

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA
APLICADAS

Avaliação dos efeitos da saliva dos carrapatos das espécies *Amblyomma sculptum*,
Amblyomma parvum e *Rhipicephalus sanguineus* sobre linhagens celulares tumorais de mama
humanas e murina.

ANA CAROLINA PRADO SOUSA

Uberlândia
Outubro-2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA
APLICADAS

Avaliação dos efeitos da saliva dos carrapatos das espécies *Amblyomma sculptum*,
Amblyomma parvum e *Rhipicephalus sanguineus* sobre linhagens celulares tumorais de mama
humanas e murina.

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós Graduação em Imunologia e
Parasitologia Aplicadas do Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade
Federal de Uberlândia como requisito
parcial à obtenção ao título de Mestre em
Imunologia e Parasitologia.

Discente: Ana Carolina Prado Sousa

Orientador: Prof. Dr. Marcelo José Barbosa
Silva

Co-orientador: Prof. Dr. Matias Pablo Juan
Szabó

Uberlândia
Outubro-2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

S725a Sousa, Ana Carolina Prado, 1987-
2015 Avaliação dos efeitos da saliva dos carrapatos das espécies
Amblyomma sculptum, *Amblyomma parvum* e *Rhipicephalus sanguineus*
sobre linhagens celulares tumorais de mama humanas e murina / Ana
Carolina Prado Sousa. - 2015.
48 f. : il.

Orientador: Marcelo José Barbosa Silva.

Coorientador: **Matias Pablo Juan Szabó.**

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.
Inclui bibliografia.

1. Imunologia - Teses. 2. Mamas - Câncer - Teses. 3. Saliva - Teses.
4. Carrapato - Teses. I. Silva, Marcelo José Barbosa. II. Szabó, Matias
Pablo Juan. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-
Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. IV. Título.

CDU: 612.017



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS



Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Ana Carolina Prado Sousa

“Avaliação dos efeitos da saliva dos carrapatos das espécies *Amblyomma sculptum*, *Amblyomma parvum* e *Rhipicephalus sanguineus* sobre linhagens celulares tumorais de mama humanas e murina.”

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Banca Examinadora:

Uberlândia, 23 de outubro de 2015.

Prof. Dr. Carlo José Freire de Oliveira – UFTM

Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho – INGEB/UFU

Prof. Dr. Marcelo José Barbosa Silva – ICBIM/UFU (orientador)

AGRADECIMENTOS

Agradeço infinitamente a Deus pela vida, pela minha família e por todas as maravilhosas oportunidades que Ele me concede de tentar melhorar como pessoa.

Agradeço à minha família, meus pais, que sempre me apoiaram; ao meu marido, que sempre me incentivou a continuar e buscar meus sonhos, por mais difícil e distante que estivessem; e ao meu amado filho, meu maior incentivo para continuar buscando uma forma de melhorar nossa vida, e mudar, nem que seja uma pouquinho, nosso mundo.

Agradeço imensamente meu professor orientador Dr. Marcelo José Barbosa Silva por ter acreditado em mim e ter aceitado e concedido a oportunidade de trabalharmos juntos. Obrigada por me apresentar o mundo da pesquisa e me fazer descobrir o que eu realmente amo fazer. Obrigada por me apresentar ao meu co-orientador professor Dr. Matias Pablo Juan Szabó, a quem eu agradeço por todos os ensinamentos, conversas, apoio, incentivo e por me apresentar ao que eu amo pesquisar, meus queridos carrapatos.

Agradeço muito aos meus queridos colegas e parceiros dos Laboratórios: de Ixodologia, Marlene, minha mestra, minha inspiração; Carolina, Vanessa, Samantha, Graziela, Khelma, com quem pouco convivi, e todos os outros, que sempre me ajudaram muito, me ensinaram muito; de Osteoimunologia e Imunologia dos Tumores, Bruna, meu anjo, minha salvação; Felipe, meu consultor/ orientador; Livia, grande parceira; Brunna, fornecedora de insumos (brincadeira); enfim, a todos que sempre me auxiliaram muito, com quem aprendi demais, a quem devo todos os meus agradecimentos pela conclusão dessa pesquisa. Muito obrigada por tudo pessoal!

Agradeço aos meus amigos-irmãos que, mesmo distantes, sempre estiveram presentes em pensamento, me apoiando, não me deixando desistir nos momentos difíceis, me oferecendo todo o suporte, mesmo em lembranças, que são tão importantes para mim: Camila Faleiros, Amanda Dias e tantos outros.

