

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**Instituto de Ciências Biológicas**

**Departamento de Parasitologia**

**Programa de Pós-Graduação em Parasitologia**

**Paula Ferreira Franco**

**Identificação e caracterização funcional de esfingomielinases salivares do carrapato**  
*Amblyomma sculptum*

**Belo Horizonte**

**2019**

**Paula Ferreira Franco**

**Identificação e caracterização funcional de esfingomielinases salivares do carrapato  
*Amblyomma sculptum***

Tese 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 Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Entomologia

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Nascimento Araújo

Coorientador: Profa. Dra. Liza Figueiredo Felicori Vilela

**Belo Horizonte  
2019**

- 043 Franco, Paula Ferreira.  
Identificação e caracterização funcional de esfingomielinases salivares do carrapato *Amblyomma sculptum* [manuscrito] / Paula Ferreira Franco. – 2019.  
71 f. : il. ; 29,5 cm.
- Orientador: Prof. Dr. Ricardo Nascimento Araújo. Coorientador: Profa. Dra. Liza Figueiredo Felicori Vilela.  
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Parasitologia.
1. Parasitologia. 2. Carrapatos. 3. Glândulas Salivares. 4. Esfingomielina Fosfodiesterase. I. Araújo, Ricardo Nascimento. II. Vilela, Liza Figueiredo Felicori. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 576.88/.89



Universidade Federal de Minas Gerais



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Parasitologia

**ATA DE DEFESA DE TESE - DOUTORADO**

**Paula Ferreira Franco**

296/2019/10  
entrada  
1º/2015  
2015705931

Às nove horas e trinta minutos do dia 28 de junho do ano de 2019, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora de Tese, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: **“Identificação e caracterização funcional de esfingomielinases salivares do carrapato *Amblyomma sculptum*”**, área de concentração: **Entomologia**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, **Dr. Ricardo Nascimento Araujo**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao (a) candidato (a), para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do (a) candidato (a). Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do (a) candidato (a) e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dr. Ricardo Nascimento Araujo	UFMG	APROVADA
Dr. Fernando Ariel Genta	IOC/FIOCRUZ - RJ	APROVADA
Dra. Camila Dias-Lopes	COLTEC	Aprovada
Dr. Gregório Guilherme Almeida	IRR/FIOCRUZ - BH	Aprovada
Dr. Ronaldo Alves Pinto Nagem	UFMG	APROVADA
Dra. Liza Figueiredo Felicori Vilela	UFMG	APROVADA

**Expedição do resultado final.**

CONSIDERAÇÕES GERAIS – SOBRE TESE APRESENTADA PELO (A) O (A) CANDIDATO (A):

Exigências	
Recomendações	
Sugestões	Foram reparadas a última ao longo da arguição.

Pelas indicações, o (a) candidato(a) foi considerado(a): Aprovada  
O resultado final foi comunicado publicamente ao(a) candidato(a) pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.

**Belo Horizonte, 28 de junho de 2019.**

Dr. Ricardo Nascimento Araujo \_\_\_\_\_  
(Orientador)

Dr. Fernando Ariel Genta Fernando Ariel Genta \_\_\_\_\_

Dra. Camila Dias-Lopes Camila Elias Lopes \_\_\_\_\_

Dr. Gregório Guilherme Almeida \_\_\_\_\_

Dr. Ronaldo Alves Pinto Nagem \_\_\_\_\_

Dr. Liza Figueiredo Felicori Vilela Felicori \_\_\_\_\_  
(Coorientadora)

Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador

Desatid  
Dra. Mariana Casagrande Barroto  
Coordenadora do Programa de  
Pós-Graduação em Parasitologia  
Portaria no. 3.594 - 03/08/2019  
SIAPE: 1517341

## AGRADECIMENTOS

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

À minha mãe Jerusa e meu pai Ricardo pela força e apoio em todas as minhas decisões pela vida e por serem, sempre, meus maiores exemplos. Às minhas irmãs Renata e Marina pelo carinho e por sempre estarem ao meu lado. À toda minha família, tios, tias, primos e primas, 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 dedicação.

Ao meu orientador Prof. Ricardo Araújo, muito obrigada pelos ensinamentos, orientação, paciência e dedicação.

À minha co-orientadora e amiga Profa. Liza Felicori pela ajuda e colaboração.

À Profa. Alessandra Simonini pelas oportunidades e confiança.

Aos técnicos (e amigos) Márcia e César, sem eles nada seria possível.

Às minhas amigas do LFIH Jéssica, pela ajuda, risadas e por estar sempre do meu lado em todos os momentos, de angústia e alegria; À Rafa, pela ajuda, pelos ensinamentos e conselhos e Denise, pelos desabafos e conversas sobre a vida.

Meus amigos Dalbis e Gabriel, por toda a ajuda e amizade. Bebelá Cosso, Rodolfo, Mayke, Nati, Luisa L., Luiza M., Angelita, Ulisses, Daniel, Luccas, Lidiane, Bebelá Goes, Artur, Rafael, Giovanna, Agna, Ana, Pedro... que tornaram a realização desse trabalho mais divertido

Aos Professores Nelder, Marcos, Maurício, Grasielle e Leonardo pelas contribuições dadas ao longo desses 8 anos de LFIH.

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

À FAPEMIG, CNPq, CAPES, INCT-Entomologia Molecular pelo financiamento.

Aos animais que participaram desse trabalho.

Muito Obrigada!!!!

## RESUMO

O *Amblyomma sculptum* é um carrapato de importância médica e veterinária. Além de ser o principal transmissor da *Rickettsia rickettsii* para o homem e os animais no Brasil, esta espécie também causa grandes prejuízos para a pecuária. Ao realizar a hematofagia, os carrapatos secretam grande quantidade de saliva que possui um arsenal de moléculas biologicamente ativas que contrapõem as reações reparatórias do hospedeiro e garantem o sucesso na ingestão de sangue. Dentre as moléculas salivares de carrapatos, destacam-se as esfingomielinases D (SMasesD) que são enzimas capazes de hidrolisar a esfingomielinina, presente nas membranas celulares, formando os produtos ceramida 1-fosfato e colina. Essa enzima foi descrita anteriormente no veneno de aranhas do gênero *Loxosceles* sp. e são as principais moléculas envolvidas no loxoscelismo, causando graves lesões cutâneas, como a dermonecrose e outros efeitos sistêmicos, como a hemólise intravascular e agregação plaquetária. Nos carrapatos, esta enzima foi detectada nos transcriptomas salivares de *Rhipicephalus microplus*, *Amblyomma maculatum* e *Ixodes scapularis*. Para aprofundar o conhecimento sobre as SMases D salivares de carrapatos, os objetivos deste estudo foram verificar a presença dessa enzima na glândula salivar (GS) do *Amblyomma sculptum* e caracterizar sua função. Primeiramente, a presença da enzima foi investigada em extratos de glândula salivar (EGSs) de fêmeas de carrapatos em vários tempos após a alimentação. Foi possível perceber a presença de atividade e que ela aumenta ao longo da hematofagia. Em seguida, foi realizado uma busca por sequências homólogas à SMase D do veneno de *L. intermedia* em um transcriptoma de GS do carrapato. Foi identificada uma sequência com 40% de identidade que possui os aminoácidos responsáveis pela atividade catalítica, características das SMases D. A proteína, denominada AsSMase D, foi clonada em vetor pET28a e expressa em *Escherichia coli*. A proteína recombinante produzida foi chamada de rAsSMase D e anticorpos anti-rAsSMase D foram capazes de reconhecer uma proteína nativa no EGS de fêmeas por meio de Western Blot. Através de PCR convencional foi possível detectar a presença de mRNA da AsSMase D em todos os estágios de desenvolvimento do carrapato (larvas, ninfas, machos e fêmeas) e na GS de fêmeas. Análises utilizando qPCR demonstraram que a expressão da AsSMase D é maior em fêmeas de carrapatos em jejum e reduz gradualmente com o início da alimentação sanguínea, concordando com os resultados obtidos pelo ELISA, que também demonstram uma queda na quantidade de proteínas ao longo da hematofagia. Ao silenciar a expressão do gene da AsSMase D na glândula salivar de fêmeas de *A. sculptum*, através de RNAi, foi observado cerca de 90% de redução na expressão. Porém, ao utilizar os carrapatos silenciados em ensaio de alimentação em camundongos *Swiss*, não foi possível perceber alteração no comportamento alimentar desses carrapatos. Mesma observação foi feita ao avaliar a alimentação de carrapatos em hospedeiros imunizados com a rAsSMase D. Ensaios *in vivo* e *in vitro* para a identificação da função da proteína foram realizados. Com o objetivo de testar a capacidade dermonecrótica, coelhos *New Zealand* foram injetados com a rAsSMase D, não sendo observada nenhuma alteração. A capacidade de a rAsSMase D causar hemólise em ensaio hemolítico pela via alternativa também foi testada. Foi possível observar que a rAsSMase D não causa inibição da hemólise, porém foi capaz de causar aumento de 17% da hemólise. A capacidade da rAsSMase D em ativar a cascata de coagulação e a agregação plaquetária também foi avaliada, porém somente no ensaio de coagulação foi possível perceber um pequeno aumento no tempo de coagulação. Os resultados confirmam a presença de uma SMase D na glândula salivar de *A. sculptum* e indicam que a proteína é encontrada em maiores níveis no início da alimentação. Novas investigações devem ser realizadas a fim de melhor elucidar a função da AsSMase D para o *A. sculptum*.

Palavras-chave: *Amblyomma sculptum*. Esfingomielinase D. Transcriptoma salivar. Hematofagia.

## ABSTRACT

*Amblyomma sculptum* is a tick of medical and veterinary importance. In addition to being the main vector of *Rickettsia rickettsii* to humans and animals in Brazil, this species also causes great damage to livestock. During hematophagy, ticks secrete a large amount of saliva that has an arsenal of biologically active molecules which counteract the host's repair reactions and ensure success in blood ingestion. Among the salivary molecules of ticks, the sphingomyelinase D (SMasesD), which are enzymes capable of hydrolyzing sphingomyelin present in cell membranes, form the products ceramide 1-phosphate and choline. This enzyme was previously described in the venom of spiders of the genus *Loxosceles* sp. and are the major molecules involved in loxoscelism, causing severe cutaneous lesions such as dermonecrosis and other systemic effects such as intravascular hemolysis and platelet aggregation. In ticks, this enzyme was detected in the salivary transcripts of *Rhipicephalus microplus*, *Amblyomma maculatum* and *Ixodes scapularis*. The aim of this study was to verify the presence of this AsSMase D in the salivary gland (SG) of *Amblyomma sculptum* and to characterize its function. First, the presence of the enzyme was investigated in salivary gland extracts (SGEs) of tick females at different intervals post-feeding. It was possible to perceive the presence of activity and that it increases throughout hematophagy. Next, a search was made for sequences homologous to SMase D of the *L. intermedia* venom in a tick SG transcriptome. A 40% identity sequence was identified which possessed the amino acids responsible for the catalytic activity, characteristics of the SMases D. The protein, designated AsSMase D, was cloned into vector pET28a-TEV and expressed in *Escherichia coli*. The recombinant protein produced was called rAsSMase D, and through western blot analysis it was verified that anti-rAsSmaseD antibodies were able to recognize a native protein in females' SGE. Through conventional PCR it was possible to detect the presence of AsSMase D mRNA at all stages of tick development (larvae, nymphs, males and females) and in SG of females. Analyzes using qPCR demonstrated that AsSMase D expression is higher in fasting female ticks and reduces gradually with the onset of blood supply, in agreement with the results obtained by the ELISA, which also demonstrated a decrease in the amount of proteins throughout hematophagy. By silencing the expression of the AsSMase D gene in the salivary gland of *A. sculptum* females through iRNA, about 90% reduction in the expression was observed. However, when using the silenced ticks in feeding trials in Swiss mice, it was not possible to notice a change in the feeding behavior of these ticks. A similar pattern was observed when evaluating the feeding of ticks in hosts immunized with rAsSMase D. *In vivo* and *in vitro* assays for the identification of protein function were performed. In order to evaluate the dermonecrotic capacity, New Zealand rabbits were injected with rAsSMase D, but no changes were observed. The ability of rAsSMase D to cause hemolysis in the alternative pathway hemolytic assay was also tested. It was possible to observe that rAsSMase D does not cause inhibition of hemolysis, but was able to cause a 17% increase in hemolysis process. The ability of rAsSMase D to activate the coagulation cascade and platelet aggregation was also evaluated, but only in the coagulation assay was it possible to detect a small increase in coagulation time. The results confirm the presence of a SMase D in the salivary gland of *A. sculptum* and indicate that the protein is found at higher levels at the beginning of feeding. New investigations will be performed in order to better elucidate the importance of AsSMase D in *A. sculptum*.

Keywords: *Amblyomma sculptum*. Sphingomyelinase D. Salivary transcriptome. Hematophagy.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1:</b> Distribuição geográfica das espécies de carrapatos pertencentes ao complexo <i>Amblyomma cajennense</i> sensu lato..	15
<b>Figura 2:</b> Microscopia eletrônica das fases adultas do carrapato <i>A. sculptum</i> .	16
<b>Figura 3:</b> Vista dorsal dos estágios adultos de <i>A. sculptum</i> .	16
<b>Figura 4:</b> Formas evolutivas de <i>Amblyomma sculptum</i>	17
<b>Figura 5:</b> Ciclo biológico do <i>Amblyomma sculptum</i> .	18
<b>Figura 6:</b> Ação da esfingomielinase (SMase) sobre a esfingomielina.	22
<b>Figura 7:</b> Sítios de clivagem das SMases D e C na esfingomielina.	23
<b>Figura 8:</b> Representação da estrutura de SMase I de <i>L. laeta</i> vista através do eixo Tim Barril ( $\alpha/\beta$ )8.	25
<b>Figura 9:</b> Esquema do ensaio de atividade enzimática da esfingomielinase utilizando o Kit Amplex® Red Sphingomyelinase Assay	31
<b>Figura 10:</b> Atividade esfingomielinásica presente em extratos de glândula salivar de fêmeas de <i>A. sculptum</i> em diferentes dias após o início da alimentação.	42
<b>Figura 11:</b> Alinhamento das sequências da SMase D de <i>Loxosceles laeta</i> e da SMase D encontrada no transcriptoma de glândula salivar de <i>Amblyomma sculptum</i> .	44
<b>Figura 12:</b> Características estruturais da AsSMase D.	45
<b>Figura 13:</b> Alinhamento das sequências de esfingomielinases depositadas no NCBI.	47
<b>Figura 14:</b> Alinhamento de sequências de SMases D encontradas em transcriptomas de diferentes espécies de carrapatos e aranhas	49
<b>Figura 15:</b> Sequência de nucleotídeos e aminoácidos da proteína recombinante homóloga à AsSMase D.	50
<b>Figura 16:</b> Expressão e purificação da rAsSMase D.	52
<b>Figura 17:</b> Confirmação da expressão e atividade da rAsSMase D.	54
<b>Figura 18:</b> Expressão da AsSMase D em diferentes estágios e tecidos de <i>A. sculptum</i> .	55
<b>Figura 19:</b> Western Blot para confirmação da produção de anticorpos anti-rAsSMase D por camundongos e presença da AsSMase D na glândula salivar de <i>A. sculptum</i> .	56
<b>Figura 20:</b> Expressão relativa de transcritos codificantes da AsSMase D.	57
<b>Figura 21:</b> Ensaio de ELISA em vários tempos de alimentação do carrapato.	58
<b>Figura 22:</b> Avaliação da atividade dermonecrótica da rAsSMase D em coelhos.	59
<b>Figura 23:</b> Ação da rAsSMase D sobre a alternativa do sistema complemento humano.	60
<b>Figura 24:</b> Ação da rAsSMase e seus produtos de ação sobre a esfingomielina sobre a agregação plaquetária.	60
<b>Figura 25:</b> Ação da rAsSMase sobre a cascata da coagulação.	61
<b>Figura 26:</b> Avaliação do silenciamento da AsSMase D na glândula salivar de <i>A. sculptum</i> .	62
<b>Figura 27:</b> Comportamento alimentar de fêmeas de <i>A. sculptum</i> com níveis reduzidos de AsSMase D na glândula salivar.	63
<b>Figura 28:</b> Comportamento alimentar de fêmeas de <i>A. sculptum</i> alimentadas em hospedeiros imunizados com a rAsSMase D	64

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Sequência dos iniciadores utilizados na PCR convencional. ....	35
<b>Tabela 2:</b> Sequências de iniciadores utilizados para as qPCRs.....	36
<b>Tabela 3:</b> Sequência dos iniciadores utilizados nos experimentos de silenciamento.....	41
<b>Tabela 4:</b> Sequências de SMases D de <i>A. sculptum</i> depositadas em bancos de dados.....	48

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool*

BOD - demanda bioquímica de oxigênio

BSA - Bovine serum albumin (albumina do soro bovino)

CDD – conserved domains database (banco de dados de domínio conservado)

cDNA - DNA complementar

Ct- cycle threshold value

DAB- dietil-amino-etil-benzidina

DNA - Deoxyribonucleic acid (ácido desoxirribonucleico)

dNTP - desoxirribonucleotídeo trifosfato

dsRNA - RNA de fita dupla

EGS – extrato de glândula salivar

ELISA - Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ensaio de imunoabsorção enzimática)

g - aceleração da gravidade

HPR - horseradish peroxidase

IL-4 - interleucina 4

IPTG - Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside

kDa- Quilodalton

LiD1 – Proteína dermonecrótica de *Loxosceles intermedia*

rLiD1 – Protéina dermonecrótica de *Loxosceles intermedia* recombinante

M – molar

mg - miligramas

mL – mililitro

mM - milimolar

mRNA - RNA mensageiro

n - número amostral

nm – nanômetro

nM – nanomolar

OD – optical density (densidade óptica)

OPD - 1,2-Phenylenediamine

pb - pares de base

PBS- phosphate buffered saline (tampão fosfato salino)

PCR - Polymerase Chain Reaction (reação em cadeia da polimerase)

pH - potencial hidrogeniônico

pI - ponto isoelétrico

qPCR - PCR quantitativo (PCR em tempo real)

RFU - unidade de fluorescência relativa

RNA - ribonucleic acid (ácido ribonucleico)

RNAi - interferência por RNA

SDS - sodium dodecyl sulfate (dodecil sulfato de sódio)

SDS-PAGE - Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS)

V – volts

µg - micrograma

µL - microlitro

µM - micromolar

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução</b> .....	14
1.1. <i>Amblyomma sculptum</i> : classificação e distribuição geográfica.....	14
1.2. Morfologia externa do <i>A. sculptum</i> .....	15
1.3. Ciclo de vida do <i>A. sculptum</i> .....	17
1.4. Importância do <i>A. sculptum</i> .....	19
1.5. Hematofagia e importância da saliva dos carrapatos.....	20
1.6. Esfingomielinases.....	21
1.7. Esfingomielinases de artrópodes.....	24
1.8. Outras atividades das esfingomielinases de artrópodes e sua ação em processos biológicos.....	26
<b>2. Justificativa</b> .....	27
<b>3. Objetivos</b> .....	28
3.1. Objetivo geral.....	28
3.2. Objetivos específicos.....	28
<b>4. Materiais e métodos</b> .....	29
4.1. Animais experimentais e aspectos éticos.....	29
4.2. Manutenção da colônia de <i>A. sculptum</i> em laboratório.....	29
4.3. Ensaio de atividade enzimática da esfingomielinase.....	29
4.3.1. Obtenção do extrato de glândula salivar (EGS) de carrapatos.....	29
4.3.2. Ensaio enzimático da esfingomielinase salivar de <i>A. sculptum</i> .....	30
4.4. Análises <i>in silico</i> das sequências da esfingomielinase.....	31
4.5. Produção da AsSMase D recombinante (rAsSMase D).....	32
4.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE) e Western blot.....	33
4.7. Avaliação dos níveis de AsSMase D em tecidos e estágios de desenvolvimento do <i>A. sculptum</i> .....	34
4.7.1. Avaliação dos níveis de mRNA codificantes da AsSMaseD por PCR convencional.....	34
4.7.2. Avaliação dos níveis de mRNA codificantes da AsSMase D por qPCR.....	35
4.7.3 Avaliação dos níveis de AsSMase D por ELISA.....	36
4.8. Atividade dermonecrótica da AsSMase D recombinante <i>in vivo</i> .....	37
4.9 Avaliação da atuação da AsSMase D na inibição e na ativação da via alternativa do sistema complemento.....	38
4.10 Avaliação da atuação da AsSMase D na agregação plaquetária.....	39
4.11 Avaliação da atuação da AsSMase D na cascata de coagulação.....	39

4.12. Avaliação do papel da AsSMase D durante a alimentação utilizando o silenciamento gênico por RNAi.....	40
4.13. Avaliação do papel da AsSMase D através da alimentação de carrapatos em hospedeiros imunizados .....	41
4.14. Análise estatística dos dados .....	41
<b>5. Resultados</b> .....	<b>42</b>
5.1. Identificação e caracterização estrutural <i>in silico</i> de esfingomielinases presentes na glândula salivar de <i>A. sculptum</i> .....	42
5.2. Avaliação da atividade da AsSMase D .....	50
5.3. Caracterização da expressão da AsSMase D nos estágios de desenvolvimento e em tecidos do <i>A. sculptum</i> .....	54
5.4. Caracterização funcional da AsSMase D .....	58
5.4.1. Avaliação da atividade dermonecrótica da rAsSMase D <i>in vivo</i> .....	58
5.4.2. Avaliação do efeito da rAsSMase D sobre processos biológicos.....	59
5.4.3. Avaliação da influência da AsSMase D na hematofagia de carrapatos .....	61
5.4.4. Avaliação do comportamento alimentar de <i>A. sculptum</i> ao realizar hematofagia em hospedeiros previamente imunizados com a rAsSMase D.....	63
<b>6. Discussão</b>	
6.1. Identificação e caracterização estrutural de esfingomielinases salivares de <i>A. sculptum</i>	52
6.2. Caracterização da cinética de expressão da AsSMase D.....	55
6.3. Caracterização funcional da AsSMase D.....	57
<b>7. Conclusões</b> .....	<b>74</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>75</b>
<b>ANEXO 1</b> .....	<b>82</b>
<b>ANEXO 2</b> .....	<b>83</b>

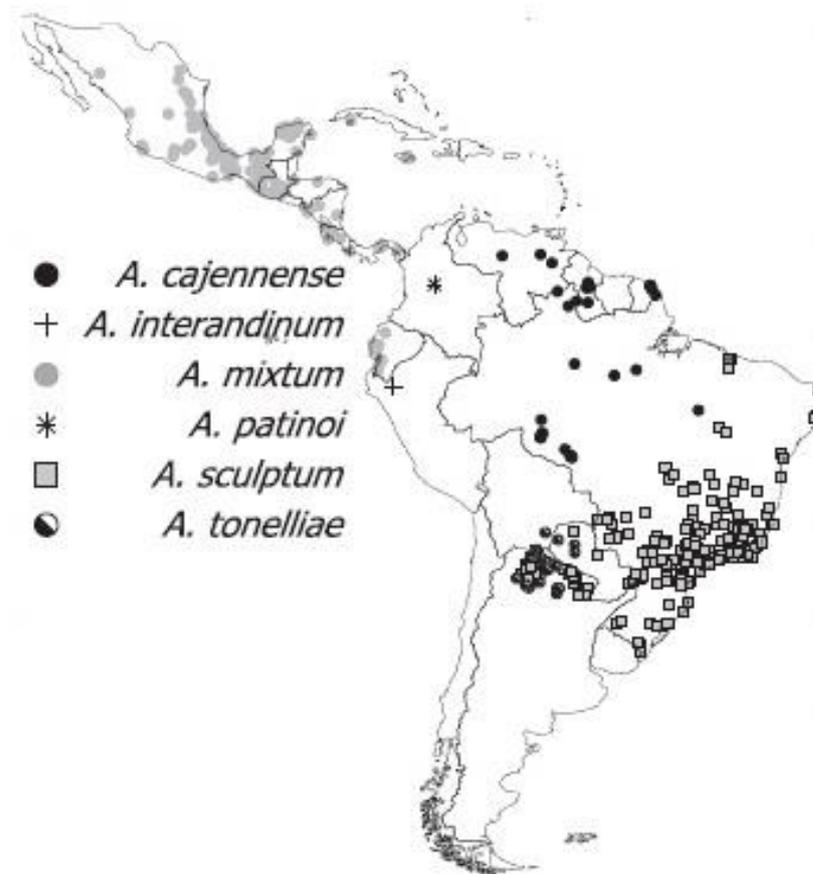
## 1. Introdução

### 1.1. *Amblyomma sculptum*: classificação e distribuição geográfica

Os carrapatos pertencem à classe Arachnida e atualmente são conhecidas mais de 900 espécies distribuídas mundialmente. As espécies estão compreendidas em duas principais famílias: Ixodidae, com mais de 720 espécies e Argasidae, que é composta por aproximadamente 208 espécies (Guglielmone et al., 2017). Existe ainda uma terceira família: Nuttalliellidae, que possui apenas uma espécie: *Nuttalliella namaqua* (Keirans, 2009).

Até 2014, o *Amblyomma sculptum* Berlese, 1888 era denominado *Amblyomma cajennense* Fabricius, 1787, que era considerada uma única espécie, e que se distribuía pelo continente americano, desde o sul dos Estados Unidos até o sul do Brasil e norte da Argentina (Estrada-Peña et al., 2004). Porém, recentes trabalhos realizando análises morfológicas e moleculares propuseram que *A. cajennense* seria na verdade um complexo (denominado *A. cajennense sensu lato*) de pelo menos seis espécies distintas, cada uma relacionada a uma área biogeográfica: *Amblyomma cajennense sensu stricto*, *Amblyomma mixtum* Koch, 1944 (sul dos Estados Unidos ao norte da América do Sul); *Amblyomma sculptum* (norte da Argentina, Bolívia, Paraguai e Brasil), *Amblyomma tonelliae* Nava, Beati e Labruna, 2014 (áreas secas do norte da Argentina, Bolívia e Paraguai), *Amblyomma interandinum* Beati, Nava e Cáceres, 2014 (vale interandino do Peru) e *Amblyomma patinoi* Labruna, Nava e Beati, 2014 (Cordilheira Oriental da Colômbia) (Fig. 1) (Beati et al., 2013; Estrada-Peña et al., 2014; Labruna, 2018; Martins et al., 2016; Nava et al., 2014)

No Brasil, foi demonstrado através de análises morfológicas (pela diferenciação do poro genital de fêmeas) e moleculares (pela amplificação da região ITS2 do DNA ribossômico) a existência de pelo menos duas espécies de carrapatos do complexo *A. cajennense sensu lato*, sendo elas *A. cajennense sensu stricto* e *A. sculptum*. *A. cajennense s.s.*, por ser mais bem adaptado às condições úmidas, ocorre na região Amazônica. Já *A. sculptum* é uma espécie mais bem adaptada às condições secas do cerrado, sendo encontrado nas regiões Sudeste, Sul e Centro-Oeste (Fig. 1) (Estrada-Peña et al., 2014; Martins et al., 2016).

