

# RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 03/09/2020.

---

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

---

**ALTERAÇÕES NAS GLÂNDULAS SALIVARES E  
INTESTINO DE FÊMEAS DE CARRAPATOS  
*Rhipicephalus sanguineus* l. s. ALIMENTADAS EM  
DIFERENTES PERÍODOS FRENTE A RESPOSTA  
IMUNOLÓGICA DE HOSPEDEIROS IMUNIZADOS COM  
EXTRATOS DE GLÂNDULAS SALIVARES DE  
CARRAPATOS E COM A CALRETICULINA**

**ELEN FERNANDA NODARI-DRAGONI**

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

Rio Claro  
Estado de São Paulo – Brasil  
Setembro - 2018

---

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

---

**ALTERAÇÕES NAS GLÂNDULAS SALIVARES E  
INTESTINO DE FÊMEAS DE CARRATOS  
*Rhipicephalus sanguineus* l. s. ALIMENTADAS EM  
DIFERENTES PERÍODOS FRENTE A RESPOSTA  
IMUNOLÓGICA DE HOSPEDEIROS IMUNIZADOS COM  
EXTRATOS DE GLÂNDULAS SALIVARES DE  
CARRATOS E COM A CALRETICULINA**

**ELEN FERNANDA NODARI-DRAGONI**

**Orientadora: Profa. Dra. Maria Izabel Souza Camargo**

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

Rio Claro  
Estado de São Paulo – Brasil  
Setembro - 2018

N761a

Nodari-Dragoni, Elen Fernanda

Alterações nas glândulas salivares e intestino de fêmeas de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* l. s. alimentadas em diferentes períodos frente a resposta imunológica de hospedeiros imunizados com extratos de glândulas salivares de carrapatos e com a calreticulina / Elen Fernanda Nodari-Dragoni. -- Rio Claro, 2018

156 p. : il., tabs., fotos

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

Orientador: Maria Izabel Souza Camargo

1. Carrapato do cão. 2. Glândulas salivares. 3. Intestino. 4. Vacina. 5. Controle. I.  
Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

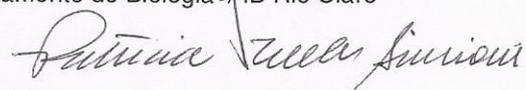
TÍTULO DA TESE: ALTERAÇÕES NAS GLÂNDULAS SALIVARES E INTESTINO DE FÊMEAS DE CARRAPATOS *Rhipicephalus sanguineus* l. s. ALIMENTADAS EM DIFERENTES PERÍODOS FRENTE A RESPOSTA IMUNOLÓGICA DE HOSPEDEIROS IMUNIZADOS COM EXTRATOS DE GLÂNDULAS SALIVARES DE CARRAPATOS E COM A CALRETICULINA.

**AUTORA: ELEN FERNANDA NODARI DRAGONI**

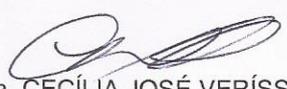
**ORIENTADORA: MARIA IZABEL SOUZA CAMARGO**

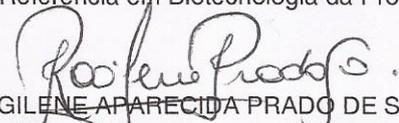
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR), pela Comissão Examinadora:

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

  
Prof. Dra. PATRICIA UCELLI SIMIONI  
x / Faculdade de Americana

  
Prof. Dr. MARCOS ROGÉRIO ANDRÉ  
Departamento de Patologia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

  
Prof. Dra. CECÍLIA JOSÉ VERÍSSIMO  
Laboratório de Referência em Biotecnologia da Produção Animal / Instituto de Zootecnia

  
Prof. Dra. ROGILENE APARECIDA PRADO DE SOUZA  
Professora Substituta do Departamento de Bioquímica / IB Rio Claro

Rio Claro, 03 de setembro de 2018

*Dedico este trabalho aos meus pais, ao meu marido, á minha avó, aos meus irmãos e sobrinhos e especialmente ao meu pinguinho de gente Levi, por todo apoio e compreensão ao longo dessa caminhada.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço em especial aos meus pais, Rute e Rodney, por estarem sempre ao meu lado e acreditarem nos meus sonhos, por me educar e ensinar o valor das pessoas e da vida, e não das coisas.

Agradeço ao meu marido Leonardo por toda a compreensão, apoio e amor sem limites, compartilhando dos meus sonhos, conquistas e frustrações, por ser meu companheiro, meu porto seguro e sempre me ouvir com paciência.

À minha avó, irmãos, sobrinhos, sogros, cunhada e amigos-irmãos por estarem ao meu lado em todos esses momentos.

Agradeço imensamente à Profa. Dra. Maria Izabel Souza Camargo por toda a orientação e amizade, por sempre estar ao meu lado e ter me acolhido todos esses anos, proporcionando experiências únicas de crescimento pessoal e profissional.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (2014/02843-8), a qual agradeço imensamente.

Agradeço a todos os docentes que contribuíram para a minha formação ao longo de todos esses anos, e aos parceiros que tornaram a realização desse trabalho possível.

Agradeço ao meu grupo de pesquisa, o BCSTM pelo apoio, e em especial aos meus amigos Melissa, Luís Adriano, Natália, Marina e Renata, que tornaram os dias mais felizes, os experimentos mais curtos e os cafés mais agradáveis.

Agradeço a todo suporte dos técnicos e funcionários do Departamento de Biologia, em especial a Cristiane, que se tornou uma amiga e companheira de cafés.

Obrigada a todos que de alguma forma participaram dessa etapa tão importante da minha vida. Agradeço a Deus por permitir mais essa conquista e realização.

*“Não é sobre chegar no topo do mundo e saber que venceu. É sobre escalar e sentir que o caminho te fortaleceu. É sobre ser abrigo e também ter morada em outros corações. E assim ter amigos em todas as situações”...*