Agradeço a todos os técnicos de Laboratórios que estiveram envolvidos nos experimentos e conclusão dessa pesquisa.

Agradeço ao Programa de Pós Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, aos ótimos e queridos mestres e doutores que compõe esse programa, às secretárias, Luceleide

e Lucélia, pela paciência e dedicação e, a todos os colegas de mestrado, pois enfrentamos toda essa maratona juntos. Tenho muito orgulho de fazer parte do PPIPA!

Agradeço à Universidade Federal de Uberlândia por todo o conhecimento e experiência que aqui adquiri. E aos órgãos FAPEMIG, CNPq e CAPES pelo apoio financeiro durante estes dois anos.

RESUMO

O câncer continua sendo uma das doenças mais preocupantes e com uma grande aumento em sua incidência na atualidade. O câncer de mama apresenta grande chance de cura quando diagnosticado precocemente, mas, na maioria dos casos, seu diagnóstico tardio leva à um tratamento muitas vezes doloroso e devastador aos pacientes acometidos por ele. Em busca de novas alternativas para esse tratamento, que possam torna-lo mais efetivo e menos prejudicial, a descoberta de biomoléculas provindas de plantas e animais com atividade antitumoral tem se tornado cada vez mais frequente. Os carrapatos, que apresentam em sua saliva diversas moléculas com diferentes propriedades, sendo estas imunomodulatórias, anticoagulantes, anti-inflamatórias, também demonstra efeitos antitumorais frente algumas linhagens tumorais. Assim, este estudo objetivou avaliar o efeito da saliva dos carrapatos das espécies *Rhipicephalus sanguineus*, *Amblyomma sculptum* e *Amblyomma parvum* sobre linhagens celulares de câncer de mama MCF-7, MDA-MB-231 e células de Ehrlich. Pode-se observar que os três diferentes tipos de saliva apresentaram citotoxicidade frente às células tumorais, não demonstrando o mesmo efeito na célula não tumoral. Também foram observadas alterações morfológicas na superfície das linhagens tumorais, o que não ocorreu nas células MCF-10A. Além disso, foi constatado que as células tumorais morrem pelo processo de apoptose e que nessas células, verificar a presença da atividade de caspase-3/7, sugerindo a possibilidade da ocorrência da apoptose pela via intrínseca. Estas alterações não foram observadas nas células MCF-10A, que se mantiveram praticamente inalteradas mesmo após a exposição aos diferentes tipos de saliva. Esses resultados sugerem que a saliva do carrapato apresenta biomoléculas que favorecem a possibilidade do desenvolvimento de novos fármacos para tratamento do câncer de mama.

Palavras chave: câncer, carrapato, saliva, atividade antitumoral.

ABSTRACT

Cancer remains one of the most troubling diseases with increasing occurrence. Breast cancer has a great chance of cure when diagnosed early, but in most cases, its late diagnosis leads to patients a treatment often painful and devastating. The search for new alternative treatments, that can make it more effective and less harmful, has led to several substances and biomolecules of plants and animals with anti-tumor activity. Ticks present in their saliva different molecules with different properties, which are immunomodulatory, anticoagulants, anti-inflammatory, and also showed some anti-tumor effects across different tumor cell lines. This study aimed to evaluate the effect of the saliva of ticks of the species *Rhipicephalus sanguineus*, *Amblyomma parvum* and *Amblyomma sculptum* on cell lines of breast cancer MCF-7, MDA-MB-231 and Ehrlich cells. It can be seen that the three different types of front saliva showed cytotoxicity to tumor cells did not demonstrate the same effect on non tumor cell. Morphological changes were also observed on the surface of tumor cell lines, which did not occur in the MCF-10A cells. Furthermore, it was found that tumor cells to die by apoptosis and that these cells, check for the presence of caspase-3 activity / 7, suggesting the possible occurrence of apoptosis by the intrinsic pathway. These changes were not observed in MCF10A cells, which remained broadly unchanged even after exposure to different types of saliva. These results suggest that tick saliva is a potential source for the development of new breast cancer drugs.