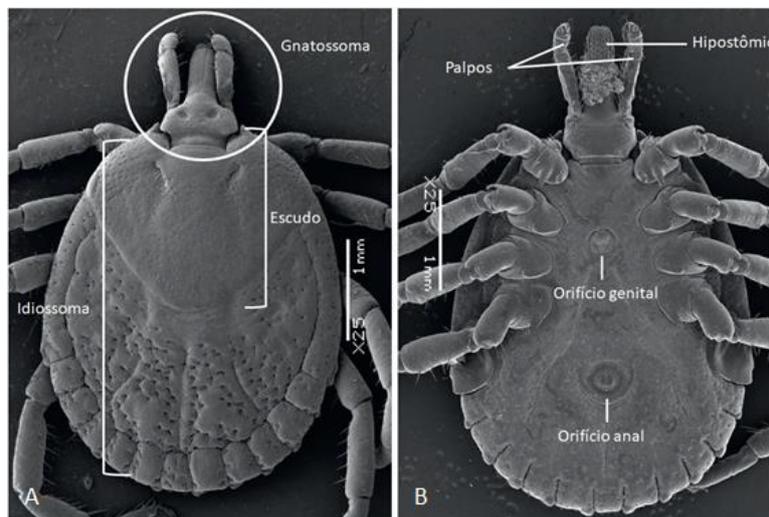


**Figura 1: Distribuição geográfica das espécies de carrapatos pertencentes ao complexo *Amblyomma cajennense sensu lato*. (Adaptado de Estrada-Peña et al 2004).**

## 1.2. Morfologia externa do *A. sculptum*

O *A. sculptum* é uma espécie pertencente à família Ixodidae. Essa família tem como principais características corpo fundido de formato globoso, sendo dividido em duas partes: uma anterior chamada de gnatossoma, onde são encontradas as peças bucais (quelióceras e hipóstomo) e os palpos, e uma posterior denominada idiossoma, de contorno oval e achatado dorsoventralmente onde apresenta, na sua região dorsal, uma placa esclerotizada denominada escudo (Fig. 2A e 2B). Na face ventro-lateral do idiossoma é possível observar a inserção dos pares de patas e na linha mediana está presente os orifícios genital e anal. O orifício genital está presente somente nas formas adultas, não estando presente nas formas jovens (larvas e ninfas), por não possuírem o sistema reprodutor desenvolvido (Fig. 2B) (Araújo et al., 2016; Guglielmone et al., 2017). Nos machos, o escudo cobre quase todo o idiossoma e nas fêmeas apenas um terço da região dorsal anterior é coberto por ele (Fig. 3A e 3B).

O *A. sculptum* se diferencia de outras espécies de carrapato por possuir uma ornamentação característica no escudo (o que faz as formas adultas serem conhecidas popularmente como “carrapato estrela”) (Fig. 3A e 3B), além de outras características mais sutis como hipostômio longo e com dentição 3/3, coxa I com dois espinhos desiguais e, coxa IV com um espinho longo nos machos (Barros-Battesti et al., 2006).

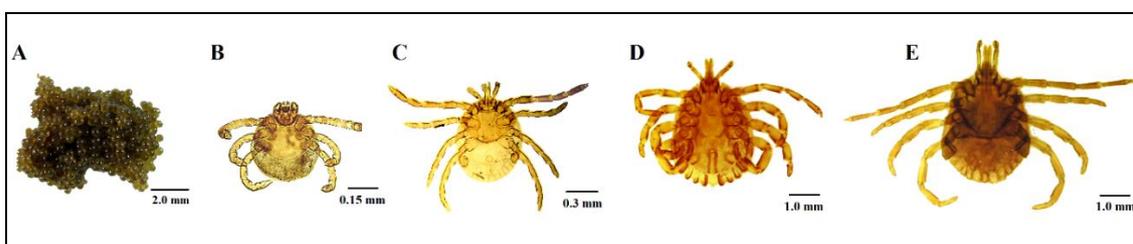


**Figura 2: Microscopia eletrônica das fases adultas do carrapato *A. sculptum*.** (A) vista dorsal de fêmea de *A. sculptum*, em destaque o gnatossoma, idiossoma e o escudo. (B) vista ventral de fêmea de *A. sculptum*, em destaque os palpos e o hipostômio pertencentes ao gnatossoma (quelíceras não visíveis) e os orifícios genital e anal (Adaptado de Guglielmo et al., 2017).



**Figura 3: Vista dorsal dos estágios adultos de *A. sculptum*.** (A) fêmea apresentando o escudo ornamentado somente no terço anterior da região dorsal. (B) macho apresentando o escudo ornamentado recobrendo a região dorsal (Adaptado de Guglielmo et al., 2017).

Além das fases adultas, o ciclo biológico do carrapato ainda passa pelas fases jovens de ninfa e larva, sendo essa última obtida a partir da eclosão dos ovos. Ao longo do desenvolvimento dos carrapatos, as larvas ao eclodirem apresentam apenas três pares de patas e ao realizarem a muda para ninfas adquirem o quarto par de pata, permanecendo na fase adulta. Nas fases jovens o escudo também recobre apenas o terço anterior da região dorsal. Os ovos, que são postos unidos por uma substância colante, são esféricos, de coloração castanha e medem cerca de 2 mm (Araújo et al., 2016; Guglielmone et al., 2017) (Fig. 4).



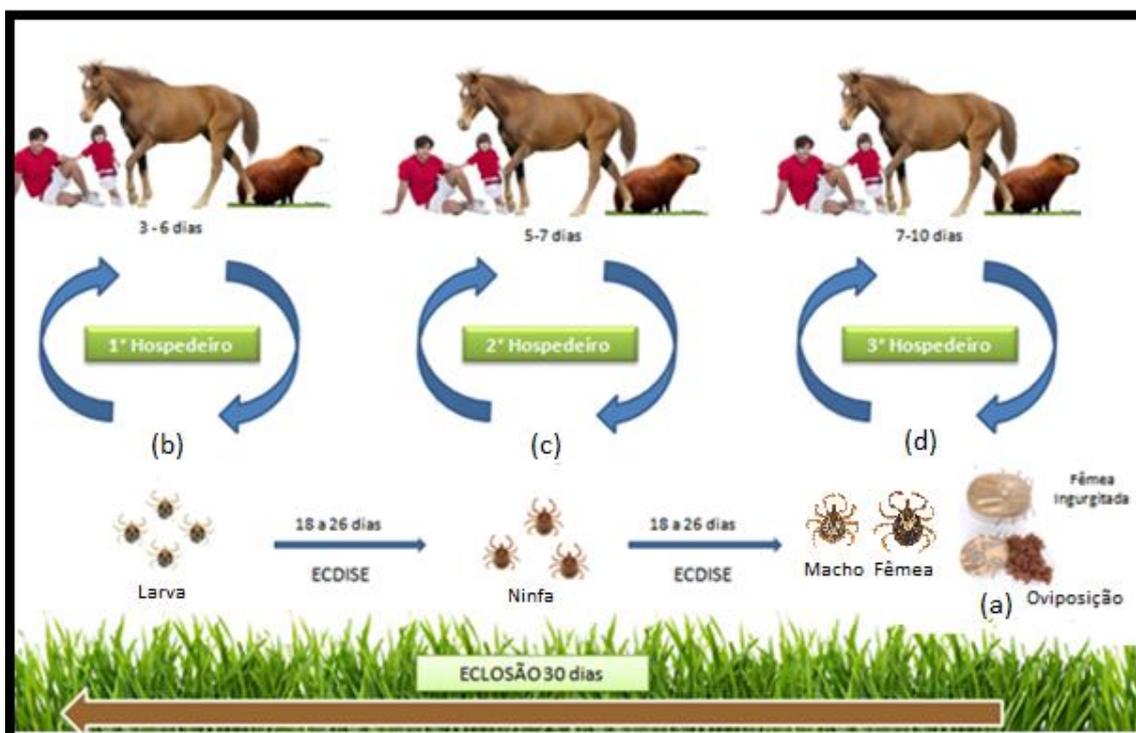
**Figura 4: Formas evolutivas de *Amblyomma sculptum*: Ovos (A); Larva (B); Ninfa (C) e Adultos: Macho (D) e Fêmea (E)** (Fonte: Gabriel C. A. Costa).

### 1.3. Ciclo de vida do *A. sculptum*

O *A. sculptum* é popularmente chamado de “carrapato do cavalo”, “carrapato estrela” ou “rodoleiro” em sua fase adulta; as ninfas e larvas são conhecidas como “vermelhinho” e “micuim”, respectivamente.

Para completar o seu ciclo biológico, o *A. sculptum* necessita de três hospedeiros sendo, portanto, um carrapato trioxeno. O ciclo biológico se inicia quando a fêmea ingurgitada se desprende do 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 (Araújo et al., 2016). 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 octópoda após um período de 18 a 26 dias (Pereira and Labruna, 1998).

As ninfas 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 macho ou fêmea. Esse período leva aproximadamente 23 a 25 dias. No hospedeiro, o macho e a fêmea realizam a cópula e após o repasto sanguíneo, as fêmeas ingurgitadas caem ao solo após 7 a 10 dias, ovipõem e iniciam um novo ciclo (Pereira and Labruna, 1998) (Fig. 5).



**Figura 5: Ciclo biológico do *Amblyomma sculptum*.** Fases de desenvolvimento do carrapato. a) Oviposição das fêmeas, b) larvas nas pastagens, sobem em um hospedeiro, ingurgitam e retornam ao solo para realizarem a ecdise para ninfas, c) ninfas nas pastagens, sobem em um hospedeiro, ingurgitam e retornam ao solo para realizarem a ecdise para adultos, d) adultos nas pastagens, sobem em um hospedeiro, fêmeas ingurgitam e retornam ao solo para realizarem a postura, machos continuam no hospedeiro para se alimentar e buscar fêmeas para a cópula. (Fonte: Jéssica F. Abreu)

#### 1.4. Importância do *A. sculptum*

O *A. sculptum* possui uma ampla gama de hospedeiros, mas possui as capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) como hospedeiros silvestres preferenciais e os equinos como os hospedeiros domésticos preferenciais. Outros mamíferos também já foram descritos como hospedeiros eventuais como os bovinos, cães, animais silvestres, aves, homens, entre outros (Lopes et al., 1998; Rojas et al., 1999; Szabó et al., 2013).

No Brasil, o *A. sculptum* se destaca, pois, a sua baixa especificidade parasitária, especialmente das fases imaturas, o faz a principal espécie de carrapatos que parasita os humanos. Isso o torna um carrapato de grande importância médica, pois esse contato faz dele o principal vetor da *Rickettsia rickettsii*, agente etiológico da Febre Maculosa Brasileira (FMB) para os humanos, que é a riquetsiose de maior ocorrência e maior gravidade no país (Galvão et al., 2005; Labruna, 2009; Labruna et al., 2002). A *Rickettsia rickettsii* é uma bactéria gram-negativa intracelular obrigatória e a sua perpetuação na natureza é possibilitada por meio da sua transmissão transovariana e transtadial nos carrapatos. Além disso, animais como as capivaras também são incriminados como agentes responsáveis pela manutenção da bactéria por serem responsáveis pela amplificação de riquetsias e por transportarem carrapatos potencialmente infectados (Polo et al., 2018; Souza et al., 2009). Nos carrapatos, esses microrganismos possuem predileção pelos ovários e pelas glândulas salivares, facilitando a sua transmissão (Andreotti et al., 2019; Yu and Walker, 2006).

Estima-se que menos de 1% dos carrapatos na natureza estejam infectados com a bactéria e a sua transmissão ocorre através da picada do carrapato infectado, que necessita permanecer fixo no hospedeiro por pelo menos 4 horas, não sendo transmitida de pessoa a pessoa (Andreotti et al., 2019; Brasil, 2017).

A FMB se tornou uma doença de notificação obrigatória a partir de 2001 devido a sua gravidade e pelos altos índices de mortalidade (Andreotti et al., 2019; Brasil, 2017). De acordo com os dados apresentados pelo SINAN (Sistema de Informação de Agravos de Notificação) no período compreendido entre os anos 2000 e 2018 foram notificados no Brasil 1.940 casos de FMB que ocorreram em sua grande maioria na região Sudeste (total de 1.418 casos). O número de óbitos registrados nesse período foi de 615, totalizando cerca de 30% de mortalidade (Ministério da Saúde, 2018).

Além de sua importância na saúde pública, o *A. sculptum* possui grande interesse na medicina veterinária devido aos prejuízos econômicos que estão relacionados à

presença desses parasitos em rebanhos de animais por todo o Brasil. Além disso, essa espécie é incriminada como vetor de patógenos para os animais como bactérias do gênero *Rickettsia*, diferentes arbovírus e algumas espécies de borrelíias (Jongejan and Uilenberg, 2004).

Durante a alimentação sanguínea, as fêmeas ingerem grandes volumes de sangue, podendo causar comprometimento da capacidade produtiva pela redução do ganho de peso e queda na produção de leite dos hospedeiros e devido à picada, predispor a infecções secundárias e instalação de miíases (Borges et al., 2002).

Outra importância da ectoparasitose está no seu controle que, quando feito de forma inadequada, gera contaminação ambiental e seleção de populações resistentes a acaricidas. O método de controle comumente utilizado é baseado na utilização de produtos químicos, os acaricidas. Esses produtos, quando utilizados indiscriminadamente, além de serem tóxicos aos animais e humanos, causam a contaminação do solo, da água e dos produtos de origem animal. A utilização dessas drogas, sem conhecimento técnico prévio, acaba promovendo uma seleção de indivíduos geneticamente resistentes aos princípios ativos disponíveis comercialmente. Isso acabou se tornando um desafio para a pecuária brasileira, uma vez que em muitos lugares a maioria desses produtos já não são mais eficazes no controle dos carrapatos. Somado a isso existe uma grande dificuldade de desenvolvimento de novas drogas devido a esse processo ser longo e dispendioso (de la Fuente et al., 2007a).

### **1.5. Hematofagia e importância da saliva dos carrapatos**

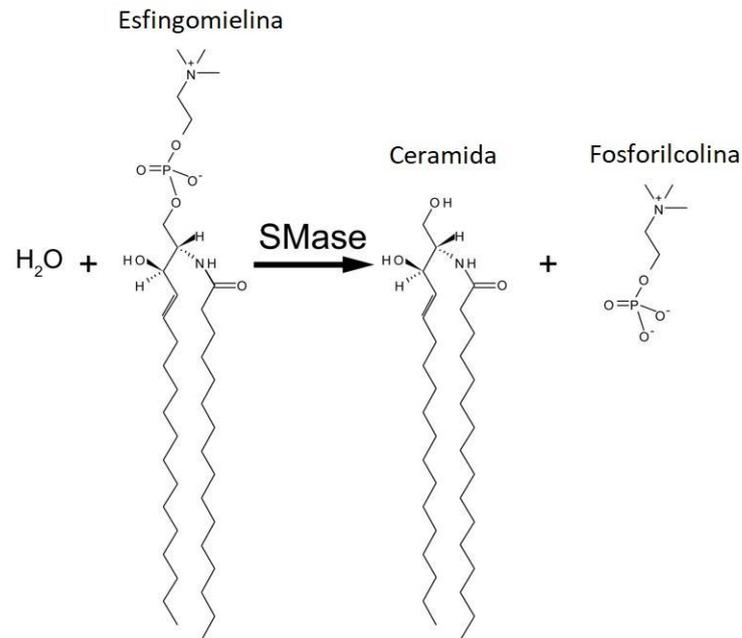
Os carrapatos ixodídeos são ectoparasitas hematófagos e permanecem no hospedeiro durante longos períodos de tempo, podendo chegar a várias semanas. A hematofagia é uma das fases mais arriscadas para o carrapato, pois é o momento em que, para a obtenção de sangue, eles precisam localizar a fonte alimentar 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 a quantidade de sangue ingerida que está diretamente relacionada a parâmetros de desenvolvimento e reprodutivos (Anderson and Magnarelli, 2008).

O longo tempo que os carrapatos ixodídeos ficam em contato com seus hospedeiros, somados à sua exposição a repetidas picadas, faz com que sejam desenvolvidas diversas respostas reparatórias sistêmicas e locais no hospedeiro, como hemostasia, respostas inflamatórias e respostas imunes (Valenzuela, 2005), que podem dificultar o processo hematofágico após a fixação do carrapato no local da alimentação. Em contrapartida, 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, garantindo a ingestão de sangue pelo artrópode (Alarcon-Chaidez, 2013a; Chmelar et al., 2011; Valenzuela, 2005).

Nos últimos anos foram descritas várias atividades presentes na saliva de carrapatos, dentre elas antihemostáticas, anti-inflamatórias e inibidores do sistema imune (Chmelar et al., 2011; Franco et al., 2016; Kotsyfakis et al., 2006; Lima et al., 2000; Nunn et al., 2005; Ribeiro, 1995; Silva et al., 2016; Tirloni et al., 2016). Com o desenvolvimento de novas técnicas de biologia molecular e de ferramentas de bioinformática juntamente com trabalhos de genômica e proteômica, o estudo da fisiologia da glândula salivar de carrapatos trouxe grandes avanços na identificação de moléculas responsáveis por essas atividades. Essas moléculas presentes na saliva vem sendo cada vez mais estudadas devido à sua importância para a alimentação dos carrapatos.

## **1.6. Esfingomielinases**

Dentre as várias moléculas salivares com importância para os carrapatos, acredita-se que as esfingomielinases possam ter um papel relevante. As esfingomielinases (SMases; EC 3.1.4.12), de uma forma geral, são enzimas responsáveis por catalisar a hidrólise da esfingomielina, que é um esfingolípido presente em membranas celulares, sobretudo na bainha de mielina que recobre o axônio de células nervosas. Ela é composta por um grupo fosforilcolina em uma extremidade e uma esfingosina e um ácido graxo na outra extremidade. O conjunto formado pela esfingosina e pelo ácido graxo é chamado de ceramida. A hidrólise promovida pelas esfingomielinases forma como produtos ceramida e fosforilcolina (Fig. 6).

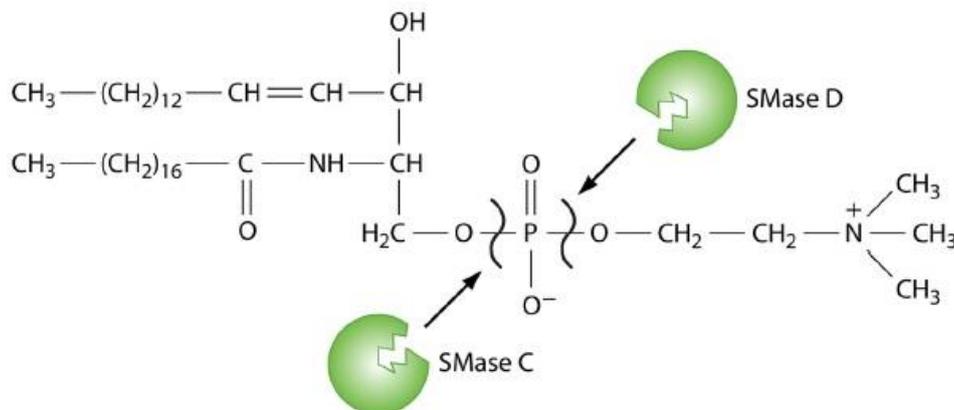


**Figura 6: Ação da esfingomielinase (SMase) sobre a esfingomielina.** Hidrólise da esfingomielina formando ceramida e fosforilcolina (Adaptado de Jenkins et al, 2009).

De acordo com a classificação proposta por Samet e Barenholz (1999), existem 5 tipos de SMases: esfingomielinases ácidas lisossomais (aSMase), esfingomielinases secretadas dependentes de  $Zn^{2+}$  (sSMase), esfingomielinases neutras (nSMase) dependentes de  $Mg^{2+}$ , nSMase independentes de  $Mg^{2+}$  e esfingomielinases alcalinas (bSMase). Goni & Alonso (2002) incluíram um sexto grupo na classificação, as SMases bacterianas.

As aSMases atuam somente em pH ácido, sendo encontradas em lisossomos e são as enzimas mais bem descritas dentre as SMases. São enzimas de importância na medicina humana pois sua deficiência causa a síndrome de Niemann-Pick, doença degenerativa que resulta em acúmulo de esfingomielina nas células nervosas (Tam et al., 2010). As sSMases são enzimas dependentes de  $Zn^{2+}$ , funcionam bem em pH ácido, sendo ativas também em pH neutro e estão relacionadas à aterogênese. As nSMases dependentes de  $Mg^{2+}$  são encontradas em vários tecidos de mamíferos e estão envolvidas em processos de aterosclerose e apoptose. Já as independentes de  $Mg^{2+}$  são pouco conhecidas e foram encontradas em músculo esquelético de coelhos. As bSMases são encontradas exclusivamente no intestino de mamíferos e aparentam estar envolvidas na indução do câncer de cólon (Samet & Barenholz 1999, Goni & Alonso 2002, Marchesini & Hannun 2004). Já as SMases bacterianas são classificadas como SMases C e SMases D, de acordo com o local da clivagem na esfingomielina. As SMases C

clivam a esfingomiéline no local de ligação entre ceramida e fosfocolina, gerando ceramida e fosforilcolina. Já as SMases D hidrolisam a ligação fosfodiéster entre 1-fosfato e colina, gerando ceramida 1-fosfato (C1P) e colina (Fig. 7).



**Figura 7: Sítios de clivagem das SMases D e C na esfingomiéline.** A clivagem da SMase D gera os subprodutos ceramida 1-fosfato e colina, a clivagem realizada pela SMase C gera ceramida e fosforilcolina (Adaptado de Flores-Díaz et al., 2016).

As SMases C são produzidas por bactérias dos gêneros *Bacillus*, *Listeria*, *Staphylococcus*, *Mycobacterium* e em várias espécies de *Helicobacter*, *Chlamydia*, *Pseudomonas* e *Leptospira*, nas quais a massa molecular varia de 27 a 63 kDa. Em infecções bacterianas, as SMases C estão envolvidas em uma série de mecanismos patogênicos como: hemólise, alteração na homeostasia intestinal, indução de morte celular, alteração de resposta imune inata, entre outros (Flores-Díaz et al., 2016).

As SMases D foram relatadas em algumas bactérias como as do gênero *Arcanobacterium* e *Corynebacterium* e os genes que codificam essas enzimas foram encontrados em genomas de outros gêneros de bactérias como *Streptomyces*, *Austwickia chelonae* e *Burkholderia*. As SMases D bacterianas são responsáveis por causar danos na membrana eritrocitária, hemólise mediada pelo complemento, morte celular, necrose, além de apresentarem outras funções na patogenicidade das infecções (Dias-Lopes et al., 2013; Flores-Díaz et al., 2016).

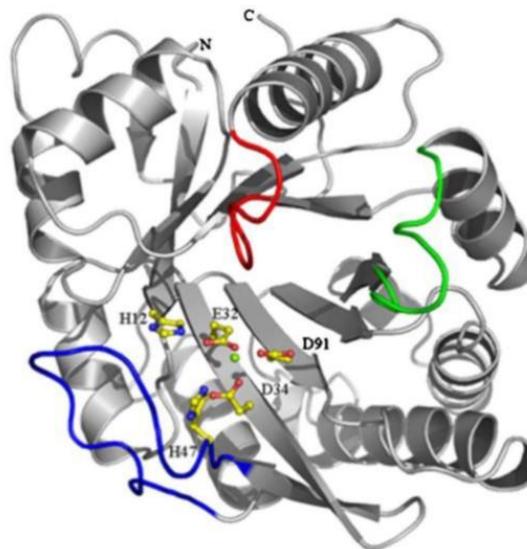
As SMases D bacterianas também são similares às enzimas de fungos como o *Aspergillus flavus* e também são as mais parecidas com as SMases identificadas em artrópodes (Binford et al., 2005; Chaim et al., 2006; de Santi Ferrara et al., 2009; Dias-Lopes et al., 2013; Flores-Díaz et al., 2016; Murakami et al., 2005).

## 1.7. Esfingomielinases de artrópodes

SMases também foram descritas em artrópodes como carrapatos e várias espécies de aranhas (Alarcon-Chaidez et al., 2009; Dias-Lopes et al., 2013; Murakami et al., 2005). Por suas características estruturais e funcionais, elas foram descritas como esfingomielinases D (SMases D) (EC 3.1.4.41) e são enzimas capazes de catalisar a clivagem hidrolítica da esfingomielina em ceramida-1-fosfato e colina, na presença do ion  $Mg^{2+}$  e de outros lisofosfolídeos. As mais conhecidas são as que estão presentes no veneno de espécies de aranha do gênero *Loxosceles* sp, sendo consideradas as principais enzimas responsáveis pelas reações sistêmicas e locais causadas pelo loxoscelismo. Essas reações, que podem ser sistêmicas ou cutâneas, incluem: hemólise, insuficiência renal, coagulação intravascular disseminada, eritema, ulceração e necrose (Chaim et al., 2006; de Santi Ferrara et al., 2009; Dias-Lopes et al., 2013; Kusma et al., 2008).

As SMases D de artrópodes, de uma forma geral, possuem massas moleculares semelhantes, variando de 31-39,7 kDa, possuem baixa identidade e são consideradas originadas de um ancestral comum, glicerofosfodiéster fosfodiesterases (GDPD\_SF; E.C. 3.1.4.46). GDPD\_SF são enzimas específicas envolvidas no metabolismo do glicerol e são encontradas em bactérias e eucariotos (Alarcon-Chaidez, 2013b; Binford et al., 2005; Murakami et al., 2006).

A primeira estrutura cristalográfica de uma SMase D foi feita por Murakami et al (2005) (Fig. 8). Nesse trabalho os autores descreveram a estrutura da SMase I de *L. laeta* e demonstram a presença de um domínio TIM barril ( $\alpha/\beta$ ) distorcido com inserção de folhas  $\beta$  e  $\alpha$  hélice e os loops catalítico, variável e flexível, que estão envolvidos no enovelamento da proteína, característico das SMases D em geral. O loop catalítico é estabilizado por uma ponte dissulfeto (Cys51-Cys57) e os aminoácidos His12, His47, Asp52, Trp230, Asp233 e Asn252, que são altamente conservados nas SMases D do gênero *Loxosceles*, formam o sítio ativo (Dias-Lopes et al., 2013; Felicori et al., 2006; Murakami et al., 2005). Outros aminoácidos importantes e que também são encontrados conservados nas estruturas das SMase I são o Glu32, Asp34, Asp91 e estão envolvidos na coordenação do  $Mg^{2+}$ , possuindo importante papel na atividade enzimática dessas proteínas. Além disso, os resíduos envolvidos na hidrólise da esfingomielina, via catálise ácido-base dependente de  $Mg^{2+}$ , são as histidinas 12 e 47 (His12 e His47) (Fig. 7) (Dias-Lopes et al., 2013; Murakami et al., 2005).