*(Ana Vilela, trecho da música “Trem bala”)*

## *Resumo e Abstract*

---

## RESUMO

Os carrapatos hoje em dia têm sido considerados como importante alvo de estudos, uma vez que são ectoparasitas que espoliam seus hospedeiros severamente, bem como são vetores de uma série de patógenos. Nessa direção, controlar esses Arthropoda tem se tornado prioridade, principalmente pelo fato de que o controle como vem sendo feito por meio do uso de químicos sintéticos, tem provocado além de outros efeitos, a seleção de populações resistentes. Especificamente os carrapatos que fazem parte do complexo *Rhipicephalus sanguineus* lato sensu têm se destacado por sua ampla distribuição e por parasitar, principalmente, o cão doméstico. Diante disso, para se realizar um controle destes ectoparasitas que seja eficiente e ao mesmo tempo sustentável vem se buscando alternativas diversas. Dentre elas destaque-se o controle imunológico por meio da aplicação de vacinas, o que consequentemente estimula a busca por antígenos que tenham capacidade de sensibilizar o sistema imune do hospedeiro e que ao mesmo tempo possua reatividade cruzada com outras espécies de carrapatos. O presente estudo teve como objetivo avaliar as alterações nas glândulas salivares e no intestino de fêmeas de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* l. s. alimentadas em diferentes períodos frente a resposta imunológica de hospedeiros imunizados com extratos de glândulas salivares de carrapatos da mesma espécie (e com a calreticulina), visto serem órgãos vitais para o sucesso biológico desse ectoparasita. Os resultados mostraram que o EGS2, o EGS4 e a CRT sensibilizaram o sistema imune dos hospedeiros via produção de anticorpos contra as proteínas presentes nos extratos e contra a CRT. Alterações na morfofisiologia das glândulas salivares e do intestino revelaram que a imunização interferiu na síntese e produção da fosfatase ácida e da calreticulina e aumentou a expressão de genes relacionados à morte, levando as glândulas a sofrer degeneração precoce. Essas alterações nos órgãos aqui estudados, sugeriram que proteínas presentes nas glândulas salivares, incluindo a CRT são antígenos candidatos ao desenvolvimento de vacinas para o controle de carrapatos.

**Palavras-chave:** Carrapato do cão; glândulas salivares; intestino; vacina; controle.

## ABSTRACT

Ticks are currently been considered an important object of studies, once they are ectoparasites that severely spoliates their hosts and are vectors of a considerable number of pathogens. In this sense, it has become a priority to control these Arthropoda, mainly because such control has been performed with the use of synthetic chemicals, causing the emergence of resistant populations. Specific attention has been given to *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato ticks, which mainly parasitize domestic dogs and are widely distributed. The search for efficient and sustainable alternatives to control these ectoparasites is ongoing. One alternative would be the application of vaccines with antigens capable of sensibilizing the host's immune system and presenting cross-reactivity with other tick species. The objective of the present study was to evaluate the alterations in the salivary glands and midgut of *Rhipicephalus sanguineus* s. l. females fed for different periods against hosts immunized with salivary gland extracts from ticks of the same species (and with calreticulin), once these organs are vital for the biological success of the ectoparasite. The results showed that SGE2, SGE4 and CRT sensibilized the immune system of the hosts by producing antibodies against the extract proteins and CRT. Alterations in the morphophysiology of the salivary glands and in the midgut revealed that the immunization interfered in the synthesis and production of acid phosphatase and calreticulin, increasing the expression of death-related genes, leading the glands to suffer early degeneration. Such alterations in the analyzed organs suggested that the proteins present in the salivary glands including the CRT are candidates for the development of vaccines to control ticks.

**Key-words:** Brown dog tick;salivary glands; midgut; vaccine; control.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BCIP/NBT	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate/ nitro blue tetrazolium
BOD	Biochemical Oxygen Demand (Demanda Bioquímica de Oxigênio)
BSA	Bovine Serum Albumins (Albumina do soro bovino)
CEUA	Comissão de Ética no Uso Animal
CRT	Calreticulina
CRT-HI	Calreticulina do carrapato <i>Haemaphysalis longicornis</i>
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DMSO	Dimetil sulfóxido ou sulfóxido de dimetilo
DO	Densidade óptica
e.p.m.	erro padrão da média
EGS	Extrato da glândula salivar
EGS2	Extrato das glândulas salivares de fêmeas alimentadas por 2 dias
EGS4	Extrato das glândulas salivares de fêmeas alimentadas por 4 dias
GS2-Imu2	Glândula salivar de fêmeas alimentadas por 2 dias em hospedeiro imunizado com EGS2
GS4-Imu2	Glândula salivar de fêmeas alimentadas por 4 dias em hospedeiro imunizado com EGS2
I2-Imu2	Intestino de fêmeas alimentadas por 2 dias em hospedeiro imunizado com EGS2
I4-Imu2	Intestino de fêmeas alimentadas por 4 dias em hospedeiro imunizado com EGS2
GS2-Imu4	Glândula salivar de fêmeas alimentadas por 2 dias em hospedeiro imunizado com EGS4
GS4-Imu4	Glândula salivar de fêmeas alimentadas por 4 dias em hospedeiro imunizado com EGS4
I2-Imu4	Intestino de fêmeas alimentadas por 2 dias em hospedeiro imunizado com EGS4
I4-Imu4	Intestino de fêmeas alimentadas por 4 dias em hospedeiro imunizado com EGS4
GS2-ImuCRT	Glândula salivar de fêmeas alimentadas por 2 dias em hospedeiro imunizado com CRT

GS4-ImuCRT	Glândula salivar de fêmeas alimentadas por 4 dias em hospedeiro imunizado com CRT
I2-ImuCRT	Intestino de fêmeas alimentadas por 2 dias em hospedeiro imunizado com CRT
I4-ImuCRT	Intestino de fêmeas alimentadas por 4 dias em hospedeiro imunizado com CRT
ELF1	Fator de alongação 1
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ensaio de imunoabsorção enzimática)
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GS2	Glândula salivar de 2 dias
GS4	Glândula salivar de 4 dias
GST	Glutathione-S-Transferase
I2	Intestino de 2 dias
I4	Intestino de 4 dias
IgG	Imunoglobulina G
IPTG	Isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside
l. s.	lato sensu
OPD	o-phenylenediamine dihydrochloride
<i>P</i>	Significância
PBS	Phosphate Buffered Saline (Tampão fosfato salino)
PM	Peso Molecular
qPCR	Reação de polimerase em cadeia em tempo real
SDS-Page	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SOB	Super Optimal Broth (caldo super ideal), meio de cultura para bactérias
TBS	Tris-Buffered Saline (Tampão Tris salino)

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	13
2 OBJETIVOS .....	20
3 MATERIAL E MÉTODOS .....	22
3.1 MATERIAL .....	22
3.1.1 Carrapatos <i>Rhipicephalus sanguineus</i> l. s. (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) .....	22
3.2 MÉTODOS .....	22
3.2.1 Infestações para aquisição de fêmeas adultas de carrapatos <i>R. sanguineus</i> .....	22
3.2.2. Inoculação nos hospedeiros .....	23
3.2.3 Preparação dos extratos glandulares para inoculação nos hospedeiros .....	24
3.2.4 Expressão e extração da calreticulina recombinante de <i>Haemaphysalis longicornis</i> (CRT-HI) .....	24
3.2.5 Purificação da CRT-HI .....	25
3.2.6 Western Blot .....	25
3.2.7 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) .....	26
3.2.8 Análises <i>in silico</i> .....	27
3.2.9 Detecção da atividade da fosfatase ácida (HUSSEIN; BOWEN; LEWIS, 1990) .....	27
3.2.10 Teste imunohistoquímico para detecção da calreticulina .....	28
3.2.11 Detecção da calreticulina por imunofluorescência (adaptado de ANTUNES et al., 2015) .....	29
3.2.12 Extração do RNA e síntese de cDNA .....	29
3.2.13 Amplificação de genes relacionados à morte celular por PCR em tempo real .....	30
3.2.14 Análise da expressão dos genes relacionados à morte celular .....	31
4 RESULTADOS .....	36
CAPÍTULO 1 .....	38
CAPÍTULO 2 .....	71
CAPÍTULO 3 .....	81
CAPÍTULO 4 .....	105
CAPÍTULO 5 .....	135
5 DISCUSSÃO GERAL .....	141
6 CONCLUSÕES .....	146
REFERÊNCIAS .....	148
ANEXO .....	156

