

Paula Ferreira Franco

Caracterização da ação da saliva do carrapato *Amblyomma cajennense* (Acari; Ixodidae) sobre a via clássica do sistema complemento

Curso de Pós-Graduação em Parasitologia

Departamento de Parasitologia

Instituto de Ciências Biológicas

Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte - MG

2015

Paula Ferreira Franco

**Caracterização da ação da saliva do carrapato *Amblyomma cajennense* (Acari; Ixodidae) sobre a via clássica do sistema
complemento**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para obtenção do grau de Mestre em Parasitologia.

Área de concentração: Entomologia

Orientador

Prof. Dr. Ricardo Nascimento Araújo

Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos –ICB - UFMG

Co-orientadora

Dra. Alessandra Pereira Simonini Gomes

Pontifícia Universidade Federal de Minas Gerais – PUC-MG

Apoio Financeiro: FAPEMIG, CNPq, CAPES, INCT-Entomologia Molecular

Departamento de Parasitologia – ICB/UFMG

Belo Horizonte – MG

Fevereiro de 2015

043 Franco, Paula Ferreira.

Caracterização da ação da saliva do carrapato *Amblyomma cajennense* (Acari; Ixodidae) sobre a via clássica do sistema complemento [manuscrito] / Paula Ferreira Franco. - 2015.

46 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Ricardo Nascimento Araújo. Co-orientadora: Alessandra Pereira Simonini Gomes.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. *Amblyomma cajennense* - Teses. 2. Saliva - Teses. 3. Glândula salivar - Teses. 4. Inibição do sistema complemento. 5. Parasitologia - Teses. I. Araújo, Ricardo Nascimento. II. Gomes, Alessandra Pereira Simonini. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 576.88/.89

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por ter chegado até aqui e por ter colocado em minha vida tantas pessoas especiais que participaram dessa conquista.

Aos meus pais Jerusa e Ricardo pela força e apoio em todas as minhas decisões pela vida e por serem meus maiores exemplos. Às minhas irmãs Renata e Marina pelo carinho e por sempre estarem ao meu lado. À toda minha família, em especial meus queridos avós Aparecida e Boanerges, tio Hamilton e tia Lúcia!!! Amo vocês!!!

Ao meu pai Ivar que, mesmo distante, esteve sempre comigo.

Ao Wesley pelo amor, apoio e paciência. À família do Wesley: Aparecida, Bruna e Leandro, Karina, Fernanda e Léo, e os amores Bernardo e Rafael!!!

Ao meu orientador Professor Ricardo Nascimento Araújo, muito obrigada pelos ensinamentos, orientação, paciência, dedicação e pela forma que me acolheu.

À minha co-orientadora Professora Alessandra Simonini, por ter me dado essa oportunidade e incentivo.

Aos Professores Nelder Gontijo, Marcos Horácio e Maurício Sant'Anna pelas contribuições dadas ao longo do mestrado.

À Márcia e ao César pelo apoio técnico. A ajuda de vocês foi essencial para a realização desse trabalho.

Às amigas Naylene e Jéssica, que agradeço não só pela ajuda nos longos dias de coleta na fazenda, mas também pela grande amizade. Sem vocês nada seria possível!

Aos amigos Vladimir e Vânia pelas dicas e colaborações nos experimentos.

Às amigas do LFIH: Elizângela, Rafaela, Luciana, Fernanda e Kel pelas boas risadas e pela ajuda nos momentos de sufoco!

À todos os amigos do LFHI, que tornaram a realização desse trabalho mais agradável: Mércia, Monique, Antônio, Adalberto, Alexandre, Kleber, Gabriel, Brenda, Bruno, Denise, Daniel, Adriana, Dimitri, Raquel, Caio.

Aos amigos e companheiros da “Turma do Naldo”: Jordanna, Tatiana, Joice, Priscila, Danielle, Letícia, Nathalie, Ivana, Ana Carolina Leão, Ana Carolina Lanna, Gisele, Débora, Alcina, Lucas, Marco Túlio e Warllem.

Aos amigos da veterinária Heloisa, Raiane e Leandro, pessoas especiais, sempre presentes.

Aos funcionários da fazenda da UFMG em Pedro Leopoldo pela ajuda nas coletas.

Aos professores da parasitologia e ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do ICB/UFMG, em especial Sumara e Sibebe, sempre dispostas a ajudar.

Aos animais que participaram desse trabalho.

Muito Obrigada!!!!

***Dedico este trabalho aos meus pais
Jerusa e Ricardo, e minhas irmãs
Renata e Marina.***

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE ANEXOS	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
1. Introdução.....	6
1.1. O <i>Amblyomma cajennense</i>	6
1.2. Biologia	7
1.3. Importância do <i>Amblyomma cajennense</i>	8
1.4. Hematofagia e importância da saliva dos carrapatos.....	9
1.5. O sistema complemento	10
1.6. Inibição do sistema do complemento de vertebrados por artrópodes hematófagos	13
2. Justificativa.....	15
3. Objetivos.....	16
3.1. Objetivo geral	16
3.2. Objetivos específicos.....	16
4. Metodologia.....	17
4.1. Comitê de Ética	17
4.2. Coleta de carrapatos.....	17
4.3. Manutenção da colônia em laboratório	17
4.4. Extração de saliva e preparação dos EGS	18
4.5. Quantificação das proteínas das amostras de saliva e EGS.....	19
4.6. Ensaio de inibição da hemólise pela via clássica	19
4.6.1. Obtenção do soro humano	19
4.6.2. Obtenção e preparo de hemácias de carneiro	20
4.6.3. Ensaio biológico de ação sobre a via clássica do complemento humano.....	20
4.7. Comparação da atividade inibidora da via clássica presente em EGS e na saliva de <i>A. cajennense</i>	21
4.8. Comparação da atividade inibidora da via clássica do EGS de carrapatos em diferentes estados fisiológicos.....	21
4.9. Avaliação da influência do pH na ativação e na inibição da via clássica do sistema complemento humano presentes no EGS do <i>A. cajennense</i>	22

4.9.1. Medida do pH intestinal de teleóginas de <i>A. cajennense</i>	22
4.9.2. Ensaio de inibição da hemólise em pH 8.0.....	22
4.10. Análise estatística dos dados	23
5. Resultados e discussão	24
5.1. Ação da saliva e EGS sobre a via clássica do sistema complemento humano.....	24
5.2. Comparação da atividade inibidora da via clássica do EGS de carrapatos em diferentes estados fisiológicos.....	27
5.2.1. Avaliação do peso.....	27
5.2.2. Quantificação de proteínas no EGS.....	29
5.2.3. Ação do EGS sobre a via clássica do sistema complemento.....	31
5.3. Ação do EGS de <i>A. cajennense</i> em diferentes estados fisiológicos obtidos de equinos naturalmente infestados sobre a via clássica do sistema complemento.....	34
5.4. Influência do pH na ativação e na inibição da via clássica do sistema complemento humano presentes no EGS do <i>A. cajennense</i>	36
5. Conclusões.....	39
REFERÊNCIAS	40
ANEXO I – Aprovação do Comitê de Ética.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP: Difosfato de adenosina

AMP: Monofosfato de adenosina

BOD: Demanda bioquímica do oxigênio

EGS: Extrato de Glândula Salivar

GHB²⁺: HEPES 5 mM, NaCl 145 mM, CaCl₂ 0,15 mM, MgCl₂ 0,5 mM e gelatina 0,1%

GHB-EDTA: HEPES 5 mM, NaCl 145 mM, EDTA 10 mM e gelatina 0,1%, pH 7,4

HEPES: 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

Ig G: Imunoglobulina G

Ig M: Imunoglobulina M

IRAC e IxAC: *Ixodes ricinus* anticomplement

ITS: Espaço interno transcrito

MAC: Complexo de ataque à membrana

MASP: Serino-protease associada à MBL

MBL: Lectina ligante de manose

OmCI: *Ornithodoros moubata* complement inhibitor

PAMP: Padrão molecular associado aos patógenos

PBS: Solução salina fosfatada

RNA: Ácido ribonucleico

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição geográfica das espécies de <i>A. cajennense sensu latu</i>	7
Figura 2: Ciclo biológico do <i>Amblyomma cajennense</i>	8
Figura 3: Representação esquemática das vias do sistema complemento.....	11
Figura 4: Formação do complexo de ataque à membrana.....	12
Figura 5: Extração da saliva de <i>Amblyomma cajennense</i>	18
Figura 6: Obtenção do Extrato de Glândula Salivar (EGS) de <i>Amblyomma cajennense</i>	19
Figura 7: Medida do pH intestinal de fêmeas de <i>Amblyomma cajennense</i>	22
Figura 8: Inibição da via clássica por diferentes quantidades de saliva de <i>Amblyomma cajennense</i>	24
Figura 9: Inibição da via clássica pelo extrato de glândula salivar de <i>Amblyomma cajennense</i>	25
Figura 10: Peso de <i>Amblyomma cajennense</i> em diferentes tempos após o início da alimentação em camundongos.....	27
Figura 11: Quantidade de proteínas no extrato de glândula salivar de <i>Amblyomma cajennense</i> em diferentes tempos após o início da alimentação.....	30
Figura 12: Inibição da via clássica pelo extrato de glândula salivar de <i>Amblyomma cajennense</i> em diferentes tempos após o início da alimentação em camundongos.....	32
Figura 13: Inibição da hemólise pela via clássica do sistema complemento humano em relação ao peso de fêmeas de <i>Amblyomma cajennense</i> alimentadas em camundongos.....	33
Figura 14: Inibição da hemólise pela via clássica do sistema complemento humano em relação ao peso de fêmeas de <i>Amblyomma cajennense</i> coletadas em equinos.....	34
Figura 15: Atividade hemolítica da via clássica do complemento humano em diferentes pHs.....	36
Figura 16: Inibição da via clássica por diferentes quantidades de EGS de <i>Amblyomma cajennense</i> nos pHs 7,4 e 8,0.....	37

LISTA DE ANEXOS

ANEXO I – Aprovação do Comitê de Ética.....	46
---	----

RESUMO

Os carrapatos são motivo de grande preocupação na medicina humana e veterinária, pois exercem ação espoliante e transmitem diversos patógenos para seus hospedeiros. As atividades exercidas por moléculas produzidas pela glândula salivar e o intestino destes artrópodes são primordiais para obtenção de sucesso alimentar e reprodutivo. Dentre as diversas atividades desempenhadas na saliva, destaca-se a inibição do sistema complemento que tem como possíveis papéis retardar ao máximo o aparecimento de uma resposta imune contra as proteínas salivares e proteger o epitélio intestinal do ataque das moléculas efetoras do sistema complemento presentes no sangue recém-ingerido. O objetivo deste trabalho foi caracterizar a ação da saliva do carrapato *Amblyomma cajennense* sobre a via clássica do sistema complemento humano. Foi avaliado se saliva e o EGS de partenóginas e teleóginas de carrapatos de diferentes dias de alimentação são capazes de inibir a ação do sistema complemento. Para isto, foram utilizados ensaios de hemólise com hemácias de carneiros e soro humano para avaliar a ação na via clássica. Também foi mensurado o valor do pH intestinal de fêmeas de *A. cajennense* e a eficiência do sistema complemento e dos inibidores neste pH. Os resultados mostraram que a saliva e o EGS são capazes de inibir a hemólise pela via clássica do sistema complemento humano, porém a saliva se mostrou mais eficaz do que o EGS. O EGS de teleóginas e partenóginas inibem a hemólise, sendo o de partenóginas mais ativo. O EGS de *A. cajennense*, quando alimentados em camundongos, possuem maior inibição da via clássica na fase final de alimentação (últimas 48 horas de alimentação) e a atividade apresentou uma correlação positiva significativa ($r=0,585$, $p<0,001$) com o peso, diferente dos alimentados em equinos, onde a inibição é igual em carrapatos de diferentes pesos. O valor do pH encontrado no intestino de *A. cajennense* foi de 8,04 e a alcalinização das soluções do ensaio hemolítico para pH 8,0 não interfere na ativação da via clássica e na atuação dos inibidores do sistema complemento, sendo a inibição mais eficaz do que em pH 7,0. O conhecimento de quando estes inibidores são expressos na saliva e como eles agem, poderá ser utilizado em futuros experimentos na busca de novos métodos de controle para carrapatos.

Palavra-chave: *Amblyomma cajennense*, saliva, glândula salivar, sistema complemento, inibidores

ABSTRACT

Ticks are a major concern in human and veterinary medicine because they cause blood loss and transmit several pathogens to their hosts. The activity performed by molecules produced by the salivary gland and gut of these arthropods are crucial for them to obtain blood and reach reproductive success. Among various activities performed by saliva, the inhibition of the complement system is important by delaying an immune response against salivary proteins and protecting the intestinal epithelium from the complement system, present within the ingested blood. The overall objective of this study was to characterize the anticomplement activity of *Amblyomma cajennense* saliva on the classical pathway of the human complement system. We evaluated whether the saliva and EGS from partially engorged and engorged ticks after different days of feeding are capable of inhibiting the action of the complement system. For this, hemolysis assays were performed with sheep red blood cells and human serum to evaluate the action in the classical pathway. We also measured the female *A. cajennense*'s intestinal pH and the efficiency of the human complement system at this pH. The results showed that both the saliva and EGS are able to inhibit the classical pathway hemolysis of human complement system, but the tick saliva was more effective than the EGS. The EGS of partially engorged and engorged ticks inhibit hemolysis, with extracts from engorged ticks being more effective. The EGS from *A. cajennense* fed to mice, presented greater inhibition of the classical pathway when dissected towards the end of the feeding stage (last 48 hours during feeding) and the activity showed a significant positive correlation ($r = 0.585$, $p < 0.001$) with total weight, unlike EGS obtained from ticks fed on horses, where the inhibition is equal in ticks of different weights. The pH found in the *A. cajennense*'s gut was 8.04 and the adjustments of the haemolytical assays to alkaline conditions did not interfere with classical pathway activation and the role of complement inhibitors, with the most effective inhibition occurring at pH 7.0. The knowledge of when these inhibitors are expressed in tick saliva and how they act may be used in future experiments searching new methods of tick control.

Key words: *Amblyomma cajennense*, saliva, salivary gland, complement system, inhibitors

1. Introdução

1.1. O *Amblyomma cajennense*

Os carrapatos pertencem à classe Arachnida e estão compreendidos em duas principais famílias: Ixodidae, com aproximadamente 680 espécies e Argasidae, que é composta por 183 espécies (Barros-Battesti et al. 2006). Existe ainda uma terceira família: Nuttalliellidae, que possui apenas uma espécie: *Nuttalliella namaqua* (Keirans 2009).

A espécie *Amblyomma cajennense* (Fabricius 1787), pertencente à família Ixodidae, foi descrita pela primeira vez na cidade de Cayena na Guiana Francesa e encontra-se distribuído por todo continente americano desde o Sul dos Estados Unidos, América Central até o Norte da Argentina (Barros-Battesti et al. 2006).