Keywords: cancer, tick, saliva, antitumoural activity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Coelho utilizado para manutenção das colônias e alimentação dos carrapatos.....	21
Figura 2: Método de coleta de saliva de carrapato.....	22
Figura 3: Gráfico representando as diferenças estatísticas entre as coletas de saliva de diferentes espécies de carrapato em diferentes períodos do dia.....	25
Figura 4: Ensaio de citotoxicidade utilizando os diferentes tipos de saliva de carrapato com as diferentes linhagens celulares tumorais.....	27
Figura 5: Imagens das alterações morfológicas das linhagens celulares tumorais e não transformadas expostas as salivas das diferentes espécies de carrapatos.....	30
Figura 6: Gráficos de Apoptose/ Necrose das linhagens celulares tumorais tratadas com as salivas das diferentes espécies de carrapatos.....	33
Figura 7: Gráficos apresentando a quantidade de caspase 3/7 nas linhagens celulares tumorais tratadas com os 03 tipos de saliva de carrapato.....	35

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

% - Porcentagem

°C - Graus Celsius

µg - Microgramas

µL - Microlitros

ATP - Adenosina Trifosfato

CO₂ - Dióxido de Carbono

DNA - Ácido desoxirribonucleico

L - Litros

mL - Mililitros

M - Molar

MTT - 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide

mM - Milimolar

nm - Nanômetro

OD - Densidade Óptica (absorbância)

PBS - Solução salina tamponada com fosfatos pH 7,2

pH - Potencial hidrogênionico

RPM - Rotações por minuto

RPMI - Meio Roswell Park Memorial Institute

SFB - Soro Fetal Bovino

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
1.1. Linhagens celulares tumorais de câncer de mama.....	12
1.2. Carrapatos.....	13
1.2.1. <i>Amblyomma sculptum</i> (Complexo <i>Amblyomma cajennense</i>).....	14
1.2.2. <i>Amblyomma parvum</i>	14
1.2.3. <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	15
1.3. A utilização da saliva de carrapato em pesquisa.....	15
1.4. A saliva de carrapato e o câncer.....	16
2. JUSTIFICATIVA.....	18
3. OBJETIVOS.....	19
3.1. Objetivo geral.....	19
3.2. Objetivos específicos.....	19
4. METODOLOGIA.....	20
4.1. Linhagens celulares tumorais.....	20
4.2. Carrapatos.....	20
4.3. Coleta de saliva dos carrapatos.....	21
4.4. Avaliação das alterações morfológicas.....	22
4.5. Ensaio de citotoxicidade – MTT.....	23
4.6. Avaliação de Necrose e Apoptose.....	23
4.7. Análise da via de ocorrência de apoptose pela presença de Caspase-3/7.....	24
4.8. Aspectos éticos do estudo.....	24
4.9. Análise estatística.....	24
5. RESULTADOS.....	25

5.1. Coleta da saliva dos carrapatos.....	25
5.2. Citotoxicidade da saliva dos carrapatos frente às linhagens celulares MCF-7, MDA-MB-231, Ehrlich e MCF-10A.....	26
5.3. Avaliação de alterações morfológicas.....	29
5.4. Avaliação da necrose e apoptose.....	31
5.5. Análise da presença de caspase-3/7 nas linhagens celulares tumorais tratadas com saliva de carrapato para averiguar a via de ocorrência da apoptose.....	34
6. DISCUSSÃO.....	37
7. CONCLUSÃO.....	42
8. REFERÊNCIAS.....	43

1. INTRODUÇÃO

O câncer de mama é o segundo tipo de neoplasia mais comum em mulheres e uma das principais causas de morte. Homens também podem desenvolver câncer de mama, porém neles a prevalência é baixa, constituindo menos de 1% dos casos de câncer de mama. Se diagnosticado em fases iniciais, o câncer de mama tem ótimas chances de cura, com uma sobrevida de 5 anos em 97% dos casos. Mesmo quando o diagnóstico não é tão precoce, novas terapias têm aumentado a sobrevida de pacientes, possibilitando uma boa qualidade de vida (INCA, 2011). Dada a importância na saúde pública, a busca por novas alternativas terapêuticas são constantes. Nesse contexto, surgiu recentemente uma nova e inesperada fonte para pesquisa de terapias para neoplasias, a partir da saliva de carrapatos.

Os carrapatos são ectoparasitas hematófagos que podem parasitar animais de diferentes grupos, como mamíferos, aves, répteis, anfíbios (KEIRANS *et al.*, 2005) e até aranhas, carrapatos, incluindo a si mesmos (LABRUNA *et al.*, 2007). Estes ectoparasitas têm ampla distribuição geográfica, e podem ser encontrados em todas as regiões do planeta (ANDERSON *et al.*, 2008).