# *Introdução*

---

## 1 INTRODUÇÃO

Os carrapatos são artrópodes hematófagos e ectoparasitas de diferentes grupos animais, inclusive de outras espécies de carrapatos (LABRUNA et al., 2007). Constituem um grupo importante dos pontos de vista médico e veterinário, pois provocam lesões no hospedeiro, seja pelo processo de repasto ou pela transmissão de enfermidades como arboviroses, rickettsioses e espiroquetoses (BARBOSA SILVA et al., 2017; CONTRERAS; DE LA FUENTE, 2016; COSTA et al., 2017; KAUFMAN, 1989; MONTENEGRO et al., 2017).

A espécie *Rhipicephalus sanguineus* l. s. faz parte de um complexo que abrange 12 espécies, que possuem diferenças morfológicas, biológicas e genéticas (BURLINI et al., 2010; DANTAS-TORRES et al., 2013; DANTAS-TORRES; OTRANTO, 2015; LEVIN et al., 2012; LIU et al., 2013; MORAES-FILHO et al., 2011; NAVA et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2005; SANCHES et al., 2016; SZABÓ et al., 2005) estando o complexo distribuído por todos os continentes, devido às migrações humanas que levou consigo o cão doméstico, principal hospedeiro desse ectoparasita (WALKER; KEIRANS; HORAK, 2000). Na América Latina o grupo *R. sanguineus* l. s. está representado por duas linhagens distintas a tropical, distribuída do México ao Brasil, e a temperada restrita ao cone sul da América (MORAES-FILHO et al., 2011).

Nos cães, além de causar danos diretos, como a anemia (JERNIGAN et al., 2000), esse ectoparasita é responsável pela transmissão de *Ehrlichia canis*, *Babesia vogeli*, *Micoplasma haemocanis*, *Hepatozoon canis* e *Anaplasma platy*. Nos humanos ainda é vetor de *Rickettsia conorii* na Europa e de *R. rickettsii* no Arizona – EUA. No Brasil, já foi confirmada a presença de *R. rickettsii* e *R. parkeri* causadoras da febre maculosa (BARBOSA SILVA et al., 2017; DE OLIVEIRA et al., 2016; LABRUNA, 2009; PADDOCK et al., 2017), bem como seu envolvimento com o ciclo endêmico da doença (MOERBECK et al., 2016).

Nos carrapatos estão presentes as glândulas salivares, consideradas fundamentais para o seu sucesso biológico. As mesmas desempenham várias funções que incluem a produção de substâncias necessárias à fixação e à alimentação dos ectoparasitas (BINNINGTON, 1978; GILL; WALKER, 1987; SONENSHINE; ROE, 2014; WALKER; FLETCHER; GILL, 1985). São estruturas pares (SONENSHINE; ROE, 2014) que se estendem antero-lateralmente na porção ventral da cavidade corpórea e desembocam na cavidade oral (OLIVIERI et al., 1992; TILL, 1961; WALKER; FLETCHER; GILL, 1985). Estão constituídas por uma porção secretora e uma excretora, porém não possuem um reservatório para armazenamento da

secreção. Nas fêmeas, a porção secretora está formada pelos ácinos **I**, **II** e **III** (BINNINGTON, 1978; CAMARGO-MATHIAS; FURQUIM, 2013; FURQUIM; BECHARA; CAMARGO-MATHIAS, 2010; WALKER; FLETCHER; GILL, 1985), interligados pela porção excretora que está composta por um sistema de ductos ramificados (NUNES et al., 2005; TILL, 1961).

Os ácinos glandulares do tipo **I** são agranulares, e atuam no balanço hídrico excretando uma solução higroscópica na região oral, capaz de absorver água do ar insaturado. Os **II** e **III** (granulares) estão constituídos por células que sintetizam e secretam produtos relacionados a: a) fixação do carrapato no hospedeiro; b) digestão de tecidos (WALKER; FLETCHER; GILL, 1985) e c) modulação local dos sistemas imune-inflamatório e hemostático do hospedeiro (PAESEN et al., 1999; RIBEIRO, 1987; RIBEIRO; MATHER, 1998; WALKER; FLETCHER; GILL, 1985).

Na saliva dos carrapatos os elementos presentes são principalmente de origem glicoprotéica, lipoprotéica e lipídica (BINNINGTON, 1978; CAMARGO-MATHIAS; FURQUIM; NUNES, 2011), como por exemplo a calreticulina, a fosfatase ácida, as esterases, as aminopeptidases, as metaloproteinases, as lipocalinas e as prostaglandinas (BINNINGTON, 1978; BROSSARD; WIKEL, 2004; CAMARGO-MATHIAS; FURQUIM; NUNES, 2011; GILL; BOID; ROSS, 1986; HARNNOI et al., 2007; JAWORSKI et al., 1995; KAEWHOM et al., 2008; KONNAI et al., 2011; MULENGA; BLANDON; KHUMTHONG, 2007; OLIVEIRA et al., 2011; RADULOVIĆ et al., 2014; STEEN; BARKER; ALEWOOD, 2006) que têm propriedades farmacológica e/ou imunológica. Nas fêmeas de *R. sanguineus* l. s. foram identificadas proteínas, polissacarídeos, lipídeos, fosfatase ácida e cálcio na secreção salivar (FURQUIM et al., 2013).

A composição da saliva do carrapato *R. sanguineus* l. s. não é sempre a mesma quando se considera os diferentes períodos de alimentação. Ela sofre transformações bioquímicas devido a necessidade do ectoparasita em modular o sistema hemostático do hospedeiro (FURQUIM et al., 2013). A composição da saliva varia tanto quantitativa quanto qualitativamente quando são considerados períodos específicos da produção da secreção como o início (2 dias de alimentação), o meio (4 dias) e o final (6 dias). Foi também demonstrado por Furquim et al. (2011) que o comportamento secretor das glândulas salivares de fêmeas de *R. sanguineus* l. s. modificar-se-ia em função da resistência adquirida pelo hospedeiro, quando imunizado.

