 0,5 e 0,1 µg/mL) (**Gráfico 1A-D**).

A exposição das células J774 ao **EG2** durante 24 horas, quando analisada estatisticamente não mostrou citotoxicidade significativa quando comparou-se o resultado aquele obtido do Grupo Controle (células expostas ao LPS). No entanto, foi observada intensa morte celular na exposição à concentração de 4 µg/mL (71,05% de células viáveis) e diminuição de células viáveis exposição à concentração de 0,5 µg/mL (90,96% de células viáveis) quando comparou-se ao Grupo Controle (97,01 % de células viáveis) (**Gráfico 1A**). As placas contendo as células expostas as concentrações 2; 1 e 0,1

$\mu\text{g/mL}$ do **EG2** durante 24 horas mostraram aumento da população de células viáveis em comparação ao mesmo controle ($2 \mu\text{g/mL}$ = 101,05%; $1 \mu\text{g/mL}$ = 104,81% e $0,1 \mu\text{g/mL}$ = 106,25% de células viáveis) (**Gráfico 1A**). As células expostas ao extrato **EG2** por 48 horas mostraram resultados semelhantes às do Grupo Controle (variando de 91,84 à 98,55% de células viáveis), com exceção exposição à concentração $4 \mu\text{g/mL}$ (25,02% de células viáveis) que apresentou aumento significativo da taxa de morte celular em relação ao controle, sugerindo citotoxicidade do extrato nessa concentração (**Gráfico 1B**). Além disso, quando comparados os dados obtidos para 24 horas e 48 horas, foi possível observar a diminuição da taxa de viabilidade celular em todas as concentrações do **EG2** (**Gráfico 1A-B**).

A exposição ao extrato **EG4** não mostrou valor significativo de aumento de taxa de morte celular nas diferentes concentrações quando comparou-se ao Grupo Controle (células expostas ao LPS) tanto em 24 quanto em 48 horas (**Gráfico 1C-D**). Porém, em ambos os períodos de tempo todos os grupos celulares expostos ao **EG4** demonstraram valores de taxa de morte celular semelhantes aqueles do Grupo Controle, exceto a concentração de $4 \mu\text{g/mL}$ onde houve notável diminuição da viabilidade celular de 24 para 48 horas (104,74% para 56,36% de células viáveis) (**Gráfico 1C-D**) e também em relação ao Grupo Controle (89,92%) (**Gráfico 1C-D**).

Apesar dos resultados obtidos entre as concentrações, os resultados estatísticos do teste de viabilidade sugeriram que os extratos **EG2** e **EG4** seriam tóxicos para as células da linhagem J774 apenas na concentração $4 \mu\text{g/mL}$.

As médias dos dados obtidos encontram-se na **Tabela 2**.

2. Avaliação da Produção de Óxido Nítrico (NO)

A avaliação do NO liberado no sobrenadante das células expostas aos extratos **EG2** e **EG4** foi realizada com o objetivo de observar a capacidade anti ou pro-

inflamatória dos mesmos sobre os macrófagos da linhagem J774 durante o período de 24 e 48 horas.

As células expostas ao **EG2** durante 24 horas aumentaram a produção de NO nas diferentes concentrações quando comparadas ao Grupo Controle (células expostas ao LPS 25,51), sendo que todos os grupos expostos ao extrato tiveram esse aumento considerado significativo em relação ao controle (**Gráfico 2A**). Já no período de 48 horas de exposição ao mesmo extrato **EG2**, nas concentrações de 4 µg/mL, 2 e 1 µg/mL houve aumento significativo na produção de NO (157,23; 94,31 e 83,85 µM de nitrito, respectivamente) em comparação ao Grupo Controle (72,81 µM de nitrito) (**Gráfico 2C**)

A análise estatística referente ao **EG4** no período de 24 horas indicou pequeno aumento das taxas de NO nas concentrações 1 e 0,5 µg/mL do extrato (41,71 e 38,98 µM de nitrito, respectivamente) quando comparadas ao Grupo Controle (células com LPS) que registrou 37,69 µM de nitrito (**Gráfico 2B**). No entanto, as demais concentrações apresentaram diminuição da produção de NO comparadas ao mesmo controle, sendo apenas considerado significativo os valores na exposição a concentração 4 µg/mL (25,08 µM de nitrito) (**Gráfico 2B**). As células expostas ao **EG4** por 48 horas, por sua vez, aumentaram a produção de NO nas concentrações 4; 2 e 1 µg/mL (83,42; 86,57 e 85,25 µM de nitrito, respectivamente), sendo considerados esses valores significativos em relação ao Grupo Controle (75,96 µM) (**Gráfico 2D**). Já as menores concentrações, ou seja, 0,5 e 0,1 µg/mL do **EG4** agiram diminuindo a produção de NO (71,38 µM e 68,65 µM de nitrito, respectivamente) em comparação ao controle (**Gráfico 2D**).

Quando comparados os dois períodos (24 e 48 horas) observou-se que as concentrações de 4, 2 e 1 µg/mL tanto no **EG2** quanto no **EG4**, passaram a ter ação inflamatória em 48 horas. Em contrapartida, o **EG4** em 24 horas na concentração de 4

µg/mL demonstrou atividade anti-inflamatória (diminuição na produção de NO em relação ao controle) (**Gráfico 2A-D**).

As médias dos dados obtidos encontram-se na **Tabela 3**.

3. Dosagem de citocinas

A dosagem de citocinas realizada através do método CBA (Cytometric Bead Array) utilizando-se kits comerciais (BD- Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit; BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA) para a determinação de citocinas (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, e TNF) considerou as citocinas IL-4, IL-17A e IFN-γ abaixo do alcance padrão de leitura do equipamento (citômetro de fluxo BD FACSCalibur™) em todas as amostras.

As células da linhagem J774 quando expostas ao **EG2** durante 24 horas foram capazes de diminuir a liberação de IL-2 nas concentrações 2; 0,5 e 0,1 µg/mL (3,59 pg/mL 3,21 pg/mL e 3,43 pg/mL) mas aumentaram a liberação na concentração de 1 µg/mL (7,64 pg/mL) em comparação ao Grupo Controle (J774+LPS) (5,52 pg/mL) (**Gráfico 3A**). Na dosagem de IL-6, as concentrações de exposição foram capazes de manter os níveis obtidos pelo Grupo Controle (6732,32 pg/mL) variando de 6685,55 a 5656,63 pg/mL (**Gráfico 3C**). Os valores de TNF-α foram menores que aqueles do Grupo Controle (1786,31 pg/mL), diminuindo conforme as concentrações também diminuíram (variando de 1370,53 a 964,60 pg/mL) (**Gráfico 3E**). Já a dosagem de IL-10 manteve-se semelhante àquela observada no Grupo Controle (3,98 pg/mL), com um pequeno aumento nas concentrações 1 e 0,1 µg/mL (4,30 e 4,73 pg/mL) e grande aumento na concentração de 0,5 µg/mL (6,46 pg/mL) (**Gráfico 3G**).

As células J774 expostas por 48 horas ao extrato **EG2** aumentaram a liberação de IL-2 nas concentrações de 2 e 0,1 µg/mL (3,90 e 4,66 pg/mL) e diminuiu a secreção da

mesma citocina nas concentrações 4; 1 e 0,5 µg/mL (2,98; 2,09 e 1,52 pg/mL) em relação ao Grupo Controle (3,17 pg/mL) (**Gráfico 3B**). Quanto a citocina IL-6, todas as concentrações do extrato foram capazes de reduzi-la em comparação ao Grupo Controle (12641,1 pg/mL), exceto a de 0,1 µg/mL que causou pequeno aumento da mesma (13181,9 pg/mL) (**Gráfico 3D**). Os valores de TNF-α liberados em cultura foram menores em todas as concentrações do **EG2** em comparação ao Grupo Controle (1797,28 pg/mL), diminuindo significativamente nas concentrações 4 µg/mL (1071,79 pg/mL) e 2 µg/mL (1131,33 pg/mL) (**Gráfico 3F**). Finalmente a dosagem de IL-10 demonstrou ser maior que a do Grupo Controle (4,02 pg/mL) em todas as concentrações, exceto na de 0,5 µg/mL do **EG2** (2,95 pg/mL) (**Gráfico 3H**).

Os resultados obtidos da dosagem de citocinas liberadas pelas células da linhagem J774 expostas ao **EG4** por 24 horas mostraram que as diferentes concentrações deste foram capazes de diminuir a produção de IL-2 em comparação ao Grupo Controle (J774+LPS) (5,52 pg/mL), sendo a concentração 4 µg/mL a que resultou nos menores valores (1,735 pg/mL) (**Gráfico 4A**). As dosagens de IL-6 também se mostraram menores nas diferentes concentrações do **EG4** em relação ao controle (6732,32 pg/mL), sendo considerado significativo os valores da concentração 1 µg/mL (4885,29 pg/mL) (**Gráfico 4C**), e apenas a concentração 0,1 µg/mL apresentou aumento dessa citocina (8081,72 pg/mL) em relação ao mesmo controle. Sobre a citocina TNF-α, o extrato também foi capaz de diminuir significativamente a liberação da mesma nas diferentes concentrações de **EG4** em relação ao Grupo Controle (1786,05 pg/mL) (**Gráfico 4E**). Já os níveis de IL-10 mostraram-se maiores em todas as concentrações de **EG4** em relação ao Grupo Controle (1,67 pg/mL), variando de 3,11 pg/mL (na concentração de 0,1 µg/mL) a 9,99 pg/mL (na concentração de 2 µg/mL) (**Gráfico 4G**).

A análise da dosagem de citocinas liberadas pelas células J774 expostas ao **EG4** durante 48 horas, mostrou aumento da produção de IL-2 nas concentrações 2 e 1 µg/mL em comparação ao Grupo Controle (J774+LPS) (3,17 pg/mL), sendo esse aumento considerado significativo para os valores apresentados pela concentração 2 µg/mL (5,52 pg/mL) (**Gráfico 4B**). Em contrapartida, o extrato em todas as concentrações mostrou capacidade de diminuir a liberação da citocina IL-6 quando comparado ao controle (12641,1 pg/mL) sendo os valores das concentrações 1; 0,5 e 0,1 µg/mL considerados significativos (8374,5; 7816,55 e 6149,75 pg/mL, respectivamente) (**Gráfico 4D**). O mesmo ocorreu com a TNF- α , onde todas as concentrações tiveram o potencial de diminuir significativamente a secreção dessa citocina em comparação ao controle (1847,28 pg/mL) (**Gráfico 4F**). Finalmente, os resultados das dosagens de IL-10 mostraram-se nesse caso, semelhantes aqueles apresentados pelo Grupo Controle (4,02 pg/mL), apresentando pequeno aumento na concentração de 0,5 µg/mL (5,5 pg/mL) (**Gráfico 4H**).

A análise da dosagem de citocinas dos extratos **EG2** e **EG4** nos dois períodos (24 e 48 horas) sugeriram que a exposição das células J774 a todas as concentrações do extrato **EG2** tiveram resultado imunomodulatório, porém no período de 24 horas a concentração 1 µg/mL pareceu ter estimulado certa atividade inflamatória, assim como a concentração 2 e 0,1 µg/mL no período de 48 horas, de acordo com as análises de liberação de IL-2, no entanto esses valores não foram considerados significativos estatisticamente. A avaliação de citocinas liberadas pelas células J774 quando expostas ao **EG4** sugeriram a capacidade imunomodulatória das diferentes concentrações tanto em 24 quanto em 48 horas, com exceção das concentrações 2 e 1 µg/mL que no período de 48 horas apresentaram pequena atividade inflamatória (alta liberação de IL-2), sendo os

valores referentes a concentração 2 µg/mL considerados significativos estatisticamente (Gráficos 3 e 4A-H).

4. Análise morfofisiológica

4.1 Células J774 expostas ao EG2

Grupo controle negativo (só células)

O Grupo Controle Negativo composto por células J774 não expostas aos extratos, quando coradas pela HE e observadas sob microscópio de luz, demonstrou características morfofisiológicas semelhantes às descritas na literatura para células neoplásicas de sarcoma histiocítico (AFFOLTER; MOORE, 2002), ou seja: a) pleomorfismo (células com diferentes formas e tamanhos) embora em cultura celular *in vitro* as mesmas sejam frequentemente fusiformes (**Fig. 1 e 2 A1-4**); b) presença de células gigantes multinucleadas, redondas ou estelares (**Fig. 1 A2**); c) citoplasma vacuolizado (**Fig. 1 e 2 A1-4**); d) presença de prolongamentos citoplasmáticos (**Fig. 1 e 2 A1-2**) e e) núcleos de diversas formas e tamanhos com um ou vários nucléolos visíveis e em alguns casos com cromatina condensada (**Fig. 1 e 2 A1-4**).

Grupo controle (células + LPS)

O Grupo Controle de células expostas ao estímulo inflamatório LPS quando coradas pela HE apresentou morfofisiologia semelhante àquela do grupo controle negativo (só células), porém com algumas características intensificadas (tanto em 24 quanto em 48 horas), como por exemplo: a) citoplasma amplamente disperso (**Fig. 1 e 2 B1-4**); b) núcleos mais irregulares, em algumas células os núcleos estavam grandes e com nucléolos visíveis, em outras com cromatina fortemente condensada (**Fig. 1 e 2 B1-4**); c)

células estelares com grandes e numerosos prolongamentos citoplasmáticos (**Fig. 1 e 2 B1-4**); e d) presença de células gigantes multinucleadas (**Fig. 1 B1 e 2 B4**).

Grupo exposto a 4 µg/mL de EG2

As células expostas à concentração de 4 µg/mL do **EG2**, submetidas a coloração pela HE durante 24 e 48 horas, apresentaram resultados semelhantes aos do Grupo Controle Negativo (só células), tais como: presença de células gigantes multinucleadas (**Fig. 1 C3**), células com abundantes prolongamentos citoplasmáticos (**Fig. 1 C1-4**), núcleos irregulares, em sua maioria, fusiformes e hipercromáticos (**Fig. 1 C1-4**), e ocasionalmente algumas células com citoplasma disperso, porém com menor frequência do o observado no grupo anterior (**Fig. 1 C1 e 4**)

Grupo exposto a 2 µg/mL de EG2

Esse grupo quando exposto ao **EG2** durante 24 horas teve as características morfológicas mais semelhantes às do Grupo Controle (células expostas ao LPS): citoplasma muito disperso e núcleos pouco definidos (**Fig. 1 D1-2**), células com núcleo hipercromático (**Fig. 1 D1-2**), e células com numerosos prolongamentos citoplasmáticos (**Fig. 1 D1-2**). Já no período de 48 horas, as células apresentaram formato fusiforme e com prolongamentos citoplasmáticos (**Fig. 1 D3**), núcleos com cromatina condensada (**Fig. 1 D3-4**), e o número menor de células com citoplasma disperso (**Fig. 1 D3-4**).