Recentes trabalhos realizando análises morfológicas e ferramentas moleculares propuseram que *A. cajennense* é um complexo de pelo menos seis espécies distintas, denominado *A. cajennense sensu latu*, sendo que cada espécie está relacionada a uma área biogeográfica (Figura 1) (Beati et al. 2013, Nava et al. 2014; Estrada-Peña et al. 2014). No Brasil, Martins (2014) demonstrou através de análises morfológicas (pela diferenciação do poro genital de fêmeas) e moleculares (pela amplificação da região ITS2 do DNA ribossômico nuclear comum a todas as espécies) a existência de pelo menos duas espécies de carrapatos distribuídos no território brasileiro, sendo elas *A. cajennense sensu stricto* e *Amblyomma sculptum*. *A. cajennense s. s.* foi encontrado nas regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste. Já *A. sculptum* foi encontrado em todas as regiões do país e é a única espécie do complexo descrita no Sudeste (Martins 2014), incluindo a região onde foram coletados os espécimes deste trabalho.

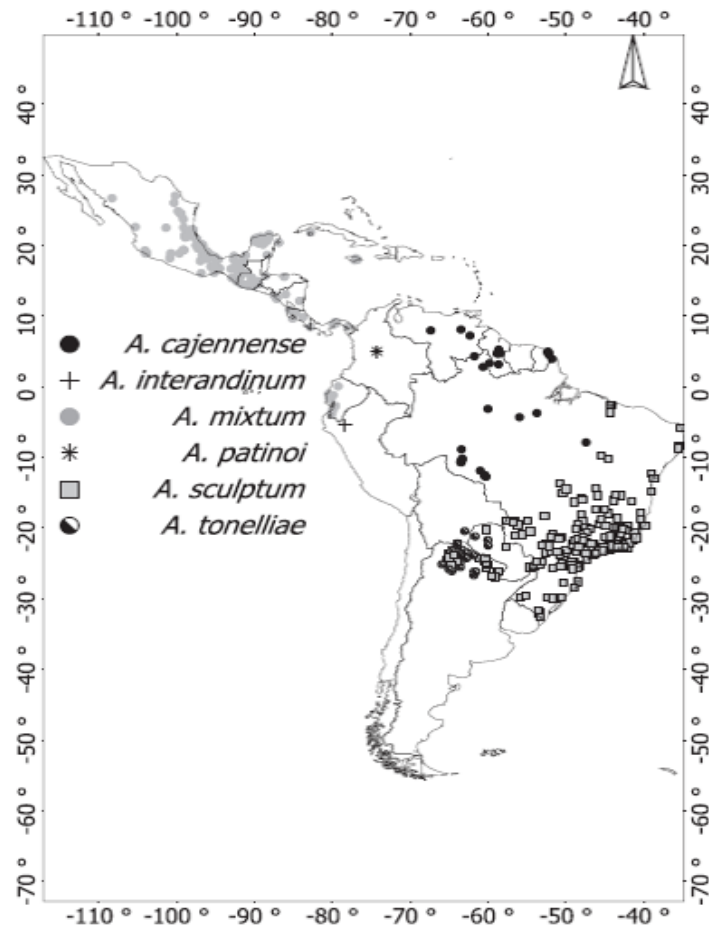


Figura 1: Distribuição geográfica das espécies do complexo *Amblyomma cajennense sensu lato* (Estrada-Peña et al. 2014).

1.2. Biologia

O *A. cajennense* é vulgarmente chamado de “carrapato estrela” ou “rodoleiro” em sua fase adulta; em suas formas mais jovens, ninfa e larva, são conhecidos como “vermelhinho” e “micuim”, respectivamente. Os equinos são os hospedeiros preferenciais dos adultos, porém as formas imaturas possuem baixa especificidade parasitária e podem ser encontrados em bovinos, cães, animais silvestres, aves, homens, entre outros mamíferos (Lopes et al. 1998, Rojas et al. 1999).

Para completar o seu ciclo biológico, o *A. cajennense* necessita de três hospedeiros, sendo assim um carrapato trioxeno (Figura 2). O ciclo biológico se inicia quando a fêmea ingurgitada se desprende no animal e cai no solo. Após um período de aproximadamente 20 dias e em condições ideais de temperatura e umidade (aproximadamente 27°C e 80%) inicia a oviposição. Uma fêmea ingurgitada ovipõe cerca de cinco a vinte mil ovos. A incubação dos ovos dura aproximadamente 30 dias, quando as larvas hexápodas eclodem e sobem nas hastes

das gramíneas à espera da passagem de um hospedeiro susceptível (Costa & Botelho 2011). Elas se fixam e iniciam o ingurgitamento durante um período de 3 a 6 dias e, quando ingurgitadas, caem ao solo e realizam a muda para o estágio de ninfa após um período de 18 a 26 dias (Pereira & Labruna 1998).

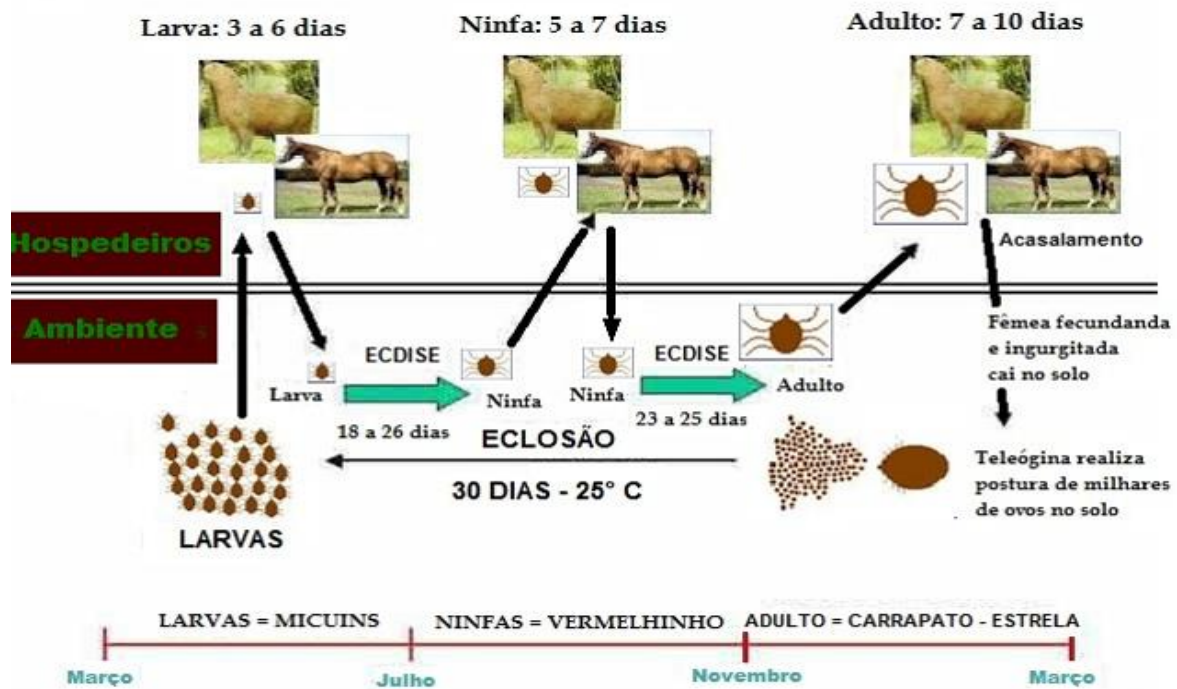


Figura 2: Ciclo biológico do *Amblyomma cajennense* (adaptado de Pereira & Labruna 1998).

As ninfas se caracterizam por apresentarem quatro pares de patas e novamente retornam a outro hospedeiro para se alimentarem. Após um período de 5 a 7 dias se desprendem e caem ao solo para realizar uma nova muda, agora para adulto, se diferenciando em macho e fêmea. Esse período leva aproximadamente 23 a 25 dias. No hospedeiro, o macho e a fêmea realizam a cópula e após completarem o repasto sanguíneo, as fêmeas ingurgitadas caem ao solo após 7 a 10 dias, ovipõem e iniciam um novo ciclo (Pereira & Labruna 1998).

1.3. Importância do *Amblyomma cajennense*

No Brasil, o *A. cajennense* é a principal espécie de carrapato de importância médica, sendo o principal carrapato associado aos humanos e o principal vetor da Febre Maculosa Brasileira ou Febre das Montanhas Rochosas, que é a riquetsiose de maior ocorrência e maior gravidade no país (Labruna et al. 2002, Galvão et al. 2005). São também incriminados como vetores de patógenos para os animais como o hemoparasito *Theileria equi*, agente causador da

piroplasmose equina (Scoles & Ueti 2013), outras bactérias do gênero *Rickettsia* (de la Fuente et al. 2008), podendo transmitir diferentes arbovírus e algumas espécies de borrelíias (Jongejan & Uilenberg 2004).

Além de sua importância na saúde pública, o *A. cajennense* possui grande interesse na Medicina veterinária devido aos grandes prejuízos econômicos que causam na pecuária. Durante a alimentação sanguínea, as fêmeas retiram grandes volumes de sangue, podendo causar comprometimento da capacidade produtiva dos hospedeiros e predispor a infecções secundárias, instalação de miíases, desvalorização do couro dos hospedeiros, gastos com carrapaticidas, entre outros (Borges et al. 2002).

1.4. Hematofagia e importância da saliva dos carrapatos

Os carrapatos são ectoparasitas hematófagos obrigatórios e espécimes da família Ixodidae permanecem no hospedeiro durante longos períodos de tempo, podendo ficar mais de 28 dias para completarem o repasto sanguíneo. A hematofagia é uma das fases mais arriscadas para o carrapato, pois é o momento em que, para a obtenção de sangue, eles precisam localizar a fonte alimentar e penetrar suas peças bucais na pele sem serem percebidos. A percepção do hospedeiro à picada pode provocar uma interrupção precoce do repasto sanguíneo ou até mesmo a morte (Rossignol et al. 1985). Além disso, o ciclo de vida e a dinâmica populacional dos carrapatos estão diretamente relacionados à interação com seus hospedeiros vertebrados, pois o desempenho durante a alimentação vai determinar sua sobrevivência, sua capacidade de mudar para o próximo estágio, seu desenvolvimento, e sua reprodução (Anderson & Magnarelli 2008).

O longo tempo que os carrapatos ixodídeos ficam em contato com seus hospedeiros, somadas à sua exposição a repetidas picadas, faz com que sejam desenvolvidas diversas respostas reparatórias sistêmicas e locais como hemostasia, respostas inflamatórias e respostas imunes (Valenzuela 2005). Essas respostas podem dificultar o processo hematofágico após a fixação do carrapato no local da alimentação e aumentam o comportamento de “grooming” do hospedeiro (Trager 1939, Wikel & Allen 1982). Para isso, a glândula salivar do carrapato produz a saliva que é um fluido composto por uma variedade de moléculas farmacologicamente ativas que, quando injetadas no hospedeiro, produzem modificações fisiológicas no local da picada que vão contrapor as reações desencadeadas no hospedeiro e garantir que o artrópode consiga ingerir sangue (Francischetti et al. 2009).

Nos últimos anos foram descritas várias moléculas presentes na saliva de carrapatos e de outros artrópodes hematófagos que possuem atividade antihemostática, anti-inflamatória ou

inibidora do sistema imune. Exemplos são os vasodilatadores identificados na saliva do carrapato bovino *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Inokuma et al. 1994) e no carrapato *Ixodes scapularis* (Valenzuela 2005). Para inibir a agregação plaquetária, que é a primeira linha de defesa contra a perda de sangue e serve como uma espécie de molde para a cascata de coagulação sanguínea, vários artrópodes hematófagos possuem enzimas com atividade apirásica, como o argasídeo *Ornithodoros moubata* (Ribeiro et al. 1991). Estas enzimas são capazes de bloquear a agregação plaquetária através da quebra do ADP, responsável pela ativação das plaquetas, em AMP (Valenzuela 2005). Já inibidores da cascata de coagulação foram identificados em *A. cajennense*, como o inibidor do fator Xa (Batista et al. 2010) e no carrapato *R. (B.) microplus* que foi identificado um inibidor de trombina (Ciprandi et al. 2006).

A resposta inflamatória representa uma ameaça aos artrópodes hematófagos, uma vez que a inflamação é uma resposta localizada a injúria, se tornando maléfica para o carrapato, prejudicando o sucesso do repasto. Já foi descrito na saliva de *I. scapularis* um antagonista da bradicinina, que é o hormônio responsável pela dor (Ribeiro & Mather 1998). Inibidores da resposta imune foram descritos nas espécies *Ixodes ricinus* (Hannier et al. 2004) e *Hyalomma asiaticum asiaticum* (Yu et al. 2006). Eles possuem inibidores de células B que inibem as respostas de anticorpos específicos anticarrapato, responsáveis por causarem rejeição pelo hospedeiro. Já a espécie *I. scapularis* possui uma proteína salivar capaz de inibir células T resultante da redução da produção de interleucina-2 (Anguita et al. 2002). A atividade anticomplemento é um outro mecanismo desenvolvido pelos carrapatos como forma de se protegerem da resposta imune do hospedeiro. O mecanismo de ação e os inibidores do sistema complemento serão explicados mais detalhadamente a seguir.

1.5. O sistema complemento

O sistema complemento é um importante mecanismo efetor da resposta imune de vertebrados, participando tanto da resposta inata como da adquirida (Nonaka & Yoshizaki 2004). É composto por aproximadamente 30 proteínas solúveis no plasma e ligadas a membranas que são sintetizadas principalmente em hepatócitos e macrófagos (Dunkelberger & Song 2010). Tem como função responder aos desafios por microrganismos, promovendo o aumento da fagocitose, liberação de peptídeos pró-inflamatórios e lise de membranas (Morgan & Wlaker 2000, Dunkelberger & Song 2010). Possui três principais vias de ativação: clássica, alternativa e das lectinas.

A ativação da via clássica ocorre principalmente pela associação de proteínas do complexo C1, formado pelas glicoproteínas C1q, C1r e C1s, a anticorpos IgM e IgG ligados a

superfície de patógenos (Figura 3). Esta via também pode ser ativada por outras substâncias, não necessitando de anticorpos, como alguns vírus e bactérias (Sim & Dodds 1997). Ao se ligar a uma substância ativadora, o componente C1s é ativado e hidrolisa os componentes solúveis C4 e C2, formando dois grandes fragmentos C4b e C2a, liberando os dois menores C4a e C2b, formando C4b2a, que é a C3 convertase da via clássica. Essa convertase cliva o C3 solúvel gerando C3b que pode se depositar na superfície dos microrganismos opsonizando-os e favorecendo a fagocitose ou então se ligar ao C4b2a formando a C5 convertase da via clássica (C4b2a3b). Essa convertase cliva o componente C5 gerando C5b que também vai se depositar, iniciando a formação do complexo de ataque à membrana (CAM) (Sim & Dodds 1997).