O intestino dos carrapatos é o local onde a digestão do sangue acontece, bem como é o local onde se desenvolvem vários endoparasitas, constituindo-se ainda na principal barreira

física entre o carrapato e a resposta imunológica do hospedeiro (HIGUCHI, 1987; KOCAN et al., 1987). Este órgão está dividido em três regiões: intestino anterior (estomodeu), médio (mesenteron), e posterior (proctodeu), sendo que o anterior e o posterior são derivados da ectoderme e o médio, da endoderme (COONS; ALBERTI, 1999).

Durante o processo de digestão, as células intestinais passam por modificações que variam de acordo com o tempo que o carrapato passa se alimentando no hospedeiro, bem como com os estágios do seu ciclo, ou seja, larva, ninfa e adulto (AGBEDE; KEMP, 1985; AGYEI; RUNHAM, 1995; CAPERUCCI; CAMARGO-MATHIAS; BECHARA, 2009; COONS; ALBERTI, 1999; COONS; ROSELL-DAVIS; TARNOWSKI, 1986; REMEDIO et al., 2013; SONENSHINE; ROE, 2014; WALKER; FLETCHER, 1987). De forma geral, o intestino médio dos carrapatos, está formado por um epitélio simples cilíndrico ou pseudoestratificado apoiado sobre uma membrana basal e esta, por sua vez em uma fina camada de fibras musculares (SONENSHINE; ROE, 2014). As células epiteliais, geralmente são classificadas em 3 tipos: a) generativas; b) digestivas e c) secretoras (AGBEDE; KEMP, 1985; AGYEI; RUNHAM, 1995; BALASHOV, 1972; CAPERUCCI; CAMARGO-MATHIAS; BECHARA, 2009; REMEDIO et al., 2013; SONENSHINE; ROE, 2014; WALKER; FLETCHER, 1987), além das basofílicas (AGBEDE; KEMP, 1985), das endócrinas e das vitelogênicas (COONS; ALBERTI, 1999).

As células classificadas como generativas são aquelas indiferenciadas com forma de cúpula e com função de originar as digestivas e secretoras (AGBEDE; KEMP, 1985; WALKER; FLETCHER, 1987). São observadas com mais frequência nos estágios iniciais de cada ínstar, bem como na fase de alimentação lenta do carrapato. Sua ocorrência fica diminuída nos estágios de pós-ingurgitamento (AGBEDE; KEMP, 1985; REMEDIO et al., 2013; WALKER; FLETCHER, 1987). Morfologicamente apresentam microvilosidades voltadas para o lúmen do intestino o que lhes garante um aumento da superfície de absorção (AGBEDE; KEMP, 1985; CAPERUCCI; BECHARA; CAMARGO-MATHIAS, 2010; REMEDIO et al., 2013; WALKER; FLETCHER, 1987).

As células digestivas são consideradas as principais células do intestino médio, sendo responsáveis pela síntese e secreção das enzimas digestivas, bem como por realizar a absorção de água e de outras substâncias digeridas pelo carrapato (HARRISON; FOELIX, 1999). Segundo alguns autores, elas passam por modificações à medida que o processo digestivo evolui, caracterizando assim a ocorrência de momentos fisiológicos específicos, com conseqüente morfologia celular específica (AGYEI; RUNHAM, 1995; REMEDIO et al., 2013).

Na espécie *R. sanguineus* l. s., devido à estas modificações morfológicas, Remedio et al. (2013) classificaram as mesmas em 4 subtipos: a) digestivas residuais, b) digestivas pinocíticas, d) digestivas fagocíticas e f) digestivas maduras.

Os processos de alimentação e de digestão do sangue são essenciais para os carrapatos, visto ser o sangue uma rica fonte de proteínas e de nutrientes utilizados nos processos anabólicos (como a produção dos ovos) (GRANDJEAN, 1984).

Devido ao sucesso biológico dos carrapatos, estes ectoparasitas vêm sendo cada vez mais alvos de estudos. Deve-se ainda considerar que as alterações climáticas favorecem ainda o aumento populacional de algumas espécies, facilitando o contato com os humanos e aumentando o risco de transmissão de doenças (CAMARGO-MATHIAS, 2018; ESTRADA-PEÑA et al., 2013), tornando necessário realizar o seu controle com eficiência.

Atualmente a principal forma de controle de carrapatos tem sido realizada por meio da aplicação de substâncias químicas, método este que apresenta inconvenientes, tais como o alto custo não só do produto, mas também da aplicação e da mão de obra, o que quando não realizados adequadamente promove a seleção de populações resistentes, além de causarem danos ao meio ambiente e à saúde pública (FREITAS; POHL; VAZ, 2005). Toda essa problemática vem estimulando a busca por métodos de controle que sejam, além de eficientes, também sustentáveis, como os acaricidas naturais, o controle biológico e a produção de vacinas (ANHOLETO et al., 2017; FURQUIM et al., 2011; MATOS et al., 2014; ROMA et al., 2013; SABADIN et al., 2017; VENDRAMINI et al., 2012a, 2012b).

Diante desse cenário, o uso de vacinas, segundo Parizi et al. (2012), seria uma estratégia economicamente viável e benéfica para o controle dos carrapatos. Porém, para tanto há a necessidade de se buscar potenciais antígenos, os quais podem ter diferentes origens (extratos proteicos produzidos a partir de órgãos dos carrapatos ou proteínas isoladas) (ANTUNES et al., 2015; FURQUIM et al., 2011; JITTAPALAPONG et al., 2008; PARIZI et al., 2009, 2012; SABADIN et al., 2017). Os extratos proteicos vêm sendo produzidos ou a partir do carrapato inteiro ou de seus órgãos, tais como das glândulas salivares e dos intestinos (FURQUIM et al., 2011; JITTAPALAPONG et al., 2000, 2008). Segundo Furquim et al. (2011) e Jittapalapong et al. (2008), o extrato da glândula salivar seria capaz de estimular a imunidade nos hospedeiros e de interferir nas glândulas salivares de fêmeas alimentadas nos mesmos. Já entre as proteínas consideradas potencialmente antigênicas, destacam-se a fosfatase ácida e a calreticulina. A primeira por ser uma enzima hidrolítica que catalisa a hidrólise de uma variedade de monoésteres ortofosfórico e que já foi observada no intestino e nas glândulas de fêmeas do

carrapato *R. sanguineus* l. s., *R. (Boophilus) microplus* e *R. appendiculatus*.

As calreticulinas, proteínas ligantes de cálcio, funcionariam como facilitadoras da alimentação por meio de sua ação imunomoduladora e anti-hemostática (BROSSARD; WIKEL, 2004; JAWORSKI et al., 1995; JITTAPALAPONG et al., 2008; KAEWHOM et al., 2008). Além disso, modulariam a imunidade do hospedeiro, mimetizando ou induzindo nestes a autoimunidade (STEEN; BARKER; ALEWOOD, 2006).