Grupo exposto a 1 µg/mL de EG2,

Os resultados desse grupo exposto a concentração de 1 µg/mL do extrato **EG2** tanto em 24 quanto 48 horas, mostraram maior frequência de células gigantes multinucleadas (**Fig. 1 E1-4**) com citoplasma disperso e longos prolongamentos

citoplasmáticos (**Fig. 1 E1-4**). Além disso, as demais células apresentaram morfologia fusiforme ou estrelada, algumas com núcleos hipercromáticos (**Fig. 1 E1-4**).

Grupo exposto a 0,5 µg/mL de EG2

As células expostas a essa concentração durante 24 horas exibiram morfofisiologia semelhante ao grupo anterior, ou seja, citoplasma disperso e com prolongamentos (**Fig. 1 F1-2**), além de grande incidência de células gigantes multinucleadas, que por sua vez, revelaram núcleos grandes, com um ou dois nucléolos (**Fig. 1 F1-2**). No período de 48 horas também foram observadas células gigantes multinucleadas (**Fig. 1 F3**), e ainda algumas células com citoplasma disperso e outras com formato fusiforme, núcleos intensamente corados (**Fig. 1 F3-4**) e presença de prolongamentos citoplasmáticos (**Fig. 1 F3-4**).

Grupo exposto a 0,1 µg/mL de EG2

O grupo exposto a menor concentração do extrato **EG2** no período de 24 horas revelou morfofisiologia semelhante à do Grupo Controle Negativo, com células fusiformes e alongadas, com prolongamentos citoplasmáticos muito frequentes (**Fig. 1 G1-2**) e núcleos intensamente corados e ocasionalmente hipertróficos (**Fig. 1 G1-2**). Já no período de 48 horas, foram observadas mais células com citoplasma disperso e núcleos hipertróficos, com dois ou mais nucléolos (**Fig. 1 G3-4**). Além disso, observou-se também numerosos prolongamentos citoplasmáticos (**Fig. 1 G3-4**).

4.2 Células J774 expostas ao EG4

O **Grupo Controle Negativo** (só células) e **Controle** (células expostas ao LPS) apresentaram a mesma morfologia descrita no item 3.1.

Grupo exposto a 4 µg/mL de EG4

As células expostas à concentração de 4 µg/mL do **EG4** em ambos os períodos (24 e 48 horas), apresentaram citoplasma disperso, moderadamente vacuolizado e com prolongamentos citoplasmáticos abundantes (**Fig. 2 C1-4**). Os núcleos mostraram-se hipertróficos (**Fig. 2 C1-4**) tendo sido observada presença células gigantes multinucleadas (**Fig. 2 C1, 2 e 4**).

Grupo exposto a 2 µg/mL de EG4

O grupo exposto a essa concentração do **EG4** em ambos os períodos (24 e 48 horas) mostrou resultados semelhantes aos do grupo anterior (**Fig. 2 D1-4**). Foram observadas também células fusiformes e com prolongamentos citoplasmáticos (**Fig. 2 D1-4**).

Grupo exposto a 1 µg/mL de EG4

Nas células J774 expostas a concentração de 1 µg/mL de **EG4**, em ambos os períodos (24 e 48 horas) foi observado citoplasma muito mais disperso e com abundantes prolongamentos citoplasmáticos (**Fig. 2 E1-4**) quando comparadas aos demais grupos expostos ao **EG4**. Os núcleos das células com citoplasma disperso apresentaram-se grandes e hipertróficos, podendo ser visualizados neles dois ou três nucléolos (**Fig. 2 E1-4**). Foram observadas também células gigantes multinucleadas (**Fig. 2 E3**).

Grupo exposto a 0,5 µg/mL de EG4

Esse grupo de células expostas a concentração de 0,5 µg/mL de **EG4** durante 24 e 48 horas apresentaram muitas células gigantes multinucleadas, chegando a ter até 5 núcleos/célula (**Fig. 2 F1-4**), com citoplasma disperso e abundantes prolongamentos. Os núcleos permaneceram irregulares e em algumas células intensamente corados devido a cromatina condensada (**Fig. 2 F1-4**).

Grupo exposto a 0,1 µg/mL de EG4

Esse grupo submetido a menor concentração do **EG4** no período de 24 horas exibiu células gigantes multinucleadas com citoplasma disperso e núcleos hipertróficos com nucléolos visíveis, mas também apresentou células fusiformes com núcleos hipercromáticos (**Fig. 2 G1-2**). Além disso foram observados numerosos prolongamentos citoplasmáticos em ambos os casos (**Fig. 2 G1-2**). Já nas células expostas ao mesmo extrato, porém no período de 48 horas, houve maior presença de células com citoplasma disperso e abundantes prolongamentos citoplasmáticos (**Fig. 2 G4**), além da presença de células gigantes multinucleadas (**Fig. 2 G3**). Os núcleos foram fortemente corados devido a cromatina condensada (**Fig. 2 G3-4**).

Tabela 2- Valores (em porcentagem) obtidos do teste de viabilidade celular de células J774 expostas a EG2 e EG4

Viabilidade celular (%)		4	2	1	0,5	0,1	Controle
		µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL	(J774+LPS)
EG2	24h	71,05	101,05	104,81	90,96	106,25	97,01
	48h	25,02*	91,84	92,83	95,11	98,55	96,17
EG4	24h	94,14	102,44	93,19	98,22	103,22	107,84
	48h	56,36	84,14	98,19	104,92	99,53	89,92

* Dados estatisticamente significativos ($p < 0,05$) em relação ao Grupo Controle (J774+LPS). Os valores correspondem as médias $\pm$ SEM (*Standard Error of the Mean*) dos dados obtidos pelas quadruplicatas dos testes. **EG2**= Extrato Glandular de 2 dias e **EG4**= Extrato Glandular de 4 dias.

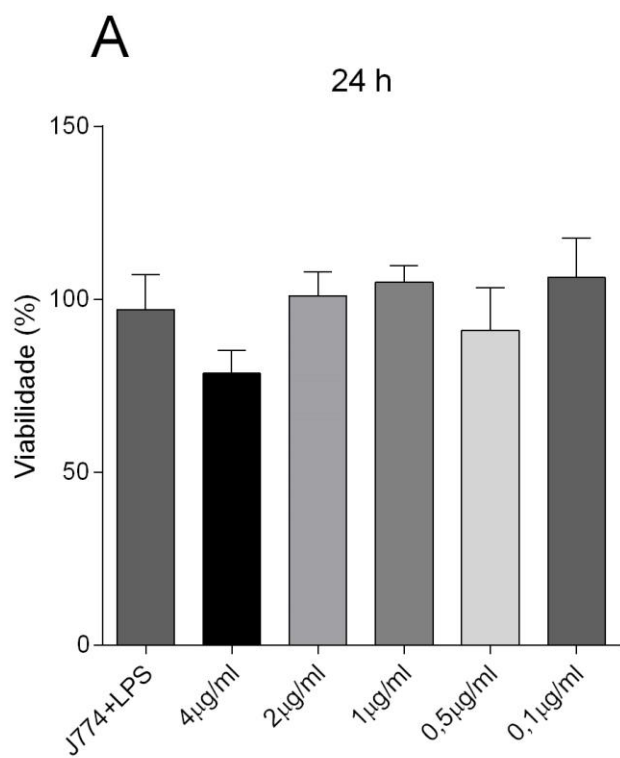
Tabela 3- Valores (em porcentagem) obtidos da avaliação da produção de óxido nítrico em células J774 expostas a EG2 e EG4

								Controle
NO (µM de Nitrito/ 1x10 ⁶ células)		4	2	1	0,5	0,1	Controle	negativo
		µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL	(J774+LPS)	(só células)
EG2	24h	52,46*	35,40*	51,45*	28,38*	32,68*	25,51	22,69
	48h	157,23*	94,31*	83,85*	71,95	66,50	72,81	69,08
EG4	24h	25,08*	32,96	41,71	38,98	33,54	37,69	24,08
	48h	83,42*	86,57*	85,28*	71,38	68,65	75,96	72,09

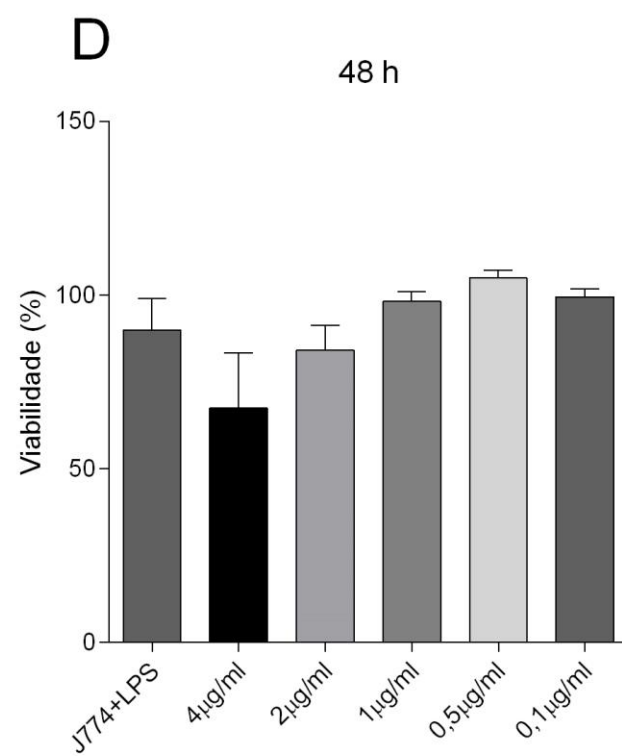
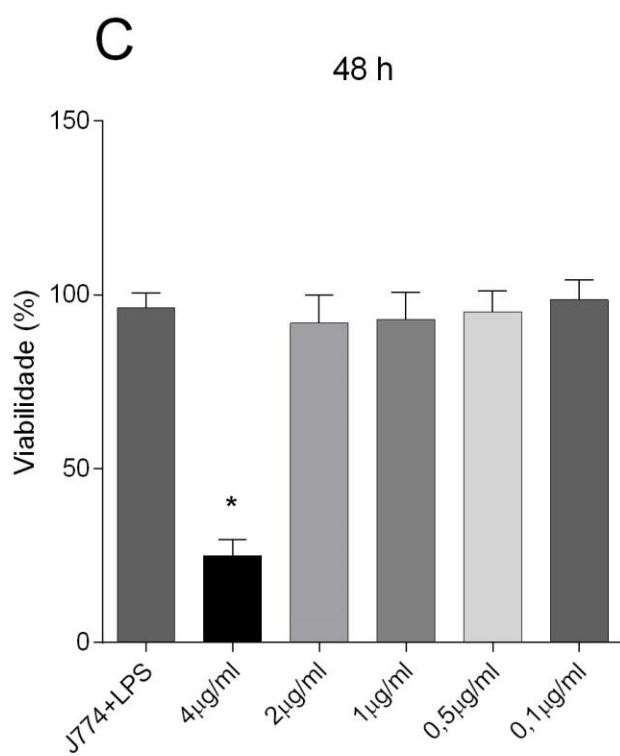
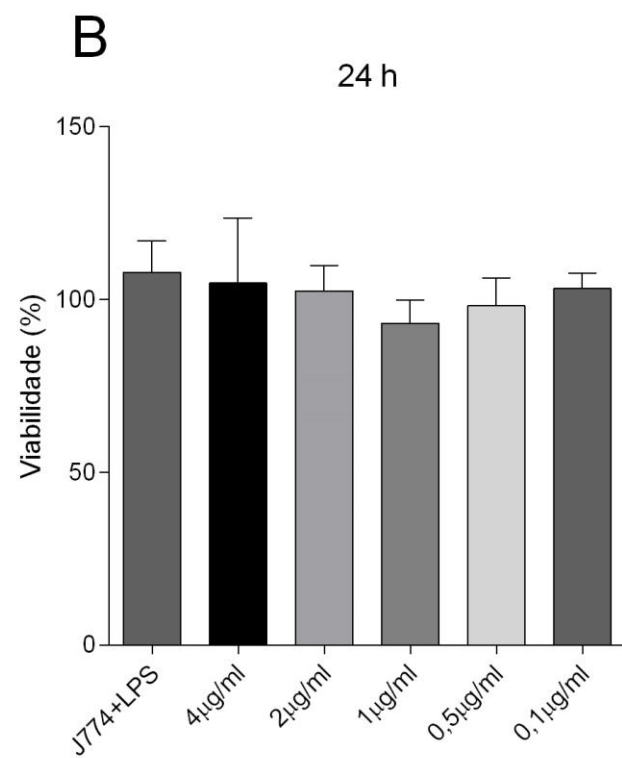
* Dados estatisticamente significativos ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle (J774+LPS). Os valores correspondem as médias $\pm$ SEM (*Standard Error of the Mean*) dos dados obtidos pelas quadruplicatas dos testes. **EG2**= Extrato Glandular de 2 dias e **EG4**= Extrato Glandular de 4 dias.

Gráficos 1A-D: Análise estatística dos resultados obtidos do teste de viabilidade celular de células J774 expostas as diferentes concentrações dos extratos de glândulas salivares de 2 dias (**EG2**) e 4 dias (**EG4**) no período de 24 e 48 horas. As colunas representam as médias $\pm$ SEM (*Standard Error of the Mean*) dos dados obtidos pelas quadruplicatas dos testes. (*) Indica os dados estatisticamente significativos ($p < 0.05$) em comparação ao Grupo Controle (J774 + LPS).