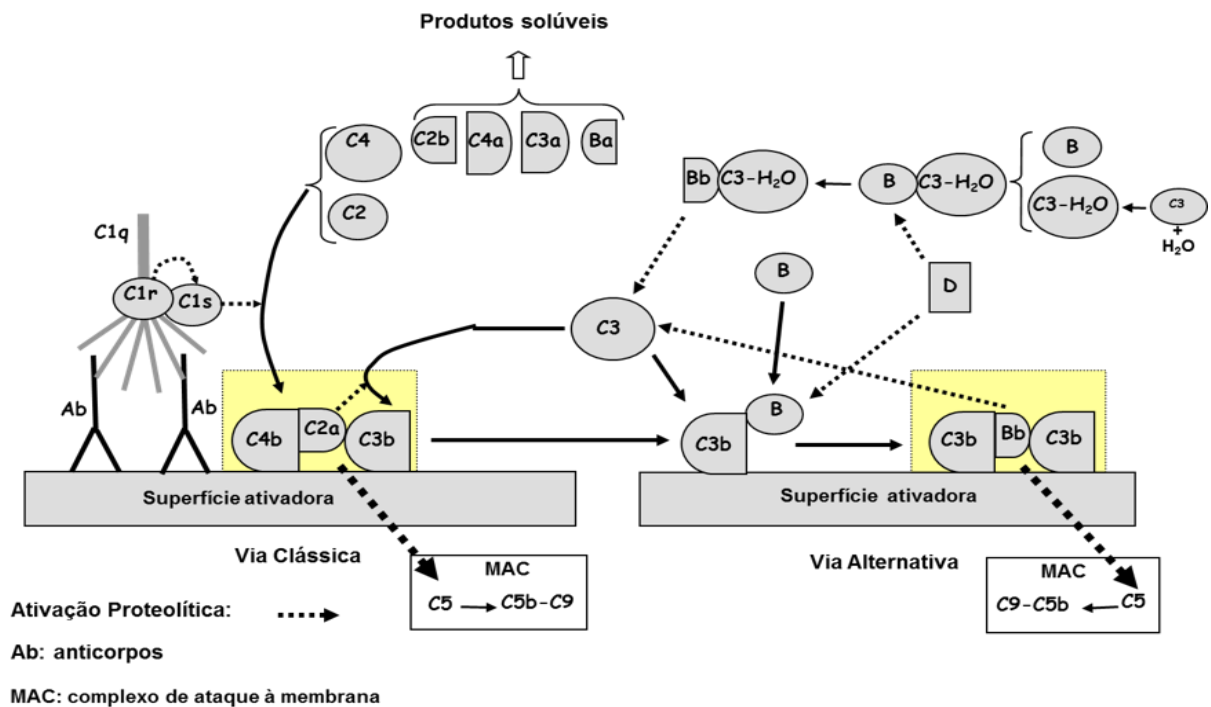


Figura 3: Representação esquemática das vias clássica e alternativa do sistema complemento (modificado de Barros et al. 2009).

A via das lectinas foi a última via de ativação a ser descrita e sua ativação é feita pela lectina ligante de manose (MBL), que reconhece PAMP's (padrões moleculares associados aos patógenos) presentes na superfície de patógenos (Presanis et al. 2003, Dunkelberger & Song 2010). A MBL é semelhante estruturalmente ao C1q da via clássica e quando ligada aos patógenos, ativa as serino-proteases MASP-1 e MASP-2 (serino-protease associada a MBL) que são semelhantes ao C1r e C1s, respectivamente (Presanis et al. 2003). Após a clivagem de

C4 pela MASP-1 ou MASP-2 e C2 pela MASP-1 (Chen & Wallis 2004) a cascata do complemento ocorre de forma semelhante à via clássica.

A via alternativa é diferente das anteriores, pois não necessita de moléculas de reconhecimento como C1q ou MBL (Figura 3). A rota mais comum de ativação dessa via é a presença de várias substâncias na superfície de bactérias, fungos, vírus, protozoários e parasitos multicelulares (Sim & Dodds 1997). Ela se inicia pela reação espontânea do C3, presente em grandes quantidades no plasma, com moléculas de água formando o C3-H₂O e na presença de fator B e fator D formam uma C3 convertase solúvel, a C3(H₂O)Bb. Quando esse complexo interage com C3, ele é clivado e forma o C3b que irá se depositar na superfície de patógenos. O C3b depositado serve de sítio de ligação para uma molécula de fator B que será clivada pelo fator D formando a C3 convertase da via alternativa (C3bBb), que é estabilizada pela properdina evitando seu desmembramento (Dunkelberger & Song 2010, Sarma & Ward 2011). Essa convertase é capaz de clivar outras moléculas de C3 em C3b que irão se depositar na superfície ativadora, formando a C5 convertase da via alternativa (C3bBbC3b) que irá clivar C5 e ativar os outros componentes da cascata (Dunkelberger e Song, 2010; Sim & Dodds 1997).

Uma vez disparadas, essas três vias culminam na formação da C5 convertase, o primeiro componente da via comum, que cliva o C5 em C5a e C5b. C5b expõe o local de ligação para C6 e C7, e quando integrados à bicamada fosfolipídica de uma célula, induz a inserção de C8 formando poros instáveis. O componente C9 se liga ao C8 e inicia a ligação de várias outras moléculas de C9 (de 10 a 16 unidades), tonando o poro, que pode chegar até 10 nm de diâmetro, mais estável (Figura 4). Está formado o complexo de ataque à membrana (CAM) que induz a célula-alvo à lise (Dunkelberger & Song 2010).

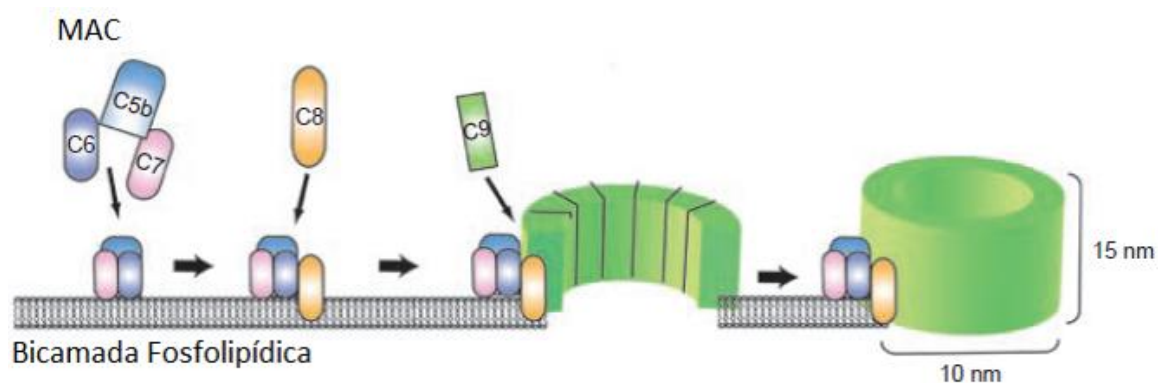


Figura 4: Formação do complexo de ataque à membrana (CAM; C5b-9) que leva a célula alvo à lise e consequente morte (Dunkelberger & Song 2010).

Além da lise de patógenos pelo CAM, a ativação do sistema complemento gera as anafilatoxinas C3a e C5a que são responsáveis pela quimiotaxia de células como eosinófilos, neutrófilos e basófilos para os locais da inflamação e induzem vasodilatação, facilitando a infiltração celular e a degranulação de mastócitos (Sarma & Ward 2011). Outro mecanismo efetor é a geração de C3b pelas C3 convertases de todas as vias de ativação. Esses fragmentos se ligam a superfície ativadora, opsonizando a célula-alvo e sinalizando sua fagocitose por macrófagos e neutrófilos (Dunkelberger & Song 2010).

1.6. Inibição do sistema do complemento de vertebrados por artrópodes hematófagos

A atividade anticomplemento foi descrita em artrópodes hematófagos filogeneticamente distintos, reforçando a importância da inibição do complemento para esses organismos (revisado por Schroeder et al. 2009). Em carrapatos, a importância foi confirmada em experimentos realizados com cobaios que relacionaram a via alternativa do sistema complemento com a rejeição a *Dermacentor andersoni*. Esta resistência foi parcialmente abolida em animais cujo complemento foi suprimido (Wikel & Allen 1977).

Várias moléculas anticomplemento foram descritas anteriormente em carrapatos. Inibidores da via alternativa do sistema complemento já foram identificados nas glândulas salivares de ixodídeos e argasídeos. *I. ricinus* possui as proteínas IRACs e IxACs que se ligam a properdina, inibindo a formação da C3 convertase da via alternativa e prevenindo a deposição de C3b na superfície de patógenos (Daix et al. 2007, Couvreur et al. 2008) assim como *I. scapularis* que possui as proteínas Salp20 e Isac que atuam nesses mesmos pontos da cascata (Valenzuela et al. 2000, Tyson et al. 2007). Inibidores da deposição de C3 *in vitro* também foram encontrados na saliva de *Ixodes dammini* (Ribeiro 1987). Ainda não foram descritos inibidores da via clássica, porém o argasídeo *Ornithodoros moubata* expressa a proteína OmCI (*Ornithodoros moubata* complement inhibitor) que se liga ao C5 inibindo a via comum da cascata do sistema complemento (Nuttall & Labuda 2004, Nunn et al. 2005).

No local da picada, os inibidores do sistema complemento teriam a função principal de inibir a opsonização de moléculas salivares por C3b. Com isso, os hospedeiros se tornam menos eficientes em promover uma resposta imune contra a picada permitindo uma ação mais eficiente das proteínas presentes na saliva. Se isso não acontecesse, a atuação da resposta imune comprometeria as atividades salivares e prejudicaria a ingestão de sangue, tornando esse processo mais demorado e perigoso para o artrópode (Vilela et al. 2006).

Os inibidores do complemento também atuam no intestino dos artrópodes hematófagos e sua provável função seria de proteger as células do trato digestivo contra o ataque do sistema

complemento durante e após a ingestão de sangue (Willadsen 2004, Barros et al. 2009). A digestão em carrapatos é intracelular e acontece no intestino médio, que é composto externamente por uma camada muscular, seguida da lâmina basal e, internamente, de uma monocamada epitelial (Grandjean & Aeschlimann 1973, Caperucci et al. 2010). Se o sistema complemento ativo no sangue do hospedeiro ingerido causasse algum tipo de lesão no intestino do artrópode este poderia acabar levando-o à morte ou comprometeria o desempenho reprodutivo das teleóginas. Trabalhos anteriores mostraram que o antígeno vacinal BM86, disponível comercialmente para o controle do *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, causa menores danos intestinais quando o sistema do complemento do hospedeiro é inativado (Hamilton et al. 1991). A função no intestino é desempenhada por moléculas intestinais em conjunto com moléculas salivares que são ingeridas juntamente com a dieta (Barros et al. 2009, Mendes-Sousa et al. 2013).

A inibição do sistema complemento também parece estar envolvido na escolha do hospedeiro pelo artrópode. Trabalhos realizados com *I. ricinus* e *I. hexagonus* mostraram que a saliva de ambos foi capaz de inibir a via alternativa de humanos, cervos (*Cervus elaphus*) e porcos-espinhos, porém são incapazes de inibir a de pombos. As principais diferenças entre as espécies foram que a saliva de *I. hexagonus* foi capaz de inibir a via alternativa de caninos enquanto *I. ricinus* não, e que *I. hexagonus* tem atividade quase duas vezes maior na via alternativa de porco-espinho (Lawrie et al. 1999). Sendo que pombos não são hospedeiros comuns para nenhuma das espécies (Lawrie et al. 1999) e *I. hexagonus* é comumente encontrado em porco-espinho enquanto *I. ricinus* não (Martyn 1988). Estes resultados indicam que carrapatos inibem mais eficientemente o sistema do complemento de seus hospedeiros preferenciais, o que justificaria a dificuldade de algumas espécies em alimentar em hospedeiros não usuais.

Além da importância na interação vetor-hospedeiro, a inibição do complemento pela saliva e pelo intestino pode, também, favorecer a transmissão de patógenos protegendo-os no local da picada e no ambiente intestinal. Uma vez que o intestino é o primeiro ponto de contato do parasito com o vetor invertebrado, é importante essa proteção, pois este precisa ligar-se e / ou invadir tecidos adjacentes do vetor para se estabelecer e sofrer as transformações necessárias para completar seu ciclo (Barros et al. 2009). Essa proteção é bem caracterizada no caso da infecção de carrapatos do gênero *Ixodes* por bactérias do complexo *Borrelia burgdoferi sensu lato*, causadoras da doença de Lyme (de Taeye et al. 2013) e foi mostrada na interação do *Trypanosoma brucei* com *Glossina morsitans morsitans* (Ooi et al. 2015).

2. Justificativa

Os carrapatos são motivo de grande preocupação na medicina humana e veterinária, pois, além da ação espoliante, eles podem transmitir agentes etiológicos para seus hospedeiros que podem levar à morte ou causar diferentes condições patogênicas. Na saúde animal, carrapatos causam enormes prejuízos às criações provocados pela queda na produção, danos diretos ao couro, gastos com produtos químicos e mão de obra e pela sua ação como vetor de doenças. Um maior conhecimento da fisiologia, genética e comportamento dos artrópodes hematófagos auxiliou indiscutivelmente no desenvolvimento de métodos de controle resultando em grandes benefícios para a saúde humana e no aumento da produtividade na agricultura e na pecuária. Entretanto, estes organismos estão sempre evoluindo e desenvolvendo mecanismos de evasão das formas de controle empregadas. Sendo assim, torna-se imperativo o desenvolvimento de novas estratégias a fim de evitar surtos de transmissão de doenças ou proliferação de pragas.

A glândula salivar é um dos principais órgãos envolvidos na interação com seus hospedeiros. A saliva contém uma diversidade de moléculas bioativas que vão contrapor as reações reparatórias do hospedeiro e garantir que o carrapato consiga ingerir a quantidade de sangue necessária para completar seu desenvolvimento. Dentre as diversas atividades desempenhadas na saliva, destaca-se a inibição do sistema complemento que tem como possíveis papéis: retardar ao máximo o aparecimento de uma resposta imune contra as proteínas salivares e proteger o epitélio intestinal do ataque do sistema complemento presente no sangue recém ingerido. Trabalhos anteriores mostraram que a BM86, um antígeno vacinal disponível comercialmente para o controle do *R. (B.) microplus* (Gavac[®] Heber Biotec, Havana, Cuba; TickGARD[®] Hoechst Animal Health; Austrália), causa menores danos intestinais quando o sistema complemento do hospedeiro é inativado (Hamilton et al. 1991). Isso indica que, provavelmente, a efetividade destes antígenos vacinais será potencializada se conseguirmos, de alguma forma, suprimir a ação dos inibidores do complemento dos carrapatos. Para que isto possa ser viabilizado, é necessário, inicialmente, conhecer quando estes inibidores são expressos na saliva e como eles agem.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Caracterizar a ação da saliva e do extrato de glândula salivar do carrapato *Amblyomma cajennense*, em diferentes condições fisiológicas, sobre a via clássica do sistema complemento humano.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar a presença da atividade inibidora do complemento na saliva e EGS do *Amblyomma cajennense*.
- Comparar a atividade anticomplemento presente no EGS de teleóginas e partenóginas.
- Descrever a inibição do sistema complemento presente no EGS de fêmeas de *A. cajennense* em diferentes momentos após o início da alimentação em camundongos.
- Comparar a atividade inibidora da via clássica do EGS de fêmeas de *A. cajennense* de diferentes estados fisiológicos obtidos de equinos naturalmente infestados.
- Mensurar o valor do pH no lúmen do tubo digestivo de teleóginas de *A. cajennense*.
- Avaliar a influência do pH na ativação da via clássica do sistema complemento humano e avaliar a inibição da via pelo EGS de *A. cajennense*.