Vêm sendo realizados estudos para a avaliação da resposta imunológica por parte do hospedeiro. Nestes, além da análise do soro para comprovação da presença de anticorpos, leva-se também em consideração parâmetros biológicos e morfológicos dos ectoparasitas (ANTUNES et al., 2015; FURQUIM et al., 2011, 2014a, 2014b; PARIZI et al., 2009; SABADIN et al., 2017). Dentre os métodos de avaliação dos parâmetros morfológicos destacam-se as técnicas histológicas, histoquímicas, imunohistoquímica e imunofluorescência. São utilizadas também, ferramentas moleculares, tais como a avaliação da expressão de genes relacionados ao processo de morte. Quando se considera a morte celular apoptótica, sabe-se que a mesma é ativada por duas vias: a intrínseca (mitocondrial) e a extrínseca (citoplasmática). A intrínseca ocorre devido à estímulos internos tais como danos no DNA, no retículo endoplasmático, vírus ou outro trauma celular (MAES; SCHLAMP; NICKELLS, 2017) o que leva a ativação das proteínas BH3-somente, que irão interagir e ativar os genes para as proteínas BaX ou BaK, localizados na membrana externa das mitocôndrias. Essas proteínas provocarão a permeabilidade da membrana externa da mitocôndria, permitindo a saída do citocromo C e interrompendo a cadeia de transporte de elétrons. Este, por sua vez, iniciará a formação do apoptossomo e a cascata de caspase, desencadeando a morte celular apoptótica (MAES; SCHLAMP; NICKELLS, 2017; TAIT; GREEN, 2010). A via extrínseca é ativada por meio de receptor localizado na superfície da membrana celular e é desencadeada por receptores de morte celular, tais como o CD95, Fas ou Apo-1, ligantes específicos da membrana, os quais sinalizarão para a agregação e formação de um complexo indutor de morte, que recrutará a pró-caspase-8, deixando-a ativa, que por sua vez ativará a caspase-3 que executará a morte apoptótica (ANAZETTI; MELO, 2007; GRIVICICH; REGNER; DA ROCHA, 2007).

Assim, diante das informações aqui expostas e devido à grande importância dos carrapatos especificamente da espécie *R. sanguineus* l. s. no cenário da saúde pública, além da dificuldade que se tem encontrado em controlar os carrapatos de forma geral, o presente trabalho teve como objetivo estudar e identificar antígenos que quando compartilhados por diferentes órgãos, tais como as glândulas salivares e o intestino, teriam potencial imunogênico,

contribuindo assim com informações que serão úteis dentro da temática: estratégias eficientes e sustentáveis de controle de carrapatos de importância econômica.

*Conclusões*

---

## 6 CONCLUSÕES

- 1) Extratos de glândulas salivares de fêmeas alimentadas por 2 e 4 dias são imunogênicos para coelhos hospedeiros e carregam proteínas que se apresentam como potenciais antígenos que poderiam ser utilizados no desenvolvimento de vacinas;
- 2) O EGS4 foi mais imunogênico do que o EGS2, visto as glândulas das fêmeas alimentadas por 4 dias estarem mais ativas e possuírem maior número de moléculas imunogênicas;
- 3) A marcação da CRT nas glândulas salivares das fêmeas alimentadas em hospedeiros imunizados com EGS não mostrou-se alterada nos diferentes grupos, sugerindo que esta não seria eficiente para sensibilizar o sistema imune do hospedeiro;
- 4) O EGS2 e o EGS4 interferiram na síntese e secreção da fosfatase ácida das glândulas salivares das fêmeas alimentadas em hospedeiros imunizados com esses extratos;
- 5) A degeneração precoce das glândulas salivares das fêmeas alimentadas por 4 dias em hospedeiros imunizados com EGS4 foi confirmada pelo aumento na expressão dos genes BaX e citocromo C, relacionados à via intrínseca da morte celular apoptótica;
- 6) A diminuição da marcação da fosfatase ácida e da CRT nas células do intestino das fêmeas alimentadas em hospedeiros imunizados se deu devido à presença dos antígenos no EGS;
- 7) A proteína CRT expressa em sistema heterólogo, por ter sido capaz de sensibilizar o sistema imune do hospedeiro quando aplicada isoladamente, pode ser considerada candidata para produção de vacina;
- 8) Anticorpos produzidos contra a CRT-HI reconheceram a CRT nas glândulas salivares (grupo controle), bem como interferiram na atividade dessa proteína nas fêmeas alimentadas em hospedeiros imunizados, os quais interferiram na alimentação e na imunomodulação do hospedeiro;
- 9) A imunização com a CRT-HI induziu a degeneração precoce das glândulas salivares de *R. sanguineus* l. s. pela via extrínseca da morte celular apoptótica.

# *Referências*

---

*Introdução*

*Material e Métodos*

*Discussão Geral*

## REFERÊNCIAS

- AGBEDE, R. I. S.; KEMP, D. H. Digestion in the cattle-tick *Boophilus microplus*: Light microscope study of the gut cells in nymphs and females. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 15, n. 2, p. 147–157, 1985.
- AGYEI, A. D.; HERBERT, I. V.; RUNHAM, N. W. Histochemical localisation of acid phosphatase and non-specific esterase in the midguts of two species of tick, *Boophilus microplus* and *Rhipicephalus appendiculatus*, as determined by light microscopy. **Parasitology Research**, Berlin, v. 77, p. 629–634, 1991.
- AGYEI, A. D.; RUNHAM, N. W. Studies on the morphological changes in the midguts of two ixodid tick species *Boophilus microplus* and *Rhipicephalus appendiculatus* during digestion of the blood meal. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 25, n. 1, p. 55–62, 1995.
- ANAZETTI, M. C.; MELO, P. S. Morte Celular por Apoptose : uma visão bioquímica e molecular. **Metrocamp Pesquisa**, Campinas, v. 1, n. 1, p. 37–58, 2007.
- ANHOLETO, L. A. et al. Potential action of extract of *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen to control *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) ticks. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 8, n. 1, p. 65–72, 2017.
- ANTUNES, S. et al. Artificial feeding of *Rhipicephalus microplus* female ticks with anti calreticulin serum do not influence tick and *Babesia bigemina* acquisition. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 6, n. 1, p. 47–55, 2015.
- BALASHOV, Y. S. Bloodsucking ticks (Ixodoidea)--vectors of diseases of man and animals. **Miscellaneous publications of the Entomological Society of America**, Lanham, v. 8, p. 161–376, 1972.
- BARBOSA SILVA, A. et al. *Rickettsia rickettsii* infecting *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Latreille 1806), in high altitude atlantic forest fragments, Ceara State, Brazil. **Acta Tropica**, Basel, v. 173, p. 30–33, 2017.
- BECHARA, G. H. et al. *Rhipicephalus sanguineus* tick in Brazil: feeding and reproductive aspects under laboratorial conditions. **Brazilian Journal Veterinary Parasitology**, São Paulo, v. 4, n. 2, p. 61–66, 1995.
- BINNINGTON, K. C. Sequential changes in salivary gland structure and feeding of the cattle tick, *Boophilus microplus*. **International Journal of Parasitology**, Oxford, v. 8, p. 97–115, 1978.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.
- BROSSARD, M.; WIKEL, S. K. Tick immunobiology. **Parasitology**, Cambridge, v. 129 Suppl, n. 2004, p. S161–S176, 2004.
- BURLINI, L. et al. Molecular dissimilarities of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in Brazil and its relation with samples throughout the world: is there a geographical pattern? **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 50, n. 4, p. 361–374, 2010.
- BUSTIN, S. A. et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**, Baltimore, v. 55, n. 4, p. 611–622, 2009.