EG2

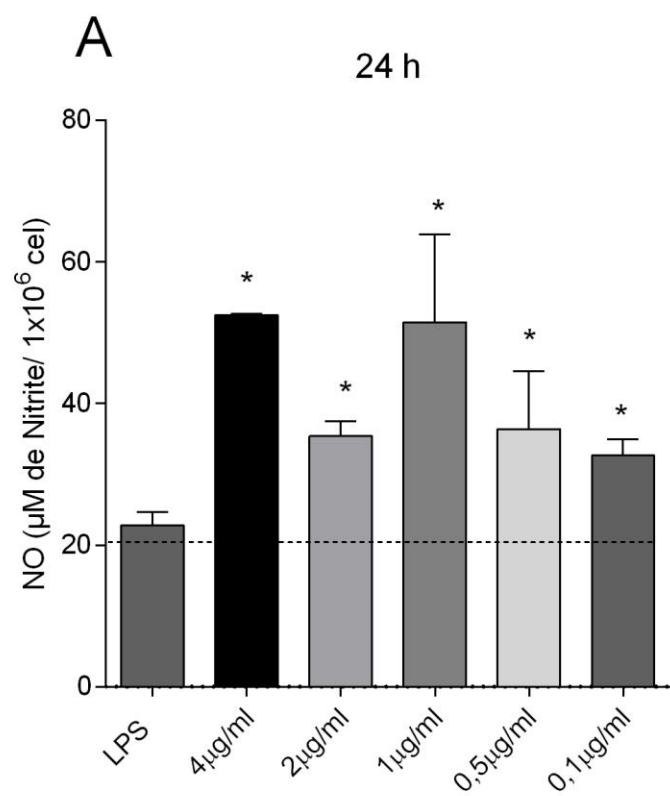


EG4

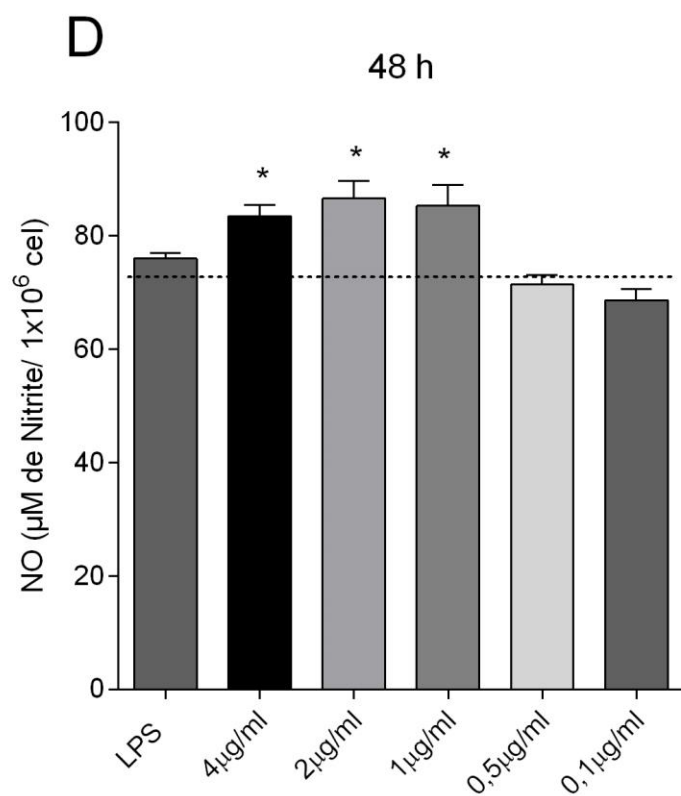
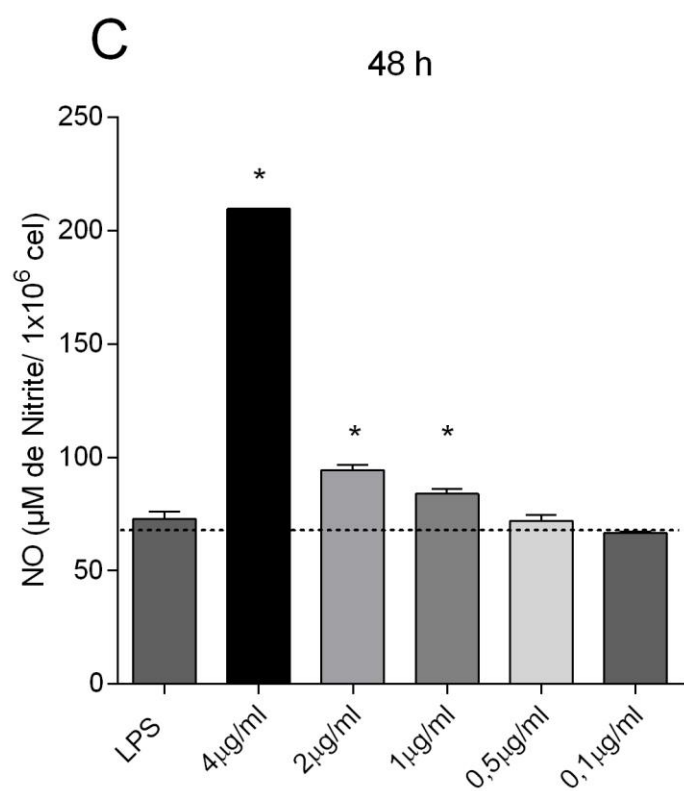
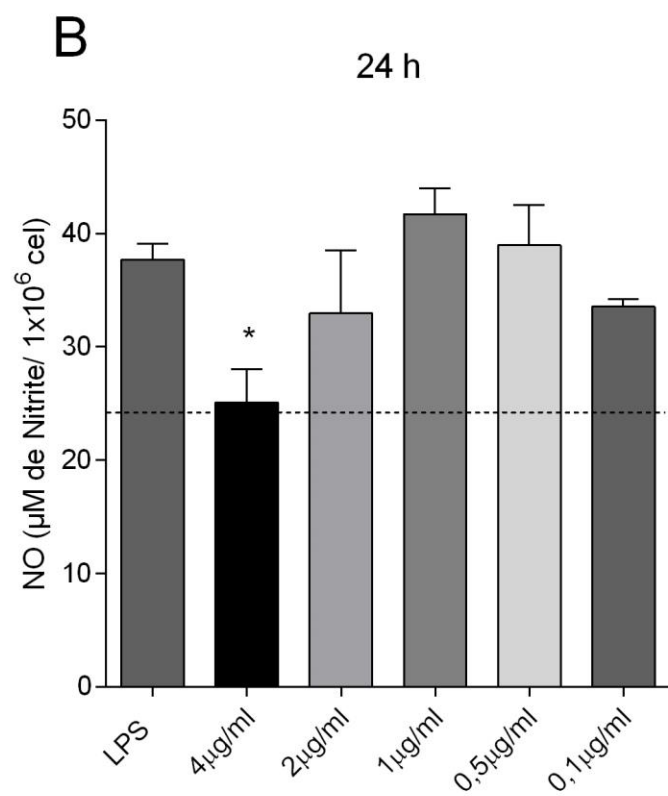


Gráficos 2A-D: Análise estatística dos resultados obtidos da avaliação da produção de óxido nítrico pelas células J774 expostas as diferentes concentrações dos extratos de glândulas salivares de 2 dias (**EG2**) e 4 dias (**EG4**) no período de 24 e 48 horas. As colunas representam as médias $\pm$ SEM (*Standard Error of the Mean*) dos dados obtidos pelas quadruplicatas dos testes. (*) Indica os dados estatisticamente significativos ($p < 0.05$) em comparação ao Grupo Controle (J774 + LPS).

EG2

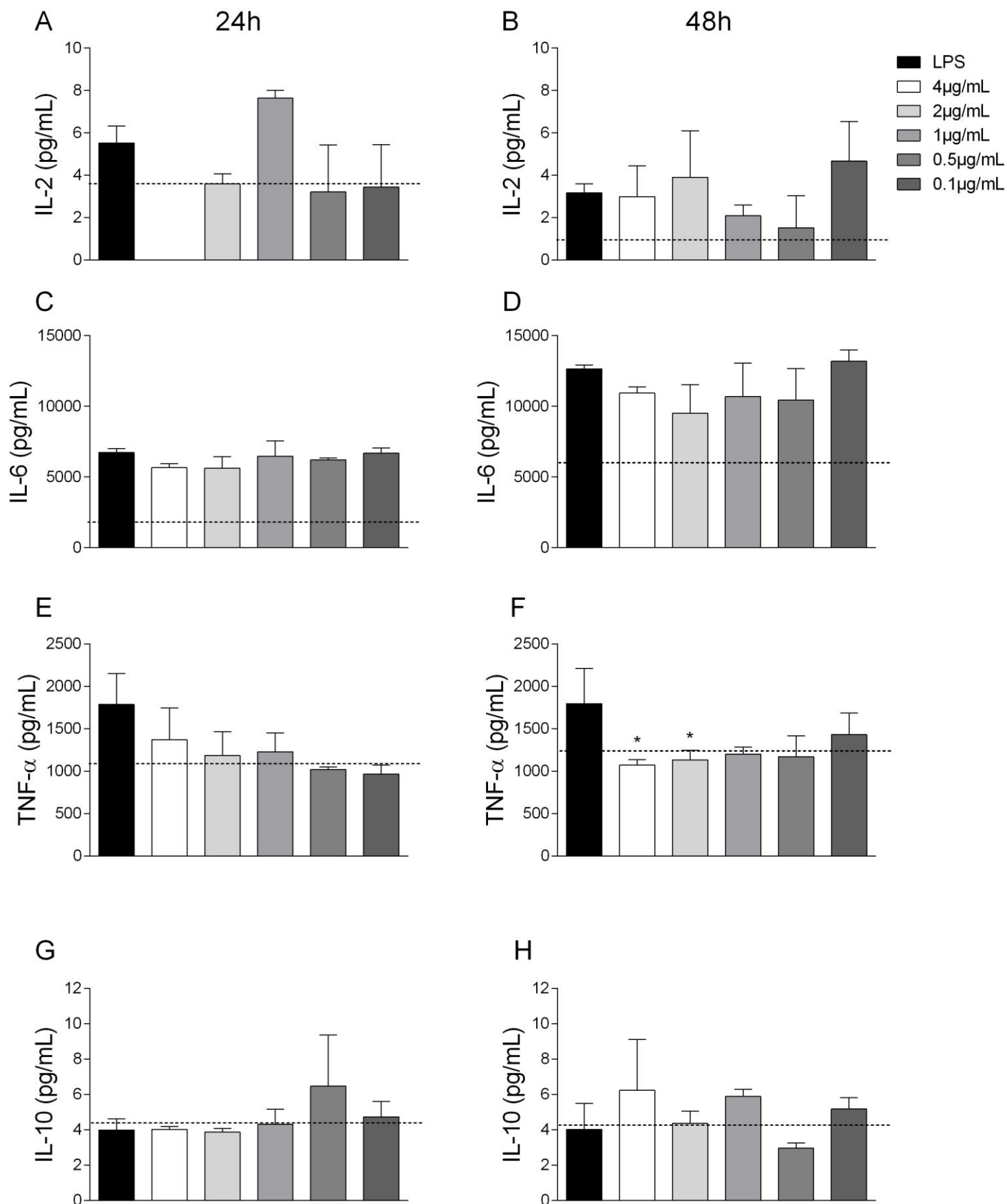


EG4



Gráficos 3A-H: Análise estatística dos resultados obtidos na dosagem de citocinas liberadas pelas células J774 expostas as diferentes concentrações dos extratos de glândulas salivares de 2 dias (**EG2**) no período de 24 e 48 horas. As colunas representam as médias $\pm$ SEM (*Standard Error of the Mean*) dos dados obtidos pelas quadruplicatas dos testes. (*) Indica os dados estatisticamente significativos ($p < 0.05$) em comparação ao Grupo Controle (J774 + LPS).

EG2



Gráficos 4A-H: Análise estatística dos resultados obtidos na dosagem de citocinas liberadas pelas células J774 expostas as diferentes concentrações dos extratos de glândulas salivares de 4 dias (**EG4**) no período de 24 e 48 horas. As colunas representam as médias $\pm$ SEM (*Standard Error of the Mean*) dos dados obtidos pelas quadruplicatas dos testes. (*) Indica os dados estatisticamente significativos ($p < 0.05$) em comparação ao Grupo Controle (J774 + LPS).