4. Metodologia

4.1. Comitê de Ética

Todos os procedimentos envolvendo animais estão de acordo com os princípios para utilização de animais em pesquisa e foram aprovados Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG) sob o número 137/2011 conforme documento em anexo.

4.2. Coleta de carrapatos

Fêmeas ingurgitadas e semi-ingurgitadas de *Amblyomma cajennense*, foram coletadas do plantel equino da Fazenda Experimental da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), localizada em Pedro Leopoldo, MG, durante o período prevalência das formas adultas (Novembro a Março). O plantel era composto por 15 equinos adultos (machos e fêmeas) naturalmente infestados por carrapatos. As fêmeas também foram obtidas através da colônia de *A. cajennense* mantida no Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos (LFIH) no Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG que é originária de carrapatos coletados neste mesmo local.

4.3. Manutenção da colônia em laboratório

Para a manutenção da colônia de *A. cajennense*, teleóginas foram coletadas em equinos naturalmente infestados e mantidas em estufa BOD em condições de temperatura e umidade controladas ($28 \pm 2^\circ\text{C}$ e $90 \pm 5\%$ de umidade) até a oviposição. Para a manutenção do ciclo, larvas, ninfas e adultos foram alimentados em camundongos da linhagem *Swiss* de acordo com a metodologia de Bouchard & Wikel 2005 com modificações. Os camundongos foram obtidos do Centro de Bioterismo da UFMG, e eram machos com 8 semanas de idade. Durante os experimentos, os animais foram mantidos em gaiolas de plástico de 50 cm de comprimento, 36 cm de largura e 15 cm de profundidade, com acesso livre a ração (Nuvilab) e água, a uma taxa de lotação de até 10 animais/gaiola. Essa metodologia se baseia na fixação de câmaras de alimentação em camundongos. As câmaras foram confeccionadas a partir de tubos de polipropileno de 1,5 mL (Eppendorf Tube®) e foram cortados permanecendo com aproximadamente 1,5 cm de altura. As tampas receberam pequenos furos para permitir a entrada de umidade. Os carrapatos de diferentes fases de desenvolvimento foram colocados nas câmaras fixadas nos animais que foram mantidos em gaiolas com maravalha e em ambiente com condições de temperatura e umidade controladas ($27 \pm 1^\circ\text{C}$ e $70 \pm 5\%$) e variação de claro/escuro a cada 12 horas.

As câmaras foram afixadas com adesivo de contato (Brascoplast Standard, Brascola) no dorso (região da cernelha) de camundongos previamente anestesiados com 150 mg/Kg de peso vivo de Ketamina (Ketamin-S; Cristália) e 10 mg/Kg de peso vivo de Xilazina (Rompum; Bayer Healthcare S.A) por via intraperitoneal. Após 24 horas da fixação das câmaras, as larvas, ninfas ou os casais de adultos foram colocados dentro das câmaras, que foram verificadas diariamente. Após completarem a alimentação, os espécimes foram retirados e mantidos em estufa BOD nas condições mencionadas acima.

4.4. Extração de saliva e preparação dos EGS

A saliva foi obtida a partir de fêmeas de *A. cajennense* coletadas no campo. Após a coleta, elas foram levadas ao laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos do ICB-UFMG, lavadas com água destilada, os pesos anotados e afixadas pelo dorso em um suporte com o auxílio de fita dupla-face (3M). Para a estimulação da salivação, foram injetados 3 a 5 μ L de pilocarpina (SIGMA) a 2% em PBS (pH 7,4) diretamente na hemocele com auxílio de uma seringa (Hamilton) acoplada a um disparador (Hamilton) (Figura 5A). Os carrapatos foram mantidos em câmara úmida a 37°C durante 2 horas ou até o fim da salivação. A saliva foi coletada com o auxílio de uma micropipeta e transferida para tubos de 1,5 mL mantidos em gelo para em seguida ser estocadas a -80°C até o uso (Figura 5B). Todos os procedimentos foram realizados no máximo duas horas após a coleta.

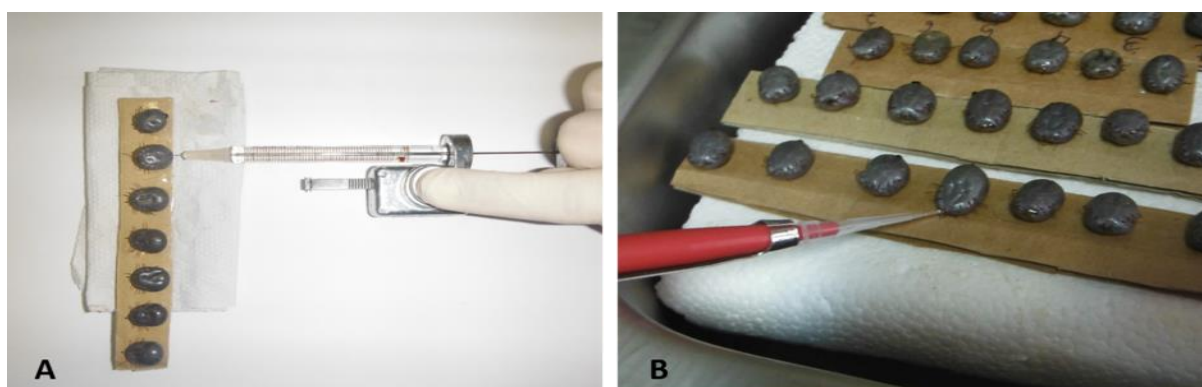


Figura 5: Extração da saliva de *Amblyomma cajennense*. (A) Aplicação de pilocarpina na hemocele dos carrapatos. (B) Coleta da saliva com o auxílio de micropipeta.

Para a obtenção do EGS, as fêmeas de *A. cajennense* coletadas no campo e as obtidas através da alimentação em camundongos em laboratório foram lavadas com água destilada, pesadas e mantidas em gelo até o momento da dissecação, que foi realizada no mesmo dia da

coleta. Os carrapatos foram dissecados com o auxílio de uma lupa (Leica EZ4) (Figura 6A) e cada par de glândulas salivar foi retirado em solução salina (NaCl 0,9%) (Figura 6B) e transferido para tubos de microcentrífuga (Eppendorf Tube®) de 1,5 mL contendo 10 µL de salina. As amostras foram tratadas por ultrassom em banho-maria (Branson 1510) por 40 segundos e centrifugadas a 4°C por 10 minutos a 14.000 g. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo que permaneceu a -80°C até o momento dos ensaios.

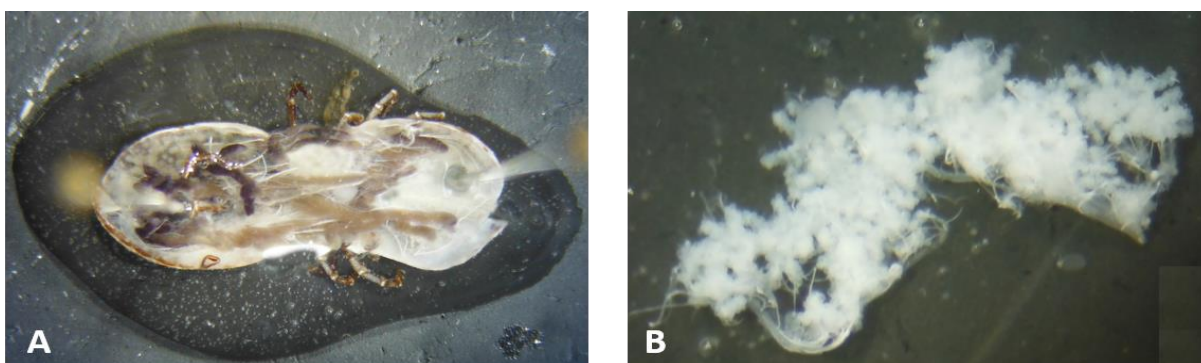


Figura 6: Obtenção do Extrato de Glândula Salivar (EGS) de *Amblyomma cajennense*. (A) Fêmea com tegumento rebatido para visualização dos órgãos internos. (B) Glândulas salivares isoladas.

4.5. Quantificação das proteínas das amostras de saliva e EGS

Após a coleta da saliva e preparação do EGS, a quantidade de proteínas totais nas amostras foi mensurada através do método de Bradford (1976), que é determinada seguindo uma curva padrão de concentração de albumina bovina. As amostras foram distribuídas em triplicatas, em placas de 96 poços, e então medidas em leitor de ELISA (Molecular Devices) com comprimento de onda de 595 nm. Com o resultado, a quantidade de proteínas a ser utilizada em cada ensaio foi ajustada.

4.6. Ensaio de inibição da hemólise pela via clássica

4.6.1. Obtenção do soro humano

Para a obtenção do soro humano foram coletados 10 mL de sangue de dez voluntários saudáveis através da punção da veia cefálica. Os tubos de vidro contendo o sangue foram mantidos em repouso a temperatura ambiente durante três horas e, em seguida, centrifugados a 3.000 g por dez minutos. O soro de cada tubo foi coletado e todos eles foram misturados para

a formação de um *pool* de soros humanos, e então aliquotados e armazenados em -80°C até o uso.

4.6.2. Obtenção e preparo de hemácias de carneiro

As hemácias de carneiro foram obtidas através da punção da veia jugular de animais adultos mantidos na Escola de Veterinária da UFMG. O sangue foi coletado com uma seringa contendo solução conservadora (glicose 2,05%, citrato de sódio 0,8%, NaCl 0,42% e ácido cítrico 0,05%) na proporção de 1:1. As hemácias foram aliquotadas em tubos de 1,5 mL e mantidas a 4°C até o uso.

Para a realização do ensaio de inibição da hemólise pela via clássica, uma alíquota contendo 1 mL de hemácias foi lavada três vezes com 5 mL de solução GHB-EDTA (HEPES 5 mM, NaCl 145 mM, EDTA 10 mM e gelatina 0,1%, pH 7,4) através da centrifugação a 480 g, durante cinco minutos a 4°C. Após a lavagem, as hemácias foram incubadas a 37°C durante 30 minutos para opsonização com anticorpos anti-hemácia de carneiro na diluição de 1:1000. Após a sensibilização (opsonização com anticorpos), as hemácias foram mais uma vez lavadas com GHB-EDTA e então lavadas duas vezes com solução GHB²⁺ (HEPES 5 mM, NaCl 145 mM, CaCl₂ 0,15 mM, MgCl₂ 0,5 mM e gelatina 0,1%) e mantidas nessa solução. Após a leitura em espectrofotômetro (414 nm) a concentração das hemácias foi ajustada para 2x10⁸ células/mL.

4.6.3. Ensaio biológico de ação sobre a via clássica do complemento humano

Para avaliar a ação das amostras sobre a via clássica do sistema complemento humano foi realizado o ensaio biológico de acordo com o protocolo de Sim & Dodds (1997) modificado por Cavalcante et al. (2003). Para os ensaios, foram utilizados 50 µL do *pool* de soro humano normal diluído em GHB²⁺ (pH 7.4), acrescidos de 25 µL das amostras e 50 µL da suspensão de eritrócitos de carneiro sensibilizados e incubados a 37°C. Após 30 minutos de incubação, 500 µL de solução salina gelada foram adicionadas aos tubos, exceto em um dos tubos (controle hemólise total) no qual foi adicionada 500 µL de água destilada gelada. Em seguida, os tubos foram centrifugados por 60 segundos a 1700 g e então 200 µL do sobrenadante foram adicionados em placas de 96 poços para leitura em leitor de ELISA (Molecular Devices) a 414 nm. Os ensaios foram realizados com três repetições de cada amostra.

Em cada experimento foram utilizados os controles de hemólise total, positivo e negativo, todos sem a presença de EGS ou saliva. No controle de hemólise total foi adicionado água destilada com o objetivo de lisar 100% das hemácias. O controle positivo avaliou a

capacidade do soro humano em lisar as hemácias sensibilizadas, sendo que a hemólise provocada pelo soro na ausência de inibidores deve representar cerca de 90% da hemólise total. Já o controle negativo, sem adição de soro humano normal, foi utilizado para estimar a taxa de hemólise espontânea. Os resultados foram expressos como porcentagem de hemólise, considerando 100% o valor obtido no controle positivo.

4.7. Comparação da atividade inibidora da via clássica presente em EGS e na saliva de *A. cajennense*

Para avaliar a atividade de inibidores da via clássica do complemento humano presente no EGS com a atividade presente na saliva de *A. cajennense*, fêmeas ingurgitadas do carrapato foram coletadas em animais naturalmente infestados e dissecadas para a obtenção do EGS e também estimuladas a produzir saliva, como já descrito anteriormente. Foram formados três *pools* de saliva coletada de carrapatos com peso variando de 940 mg a 470,0 mg e três *pools* de EGS de carrapatos com o peso variando entre 820 mg e 466,0 mg. Foram realizados os ensaios de inibição da hemólise pela via clássica (Sim & Dodds 1997) utilizando os *pools* de EGS e de saliva obtidos.

4.8. Comparação da atividade inibidora da via clássica do EGS de carrapatos em diferentes estados fisiológicos

Para esse experimento foram utilizados espécimes de *A. cajennense* pertencentes a colônia do LFIH, ICB - UFMG. Fêmeas de carrapatos foram colocados para se alimentarem em camundongos da linhagem *Swiss*, obtidos do Centro de Bioterismo do ICB – UFMG, de acordo com a metodologia de Bouchard & Wikel 2005, como descrito anteriormente. Foram criados seis grupos com seis camundongos, onde foi colocado um casal de carrapatos em cada. A cada 2 dias as fêmeas de um grupo eram retiradas, pesadas, dissecadas e o EGS obtido armazenado em -80°C. Foram formados os grupos de 2, 4, 6, 8, 10, 12 dias, além do grupo de carrapatos que se desprenderam espontaneamente e o grupo de carrapatos em jejum. Após a alimentação, os carrapatos foram pesados, tiveram a glândula salivar dissecada para preparação do EGS que foi utilizado para mensuração da quantidade de proteínas totais e nos ensaios de inibição da via clássica do sistema complemento.

4.9. Avaliação da influência do pH na ativação e na inibição da via clássica do sistema complemento humano presentes no EGS do *A. cajennense*

4.9.1. Medida do pH intestinal de teleóginas de *A. cajennense*

O pH intestinal de fêmeas de *A. cajennense* foi medido de acordo com o protocolo de Santos et al. (2008) que utilizaram microeletrodos H⁺ sensíveis confeccionados a partir de capilares de vidro com pontas suficientemente finas para serem introduzidas no intestino dos carrapatos. Foram preparados dois tipos de microeletrodos, o de referência e o condutor de íons H⁺. Os microeletrodos foram montados em micromanipuladores para que fossem inseridos no tegumento dos carrapatos e conectados a um aparelho que mede a diferença de potencial (voltagem) (Figura 7A).