**Figura 8: Representação da estrutura de SMase I de *L. laeta* vista através do eixo Tim Barril ( $\alpha/\beta$ )8.** Aminoácidos incluídos: Histidinas catalíticas His12 e His47 e aminoácidos envolvidos na coordenação do íon  $Mg^{2+}$  (representado pela esfera verde): Glu32, Asp34, Asp91. Loop catalítico (Azul), loop variável (Verde), loop flexível (Vermelho) (Adaptado de Murakami et al. 2005).

Atualmente, pouco se sabe sobre as SMases D presentes na glândula salivar de carrapatos. Em 2009, Alarcon-Chaidez et al., identificaram uma proteína com atividade de esfingomielinase similar à proteína encontrada no veneno de aranhas do gênero *Loxosceles* e que está presente na glândula salivar do carrapato *I. scapularis*. Essa SMase de *I. scapularis* (IsSMase) é uma proteína dependente de  $Mg^{2+}$  e atua em pH neutro (pH 7.4), assim como as SMases D de outras espécies de aranha. Nesse trabalho foi descrito que 5  $\mu$ g de IsSMase recombinante foram capazes de reprogramar células T CD4+ a produzir IL-4. Dias-Lopes et al., (2013) identificaram através de análises *in silico*, a presença de diversas sequências de transcritos codificantes de SMases D em transcriptomas salivares de alguns carrapatos da família Ixodidae. Todos os transcriptomas de glândulas salivares realizados até então possuem sequências de SMases D, sugerindo que essa possa ter importância para os carrapatos. Os trabalhos mostram que essas SMases D de carrapatos possuem os aminoácidos importantes para a atividade enzimática estritamente conservados, porém a sua função e importância para a hematofagia do carrapato ainda necessitam ser esclarecidas em estudos mais aprofundados.

### 1.8. Outras atividades das esfingomielinases de artrópodes e sua ação em processos biológicos

As SMases D de artrópodes parecem ser específicas quanto a seu substrato. Dentre os fosfolídeos de mamíferos, as SMases D de *Loxosceles* são capazes de atuar apenas em esfingomielina e lisofosfatidilcolina (Tambourgi et al., 2007; Van Meeteren et al., 2004). Lisofosfatidilcolina é abundante no plasma e as SMases D de aranhas são capazes de remover a colina na presença de  $Mg^{2+}$  e produzir ácido fosfatídico (Chun, 2002; Moolenaar, 1999).

A ação nesses substratos resulta na interferência em diferentes sistemas biológicos. Já foi demonstrado que as SMases D são capazes de influenciar a agregação plaquetária, a permeabilidade endotelial, a hemólise via sistema complemento e o recrutamento de neutrófilos (Bernheimer et al., 1985; Carne and Onon, 1978; Fernandes Pedrosa et al., 2002; Forrester et al., 1978; Kurpiewski et al., 1981; Tambourgi et al., 2007, 2002, 1998, 2000). O mecanismo de ação em algum desses modelos já foi caracterizado.

Na via alternativa do sistema complemento, as SMases D induzem a clivagem de glicoproteínas de membranas de hemácias e de outras células que seriam responsáveis por reconhecer as células como “self” e, conseqüentemente, inibir a via alternativa ativada pela deposição inespecífica de C3B. Desta forma, células tidas como “self” pelo sistema complemento passa a ter a via alternativa ativa em sua superfície. Essa clivagem não é realizada pelas SMases D, mas feita por metaloproteases que são induzidas pelas SMases D (Tambourgi et al., 2000, 1995).

As SMases D de *Loxosceles* também são capazes de estimular a agregação plaquetária (Felicori et al., 2006). O mecanismo envolvido está relacionado à clivagem da lisofosfatidilcolina pelas SMases D com liberação de ácido lisofosfatídico, que é capaz de estimular as plaquetas a mudar conformacionalmente e expressar receptores para fibrinogênio (Van Meeteren et al., 2004).

Os mecanismos de ação das SMases D em carrapatos ainda precisam ser esclarecidos, uma vez que os processos fisiológicos em que as SMases D de aranhas atuam não seriam benéficos aos carrapatos no momento da hematofagia.

## 2. Justificativa

Os carrapatos possuem grande importância para a medicina veterinária e saúde pública no Brasil devido aos prejuízos econômicos causados pelo parasitismo e pela transmissão de agentes etiológicos causadores de doenças. O *A. sculptum*, por ser o principal carrapato associados aos humanos e possuir como hospedeiros preferenciais as capivaras e equinos, se torna um importante objeto de estudo, principalmente por ser o vetor da febre maculosa brasileira.

O conhecimento da biologia e fisiologia dos carrapatos são extremamente importantes para o desenvolvimento de novas alternativas de controle. O estudo de moléculas salivares de carrapatos se encaixa nesse contexto. Sabe-se que a saliva é extremamente importante na modulação das respostas dos hospedeiros contra os carrapatos e, conseqüentemente, garantir o sucesso da hematofagia. Um maior conhecimento do papel de compostos salivares para a hematofagia poderia levar à identificação de moléculas que possam vir a ser alvos em programas de controle de carrapatos ou de doenças por eles transmitidas.

Nesse sentido destacam-se as esfingomielinases, que são enzimas encontradas em diferentes grupos de artrópodes da classe Arachnida, porém, na saliva de carrapatos, ainda possuem função desconhecida. O presente trabalho busca identificar a presença dessa enzima na saliva do carrapato *A. sculptum* e sua provável função na alimentação de carrapatos.

### 3. Objetivos

#### 3.1. Objetivo geral

Identificar e caracterizar funcionalmente esfingomielinases presentes na saliva do carrapato *Amblyomma sculptum*.

#### 3.2. Objetivos específicos

- Investigar a presença de esfingomielinases e descrever a cinética da atividade enzimática da esfingomielinase presente na glândula salivar de fêmeas de *A. sculptum*.
- Identificar as esfingomielinases presentes na glândula salivar do *A. sculptum* e caracterizar sua estrutura primária.
- Caracterizar a expressão da AsSMase D em diferentes tecidos e estágios de desenvolvimento do *A. sculptum*.
- Avaliar a cinética de expressão da AsSMase D na glândula salivar de fêmeas de *A. sculptum* durante o período de alimentação.
- Avaliar a atividade dermonecrótica da rAsSMase D de *A. sculptum*
- Avaliar a atuação da rAsSMase D em processos biológicos
- Avaliar a função da rAsSMase D para a hematofagia de fêmeas de *A. sculptum*
- Avaliar o comportamento alimentar de fêmeas de *A. sculptum* alimentadas em hospedeiros imunizados com a rAsSMase D

## **4. Materiais e métodos**

### **4.1. Animais experimentais e aspectos éticos**

Foram utilizados para este estudo duas linhagens de camundongos, Balb/C e Swiss, machos de 6 a 8 semanas de vida, provenientes do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG (Cebio-ICB/UFMG) que foram mantidos no biotério do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB/UFMG) com livre acesso a água e ração, com ciclo claro-escuro de 12 horas. Também foram utilizados coelhos New Zealand de 8 a 9 semanas de vida, provenientes da Fazenda da Escola de Veterinária da UFMG localizada no município de Igarapé, MG. Estes animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG, com livre acesso a água e ração em sala climatizada (23 a 25°C), com ciclo claro-escuro de 12 horas.

Todos os procedimentos envolvendo animais estão de acordo com os princípios para utilização de animais em pesquisa e foram aprovados pelo Comitê de Ética no uso de Animais da UFMG (CEUA/UFMG) sob o protocolo número 103/2017 (Anexo 1).

### **4.2. Manutenção da colônia de *A. sculptum* em laboratório**

Para a manutenção da colônia de *A. sculptum*, fêmeas ingurgitadas foram coletadas em equinos naturalmente infestados da Fazenda da Escola de Veterinária da UFMG localizada no município de Pedro Leopoldo, MG, 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 biológico, as larvas, ninfas e adultos foram alimentados em camundongos *Swiss* de acordo com a metodologia de Bouchard & Wikel 2005. A colônia é mantida no Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos (LFIH), ICB/UFMG.

### **4.3. Ensaio de atividade enzimática da esfingomielinase**

#### **4.3.1. Obtenção do extrato de glândula salivar (EGS) de carrapatos**

Para a avaliação da atividade enzimática da esfingomielinase da glândula salivar de *A. sculptum*, foram utilizados o EGS de fêmeas em jejum e de fêmeas com vários

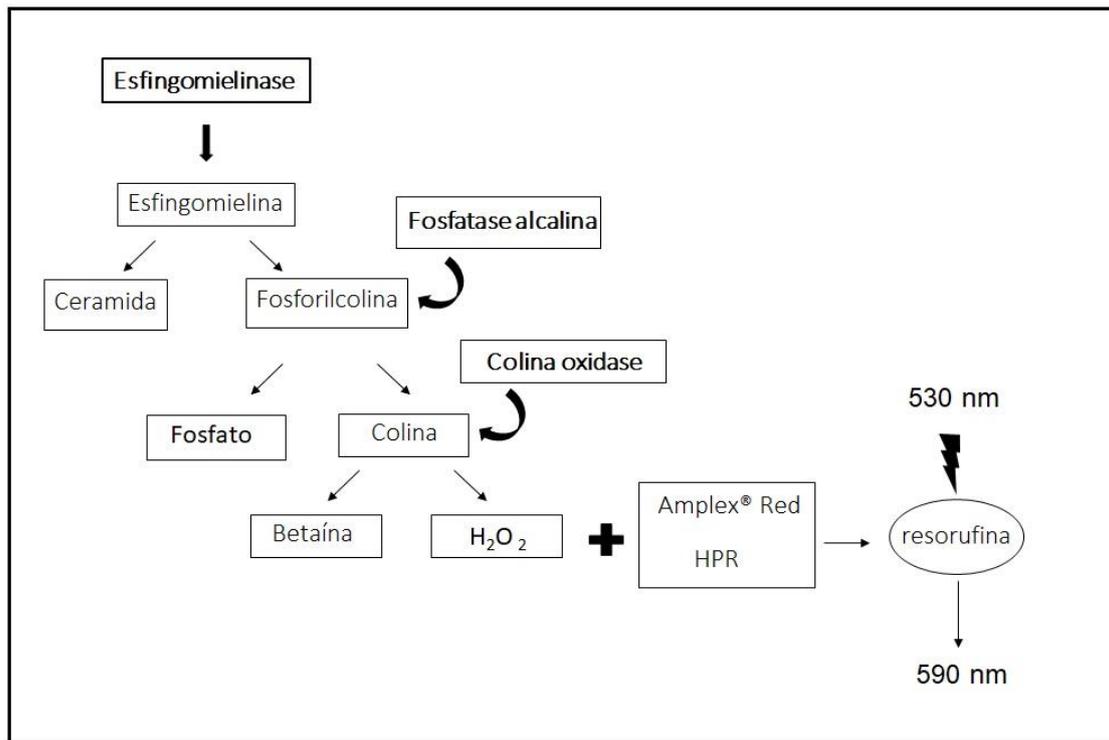
tempos de alimentação no hospedeiro. Para isso, os espécimes foram colocados para alimentar em camundongos Swiss e retiradas com 1, 3, 5 e 8 dias após o início da alimentação. Os carrapatos foram removidos de seus hospedeiros e as glândulas salivares imediatamente removidas com o auxílio de uma lupa estereoscópica (Leica Microsystems) e pinças de dissecação. Cada par de glândula salivar foi retirada em solução salina (NaCl 0,9%) e transferida para tubos de micro centrífuga de 0,5 mL contendo 10 µL de salina e mantidas em gelo. As amostras foram tratadas por ultrassom em banho-maria por 40 segundos e centrifugadas por 10 minutos a 12.000 g, a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e mantido a -80°C até o momento dos ensaios.

#### **4.3.2. Ensaio enzimático da esfingomielinase salivar de *A. sculptum***

As atividades enzimáticas da rAsSMase D e da AsSMase D presente na glândula salivar do *A. sculptum* foram avaliadas *in vitro* utilizando o kit Amplex® Red Sphingomyelinase Assay Kit (Thermo Fischer Scientific), de acordo com as recomendações do fabricante.

Os ensaios foram realizados em placas de cultura de 96 poços e a fluorescência foi medida utilizando o equipamento Varioskan (Thermo Fisher Scientific). Em cada poço da placa foram adicionados 100 µL da “Work Solution” (10 mM Amplex® Red, 200 U/mL HPR, 20 U/mL colina oxidase, 400 U/mL fosfatase alcalina, 5 mM esfingomielina e q.s.p. tampão de reação: 0,5 M Tris-HCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,4) e amostra, diluída em 100 µL de tampão de reação. Em seguida, a placa foi incubada a 37°C durante 30 minutos ao abrigo de luz. A excitação do fluoróforo foi realizada a 530 nm e a leitura no comprimento de onda 590 nm.

No ensaio, a atividade da esfingomielinase é monitorada indiretamente utilizando o 10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine (Amplex® Red), que é um fluoróforo sensível a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Inicialmente a esfingomielinase (presente no EGS ou a proteína recombinante) hidrolisa a esfingomielina para obtenção de ceramida e fosforilcolina. Após a ação da fosfatase alcalina ocorre a hidrólise da fosforilcolina em colina, que é oxidada pela colina oxidase em betaína e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na presença do HPR reage com o Amplex® Red produzindo resorufina, que ao ser excitada a 530 nm emite fluorescência no comprimento de onda de 590 nm (Fig. 9).



**Figura 9: Esquema do ensaio de atividade enzimática da esfingomielinase utilizando o Kit Amplex® Red Sphingomyelinase Assay**

#### 4.4. Análises *in silico* das sequências da esfingomielinase

Para a identificação de proteínas do tipo SMase D, foram feitas buscas em bancos de dados utilizando como molde a SMase D de *L. laeta* (GI: 60594084). Os bancos de dados investigado foram: a) um transcriptoma de glândula salivar de *A. sculptum* pertencente ao LFIH (dados não publicados e não depositados em bancos de dados); e b) sequências depositadas no NCBI nos bancos de dados “Nucleotide collection (nr/nt)”, “Expressed sequence tags (est)” e “Transcriptome Shotgun Assembly (TSA)” utilizando a ferramenta tblastn e “*Amblyomma cajennense* (taxid:34607)”, “*Amblyomma sculptum* (taxid:1581419)” e “Ixodidae (taxid: 6939)” como organismos.

As análises das sequências de SMases identificadas de carrapatos foram realizadas pelos programas “ExPASy - Translate tool” para a tradução das sequências de nucleotídeos (<https://web.expasy.org/translate/>); “SignalP-5.0 Server” (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) para identificação dos peptídeos sinal e dos seus sítios de clivagem nas sequências de aminoácidos; “ProtParam tool” (<https://web.expasy.org/protparam/>) para o cálculo de parâmetros como a massa

molecular e o ponto isoelétrico das sequências de proteínas; e o Banco de Dados de Domínios Conservados (CDD) do NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/>) que avaliou a presença de domínios nas sequências em estudo. Os alinhamentos entre as sequências de SMase D de aranhas e carrapatos foi feito pelo Clustal, que alinha múltiplas sequencias, através do programa SnapGene® (<https://www.snapgene.com/>).

#### 4.5. Produção da AsSMase D recombinante (rAsSMase D)

Para a expressão da rAsSMase D, a sequência de nucleotídeos do transcrito da AsSMase D foi submetida à uma otimização de códons para a expressão em bactérias e em seguida foi feito um gene sintético (Fastbio - [www.fastbio.com.br](http://www.fastbio.com.br)). A sequência foi clonada no vetor pET-28a(TEV) (GenScript® Make Research Easy). O plasmídeo recombinante pET-28a(TEV)-AsSMase D foi transformado em bactérias BL-21(DE3) *Arctic Express* termocompetentes. As células resistentes ao antibiótico, contendo o plasmídeo, foram selecionadas em placas de cultura contendo meio LB, ágar e Kanamicina (50 µg/mL) e inoculadas em 20 mL de meio LB contendo Kanamicina (50 µg/mL) e Gentamicina (20 µg/mL) e mantidas em temperatura de 37°C, 160 rpm *overnight*. Em seguida, a cultura foi transferida para 1 L de meio LB sem antibiótico e mantida a 37°C durante aproximadamente 3 horas. Após atingir a densidade 0,4 - 0,8 (OD<sub>600nm</sub>) a expressão da proteína recombinante foi induzida com IPTG (isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) em uma concentração final de 1 mM e mantida a 12°C, sob agitação de 160 rpm, durante 24 horas. Em seguida as células foram centrifugadas a 10.000 g durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspenso em tampão de lise (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 5 mM MgSO<sub>4</sub>, 100 mg de lisozima), incubado a temperatura ambiente durante 15 minutos e sonificado através de sonicador ultrassônico em três ciclos de 30 segundos cada, intervalados com 30 segundos de resfriamento a 4°C. O lisado foi centrifugado a 10.000 g por 30 minutos a 4°C e o sedimento mantido a -80°C até o momento da purificação. O sobrenadante, que continha a proteína recombinante na forma solúvel, foi purificado no mesmo dia da lise celular. Para a purificação da rAsSMase D foi utilizado uma coluna de afinidade HisTrap HP Ni<sup>2+</sup> (5 mL) (GE Healthcare) em AKTA Prime Plus System (GE Healthcare). Foram utilizados dois tampões durante a purificação da forma solúvel: tampão de equilíbrio (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 300 mM NaCl, 5 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM Imidazol) e o de eluição (50 mM Tris-

HCl pH 7,5, 300 mM NaCl, 5 mM MgSO<sub>4</sub>, 500 mM Imidazol). A rAsSMase D foi eluída em um gradiente de eluição a um fluxo de 1 mL/min. A absorvância das frações obtidas foram monitoradas a 280 nm e as que indicavam a presença de proteínas foram submetidas ao SDS-PAGE para verificação da sua massa e pureza. O rendimento da purificação rAsSMase D foi determinado pelo método de Bradford (Bradford, 1976) usando várias concentrações de soro albumina bovina (BSA) para a montagem da curva padrão. Após o SDS-PAGE, As frações contendo rAsSMase D foram submetidas à diálise para troca do tampão de eluição para o tampão de ensaio, no caso da realização da atividade enzimática ou PBS, para imunização de camundongos.

#### **4.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE) e Western blot**

A expressão e a purificação das proteínas recombinantes foram verificadas através de SDS-PAGE 12,5% e padrão de peso molecular da Bio-Rad (Precision Plus Protein™ Dual Color Standards 10-250 kD). Os géis foram utilizados para avaliar o perfil da expressão da rAsSMase D, a pureza e a massa das frações após a purificação. Para a avaliação do perfil de expressão da rAsSMase D foi coletado 1 mL de cultura bacteriana antes e após 24 horas da indução com IPTG. Essas alíquotas foram centrifugadas 10.000g por 5 minutos e o sedimento ressuspendido em 10 µL de água destilada. Já para a eletroforese das frações purificadas da rAsSMase D, foram utilizados 20 µL de cada uma das frações dos picos de proteína. Estas amostras foram adicionadas ao tampão da amostra em condições redutoras (0,5 M Tris-HCl, pH 6.8; 10% glicerol, 10% (p/v) de SDS, 0,1% (p/v) de azul de bromofenol, 5% de β-mercapto-etanol) e incubadas a 100°C durante 5 minutos. A corrida eletroforética foi realizada utilizando tampão de corrida (0,025 mol/L Tris, 0,2 mol/L glicina e 0,1% de SDS, pH 8.3) sob voltagem de 100 V. Para a visualização do perfil de expressão da rAsSMase D, o gel contendo os tempos de expressão (antes e depois da indução com IPTG) e as alíquotas após a lise da cultura bacteriana foi corado com a solução de azul de coomassie (0,25% de azul de coomassie brilhante G25; 5% de metanol e 7% ácido acético; em água deionizada) por 60 minutos à temperatura ambiente sob agitação constante. Após esse período o gel foi descorado com solução descorante (50% metanol em água deionizada), com sucessivas trocas da solução descorante para a visualização

da separação das proteínas. A visualização das proteínas purificadas foi feita através da coloração por 0,5% de nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ).

Para a realização do Western blot, inicialmente foram produzidos anticorpos policlonais anti-rAsSMase D. Para isto, 10 camundongos fêmeas de 6 a 8 semanas de idade da linhagem Balb/C foram imunizados a partir da injeção subcutânea de 10  $\mu\text{g}$  da rAsSMase D em adjuvante hidróxido de alumínio (Sigma). Foram realizadas três injeções com intervalos de 15 dias e o sangue, para a obtenção do soro imune, foi coletado sete dias após a última injeção.

Em seguida, o EGS e as frações purificadas contendo a proteína recombinante foram submetidas ao SDS-PAGE e então transferidas para membranas de nitrocelulose (Hybond, Amersham) utilizando o equipamento Mini-protean II (BioRad) (Towbin et al., 1979) durante 2 horas. Após a transferência, a membrana de nitrocelulose foi mantida em solução de bloqueio (0,1% de PBS/ Tween<sup>®</sup> 20 e 10% de leite desnatado) durante 2 horas ou *overnight*, sob agitação a 4°C. Após o bloqueio, a membrana foi incubada sob agitação com o soro anti-rAsSMase D produzido em camundongos na diluição de 1:70 ou com o anticorpo monoclonal Anti-poliHistidina (Sigma-Aldrich) também produzido em camundongos, na diluição 1:3.000 de acordo com o fabricante. Ambos foram diluídos em PBS contendo 0,1% de Tween<sup>®</sup> 20 (Sigma-Aldrich). Após uma hora e trinta minutos de incubação com os anticorpos primários, as membranas foram novamente incubadas com o soro anti-IgG conjugado com peroxidase, na diluição 1:1.000 em PBS. Em todos os intervalos entre as incubações as membranas foram lavadas 3 vezes por 10 minutos com solução de PBS/ Tween<sup>®</sup> 20 0,1%, sob agitação. A revelação foi realizada utilizando o kit DAB peroxidase substrate (Vector Laboratories) de acordo com as recomendações do fabricante.

#### **4.7. Avaliação dos níveis de AsSMase D em tecidos e estágios de desenvolvimento do *A. sculptum***

##### **4.7.1. Avaliação dos níveis de mRNA codificantes da AsSMase D por PCR convencional**

A extração do RNA total foi feita a partir dos órgãos (intestino e glândula salivar) e corpo inteiro de larvas e ninfas. O RNA de corpo inteiro foi extraído em pools contendo 10 larvas e 10 ninfas. O RNA da glândula salivar e o intestino foram extraídos individualmente. As extrações foram realizadas utilizando o Kit Nucleospin RNA II

(Thermo Fisher), de acordo com as instruções do fabricante. Após a extração, o RNA foi eluído em 20 µL de água milliQ livre de nucleases e quantificado a 260 nm no equipamento Nanodrop® (ThermoScientific). Para a síntese de cDNA, 0,5 µg dos RNAs extraídos foram adicionados a 0,5 µL de hexâmeros randômicos (Promega) e submetidos ao sistema da transcriptase reversa M-MLV (Promega) em um volume final de 25 µL. A reação foi realizada em um termociclador, em ciclos de 25°C por 10 minutos, 37°C por 60 minutos e 70°C por 15 minutos e armazenada a -20°C. O cDNA sintetizado foi utilizado como molde para as reações de PCR convencional que foram realizadas em 35 ciclos (94°C por 45 segundos, 60°C por 45 segundos, 72°C por 1 minuto) com 1 µL de cDNA, 200 nM de cada iniciador, 200 µM de dNTPs e 1 U de Taq DNA polimerase em um volume final de 20 µL. Para cada par de iniciadores foi feito um controle negativo (branco), onde o cDNA foi substituído por água Milli-Q, com o objetivo de descartar a presença de contaminação por DNA nos iniciadores ou em qualquer outro reagente. Após a PCR, os produtos foram analisados em gel de agarose 1,5% que foram corados com GelRed (Biotium) logo após a corrida e visualizados em fotodocumentador AlphaDigiDoc™ sob luz ultravioleta e fotografado. Nos géis, foram aplicados o padrão de peso molecular de 100 pb e um mix contendo 5 µL do produto da PCR e 1 µL tampão de amostra (PCR Marker Sigma®). As sequências dos iniciadores utilizados nas reações de PCR foram desenhadas com o software Primer3 (<http://primer3.sourceforge.net/>) e estão listadas na Tabela 1.

Gene alvo	Iniciador F: 5'→3'	Iniciador R: 5' → 3'	Produto
AsSMase D	ggacgtcatcagaggtgctt	gctgtcggttatgtcagcaa	452 pb

**Tabela 1: Sequência dos iniciadores utilizados na PCR convencional.**

#### 4.7.2. Avaliação dos níveis de mRNA codificantes da AsSMase D por qPCR

A extração do RNA total foi feita a partir da extração de dois pares de glândulas salivares de fêmeas em cada um dos tempos a seguir: jejum, 1, 3, 5 e 8 dias de alimentação. Os cDNAs foram sintetizados conforme protocolo descrito para PCR convencional. As qPCRs foram realizadas utilizando o Power SYBR Green PCR Master Mix Kit (Applied Biosystems) de acordo com as instruções do fabricante e para a detecção dos resultados foi utilizado o equipamento StepOnePlus™ System (Applied Biosystems). As reações foram feitas em triplicata utilizando 1 µL dos produtos da

síntese de cDNA, 300 nM de cada iniciador (Tabela 2), 12,5 µL Power SYBR Green PCR Master Mix Kit e água para completar o volume final de 25 µL. Para a amplificação as condições utilizadas foram: 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Um controle negativo da transcrição reversa (sem a enzima transcriptase reversa) e um controle negativo sem cDNA (substituído por água Milli-Q) foram incluídos em cada placa para cada conjunto de iniciadores utilizados, com a finalidade de confirmar a ausência de amplificação de DNA genômico e avaliar a presença de dímeros de primers ou contaminação dos reagentes, respectivamente.

A análise das curvas de dissociação dos amplificadas das amostras foi realizada com o objetivo de avaliar se estavam sendo produzidos mais de um produto ou sobre a existência da formação de dímeros. Para quantificação relativa de transcritos-alvo em cada amostra, foi utilizado o método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak & Schmittgen 2001) utilizando os transcritos do gene constitutivo Fator de Elongação como normalizador interno. A eficiência das reações de qPCR foi determinada para cada transcrito estudado utilizando o valor da inclinação da curva obtida pela diluição seriada do cDNA (100, 10, 1, 0,1, 0,01 ng de cDNA) em um modelo de regressão linear simples (Radonić et al., 2004). As sequências dos iniciadores utilizados nas reações de qPCR foram desenhadas com o software Primer3 (<http://primer3.sourceforge.net/>) e estão listadas na Tabela 2.