EG4

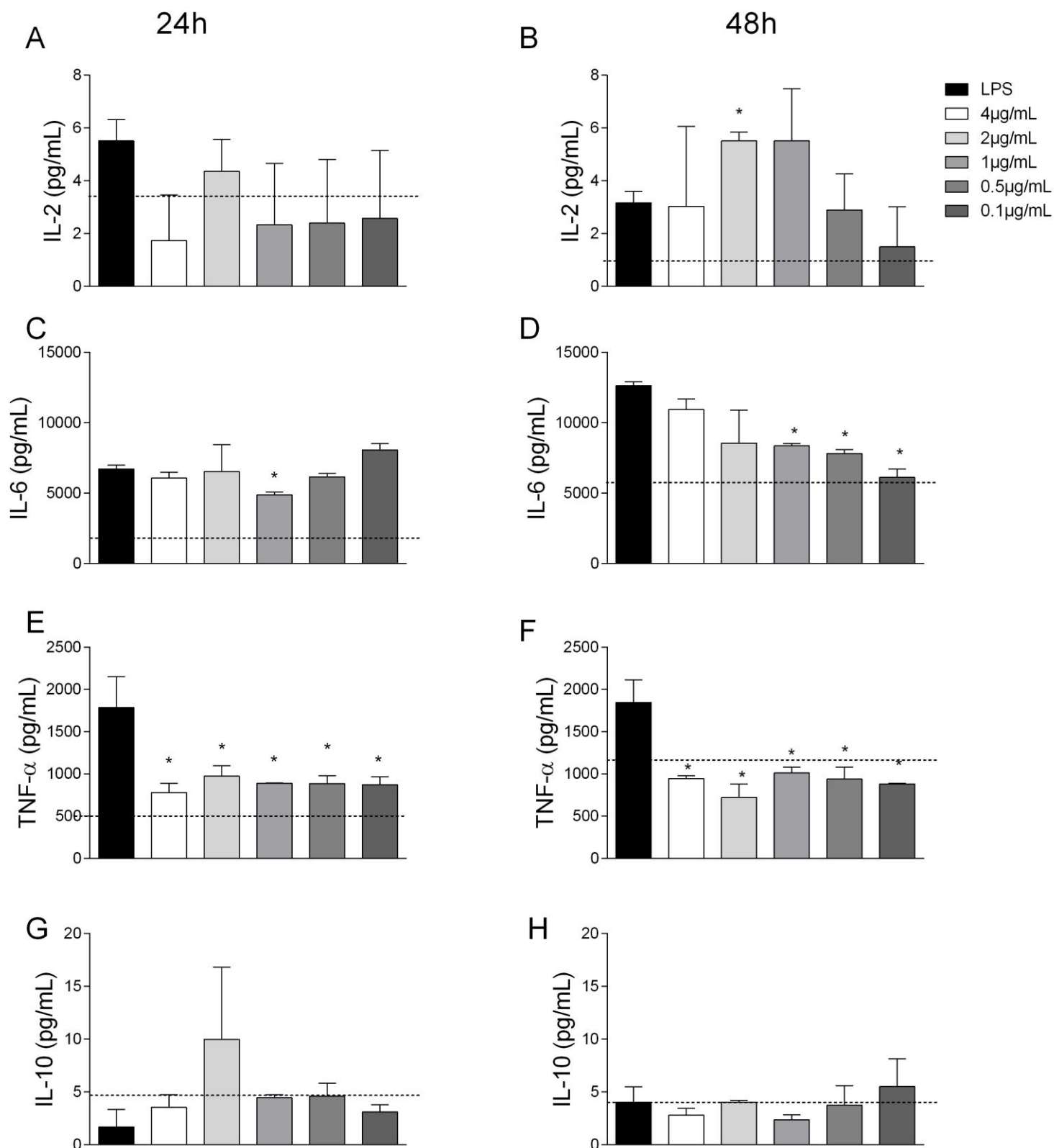


Figura 1: Análise morfológica das células da linhagem J774 expostas a diferentes concentrações do extrato de glândula salivar de fêmeas de carrapatos *R. sanguineus* s. l. alimentadas por dois dias (**EG2**), no período de 24 (**1-2**) e 48 horas (**3-4**), coradas pela hematoxilina de Harris e eosina aquosa (HE) e observadas sob microscopia de luz de campo claro. **A1-4:** Grupo Controle Negativo (só células); **B1-4:** Grupo Controle (J774+LPS); **C1-4:** Células expostas a concentração de 4 µg/mL do EG2; **D1-4:** Células expostas a concentração de 2 µg/mL do EG2; **E1-4:** Células expostas a concentração de 1 µg/mL do EG2; **F1-4:** Células expostas a concentração de 0,5 µg/mL do EG2; **G1-4:** Células expostas a concentração de 0,1 µg/mL do EG2.

cd= citoplasma disperso; **cgm**= célula gigante multinucleada; **n**= núcleo; **nu**= nucléolo; **pc**= prolongamento citoplasmático, **v**= vacuolização.

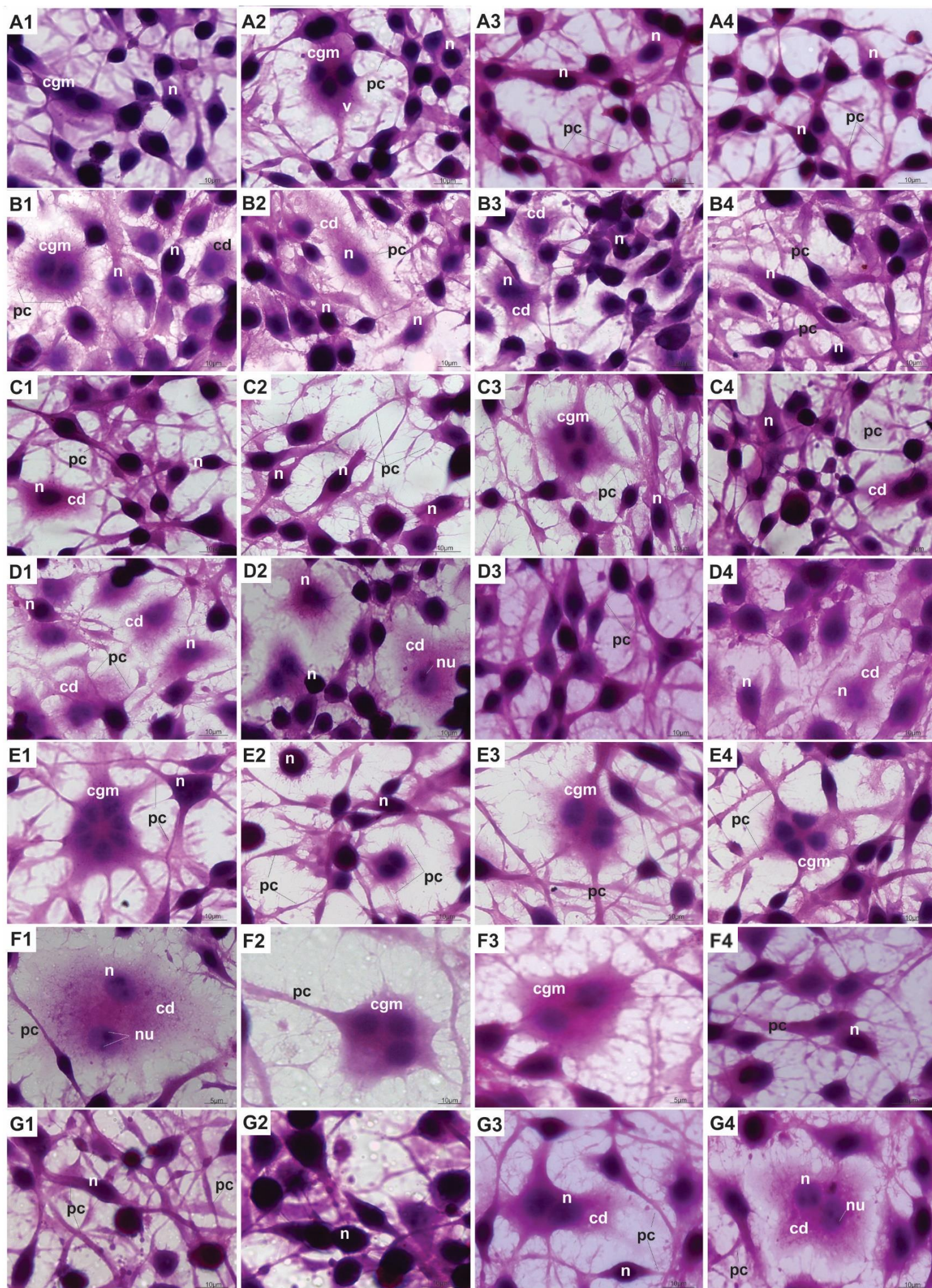
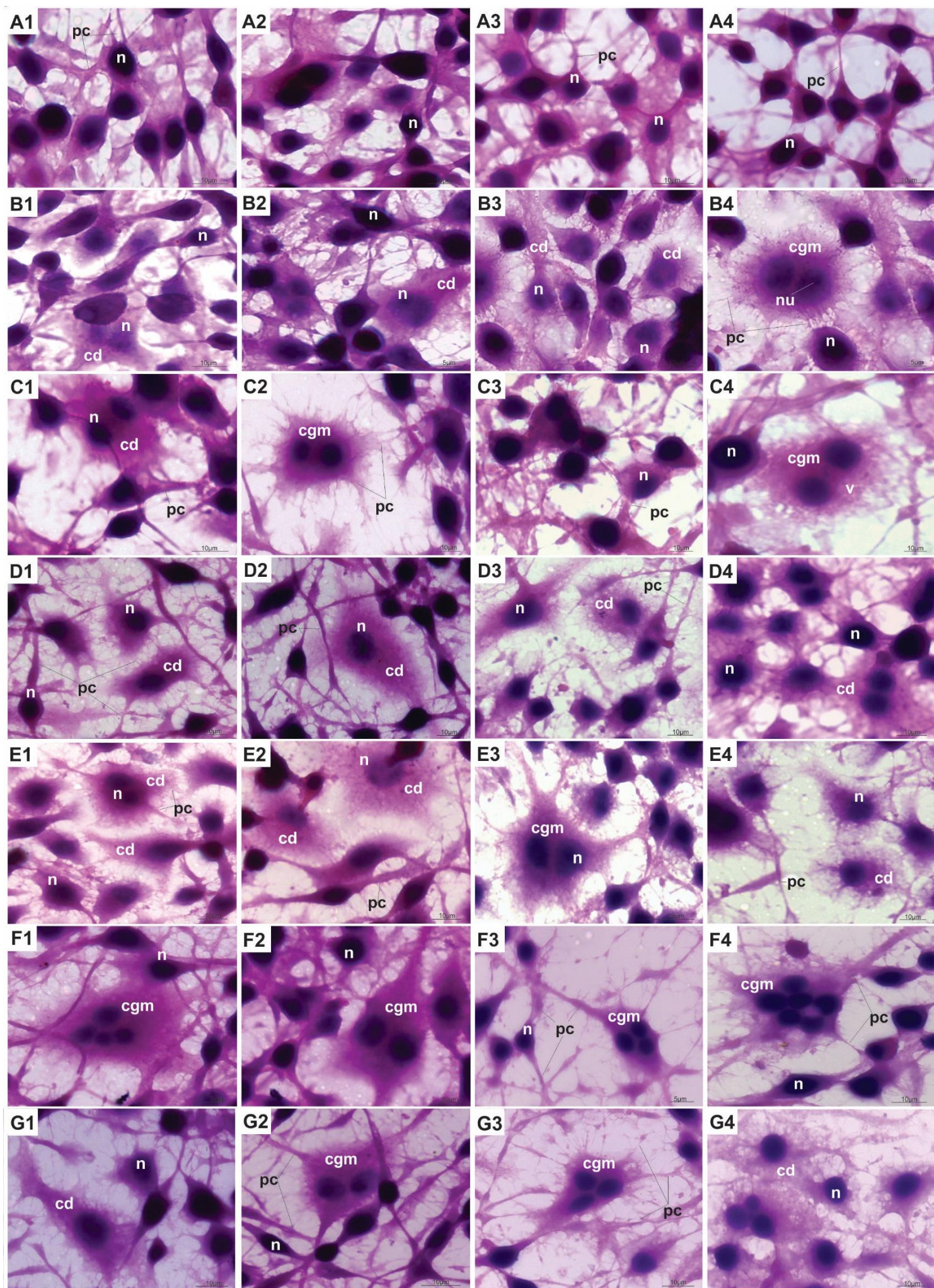


Figura 2: Análise morfológica das células da linhagem J774 expostas a diferentes concentrações do extrato de glândula salivar de fêmeas de carrapatos *R. sanguineus* s. l. alimentadas por quatro dias (**EG4**), no período de 24 (**1-2**) e 48 horas (**3-4**), coradas pela HE e observadas sob microscopia de luz de campo claro. **A1-4:** Grupo Controle Negativo (só células); **B1-4:** Grupo Controle (J774+LPS); **C1-4:** Células expostas a concentração de 4 µg/mL do EG2; **D1-4:** Células expostas a concentração de 2 µg/mL do EG2; **E1-4:** Células expostas a concentração de 1 µg/mL do EG2; **F1-4:** Células expostas a concentração de 0,5 µg/mL do EG2; **G1-4:** Células expostas a concentração de 0,1 µg/mL do EG2.

cd= citoplasma disperso; **cgm**= célula gigante multinucleada; **n**= núcleo; **nu**= nucléolo; **pc**= prolongamento citoplasmático, **v**= vacuolização.



DISCUSSÃO

A saliva dos carrapatos é considerada um arsenal farmacológico devido à presença na sua composição de bioativos com as mais variadas funções, tais como: ação vasodilatadora, anti-inflamatória, antihemostática e até mesmo antitumoral (ABREU et al., 2014; FRANCISCHETTI et al., 2009; CAMARGO-MATHIAS; FURQUIM; NUNES, 2011; MOR; FERREIRA; CAMPANELLI, 2006; RIBEIRO et al., 1985; XIANG et al., 2009). Segundo Furquim et al. (2014) o comportamento secretor das glândulas salivares das fêmeas de *R. sanguineus* s. l. durante o período de alimentação se modificaria de acordo com a resistência do hospedeiro, ou seja, ocorreriam modificações na produção de componentes da saliva (proteínas, lipídios, polissacarídeos, fosfatase ácida e cálcio) demonstrando a variação da complexidade bioquímica da mesma diante da alteração imunológica do hospedeiro. Acredita-se que isso ocorreria devido ao fato de que o sistema imune do hospedeiro teria coevoluído com os componentes da saliva dos carrapatos, resultando numa interação que poderia ser comparada a uma “corrida armamentista” entre os mecanismos de defesa de um e do poder de invasão do outro (KOTÁL et al., 2015).

Contudo, mesmo com o conhecimento da ação imunossupresora da saliva dos carrapatos *R. sanguineus* s. l., pouco se sabe sobre os mecanismos nela envolvidos, ou seja, quais seriam os moduladores ativos desse processo, bem como as possíveis alterações morfofisiológicas das células do sistema imune frente a exposição dessa saliva e, levando-se em consideração ainda os diferentes períodos do ciclo glandular, ou seja, início (2 dias), meio (4 dias) e final (6 dias) do processo de alimentação, para se entender quais seriam os processos imunológicos que ocorreriam nesses períodos.

Nessa perspectiva, o presente trabalho teve por objetivo analisar a ação imunomoduladora *in vitro* do extrato de glândula salivar de fêmeas de *R. sanguineus* s. l.

com 2 e 4 dias de alimentação em coelhas hospedeiras, sobre linhagens de células J774 expostas a ele por 24 e 48 horas, buscando detectar a ocorrência de alterações morfofisiológicas resultantes dessa exposição, por meio da realização de bioensaios de viabilidade celular, avaliação de NO, dosagem de citocinas e análise sob microscopia de luz de campo claro (coloração pela HE).