Foram coletadas a campo cinco teleóginas e a medição foi realizada 6 a 7 horas após a coleta. Os carrapatos foram fixados em um suporte, com a região ventral exposta, por uma fita adesiva de dupla face (3M). Sob o microscópio estereoscópico, um par de eletrodos foi introduzido no tegumento, alcançando assim, o intestino repleto de sangue (Figura 7B). Os valores medidos em mV foram transformados em unidades de pH, através das respectivas curvas de calibração feitas em soluções de pHs conhecidos.

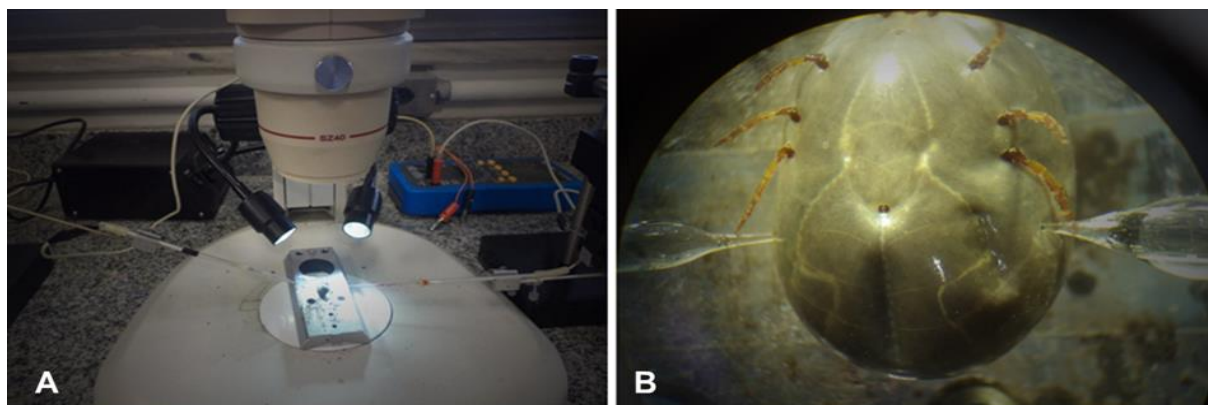


Figura 7: Medida do pH intestinal de fêmeas de *Amblyomma cajennense*. (A) Microeletrodos montados em micromanipuladores e carrapato fixado em suporte. (B) Introdução dos microeletrodos no tegumento dos carrapatos.

4.9.2. Ensaio de inibição da hemólise em pH 8.0

Nesse experimento o ensaio de inibição da hemólise foi realizado segundo protocolo já descrito (Sim & Dodds 1997, modificado por Cavalcante et al. 2003), porém, as hemácias e o soro humano normal foram diluídos em solução GHB²⁺ com pH 8,0, valor encontrado no lúmen intestinal dos carrapatos.

4.10. Análise estatística dos dados

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando o programa GraphPad Prism for Windows versão 5.01. Para testar a normalidade dos dados utilizou-se o teste Kolmogorov-Smirnov. A diferença entre os grupos foi avaliada com o teste ANOVA seguido do teste Dunnett ou Bonferroni (mais de dois grupos) ou o teste T de Student (no caso de dois grupos). O coeficiente de correlação de Pearson foi utilizado para avaliar a relação entre as variáveis do estudo. O nível de significância foi determinado como $p < 0,05$.

5. Resultados e discussão

5.1. Ação da saliva e EGS sobre a via clássica do sistema complemento humano

De acordo com os resultados apresentados na Figura 8 observa-se que a saliva de *A. cajennense* inibe a hemólise causada pela via clássica do sistema complemento humano. A inibição foi dose dependente e nota-se que com 15 µg de proteínas foi de aproximadamente 75%; quando utilizados 30 µg de proteínas, a inibição foi de quase 100%.

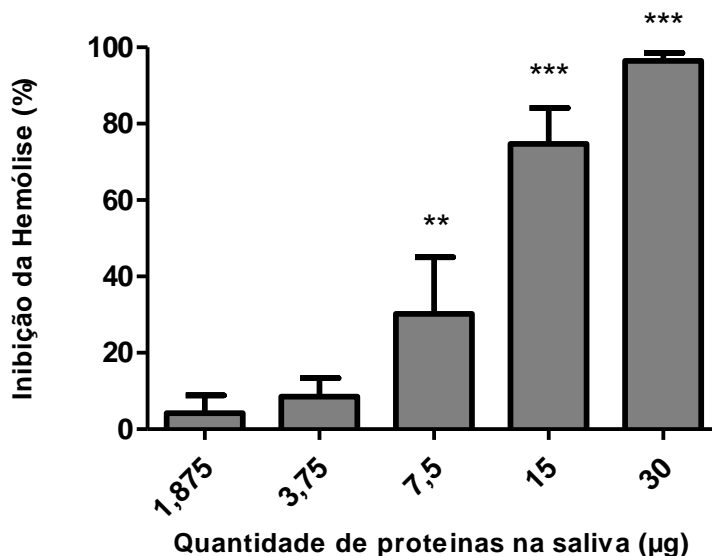


Figura 8: Inibição da via clássica por diferentes quantidades de saliva de teleóginas de *Amblyomma cajennense* coletadas na fazenda. Os dados estão representados como média \pm desvio padrão (n=3). Os asteriscos indicam diferença estatística em relação a quantidade de 1,875 µg de proteínas (ANOVA, Dunnet, **p<0,01, ***p<0,0001).

Baseado no resultado anterior objetivou-se avaliar se o EGS de *A. cajennense* também seria capaz de inibir a via clássica do complemento humano. A Figura 9 mostra que o EGS inibe a via clássica do complemento e que essa inibição, tanto de partenóginas (fêmeas parcialmente ingurgitadas) quanto de teleóginas (fêmeas ingurgitadas), ocorre de forma dose-dependente. Além disso, pode-se observar que, quando comparados os EGS de teleóginas e partenóginas, não há diferença estatística quando utilizados as quantidades de 1,875 a 15 µg de proteínas. Porém, quando utilizados 30 µg de proteínas do EGS de partenóginas ocorre uma inibição de quase 70% da hemólise, estatisticamente superior (p<0,05) ao EGS de teleóginas, onde nessa mesma quantidade de proteínas a inibição é de aproximadamente 50%.

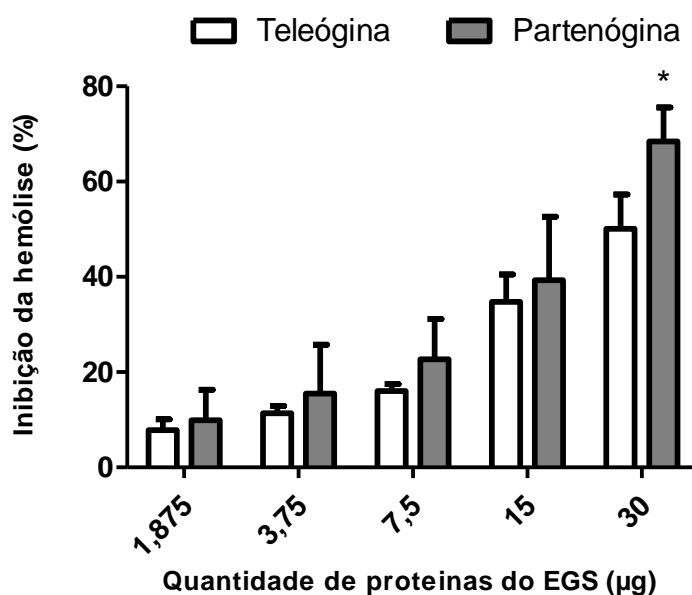


Figura 9: Inibição da via clássica pelo extrato de glândula salivar de *Amblyomma cajennense* coletados no campo. Os dados estão representados como média \pm desvio padrão (n=3). * indica diferença estatística entre partenóquina e teleóquina (ANOVA, Bonferroni, $p < 0,05$).

Ao comparar os resultados obtidos com a saliva e EGS, nota-se que o EGS possui menor eficiência, pois com 15 µg de proteínas da saliva já se observa uma inibição maior do que a encontrada utilizando 30 µg do EGS. Estes resultados eram esperados uma vez que o EGS é composto por saliva e moléculas presentes intracelularmente nos ácinos da glândula salivar e, conseqüentemente, possuem uma quantidade consideravelmente menor de inibidores do complemento por µg de amostra.

A presença da atividade inibidora da via clássica na saliva de *A. cajennense* é um achado novo e realça as diferenças observadas entre espécies. Até então, trabalhos realizados com carrapatos ixodídeos demonstraram a presença de inibidores apenas para a via alternativa. Entre as espécies estudadas incluem apenas membros do gênero *Ixodes* e nenhuma das espécies testadas apresentou inibição na via clássica (Lawrie et al. 1999, Valenzuela et al. 2000, Daix et al. 2007, Couvreur et al. 2008). Outro ponto interessante é que a atividade é relativamente alta em comparação com outros artrópodes hematófagos e parece ter relação com a forma de alimentação. Em comparação com a atividade observada em triatomíneos que são solenofágicos, a inibição promovida pela saliva de *A. cajennense* na via clássica é em torno de seis vezes maior do que aquela observada para a saliva de *Rhodnius prolixus* e *Triatoma infestans* (Barros et al. 2009). Porém ela é inferior ao observado em *Lutzomyia longipalpis*

(Cavalcante et al. 2003), que se alimenta por telmatofagia. Estes resultados indicam que artrópodes telmatofágicos são mais dependentes dos inibidores do complemento para obter sucesso no repasto sanguíneo do que os solenofágicos.

Os resultados acima também levaram ao esclarecimento de pontos importantes a serem considerados na metodologia usada para a continuidade do trabalho, sendo eles:

- Tanto a saliva quanto o EGS de *A. cajennense* inibem a via clássica do sistema complemento humano.

- EGS apresenta uma inibição satisfatória a ponto de permitir a realização dos experimentos necessários para alcançar os objetivos.

- EGS de teleóginas e partenóginas apresentam a atividade anticomplemento relativamente semelhantes, exceto na concentração de 30 µg de proteínas.

Estes achados indicam que os próximos experimentos podem ser realizados com EGS de partenóginas, teleóginas ou ambos. O motivo de optar por EGS é que obtenção de saliva para realização de experimentos é um processo laborioso e dispendioso em comparação com a obtenção do EGS. A saliva é obtida de fêmeas ingurgitadas de *A. cajennense* que são coletadas diretamente dos principais hospedeiros, os equinos. Porém, no campo, a quantidade de teleóginas é pequena, e em consequência, a quantidade de saliva obtida também, apesar de teleóginas salivarem consideravelmente mais que partenóginas (em torno de 10 µL / fêmea). Já a quantidade de partenóginas encontradas nos animais no campo é consideravelmente maior que a de teleóginas, entretanto a produção de saliva nesse estágio é muito pequena (em torno de 1 µL / fêmea). Outra vantagem foi o fato do EGS de partenóginas ser mais ativo do que o de teleóginas.

De acordo com Ribeiro et al. (2004) o EGS pode ser utilizado como alternativa ao uso de saliva, porém podem apresentar componentes adicionais que não estão presentes na saliva e podem também não apresentar algumas moléculas que são sintetizadas durante a salivação. Isso pode explicar o fato de o EGS ser menos ativo do que a saliva em relação à inibição da hemólise, pois pode ser que os inibidores do complemento sejam secretados em maiores quantidades no momento da salivação, durante o repasto sanguíneo. Além disso, a glândula salivar do *A. cajennense* não possui a capacidade de armazenamento de saliva (Alarcon-Chaidez 2013), outro fator que pode explicar a diferença de inibição entre a saliva e o EGS.

5.2. Comparação da atividade inibidora da via clássica do EGS de carrapatos em diferentes estados fisiológicos

Para avaliar se o EGS de fêmeas de *A. cajennense* criadas em laboratório também possuem atividade inibidora sobre o sistema complemento humano e como o inibidor é produzido ao longo do período alimentar, carrapatos foram alimentados em camundongos e removidos com diferentes tempos após o início da alimentação e tiveram a atividade anticomplemento mensuradas em relação a algumas características bionômicas.

Foram avaliados grupos de carrapatos removidos com 2, 4, 6, 8, 10, 12 dias após o início da alimentação e um grupo de carrapatos que se soltaram espontaneamente de seus hospedeiros. Este último grupo foi formado por carrapatos que se desprenderam em oito a doze dias após o início da alimentação.

5.2.1. Avaliação do peso

Durante a alimentação, o peso dos grupos de fêmeas de *A. cajennense* alterou discretamente do jejum até o sexto dia. A partir do oitavo dia, o peso aumentou rapidamente até o décimo dia, não apresentando diferença para os grupos de 12 dias e desprendimento espontâneo. A média de peso após o desprendimento espontâneo foi de 700 mg (Figura 10).

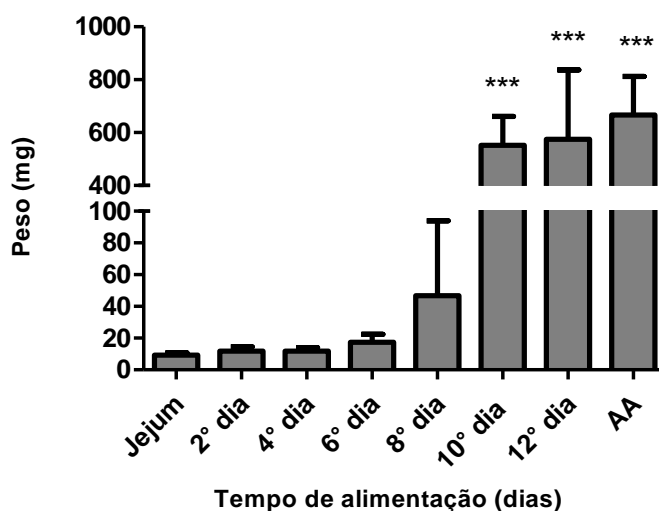


Figura 10: Peso de *Amblyomma cajennense* em diferentes tempos após o início da alimentação em camundongos. Os dados estão representados como média \pm desvio padrão (n=6). AA = após alimentação (desprendimento espontâneo). Os asteriscos indicam diferença estatística em relação ao grupo de fêmeas em jejum (ANOVA, Dunnet, ***p<0,0001).

A alimentação em carrapatos é dividida em fases. A fase preparatória é a primeira e ocorre baixa ingestão de sangue, ou até mesmo nenhuma. Essa fase compreende as primeiras horas de alimentação, normalmente 24 a 36 horas após a fixação do carrapato no hospedeiro. Durante esse período, o carrapato está se preparando para iniciar a alimentação, inserindo as peças bucais e produzindo o cimento, que é a substância responsável pela fixação no hospedeiro. Em seguida vem a fase 2, a de alimentação lenta, onde as fêmeas sugam sangue e outros fluidos lentamente durante vários dias e vão se expandindo lentamente (Sonenshine 1991a). Os resultados apresentados acima indicam que provavelmente os carrapatos dos grupos de dois, quatro e seis dias se encontram nessa fase, pois o peso não se altera significativamente, permanecendo homogêneo durante esse período.