Os carrapatos permanecem fixados aos seus hospedeiros se alimentando por muitos dias, necessitando de um arsenal farmacológico diversificado e eficaz que permita a sua sobrevivência e alimentação (STEEN *et al.*, 2006). Para este fim os carrapatos utilizam a saliva, uma fonte rica em moléculas bioativas. Destas, os inibidores de agregação plaquetária e coagulação sanguínea, compostos anti-inflamatórios e imunossupressores têm sido estudados (FRANCISCHETTI *et al.*, 2009).

Mais recentemente a ação das moléculas derivadas de diversos parasitas hematófagos, inclusive da saliva do carrapato sobre as neoplasias vêm sendo estudadas. Destaca-se a proteína anticoagulante de nemátode rNAPc2, que demonstrou promissor potencial antitumoral quando administrada em camundongos inoculados com as células de carcinoma de colo murino CT26 (ZHAO *et al.*, 2009).

Proteínas inibidoras que carrapatos possuem, como Ixolaris, que é uma proteína derivada das glândulas salivares do carrapato *Ixodes scapularis*, já demonstrou eficiência antiangiogênica frente à linhagem celular U87-MG, um modelo primário de glioblastoma (CARNEIRO-LOBO *et al.*, 2009) e também em células de melanoma, um tipo de câncer consideravelmente metastático, através de seu potencial antiangiogênico (DE OLIVEIRA ADA *et al.*, 2012). Amblyomin-X, uma proteína derivada das glândulas salivares

do carrapato *Amblyomma cajennense*, demonstrou reduzir a massa tumoral e alguns efeitos metastáticos em modelos murinos de melanoma (CHUDZINSKI-TAVASSI *et al.*, 2010), além de induzir apoptose em células de câncer renal murino de maneira dose dependente (AKAGI *et al.*, 2012). Também foi avaliado os efeitos da saliva do carrapato *Dermacentor variabilis* na migração, invasão e atividades sinalizadoras de células de osteosarcoma, Saos-2, e células tumorais de mama, MDA-MB-231, e pode-se concluir que os constituintes da saliva desse carrapato são capazes de modular a atividade migratória e invasiva de células do hospedeiro, inclusive das células tumorais testadas (POOLE *et al.*, 2013).

Considerando a gravidade do câncer e sua elevada prevalência, a possibilidade de obtenção de moléculas a partir de extratos de plantas e secreções de animais como ferramentas potenciais para combater seus vários tipos é um objeto importante na pesquisa em saúde (SHAFI *et al.*, 2009). Neste trabalho foram identificados os efeitos da saliva bruta de 03 espécies de carrapatos sobre linhagens celulares tumorais de câncer de mama.

1.1. Linhagens celulares tumorais de câncer de mama

Para execução do presente trabalho, foram definidas três linhagens celulares características de pesquisas em câncer de mama, sendo elas MCF-7, MDA-MB-231 e células de Ehrlich; e uma linhagem de célula mamária não tumoral, MCF-10A.

A MCF-7 é uma linhagem celular de câncer de mama, que foi isolada na década de 1970, extraídas de uma mulher de 69 anos de idade que faleceu neste mesmo ano, acometida pela doença. MCF-7 é a sigla de Michigan Cancer Foundation-7, referindo-se ao instituto em Detroit no qual essa linhagem celular foi estabelecida em 1973 por Hebert Soule e colaboradores (SOULE *et al.*, 1973). Dentre as principais características das células MCF-7, pode-se citar: seu tumor primário caracteriza-se por ser um carcinoma ductal invasivo de mama; as células se originam por efusão pleural; existe a presença de receptores de estrogênio e progesterona e resposta proliferativa à estrogênio; fenótipo tipo epitélio luminal. Esta linhagem de células apresentam várias características do epitélio mamário diferenciados, incluindo a capacidade de processar estradiol via receptores de estrogênio citoplasmáticos e a capacidade de formar cúpulas (LACROIX *et al.*, 2004).

A linhagem celular MDA-MB-231 é uma linhagem celular de câncer de mama humano metastático originalmente isolada no início de 1970. Estas células possuem morfologia epitelial semelhantes e apresentam propriedades invasivas quando cultivadas *in vitro* e quando

transplantadas em camundongos. A linhagem celular MDA-MB-231 é largamente utilizado como um modelo para o receptor negativo de estrogênio do câncer da mama, com aplicações em estudos de tumorigenicidade, metástase e invasão celular (CAILLEAU *et al.*, 1974).