Os resultados aqui apresentados sobre a viabilidade de células J774 expostas aos extratos **EG2** e **EG4** mostraram que a concentração de 4 µg/mL do **EG2**, tanto no período de 24 quanto no de 48 horas reduziu a viabilidade celular em comparação as outras concentrações e ao Grupo Controle, sendo considerada significativa a diminuição da viabilidade no caso do período de 48 horas. Da mesma forma, o **EG4** na mesma concentração de 4 µg/mL provocou maior taxa de morte celular principalmente em 48 horas quando comparou-se às demais concentrações e ao Grupo Controle. Esses resultados sugeriram que ambos os extratos quando na maior concentração testada (4 µg/mL) teriam efeito citotóxico nessa linhagem celular, o qual seria intensificado depois de 48 horas. Concomitantemente, nessa mesma concentração foram observados aumentos significativos da taxa de liberação de NO na exposição a ambos os extratos (**EG2** e **EG4**) e nos diferentes períodos (24 e 48 horas), porém, sendo a maior liberação em 48 horas, assim como ocorrido nos testes de citotoxicidade. Essa correlação poderia ser explicada pelo fato de espécies reativas de nitrogênio, como o NO, quando em níveis baixos poderiam ser importantes sinalizadores celulares e até estimuladores de proliferação celular, porém, em níveis muito altos poderiam causar danos no DNA e nas proteínas celulares, consequentemente levando a morte apoptótica (ALBINA et al., 1993; JUSTO et al., 2015; MAROTTA; SAUTEBIN; ROSA, 1992).

Ainda sobre a avaliação da produção de NO, além das células J774 expostas a concentração de 4 µg/mL dos extratos **EG2** e **EG4**, aquelas expostas a 2 µg/mL do **EG2**

e **EG4** em 48 horas e a 1 µg/mL do **EG2** em 24 e 48 horas, também apresentaram aumento significativo na produção de NO. Os macrófagos podem produzir grandes quantidades de NO quando estimulados, visto esta ser uma molécula gasosa e inorgânica que é liberada pela enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) na produção de L-arginina (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2014). Sendo assim, o NO é considerado um importante mediador de respostas intra e extracelulares com atividade citotóxica, antitumoral e antiviral, desempenhando papel fundamental na resposta imune contra microrganismos e células tumorais, sendo um ótimo indicador de ativação de macrófagos (BUSSOLARO, 2009; OLIVEIRA, 2005). Esses dados levaram a sugerir que as concentrações dos extratos que estimularam a produção de maiores taxas de NO na linhagem J774 foram aquelas capazes de induzir a ativação dos macrófagos, tendo ação pró-inflamatória (KOPECKY; KUTHEJLOVA; PECHOVA, 1999; OLIVEIRA et al., 2010; OLIVEIRA, 2005; OLSON; VAN DER VLIET, 2012). No presente trabalho verificou-se que principalmente as menores concentrações (0,5 e 0,1 µg/mL) de ambos os extratos **EG2** e **EG4** em ambos os períodos diminuíram a liberação de NO, indicando provável efeito anti-inflamatório do extrato, dados que corroboraram aqueles da literatura, descritos para os efeitos da saliva (FERREIRA et al., 2003; FERREIRA; SILVA, 1998; GWAKISA et al., 2001; MOR; FERREIRA; CAMPANELLI, 2006).

Além de espécies reagentes de nitrogênio, macrófagos ativados também estão aptos a fagocitar microrganismos patogênicos, apresentar antígenos aos linfócitos T e secretar citocinas responsáveis por mediar todas essas atividades (MORITA et al., 2002). Desse modo, as mudanças no perfil de citocinas derivadas de macrófagos são excelentes indicativos de indução da resposta imune. As citocinas IL-2, IL-6 e TNF são consideradas pró-inflamatórias, e são responsáveis pela proliferação ou diferenciação de células efectoras do sistema imune. A IL-2 (interleucina-2) especificamente está associada a

proliferação, maturação e crescimento de linfócitos T, assim como a proliferação e diferenciação de células NK, e *in vitro* mostrou ser capaz de estimular a diferenciação de células B e à produção de anticorpos; a IL-6 sintetizada por fagócitos em resposta a presença de microrganismos e ainda outras citocinas como a IL-1 e TNF, possuiriam funções na estimulação da produção de neutrófilos, diferenciação de linfócitos B, e produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-17), inibindo a geração de células T reguladoras; o TNF- α (fator de necrose tumoral) tem função de recrutar neutrófilos e monócitos para o local da infecção, promovendo a coagulação sanguínea e, como o próprio nome indica, também seria capaz de promover a necrose tumoral, por trombose nos vasos sanguíneos responsáveis pela irrigação das células tumorais (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2014).

A indução da produção de citocinas pró-inflamatórias, na presença de estímulos apropriados, como o LPS por exemplo, iniciaria a resposta inflamatória (FERREIRA; LIONI, 2005). No entanto, a literatura relatou que a saliva de diferentes espécies de carrapatos teria capacidade de regular e inibir tais citocinas. Foram realizados estudos com *Ixodes scapularis* onde foi identificada uma proteína salivar (Salp15) que foi classificada como sendo responsável pela inibição da produção de IL-2 durante o desenvolvimento da resposta imune (JUNCADELLA et al., 2007); a saliva da mesma espécie demonstrou também ter potencial para inibir a produção de TNF, IL-1 β , IL-6, e IL-12p40 em macrófagos de murinos depois da estimulação destes com LPS (CHEN et al., 2012); o extrato salivar de *R. microplus* causou diminuição na produção de TNF, IFN- γ e IL-12 em macrófagos também estimulados por LPS durante 24 horas (BRAKE; PÉREZ DE LEÓN, 2012); assim como o extrato de glândula salivar de *Dermacentor andersoni* inibiu a síntese de IL-1 e TNF em macrófagos de bovinos, e ainda diminuiu a produção de IL-2 e IFN- γ em murinos (RAMACHANDRA; WIKEL, 1992). Os

resultados obtidos neste estudo sobre a dosagem de citocinas corrobora outros estudos já realizados, uma vez que as diferentes concentrações de **EG2** provocaram diminuição na produção de IL-6 e TNF- α tanto no tempo de 24 quanto no de 48 horas de exposição, (sendo em 48 horas a diminuição da liberação de TNF- α considerada significativa na concentrações 4 e 2 $\mu\text{g/mL}$), bem como a do **EG4** visto ter havido diminuição significativa da produção de IL-6 na exposição às concentrações de 1; 0,5 e 0,1 $\mu\text{g/mL}$ e de TNF- α em todas as diferentes concentrações.

Os resultados obtidos sobre a dosagem de citocinas neste estudo também mostraram que o **EG2** na concentração de 2 $\mu\text{g/mL}$ (48 horas de exposição) e 1 $\mu\text{g/mL}$ (em 24 horas de exposição) foram capazes de promover a liberação de maiores quantidades de IL-2 nas células J774, assim como nestas mesmas concentrações 2 e 1 $\mu\text{g/mL}$ de **EG4** no período de 48 horas. Além disso, apesar de não ter havido aumento dos valores de IL-6 nem TNF- α , houve aumento na liberação de NO, como já mencionado anteriormente, resultados estes que sugeriram a ocorrência de pouca atividade pró-inflamatória quando da exposição dessas concentrações dos extratos, e ainda demonstrou a importância em se levar em consideração os diferentes períodos do ciclo secretor das glândulas salivares, o tempo de exposição aos extratos e as concentrações dos mesmos em cada espécie.

Concomitantemente, o **EG2** foi capaz de estimular a síntese da citocina IL-10 principalmente na concentração 0,5 $\mu\text{g/mL}$ em 24 horas, e 4; 1 e 0,1 $\mu\text{g/mL}$ em 48 horas. Já o **EG4** teve aumento na produção de IL-10 em todas as concentrações em 24 horas e apenas na de 0,1 $\mu\text{g/mL}$ em 48 horas. A IL-10 tem sido considerada uma citocina reguladora, por estar envolvida na inibição de macrófagos e de células dendríticas ativadas, funcionando como um exemplo de *feedback* negativo, ou seja, inativando os macrófagos que a secretariam e consequentemente, diminuindo a atividade de linfócitos

T e modulando a resposta imune (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2014). Esses dados, corroboraram os estudos realizados com a mesma espécie *R. sanguineus* s. l. (FERREIRA; SILVA, 1999; MATSUMOTO et al., 2003; MOR; FERREIRA; CAMPANELLI, 2006; OLIVEIRA et al., 2011) sobre o potencial imunomodulatório do extrato de glândulas salivares sobre as células do sistema imune.

A análise morfofisiológica das células J774 sob microscopia de luz e coloração pela HE, mostrou níveis distintos de ativação dos macrófagos em função da exposição às diferentes concentrações dos extratos **EG2** e **EG4**, com pequenas diferenças sendo observadas entre os períodos de exposição. O Grupo Controle Negativo (só células) apresentou células com morfologia de células neoplásicas de sarcoma histiocítico, ou seja, com pleomorfismo, presença de células gigantes multinucleadas, nas formas redonda ou estelar, células com prolongamentos, citoplasma vacuolizado com e núcleos arredondados ou ovais, variando de tamanho e em alguns casos com cromatina condensada, corroborando as características descritas por Affolter e Moore (2002) para células neoplásicas de sarcoma histiocítico. Já o Grupo Controle (J774+LPS) exibiu macrófagos com características típicas de ativação, ou seja, citoplasma disperso, abundantes prolongamentos citoplasmáticos, células com núcleos hipertróficos e células gigantes multinucleadas (NORTH, 1978).

As alterações morfológicas de ativação ocorreram nas concentrações 2 e 1 µg/mL do **EG2** onde observou-se mais células com citoplasma disperso, maior incidência de células gigantes multinucleadas e mais células com mais prolongamentos citoplasmáticos, confirmando os resultados obtidos da dosagem de citocinas e da avaliação de NO, visto essas duas concentrações do **EG2** terem demonstrado potencial pró-inflamatório e, portanto, com provocando a intensa ativação de macrófagos. A exposição ao **EG4**, no entanto, teve as alterações mais visíveis nas concentrações 4; 2 e

1 µg/mL, pois observou-se características de intensa ativação de macrófagos, ou seja, células espalhadas, com citoplasma muito disperso e presença de numerosos prolongamentos citoplasmáticos. Esses dados também corroboraram aqueles obtidos principalmente na avaliação de NO (4 e 2 µg/mL) e no aumento da liberação de IL-2 (2 e 1 µg/mL), confirmando então o potencial inflamatório dessas concentrações. Além disso, nas demais concentrações de ambos os extratos, apesar de terem sido observados macrófagos ativados, evento esperado uma vez que essas células foram também estimuladas com LPS, a ativação ocorreu com menor intensidade e, ainda a exposição aos respectivos extratos diminuiu e regulou as características de ativação, corroborando os dados de aumento de citocina IL-10, principalmente nas menores concentrações dos extratos **EG2** e **EG4**, ressaltando que a IL-10 teria função na modulação e na inativação de macrófagos anteriormente ativados (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2014).

Levando-se em consideração os aspectos apresentados no presente trabalho, pode-se inferir que: **a)** tanto o extrato **EG2** quanto o **EG4** na concentração de 4 µg/mL apresentou citotoxicidade para células da linhagem J774 quando expostas por 24 e 48 horas; **b)** o **EG2** na concentração de 2 µg/mL no período de exposição de 48 horas de e 1 µg/mL no de 24 horas de exposição e o **EG4** nas concentrações 2 e 1 µg/mL no período de 48 horas de exposição apresentaram atividade pró-inflamatória, confirmada pelo aumento de liberação de NO, liberação de citocina pró-inflamatória (IL-2) e na presença de características morfológicas quando da análise sob microscopia de luz (coloração pela HE); **c)** as demais concentrações dos extratos **EG2** e **EG4** tiveram atividade imunomodulatória, demonstrada pela diminuição de liberação de NO, concomitantemente à diminuição de liberação de citocinas pró-inflamatórias (IL2, IL-6 e TNF-α), aumento da síntese de IL-10, confirmadas também pela análise morfofisiológica.

Assim os resultados obtidos nesse estudo são ainda pioneiros e sabe-se que há muito a se esclarecer sobre os mecanismos envolvidos na modulação do sistema imune do hospedeiro quando estimulado pelos extratos de glândulas salivares de carrapatos *R. sanguineus* s. l. Os resultados apresentados, no entanto, já sinalizaram que esse é um caminho que se bem explorado, poderá auxiliar na identificação dos processos envolvidos na relação ectoparasita-hospedeiro, auxiliando assim no entendimento e fornecendo informações que serão úteis no desenvolvimento de novos meios de controle desse ectoparasita que sejam mais efetivos.

REFERÊNCIAS

ABBAS, Abul K.; LICHTMAN, Andrew HH; PILLAI, Shiv. Cellular and Molecular Immunology E-Book. **Elsevier Health Sciences**, 2014.

ABREU, M. R. et al. Salivary Glands of Female Ticks *Rhipicephalus sanguineus* Like a Potential Source of Molecules with Inhibitory Action: In vivo study with Walker 256 Tumor Cells. **Journal of Pharmaceutical Care & Health Systems**, v. 1, n. 4, p. 1–8, 2014.

AFFOLTER, V. K.; MOORE, P. F. Localized and disseminated histiocytic sarcoma of dendritic cell origin in dogs. **Veterinary pathology**, v. 39, n. 1, p. 74–83, 2002.

ALBINA, J E. et al. Nitric oxide-mediated apoptosis in murine peritoneal macrophages. **The Journal of Immunology**, v. 150, n. 11, p. 5080-5085, 1993.

ALVES, A. L.; RIBEIRO, F. de A. Q. O papel das citocinas no colesteatoma adquirido da orelha média: revisão da literatura. **Rev. bras. otorrinolaringol**, v. 70, n. 6, p. 813-818, 2004.

ANDERSON, J. F.; MAGNARELLI, L. A. Biology of ticks. **Infectious disease clinics of North America**, v. 22, n. 2, p. 195–215, jun. 2008.

BARKER, S. C.; MURRELL, A. Systematics and evolution of ticks with a list of valid genus and species names. **Parasitology**, v. 129 Suppl, n. February, p. S15–S36, 2004.

BECHARA, G. H. et al. *Rhipicephalus sanguineus* tick in Brazil: feeding and reproductive aspects under laboratorial conditions. **Braz J Vet Parasitol**, v. 4, n. 2, p. 61-66, 1995.

BINNINGTON, K. C. Sequential changes in salivary gland structure during attachment and feeding of the cattle tick, *Boophilus microplus*. **International Journal for Parasitology**, v. 8, n. 2, p. 97–115, 1978.