Gene alvo	Iniciador F: 5'→3'	Iniciador R: 5' → 3'	Produto
AsSMase D qPCR	ggacttgaaaacagccaagc	atctttgacgtagccgatgg	145 pb
Fator de Elongação	cgtgcccaaaaatccttat	ggaagtctcaaaagccgta	153 pb

**Tabela 2: Sequências de iniciadores utilizados para as qPCRs.**

#### 4.7.3 Avaliação dos níveis de AsSMase D por ELISA

Para o ensaio imunoenzimático, uma placa de ELISA (Nunc-Immuno™ MicroWell™) foi sensibilizada durante 12 horas, à temperatura de 4°C, dentro de uma câmara úmida com 1 µg de extrato de glândula salivar de carrapatos em jejum e 1, 3, 5 e 8 dias de alimentação diluídos em 100 µL de tampão carbonato (35 mM NaHCO<sub>3</sub>; 15 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; pH 9,6). Os poços sensibilizados foram bloqueados com 200 µL de solução bloqueadora (0,05% Tween 20 em PBS + 5% de leite em pó desnatado) durante 2 horas a 37°C. Após o bloqueio, cada poço foi lavado três vezes utilizando 200 µL de solução de lavagem (0,05% Tween 20 em PBS) por 2 minutos. Foram adicionados 100

$\mu\text{L}$  de soro dos camundongos, diluídos em 1:160 em solução diluente de anticorpo (0,05% Tween 20 em PBS, 0,1% BSA) e incubados durante 1 hora a 37°C, sob agitação de 160 rpm, contendo os anticorpos anti rAsSMase D. O controle foi preparado da mesma forma com soro dos camundongos não imunizados. Cada um dos tratamentos foi realizado em triplicata. Após a incubação, os poços foram lavados três vezes com 200  $\mu\text{L}$  de solução de lavagem, em agitação por 2 minutos. A detecção dos anticorpos anti rAsSMase D foi realizada com adição de anticorpo anti-mouse IgG conjugado com peroxidase produzido em cabra (Sigma-Aldrich). Foram transferidos para cada poço, 100  $\mu\text{L}$  do anticorpo anti-mouse IgG peroxidase diluído a 1:5.000 em solução diluente de anticorpos (0,05% Tween 20 em PBS, 0,1% BSA) e incubados por uma hora a 37°C, sob agitação. Após nova lavagem, os poços foram rapidamente preenchidos com 100  $\mu\text{L}$  de substrato OPD- $\text{H}_2\text{O}_2$  (1 mg/mL de OPD [Sigma: P-9029], 0,04% de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) dissolvido em tampão de citrato de sódio (50 mM ácido cítrico; 50 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; pH 5,0) e incubados por 20 minutos à temperatura ambiente no escuro. A reação foi interrompida com a adição de 100  $\mu\text{L}$  de ácido sulfúrico (1M) por poço. As leituras foram executadas a 492 nm em leitor de microplacas (VersaMax™ - Molecular Devices) e os dados gerados foram utilizados para os cálculos estatísticos.

#### **4.8. Atividade dermonecrótica da AsSMase D recombinante *in vivo***

Para a avaliação da atividade dermonecrótica da rAsSMase D foi utilizado um coelho fêmea da raça New Zealand. Para o experimento foram utilizadas cerca de 6  $\mu\text{g}$  de rAsSMase D, diluída em 150  $\mu\text{L}$  de tampão (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 300 mM NaCl, 5 mM  $\text{MgSO}_4$ ) e 16  $\mu\text{g}$  de extrato de glândula salivar de fêmeas com 3 dias de alimentação, diluído em 100  $\mu\text{L}$  salina 0,9%. Como controle foram utilizados 2,5  $\mu\text{g}$  da proteína recombinante de *L. intermedia* LiD1, diluída em 100  $\mu\text{L}$  de PBS e 100  $\mu\text{L}$  da solução tampão no qual as proteínas recombinates estavam diluídas. As amostras foram inoculadas por via intradérmica na região dorsal do coelho previamente tricotomizado. A formação ou não das lesões dermonecróticas foram avaliadas 4, 24 e 48 horas após a inoculação das proteínas, do EGS e dos controles.

#### 4.9 Avaliação da atuação da AsSMase D na inibição e na ativação da via alternativa do sistema complemento

Para a realização do ensaio de ativação da via alternativa do sistema complemento, 10 mL de sangue ORh<sup>+</sup> de doador voluntário saudável foi coletado sem anticoagulante e mantido à temperatura ambiente por 2 horas e em seguida submetido à centrifugação a 3000g durante 5 minutos, para a obtenção do soro humano normal (SHN). O soro foi aliquoteado e mantido -80°C até o momento da realização dos ensaios. Para a obtenção dos eritrócitos, 10 mL de sangue foi coletado do mesmo doador e acrescentados à heparina (2 UI/mL). O sangue foi lavado três vezes (480g durante 5 minutos) com uma solução de Mg-EGTA (1 mM HEPES, 30 mM NaCl, 10 mM EGTA, 7 mM MgCl<sub>2</sub>, 3% glicose, 0,02% gelatina, pH 7,4) e ajustado na concentração de 5x10<sup>8</sup> células/mL. Para a realização dos ensaios, 200 µl de hemácias foram incubadas durante 1h a 37° C com 200 µl da proteína recombinante (1 µg da rAsSMase D). A proteína recombinante rLiD1, referente a SMase D de *L. intermedia* foi utilizada na mesma concentração como controle positivo e foi gentilmente cedida pela Dra. Liza Felicori (Felicori et al., 2006) . Após a incubação, as hemácias foram lavadas com Mg-EGTA e ressuspendidas em 400 µl do mesmo tampão e incubadas com 100 µl do SHN durante 1h a 37°C. Após a incubação as reações foram centrifugadas a 1700 g durante 1 minuto e a absorbância do sobrenadante foi medida a 414nm. Os resultados foram expressos em porcentagem de hemólise, utilizando como controle do experimento a hemólise total (100%), obtida a partir do acréscimo de 400 µl de água destilada.

Para a realização do ensaio de inibição da via alternativa do complemento, SHN foi coletado de 10 voluntários saudáveis e após a centrifugação a 3.000g durante 5 minutos a 4°C os soros foram misturados em *pools*, aliquoteados e armazenados a -80° C até o momento da realização dos ensaios. As hemácias utilizadas foram obtidas a partir da punção da veia auricular de 1 coelho, mantido no biotério de Parasitologia no ICB-UFMG. O sangue coletado foi acrescentado à uma solução conservadora de hemácias (0,05%, ácido cítrico, 0,8% citrato de sódio, 2,05% glicose, 0,42% NaCl) na proporção de 1:1 e mantidos a 4°C até a realização dos ensaios.

Para o ensaio, as hemácias de coelho foram lavadas 3 vezes (480g durante 5 minutos a 4° C) com a solução de Mg-EGTA e ressuspendidas no mesmo tampão. A concentração das hemácias foi ajustada para 2x10<sup>8</sup> células/mL. Em tubos de 1,5 mL foram adicionados 50 µl de soro humano diluído 1:30 em Mg-EGTA, 50 µl de hemácias

e 50 µl das proteínas recombinantes diluídas em Mg-EGTA (1 µg da rAsSMase D). Os tubos foram mantidos a 37° C durante 30 minutos. Após a incubação, as reações foram interrompidas com 500 µl de solução salina 0,9% gelada e centrifugadas a 1.700g por 1 minuto. Em seguida, 200 µl de sobrenadante de cada reação foram transferidos para placas de 96 poços e lidos em leitor de ELISA (Bio-Rad Benchmark®) a 414nm. Em cada teste, foram utilizados três controles: hemólise total, no qual eram acrescentados 500 µl de água destilada fria após a incubação a 37°C; hemólise espontânea (controle negativo), no qual não havia adição de soro, apenas 50 µl de Mg-EGTA; e hemólise pelo complemento (controle positivo), no qual era acrescentado soro, sem adição de proteína recombinante. Para análise dos dados, a média do controle negativo foi subtraída dos demais resultados e os mesmos transformados em porcentagem de hemólise, considerando o controle positivo como 100% de atividade hemolítica.

#### **4.10 Avaliação da atuação da AsSMase D na agregação plaquetária**

Para avaliar a atuação da rAsSMase D na agregação plaquetária, o sangue de um doador voluntário saudável foi coletado em citrato (0,38% citrato trisódio). Após a coleta, o sangue foi centrifugado a 100g durante 10 minutos para a obtenção do PRP (plasma rico em plaquetas). Para avaliar a capacidade da rAsSMase D em de ativar a agregação plaquetária, 100 µl do PRP foi adicionado à 1 µg de rAsSMase D, diluída em 20 µl de tampão (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 300 mM NaCl, 5 mM MgSO<sub>4</sub>) e a leitura foi realizada em leitor de ELISA a 655 nm, com 200 leituras, uma a cada 10 segundos. Como controle positivo foi utilizado 5 µM de ADP e como controle negativo o tampão. Para avaliar a capacidade de a rAsSMase D de inibir a agregação plaquetária, foram utilizados 100 µl do PRP, que foram adicionados à 1 µg de rAsSMase D, diluído em 20 µl de tampão. A agregação foi ativada utilizando 5 µM de ADP e a leitura realizada da mesma forma que a anterior. Como controles foram utilizados tampão com adição de 5 µM ADP (controle positivo) e sem a adição de ADP (controle negativo).

#### **4.11 Avaliação da atuação da AsSMase D na cascata de coagulação**

Para detectar alterações no tempo de coagulação do plasma humano na presença da rAsSMase D, ensaios de tempo de recalcificação do plasma foram realizados. Nesse ensaio, 30 µl de plasma citratado (0,38% citrato trisódio), obtido de doador voluntário saudável e centrifugado à 3.000g durante 10 minutos, foram adicionados a 30 µl da

proteína recombinante (1 µg de rAsSMase D ou da rLiD1) diluída em tampão (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 300 mM NaCl, 5 mM MgSO<sub>4</sub>) ou apenas 30 µl do tampão (controle negativo). As reações foram distribuídas em uma placa de 96 poços e em seguida, foram disparadas com o acréscimo de 30 µl de CaCl<sub>2</sub>. Uma vez que a coagulação do plasma provoca um aumento na turbidez da amostra, é possível monitorar a reação em um leitor de microplacas a 37°C na absorbância de 655 nm, com 200 leituras a cada 10 segundos.

#### **4.12. Avaliação do papel da AsSMase D durante a alimentação utilizando o silenciamento gênico por RNAi**

O silenciamento por RNAi foi obtido através da injeção de RNA de dupla fita (dsRNA) com sequência homóloga ao transcrito alvo na hemolinfa das fêmeas do *A. sculptum*. A produção dos moldes para a síntese de dsRNA foi realizada através de PCRs para a amplificação das sequências alvo a partir dos iniciadores contendo o promotor T7 (Tabela 2). A síntese de dsRNA foi realizada utilizando o kit Megascript T7Kit (Thermo Fisher) (Araujo et al., 2007, Araujo et al., 2009). O dsRNA foi quantificado pelo Nanodrop® (ThermoScientific) e a qualidade das fitas avaliada por eletroforese em gel de agarose a 2%. O dsRNA foi ressuspendido em solução salina na concentração de 10 µg/µL. O dsRNA foi introduzido na hemolinfa de fêmeas de *A. sculptum* por injeção utilizando um microinjetor (Nanoject II, Drummond) de acordo com as metodologias descritas por Araújo et al., 2009 e Narasimhan et al., 2004.

Os níveis dos transcritos em estudo, após o silenciamento, foram avaliados através da extração da glândula salivar de carrapatos com 6 e 30 dias após as injeções da suspensão de dsRNA. Em seguida foi realizada a síntese de cDNA e avaliação por qPCR conforme descrito no item 4.7.2. Os iniciadores utilizados foram montados utilizando o software Primer3 (<http://primer3.sourceforge.net/>) (Tabela 3). As reações foram realizadas utilizando o Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) no aparelho StepOnePlus™ System (Applied Biosystems). A quantidade relativa de cada gene foi mensurada de acordo com o método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (Livak and Schmittgen, 2001) utilizando o gene do fator de Elongação como gene de referência. Como controle, foram utilizadas reações sem cDNA (branco) e reações onde o cDNA foi substituído por RNA total (controle da contaminação por DNA).

Gene alvo	Iniciador <i>F</i> : 5'→3'	Iniciador <i>R</i> : 5' → 3'	Produto
AsSMase D	T7 + ggacgtcatcagaggtgctt	T7 + gctgtcggttatgtcagcaa	452 pb
Fator de Elongação	cgtgcccaaaaatccttat	ggaagtctcaaaagccgta	153 pb
Queratina de camundongo	T7 + ggggtctcctctctgaaac	T7 + attagcagccgtggaagaga	275 pb
T7	taatacgactcactatagggaga		

**Tabela 3: Sequência dos iniciadores utilizados nos experimentos de silenciamento.**

Fêmeas do carrapato com 10 dias após a muda foram injetadas com 4 µg da suspensão de dsRNA e mantidas em estufa BOD sob condições controladas. Após 30 dias foram colocadas para alimentar em camundongos em câmaras de alimentação (Bouchard and Wikel, 2005). Além do grupo teste foram feitos os grupos controle com carrapatos injetados com dsRNA de queratina (4 µg) e salina 0,9%. Cada camundongo foi infestado com uma fêmea silenciada e um macho não silenciado. Os parâmetros alimentares observados nas fêmeas foram: tempo de alimentação, peso após a alimentação e peso dos ovos.

#### **4.13. Avaliação do papel da AsSMase D através da alimentação de carrapatos em hospedeiros imunizados**

Grupos de seis camundongos foram imunizados com a rAsSMase D, conforme metodologia descrita no item 4.6. Após a imunização, os camundongos foram utilizados como fonte alimentar para um casal de adultos de *A. sculptum*, com 20 a 30 dias após a muda. O grupo controle utilizado foi injetado apenas com o adjuvante hidróxido de alumínio (Sigma). Os parâmetros alimentares observados nas fêmeas foram: tempo de alimentação, peso após a alimentação e peso dos ovos.

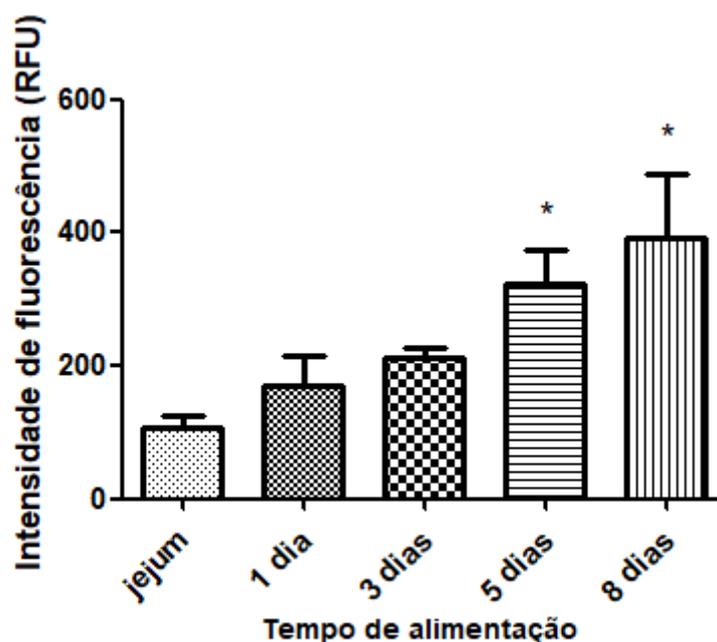
#### **4.14. Análise estatística dos dados**

Os dados foram analisados utilizando o software GraphPad Prism 5.0. A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste Kolmogorov-Smirnov. As análises das variáveis que não apresentaram distribuição normal e com mais de dois grupos foram feitas com o teste Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn's. Para análise com dois grupos foi realizado o teste de Mann Whitney.  $P < 0,05$  foi considerado como significativo.

## 5. Resultados

### 5.1. Identificação e caracterização estrutural *in silico* de esfingomielinases presentes na glândula salivar de *A. sculptum*

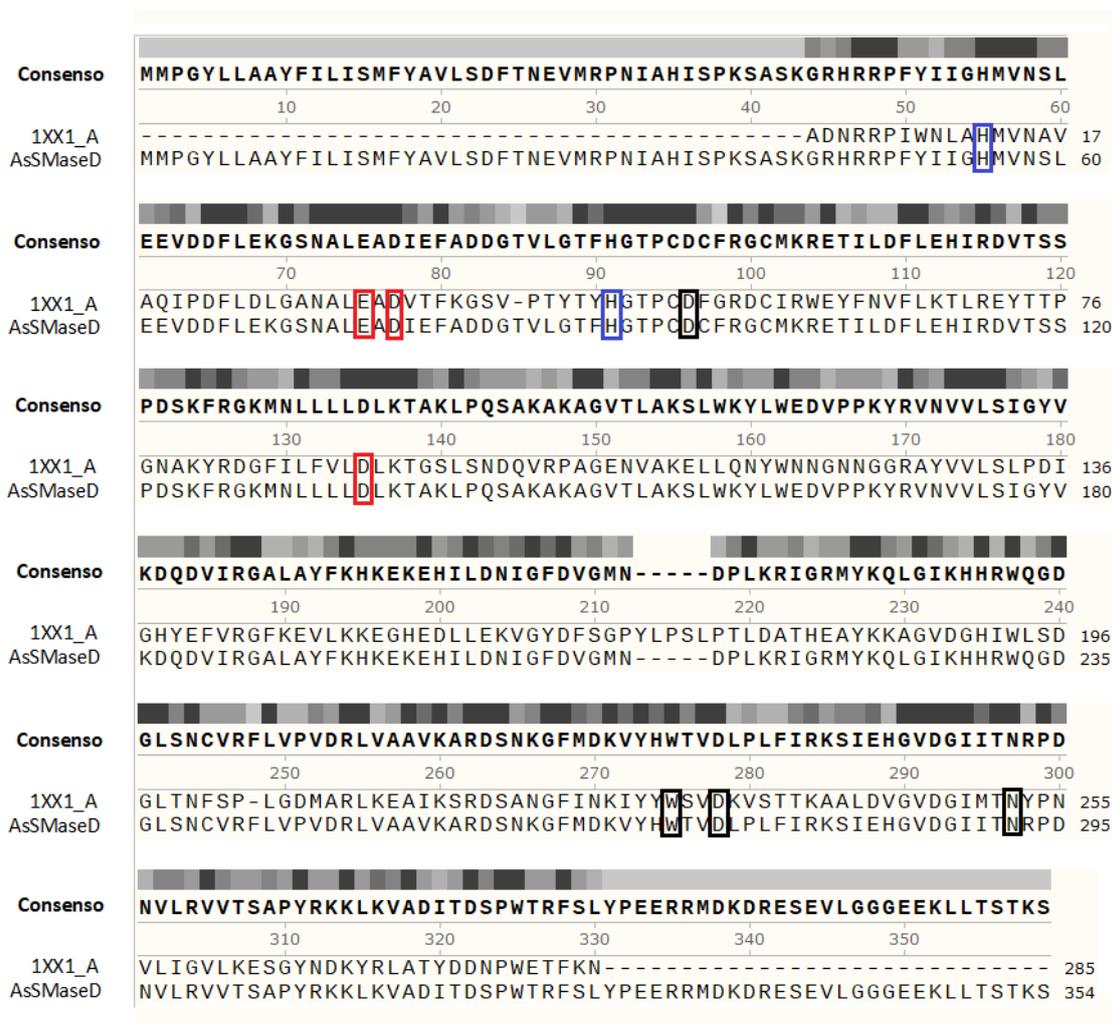
Para investigar a presença de esfingomielinases (SMases) produzidas pela glândula salivar do *A. sculptum*, o primeiro passo foi avaliar se a saliva do carrapato possui atividade de esfingomielinase. Para isso, EGSs de fêmeas de *A. sculptum* em diferentes momentos de alimentação foram submetidos aos ensaios de atividade. Os resultados demonstraram que a glândula salivar produz moléculas capazes de degradar a esfingomielina. Essas moléculas são produzidas já em carrapatos em jejum e há um aumento gradativo da atividade ao longo do tempo de alimentação, sendo a atividade mais intensa no EGS de carrapatos com 8 dias de alimentação (Fig. 10).



**Figura 10:** Atividade enzimática da esfingomielinase presente em extratos de glândula salivar de fêmeas de *A. sculptum* em diferentes dias após o início da alimentação. Foram utilizados 2  $\mu$ g de proteína total do EGS de fêmeas de *A. sculptum* em diferentes tempos de alimentação. Os dados estão representados pela média (n=4 para os grupos jejum, 1 dia, 3 dias e 5 dias; n=3 para 8 dias) (Kruskall-wallis, Dunn's,  $p < 0,05$ , \* diferença estatística em relação ao jejum).

Uma vez demonstrada a presença de atividade enzimática da esfingomielinase na glândula salivar, o passo seguinte foi identificar quais poderiam ser as moléculas responsáveis por tal atividade. A partir da sequência de uma SMase D presente no

veneno da aranha *Loxosceles laeta* (1XX1\_A) (Zela et al., 2004) foram realizadas buscas em um transcriptoma de glândula salivar de *A. sculptum* pertencente ao LFIH (dados não publicados) com o objetivo de encontrar sequências similares às esfingomielinases. Foi possível identificar apenas uma sequência com 40% de identidade e valor esperado de  $1e-69$ . A comparação entre as duas sequências demonstrou que elas apresentam resíduos catalíticos de histidina conservados (His12 e His47 na sequência de *L. laeta*). Além disso, é possível observar que os resíduos Glu e Asp (posições Glu32, Asp34 e Asp91 na sequência de *L. laeta*) que coordenam o íon  $Mg^{+2}$ , e os resíduos envolvidos na rede de ligação do hidrogênio (Asp52, Trp230 e Asp233 e Asn252 na sequência de *L. laeta*) também são estritamente conservados (Fig. 11). Devido às semelhanças estruturais, infere-se que a sequência identificada de *A. sculptum* é uma SMase D e, no presente trabalho, passa a ser então denominada de esfingomielinase D de *A. sculptum* (AsSMase D).



**Figura 11:** Alinhamento das seqüências da SMase D de *Loxosceles laeta* e da SMase D encontrada no transcriptoma de glândula salivar de *Amblyomma sculptum*. A seqüência consenso é mostrada acima do alinhamento. As histidinas catalíticas conservadas estão destacadas em azul. Resíduos responsáveis pela coordenação do íon Mg<sup>2+</sup> estão destacados em vermelho e os aminoácidos envolvidos na rede de ligação de hidrogênio estão marcados em preto. A seqüência de *Loxosceles laeta* (GI: 60594084) utilizada para a construção do alinhamento foi obtida do NCBI.

A seqüência de nucleotídeos encontrada no transcriptoma de *A. sculptum* (AsSMase D) possui 1.067 nucleotídeos e codifica uma proteína imatura que possui 354 aminoácidos com peptídeo sinal, cuja clivagem acontece entre os aminoácidos das posições 22 (S) e 23 (D) (Fig. 12A), resultando em uma proteína madura de 332 aminoácidos. A massa molecular estimada foi de 37,8 kDa e ponto isoelétrico de 9,14. Ao comparar a seqüência da AsSMase D com o banco de dados de domínios conservados do NCBI foi identificado apenas um domínio conservado da família Glycerophosphoryl diester phosphodiester (GDPD\_SF) que ocupa a região da proteína

que se inicia no aminoácido da posição 51, terminando no aminoácido da posição 320 (Fig. 12B).