A terceira fase de alimentação dos carrapatos é conhecida como alimentação rápida, onde a fêmea sai da fase de alimentação lenta (com crescimento lento) e inicia uma rápida ingestão de sangue e ingurgitamento. Essa fase se inicia nas últimas 12 a 36 horas do repasto, onde grandes quantidades de sangue são ingeridas e o carrapato expande seu tamanho excepcionalmente. Após essa fase, a fêmea se desprende do hospedeiro, inicia a fase de digestão e se prepara para a oviposição (Sonenshine 1991a).

Na Figura 10 observa-se que a média de peso dos carrapatos do 8º dia aumenta ligeiramente em relação aos grupos que o antecedem, além disso, percebe-se também que a dispersão do grupo é grande, já que neste grupo haviam carrapatos de variados pesos e em fases diferentes. Neste grupo haviam carrapatos que ainda se encontram na fase 2 e carrapatos na fase de alimentação rápida. Isto é confirmado pelo fato de alguns carrapatos terem terminado o repasto com apenas oito dias e foram incluídos nos grupos AA. Nota-se que a partir do 10º dia de alimentação há um aumento significativo no peso dos carrapatos e isso indica que a maioria está na fase de alimentação rápida. Trabalhos que estabeleceram metodologias para a colonização de *A. cajennense* em laboratório mostraram que o tempo de ingurgitamento de fêmeas do carrapato, quando alimentadas em equinos, foi de oito a dez dias (Sanavria & Prata 1996). Cunha 1978 realizou infestações experimentais em coelhos e encontrou um tempo de ingurgitamento de oito até 30 dias. Uma publicação de 1912, feita pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, encontrou a duração de sete a 12 dias de alimentação de fêmeas de *A. cajennense* em bovinos (Hooker et al. 1912). Esses trabalhos corroboram o fato de que alguns carrapatos com oito dias de alimentação poderiam estar iniciando a última fase de ingurgitamento, mesmo a alimentação sendo realizada em hospedeiro não usual como os camundongos.

Para a realização deste trabalho foram utilizados como fonte de alimentação para os carrapatos camundongos machos da linhagem *Swiss*. Foi escolhido esse modelo, pela facilidade de ser mantido em laboratório e pela disponibilidade de reagentes comerciais a serem utilizados em estudos futuros. Sanavria & Prata (1996) utilizaram equinos para alimentar adultos de *A. cajennense* e obtiveram fêmeas ingurgitadas com peso médio de $601,9 \pm 16,1$ mg com o peso variando de 340 a 1.220 mg. Nunes (2009) e Pinter et al. (2002) utilizando coelhos como fonte de alimentação obtiveram uma variação na média de peso de 362 a 676 mg e 284,5 a 384 mg, respectivamente. No presente trabalho o peso de teleóginas após o desprendimento variou de 502,9 a 841 mg. Diante desses resultados e dos apresentados na literatura, percebe-se que o peso final dos carrapatos alimentados em camundongos é semelhante aos dos alimentados em outros hospedeiros, principalmente em equinos, que é o hospedeiro natural do *A. cajennense*. Estes dados parecem indicar que o hospedeiro não interferiu diretamente no ganho de peso e no desprendimento do carrapato ao final da alimentação.

5.2.2. Quantificação de proteínas no EGS

A fim de verificar a evolução da glândula salivar dos carrapatos durante a alimentação, a quantidade de proteínas totais presente no EGS também foi avaliada. Observou-se que as quantidades de proteínas totais presentes no EGS de carrapatos dos grupos em jejum ao oitavo dia não apresentaram diferença estatística ($p < 0,05$) (Figura 11). Já no 10º dia ocorre um aumento significativo da quantidade de proteínas chegando a pouco mais de 400 µg. Porém, observa-se uma queda da quantidade de proteínas no EGS de carrapatos com 12 dias de alimentação e nos carrapatos que se desprenderam espontaneamente.

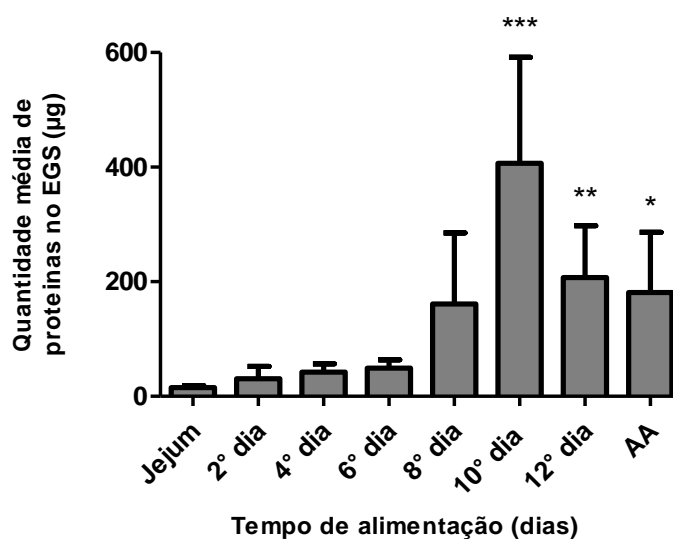


Figura 11: Quantidade de proteínas no extrato de glândula salivar de *Amblyomma cajennense* em diferentes tempos após o início da alimentação. Os dados estão representados como média \pm desvio padrão (n=6). AA = após alimentação (desprendimento espontâneo). Os asteriscos indicam diferença estatística em relação ao grupo de fêmeas em jejum (ANOVA, Dunnet, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,0001).

Trabalhos que estudaram o desenvolvimento da glândula salivar mostraram que o tecido se desenvolve com maior intensidade no período de ingestão rápida de sangue e, nos momentos finais da alimentação, as glândulas já começam a regredir uma vez que várias células entram em apoptose (Bowman & Sauer 2004). Os resultados encontrados refletem este perfil de desenvolvimento. Como descrito acima, no oitavo dia a maior parte das fêmeas está iniciando a fase de alimentação rápida, e a partir do 12º dia, várias fêmeas já se encontravam com a glândula em apoptose, fazendo com que a quantidade média de proteínas no grupo fosse reduzida.

Os carrapatos produzem uma variedade de moléculas farmacológicas pela glândula salivar, como proteínas, lipídeos, lipoproteínas e glicoproteínas. Como já dito anteriormente, essas moléculas são injetadas durante o repasto prejudicando as defesas do hospedeiro, e permitindo sucesso na alimentação. Com o objetivo de identificar as proteínas presentes na saliva do *R. (B.) microplus* durante os estágios de alimentação, Tirloni et al. (2014) realizaram um proteoma da saliva de fêmeas parcialmente ingurgitadas (fase lenta) e completamente ingurgitadas (fase rápida) do carrapato bovino. Este estudo constatou que a saliva de fêmeas parcialmente ingurgitadas possui maior concentração de proteínas (3,22 mg/mL) quando

comparado com os carrapatos completamente ingurgitados (1,75 mg/mL). De acordo com Sauer et al. (1995) durante a alimentação, as fêmeas de ixodídeos aumentam o teor de proteínas no EGS pois expressam novas moléculas, além disso, o tamanho e a massa da glândula salivar de fêmeas adultas aumentam cerca de 25 vezes, quando a fêmea se desprende, a glândula começa a involuir (Bowman & Sauer 2004). Além disso, a glândula salivar também possui a função de diurese em carrapatos ixodídeos, eliminando o excesso de líquido adquirido na dieta através da saliva, sendo esta uma nova função que faz estimular o crescimento da glândula durante a fase de ingestão rápida de sangue (Kaufman et al. 1980, Nunes et al. 2008).

A partir do 12º dia de alimentação e após o desprendimento (Figura 11) a quantidade de proteínas diminui, o que também acontece com os carrapatos completamente ingurgitados de *R. (B.) microplus*. Essa redução na constituição proteica na fase final de ingurgitamento e imediatamente após a o desprendimento do hospedeiro, provavelmente está ligada a autólise que ocorre na glândula salivar neste momento (Sonenshine 1991b, Sauer et al. 1995, Tirloni et al. 2014). Esta degeneração acontece quando a fêmea repleta atinge seu peso e se desprende do hospedeiro. Segundo Sauer et al. (1995) esse processo é iniciado pela liberação do fator de degeneração da glândula salivar, que ocorre quando a fêmea atinge uma massa 10 vezes maior do que em jejum. A degeneração seria controlada por hormônios, os ecdisteróides e também por substâncias do macho que seriam introduzidas com o espermátóforo durante a cópula (Weiss & Kaufman 2004).

5.2.3. Ação do EGS sobre a via clássica do sistema complemento

Após a avaliação do peso, a extração e a quantificação de proteínas totais dos EGS dos grupos de carrapatos retirados dos camundongos, foi realizado o ensaio de inibição da hemólise pela via clássica do sistema complemento humano, a fim de verificar em qual momento da alimentação ocorre uma maior inibição da hemólise. Baseado nos resultados anteriores foi utilizado nos ensaios 7,5 µg de proteínas do EGS, quantidade que já se observa em torno de 20% de inibição na via clássica. Nota-se através dos resultados apresentados na Figura 12 que a inibição da hemólise quase não varia entre os grupos de carrapatos em jejum até o grupo de 10 dias de alimentação. Porém, o grupo em jejum, que inibiu cerca de 25% da hemólise, apresentou diferença estatística ($p < 0,05$) com os grupos de 12 dias e o que se despreendeu espontaneamente, que inibiram mais de 60% da hemólise.

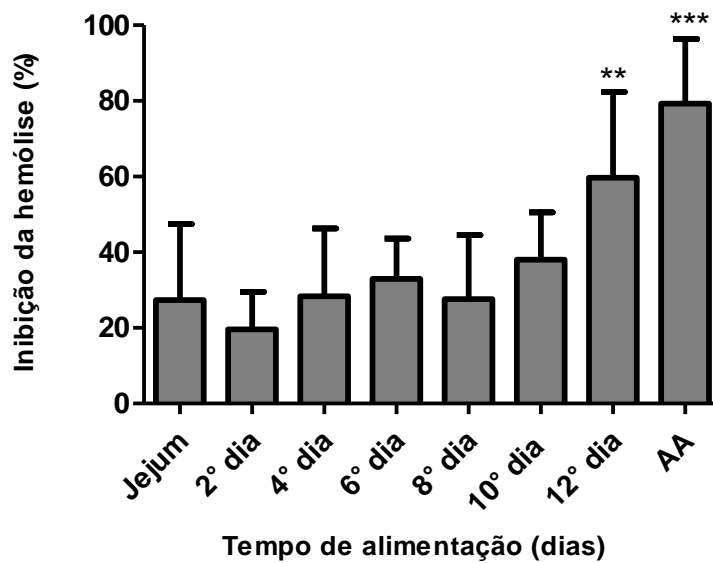


Figura 12: Inibição da via clássica pelo extrato de glândula salivar de *Amblyomma cajennense* em diferentes tempos após o início da alimentação em camundongos. Os dados estão representados como média \pm desvio padrão (n=6). AA = após alimentação (desprendimento espontâneo). Foram utilizados 7,5 μ g de proteínas no ensaio. Os asteriscos indicam diferença estatística em relação ao grupo de fêmeas em jejum (ANOVA, Dunnet, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,0001).

Também foi avaliado a correlação entre o peso dos carrapatos alimentados em camundongos e a atividade inibidora do EGS sobre o sistema complemento. Para isto, foram excluídas da análise as fêmeas em jejum e as que já haviam se desprendido do hospedeiro espontaneamente. Observa-se que existe uma correlação positiva significativa (p<0,001) de nível moderado ($r = 0,585$) entre o peso e a inibição do sistema complemento por EGS (Figura 13).

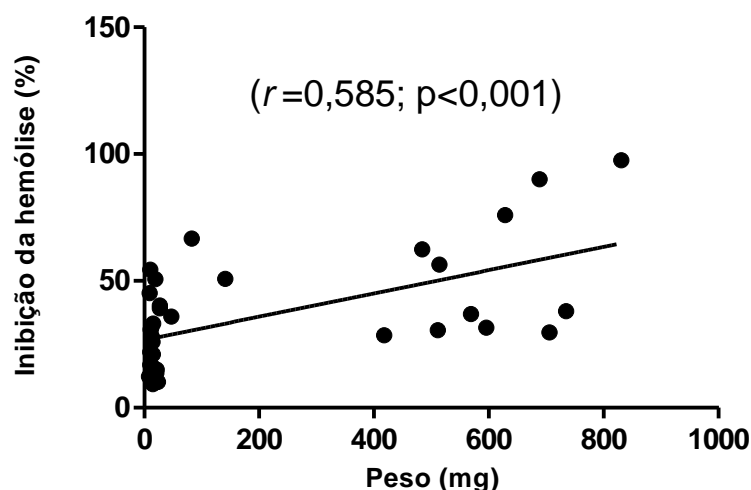


Figura 13: Inibição da hemólise pela via clássica do sistema complemento humano em relação ao peso de fêmeas de *Amblyomma cajennense* alimentadas em camundongos (n=36). $r =$ coeficiente de correlação de Pearson.

Estes resultados possuem uma aplicação prática muito importante, eles indicam que carrapatos no final do período alimentar e aqueles mais pesados possuem maior atividade anticomplemento no EGS, sugerindo que nas coletas realizadas a campo devemos priorizar as fêmeas mais pesadas.

Quanto aos resultados observados, a fisiologia de produção de inibidores do complemento foi semelhante ao observado para saliva de *I. ricinus* alimentados em hamsters, na inibição da via alternativa. Saliva de fêmeas em jejum também foi capaz de promover a inibição da via alternativa e o nível de inibição foi relativamente semelhante até quatro dias antes do final da alimentação, quando houve um aumento na atividade (Lawrie et al. 1999). Estes resultados indicam que já há certa quantidade de inibidor nas glândulas salivares antes mesmo da alimentação. Como as glândulas salivares não possuem um compartimento para estocar a saliva produzida, Lawrie et al. (1999) sugerem que o inibidor seja estocado em vesículas intracelulares presentes na glândula mesmo antes da alimentação. Durante a alimentação estas vesículas são secretadas nos ductos salivares e seu auge de produção ocorre no final do período alimentar, apesar da glândula já vir apresentando uma redução de conteúdo proteico devido a degeneração. Neste momento os carrapatos precisam produzir grande quantidade de moléculas para contrapor as reações nocivas aos carrapatos disparadas no sangue recém-ingerido e que podem lesar o intestino.

Existe um grupo de pesquisadores que levantou uma hipótese relativamente diferente sugerindo que grande parte das atividades que inibem reações desencadeadas no sangue e tecidos do hospedeiro são desempenhadas por moléculas do próprio hospedeiro. A excreção do excesso de fluidos da dieta pelos carrapatos é feita pelas glândulas salivares e, juntamente com estes fluidos, iriam várias moléculas do hospedeiro que atuam no sítio de alimentação (Comunicação pessoal: Albert Mulenga – Texas A&M University, Department of Entomology). Saliva de teleóginas apresenta grande quantidade de moléculas de seus hospedeiros, sendo principalmente moléculas encontradas normalmente no sangue e pele (Tirloni et al. 2014).