- CAMARGO-MATHIAS, M. I. **Inside ticks: Morphophysiology, toxicology and therapeutic perspectives**. 1. ed. São Paulo, Editora Unesp, 2018.
- CAMARGO-MATHIAS, M. I.; FURQUIM, K. C. S. The Histology as a Tool for the Understanding of the Morphophysiology of the Brown Dog Tick (*Rhipicephalus sanguineus*). In: JENKINS, O. P. (Ed.). **Advances in Zoology Research**. 5. ed. New York: Nova Science Publishers, 2013. p. 167–192.
- CAMARGO-MATHIAS, M. I.; FURQUIM, K. C. S.; NUNES, P. H. Immunomodulatory effects of tick saliva. **Invertebrate Survival Journal**, v. 8, p. 231–240, 2011.
- CAPERUCCI, D.; BECHARA, G. H.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Ultrastructure features of the midgut of the female adult *Amblyomma cajennense* ticks Fabricius, 1787 (Acari: Ixodidae) in several feeding stages and subjected to three infestations. **Micron**, New York, v. 41, n. 7, p. 710–721, 2010.
- CAPERUCCI, D.; CAMARGO-MATHIAS, M. I.; BECHARA, G. H. Histopathology and Ultrastructure Features of the Midgut of Adult Females of the Tick *Amblyomma cajennense* Fabricius, 1787 (Acari: Ixodidae) in Various Feeding Stages and Submitted to Three Infestations. **Ultrastructural Pathology**, v. 33, n. 6, p. 249–259, 2009.
- CONTRERAS, M.; DE LA FUENTE, J. Control of *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus* tick infestations in rabbits vaccinated with the Q38 Subolesin/Akirin chimera. **Vaccine**, v. 34, n. 27, p. 3010–3013, 2016.
- COONS, L. B.; ALBERTI, G. The acari-ticks. In: HARRISON, F. W.; FOELIX, R. F. (Eds.). **Microscopic Anatomy of Invertebrates. Volume 8B:Chelicerata Arthropoda**. New York: Wiley-Liss, 1999. p. 267–514.
- COONS, L. B.; ROSELL-DAVIS, R.; TARNOWSKI, B. I. Blood meal digestion in ticks. In: SAUER, J. R.; HAIR, A. J. (Eds.). **Morphology, physiology and behavioral biology of ticks**. Chichester: Ellis Horwood Ltd, 1986. p. 248–279.
- COSTA, F. B. et al. *Rickettsia amblyommatis* infecting ticks and exposure of domestic dogs to *Rickettsia* spp. in an Amazon-Cerrado transition region of northeastern Brazil. **PLOS ONE**, v. 12, n. 6, p. 1–17, 2017.
- DANTAS-TORRES, F. et al. Morphological and genetic diversity of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato from the New and Old Worlds. **Parasites & vectors**, v. 6, p. 213, 2013.
- DANTAS-TORRES, F.; OTRANTO, D. Further thoughts on the taxonomy and vector role of *Rhipicephalus sanguineus* group ticks. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 208, n. 1–2, p. 9–13, 2015.
- DE OLIVEIRA, S. V. et al. An update on the epidemiological situation of spotted fever in Brazil. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, Botucatu, v. 22, n. 1, p. 22, 2016.
- ESTRADA-PENÑA, A. et al. Association of environmental traits with the geographic ranges of ticks (Acari: Ixodidae) of medical and veterinary importance in the western Palearctic. A digital data set. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 59, n. 3, p. 351–366, 2013.
- FERREIRA, C. A. S. et al. Cloning and partial characterization of a *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) calreticulin. **Experimental Parasitology**, San Diego, v. 101, p. 25–34, 2002.
- FERROLHO, J. et al. Ferritin 1 silencing effect in *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae) during experimental infection with *Ehrlichia canis*. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 8, n. 1, p. 174–184, 2017.

- FREITAS, D. R. DE; POHL, P. C.; VAZ, I. S. Caracterização da resistência para acaricidas no carrapato *Boophilus microplus*\*. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 33, n. 2, p. 109–117, 2005.
- FURQUIM, K. C. S. et al. Ticks' response to feeding on host immunized with glandular extracts of *Rhipicephalus sanguineus* females fed for 2, 4, and 6 days. I. Inactivity or early degeneration of salivary glands? **Parasitology Research**, Berlin, v. 109, n. 1, p. 147–162, 2011.
- FURQUIM, K. C. S. et al. Alterations in the Secretory Behavior of Salivary Glands of *Rhipicephalus sanguineus* Females (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) Feeding in Resistant Rabbit. **Air & Water Borne Diseases**, v. 02, n. 02, p. 114–225, 2013.
- FURQUIM, K. C. S. et al. Secretory Behavior of Salivary Glands of *Rhipicephalus sanguineus* Fed on Immunized Rabbit Hosts. **Journal Cytology & Histology**, v. 4, p. 1–12, 2014a.
- FURQUIM, K. C. S. et al. Morphological Plasticity of Ticks' Salivary Glands and the Meaning of Hematophagy in Hosts Immunized with Glandular Extract of Females Fed for 4 Days. **Animal and Veterinary Sciences**, v. 2, n. 6, p. 194–207, 2014b.
- FURQUIM, K. C. S.; BECHARA, G. H.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Death by apoptosis in salivary glands of females of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). **Experimental Parasitology**, San Diego, v. 119, n. 1, p. 152–163, 2008.
- FURQUIM, K. C. S.; BECHARA, G. H.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Morpho-histochemical characterization of salivary gland cells of males of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodid. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 50, n. 1, p. 59–70, 2010.
- GILL, H. S.; BOID, R.; ROSS, C. A. Isolation and characterization of salivary antigens from *Hyalomma anatolicum anatolicum*. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 8, n. 1, p. 11–25, 1986.
- GILL, H. S.; WALKER, A. R. The salivary glands of *Hyalomma anatolicum anatolicum*: Structural changes during attachment and feeding. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 17, n. 8, p. 1381–1392, 1987.
- GRANDJEAN, O. Blood digestion in *Ornithodoros moubata* Murray *sensu stricto* Walton (Ixodoidea: Argasidae) females. I. Biochemical changes in the midgut lumen and ultrastructure of the midgut cell, related to intracellular digestion. **Acarologia**, Paris, v. 25, p. 147–165, 1984.
- GRIVICICH, I.; REGNER, A.; DA ROCHA, A. B. Morte Celular por Apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Rio de Janeiro, v. 53, n. 3, p. 335–343, 2007.
- HARNNOI, T. et al. Molecular characterization and comparative study of 6 salivary gland metalloproteases from the hard tick, *Haemaphysalis longicornis*. **Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology**, Oxford, v. 147, n. 1, p. 93–101, 2007.
- HARRISON, W. F.; FOELIX, R. F. **Microscopic Anatomy of Invertebrates. Volume 8B: Chelicerata Arthropoda**. New York: Wiley-Liss, 1999.
- HEBLING, L. M. G. F. et al. Inoculation of salivary gland extracts obtained from female of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari, Ixodidae) with 2, 4, and 6 days of feeding in rabbit: I - Histopathology of the feeding lesion. **Parasitology Research**, Berlin, v. 112, n. 2, p. 577–584, 2013.
- HIGUCHI, S. Development of *Theileria sergenti* in the midgut of the tick, *Haemaphysalis*