BOWMAN, A. S.; DILLWITH, J. W.; SAUER, J. R. Tick salivary prostaglandins: Presence, origin and significance. **Parasitology Today**, v. 12, n. 10, p. 388-396, 1996.

BRAKE, D. K.; PÉREZ DE LEÓN, A. A. Immunoregulation of bovine macrophages by factors in the salivary glands of *Rhipicephalus microplus*. **Parasites & vectors**, v. 5, p. 38, 2012.

BROSSARD, M.; WIKEL, S. K. Tick immunobiology. **Parasitology**, v. 129, n. 7, p. S161–S176, 2004.

BUSSOLARO, Daniel. **Efeitos in vitro do chumbo inorgânico [Pb (II)] na resposta imunitária de macrófagos peritoneais de camundongo**. 2009. 69p. Dissertação de Mestrado (Biologia Celular e Molecular)- Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná. 2009.

CAMARGO-MATHIAS, M.; FURQUIM, K. S.; NUNES, P. Immunomodulatory effects of tick saliva. **ISJ**, v. 8, p. 231–240, 2011.

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

CHEN, G. et al. *Ixodes scapularis* saliva mitigates inflammatory cytokine secretion during *Anaplasma phagocytophilum* stimulation of immune cells. **Parasites & vectors**, v. 5, n. 1, p. 229, 2012.

CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M. et al. A new tick Kunitz type inhibitor, Amblyomin-X, induces tumor cell death by modulating genes related to the cell cycle and targeting the ubiquitin-proteasome system. **Toxicon**, v. 56, n. 7, p. 1145–1154, 2010.

CIPRANDI, A. et al. *Boophilus microplus*: Its saliva contains microphilin, a small thrombin inhibitor. **Experimental Parasitology**, v. 114, n. 1, p. 40–46, 2006.

D'ACQUISTO, Fulvio et al. Involvement of NF- κ B in the regulation of cyclooxygenase-2 protein expression in LPS-stimulated J774 macrophages. **FEBS letters**, v. 418, n. 1-2, p. 175-178, 1997.

DANTAS-TORRES, F. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): From taxonomy to control. **Veterinary Parasitology**, 2008.

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

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

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

DENARDI, S. E. et al. Morphological characterization of the ovary and vitellogenesis dynamics in the tick *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 125, n. 3–4, p. 379–395, 2004.

FERREIRA, B. R. et al. Antigens from *Rhipicephalus sanguineus* ticks elicit potent cell-mediated immune responses in resistant but not in susceptible animals. **Veterinary Parasitology**, v. 115, n. 1, p. 35–48, 2003.

FERREIRA, B. R.; LIONI, L. M. Y. Expressão gênica de citocinas em cobaias resistentes a carrapatos *Rhipicephalus sanguineus*. **Medicina**, p. 1–77, 2005.

FERREIRA, B. R.; SILVA, J. S. Saliva of *Rhipicephalus sanguineus* tick impairs T cell proliferation and IFN- γ -induced macrophage microbicidal activity. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 64, n. 3, p. 279–293, 1998.

FERREIRA, B. R.; SILVA, J. S. Successive tick infestations selectively promote a T-helper 2 cytokine profile in mice. **Immunology**, v. 96, n. 3, p. 434–439, 1999.

FRANCISCHETTI, I. M. B. et al. The role of saliva in tick feeding. **Frontiers in bioscience (Landmark edition)**, v. 14, p. 2051–88, 2009.

FRANCISCHETTI, I. M. B.; MATHER, T. N.; RIBEIRO, J. M. C. Tick saliva is a potent inhibitor of endothelial cell proliferation and angiogenesis. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 94, n. 1, p. 167–174, 2005.

FURQUIM, K. C. S. et al. Cytology & Histology Secretory Behavior of Salivary Glands

of *Rhipicephalus sanguineus* Fed on Immunized Rabbit Hosts. **J Cytol Histol**, v. 4, 2014.

FURQUIM, K. C. S.; BECHARA, G. H.; CAMARGO MATHIAS, M. I. Degeneration of salivary glands of males of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari, Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 154, n. 3–4, p. 325–335, 2008.

FURQUIM, K. C. S.; BECHARA, G. H.; MATHIAS, M. I. C. 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**, v. 50, n. 1, p. 59–70, 2010.

GRAY, J. et al. Systematics and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 4, n. 3, p. 171-180, 2013.

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

GUGLIELMONE, Alberto A. et al. The hard ticks of the world. **Springer**, Dordrecht. doi, v. 10, n. 1007, p. 978-94, 2014.

GWAKISA, P. et al. Salivary gland extract of *Rhipicephalus appendiculatus* ticks inhibits in vitro transcription and secretion of cytokines and production of nitric oxide by LPS-

stimulated JA-4 cells. **Veterinary Parasitology**, v. 99, n. 1, p. 53–61, 2001.

HEBLING, L. M. F. G.; CMARGO-MATHIAS, M. I.; FURQUIM, K. C. S. **Estudo dos efeitos de extratos de glândulas salivares de fêmeas de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari:Ixodidae) na resposta imunológica de hospedeiros pós inoculados**. 2011. Dissertação De Mestrado (Biologia Celular e Molecular), Instituto de Biociências, UNESP *campus* Rio Claro, São Paulo. 2011.

JUNCADELLA, I. J. et al. T-cell signaling pathways inhibited by the tick saliva immunosuppressor, Salp15. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 49, n. 3, p. 433–438, 2007.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**, 12^aed. 2014.

JUSTO, O. R. et al. Evaluation of in vitro anti-inflammatory effects of crude ginger and rosemary extracts obtained through supercritical CO₂ extraction on macrophage and tumor cell line : the influence of vehicle type. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, p. 1–15, 2015.

KOPECKY, J.; KUTHEJLOVA, M.; PECHOVA, J. Salivary gland extract from *Ixodes ricinus* ticks inhibits production of interferon-gamma by the upregulation of interleukin-10. **Parasite immunology**, v. 21, n. 7, p. 351–356, 1999.

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

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

KUTHEJLOVA, M. et al. Salivary gland extract inhibits killing of *Borrelia afzelli* spirochetes by mouse macrophages. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 1, p. 575–578, 2001.

LABRUNA, M. B. et al. A preliminary investigation of *Ehrlichia* species in ticks, humans, dogs, and capybaras from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 143, n. 2, p. 189–195, 2007.

MACEDO-RIBEIRO, S. et al. Isolation, cloning and structural characterization of boophilin, a multifunctional Kunitz-type proteinase inhibitor from the cattle tick. **PLoS ONE**, v. 3, n. 2, p. 1–17, 2008.

MACRI, M. M. et al. Influência do pneumoperitônio nas funções hepática e renal e na liberação de citocinas pró-inflamatórias em modelo experimental de endotoxemia induzida por lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*. **ABCD arq bras cir dig**, v. 22, n. 4,

p. 206-11, 2009.

MANS, B. J. et al. Pathogenic mechanisms of sand tampan toxicoses induced by the tick, *Ornithodoros savignyi*. **Toxicon**, v. 40, n. 7, p. 1007–1016, 2002.

MAROTTA, Principia; SAUTEBIN, Lidia; ROSA, Massimo. Modulation of the induction of nitric oxide synthase by eicosanoids in the murine macrophage cell line J774. **British journal of pharmacology**, v. 107, n. 3, p. 640-641, 1992.

CAMARGO-MATHIAS, MI; FURQUIM, KCS; NUNES, P. H. Immunomodulatory effects of tick saliva. **Invertebr. Survival J.**, v. 8, p. 231-240, 2011.

MATSUMOTO, K. et al. Effects of salivary gland extract from *Rhipicephalus sanguineus* on IgG subclass production and cytokine mRNA expression in mononuclear cells of canine peripheral blood. **The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science**, v. 65, n. 1, p. 137–40, 2003.

MOR, D. D.; FERREIRA, B. R.; CAMPANELLI, A. P. **Modulação da resposta imune pela saliva de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* : estudo do envolvimento de células T regulatórias**. 2006. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo. 2006.

MORITA, H et al. Cytokine production by the murine macrophage cell line J774. 1 after exposure to lactobacilli. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 66, n. 9, p. 1963-1966, 2002.

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

NAVA, S. et al. The taxonomic status of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806). **Veterinary Parasitology**, v. 208, n. 1–2, p. 2–8, 2015.

NORTH, Robert J. Opinions the concept of the activated macrophage. **The Journal of Immunology**, v. 121, n. 3, p. 806-809, 1978.

NUTTALL, P. A.; LABUDA, M. Tick-host interactions: saliva-activated transmission. **Parasitology**, v. 129, p. S177–S189, 2004.

OLIVEIRA, C. J. F. et al. Tick saliva induces regulatory dendritic cells: MAP-kinases and Toll-like receptor-2 expression as potential targets. **Veterinary Parasitology**, v. 167, n. 2–4, p. 288–297, 2010.

OLIVEIRA, C. J. F. et al. Deconstructing tick saliva: Non-protein molecules with potent

immunomodulatory properties. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 13, p. 10960–10969, 2011.

OLIVEIRA, P. R. et al. Seasonal dynamics of the Cayenne tick, *Amblyomma cajennense* on horses in Brazil. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 17, n. 4, p. 412–416, 2003.

OLIVEIRA, S. M. **Triagem de medicamentos homeopáticos que ativam macrófagos com detecção e quantificação de IFN- γ , IL-4 e NO**. 2005. Dissertação de Mestrado (Biologia Celular e Molecular) departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná. 2005.

OLSON, N.; VAN DER VLIET, A. Interactions between nitric oxide and hypoxia-inducible factor signaling pathways in inflammatory disease. **Nitric Oxide**, v. 25, n. 2, p. 125–137, 2012.

RALPH, P.; NAKOINZ, I. Direct Toxic Effects of Immunopotentiators on Monocytic, Myelomonocytic, and Histiocytic or Macrophage Tumor Cells in Culture. **Cancer Research**, v. 37, n. 2, p. 546–550, 1977.

RAMACHANDRA, R. N.; WIKEL, S. K. Modulation of host-immune responses by ticks (Acari: Ixodidae): effect of salivary gland extracts on host macrophages and lymphocyte cytokine production. **Journal of medical entomology**, v. 29, n. 5, p. 818–826, 1992.

RIBEIRO, J. C.; WEIS, J. J.; TELFORD, S. R. Saliva of the tick *Ixodes dammini* inhibits neutrophil function. **Experimental Parasitology**, v. 70, n. 4, p. 382–388, 1990.

RIBEIRO, J. M. et al. Antihemostatic, antiinflammatory, and immunosuppressive properties of the saliva of a tick, *Ixodes dammini*. **The Journal of experimental medicine**, v. 161, n. 2, p. 332–44, 1985.

ROCHA, F. A. **Efeitos in vitro e in vivo do Extrato de Glândulas Salivares de Fêmeas de Carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* com 2 Dias de Alimentação Sobre Diferentes Modelos Tumoriais**. 2014. Tese de Doutorado (Biologia Celular e Molecular), Instituto de Biociências, UNESP campus Rio Claro, São Paulo. 2014.

SA-NUNES, A. et al. Prostaglandin E2 Is a Major Inhibitor of Dendritic Cell Maturation and Function in *Ixodes scapularis* Saliva. **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 3, p. 1497–1505, 2007.

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

SCHOELER, G. B.; WIKEL, S. K. Modulation of host immunity by haematophagous

arthropods. **Annals of tropical medicine and parasitology**, v. 95, n. 8, p. 755–771, 2001.

SEDMAN, J. J.; GROSSBERG, S. E. A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G250. **Analytical biochemistry**, v. 79, n. 1-2, p. 544-552, 1977.

SIMONS, S. M. et al. The action of *Amblyomma cajennense* tick saliva in compounds of the hemostatic system and cytotoxicity in tumor cell lines. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 65, n. 6, p. 443–450, 2011.

SONENSHINE, D. E.; ROE, R. M. **Biology of ticks vol. 1 e 2**. New York: Oxford University Press, 2014.

WALKER, A. R. **Arthropods of humans and domestic animals: a guide to preliminary identification**. Springer Science & Business Media, 1994.

WANG, X. et al. Variabilin, a novel RGD-containing antagonist of glycoprotein IIb-IIIa and platelet aggregation inhibitor from the hard tick *Dermacentor variabilis*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 30, p. 17785–17790, 1996.

WAXMAN, L.; CONNOLLY, T. M. Isolation of an inhibitor selective for collagen-stimulated platelet aggregation from the soft tick *Ornithodoros moubata*. **Journal of**

Biological Chemistry, v. 268, n. 8, p. 5445–5449, 1993.

WEISS, B. L.; KAUFMAN, W. R. Two feeding-induced proteins from the male gonad trigger engorgement of the female tick *Amblyomma hebraeum*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 16, p. 5874–9, 2004.

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, n. 6, p. 965–973, 1991.

WIKEL, Stephen K. Tick modulation of host immunity: an important factor in pathogen transmission. **International journal for parasitology**, v. 29, n. 6, p. 851-859, 1999.

XIANG, F. YU et al. Proteomic Analysis of Proteins in the Salivary Glands of the Fed and Unfed Female Tick *Rhipicephalus haemaphysaloides*. **Agricultural Sciences in China**, v. 8, n. 1, p. 121–127, 2009.

YODER, J. A. et al. Developmental profiles in tick water balance with a focus on the new Rocky Mountain spotted fever vector, *Rhipicephalus sanguineus*. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 20, n. 4, p. 365–372, 2006.

ZHU, K. et al. Isolation and characterization of americanin, a specific inhibitor of thrombin, from the salivary glands of the lone star tick *Amblyomma americanum* (L.).

Experimental parasitology, v. 87, n. 1, p. 30–38, 1997.

DISCUSSÃO GERAL

Os carrapatos possuem grande importância médico-veterinária, por serem vetores de bactérias, vírus, protozoários e helmintos, em animais domésticos, silvestres e para o próprio homem (DANTAS-TORRES et al., 2010). O processo espoliativo e a transmissão de agentes patogênicos ocorrem devido à ação da saliva, secretada pelas glândulas salivares, fundamentais para o seu sucesso biológico (FRANCISCETTI et al., 2009).