A

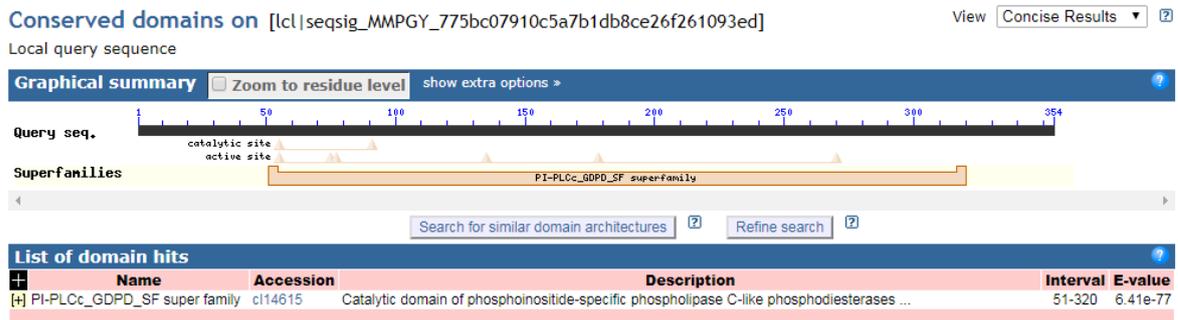
### Peptídeo Sinal

```

atgatgcctgggtatctccttgcgcttattttatcctaataagtatgttttatgctggtgctaagtgaactttacaacgaagtaatgcgcccccaacatcgcacacatcagcccgaatcg
M M P G Y L L A A Y F I L I S M F Y A V L S D F T N E V M R P N I A H I S P K S
gctagcaaaggccggcacaggcggcctttctacatcattggccacatggtgaactcgttgaagaagtggagcacttcctcgagaaggatccaatgcccctcaggcagacatcgagttt
A S K G R H R R P F Y I I G H M V N S L E E V D D F L E K G S N A L E A D I E F
gcagatgacgggtaccgtgctgggcacgtttcacggaactcgtgtgactgcttccgcgctcatgaagcagagaccattttggacttctggagcacattagggatgtcaccagtagc
A D D G T V L G T F H G T P C D C F R G C M K R E T I L D F L E H I R D V T S S
cctgattcaaatgtagaggaataaagaaccttcttactggacttgaacacagcaactcctcgaatctgccaagcgaagcggagtcaccctagcaaaaagcctttggaatac
P D S K F R G K M N L L L L D L K T A K L P Q S A K A K A G V T L A K S L W K Y
ctctgggaagcgtgctcctaatacagggtgaacgtcgtgcttccatcgctcagctcaagatcaggagcgtcatcagaggtgctttggcatacttcaagcataaagaaaaggaaacac
L W E D V P P K Y R V N V V L S I G Y V K D Q D V I R G A L A Y F K H K E K E H
atttggacaatattggttgcagcttggcatgaacgacccccctaaaacggattggcgcatgtacaagcagctgggtatcaagcaccatcgctggcagggcagcggccttccaactgc
I L D N I G F D V G M N D P L K R I G R M Y K Q L G I K H H R W Q G D G L S N C
gtgcgcttctgtgaccatagatagctggtggcagccgtaagcccagagacagcaacaaggcttcatggacaaggtttaccactggactgtcagctgccgcttccataaggaaa
V R F L V P V D R L V A A V K A R D S N K G F M D K V Y H W T V D L P L F I R K
agcattgacacggcgttgcaggtatcatcacgaacggccagacaacgtactcgtgtagtgaccagtgaccataccggaagaagctgaaggttgctgacataaccgacgccctggg
S I E H G V D G I I T N R P D N V L R V V T S A P Y R K K L K V A D I T D S P W
acgcggttcagcctgtaccggaggaggaggatggacaaagacagagaatcgggaagtctgggtggaggaggaaaactgctgacttactaataatccttagca
T R F S L Y P E E R R M D K D R E S E V L G G G E E K L L T S T K S -

```

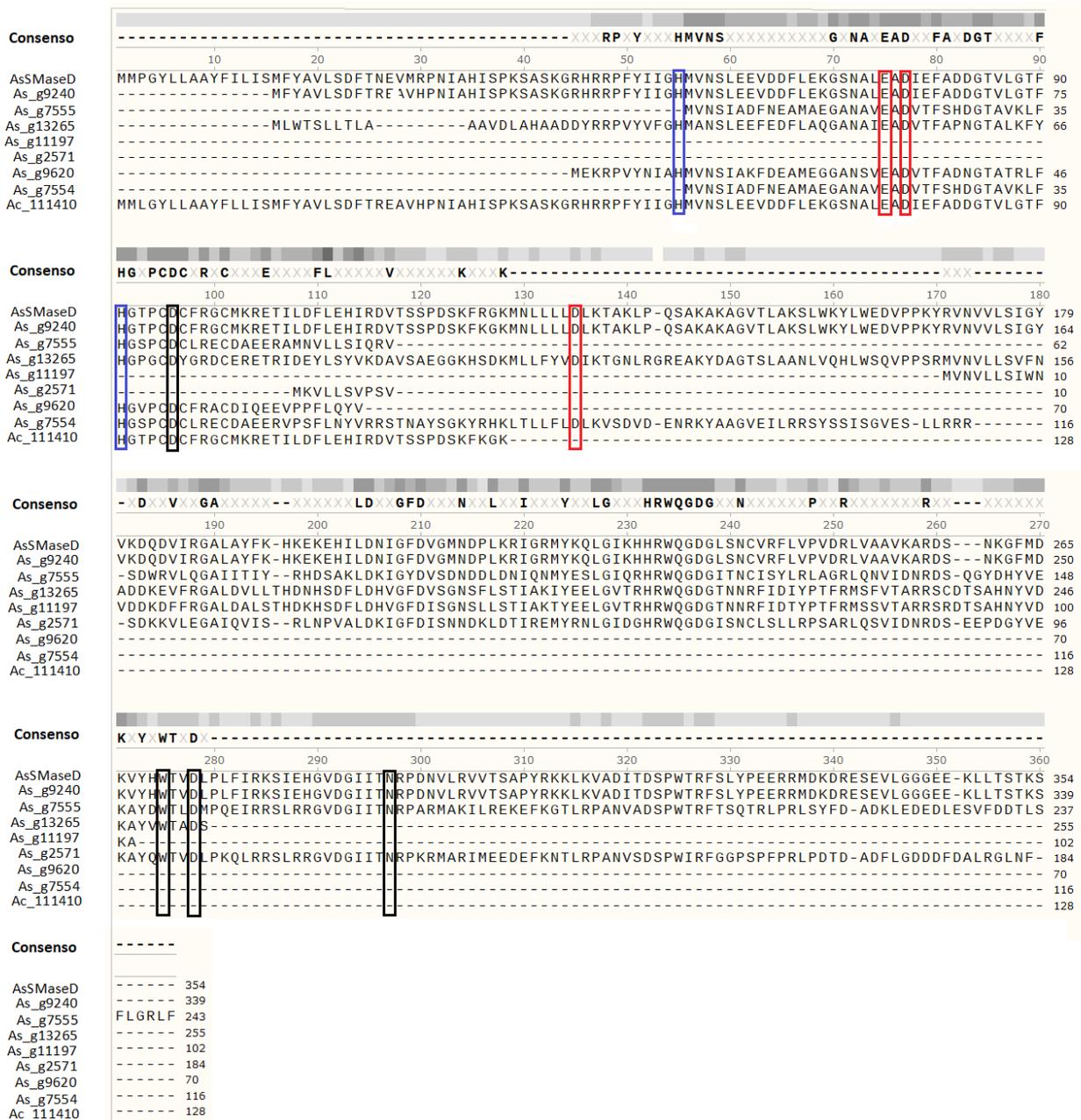
B



**Figura 12: Características estruturais da AsSMase D.** (A) Sequência de nucleotídeos e os respectivos aminoácidos e (B) Domínio Glycerophosphoryl diester phosphodiester (GDPD\_SF) presente na AsSMase D. A sequência foi traduzida utilizando o programa ExPASy - *Translate tool* a partir da sequência de nucleotídeos obtidos do transcriptoma salivar do *A. sculptum*.

A fim de avaliar a possibilidade da expressão de outras SMases na glândula salivar do *A. sculptum*, foram feitas buscas utilizando a ferramenta BLAST® em outros bancos de dados no NCBI. Foram encontradas outras oito sequências depositadas cujo alinhamento confirma a presença dos aminoácidos conservados, importantes para a atividade das SMases D (Fig. 13) e a análise do CDD confirma a presença do domínio GDPD\_SF. Dentre as oito sequências encontradas, uma delas (g9240) apresentou identidade de 99% com a AsSMase D e massa molecular também muito próxima (38,5

kDa). A sequência parece estar truncada na região amino terminal, de forma que o peptídeo sinal estava incompleto, sendo essa a principal diferença para a AsSMase D. As outras sequências encontradas apresentaram massas moleculares que variaram de 7,7 a 28,5 kDa e suas sequências se apresentaram truncadas. Apenas duas delas apresentaram peptídeo sinal (Tabela 4). Estes dados sugerem que o *A. sculptum* pode expressar mais de uma SMase em sua glândula salivar ou então que existem polimorfismos entre populações de diferentes regiões uma vez que as sequências do NCBI foram obtidas de um transcriptoma produzido a partir de glândulas salivares de uma população de *A. sculptum* coletados na região de Uberlândia, MG.



**Figura 13: Alinhamento das sequências de esfingomielinases encontradas no NCBI.** A sequência consenso é mostrada acima do alinhamento. As histidinas catalíticas conservadas estão destacadas em azul. Resíduos responsáveis pela coordenação do íon  $Mg^{2+}$  estão destacados em vermelho e os aminoácidos envolvidos na rede de ligação de hidrogênio estão marcados em preto. As sequências utilizadas para a construção desse alinhamento foram obtidas do NCBI “Transcriptome Shotgun Assembly” (TSA), “*Amblyomma sculptum* (taxid:1581419)” e “*Amblyomma cajennense* (taxid:34607)”. *A. sculptum* - g9240 (GB: GEEX01008232.1); *A. sculptum* - g7555 (GB: GEEX01006678.1), *A. sculptum* - g13265 (GB: GEEX01011798.1); *A. sculptum* – g 11197 (GenBank: GEEX01010013.1); *A. scultum* – g2571 (GB: GEEX01002251.1); *A. scultum* – g9620 (GB: GEEX01008579.1); *A. scultum* – g7554 (GB: GEEX01006677.1); *A. cajennense* Ac-111410 (GB: GBBK01000673.1).

Sequência	Peptídeo sinal	Peso Molecular	Domínio GDPD_SF
<i>Amblyomma sculptum</i> – AsSMase D	Presente	37,8 kDa	Presente
<i>Amblyomma sculptum</i> - g9240	Ausente	38,5 kDa	Presente
<i>Amblyomma sculptum</i> -g7555	Ausente	11,6 kDa	Presente
<i>Amblyomma sculptum</i> - g13265	Ausente	13,0 kDa	Presente
<i>Amblyomma sculptum</i> -g11197	Ausente	7,7 kDa	Presente
<i>Amblyomma sculptum</i> - g2571	Ausente	27,8 kDa	Presente
<i>Amblyomma sculptum</i> -g9620	Ausente	20,8 kDa	Presente
<i>Amblyomma sculptum</i> - g7554	Ausente	28,5 kDa	Presente
<i>Amblyomma cajennense</i> - Ac-111410	Presente	14,4 kDa	Presente

**Tabela 4: Sequências de SMases D de *A. sculptum* depositadas em bancos de dados.** São mostrados presença ou ausência de peptídeo sinal e do domínio GDPD\_SF e as massas moleculares de cada uma das seqüências encontradas.

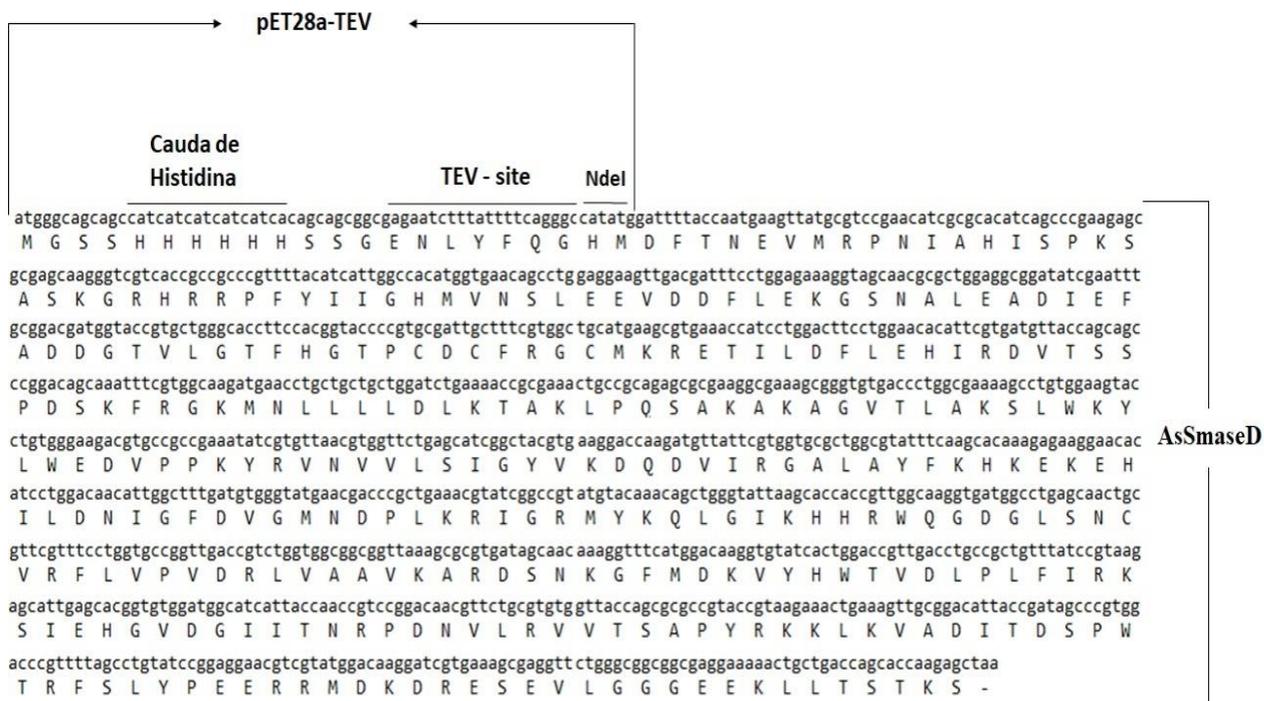
A partir da identificação da AsSMase D no transcriptoma do *A. sculptum*, objetivou-se, através de análises utilizando o BLAST® (Basic Local Alignment Search Tool), avaliar a possível presença de SMases D em diferentes espécies de carrapatos e comparar suas estruturas primárias. Foram encontradas seqüências pertencentes à diferentes espécies, dentre elas *Rhipicephalus annulatus*; *R. pulchellus*; *R. zambeziensis*; *Dermacentor variabilis* e *Ixodes ricinus*, algumas delas ainda não anotadas. Essas seqüências foram alinhadas com as seqüências de AsSMase D e as SMases D das aranhas *L. intermedia* e *L. laeta* e foi possível identificar que todas as espécies possuem os aminoácidos responsáveis pela atividade conservados. Esses resultados demonstram a presença de SMases D também na saliva de outros carrapatos e que essas moléculas também possuem os aminoácidos importantes para a sua função (Fig. 14).



Uma vez que a AsSMaseD se apresentou como a única sequência completa de *A. sculptum* e foi a única encontrada no transcriptoma construído com mRNA da população de carrapatos usada no presente trabalho, os experimentos subsequentes focaram nesta sequência.

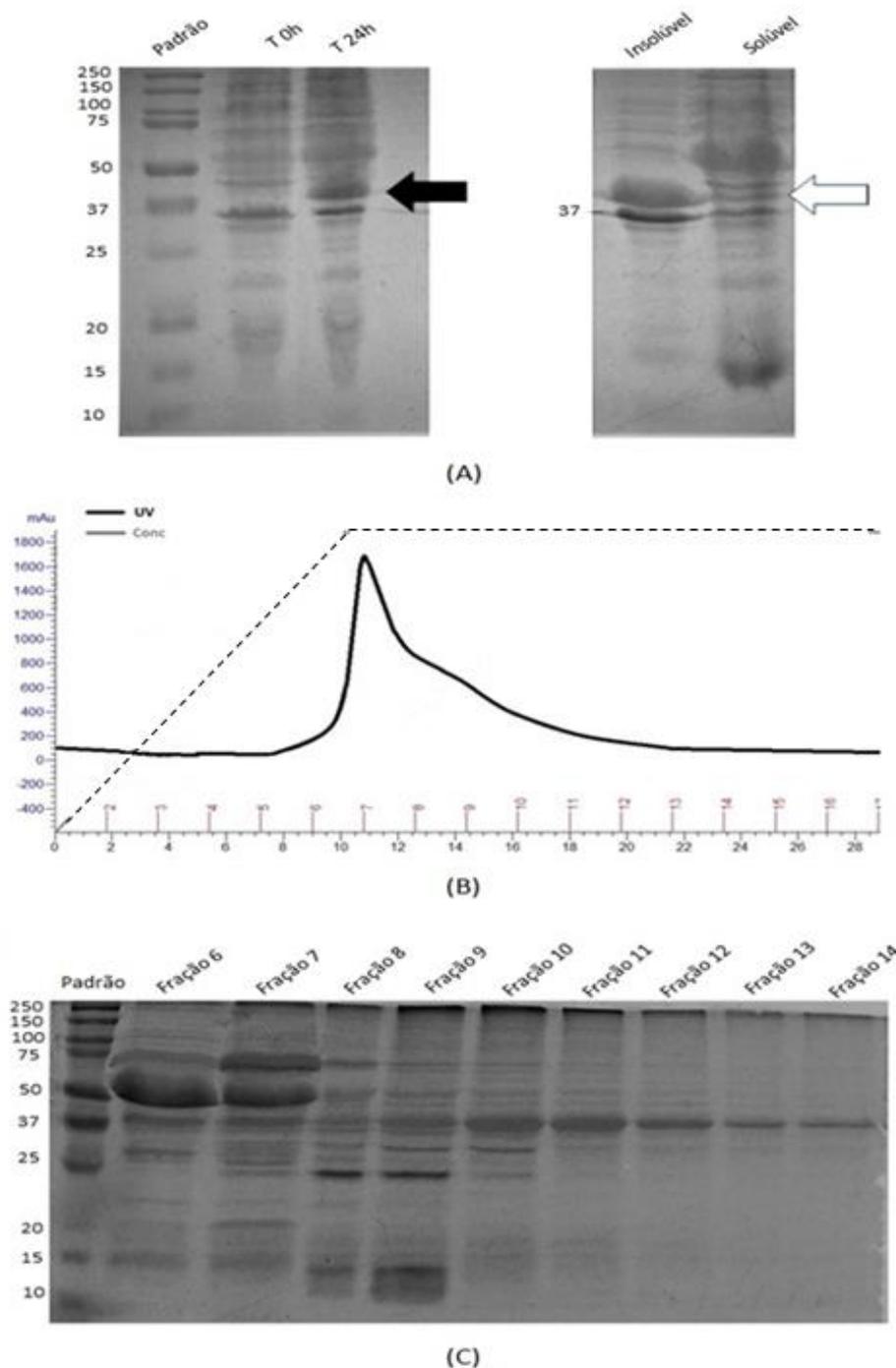
## 5.2. Avaliação da atividade da AsSMase D

Para confirmar se a AsSMase D possui atividade de esfingomielinase, a sequência de nucleotídeos que codifica a AsSMase D passou por uma otimização de códons para expressão em bactérias e foi clonada no vetor pET28a-TEV. A proteína recombinante, chamada de rAsSMase D, contém 354 aminoácidos, peso molecular estimado em 40,3 kDa e ponto isoeletrico de 9,04. O aumento do peso molecular se deve à presença de sequências extras do vetor, tais como a cauda de histidina, o sítio de clivagem da enzima TEV e o sítio de restrição da enzima NdeI (Fig. 15).



**Figura 15: Sequência de nucleotídeos e aminoácidos da proteína recombinante homóloga à AsSMase D.** Sequência traduzida a partir da sequência de nucleotídeos obtidos do transcriptoma salivar do *A. sculptum* após a clonagem em vetor pET28a-TEV. Em destaque as sequências da cauda de histidina e os sítio de clivagem da TEV e da enzima de restrição NdeI.

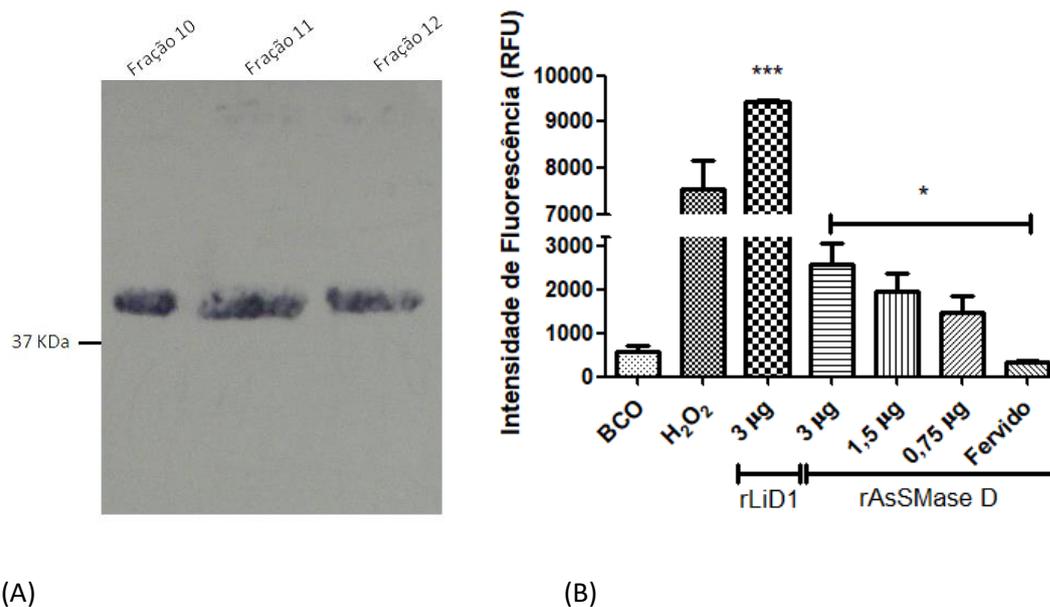
Para expressar a rAsSMase D, o plasmídeo construído foi transformado em bactérias da linhagem *Escherichia coli* ArcticExpress. Após a indução com IPTG pode-se observar a presença de uma proteína acima de 37 kDa, na fração solúvel da purificação (Fig. 16 A). A purificação da rAsSMase D foi realizada utilizando a coluna HisTrap HP Ni<sup>2+</sup> (GE Healthcare). A cromatografia de afinidade demonstra que a presença de proteínas ocorre nos intervalos entre as frações de 6 e 12 (Fig. 16 B). A eletroforese em gel de poliacrilamida demonstra a presença de uma proteína ligeiramente acima de 37 kDa, que nas frações iniciais se encontra misturada à outras proteínas de diferentes pesos moleculares (Fig. 16 C).



**Figura 16: Expressão e purificação da rAsMase D.** (A) T 0h: antes da indução com IPTG; T 24h: vinte e quatro horas após a indução com IPTG. Insolúvel: conteúdo presente no sedimento após a centrifugação do lisado bacteriano; Solúvel: conteúdo presente no sobrenadante após centrifugação do lisado bacteriano. A seta cheia indica a proteína recombinante 24 horas após a indução e após a lise bacteriana, seta vazia indicando a presença da proteína nas formas solúvel e insolúvel. (B) Perfil cromatográfico da purificação da rAsMase D da forma solúvel em coluna HisTrap HP  $\text{Ni}^{2+}$ . Linha cheia: Absorbância a 280 nm; linha tracejada: concentração do tampão de eluição. (C) SDS-PAGE das frações obtidas após a purificação das frações solúvel (Frações 6 a 14) Seta vazia indicando a proteína com peso molecular acima de 37kDa. As imagens (A) e (C) são de géis de poliacrilamida a 12% corados com comassie e nitrato de prata respectivamente.

A fim de confirmar a expressão da rAsSMase D, frações contendo as proteínas foram submetidas a Western blot utilizando como revelador anticorpos anti-cauda de histidina. Foi possível observar uma banda fortemente marcada com massa molecular ligeiramente superior a 37 KDa (Fig. 17 A), o que permite concluir que a proteína rAsSMase D, que teve a cauda de Histidina inserida na região N-terminal da sua sequência, foi corretamente expressa e purificada.

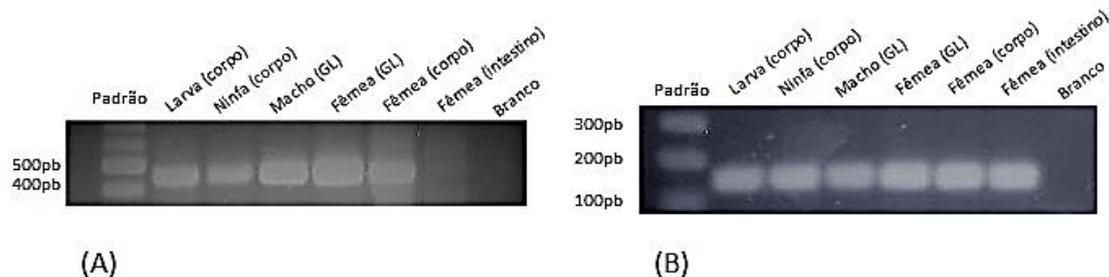
Após a expressão e a purificação da rAsSMase D, o próximo objetivo foi confirmar a atividade enzimática da proteína recombinante, para isso a rAsSMase D foi submetida a ensaios de atividade de esfingomielinase. Os resultados demonstram que a proteína recombinante foi capaz de clivar o substrato esfingomielina nas condições de pH 7,5 e presença de  $Mg^{2+}$ , indicando que ela é uma SMase D, se encontra na forma ativa e possui atividade dose-dependente. Na figura é possível observar que 3  $\mu g$  de proteína recombinante possui atividade enzimática maior que as outras concentrações da rAsSMase D testadas (1,5 e 0,75  $\mu g$ ), porém possui atividade 3,6 vezes menor que o controle positivo (LiD1), a SMase D recombinante obtida a partir do veneno de *L. intermedia*. Outro ponto observado é que quando a proteína recombinante foi submetida à fervura sua atividade enzimática reduziu consideravelmente, o que confirma a natureza proteica da rAsSMase D (Fig. 17 B).



**Figura 17: Confirmação da expressão e atividade da rAsSMase D.** (A) Western Blot com anticorpos anti-cauda de histidina e as frações da purificação. As frações foram incubadas com anticorpo Anti-polyHis demonstrando massa molecular de pouco mais de 37 kDa em cada uma das frações; (B) atividade enzimática da rAsSMase D (utilizando o kit Amplex Red Sphingomyelinase Assay – Invitrogen) com quantidades variadas ( $\mu\text{g}$ ) de rAsSMase D. Como controles positivos foram utilizados 3  $\mu\text{g}$  da recombinante da SMase D de *L. intermedia* (rLiD1) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Os dados estão representados pela média ( $n=6$  para 3  $\mu\text{g}$  de rAsSMase D,  $n=5$  para 1,5 e 0,75  $\mu\text{g}$  de rAsSMase D e  $n=3$  para 3  $\mu\text{g}$  de rAsSMase D fervido durante 20 minutos) (Kruskall-wallis, Dunn's,  $p < 0,05$ , \*\*\* diferença estatística com todos os grupos analisados, \* diferença estatística entre o grupo 3  $\mu\text{g}$  e o grupo fervido).

### 5.3. Caracterização da expressão da AsSMase D nos estágios de desenvolvimento e em tecidos do *A. sculptum*

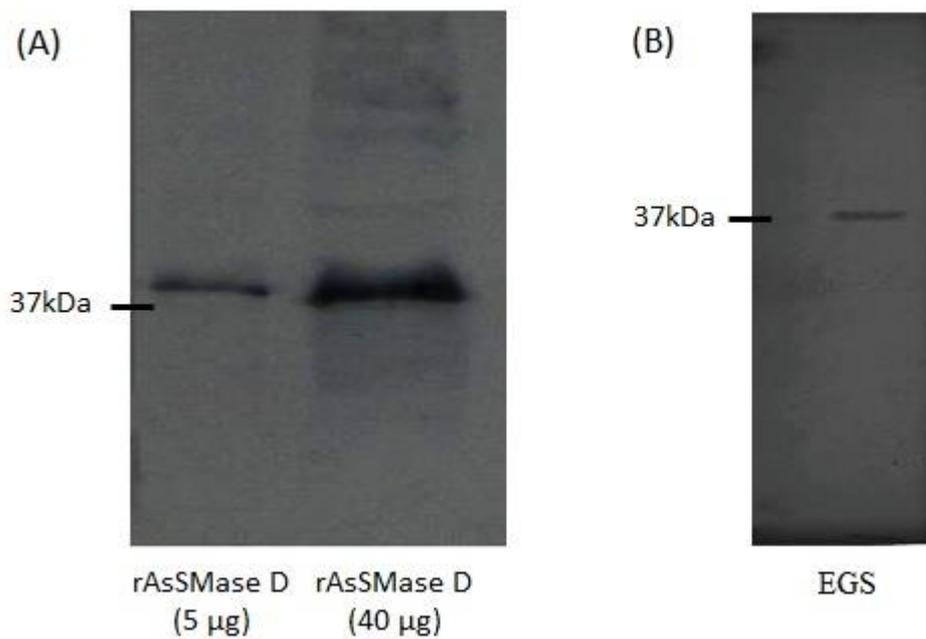
Após realizar PCR convencional, utilizando os cDNAs de glândula salivar e de corpo inteiro de *A. sculptum*, pode-se perceber a presença de transcritos que codificam a AsSMase D em todos os estágios de desenvolvimento do carrapato (larvas, ninfas e adultos machos e fêmeas) (Fig. 18 A). Na mesma figura é possível perceber também que a expressão da AsSMase D ocorre na glândula salivar e no corpo (sem glândula salivar e intestino) de fêmea do *A. sculptum*. No intestino não houve amplificação, demonstrando que a AsSMase D é produzida na glândula salivar.