5.3. Ação do EGS de *A. cajennense* em diferentes estados fisiológicos obtidos de equinos naturalmente infestados sobre a via clássica do sistema complemento

Uma vez realizados os ensaios de inibição da hemólise com os EGS de carrapatos criados em laboratório, objetivou-se avaliar o perfil de inibição da hemólise dos EGS de fêmeas de *A. cajennense* de diferentes pesos, obtidas a campo. Os carrapatos foram coletados, levados ao laboratório e o EGS foi obtido como já descrito. Foram coletadas fêmeas com peso variando de 15,4 a 970 mg, sendo que todas estavam afixadas nos hospedeiros no momento da coleta. A inibição da via clássica do sistema complemento pelos EGS variou de 11,2 a 64,7% com média de 32,2%, porém não houve correlação (Pearson; $r=-0,187$; $p>0,05$) entre o peso dos carrapatos e a atividade inibidora apresentada (Figura 14).

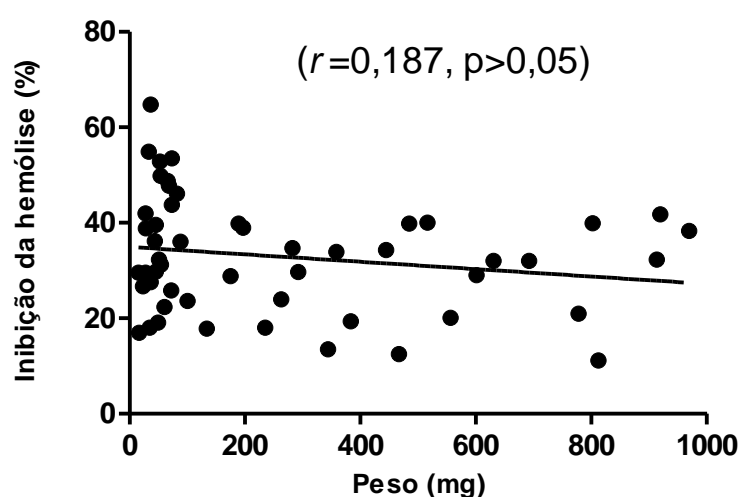


Figura 14: Inibição da hemólise pela via clássica do sistema complemento humano em relação ao peso de fêmeas de *Amblyomma cajennense* coletadas em equinos naturalmente infestados ($n=52$). r = coeficiente de correlação de Pearson.

Os resultados observados para carrapatos de campo foram contrastantes com os obtidos em laboratório. A média de inibição do complemento pelo EGS foi semelhante ao observado para animais de laboratório com tempo de alimentação de até dez dias, porém era esperado que fêmeas com peso acima de 500 mg apresentassem valores de inibição próximos a 60%, como observado para as fêmeas que se alimentaram em camundongos (Figuras 12 e 13). Estes resultados podem estar relacionados às diferenças fisiológicas que ocorrem na alimentação em diferentes hospedeiros, uma vez que no campo eles foram coletados em equinos.

Outra hipótese seria a possibilidade dos carrapatos não terem sido coletados próximo ao momento do desprendimento, quando a atividade está em seu auge. É difícil estimar quando as fêmeas irão encerrar seu repasto, apesar deste momento ser esperado em carrapatos acima de 600 mg.

Além disso, os carrapatos foram coletados nos equinos no início da manhã e levados ao laboratório para serem dissecados, processo que durava até seis horas. Pode ser que o tempo decorrido desde a retirada do carrapato do hospedeiro até o momento da dissecação no laboratório tenha sido tempo suficiente para o início da degeneração na glândula salivar e perda da capacidade inibitória. Segundo Nunes (2009), quando o carrapato é retirado do hospedeiro, sem que ele tenha atingido seu peso ideal, a glândula sofre perda parcial de sua atividade (podendo ser restabelecida ao retorno da alimentação), o que pode ocasionar também, na perda de atividade dos inibidores. O que era diferente dos carrapatos criados em laboratório, que eram dissecados logo que eram retirados dos camundongos e, como eram em menores quantidades, dissecados mais rapidamente.

Nunes (2009) realizou um trabalho que demonstrou que coelhos reinfestados por fêmeas de *A. cajennense* desenvolveram resistência ao carrapato. Essas fêmeas apresentaram aumento no tempo de ingurgitamento total e diminuição de peso final, além de alterações morfológicas nas glândulas salivares. Constatou-se que quando as fêmeas foram alimentadas em coelhos sem contato prévio com carrapatos, as glândulas salivares degeneraram a partir do desprendimento do hospedeiro, com degeneração total cinco dias pós-ingurgitamento. Mas quando alimentadas em coelhos resistentes, as glândulas salivares de partenóginas já apresentavam os primeiros sinais de degeneração, que foi mais severo nas glândulas de carrapatos completamente ingurgitados. Resultados semelhantes foram obtidos por Jittapalapong et al. (2008) na glândula salivar de fêmeas parcialmente ingurgitadas de *R. (B.) microplus*. Os autores observaram maiores danos na glândula salivar de carrapatos alimentados em bovinos que foram previamente imunizados com EGS do carrapato, em comparação com o grupo controle que foi injetado salina. Esse fenômeno poderia explicar a variação na inibição da hemólise apresentada

nos carrapatos coletados na fazenda, uma vez que os equinos, após intensas e incontáveis infestações poderiam estar parcialmente resistentes, alterando a morfologia das glândulas salivares dos carrapatos, enquanto os camundongos utilizados não haviam tido contato prévio com carrapatos.

5.4. Influência do pH na ativação e na inibição da via clássica do sistema complemento humano presentes no EGS do *A. cajennense*

Os ensaios de inibição da hemólise são realizados em pH 7,4, que é o pH normal do sangue. Todos os ensaios foram realizados neste pH no intuito de avaliar a ação da saliva no local de alimentação. Para avaliar a possível ação da saliva na proteção do epitélio intestinal, inicialmente foi medido o valor de pH em cinco teleóginas, coletadas de equinos naturalmente infestados, com peso de 480 a 970 mg. O valor médio do pH no lúmen do intestino foi de $8,04 \pm 0,08$.

Ensaio de hemólise, na ausência de inibidores, em pH 8,0 mostraram que a via clássica está ativa de forma semelhante ao pH 7,4 (Figura 15). Estes resultados indicam que o sistema complemento no sangue recém-ingerido do hospedeiro está ativo e pode causar lesões no intestino do artrópode.

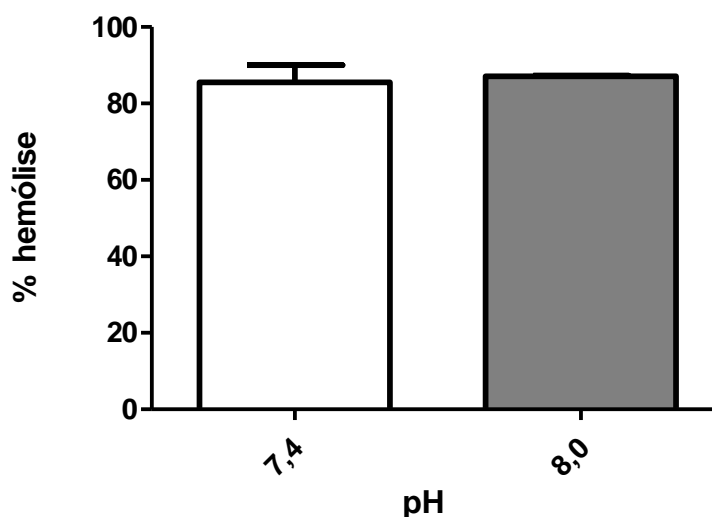


Figura 15: Atividade hemolítica da via clássica do complemento humano em diferentes pHs. Os dados estão representados como média \pm desvio padrão (n=3). Não houve diferença estatística entre os grupos (Teste T, $p > 0,05$)

Para avaliar a ação de moléculas salivares nas condições do pH intestinal, foram realizados ensaios de inibição do complemento por EGS em pH 8,0. Na Figura 16 observa-se que a alcalinização do pH favorece a inibição do complemento, já que a inibição da hemólise

promovida pelo EGS foi significativamente maior ($p < 0,05$) no pH 8,0 para as concentrações proteicas de 3,75 a 15 μg .

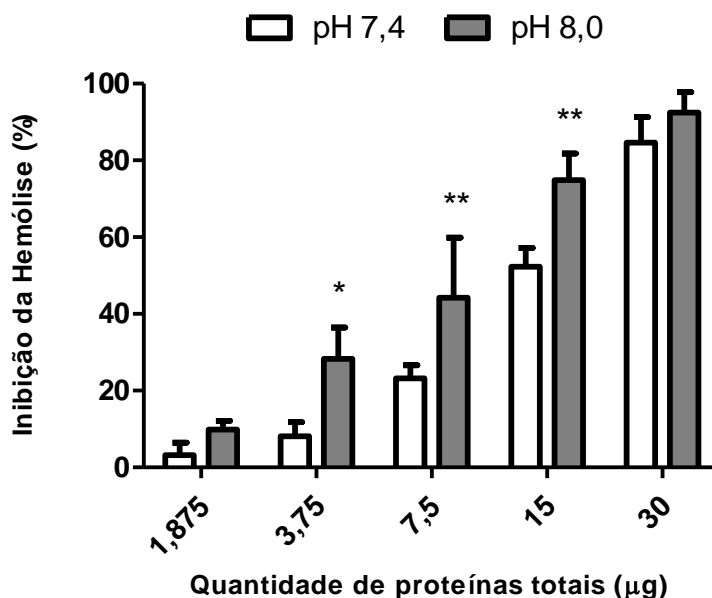


Figura 14: Inibição da via clássica por diferentes quantidades de EGS de *Amblyomma cajennense* nos pHs 7,4 e 8,0. Os dados estão representados como média \pm desvio padrão ($n=3$). Os asteriscos indicam diferença estatística entre os ensaios em pH 7,0 e 8,0 (ANOVA, Bonferroni, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

No momento que o carrapato realiza a hematofagia, ele ingere o sangue, que contém todas as moléculas da cascata do complemento do hospedeiro que pode já estar disparada ou iniciar a partir de anticorpos ou C3b que se ligam à superfície do epitélio intestinal. Por outro lado, o carrapato ingere a própria saliva, que possui os inibidores do sistema complemento e vão contrapor estas respostas. Barros et al. (2009) investigaram o papel dos inibidores do complemento no tubo digestivo de triatomíneos e constatou que quando os insetos eram alimentados forçadamente com soro humano, na ausência quase total de saliva, a superfície intestinal apresentava alta deposição de CAMs e mortalidade de células no epitélio e que estas observações aumentaram à medida que aumentava a concentração de soro, confirmando que os inibidores protegem o intestino contra o ataque do sistema complemento do hospedeiro.

A alcalinização do pH não afeta a ativação do sistema complemento e nem a atuação dos inibidores do complemento. Isso é benéfico para o carrapato, uma vez que os inibidores do sistema complemento, após serem ingeridos, protegem o epitélio do intestino contra o ataque do complemento do hospedeiro no momento da hematofagia. A atuação do sistema

complemento em diferentes pHs já foi estudada em outras espécies de artrópodes hematófagos, tais como flebotomíneos (Mendes-Sousa et al. 2013) e triatomíneos (Barros et al. 2009). Mendes-Sousa et al. (2013) testaram o pH 8,15, que é encontrado no intestino de flebotomíneos (Santos et al. 2008), na ativação do complemento de cães, galinhas e cobaias. Essa alteração não causou diferença significativa na ativação da via clássica das três espécies testadas, indicando que a alcalinização do sangue no intestino do vetor não afeta de forma significativa a ativação da via clássica das três espécies. Porém, houve redução da ativação da via alternativa de cães e cobaias. Barros et al. (2009) também encontraram resultados semelhantes estudando a influência do pH na ativação do sistema complemento humano. O aumento de 7,4 para pHs 8,0 e 8,5 não alterou a ativação da via clássica, porém alterou a ativação da via alternativa. Os trabalhos indicam que a alcalinização do pH poderia se tornar um risco para os hematófagos, uma vez que a via clássica é ativada normalmente no interior do intestino. Já a via alternativa, que não foi testada no presente trabalho, pode ser inibida naturalmente pela alcalinização do pH no intestino dos artrópodes, podendo atuar como proteção parcial contra o ataque do sistema complemento no epitélio intestinal.

5. Conclusões

- A saliva e o EGS do *Amblyomma cajennense* inibem a via clássica do sistema complemento humano;
- O EGS de partenóginas e teleóginas de *A. cajennense* inibem a via clássica do sistema complemento humano, porém o EGS de partenóginas é mais ativo;
- A inibição da via clássica do sistema complemento humano presente no EGS de fêmeas de *A. cajennense* alimentadas em camundongos é maior na fase final de alimentação;
- A inibição da via clássica do sistema complemento humano presente no EGS de fêmeas alimentadas em equinos não apresenta correlação com o peso;
- A alcalinização do pH (pH 8,0) não interfere na ativação da via clássica do sistema complemento humano;
- A inibição promovida pelo EGS é maior em pH 8,0 do que em pH 7,4.

REFERÊNCIAS

- Alarcon-Chaidez FJ 2013. Francisco J. Alarcon-Chaidez. In: Sonenshine DE, Roe RM (Eds.), *Biol. Ticks*, p.163-205.
- Anderson JF, Magnarelli LA 2008. Biology of ticks. *Infect Dis Clin North Am* 22: 195–215.
- Anguita J, Ramamoorthi N, Hovius JW., Das S, Thomas V, Persinski R, Conze D, Askenase PW, Rincón M, Kantor FS, Fikrig E 2002. Salp15, an Ixodes scapularis Salivary Protein, Inhibits CD4+ T Cell Activation. *Immunity* 16: 849–859.
- Barros VC, Assumpcao JG, Cadete AM, Santos VC, Cavalcante RR, Araujo RN, Pereira MH, Gontijo NF 2009. The role of salivary and intestinal complement system inhibitors in the midgut protection of triatomines and mosquitoes. *PLoS One* 4.
- Barros-Battesti DM, Arzua M, Bechara GH 2006. *Carrapatos de importância médico-veterinária da região Neotropical*. Vox/ICTTD-3/Butantan, São Paulo.
- Batista IF, Ramos OH, Ventura JS, Junqueira-de-Azevedo IL, Ho PL, Chudzinski-Tavassi AM 2010. A new Factor Xa inhibitor from Amblyomma cajennense with a unique domain composition. *Arch Biochem Biophys* 493: 151–156.
- Beati L, Nava S, Burkman EJ, Barros-Battesti DM, Labruna MB, Guglielmone AA, Caceres AG, Guzman-Cornejo CM, Leon R, Durden LA, Faccini JL 2013. Amblyomma cajennense (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae), the Cayenne tick: phylogeography and evidence for allopatric speciation. *BMC Evol Biol* 13: 267.
- Borges LMF, Oliveira PR, Lisboa CLM, Ribeiro MFB 2002. Horse resistance to natural infestations of Anocentor nitens and Amblyomma cajennense (Acari: Ixodidae). *Vet. Parasitol.* 104: 265–273.
- Bouchard KR, Wikel SK 2005. Care, Maintenance, and Experimental Infestation of Ticks in the Laboratory Setting. In: Marquardt WC (Ed.), *Biol. Dis. Vectors*, Elsevier, San Diego, pp. 705–712.
- Bowman AS, Sauer JR 2004. Tick salivary glands: function, physiology and future. *Parasitology* 129 Suppl: S67–S81.
- Bradford MM 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248–254.
- Caperucci D, Bechara GH, Camargo Mathias MI 2010. 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* 41: 710–721.
- Cavalcante RR, Pereira MH, Gontijo NF 2003. Anti-complement activity in the saliva of phlebotomine sand flies and other haematophagous insects. *Parasitology* 127: 87–93.