A saliva é uma mistura complexa de bioativos e com funções que incluem a capacidade de modular os processos hemostático, inflamatório e imunológico do hospedeiro, permitindo que o carrapato permaneça fixado se alimentando durante longos períodos (BOWMAN; DILLWITH; SAUER, 1996). Além disso, ela pode sofrer alterações em sua composição durante o período de alimentação diante das alterações imunológicas do hospedeiro (FURQUIM et al., 2014), devido ao sistema imune do hospedeiro e aos componentes da saliva dos carrapatos terem coevoluído resultando numa interação entre os mecanismos de defesa do hospedeiro e do poder de invasão do ectoparasita (KOTÁL et al., 2015).

Devido a sua importância muitos trabalhos relacionados ao extrato de glândulas salivares de *R. sanguineus* s. l. tem tratado das propriedades imunomodulatórias da saliva ou do desenvolvimento da resposta imuneinflamatória do hospedeiro, visando entender a relação imunobiológica na interface carrapato-hospedeiro e buscando novas maneiras de controlar esses ectoparasitas, como por exemplo por meio da produção de vacinas (FERREIRA et al., 2003; HEBLING; CMARGO-MATHIAS; FURQUIM, 2011; MATSUMOTO et al., 2003). No entanto, mesmo com o conhecimento já adquirido sobre a ação imunossupressora da saliva dessa espécie, ainda há muito a se elucidar sobre os mecanismos envolvidos na modulação do sistema imune do hospedeiro e os fatores

mediadores de tal resposta imunológica, levando-se em conta as diferentes necessidades imunomodulatórias conforme o ciclo glandular.

Com isso, o presente trabalho teve como objetivos analisar a ação imunomoduladora *in vitro* do extrato de glândulas salivares de fêmeas de *R. sanguineus* s. l. com 2 e 4 dias de alimentação em coelhas hospedeiras, sobre macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e linhagem de células J774, buscando estabelecer a ocorrência de alterações morfofisiológicas nessas células expostas às diferentes concentrações dos extratos, por meio da realização de bioensaios de viabilidade celular, avaliação de NO, dosagem de citocinas e análise morfológica sob microscopia de luz de campo claro (coloração pela HE), bem como por meio de avaliações sob microscopia de varredura.

Os resultados da viabilidade celular, demonstraram que os extratos de glândulas salivares de 2 e 4 dias (**EG2** e **EG4**) foram citotóxicos para as células da linhagem J774 e não para os macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, uma vez que a mesma concentração de 4 µg/mL de ambos os extratos causou diminuição significativa de células viáveis. Esses dados confirmaram estudo já realizado com o extratos de glândulas salivares de carrapatos em células de diversas linhagens tumorais quando se demonstrou a atividade antitumoral do mesmo (ABREU et al., 2014; CHUDZINSKI-TAVASSI et al., 2010; ROCHA, 2014; SIMONS et al., 2011), justificando sua citotoxicidade mais notável em células neoplásicas como a linhagem J774, originadas de sarcoma histiocítico (RALPH; NAKOINZ, 1977).

O resultado da avaliação da liberação das taxas de NO foi muito semelhante entre as duas linhagens celulares (J774 e macrófagos peritoneais), uma vez que em ambas houve aumento nas maiores concentrações (4 e 2 µg/mL) dos extratos **EG2** e **EG4** e, concomitantemente a esse aumento na produção de NO, observou-se também nas duas linhagens o aumento da taxa de morte celular. Tal correlação pode ser explicada pelo fato

de que espécies reativas de nitrogênio, como o óxido nítrico, quando em níveis muito altos podem causar danos no DNA e nas proteínas celulares, consequentemente levando as células à morte apoptótica (ALBINA et al., 1993; JUSTO et al., 2015; MAROTTA; SAUTEBIN; ROSA, 1992). Além disso, NO é uma molécula gasosa e inorgânica liberada por macrófagos quando estimulados por IFN ou LPS e produzido pela isoforma induzida da enzima óxido nítrico sintase (iNOS) devido a conversão de L-arginina em L-citrulina (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2014). Sendo assim, o NO é considerado um importante mediador de respostas intra e extracelulares com atividade citotóxica, antitumoral e antiviral, desempenhando papel fundamental na resposta imune contra microrganismos e células tumorais, sendo um ótimo indicador de ativação de macrófagos (BUSSOLARO, 2009; OLIVEIRA, 2005). Dessa forma, os dados aqui obtidos sugeriram que as concentrações que apresentaram maiores taxas de NO foram aquelas que mais ativaram os macrófagos, e por isso teriam perfil considerado pró-inflamatório (KOPECKY; KUTHEJLOVA; PECHOVA, 1999; OLIVEIRA et al., 2010; OLIVEIRA, 2005).

No entanto, também em ambas as linhagens aqui testadas as menores concentrações (0,5 e 0,1 µg/mL) de ambos os extratos **EG2** e **EG4** foram capazes de diminuir a liberação de NO, indicando provável efeito anti-inflamatório do extrato, fato já bem descrito para a saliva (FERREIRA et al., 2003; FERREIRA; SILVA, 1998; GWAKISA et al., 2001; MOR; FERREIRA; CAMPANELLI, 2006).

Adicionalmente, a dosagem de citocinas realizada nas células da linhagem J774 mostrou o potencial imunomodulatório dos extratos salivares **EG2** e **EG4**, visto estes terem diminuído a síntese de citocinas pró-inflamatórias como a IL-2, IL-6 e TNF- α , ao mesmo tempo que aumentaram a liberação da citocina reguladora e anti-inflamatória IL-10, dados que corroboraram aqueles registrados na literatura sobre a capacidade da saliva de diferentes espécies de carrapatos em inibir ou diminuir a síntese de citocinas

inflamatórias, como em *Ixodes scapularis* onde foi identificada uma proteína salivar (Salp15) responsável pela inibição da produção de IL-2 durante o desenvolvimento da resposta imune (JUNCADELLA et al., 2007); a saliva da mesma espécie demonstrou ser inibidora da produção de TNF, IL-1 β , IL-6, e IL-12p40 em macrófagos de murinos depois de estimulados com LPS (CHEN et al., 2012); o extrato salivar de *R. microplus* registrou diminuição na produção de TNF, IFN- γ e IL-12 em macrófagos também estimulados por LPS durante 24 horas (BRAKE; PÉREZ DE LEÓN, 2012); assim como o extrato de glândula salivar de *Dermacentor andersoni* inibiu a síntese de IL-1 e TNF em macrófagos de bovinos, e ainda diminuiu a produção de IL-2 e IFN- γ em murinos (RAMACHANDRA; WIKEL, 1992). Já a IL-10 foi considerada uma citocina reguladora, por estar envolvida na inibição de macrófagos e de células dendríticas ativadas, inativando-as, diminuindo a atividade de linfócitos T e modulando a resposta imune (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2014). Assim, os dados aqui obtidos corroboram aqueles obtidos em estudos com a mesma espécie sobre o potencial imunomodulatório do extrato de glândulas salivares de *R. sanguineus* s. l. em células do sistema imune (FERREIRA; SILVA, 1999; MATSUMOTO et al., 2003; MOR; FERREIRA; CAMPANELLI, 2006; OLIVEIRA et al., 2011).

O presente estudo revelou que a exposição das células ao **EG2** na concentração de 2 μ g/mL (48 horas de exposição) e 1 μ g/mL (em 24 horas de exposição) promoveu a liberação de maiores quantidades de IL-2 pelas células J774, assim como ocorreu nas mesmas concentrações 2 e 1 μ g/mL do **EG4** no período de 48 horas. Além disso, apesar de não ter ocorrer aumento dos valores de IL-6 nem TNF- α , houve maior liberação de NO, sugerindo indício de atividade pró-inflamatória dos extratos nestas concentrações, reforçando a importância em se levar em consideração os diferentes períodos do ciclo glandular, o tempo de exposição aos extratos e as concentrações dos mesmos em cada

espécie, e ainda abre novas perspectivas sobre a imunogenicidade do extrato de glândulas salivares de carrapatos *R. sanguineus* s. l. para o desenvolvimento de futuras vacinas.

Finalmente sobre as alterações morfofisiológicas observadas nas duas linhagens celulares, os resultados aqui obtidos permitem afirmar que as maiores concentrações (4 e 2 µg/mL) de **EG2** e **EG4** sobre os macrófagos peritoneais superativaram os mesmos, inclusive mostrando indícios de morte celular apoptótica nessas células. Já nas células da linhagem J774, as concentrações 4; 2 e 1 µg/mL causaram alterações mais intensas quando comparadas às dos grupos controle (células expostas e não expostas ao LPS), com presença de citoplasma mais disperso, de abundantes prolongamentos citoplasmáticos e maior incidência de células gigantes multinucleadas. No entanto, as menores concentrações (0,5 e 0,1 µg/mL) dos extratos **EG2** e **EG4** foram em ambas as linhagens capazes de regular e diminuir tais características de ativação de macrófagos. Portanto, os resultados obtidos da análise morfofisiológica confirmaram aqueles demonstrados no teste de viabilidade, na avaliação de NO, e no caso das células J774, na dosagem de citocinas.

Desse modo, compreende-se que ainda há muito a se esclarecer sobre os mecanismos envolvidos na modulação do sistema imune do hospedeiro por extratos de glândulas salivares de carrapatos *R. sanguineus* s. l., bem como saber quais são as alterações morfofisiológicas por eles estimuladas, no entanto, destaca-se aqui a relevância dos resultados obtidos neste estudo considerando os dois períodos do ciclo glandular (2 e 4 dias), diferentes concentrações dos extratos, e duas linhagens de macrófagos diferentes, na tentativa de se identificar os processos envolvidos nessa relação ectoparasita-hospedeiro, no auxílio do entendimento e do desenvolvimento de novos meios de controle deste importante ectoparasita.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

- As concentrações (4; 2; 1; 0,5 e 0,1 $\mu\text{g/mL}$) dos extratos **EG2** e **EG4** de glândulas salivares de fêmeas de carrapatos *R. sanguineus* s. l. não apresentaram citotoxicidade significativa sobre macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, no entanto, no extrato **EG2** a concentração de 4 $\mu\text{g/mL}$ apresentou citotoxicidade sobre células da linhagem J774 quando expostas por 48 horas;
- As concentrações de 4 e 2 $\mu\text{g/mL}$ de ambos os extratos (**EG2** e **EG4**) estimularam perfis pró-inflamatórios em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, confirmados pelos testes de viabilidade celular e de produção de NO, corroborando as análises morfológicas sob microscopia de luz e eletrônica de varredura;
- As concentrações 1; 0,5 e 0,1 $\mu\text{g/mL}$ dos extratos **EG2** e **EG4**, por sua vez, demonstraram perfis imunomodulatórios em macrófagos peritoneais, confirmados principalmente pela análise morfológica sob microscopia de luz e eletrônica de varredura, mas não pela dosagem de NO, o que sugeriu que essa imunomodulação seria desencadeada por outros mediadores, possivelmente por citocinas;
- A concentração de 2 $\mu\text{g/mL}$ no tempo de 48 horas de exposição e 1 $\mu\text{g/mL}$ no de 24 horas de exposição do **EG2** e as concentrações 2 e 1 $\mu\text{g/mL}$ o **EG4** em 48 horas de exposição também apresentaram atividade pró-inflamatória em células da linhagem J774, confirmada pelo aumento da liberação NO, de citocina pró-inflamatória (IL-2) e análise morfológica sob microscopia de luz;
-

- As demais concentrações dos extratos **EG2** e **EG4** tiveram atividade imunomodulatória sobre as células da linhagem J774 demonstrada pela diminuição de liberação de NO, concomitantemente a diminuição de citocinas pró-inflamatórias (IL2, IL-6 e TNF- α), aumento da síntese de IL-10, e confirmada pela análise morfológica sob microscopia de luz.

REFERÊNCIAS

ABBAS, Abul K.; LICHTMAN, Andrew HH; PILLAI, Shiv. Cellular and Molecular Immunology E-Book. **Elsevier Health Sciences**, 2014.

ABREU, M. R. et al. Salivary Glands of Female Ticks *Rhipicephalus sanguineus* Like a Potential Source of Molecules with Inhibitory Action: In vivo study with Walker 256 Tumor Cells. **Journal of Pharmaceutical Care & Health Systems**, v. 1, n. 4, p. 1–8, 2014.

AFFOLTER, V. K.; MOORE, P. F. Localized and disseminated histiocytic sarcoma of dendritic cell origin in dogs. **Veterinary pathology**, v. 39, n. 1, p. 74–83, 2002.

ALBINA, Jorge E. et al. Nitric oxide-mediated apoptosis in murine peritoneal macrophages. **The Journal of Immunology**, v. 150, n. 11, p. 5080-5085, 1993.

ANDERSON, J. F.; MAGNARELLI, L. A. Biology of ticks. **Infectious disease clinics of North America**, v. 22, n. 2, p. 195–215, v. jun. 2008.

BARKER, S. C.; MURRELL, A. Systematics and evolution of ticks with a list of valid genus and species names. **Parasitology**, v. 129 Suppl, n. February, p. S15–S36, 2004.

BECHARA, G. H. et al. *Rhipicephalus sanguineus* tick in Brazil: feeding and reproductive aspects under laboratorial conditions. **Braz J Vet Parasitol**, v. 4, n. 2, p. 61-66, 1995.

BINNINGTON, K. C. Sequential changes in salivary gland structure during attachment and feeding of the cattle tick, *Boophilus microplus*. **International Journal for Parasitology**, v. 8, n. 2, p. 97–115, 1978.

BOWMAN, A. S.; DILLWITH, J. W.; SAUER, J. R. Tick salivary prostaglandins: Presence, origin and significance. **Parasitology Today**, , v. 12, n. 10, p. 388-396, 1996.

BRAKE, D. K.; PÉREZ DE LEÓN, A. A. Immunoregulation of bovine macrophages by factors in the salivary glands of *Rhipicephalus microplus*. **Parasites & vectors**, v. 5, p. 38, 2012.

BROSSARD, M.; WIKEL, S. K. Tick immunobiology. **Parasitology**, v. 129, n. 7, p. S161–S176, 2004.

BUSSOLARO, Daniel. **Efeitos in vitro do chumbo inorgânico [Pb (II)] na resposta imunitária de macrófagos peritoneais de camundongo**. 2009. 69p. Dissertação de Mestrado (Biologia Celular e Molecular)- Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná. 2009.