**Figura 18: Expressão da AsSMase D em diferentes estágios e tecidos de *Amblyomma sculptum*.** (A) avaliação da presença de mRNAs codificantes da AsSMase D, produtos: 452 pares de base. (B) Reação feita utilizando iniciadores para Fator de Elongação, utilizado como controle interno da reação, produtos: 150 pares de base. Em (A) e (B) foram utilizados os cDNAs de corpo inteiro de larva e ninfa, glândula salivar de macho, glândula salivar de fêmea, corpo de fêmea e intestino de fêmea. Branco: ausência de cDNA.

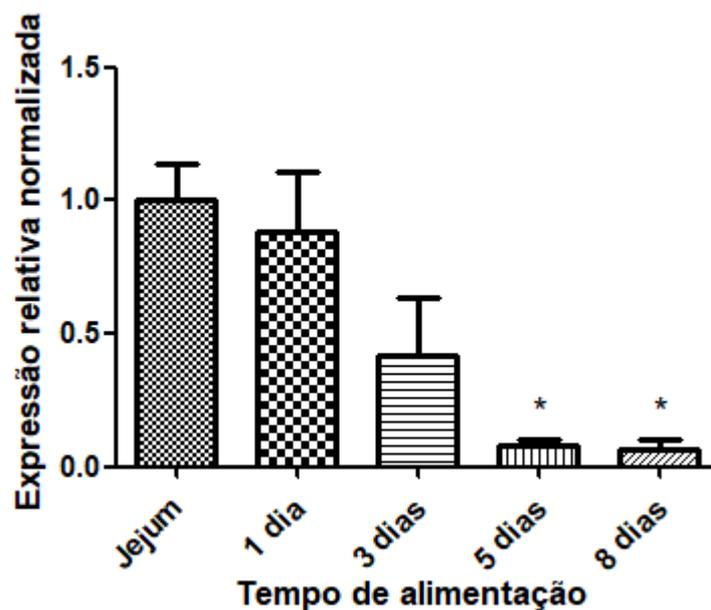
As PCRs confirmaram a expressão de mRNAs codificantes da SMase D na glândula salivar. Para analisar a presença da proteína nativa AsSMase D na glândula salivar, foram produzidos anticorpos contra a rAsSMase D. Para isto, foram realizadas imunizações em camundongos para produção de soro com anticorpos anti rAsSMase D. Após a coleta do soro foi realizado o Western blot utilizando duas concentrações diferentes da proteína recombinante. Foi possível perceber que os animais imunizados foram capazes de produzir anticorpos contra a proteína recombinante (Fig. 19A).

Uma vez produzidos os anticorpos anti-rAsSMase D, estes foram usados para avaliar a presença da AsSMase D na glândula salivar dos carrapatos. O EGS de fêmea de *A. sculptum* com um dia de alimentação foi submetido a SDS-PAGE, transferido para membrana de nitrocelulose e tratado com anticorpos anti-rAsSMase D. Os anticorpos foram capazes de reconhecer uma proteína com massa molecular próxima a 37 kDa, compatível com a AsSMase D nativa, confirmando que a proteína está presente nas glândulas salivares do *A. sculptum* (Fig. 19B).



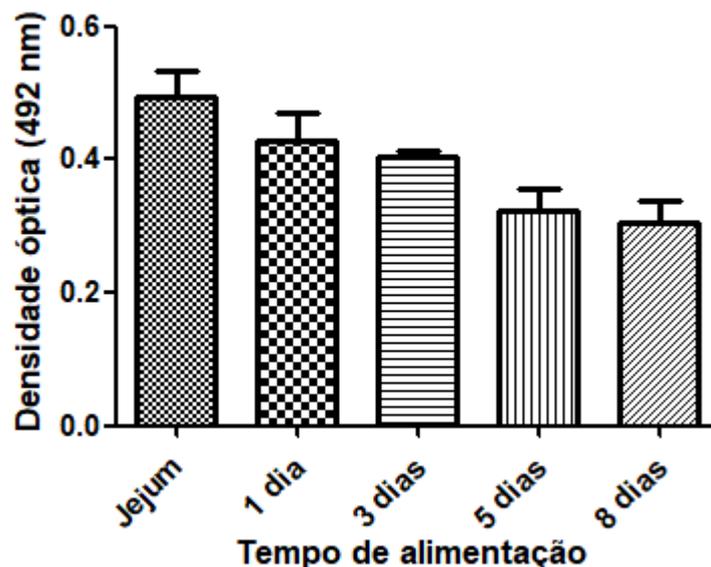
**Figura 19: Western Blot para confirmação da produção de anticorpos anti-rAsSMase D por camundongos e presença da AsSMase D na glândula salivar de *A. sculptum*.** Em (A) foram utilizados 5µg e 40 µg de proteína recombinante e o soro de camundongos imunizados com a rAsSMase D. Em (B) foi utilizado o extrato de uma glândula salivar de *A. sculptum* com 1 dia de alimentação. Em ambas as membranas é possível visualizar a proteína acima do padrão de peso molecular 37 kDa.

Análises utilizando PCR quantitativo mostraram que a expressão dos transcritos que codificam a AsSMase D acontece em todos os tempos de alimentação, porém essa expressão se apresenta maior na glândula salivar de carrapatos em jejum e no início da alimentação (1 dia). Percebe-se também que ao longo da hematofagia essa expressão reduz gradualmente, sendo essa queda mais significativa em carrapatos com 5 e 8 dias, cerca de 14 vezes menor do que quando em jejum (Fig. 20).



**Figura 20: Expressão relativa de transcritos codificantes da AsASMase D.** Expressão normalizada pelo transcrito Fator de Elongação que foi utilizado como controle da reação. Reações feitas com cDNAs de glândula salivar de fêmeas de *A. sculptum* em jejum, 1 dia, 3 dias, 5 dias e 8 dias de alimentação. Os dados estão representados pela mediana (n=8 para os grupos jejum e 1 dia; n=3 para 3 e 8 dias, e n=4 para 5 dias).\* Kruskal-Wallis, Dunn's,  $p < 0,05$  \* diferença estatística em relação ao grupo jejum).

Um ensaio de ELISA também foi realizado a fim de avaliar a presença da AsSMase D nativa no EGS de fêmeas de vários tempos de alimentação (Fig. 21). Para isso, foi utilizado o soro de camundongos imunizados com a rAsSMase D. Os resultados corroboraram os achados da qPCR e demonstram que os anticorpos foram capazes de reconhecer epítopos, principalmente nos EGSs de carrapatos em jejum, de 1 dia e 3 dias, sendo que esse reconhecimento tende a diminuir nos EGSs de carrapatos com 5 e 8 dias de alimentação.

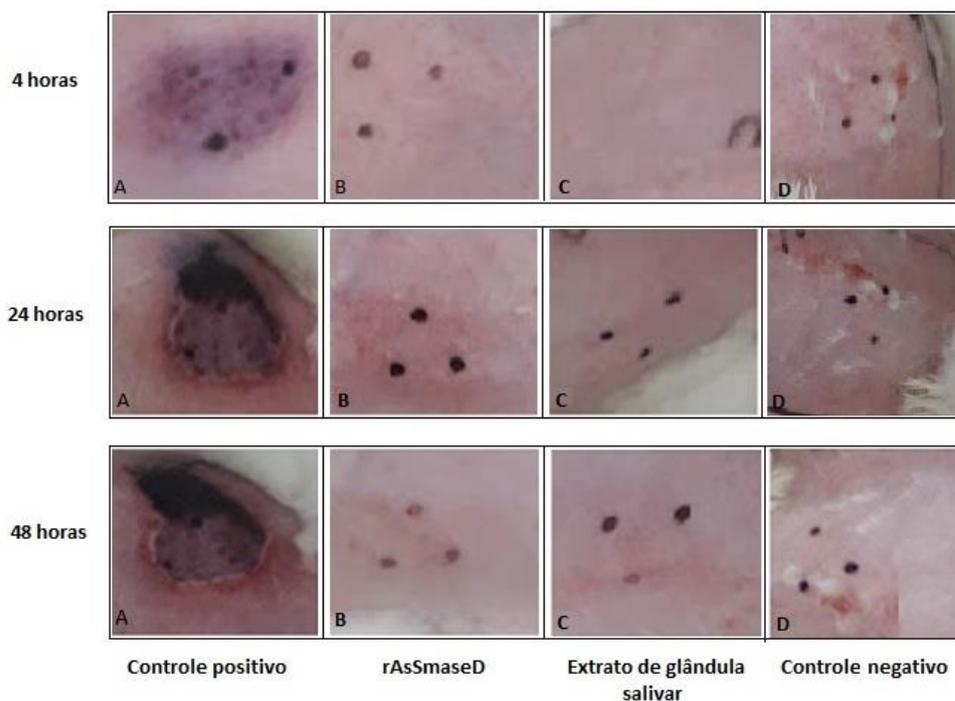


**Figura 21: Ensaio de ELISA em vários tempos de alimentação do carrapato.** Para o ensaio foram utilizados 1  $\mu\text{g}$  de proteínas totais do EGS de fêmeas em vários tempos de alimentação. Diluição do soro 1:160. Os dados estão representados pela média (n=4 para os grupos jejum, 1 dia, 3 dias e 5 dias; n=3 para 8 dias).

#### 5.4. Caracterização funcional da AsSMase D

##### 5.4.1. Avaliação da atividade dermonecrótica da rAsSMase D *in vivo*

Devido ao fato da SMase D de *Loxosceles intermedia* (LiD1) pertencer ao grupo de proteínas demonecróticas, objetivou-se avaliar a existência de potencial dermonecrótico da rAsSMase D. O principal fato que levou a avaliar essa hipótese é a semelhança entre as duas sequências sobretudo quanto à presença de todos os aminoácidos responsáveis pela atividade dermonecrótica da LiD1 também na AsSMase D. Foi possível perceber que a rLiD1 foi capaz de causar uma lesão dermonecrótica e edema após 24 horas de sua injeção, se tornando mais extensa após 48 horas. A lesão é caracterizada pela presença de um tecido isquêmico e necrótico cercado pelo eritema no ponto da injeção, sendo que a lesão foi se disseminando por gravidade, se tornando cada vez maior ao longo do tempo de avaliação (Fig. 22 A). Entretanto, ao se avaliar o ponto de injeção da rAsSMase D foi possível perceber apenas uma pequena alteração com a formação de um leve eritema, após 24 horas da inoculação da rAsSMase D, que diminuiu com 48 horas, sem evidenciar a formação de dermonecrose (Fig. 22 B). Após a inoculação do EGS e do tampão não foi observada nenhuma alteração (Fig. 22 C e D).



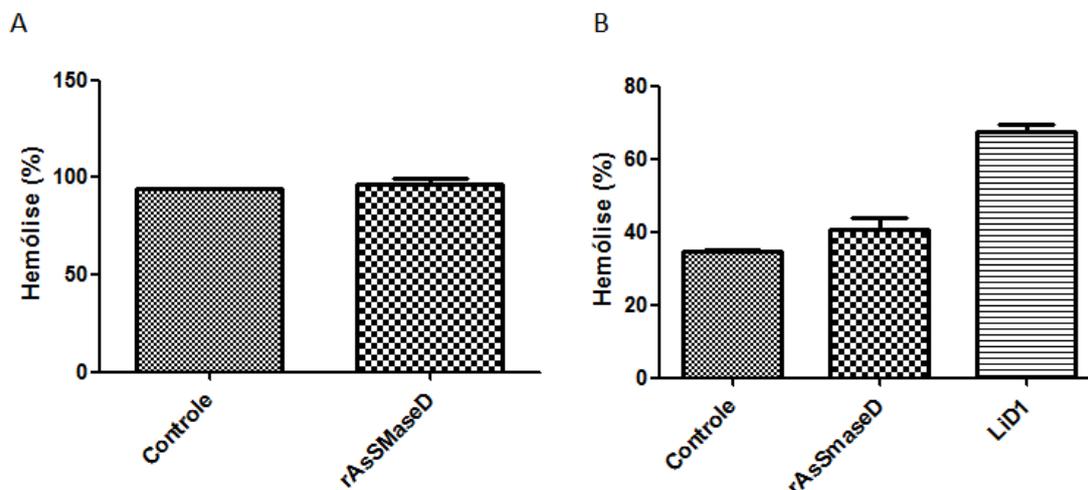
**Figura 22: Avaliação da atividade dermonecrótica da rAsSMase D em coelhos.** (A) Controle positivo - Injeção de 2,5  $\mu\text{g}$  de SMase D recombinante de *Loxosceles intermedia* (rLiD1). (B) Injeção de 6  $\mu\text{g}$  de rAsSMase D. (C) Injeção de 16  $\mu\text{g}$  de extrato de glândula salivar de fêmeas com 3 dias de alimentação. (D) Controle negativo - tampão (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 50 mM NaCl, 5 mM  $\text{MgSO}_4$ ) usado na diluição da rAsSMase D. Os tempos de observação foram 4, 24 e 48h após as inoculações. As marcações em pontos pretos indicam o local de formação da pápula após a injeção intradérmica.

#### 5.4.2. Avaliação do efeito da rAsSMase D sobre processos biológicos

Na tentativa de identificar possíveis funções, a rAsSMase D foi submetida a diferentes ensaios biológicos, dentre eles a hemólise mediada pela via alternativa da cascata do complemento, a agregação plaquetária de plasma rico em plaquetas e o tempo de recalcificação de plasma citratado. Estes ensaios nos permitiram avaliar o efeito sobre o sistema complemento, a agregação plaquetária e a coagulação sanguínea.

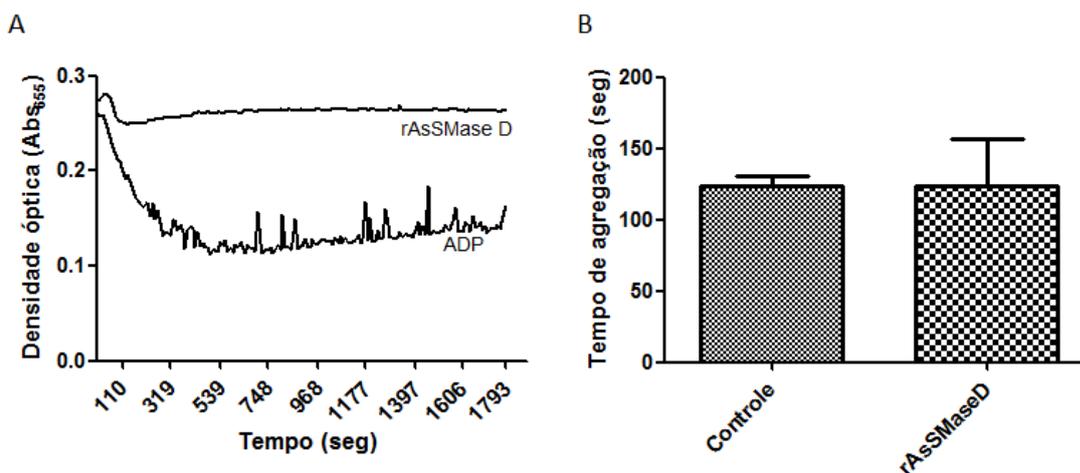
Para avaliar o efeito sobre o sistema complemento, dois parâmetros foram avaliados, a possível inibição da cascata e o possível efeito na ativação, ambos na via alternativa. Os resultados mostraram que a rAsSMase D não possui atividade inibidora sobre a via alternativa do sistema complemento (Fig. 23A), porém foi capaz de aumentar sua ação (Fig. 23B). A cascata do complemento na presença da rAsSMase D, avaliada após 60 minutos da ativação, elevou a hemólise em aproximadamente 17%,

assim como na presença da LiD1 (usada como controle positivo) que elevou a hemólise em 94%.



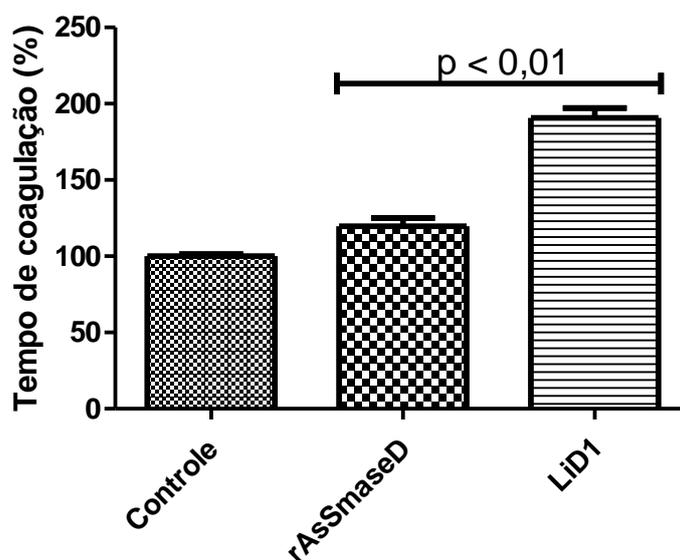
**Figura 23: Ação da rAsSMase D sobre a via alternativa do sistema complemento humano.** (A) Ação inibitória sobre a via alternativa; (B) Ação ativadora sobre a via alternativa. Nas amostras controle foi usado apenas tampão.

A ação da rAsSMase D sobre a agregação plaquetária também foi avaliada. Os resultados mostraram que a rAsSMase D não foi capaz de ativar a agregação plaquetária (Fig. 24A), nem de inibir a agregação plaquetária induzida por ADP (Fig 24B).



**Figura 24: Ação da rAsSMase sobre a agregação plaquetária.** (A) 1  $\mu$ g de rAsSMase D e 5  $\mu$ M de ADP foram utilizados como ativadores; (B) 5  $\mu$ M de ADP foram utilizados como ativadores em ambas amostras que continham apenas tampão (controle) ou 1  $\mu$ g de rAsSMase D.

Ao avaliar o efeito sobre a cascata da coagulação, foi observado que ambas SMases D foram capazes de retardar significativamente ( $p < 0,01$ ) a coagulação do plasma, porém o aumento no tempo de coagulação foi de 19,6% para a rAsSMase D e de 90,7% para a LiD1 (Fig. 25).

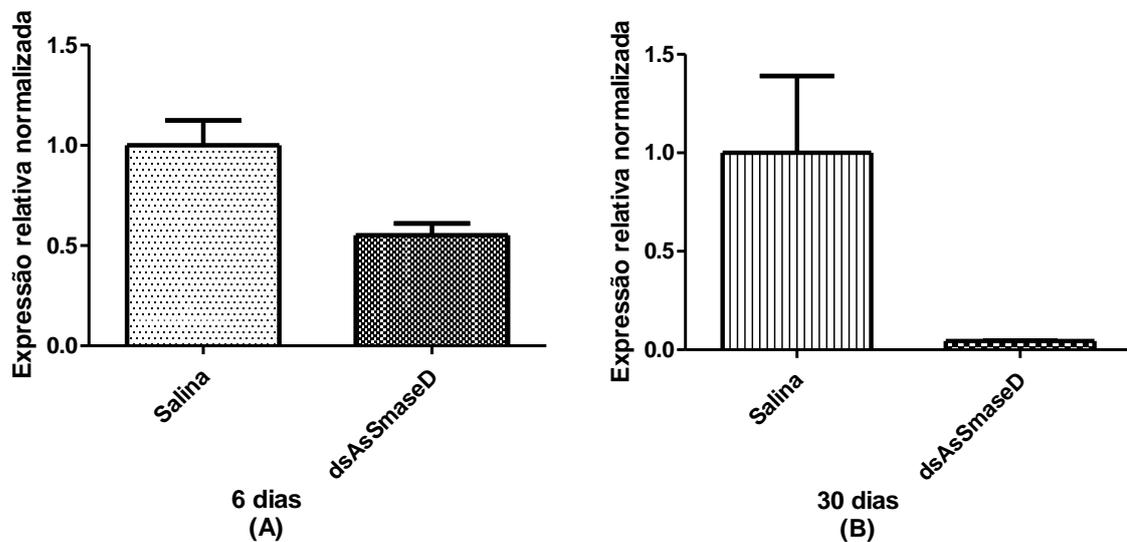


**Figura 25: Ação da rAsSMase sobre a cascata da coagulação.** No controle foi usado apenas tampão e nas amostras teste foram usados 1  $\mu\text{g}$  de rAsSMase D ou rLiD1 (ANOVA, Dunnet).

#### 5.4.3. Avaliação da influência da AsSMase D na hematofagia de carrapatos

Na tentativa de identificar o papel da AsSMase D durante a hematofagia, fêmeas de *A. sculptum* tiveram o mRNA codificante da AsSMase D silenciado por RNAi, em seguida foram alimentados em camundongos e tiveram alguns parâmetros alimentares avaliados. As análises utilizando qPCR demonstraram que foi possível reduzir os níveis de mRNA codificantes da AsSMase D na glândula salivar de fêmeas em jejum. Na figura 26 é possível observar que após 6 dias da injeção do dsRNA, a produção do mRNA codificante foi reduzida pela metade, quando comparado ao controle feito com salina 0,9% (Fig. 26 A). Aos 30 dias após o silenciamento, foi possível observar que os níveis de mRNA da AsSMase D foram reduzidos em cerca de 14 vezes em relação ao controle (Fig. 26 B). Portanto, uma redução mais expressiva na produção de mRNA

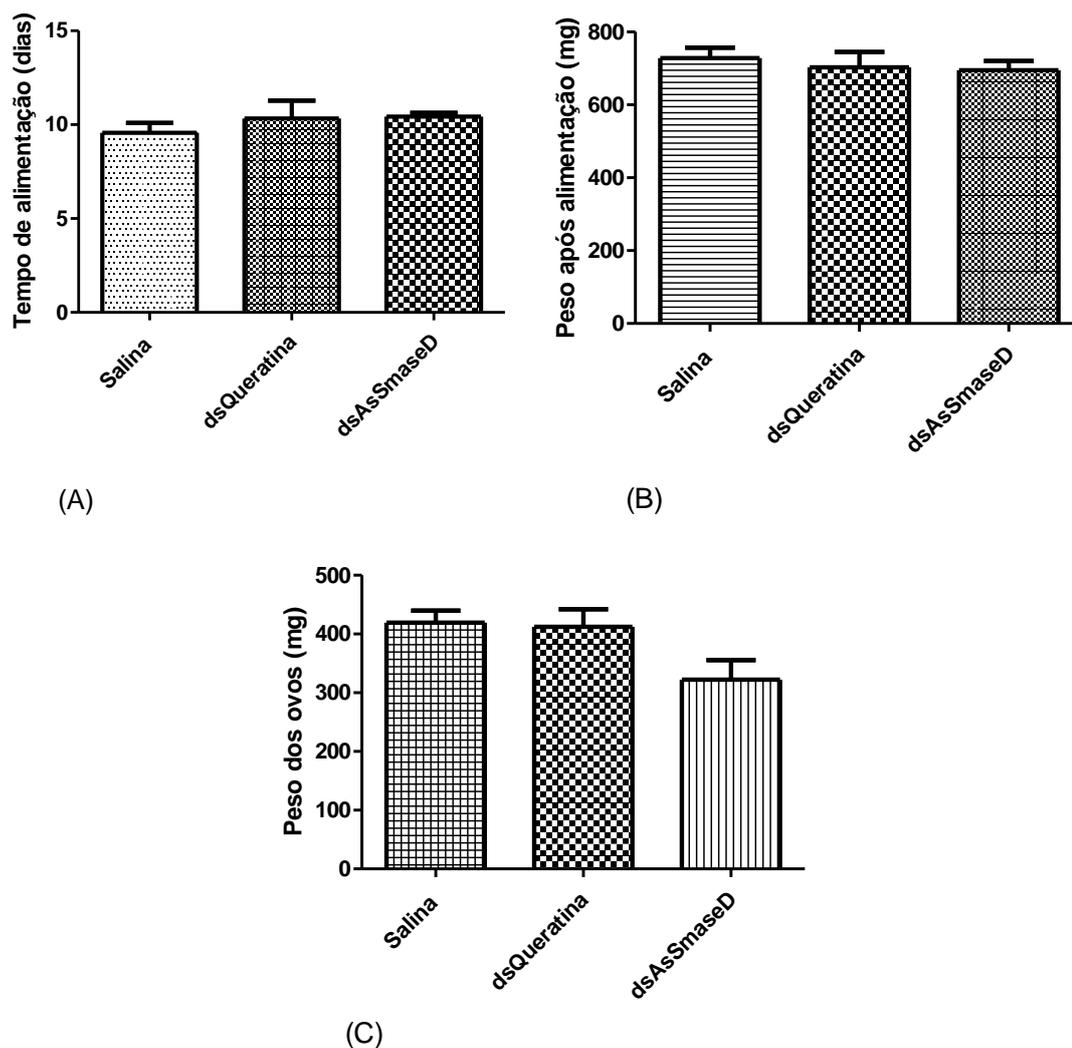
codificante da AsSMase D na glândula salivar dos carrapatos somente é obtida após um período de 30 dias após a indução do RNAi.



**Figura 26: Avaliação do silenciamento da AsSMase D na glândula salivar de *A. sculptum*.** (A) 6 dias e (B) 30 dias após a injeção de 4  $\mu$ g de dsRNA (n= 3 para controle e silenciado após 6 dias e n= 2 para controle e silenciado após 30 dias).

Ao observar que os níveis de mRNA codificantes da AsSMase D foram reduzidos na glândula salivar de *A. sculptum*, fêmeas do carrapato foram novamente injetadas com 4  $\mu$ g dsRNA e após 30 dias foram colocadas para alimentar em camundongos. Os parâmetros alimentares observados foram: tempo de alimentação, peso após a alimentação e peso dos ovos.

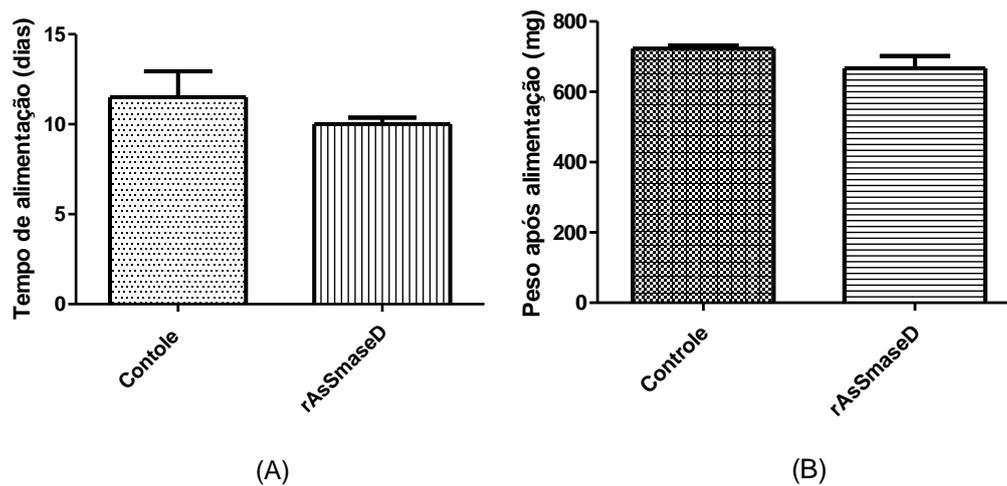
A caracterização funcional da AsSMase D através do silenciamento objetivou avaliar se a ausência da enzima na glândula salivar interfere no comportamento alimentar do carrapato. Em todos os grupos utilizados o tempo de alimentação, que é o tempo em que a fêmea permanece fixa ao hospedeiro se alimentando, o peso após a alimentação e o peso da oviposição não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre o grupo injetado com dsRNA da AsSMase D e os grupos controle, demonstrando que a ausência da AsSMase D na glândula salivar de fêmeas de *A. sculptum* não interferiu no comportamento alimentar dessas fêmeas (Figs. 27 A, B e C).