- longicornis*. **Nihon juigaku zasshi. The Japanese journal of veterinary science**, Tokyo, v. 49, n. 2, p. 341–347, 1987.
- HUSSEIN, M. A.; BOWEN, I. D.; LEWIS, G. H. J. The histochemical localization of ATPase, cholinesterase and acid phosphatase activity in *Culex pipiens* (Diptera, Culicidae) larvae using a methacrylate embedding technique. **Cell Biology International Reports**, London, v. 14, n. 9, p. 775–781, 1990.
- JAWORSKI, D. C. et al. A secreted calreticulin protein in ixodid tick (*Amblyomma americanum*) saliva. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 41, n. 4, p. 369–375, 1995.
- JERNIGAN, A. D. et al. Efficacy of selamectin against experimentally induced tick (*Rhipicephalus sanguineus* and *Dermacentor variabilis*) infestations on dogs. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 91, p. 359–375, 2000.
- JITTAPALAPONG, S. et al. Humoral immune response of dogs immunized with salivary gland, midgut, or repeated infestations with *Rhipicephalus sanguineus*. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 916, p. 283–288, 2000.
- JITTAPALAPONG, S. et al. Immunization with tick salivary gland extracts. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 1149, p. 200–4, 2008.
- KAEWHOM, P. et al. Molecular analysis of calreticulin expressed in salivary glands of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* indigenous to Thailand. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 1149, p. 53–57, 2008.
- KAUFMAN, W. R. Tick-host interaction: a synthesis of current concepts. **Parasitology today**, Amsterdam, v. 5, n. 2, p. 47–56, 1989.
- KOCAN, K. M. et al. Demonstration of colonies of *Cowdria ruminantium* in midgut epithelial cells of *Amblyomma variegatum*. **American journal of veterinary research**, Chicago, v. 48, n. 3, p. 356–60, 1987.
- KONNAI, S. et al. Molecular identification and expression analysis of lipocalins from blood feeding taiga tick, *Ixodes persulcatus* Schulze. **Experimental Parasitology**, San Diego, v. 127, n. 2, p. 467–474, 2011.
- LABRUNA, M. B. et al. Hyperparasitism in *Amblyomma rotundatum* (Acari: Ixodidae). **The Journal of parasitology**, Lawrence, v. 93, n. 6, p. 1531–1532, 2007.
- LABRUNA, M. B. Ecology of *Rickettsia* in South America. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 1166, n. 1, p. 156–166, 2009.
- LEVIN, M. L. et al. Crossbreeding between different geographical populations of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). **Experimental and applied acarology**, Amsterdam, v. 58, n. 1, p. 51–68, 2012.
- LIU, G.-H. et al. Complete mitochondrial genome sequence data provides genetic evidence that the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) represents a species complex. **International journal of biological sciences**, Bethesda, v. 9, n. 4, p. 361–9, 2013.
- MAES, M. E.; SCHLAMP, C. L.; NICKELLS, R. W. BAX to basics: How the BCL2 gene family controls the death of retinal ganglion cells. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 57, p. 1–25, 2017.
- MATOS, R. DA S. et al. Histopathological study of ovaries of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) exposed to different thymol concentrations. **Parasitology Research**, Berlin, v. 113, n. 12, p. 4555–4565, 2014.
- MOERBECK, L. et al. *Rickettsia* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) Vector Biodiversity in High

- Altitude Atlantic Forest Fragments Within a Semiarid Climate: A New Endemic Area of Spotted-Fever in Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 53, n. 6, p. 1458–1466, 2016.
- MONTENEGRO, D. C. et al. Spotted Fever: Epidemiology and Vector-*Rickettsia*-Host Relationship in Rio de Janeiro State. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 505–515, 2017.
- MORAES-FILHO, J. et al. Genetic analysis of ticks belonging to the *Rhipicephalus sanguineus* group in Latin America. **Acta Tropica**, Basel, v. 117, n. 1, p. 51–55, 2011.
- MULENGA, A.; BLANDON, M.; KHUMTHONG, R. The molecular basis of the *Amblyomma americanum* tick attachment phase. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 41, n. 4, p. 267–287, 2007.
- NAVA, S. et al. The taxonomic status of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806). **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 208, n. 1–2, p. 2–8, 2015.
- NODARI, E. F. et al. Midgut of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae) females fed for 2 and 4 days: acid phosphatase detection and morphophysiology of epithelial cells. **Jornal of Biochemistry International**, v. 3, n. 3, p. 85–91, 2016.
- NUNES, E. T. et al. Morphological, histological, and ultrastructural characterization of degenerating salivary glands in females of the cattle-tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (CANESTRINI, 1887) (Acari: Ixodidae). **Micron**, New York, v. 36, n. 5, p. 437–447, 2005.
- OLIVEIRA, C. J. F. et al. Deconstructing tick saliva: non-protein molecules with potent immunomodulatory properties. **The Journal of biological chemistry**, Baltimore, v. 286, n. 13, p. 10960–9, 2011.
- OLIVEIRA, P. R. et al. Comparison of the external morphology of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) ticks from Brazil and Argentina. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 129, n. 1–2, p. 139–147, 2005.
- OLIVIERI, J. A. et al. Structure of the salivary glands of the unfed female tick *Amblyomma cajennense* (Fabricius) (Acarina: Ixodidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 87, p. 167–174, 1992.
- PADDOCK, C. D. et al. Unique Strain of *Rickettsia parkeri* Associated with the Hard Tick *Dermacentor parumapertus* Neumann in the Western United States. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 83, n. 9, p. e03463-16, 2017.
- PAESEN, G. C. et al. Tick histamine-binding proteins: isolation, cloning, and three-dimensional structure. **Molecular cell**, Cambridge, v. 3, n. 5, p. 661–71, 1999.
- PARIZI, L. F. et al. Comparative immunogenicity of *Haemaphysalis longicornis* and *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* calreticulins. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 164, n. 2–4, p. 282–290, 2009.
- PARIZI, L. F. et al. The quest for a universal vaccine against ticks: Cross-immunity insights. **The Veterinary Journal**, v. 194, n. 2, p. 158–165, 2012.
- RADULOVIĆ, Ž. M. et al. A 24-48 h fed *Amblyomma americanum* tick saliva immunoproteome. **BMC Genomics**, v. 15, p. 518–548, 2014.
- REMEDIÓ, R. N. et al. Morphology of the midgut of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) adult ticks in different feeding stages. **Parasitology Research**, Berlin, v. 112, n. 1, p. 415–425, 2013.
- RIBEIRO, J. M. C. Role of Saliva in Blood-Feeding by Arthropods. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 32, n. 1, p. 463–478, 1987.