CAMARGO-MATHIAS, M.; FURQUIM, K. S.; NUNES, P. Immunomodulatory effects of tick saliva. **ISJ**, v. 8, p. 231–240, 2011.

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

CHEN, G. et al. *Ixodes scapularis* saliva mitigates inflammatory cytokine secretion during *Anaplasma phagocytophilum* stimulation of immune cells. **Parasites & vectors**, v. 5, n. 1, p. 229, 2012.

CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M. et al. A new tick Kunitz type inhibitor, Amblyomin-X, induces tumor cell death by modulating genes related to the cell cycle and targeting the ubiquitin-proteasome system. **Toxicon**, v. 56, n. 7, p. 1145–1154, 2010.

CIPRANDI, A. et al. *Boophilus microplus*: Its saliva contains microphilin, a small thrombin inhibitor. **Experimental Parasitology**, v. 114, n. 1, p. 40–46, 2006.

D' ACQUISTO, Fulvio et al. Involvement of NF- κ B in the regulation of cyclooxygenase-2 protein expression in LPS-stimulated J774 macrophages. **FEBS letters**, v. 418, n. 1-2, p. 175-178, 1997.

DANTAS-TORRES, F. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): From taxonomy to control. **Veterinary Parasitology**, 2008.

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

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

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

DENARDI, S. E. et al. Morphological characterization of the ovary and vitellogenesis dynamics in the tick *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 125, n. 3–4, p. 379–395, 2004.

FERREIRA, B. R. et al. Antigens from *Rhipicephalus sanguineus* ticks elicit potent cell-mediated immune responses in resistant but not in susceptible animals. **Veterinary Parasitology**, v. 115, n. 1, p. 35–48, 2003.

FERREIRA, B. R.; LIONI, L. M. Y. Expressão gênica de citocinas em cobaias resistentes a carrapatos *Rhipicephalus sanguineus*. **Medicina**, p. 1–77, 2005.

FERREIRA, B. R.; SILVA, J. S. Saliva of *Rhipicephalus sanguineus* tick impairs T cell proliferation and IFN- γ -induced macrophage microbicidal activity. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 64, n. 3, p. 279–293, 1998.

FERREIRA, B. R.; SILVA, J. S. Successive tick infestations selectively promote a T-helper 2 cytokine profile in mice. **Immunology**, v. 96, n. 3, p. 434–439, 1999.

FRANCISCHETTI, I. M. B. et al. The role of saliva in tick feeding. **Frontiers in bioscience (Landmark edition)**, v. 14, p. 2051–88, 2009.

FRANCISCHETTI, I. M. B.; MATHER, T. N.; RIBEIRO, J. M. C. Tick saliva is a potent inhibitor of endothelial cell proliferation and angiogenesis. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 94, n. 1, p. 167–174, 2005.

FURQUIM, K. C. S. et al. Cytology & Histology Secretory Behavior of Salivary Glands of *Rhipicephalus sanguineus* Fed on Immunized Rabbit Hosts. **J Cytol Histol**, v. 4, 2014.

FURQUIM, K. C. S.; BECHARA, G. H.; CAMARGO MATHIAS, M. I. Degeneration of salivary glands of males of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari, Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 154, n. 3–4, p. 325–335, 2008.

FURQUIM, K. C. S.; BECHARA, G. H.; MATHIAS, M. I. C. 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**, v. 50, n. 1, p. 59–70, 2010.

GRAY, J. et al. Systematics and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 4, n. 3, p. 171-180, 2013.

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

GUGLIELMONE, Alberto A. et al. The hard ticks of the world. **Springer**, Dordrecht. doi, v. 10, n. 1007, p. 978-94, 2014.

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

HEBLING, L. M. F. G.; CMARGO-MATHIAS, M. I.; FURQUIM, K. C. S. **Estudo dos efeitos de extratos de glândulas salivares de fêmeas de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari:Ixodidae) na resposta imunológica de hospedeiros pós inoculados.** 2011. Dissertação De Mestrado (Biologia Celular e Molecular), Instituto de Biociências, UNESP *campus* Rio Claro, São Paulo. 2011.

JUNCADELLA, I. J. et al. T-cell signaling pathways inhibited by the tick saliva immunosuppressor, Salp15. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 49, n. 3, p. 433–438, 2007.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**, 12^aed. 2014.

JUSTO, O. R. et al. Evaluation of in vitro anti-inflammatory effects of crude ginger and rosemary extracts obtained through supercritical CO₂ extraction on macrophage and tumor cell line : the influence of vehicle type. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, p. 1–15, 2015.

KOPECKY, J.; KUTHEJLOVA, M.; PECHOVA, J. Salivary gland extract from *Ixodes ricinus* ticks inhibits production of interferon-gamma by the upregulation of interleukin-10. **Parasite immunology**, v. 21, n. 7, p. 351–356, 1999.

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

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

KUTHEJLOVA, M. et al. Salivary gland extract inhibits killing of *Borrelia afzelli* spirochetes by mouse macrophages. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 1, p. 575–578, 2001.

LABRUNA, M. B. et al. A preliminary investigation of Ehrlichia species in ticks, humans, dogs, and capybaras from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 143, n. 2, p. 189–195, 2007.

MACEDO-RIBEIRO, S. et al. Isolation, cloning and structural characterization of boophilin, a multifunctional Kunitz-type proteinase inhibitor from the cattle tick. **PLoS ONE**, v. 3, n. 2, p. 1–17, 2008.

MANS, B. J. et al. Pathogenic mechanisms of sand tampan toxicoses induced by the tick, *Ornithodoros savignyi*. **Toxicon**, v. 40, n. 7, p. 1007–1016, 2002.

MAROTTA, P.; SAUTEBIN, L.; ROSA, M. DI. Modulation of the induction of nitric oxide synthase by eicosanoids in the murine macrophage cell line J774. **British journal of pharmacology**, v. 107, n. 3, p. 640–641, 1992.

MATHIAS, MI Camargo; FURQUIM, KC Scopinho; NUNES, P. H. Immunomodulatory effects of tick saliva. **Invertebr. Survival J.**, v. 8, p. 231-240, 2011.

MATSUMOTO, K. et al. Effects of salivary gland extract from *Rhipicephalus sanguineus* on IgG subclass production and cytokine mRNA expression in mononuclear cells of canine peripheral blood. **The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science**, v. 65, n. 1, p. 137–40, 2003.

MOR, D. D.; FERREIRA, B. R.; CAMPANELLI, A. P. **Modulação da resposta imune pela saliva de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* : estudo do envolvimento de células T regulatórias**. 2006. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo. 2006.

MORITA, H. et al. Cytokine Production by the Murine Macrophage Cell Line J774 . 1 after Exposure to Lactobacilli after Exposure to Lactobacilli. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 66, n. 9, p. 1963-1966, 2002.

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

NAVA, S. et al. The taxonomic status of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806). **Veterinary Parasitology**, v. 208, n. 1–2, p. 2–8, 2015.

NORTH, Robert J. Opinions the concept of the activated macrophage. **The Journal of Immunology**, v. 121, n. 3, p. 806-809, 1978.

NUTTALL, P. A.; LABUDA, M. Tick-host interactions: saliva-activated transmission. **Parasitology**, v. 129, p. S177–S189, 2004.

OLIVEIRA, C. J. F. et al. Tick saliva induces regulatory dendritic cells: MAP-kinases and Toll-like receptor-2 expression as potential targets. **Veterinary Parasitology**, v. 167, n. 2–4, p. 288–297, 2010.

OLIVEIRA, C. J. F. et al. Deconstructing tick saliva: Non-protein molecules with potent immunomodulatory properties. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 13, p. 10960–10969, 2011.

OLIVEIRA, P. R. et al. Seasonal dynamics of the Cayenne tick, *Amblyomma cajennense* on horses in Brazil. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 17, n. 4, p. 412–416, 2003.

OLIVEIRA, S. M. **Triagem de medicamentos homeopáticos que ativam macrófagos com detecção e quantificação de IFN- γ , IL-4 e NO**. 2005. Dissertação de Mestrado (Biologia Celular e Molecular) departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná. 2005.

OLSON, N.; VAN DER VLIET, A. Interactions between nitric oxide and hypoxia-inducible factor signaling pathways in inflammatory disease. **Nitric Oxide**, v. 25, n. 2, p. 125–137, 2012.

RALPH, P.; NAKOINZ, I. Direct Toxic Effects of Immunopotentiators on Monocytic, Myelomonocytic, and Histiocytic or Macrophage Tumor Cells in Culture. **Cancer Research**, v. 37, n. 2, p. 546–550, 1977.

RAMACHANDRA, R. N.; WIKEL, S. K. Modulation of host-immune responses by ticks (Acari: Ixodidae): effect of salivary gland extracts on host macrophages and lymphocyte cytokine production. **Journal of medical entomology**, v. 29, n. 5, p. 818–826, 1992.

RIBEIRO, J. C.; WEIS, J. J.; TELFORD, S. R. Saliva of the tick *Ixodes dammini* inhibits neutrophil function. **Experimental Parasitology**, v. 70, n. 4, p. 382–388, 1990.

RIBEIRO, J. M. et al. Antihemostatic, antiinflammatory, and immunosuppressive properties of the saliva of a tick, *Ixodes dammini*. **The Journal of experimental medicine**, v. 161, n. 2, p. 332–44, 1985.

ROCHA, F. A. **Efeitos in vitro e in vivo do Extrato de Glândulas Salivares de Fêmeas de Carrapatos Rhipicephalus sanguineus com 2 Dias de Alimentação Sobre Diferentes Modelos Tumoriais**. 2014. Tese de Doutorado (Biologia Celular e Molecular), Instituto de Biociências, UNESP campus Rio Claro, São Paulo. 2014.

SA-NUNES, A. et al. Prostaglandin E2 Is a Major Inhibitor of Dendritic Cell Maturation and Function in *Ixodes scapularis* Saliva. **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 3, p. 1497–1505, 2007.

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

SCHOELER, G. B.; WIKEL, S. K. Modulation of host immunity by haematophagous arthropods. **Annals of tropical medicine and parasitology**, v. 95, n. 8, p. 755–771, 2001.

SIMONS, S. M. et al. The action of *Amblyomma cajennense* tick saliva in compounds of the hemostatic system and cytotoxicity in tumor cell lines. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 65, n. 6, p. 443–450, 2011.

SONENSHINE, D. E.; ROE, R. M. **Biology of ticks (vol. 1 e 2)**. New York: Oxford University Press, 2014.

WALKER, Alan R. **Arthropods of humans and domestic animals: a guide to preliminary identification**. Springer Science & Business Media, 1994.

WANG, X. et al. Variabilin, a novel RGD-containing antagonist of glycoprotein IIb-IIIa and platelet aggregation inhibitor from the hard tick *Dermacentor variabilis*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 30, p. 17785–17790, 1996.

WAXMAN, L.; CONNOLLY, T. M. Isolation of an inhibitor selective for collagen-stimulated platelet aggregation from the soft tick *Ornithodoros moubata*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 8, p. 5445–5449, 1993.

WEISS, B. L.; KAUFMAN, W. R. Two feeding-induced proteins from the male gonad

trigger engorgement of the female tick *Amblyomma hebraeum*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 16, p. 5874–9, 2004.

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, n. 6, p. 965–973, 1991.

WIKEL, Stephen K. Tick modulation of host immunity: an important factor in pathogen transmission. **International journal for parasitology**, v. 29, n. 6, p. 851-859, 1999.

XIANG, F. YU et al. Proteomic Analysis of Proteins in the Salivary Glands of the Fed and Unfed Female Tick *Rhipicephalus haemaphysaloides*. **Agricultural Sciences in China**, v. 8, n. 1, p. 121–127, 2009.

YODER, J. A. et al. Developmental profiles in tick water balance with a focus on the new Rocky Mountain spotted fever vector, *Rhipicephalus sanguineus*. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 20, n. 4, p. 365–372, 2006.

ZHU, K. et al. Isolation and characterization of americanin, a specific inhibitor of thrombin, from the salivary glands of the lone star tick *Amblyomma americanum* (L.). **Experimental parasitology**, v. 87, n. 1, p. 30–38, 1997.

DECISÃO CEUA Nº 04/2016

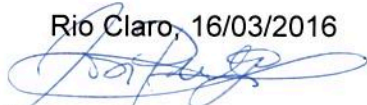
Instituição: UNESP – IB – CRC	Departamento: Biologia
Data de Registro CEUA: 03.11.15	
CERTIFICADO	
Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "Análise morfofisiológica <i>in vitro</i> da ação de extratos de glândulas salivares de fêmeas de carrapatos <i>Rhipicephalus sanguineus</i> (Acari: Ixodidae) sobre a linhagem J774 e macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c", protocolo nº 9133, sob responsabilidade de Marina Rodrigues de Abreu (Pesquisador Responsável) e Maria Izabel Souza Camargo (Orientadora), que envolve a produção, manutenção e/ou a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 1676.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA).	
Subprojeto(s) vinculado(s): ==.==	

Colaboradores:	
A Comissão de Ética no Uso de Animal - CEUA do Instituto de Biociências da UNESP – Campus de Rio Claro, em sua 27ª reunião ordinária , realizada em 16.03.2016	
(x)	Aprovou o Projeto de Pesquisa acima citado, ratificando o parecer emitido pelo relator.
()	Desde que atendidas as pendências apontadas na reunião (vide anexo), aprova o Projeto de Pesquisa acima citado (prazo máximo de 30 dias).
()	Referendou o Projeto de Pesquisa acima citado, ratificando o parecer emitido pelo relator.
()	Aprovou retornar ao interessado para atendimento das pendências encontradas (prazo máximo de 30 dias).
()	Não Aprovou.
()	Retirou , devido à permanência das pendências.

Vigência do Projeto: 01/02/2016 a 30/12/2017	
Espécie/linhagem: coelho New Zealand White	Número de animais: 10
Peso: 2 kg	Idade: Sexo: fêmea
Origem dos animais (Informações sobre o fornecedor): Biotério de Botucatú	

Objetivo Acadêmico:	() TCC
	(x) Mestrado
	() Doutorado
	() Outros – (Iniciação Científica)
	() Pós- Graduação

Rio Claro, 16/03/2016



Prof. Dr. José Paulo Leite Guadanucci
Coordenador