**Figura 27: Comportamento alimentar de fêmeas de *A. sculptum* com níveis reduzidos de AsSMase D na glândula salivar.** (A) Tempo de alimentação (dias); (B) Peso após a alimentação (mg); (C) Peso da oviposição (mg). Os dados estão representados pela média (n= 6 para todos os grupos).

#### 5.4.4. Avaliação do comportamento alimentar de *A. sculptum* ao realizar hematofagia em hospedeiros previamente imunizados com a rAsSMase D.

Após a imunização de um grupo de 10 camundongos *Swiss*, cada camundongo foi infestado com um casal de *A. sculptum*. Os parâmetros alimentares observados foram o tempo de alimentação e peso após a alimentação. Nos gráficos da figura 28 é possível observar que o tempo de alimentação (Fig. 28 A) e o peso após alimentação (Fig. 28 B) não apresentaram diferença estatística ( $p < 0,05$ ), quando comparados ao grupo controle.



**Figura 28: Comportamento alimentar de fêmeas de *A. sculptum* alimentadas em hospedeiros imunizados com a rAsMase D.** (A) Tempo de alimentação (dias); (B) Peso após a alimentação (mg). Grupo controle imunizado com adjuvante AIOH. Os dados estão representados pela média (n = 4 para grupo controle e n = 9 para grupo imunizado).

## 6. Discussão

### 6.1. Identificação e caracterização estrutural de esfingomielinases salivares de *A. sculptum*

O primeiro objetivo do trabalho foi investigar a presença de esfingomielinases (SMases) na glândula salivar do carrapato *A. sculptum*. Como esperado, o EGS de fêmeas possui a capacidade de degradar a esfingomielina indicando a presença de pelo menos uma SMase na glândula salivar do carrapato.

Na tentativa de identificar a sequência da proteína ativa, foram realizadas buscas por sequências de SMases nos bancos de dados de sequências salivares de *A. sculptum*. As análises feitas através do BLAST utilizando a sequência da SMase D de *L. laeta* (1XX1\_A) no transcriptoma de *A. sculptum*, produzido pelo LFIH, revelaram a presença de apenas uma sequência. A sequência apresentou baixa identidade (40%), porém demonstrou um valor esperado muito baixo e características estruturais (como a presença dos aminoácidos responsáveis pela atividade enzimática e os de coordenação do íon  $Mg^{2+}$ ) que caracterizam a sequência encontrada como SMase D, sendo denominada AsSMase D. O alinhamento da AsSMase D com esfingomielinases de outras classes indicou baixa identidade (veja alinhamento com uma SMase ácida de mamíferos no anexo 2) e confirma sua alta identidade com as SMases D.

A AsSMase D possui características semelhantes quando comparadas às SMases D de artrópodes. Em geral, as SMases D de aranhas possuem massa molecular variando entre 30 a 35 kDa (Felicori et al., 2006; Murakami et al., 2005; Tambourgi et al., 1998; Van Meeteren et al., 2004), mas as de carrapatos aparentemente possuem as massas moleculares maiores, como as SMases D encontradas no *A. sculptum* e no *I. scapularis* que apresentaram 37,8 e 39,7 kDa, respectivamente (Alarcon-Chaidez et al., 2009). O alinhamento entre as sequências da IsSMase e a LiD1, que é a SMase D da *Loxosceles intermedia*, revelou a presença dos resíduos catalíticos envolvidos na atividade enzimática conservados em ambas sequências (Alarcon-Chaidez et al., 2009; Dias-Lopes et al., 2013), assim como no presente trabalho, quando o alinhamento entre as sequências da AsSMase D e a 1XX1\_A foi realizado. Além disso, a sequência de *A. sculptum* apresentou o domínio GDPD\_SF, que é característico de SMases D e também está presente nas SMases D de aranhas do gênero *Loxosceles* e na IsSMase (Alarcon-Chaidez et al., 2009; Dias-Lopes et al., 2013; Murakami et al., 2006).

A busca em outros bancos de dados de sequências depositadas no NCBI identificou outras oito sequências semelhantes às SMases D expressas na glândula salivar de *A. sculptum*. Os alinhamentos feitos entre as sequências indicam que elas podem ser de isoformas da AsSMase D pois elas apresentam os aminoácidos conservados característicos das SMases D (algumas por estarem incompletas não possuem alguns aminoácidos) e o domínio GDPD\_SF.

A presença de isoformas de SMases D já foi descrita para aranhas. Alguns trabalhos utilizando o veneno de aranhas demonstraram que algumas espécies de *Loxosceles* possuem diferentes isoformas de SMases D (11 e 14 diferentes isoformas em *L. gaucha* e *L. intermedia*, respectivamente) (Gremski et al., 2010; Kalapothakis et al., 2007; Machado et al., 2005; Tambourgi et al., 2010). Foi visto também que essas isoformas encontradas no veneno de aranhas possuem os aminoácidos do sítio catalítico, responsáveis pela atividade enzimática e pela coordenação do íon  $Mg^{2+}$ , altamente conservados (Chaim et al., 2006; Kalapothakis et al., 2007).

A expressão de sequências de mRNA na glândula salivar de carrapatos que codificam SMases D é um achado comum. A partir de pesquisas utilizando a sequência da AsSMase D em bancos de dados (Transcriptome Shotgun Assembly – TSA, Ixodidae - Taxid: 6939), foi possível identificar SMases D em pelo menos cinco outras espécies de carrapatos (*Rhipicephalus annulatus*; *R. pulchellus*; *R. zambeziensis*; *Dermacentor variabilis* e *Ixodes ricinus*). Soma-se a isso trabalhos de que descreveram a presença de SMases D em espécies de carrapatos como o *Ixodes scapularis*, no qual a IsSMase foi identificada e submetida a estudos funcionais, e em *A. maculatum*. *R. microplus* e *R. appendiculatus*, no qual análises *in silico* identificaram a presença de SMases D (Alarcon-Chaidez et al., 2009; Dias-Lopes et al., 2013) na glândula salivar desses carrapatos.

Para confirmar se a sequência identificada (AsSMase D) possui atividade de esfingomielinase, uma proteína recombinante homóloga à AsSMase D foi produzida e sua atividade foi analisada através de um ensaio enzimático *in vitro*. Para a produção da proteína recombinante (rAsSMase D) a proteína madura (AsSMase D) foi submetida à otimização de códons e sua clonagem no vetor pET28a-TEV acabou por inserir algumas sequências pertencentes a ele. Isso fez com que a rAsSMase D e a AsSMase D possuam massas moleculares diferentes (40,3 e 37,8 kDa respectivamente) o que justifica a rAsSMase D se apresentar acima do padrão de peso molecular de 37 kDa em géis de poliacrilamida e no Western blot. Após a expressão da rAsSMase D e da lise bacteriana

observou-se que a proteína estava presente tanto na forma solúvel quanto insolúvel. A presença da proteína em sua forma nativa, ou seja, solúvel, foi de grande importância, pois, para confirmar a presença de atividade enzimática seria necessário que a proteína obtida estivesse em sua estrutura funcional correta. Após a purificação da rAsSMase D ela foi submetida ao Western blot que confirmou a inserção correta da cauda de histidina e que a purificação isolou a rAsSMase D do cultivo bacteriano.

A rAsSMase D foi submetida ao ensaio de atividade enzimática e foi possível observar atividade de esfingomielinase, confirmando que a AsSMase D é uma esfingomielinase salivar do *A. sculptum*. Os dados de atividade mostraram ainda que 3 µg de proteína recombinante geraram aproximadamente 2500 RFU no ensaio realizado (momento da leitura da fluorescência: após 30 minutos de incubação). Ao comparar essa atividade com a apresentada por 3 µg de proteína ao controle positivo usado (rLiD1) foi evidente que, na mesma quantidade, a SMase D de *L. intermedia* apresentou atividade consideravelmente maior que a rAsSMase D. Esse resultado pode indicar que as SMases D, presentes na saliva de carrapatos, podem possuir menores atividades enzimáticas quando comparadas às SMases D de aranhas e de algumas espécies de bactérias.

Outros fatores podem estar relacionados ao baixo desempenho demonstrado pela rAsSMase D. Um deles poderia se dar ao fato da presença de proteínas bacterianas contaminantes nas frações utilizadas nos ensaios. Ao analisar o SDS-PAGE das frações obtidas durante a purificação da rAsSMase D foi possível perceber a presença de uma pequena quantidade de proteínas bacterianas, mesmo nas frações mais puras. Isso faz com que haja uma superestimativa da quantidade de SMase D nas amostras e, portanto, ocasionam a adição de quantidades menores de rAsSMase D no ensaio, quando comparado às quantidades adicionadas da LiD1.

Além disso, é possível que algumas proteínas, após a expressão, não se encontrem corretamente enoveladas o que acabaria por afetar sua atividade. Outro fator observado foi que a rAsSMase é extremamente lábil e perde sua atividade em poucos dias ao ser armazenada tanto em 4 quanto -20°C. Outra possibilidade poderia ser a necessidade de algumas modificações pós tradução e, por ter sido utilizado bactérias na produção da proteína recombinante, essas modificações, que poderiam ser importantes para a atividade enzimática, não ocorreram. Mesmo assim, é importante ressaltar que a rAsSMase D é uma esfingomielinase e que possui atividade enzimática marcante.

## 6.2. Caracterização da cinética de expressão da AsSMase D

Com o objetivo de caracterizar a expressão da AsSMase D pelo *A. sculptum*, foi avaliado em quais tecidos da fêmea do carrapato a proteína é expressa. Os resultados permitem afirmar que ela é expressa na glândula salivar, não sendo expressa no intestino. Além do intestino e da glândula salivar, uma amostra de corpo inteiro, sem a glândula salivar, também foi submetida à avaliação pelo PCR convencional para avaliar a expressão da AsSMase D. Porém, as glândulas salivares do carrapato, que são estruturas pares e são formadas por inúmeros ácinos (responsáveis pela excreção e secreção de saliva), se estendem ao longo da cavidade corpórea do carrapato e dessa forma, dificulta sua remoção completa. Por esse motivo não foi possível afirmar que outros tecidos não produzam AsSMase D. Entretanto, não há relatos da produção da SMase D em outros tecidos de artrópodes, diferentes da glândula salivar de carrapatos e da glândula produtora de veneno das aranhas (Alarcon-Chaidez, 2013b; Binford et al., 2009, 2005; Fernandes Pedrosa et al., 2002; Karim et al., 2011; Tan et al., 2015). Novos experimentos devem ser realizados com outros tecidos isoladamente, como por exemplo o corpo gorduroso, túbulos de Malpighi, útero, ovários e órgão de Gené, entre outros.

Para avaliar a expressão da AsSMase D nos estágios de desenvolvimento do *A. sculptum*, foram realizadas PCRs em tecidos de machos, ninfas e larvas. Os resultados demonstraram a presença de mRNAs da enzima em todos os estágios testados. Em machos, o tecido utilizado foi a glândula salivar e a PCR confirma a expressão nesse tecido. Em larvas e ninfas, devido ao seu tamanho diminuto e a grande dificuldade do isolamento das glândulas salivares de forma satisfatória (i.e., sem contaminação com outros tecidos), foram utilizados o corpo inteiro na avaliação pela PCR. A expressão em todos os estágios de desenvolvimento indica que esta é uma proteína importante para os carrapatos e que deve estar presente em diferentes momentos de seu desenvolvimento.

Todos os resultados obtidos até então, confirmaram a presença da AsSMase D através de análises *in silico* ou de sequência de mRNA. Para a confirmação da presença da proteína na glândula salivar do carrapato, o EGS de fêmeas com 1 dia de alimentação foi submetido ao Western blot, utilizando anticorpos anti-rAsSMase D. O resultado demonstra que a proteína está presente na glândula salivar do carrapato. É possível notar que apenas uma proteína, de massa molecular próxima de 37 kDa, foi detectada. Isso vai de acordo com a massa molecular estimada da AsSMase D de 37,8 kDa. Ao avaliar as massas moleculares das outras sequências de SMases D (que variaram de 7,7 a 28,5

kDa), encontradas no transcriptoma salivar de *A. sculptum* produzido pelo LFIH, percebe-se que são diferentes quando comparadas à AsSMase D. A presença de uma única proteína marcada no Western blot sugere que os anticorpos produzidos com a rAsSMase D são específicos para a AsSMase D ou que apenas isoformas de AsSMase D com massa molecular idêntica são expressas na glândula salivar do *A. sculptum*.

Os níveis de expressão da AsSMase D ao longo da alimentação foram avaliados utilizando duas técnicas diferentes, qPCR e ELISA, que avaliam os níveis de mRNA codificantes e da própria AsSMase D, respectivamente. Os resultados obtidos com as duas técnicas foram concordantes, em ambos as quantidades caem ao longo da alimentação, sendo essa queda maior no final da alimentação.

Os dados da qPCR mostraram que a redução dos níveis de mRNA é mais rápida e drástica que a redução dos níveis de AsSMase D. Isso pode ser explicado através da relação entre a produção e degradação das moléculas, uma vez que os mRNAs são menos estáveis que as proteínas. Sabe-se que a meia-vida de mRNAs pode durar minutos, sendo que a meia-vida de proteínas pode chegar até alguns dias (Vogel and Marcotte, 2012)

Ao se avaliar a fisiologia da hematofagia dos carrapatos é importante observar que os carrapatos, ao iniciarem a alimentação, penetram as peças bucais na pele do hospedeiro e logo em seguida iniciam a formação de um poço alimentar. A formação desse poço é feito com o auxílio de moléculas salivares e com o mecanismo físico de dilaceração tecidual causado pelas quelíceras (Alarcon-Chaidez, 2013a; Ribeiro et al., 2006). Visto que as SMases D são enzimas que atuam nas esfingomielinas, e estas estão presentes nas membranas celulares (Dias-Lopes et al., 2013; Kalapothakis et al., 2002), as SMases presentes na saliva, como a AsSMase D, poderiam ser úteis na formação do poço alimentar e atuariam juntamente com as quelíceras, no local de fixação das peças bucais.

Já é conhecido que a glândula salivar de carrapatos possui perfis proteicos diferentes ao longo do período de hematofagia. Esteves et al., (2017) compararam transcriptomas de glândulas salivares de *A. sculptum* não alimentados e parcialmente alimentados (72 horas de alimentação) e demonstraram que alguns transcritos só foram identificados em um dos tempos de alimentação, sendo a maior quantidade detectada exclusivamente no sialotranscriptoma de carrapatos com 72 horas de alimentação. Portanto, a expressão da AsSMase somente no início da alimentação está coerente com

a fisiologia da glândula salivar descrita em trabalhos anteriores (Esteves et al., 2017; Garcia et al., 2014; Moreira et al., 2017).

Uma contradição que deve ser comentada, é que tanto o qPCR quanto o ELISA demonstraram que um pico de expressão da AsSMase D no início da alimentação com queda ao longo da alimentação. Esses achados contradizem os resultados apresentados no gráfico de atividade enzimática da SMase presente no EGS de carrapatos em diferentes dias de alimentação (Figura 10).

Uma das hipóteses que explicaria essa diferença seria a existência de outras SMases na glândula salivar do *A. sculptum*, principalmente no momento final da alimentação, e que também realizariam a atividade enzimática de quebra do substrato esfingomiéline que está presente na reação. Um resultado que concorda com essa hipótese é o apresentado pela figura 12, que demonstra o alinhamento de possíveis sequências de SMases D encontradas em bancos de dados de *A. sculptum*. Nesse alinhamento foi possível perceber a existência de sequências que possuem os aminoácidos catalíticos característicos das SMases D conservados.

Outra hipótese levantada para explicar a alta atividade enzimática no final do período de alimentação seria o fato de o EGS possuir outras enzimas, como, por exemplo, outras fosfodiesterases produzidas pela glândula salivar (Garcia et al., 2014; Moreira et al., 2017), que também poderiam ter clivado esfingomiéline.

### **6.3. Caracterização funcional da AsSMase D**

Na tentativa de identificar uma função da AsSMase D para os carrapatos, ensaios funcionais foram realizados. O primeiro deles foi o de dermonecrose. Como já dito anteriormente, o veneno de aranhas do gênero *Loxocles* possui uma alta atividade dermonecrótica, causada pelas SMases D presentes nesses venenos (Binford et al., 2005; Murakami et al., 2005; Tambourgi et al., 1998). A atividade dermonecrótica causada pela rAsSMase D foi testada em coelho e os resultados demonstraram que a enzima, em sua forma recombinante, não foi capaz de causar dermonecrose, assim como o EGS desses carrapatos. O que foi diferente do apresentado pela rLiD1, que causou edema e uma intensa necrose no local de inoculação, que foi evoluindo ao longo do período de observação (48 horas).

Alarcon-Chaidez et al., (2009) também observaram a ausência de dermonecrose ao inocularem a IsSMase em coelhos. Foi observado que a injeção de 5 µg da IsSMase

não foi capaz de produzir alterações cutâneas visivelmente detectáveis, sugerindo pequena ou nenhuma atividade dermonecrótica. Os achados, tanto os da rAsSMase D quanto da IsSMase recombinante são justificáveis, uma vez que, uma lesão necrosante no local de alimentação não seria interessante para o carrapato, pois além de dificultar sua fixação, pode tornar o local propício para a ocorrência de infecções bacterianas secundárias, prejudicando a alimentação dos carrapatos. Além disso a dor causada pela formação da ferida facilitaria a percepção do carrapato pelo hospedeiro durante o parasitismo e poderia levar a uma retirada mecânica do carrapato via “*grooming*” (Alarcon-Chaidez et al., 2009; Ribeiro et al., 1985).

Na tentativa de identificar atividades da AsSMase D que possam ser vantajosas para a hematofagia ou desenvolvimento do carrapato, a rAsSMase D foi submetida a diferentes ensaios biológicos. Inicialmente, é importante frisar que todos os experimentos realizados ainda são preliminares e serão repetidos utilizando novos controles e diferentes concentrações de rAsSMase D, a fim de confirmar as atividades observadas.

Os resultados mostraram que a rAsSMase D não foi capaz de inibir a ativação da via alternativa do sistema complemento, mas, pelo contrário, aumenta a hemólise. Esse resultado corrobora a literatura já que trabalhos anteriores já demonstraram que a rLiD1 é capaz de ativar a via alternativa do sistema complemento (Felicori et al., 2006). Os dados também corroboram os de atividade das duas proteínas (Fig. 17). A rLiD1 apresentou atividade sobre a esfingomielina quase quatro vezes maior que a rAsSMase D e em torno de cinco vezes maior na ativação do complemento.

Quanto a agregação plaquetária, não foi observada ação da rAsSMase D. Era esperada uma ativação da agregação plaquetária, já que essa ativação já foi demonstrada para as SMases D de *Loxosceles* (Felicori et al., 2006). Outro dado inesperado foi o retardo da coagulação promovido por ambas SMases D. Assim como discutido para a ativação da via alternativa do sistema complemento, esses resultados corroboram a atividade das SMases D (LiD1 com mais atividade que a rAsSMase D). Entretanto, não há relatos da ação de SMases sobre fatores da cascata da coagulação. Uma hipótese é que as SMases D podem ter atuado em algum componente do plasma cuja ausência prejudique a ativação da coagulação.

É difícil imaginar as vantagens da ativação do sistema complemento e da agregação plaquetária para a hematofagia do carrapato e de outros artrópodes hematófagos. Os relatos existentes mostram exatamente o contrário, isto é, que esses

processos devem ser inibidos a fim de evitar reações adversas como opsonização de moléculas salivares por fatores do complemento, danos no endotélio intestinal pela lise através do complemento (Barros et al., 2009; Khattab et al., 2015) e aumento da viscosidade da dieta (Araujo et al., 2007). De fato, carrapatos tem inúmeros inibidores do complemento e antiagregantes na saliva (Francischetti et al., 2009). Em aranhas, onde o veneno tem a função de destruir tecidos e interferir na homeostase, a ativação desses processos pode ser útil. Provavelmente essas, e também a atividade dermonecrótica, não são as funções primordiais da AsSMase D, mas permanecem como “atividades colaterais” como resquício da molécula presente no ancestral dos carrapatos que se alimentava de artrópodes mortos (Mans and Neitz, 2004). Isso poderia justificar a redução dessas atividades na AsSMase D em relação à rLiD1, uma vez que todas elas são desvantajosas para o carrapato.

Outro ensaio funcional realizado foi o de silenciamento pós-transcricional da AsSMase D utilizando a técnica de RNA de interferência (RNAi). Essa técnica tem sido amplamente usada em vários estudos relacionados à biologia de carrapatos, como por exemplo na avaliação de genes da glândula salivar. Os carrapatos, após serem silenciados, são submetidos à infestação e à avaliação de fenótipos, tais como comportamento alimentar e reprodução (Aljamali et al., 2002; de la Fuente et al., 2007b; Galay et al., 2016; Gong et al., 2009). Em carrapatos, o dsRNA do gene alvo é injetado diretamente na hemocele e circula juntamente com a hemolinfa até atingir o órgão e o mRNA alvos (Galay et al., 2016).

No presente estudo, foram injetados 4 µg de dsRNA da AsSMase D na hemocele de fêmeas do carrapato *A. sculptum*. A análise dos resultados demonstrou que as fêmeas de carrapatos silenciados com dsRNA da AsSMase D obtiveram redução nos níveis de mRNA da AsSMase D, quando comparados aos controles salina 0,9%. Essa queda foi mais acentuada após 30 dias da injeção do dsRNA, demonstrando que após esse tempo, a redução dos níveis de mRNA da AsSMase D é maior.

Em um segundo momento, fêmeas de *A. sculptum* foram novamente submetidas ao silenciamento por RNAi e colocadas para se alimentar em hospedeiros. Pode-se perceber que o silenciamento da AsSMase D salivar não alterou o comportamento alimentar das fêmeas dos carrapatos.

Esse comportamento alimentar inalterado dos carrapatos silenciados pode ser explicado pela redundância de moléculas na saliva dos carrapatos. De uma forma geral, a saliva dos carrapatos, como já discutido anteriormente, possui um arsenal de

moléculas farmacologicamente ativas que são liberadas no local da picada. Pode ser que uma ou mais moléculas estejam suprindo a falta da AsSMase D.

Um ensaio de vacinação foi realizado com o objetivo de avaliar o comportamento alimentar de carrapatos alimentados em hospedeiros imunizados. Os resultados foram semelhantes aos observados nos experimentos de RNAi e os parâmetros alimentares não sofreram alterações quando comparados aos controles.

Esses resultados já eram esperados, pois os dois testes (imunização e silenciamento por RNAi) avaliam o comportamento alimentar dos carrapatos frente à ausência da proteína recombinante. É importante ressaltar que a avaliação, feita através de Western blot, utilizando o soro de camundongos imunizados contra a rAsSMase D foi capaz de reconhecer a própria proteína recombinante e a AsSMase D no EGS de carrapatos com 1 dia de alimentação. Esses resultados garantem que os anticorpos produzidos a partir da imunização de hospedeiros são capazes de reconhecer a AsSMase D durante a hematofagia.

Apesar dos vários experimentos realizados, ainda não foi possível identificar qual a principal função da AsSMase D e qual a sua importância para o *A. sculptum*. Novos experimentos serão realizados a fim de avaliar a possível ação da AsSMase D, dentre eles a possível ação sobre células do sistema imune como a reversão de uma resposta celular para humoral com estímulo da produção de IL4, conforme observado para a SMase D do carrapato *I. scapularis* (Alarcon-Chaidez et al., 2009).

## 7. Conclusões

- O *A sculptum* possui SMase D na sua saliva.
- A AsSMase D possui os aminoácidos conservados e o domínio GDPD\_SF que a caracteriza como uma SMase D.
- A AsSMase D é expressa na glândula salivar e ausente do intestino.
- A AsSMase D é expressa por todos os estádios de desenvolvimento do carrapato.
- A AsSMase D é expressa em maiores níveis em carrapatos em jejum e no início da alimentação e seus níveis reduzem ao longo da hematofagia.
- A AsSMase D não possui atividade dermonecrótica.
- A rAsSMase D é capaz de aumentar a ativação da via alternativa do sistema complemento.
- A rAsSMase D não é capaz de ativar nem inibir a agregação plaquetária.
- A rAsSMase D é capaz de retardar a coagulação sanguínea.
- A ausência da AsSMase D não afeta a hematofagia dos carrapatos.