- RIBEIRO, J. M.; MATHER, T. N. *Ixodes scapularis*: salivary kininase activity is a metallo dipeptidyl carboxypeptidase. **Experimental parasitology**, San Diego, v. 89, p. 213–221, 1998.
- ROMA, G. C. et al. Morphological and cytochemical changes in synganglion of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) female ticks from exposure of andiroba oil (*Carapa guianensis*). **Microscopy Research and Technique**, New York, v. 76, n. 7, p. 687–696, 2013.
- SABADIN, G. A. et al. Effect of recombinant glutathione S-transferase as vaccine antigen against *Rhipicephalus appendiculatus* and *Rhipicephalus sanguineus* infestation. **Vaccine**, Kidlington, v. 35, n. 48, p. 6649–6656, 2017.
- SANCHES, G. S. et al. Molecular, biological, and morphometric comparisons between different geographical populations of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 215, p. 78–87, 2016.
- SHAPIRO, S. Z.; VOIGT, W. P.; FUJISAKI, K. Tick antigens recognized by serum from a guinea pig resistant to infestation with the tick *Rhipicephalus appendiculatus*. **The Journal of parasitology**, v. 72, n. 3, p. 454–63, 1986.
- SONENSHINE, D. E.; ROE, R. . **Biology of ticks**. 2<sup>a</sup> ed. New York: Oxford University Press, 2014.
- STEEN, N. A.; BARKER, S. C.; ALEWOOD, P. F. Proteins in the saliva of the Ixodida (ticks): Pharmacological features and biological significance. **Toxicon**, Elmsford, v. 47, n. 1, p. 1–20, 2006.
- SZABÓ, M. P. J. et al. Biological and DNA evidence of two dissimilar populations of the *Rhipicephalus sanguineus* tick group (Acari: Ixodidae) in South America. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 130, n. 1–2, p. 131–140, 2005.
- TAIT, S. W. G.; GREEN, D. R. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 11, n. 9, p. 621–632, 2010.
- TILL, W. M. **A Contribution to the Anatomy and Histology of the Brown Ear Tick: *Rhipicephalus Appendiculatus* Neumann Memoirs, Entomological Society of Southern Africa**. Johannesburg: University of the Witwatersrand, 1961.
- VENDRAMINI, M. C. R. et al. Cytotoxic effects of andiroba oil (*Carapa guianensis*) in reproductive system of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) semi-engorged females. **Parasitology Research**, Berlin, v. 111, n. 5, p. 1885–1894, 2012a.
- VENDRAMINI, M. C. R. et al. Action of andiroba oil ( *Carapa guianensis* ) on *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) semi-engorged females: Morphophysiological evaluation of reproductive system. **Microscopy Research and Technique**, New York, v. 75, n. 12, p. 1745–1754, 2012b.
- VERONEZ, V. A. et al. Histopathology of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) ticks fed on resistant hosts. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 50, n. 2, p. 151–161, 2010.
- WALKER, A. R.; FLETCHER, J. D. Histology of digestion in nymphs of *Rhipicephalus appendiculatus* fed on rabbits and cattle naive and resistant to the ticks. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 17, n. 8, p. 1393–1411, 1987.
- WALKER, A. R.; FLETCHER, J. D.; GILL, H. S. Structural and histochemical changes in the salivary glands of *Rhipicephalus appendiculatus* during feeding. **International Journal**

for **Parasitology**, Oxford, v. 15, n. 1, p. 81–100, 1985.

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

ZIVKOVIC, Z. et al. Subolesin expression in response to pathogen infection in ticks. **BMC Immunology**, v. 11, n. 7, p. 1–12, 2010.

*Anexo*

---

## ANEXO

## Aprovação da Comissão de Ética no Uso Animal – IB-UNESP-CRC



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Rio Claro

COMISSÃO DE ÉTICA  
NO USO DE ANIMAL  
CEUA – IB – UNESP - CRC

## DECISÃO CEUA Nº 11/2014

Instituição: UNESP – IB – CRC	Departamento: Biologia
Protocolo nº: 925	Data de Registro CEUA: 18.2.2014
Projeto de Pesquisa: "Hematofagia em fêmeas de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> (Acari: Ixodidae) e suas relações: Bioquímicas (bioativos presentes em extratos) e Morfofisiológicas (glândulas salivares e intestino)"	
Subprojeto(s) vinculado(s): ==,==	

Pesquisador Responsável: MARIA IZABEL DE SOUZA CAMARGO

Orientando(a): Elen Fernanda Nodari

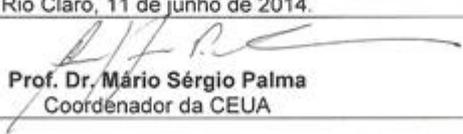
Colaborador(es): ==,==

Objetivo Acadêmico:	<input type="checkbox"/> TCC <input type="checkbox"/> Mestrado <input checked="" type="checkbox"/> Doutorado <input type="checkbox"/> Outros – (Especificar)
---------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

A Comissão de Ética no Uso de Animal - CEUA do Instituto de Biociências da UNESP – Campus de Rio Claro, em sua 20ª reunião ordinária, realizada em 11/6/2014:

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

Rio Claro, 11 de junho de 2014.

  
Prof. Dr. Mário Sérgio Palma  
Coordenador da CEUA