- Chen CB, Wallis R 2004. Two mechanisms for mannose-binding protein modulation of the activity of its associated serine proteases. *J. Biol. Chem.* 279: 26058–26065.
- Ciprandi A, Oliveira SK de, Masuda A, Horn F, Termignoni C 2006. Boophilus microplus: its saliva contains microphilin, a small thrombin inhibitor. *Exp Parasitol* 114: 40–46.
- Costa J, Botelho J 2011. Classe Arachnida. In: Neves D, Melo A, Linardi P, Vitor R (Eds.), *Parasitol. Humana*, Atheneu, p. 449-458.
- Couvreur B, Beaufays J, Charon C, Lahaye K, Gensale F, Denis V, Charlotiaux B, Decrem Y, Prevot PP, Brossard M, Vanhamme L, Godfroid E 2008. Variability and action mechanism of a family of anticomplement proteins in Ixodes ricinus. *PLoS One* 3:.
- Daix V, Schroeder H, Praet N, Georgin JP, Chiappino I, Gillet L, Fays K De, Decrem Y, Lebouille G, Godfroid E, Bollen A, Pastoret PP, Gern L, Sharp PM, Vanderplasschen A 2007. Ixodes ticks belonging to the Ixodes ricinus complex encode a family of anticomplement proteins. *Insect Mol. Biol.* 16: 155–166.
- Dunkelberger JR, Song WC 2010. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Res* 20: 34–50.
- Estrada-Peña A, Tarragona EL, Vesco U, Meneghi D de, Mastropaolo M, Mangold AJ, Guglielmone AA, Nava S 2014. Divergent environmental preferences and areas of sympatry of tick species in the Amblyomma cajennense complex (Ixodidae). *Int. J. Parasitol.* 44: 1081–1089.
- Francischetti IM, Sa-Nunes A, Mans BJ, Santos IM, Ribeiro JM 2009. The role of saliva in tick feeding. *Front Biosci* 14: 2051–2088.
- Galvão MAM, Silva LJ da, Nascimento EMM, Calic SB, Sousa R de, Bacellar F 2005. Rickettsial diseases in Brazil and Portugal: occurrence, distribution and diagnosis. *Rev. Saude Publica* 39: 850–856.
- Grandjean O, Aeschlimann A 1973. Contribution to the study of digestion in ticks: histology and fine structure of the midgut epithelium of Ornithodoros moubata, Murray (Ixodoidea, Argasidae). *Acta Trop* 30: 193–212.
- Hamilton SE, Kemp DH, McKenna R V, Willadsen P 1991. Gut cells of the tick B. microplus: the effect of vaccination on digest cells and experiments on blood meal absorption by these cells. In: Dusbabek F, Bukva V (Eds.), *Mod. Acarol.*, SPB Academic Publishing, pp. 341–351.
- Hannier S, Liversidge J, Sternberg JM, Bowman AS 2004. Characterization of the B-cell inhibitory protein factor in Ixodes ricinus tick saliva: a potential role in enhanced Borrelia burgdoferi transmission. *Immunology* 113: 401–408.
- Hooker WA, Bishopp FC, Wood HP 1912. The life history and bionomics of some North American ticks. *U. S. Dept. Agri. Bur. Ent. Bui.* 239.

- Inokuma H, Kemp DH, Willadsen P 1994. Prostaglandin E2 production by the cattle tick (*Boophilus microplus*) into feeding sites and its effect on the response of bovine mononuclear cells to mitogen. *Vet Parasitol* 53: 293–299.
- Jittapalapong S, Phichitrasilp T, Chanphao H, Rerkamnuychoke W, Stich RW 2008. Immunization with tick salivary gland extracts. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1149: 200–204.
- Jongejan F, Uilenberg G 2004. The global importance of ticks. *Parasitology* 129 Suppl: S3–S14.
- Kaufman WR, Aeschlimann AA, Diehl PA 1980. Regulation of body volume by salivation in a tick challenged with fluid loads. *Am. J. Physiol.* 238: R102–R112.
- Keirans JE 2009. Order Ixodida. In: Krantz G, Walter D (Eds.), *A Man. Acarol.*, Texas Tech University Press, Lubbock, pp. 111–123.
- la Fuente J de, Estrada-Pena A, Venzal JM, Kocan KM, Sonenshine DE 2008. Overview: Ticks as vectors of pathogens that cause disease in humans and animals. *Front. Biosci.* 13: 6938–6946.
- Labruna MB, Paula CD De, Lima TF, Sana DA 2002. Ticks (Acari: Ixodidae) on wild animals from the Porto-Primavera hydroelectric power station area, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 97: 1133–1136.
- Lawrie CH, Randolph SE, Nuttall PA 1999. Ixodes ticks: serum species sensitivity of anticomplement activity. *Exp Parasitol* 93: 207–214.
- Lopes CM, Leite RC, Labruna MB, Oliveira PR de, Borges LM, Rodrigues ZB, Carvalho HA de, Freitas CM de, Vieira Junior CR 1998. Host specificity of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) with comments on the drop-off rhythm. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93: 347–351.
- Martins TF 2014. Estudo do complexo *Amblyomma cajennense* no Brasil, PhD Thesis, Universidade de São Paulo, São Paulo, p.113.
- Martyn K. 1988. Provisional Atlas of the Ticks (Ixodidae) of the British Isles. *Nat. Environ. Res. Counc*, Swindon.
- Mendes-Sousa AF, Nascimento AA, Queiroz DC, Vale VF, Fujiwara RT, Araujo RN, Pereira MH, Gontijo NF 2013. Different host complement systems and their interactions with saliva from *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae) and *Leishmania infantum* promastigotes. *PLoS One* 8.
- Morgan BP, Wlaker JM 2000. The complement system: An overview. In: Morgan BP (Ed.), *Complement methods Protoc.*, Humana press, Totowa, p. 261.
- Nava S, Beati L, Labruna MB, Caceres AG, Mangold AJ, Guglielmone AA 2014. Reassessment of the taxonomic status of *Amblyomma cajennense* () with the description of three new species, *Amblyomma tonelliae* n. sp., *Amblyomma interandinum* n. sp. and

- Amblyomma patinoi n. sp., and reinstatement of Amblyomma mixtum, and Amblyomma sculptu. *Ticks Tick Borne Dis.* 5: 252-76.
- Nonaka M, Yoshizaki F 2004. Evolution of the complement system. *Mol. Immunol.* 40: 897–902.
- Nunes PH 2009. Alterações morfológicas em glândulas salivares de fêmeas de carrapatos *Amblyomma cajennense* Fabricius, 1787, (Acari: Ixodidae) em diferentes estágios de alimentação durante sucessivas infestações em coelhos, PhD Thesis, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 112 pp.
- Nunes PH, Bechara GH, Camargo-Mathias MI 2008. Morphological changes in the salivary glands of *Amblyomma cajennense* females (Acari: Ixodidae) in different feeding stages on rabbits at first infestation. *Exp. Appl. Acarol.* 45: 199–209.
- Nunn MA, Sharma A, Paesen GC, Adamson S, Lissina O, Willis AC, Nuttall PA 2005. Complement inhibitor of C5 activation from the soft tick *Ornithodoros moubata*. *J. Immunol.* 174: 2084–2091.
- Nuttall PA, Labuda M 2004. Tick-host interactions: saliva-activated transmission. *Parasitology* 129 Suppl: S177–S189.
- Ooi C, Haines LR, Southern DM, Lehane MJ, Acosta-serrano A 2015. Tsetse GmmSRPN10 Has Anti-complement Activity and Is Important for Successful Establishment of Trypanosome Infections in the Fly Midgut. *PLoS One* 9: 1–12.
- PAHO 2002. Health in the Americas. In: Pan American Health Organization, p. 580.
- Pereira M, Labruna MB 1998. Febre maculosa: aspectos clínicos e epidemiológicos. *Clín. Vet* 12: 19–23.
- Pinter A, Labruna MB, Faccini JL 2002. The sex ratio of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) with notes on the male feeding period in the laboratory. *Vet Parasitol* 105: 79–88.
- Presanis JS, Kojima M, Sim RB 2003. Biochemistry and genetics of mannan-binding lectin (MBL). *Biochem. Soc. Trans.* 31: 748–752.
- Ribeiro JM 1987. *Ixodes dammini*: salivary anti-complement activity. *Exp Parasitol* 64: 347–353.
- Ribeiro J., Endris TM, Endris R 1991. Saliva of the soft tick, *ornithodoros moubata*, contains anti-platelet and apyrase activities. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Physiol.* 100: 109–112.
- Ribeiro JM, Mather TN 1998. *Ixodes scapularis*: salivary kininase activity is a metallo dipeptidyl carboxypeptidase. *Exp. Parasitol.* 89: 213–221.
- Ribeiro JMC, Zeidner NS, Ledin K, Dolan MC, Mather TN 2004. How much pilocarpine contaminates pilocarpine-induced tick saliva?. *Med. Vet. Entomol.* 18: 20–24.

- Rojas R, Marini MA, Coutinho MTZ 1999. Wild birds as hosts of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94: 315–322.
- Rossignol PA, Ribeiro JM, Jungery M, Turell MJ, Spielman A, Bailey CL 1985. Enhanced mosquito blood-finding success on parasitemic hosts: evidence for vector-parasite mutualism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82: 7725–7727.
- Sanavria A, Prata MCA 1996. Metodologia para colonização do *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) em laboratório. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 5: 87–90.
- Santos VC, Araujo RN, Machado LA, Pereira MH, Gontijo NF 2008. The physiology of the midgut of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva 1912): pH in different physiological conditions and mechanisms involved in its control. *J Exp Biol* 211: 2792–2798.
- Sarma JV, Ward PA 2011. The complement system. *Cell Tissue Res.* 343: 227–235.
- Sauer JR, McSwain JL, Bowman AS, Essenberg RC 1995. Tick salivary gland physiology. *Annu. Rev. Entomol.* 40: 245–267.
- Schroeder H, Skelly PJ, Zipfel PF, Losson B, Vanderplasschen A 2009. Subversion of complement by hematophagous parasites. *Dev Comp Immunol* 33: 5–13.
- Scoles G a, Ueti MW 2013. *Amblyomma cajennense* is an intrastadial biological vector of *Theileria equi*. *Parasit. Vectors* 6: 306.
- Sim RB, Dodds AW 1997. The complement system: an introduction. In: Dodds R. B. AW& S (Ed.), *Complement a Pract. approach*, University Press, Oxford, pp. 1–18.
- Sonenshine DE 1991a. Structure and function of body organs and tissues. The midgut. In: Sonenshine DE (Ed.), *Biol. ticks*, Oxford University Press, New York, pp. 159–188.
- Sonenshine DE 1991b. Structure and function of body organs and tissues. Salivary Glands. In: Sonenshine DE (Ed.), *Biol. Ticks*, Oxford University Press, New York, pp. 141–158.
- Taeye SW de, Kreuk L, Dam AP van, Hovius JW, Schuijt TJ 2013. Complement evasion by *Borrelia burgdorferi*: It takes three to tango. *Trends Parasitol.* 29: 119–128.
- Tirloni L, Reck J, Terra RMS, Martins JR, Mulenga A, Sherman NE, Fox JW, Yates JR, Termignoni C, Pinto AFM, Vaz IDS 2014. Proteomic analysis of cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* saliva: A comparison between partially and fully engorged females. *PLoS One* 9.
- Trager W 1939. Acquired immunity to ticks. *J. Parasitol.* 25: 57–81.
- Tyson K, Elkins C, Patterson H, Fikrig E, Silva A de 2007. Biochemical and functional characterization of Salp20, an *Ixodes scapularis* tick salivary protein that inhibits the complement pathway. *Insect Mol Biol* 16: 469–479.
- Valenzuela JG 2005. Blood-feeding arthropod salivary glands and saliva. In: Marquardt WC (Ed.), *Biol. Dis. vectors*, Elsevier Academic Press, p. 785.

- Valenzuela JG, Charlab R, Mather TN, Ribeiro JM 2000. Purification, cloning, and expression of a novel salivary anticomplement protein from the tick, *Ixodes scapularis*. *J Biol Chem* 275: 18717–18723.
- Vilela ML, Souza NA, Oliveira SM, Costa-Pinto D, Cabello PH, Rangel EF, Traub-Cseko YM 2006. Considerations on the effect of anti-sandfly antibodies on biological parameters of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Braz J Biol* 66: 175–183.
- Weiss BL, Kaufman WR 2004. Two feeding-induced proteins from the male gonad trigger engorgement of the female tick *Amblyomma hebraeum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101: 5874–5879.
- WHO 1997. Vector control methods for use by individuals and communities. In: World Health Organization, Geneva, p. 412.
- Wikel SK, Allen JR 1977. Acquired resistance to ticks. III. Cobra venom factor and the resistance response. *Immunology* 32: 457–465.
- Wikel SK, Allen JR 1982. Immunological basis of host resistance to ticks. In: Galun F, Obenchaim R (Eds.), *Physiol. ticks*, Pergamon, Oxford, pp. 169–196.
- Willadsen P 2004. Anti-tick vaccines. *Parasitology* 129 Suppl: S367–S387.
- Yu D, Liang J, Yu H, Wu H, Xu C, Liu J, Lai R 2006. A tick B-cell inhibitory protein from salivary glands of the hard tick, *Hyalomma asiaticum asiaticum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 343: 585–590.

ANEXO I – Aprovação do Comitê de Ética



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 137/2011**, relativo ao projeto intitulado "**Identificação e caracterização funcional de moléculas relacionadas à hematofagia expressas na glândula salivar e no intestino do Amblyomma Cajennense (Acari: Ixodidae)**", que tem como responsável(is) **Ricardo Nascimento Araújo**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **22/ 06/ 2011**.


Este certificado expira-se em **22/ 06/ 2016**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 137/2011**, related to the project entitled "**Identification and functional characterization of molecules related to the hematophagy expressed in the salivary gland and intestine of Amblyomma Cejennense (Acari: Ixodidae)**", under the supervisors of **Ricardo Nascimento Araújo**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **June 22, 2011**.

This certificate expires in **June 22, 2016**.

Belo Horizonte, 27 de Junho de 2011.


Profª. Jaqueline Isaura Alvarez-Leite
Coordenadora do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

(Mod.Cert. v1.0)