## REFERÊNCIAS

- Alarcon-Chaidez, F.J., 2013a. Salivary glands: structure, physiology, and molecular biology, in: Sonenshine, D.E., Roe, R.M. (Eds.), *Biology of Ticks*. Oxford University Press, Oxford, pp. 163–205.
- Alarcon-Chaidez, F.J., 2013b. Francisco J. Alarcon-Chaidez, in: Sonenshine, D.E., Roe, R.M. (Eds.), *Biology of Ticks*.
- Alarcon-Chaidez, F.J., Boppana, V.D., Hagymasi, A.T., Adler, A.J., Wikel, S.K., 2009. A novel sphingomyelinase-like enzyme in *Ixodes scapularis* tick saliva drives host CD4+T cells to express IL-4. *Parasite Immunol.* doi:10.1111/j.1365-3024.2009.01095.x
- Aljamali, M.N., Sauer, J.R., Essenberg, R.C., 2002. RNA interference: applicability in tick research. *Exp Appl Acarol* 28, 89–96.
- Anderson, J.F., Magnarelli, L.A., 2008. Biology of ticks. *Infect Dis Clin North Am* 22, 195–215.
- Andreotti, R., Garcia, M. V., Koller, W.W., 2019. *Carrapatos na cadeia produtiva de bovinos*, 1st ed. Brasília, DF.
- Araujo, R.N., Campos, I.T., Tanaka, A.S., Santos, A., Gontijo, N.F., Lehane, M.J., Pereira, M.H., 2007. *Brasiliensin*: A novel intestinal thrombin inhibitor from *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera: Reduviidae) with an important role in blood intake. *Int J Parasitol* 37, 1351–1358.
- Araújo, R.N., Costa, J.O., Botelho, J.R., 2016. Classe Arachnida, in: Neves, D.P., Melo, A.L. de, Linardi, P.M., Vitor, R.W.A. (Eds.), *Parasitologia Humana*. Atheneu, p. 588.
- Araujo, R.N., Pereira, M.H., Soares, A.C., Pereira, I.D., Diotaiuti, L., Gontijo, N.F., Lehane, M.J., Guarneri, A.A., 2009. Effect of intestinal erythrocyte agglutination on the feeding performance of *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera: Reduviidae). *J Insect Physiol* 55, 862–868.
- Barros, V.C., Assumpção, J.G., Cadete, A.M., Santos, V.C., Cavalcante, R.R., Araújo, R.N., Pereira, M.H., Gontijo, N.F., 2009. The role of salivary and intestinal complement system inhibitors in the midgut protection of Triatomines and mosquitoes. *PLoS One* 4. doi:10.1371/journal.pone.0006047
- Beati, L., Nava, S., Burkman, E.J., Barros-Battesti, D.M., Labruna, M.B., Guglielmone, A.A., Caceres, A.G., Guzman-Cornejo, C.M., Leon, R., Durden, L.A., Faccini, J.L.H., Cáceres, A.G., Guzmán-Cornejo, C.M., León, R., Durden, L.A., Faccini, J.L.H., 2013. *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae), the Cayenne tick: phylogeography and evidence for allopatric speciation. *BMC Evol Biol* 13, 267. doi:10.1186/1471-2148-13-267
- Bernheimer, A.W., Campbell, B.J., Forrester, L.J., 1985. Comparative toxinology of *Loxosceles reclusa* and *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Science* (80- ). doi:10.1126/science.3983643
- Binford, G.J., Bodner, M.R., Cordes, M.H.J., Baldwin, K.L., Rynerson, M.R., Burns, S.N., Zobel-Thropp, P.A., 2009. Molecular evolution, functional variation, and proposed nomenclature of the gene family that includes sphingomyelinase D in sicariid spider venoms. *Mol. Biol. Evol.* doi:10.1093/molbev/msn274
- Binford, G.J., Cordes, M.H.J., Wells, M.A., 2005. Sphingomyelinase D from venoms of *Loxosceles* spiders: Evolutionary insights from cDNA sequences and gene structure. *Toxicon.* doi:10.1016/j.toxicon.2004.11.011
- Borges, L.M.F., Oliveira, P.R., Lisboa, C.L.M., Ribeiro, M.F.B., 2002. Horse resistance

- to natural infestations of *Anocentor nitens* and *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). *Vet. Parasitol.* 104, 265–273. doi:10.1016/S0304-4017(01)00625-2
- Bouchard, K.R., Wikel, S.K., 2005. Care, Maintenance, and Experimental Infestation of Ticks in the Laboratory Setting, in: Marquardt, W.C. (Ed.), *Biology of Disease Vectors*. Elsevier, San Diego, pp. 705–712.
- Bradford, M.M., 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. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3
- Brasil, 2017. *GUIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE*, Guia de Vigilância em Saúde.
- Carne, H.R., Onon, E.O., 1978. Action of *Corynebacterium ovis* exotoxin on endothelial cells of blood vessels. *Nature*. doi:10.1038/271246a0
- Chaim, O.M., Sade, Y.B., Da Silveira, R.B., Toma, L., Kalapothakis, E., Chávez-Olortegui, C., Mangili, O.C., Gremski, W., Von Dietrich, C.P., Nader, H.B., Sanches Veiga, S., 2006. Brown spider dermonecrotic toxin directly induces nephrotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* doi:10.1016/j.taap.2005.05.015
- Chmelar, J., Oliveira, C.J., Rezacova, P., Francischetti, I.M.B., Kovarova, Z., Pejler, G., Kopacek, P., Ribeiro, J.M.C., Mares, M., Kopecky, J., Kotsyfakis, M., 2011. A tick salivary protein targets cathepsin G and chymase and inhibits host inflammation and platelet aggregation. *Blood*. doi:10.1182/blood-2010-06-293241
- Chun, J., 2002. International Union of Pharmacology. XXXIV. Lysophospholipid Receptor Nomenclature. *Pharmacol. Rev.* doi:10.1124/pr.54.2.265
- de la Fuente, J., Almazan, C., Canales, M., Perez de la Lastra, J.M., Kocan, K.M., Willadsen, P., 2007a. A ten-year review of commercial vaccine performance for control of tick infestations on cattle. *Anim Heal. Res Rev* 8, 23–28. doi:10.1017/S1466252307001193
- de la Fuente, J., Kocan, K.M., Almazan, C., Blouin, E.F., 2007b. RNA interference for the study and genetic manipulation of ticks. *Trends Parasitol* 23, 427–433.
- de Santi Ferrara, G.I., Fernandes-Pedrosa, M. de F., Junqueira-de-Azevedo, I. de L.M., Gonçalves-de-Andrade, R.M., Portaro, F.C.V., Manzoni-de-Almeida, D., Murakami, M.T., Arni, R.K., van den Berg, C.W., Ho, P.L., Tambourgi, D. V., 2009. SMase II, a new sphingomyelinase D from *Loxosceles laeta* venom gland: Molecular cloning, expression, function and structural analysis. *Toxicon*. doi:10.1016/j.toxicon.2009.02.013
- Dias-Lopes, C., Neshich, I.A.P., Neshich, G., Ortega, J.M., Granier, C., Chávez-Olortegui, C., Molina, F., Felicori, L., 2013. Identification of new sphingomyelinases D in pathogenic fungi and other pathogenic organisms. *PLoS One*. doi:10.1371/journal.pone.0079240
- Esteves, E., Maruyama, S.R., Kawahara, R., Fujita, A., Martins, L.A., Righi, A.A., Costa, F.B., Palmisano, G., Labruna, M.B., Sá-Nunes, A., Ribeiro, J.M.C., Fogaça, A.C., 2017. Analysis of the Salivary Gland Transcriptome of Unfed and Partially Fed *Amblyomma sculptum* Ticks and Descriptive Proteome of the Saliva. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* doi:10.3389/fcimb.2017.00476
- Estrada-Peña, A., Guglielmone, A.A., Mangold, A.J., 2004. The distribution and ecological “preferences” of the tick *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae), an ectoparasite of humans and other mammals in the Americas. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* doi:10.1179/000349804225003316
- Estrada-Peña, A., Tarragona, E.L., Vesco, U., Meneghi, D. de, Mastropaolo, M., Mangold, A.J., Guglielmone, A.A., 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. doi:10.1016/j.ijpara.2014.08.007

- Felicori, L., Araujo, S.C., Machado de Ávila, R.A., Sanchez, E.F., Granier, C., Kalapothakis, E., Chávez-Olórtegui, C., 2006. Functional characterization and epitope analysis of a recombinant dermonecrotic protein from *Loxosceles intermedia* spider. *Toxicon*. doi:10.1016/j.toxicon.2006.06.019
- Fernandes Pedrosa, M.D.F., Junqueira de Azevedo, I.D.L.M., Gonçalves-de-Andrade, R.M., Van Den Berg, C.W., Ramos, C.R.R., Lee Ho, P., Tambourgi, D. V., 2002. Molecular cloning and expression of a functional dermonecrotic and haemolytic factor from *Loxosceles laeta* venom. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* doi:10.1016/S0006-291X(02)02521-4
- Flores-Díaz, M., Monturiol-Gross, L., Naylor, C., Alape-Girón, A., Flieger, A., 2016. Bacterial Sphingomyelinases and Phospholipases as Virulence Factors. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* doi:10.1128/MMBR.00082-15
- Forrester, L.J., Barrett, J.T., Campbell, B.J., 1978. Red blood cell lysis induced by the venom of the brown recluse spider. The role of sphingomyelinase D. *Arch. Biochem. Biophys.* doi:10.1016/0003-9861(78)90046-2
- Francischetti, I.M., Sa-Nunes, A., Mans, B.J., Santos, I.M., Ribeiro, J.M., 2009. The role of saliva in tick feeding. *Front Biosci* 14, 2051–2088.
- Franco, P.F., Silva, N.C.S., Fazito do Vale, V., Abreu, J.F., Santos, V.C., Gontijo, N.F., Valenzuela, J.G., Pereira, M.H., Sant’Anna, M.R. V, Gomes, A.P.S., Araujo, R.N., 2016. Inhibition of the classical pathway of the complement system by saliva of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). *Exp. Parasitol.* 164, 91–6. doi:10.1016/j.exppara.2016.03.002
- Galay, R.L., Umemiya-Shirafuji, R., Mochizuki, M., Fujisaki, K., Tanaka, T., 2016. RNA Interference – A Powerful Functional Analysis Tool for Studying Tick Biology and its Control, in: *RNA Interference*. doi:10.5772/61577
- Galvão, M.A.M., Silva, L.J. da, Nascimento, E.M.M., Calic, S.B., Sousa, R. de, Bacellar, F., 2005. Rickettsial diseases in Brazil and Portugal: occurrence, distribution and diagnosis. *Rev. Saude Publica* 39, 850–856. doi:/S0034-89102005000500023
- Garcia, G., Gardinassi, L., Ribeiro, J., Anatriello, E., Ferreira, B., Moreira, H.N., Mafra, C., Martins, M., Szabó, M.P., de Miranda-Santos, I.K., Maruyama, S., 2014. The sialotranscriptome of *Amblyomma triste*, *Amblyomma parvum* and *Amblyomma cajennense* ticks, uncovered by 454-based RNA-seq. *Parasit. Vectors* 7, 430. doi:10.1186/1756-3305-7-430
- Goi, F.M., Alonso, A., 2002. Sphingomyelinases: Enzymology and membrane activity. *FEBS Lett.* doi:10.1016/S0014-5793(02)03482-8
- Gong, H., Umemiya, R., Zhou, J., Liao, M., Zhang, H., Jia, H., Nishikawa, Y., Xuan, X., Fujisaki, K., 2009. Blocking the secretion of saliva by silencing the HIYkt6 gene in the tick *Haemaphysalis longicornis*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* doi:10.1016/j.ibmb.2009.03.002
- Gremski, L.H., Da Silveira, R.B., Chaim, O.M., Probst, C.M.A., Ferrer, V.P., Nowatzki, J., Weinschutz, H.C., Madeira, H.M.I., Gremski, W., Nader, H.B., Senff-Ribeiro, A., Veiga, S.S., 2010. A novel expression profile of the *Loxosceles intermedia* spider venomous gland revealed by transcriptome analysis. *Mol. Biosyst.* doi:10.1039/c004118a
- Guglielmone, A.A., Venzal, J.M., González-Acuña, D., Nava, S., Martins, T.F., 2017. Tick Classification, External Tick Anatomy with a Glossary, and Biological Cycles, in: *Ticks of the Southern Cone of America*. doi:10.1016/b978-0-12-811075-1.00001-7
- Jongejan, F., Uilenberg, G., 2004. The global importance of ticks. *Parasitology* 129 Suppl, S3-14.

- Kalapothakis, E., Araujo, S.C., De Castro, C.S., Mendes, T.M., Gomez, M.V., Mangili, O.C., Gubert, I.C., Chávez-Olórtegui, C., 2002. Molecular cloning, expression and immunological properties of LiD1, a protein from the dermonecrotic family of *Loxosceles intermedia* spider venom. *Toxicon*. doi:10.1016/S0041-0101(02)00201-5
- Kalapothakis, E., Chatzaki, M., Gonçalves-Dornelas, H., de Castro, C.S., Silvestre, F.G., Laborne, F. V., de Moura, J.F., Veiga, S.S., Chávez-Olórtegui, C., Granier, C., Barbaro, K.C., 2007. The Loxtox protein family in *Loxosceles intermedia* (Mello-Leitão) venom. *Toxicon*. doi:10.1016/j.toxicon.2007.07.001
- Karim, S., Singh, P., Ribeiro, J.M.C., 2011. A deep insight into the sialotranscriptome of the gulf coast tick, *Amblyomma maculatum*. *PLoS One*. doi:10.1371/journal.pone.0028525
- Keirans, J.E., 2009. Order Ixodida, in: Krantz, G., Walter, D. (Eds.), *A Manual of Acarology*. Texas Tech University Press, Lubbock, pp. 111–123.
- Khattab, A., Barroso, M., Miettinen, T., Meri, S., 2015. Anopheles Midgut Epithelium Evades Human Complement Activity by Capturing Factor H from the Blood Meal. *PLoS Negl. Trop. Dis.* doi:10.1371/journal.pntd.0003513
- Kotsyfakis, M., Sa-Nunes, A., Francischetti, I.M.B., Marther, T.N., Andersen, J.F., 2006. Antiinflammatory and immunosuppressive activity of sialostatin L, a salivary cystatin from the tick *Ixodes scapularis*. *J Biol Chem* 281, 26298–26307.
- Kurpiewski, G., Forrester, L.J., Barrett, J.T., Campbell, B.J., 1981. Platelet aggregation and sphingomyelinase D activity of a purified toxin from the venom of *Loxosceles reclusa*. *BBA - Gen. Subj.* doi:10.1016/0304-4165(81)90128-8
- Kusma, J., Chaim, O.M., Wille, A.C.M., Ferrer, V.P., Sade, Y.B., Donatti, L., Gremski, W., Mangili, O.C., Veiga, S.S., 2008. Nephrotoxicity caused by brown spider venom phospholipase-D (dermonecrotic toxin) depends on catalytic activity. *Biochimie*. doi:10.1016/j.biochi.2008.07.011
- Labruna, M.B., 2018. Comparative survival of the engorged stages of *Amblyomma cajennense sensu stricto* and *Amblyomma sculptum* under different laboratory conditions. *Ticks Tick. Borne. Dis.* doi:10.1016/j.ttbdis.2018.03.019
- Labruna, M.B., 2009. Ecology of rickettsia in South America. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* doi:10.1111/j.1749-6632.2009.04516.x
- Labruna, M.B., De Paula, C.D., Lima, T.F., Sana, D.A., 2002. Ticks (Acari: Ixodidae) on wild animals from the Porto-Primavera hydroelectric power station area, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 97, 1133–1136. doi:S0074-02762002000800012 [pii]
- Lima, W.S., Ribeiro, M.F., Guimaraes, M.P., 2000. Seasonal variation of *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) in cattle in Minas Gerais State, Brazil. *Trop Anim Heal. Prod* 32, 375–380.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup>. *Method Methods* 25, 402–408.
- Lopes, C.M., Leite, R.C., Labruna, M.B., de Oliveira, P.R., Borges, L.M., Rodrigues, Z.B., de Carvalho, H.A., de Freitas, C.M., Vieira Junior, C.R., 1998. Host specificity of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) with comments on the drop-off rhythm. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93, 347–351.
- Machado, L.F., Laugesen, S., Botelho, E.D., Ricart, C.A.O., Fontes, W., Barbaro, K.C., Roepstorff, P., Valle De Sousa, M., 2005. Proteome analysis of brown spider venom: Identification of loxnecrogin isoforms in *Loxosceles gaucha* venom. *Proteomics*. doi:10.1002/pmic.200401096
- Mans, B.J., Neitz, A.W.H., 2004. Adaptation of ticks to a blood-feeding environment: Evolution from a functional perspective. *Insect Biochem. Mol. Biol.*

- doi:10.1016/j.ibmb.2003.09.002
- Marchesini, N., Hannun, Y.A., 2004. Acid and neutral sphingomyelinases: roles and mechanisms of regulation. *Biochem. Cell Biol.* doi:10.1139/o03-091
- Martins, T.F., Barbieri, A.R.M., Costa, F.B., Terassini, F.A., Camargo, L.M.A., Peterka, C.R.L., De C Pacheco, R., Dias, R.A., Nunes, P.H., Marcili, A., Scofield, A., Campos, A.K., Horta, M.C., Guilloux, A.G.A., Benatti, H.R., Ramirez, D.G., Barros-Battesti, D.M., Labruna, M.B., 2016. Geographical distribution of *Amblyomma cajennense* (sensu lato) ticks (Parasitiformes: Ixodidae) in Brazil, with description of the nymph of *A. cajennense* (sensu stricto). *Parasites and Vectors.* doi:10.1186/s13071-016-1460-2
- Ministério da Saúde, 2018. Sinan Net.
- Moolenaar, W.H., 1999. Bioactive lysophospholipids and their G protein-coupled receptors. *Exp. Cell Res.* doi:10.1006/excr.1999.4702
- Moreira, H.N.S., Barcelos, R.M., Vidigal, P.M.P., Klein, R.C., Montandon, C.E., Maciel, T.E.F., Carrizo, J.F.A., Costa de Lima, P.H., Soares, A.C., Martins, M.M., Mafra, C., 2017. A deep insight into the whole transcriptome of midguts, ovaries and salivary glands of the *Amblyomma sculptum* tick. *Parasitol. Int.* doi:10.1016/j.parint.2016.10.011
- Murakami, M.T., Fernandes-Pedrosa, M.F., Tambourgi, D. V., Arni, R.K., 2005. Structural basis for metal ion coordination and the catalytic mechanism of sphingomyelinases D. *J. Biol. Chem.* doi:10.1074/jbc.M412437200
- Murakami, M.T., Freitas Fernandes-Pedrosa, M., De Andrade, S.A., Gabdoulkhakov, A., Betzel, C., Tambourgi, D. V., Arni, R.K., 2006. Structural insights into the catalytic mechanism of sphingomyelinases D and evolutionary relationship to glycerophosphodiester phosphodiesterases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* doi:10.1016/j.bbrc.2006.01.123
- Narasimhan, S., Montgomery, R.R., DePonte, K., Tschudi, C., Marcantonio, N., Anderson, J.F., Sauer, J.R., Cappello, M., Kantor, F.S., Fikrig, E., 2004. Disruption of *Ixodes scapularis* anticoagulation by using RNA interference. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 1141–1146.
- Nava, S., Beati, L., Labruna, M.B., Caceres, A.G., Mangold, A.J., Guglielmone, A.A., 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.* doi:10.1016/j.ttbdis.2013.11.004
- Nunn, M.A., Sharma, A., Paesen, G.C., Adamson, S., Lissina, O., Willis, A.C., Nuttall, P. a, 2005. Complement inhibitor of C5 activation from the soft tick *Ornithodoros moubata*. *J. Immunol.* 174, 2084–2091. doi:10.4049/jimmunol.174.4.2084
- Pereira, M., Labruna, M.B., 1998. Febre maculosa: aspectos clínicos e epidemiológicos. *Clín. Vet* 12, 19–23.
- Polo, G., Mera Acosta, C., Labruna, M.B., Ferreira, F., Brockmann, D., 2018. Hosts mobility and spatial spread of *Rickettsia rickettsii*. *PLoS Comput. Biol.* doi:10.1371/journal.pcbi.1006636
- Radonić, A., Thulke, S., Mackay, I.M., Landt, O., Siebert, W., Nitsche, A., 2004. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* doi:10.1016/j.bbrc.2003.11.177
- Ribeiro, J.M., Makoul, G.T., Levine, J., Robinson, D.R., Spielman, A., 1985. Antihemostatic, antiinflammatory, and immunosuppressive properties of the saliva of a tick, *Ixodes dammini*. *J Exp Med* 161, 332–344.
- Ribeiro, J.M.C., 1995. Insect saliva: function, biochemistry and physiology, in: Boer,

- R.F.C. a. G. d. (Ed.), *Regulatory Mechanisms of Insect Feeding*. Chapman & Hall, London, pp. 74–97.
- Ribeiro, J.M.C., Alarcon-Chaidez, F., Ivo, I.M., Mans, B.J., Mather, T.N., Valenzuela, J.G., Wikel, S.K., 2006. An annotated catalog of salivary gland transcripts from *Ixodes scapularis* ticks. *Insect Biochem. Mol. Biol.* doi:10.1016/j.ibmb.2005.11.005
- Rojas, R., Marini, M.A., Coutinho, M.T.Z., 1999. Wild birds as hosts of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94, 315–322.
- Rossignol, P.A., Ribeiro, J.M., Jungery, M., Turell, M.J., Spielman, A., Bailey, C.L., 1985. Enhanced mosquito blood-finding success on parasitemic hosts: evidence for vector-parasite mutualism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 7725–7727.
- Samet, D., Barenholz, Y., 1999. Characterization of acidic and neutral sphingomyelinase activities in crude extracts of HL-60 cells. *Chem. Phys. Lipids.* doi:10.1016/S0009-3084(99)00076-6
- Silva, N.C.S., Vale, V.F., Franco, P.F., Gontijo, N.F., Valenzuela, J.G., Pereira, M.H., Sant'Anna, M.R.V., Rodrigues, D.S., Lima, W.S., Fux, B., Araujo, R.N., 2016. Saliva of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) inhibits classical and alternative complement pathways. *Parasites and Vectors.* doi:10.1186/s13071-016-1726-8
- Souza, C.E., Moraes-Filho, J., Ogrzewalska, M., Uchoa, F.C., Horta, M.C., Souza, S.S., Borba, R.C., Labruna, M.B., 2009. Experimental infection of capybaras *Hydrochoerus hydrochaeris* by *Rickettsia rickettsii* and evaluation of the transmission of the infection to ticks *Amblyomma cajennense*. *Vet Parasitol* 161, 116–121. doi:10.1016/j.vetpar.2008.12.010
- Szabó, M.P.J., Pinter, A., Labruna, M.B., 2013. Ecology, biology and distribution of spotted-fever tick vectors in Brazil. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* doi:10.3389/fcimb.2013.00027
- Tam, C., Idone, V., Devlin, C., Fernandes, M.C., Flannery, A., He, X., Schuchman, E., Tabas, I., Andrews, N.W., 2010. Exocytosis of acid sphingomyelinase by wounded cells promotes endocytosis and plasma membrane repair. *J. Cell Biol.* doi:10.1083/jcb.201003053
- Tambourgi, D. V., De Sousa Da Silva, M., Billington, S.J., Gonçalves De Andrade, R.M., Magnoli, F.C., Songer, J.G., Van Den Berg, C.W., 2002. Mechanism of induction of complement susceptibility of erythrocytes by spider and bacterial sphingomyelinases. *Immunology.* doi:10.1046/j.1365-2567.2002.01483.x
- Tambourgi, D. V., Gonçalves-de-Andrade, R.M., van den Berg, C.W., 2010. *Loxoscelism: From basic research to the proposal of new therapies.* *Toxicon.* doi:10.1016/j.toxicon.2010.01.021
- Tambourgi, D. V., Magnoli, F.C., Van Den Berg, C.W., Morgan, B.P., De Araujo, P.S., Alves, E.W., Da Silva, W.D., 1998. Sphingomyelinases in the venom of the spider *Loxosceles intermedia* are responsible for both dermonecrosis and complement-dependent hemolysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* doi:10.1006/bbrc.1998.9474
- Tambourgi, D. V., Pedrosa, M.F.F., de Andrade, R.M.G., Billington, S.J., Griffiths, M., van den Berg, C.W., 2007. Sphingomyelinases D induce direct association of C1q to the erythrocyte membrane causing complement mediated autologous haemolysis. *Mol. Immunol.* doi:10.1016/j.molimm.2006.02.002
- Tambourgi, D. V., Magnoli, F.C., Eickstedt, V.R.D. Von, Benedetti, Z.C., Petricevich, V.L., Silva, W.D., 1995. Incorporation of a 35-Kilodalton Purified Protein from *Loxosceles intermedia* Spider Venom Transforms Human Erythrocytes into

- Activators of Autologous Complement Alternative Pathway. *Am. Assoc. Immunol.*
- Tambourgi, D. V., Morgan, B.P., de Andrade, R.M., Magnoli, F.C., van Den Berg, C.W., 2000. *Loxosceles intermedia* spider envenomation induces activation of an endogenous metalloproteinase, resulting in cleavage of glycophorins from the erythrocyte surface and facilitating complement-mediated lysis. *Blood*.
- Tan, A.W.L., Francischetti, I.M.B., Slovak, M., Kini, R.M., Ribeiro, J.M.C., 2015. Sexual differences in the sialomes of the zebra tick, *Rhipicephalus pulchellus*. *J. Proteomics*. doi:10.1016/j.jprot.2014.12.014
- Tirloni, L., Kim, T.K., Coutinho, M.L., Ali, A., Seixas, A., Termignoni, C., Mulenga, A., Da Silva Vaz, I., 2016. The putative role of *Rhipicephalus microplus* salivary serpins in the tick-host relationship. *Insect Biochem. Mol. Biol.* doi:10.1016/j.ibmb.2016.01.004
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J., 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* doi:10.1073/pnas.76.9.4350
- Valenzuela, J.G., 2005. Blood-feeding arthropod salivary glands and saliva, in: Marquardt, W.C. (Ed.), *Biology of Disease Vectors*. Elsevier Academic Press, p. 785.
- Van Meeteren, L.A., Frederiks, F., Giepmans, B.N.G., Fernandes Pedrosa, M.F., Billington, S.J., Jost, B.H., Tambourgi, D. V., Moolenaar, W.H., 2004. Spider and Bacterial Sphingomyelinases D Target Cellular Lysophosphatidic Acid Receptors by Hydrolyzing Lysophosphatidylcholine. *J. Biol. Chem.* doi:10.1074/jbc.C300563200
- Vogel, C., Marcotte, E.M., 2012. Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nat. Rev. Genet.* doi:10.1038/nrg3185
- Yu, X.-J., Walker, D.H., 2006. The Order Rickettsiales, in: *The Prokaryotes*. doi:10.1007/0-387-30745-1\_20
- Zela, S.P., Fernandes Pedrosa, M.F., Murakami, M.T., De Andrade, S.A., Arni, R.K., Tambourgi, D. V., 2004. Crystallization and preliminary crystallographic analysis of SMase I, a sphingomyelinase from *Loxosceles laeta* spider venom. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* doi:10.1107/S090744490400678X

## ANEXO 1



UFMG

## UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

## CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

**Protocolo CEUA:** 103/2017**Título do projeto:** Identificação de moléculas imunogênicas expressas na glândula salivar e intestino do carrapato *Amblyomma sculptum* e avaliação de seu potencial como antígenos vacinais**Finalidade:** Pesquisa**Pesquisador responsável:** Ricardo Nascimento Araujo**Unidade:** Instituto de Ciências Biológicas**Departamento:** Departamento de Parasitologia**Situação atual:** [Decisão Final - Aprovado](#)

Aprovado na reunião do dia 26/06/2017. Validade: 26/06/2017 à 25/06/2022  
Belo Horizonte, 27/06/2017.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG

[https://aplicativos.ufmg.br/solicite\\_ceua/](https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/)

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) 3409-4516  
[www.ufmg.br/bioetica/ceua](http://www.ufmg.br/bioetica/ceua) - [cetea@prpq.ufmg.br](mailto:cetea@prpq.ufmg.br)



foram obtidas do NCBI: 1XX1\_A (GI: 60594084), aSMase (NP\_001273067.1) e aSMase (P17405.5).