O tumor de Ehrlich foi introduzido por Ehrlich em 1886 e descrito em 1906 como um carcinoma mamário de camundongos fêmeas. Inicialmente, o tumor foi desenvolvido experimentalmente sob a forma sólida, sendo transplantado em animais da mesma espécie. Somente em 1932, com Loewenthal & Jahn, é que surgiu a forma ascítica, ou seja, aquela desenvolvida no peritônio de animais inoculados com células tumorais. A indução experimental dessa neoplasia em camundongos é feita por intermédio do transplante das células tumorais retiradas de um animal já com a neoplasia desenvolvida. Assim, são retirados cerca de 0,3mL (para a indução da forma ascítica) a 0,5mL (para indução da forma sólida) de líquido ascítico de camundongos Swiss e inoculados diretamente no camundongo receptor. Essa inoculação poderá ser feita diretamente no peritônio do receptor — levando ao desenvolvimento da forma ascítica — ou diretamente no subcutâneo ou no coxim plantar — ambas as localizações levando à formação do tumor sólido. Devido às suas características didáticas e de facilidade de manuseio experimental, o tumor de Ehrlich tem sido extensamente aplicado para a chamada Oncologia Experimental, um ramo da Oncologia Comparada dedicado ao desenvolvimento dos chamados tumores transplantáveis ou transmissíveis. (DAWE, 1982).

Já a linhagem celular MCF-10A é uma linhagem imortalizada espontaneamente, mas não transformada, de células epiteliais mamárias humanas, derivadas do tecido mamário de uma mulher com 36 anos de idade, com mudanças fibrocísticas. Estas células apresentam numerosas características de epitélio mamário normal, incluindo a ausência de tumorigenicidade em camundongos e a dependência de fatores de crescimento e hormonais para proliferação e sobrevivência (SOULE *et al.*, 1990).

1.2. Carrapatos

Os carrapatos são ectoparasitos importantes para a Saúde Pública e animal por transmitirem agentes infecciosos e causarem injúrias a seus hospedeiros durante a hematofagia. Muitas espécies estão associadas a hospedeiros específicos e aos seus habitats, não representando perigo para a indústria animal ou para a saúde humana (BARROS-BATTESTI *et al.*, 2006). Além disso, existem mais de 800 espécies de carrapatos em todo o mundo; 64 destas espécies se encontram no Brasil, apresentando-se nas mais diversas condições

ambientais, bem como alimentam-se em vários hospedeiros de espécies diferentes, daí a quantidade e diversidade de moléculas bioativas presentes na saliva das diversas espécies de carrapatos pode variar consideravelmente. (MARTINS *et al.*, 2014).

1.2.1. *Amblyomma sculptum* (Complexo *Amblyomma cajennense*)

Recentemente a espécie *Amblyomma cajennense* passou por uma reavaliação taxônômica, com base em análises morfológicas de carrapatos de toda a área de distribuição da Argentina ao Sul do México (BEATI *et al.*, 2013; NAVA *et al.*, 2014). Esta reavaliação resultou na descrição do complexo *Amblyomma cajennense*, constituído pelo *Amblyomma cajennense* s. s., validação de duas espécies reduzidas a sinônimas no passado (*Amblyomma mixtum* e *Amblyomma sculptum*) e descrição de três novas espécies (*Amblyomma tonelliae* n. sp., *Amblyomma interandinum* n. sp. e *Amblyomma patinoi* n. sp.) (NAVA *et al.*, 2014). A espécie *Amblyomma sculptum* está distribuída das áreas úmidas do norte da Argentina, para as regiões contíguas da Bolívia e do Paraguai e os estados das regiões costeiras e Centro Oeste do Brasil (NAVA *et al.*, 2014). Assim sendo, relatos anteriores com *Amblyomma cajennense* nestas regiões do Brasil, devem ser considerados como referentes ao *A. sculptum* (RAMOS *et al.*, 2014).

As populações de *A. sculptum* são as espécies de carrapatos mais prevalentes tanto no ambiente quanto nos animais dentro do Bioma Cerrado (SZABÓ *et al.*, 2007; VERONEZ *et al.*, 2010). Diversos mamíferos podem servir como hospedeiros para os diferentes estágios (larvas, ninfas e adultos) desta espécie, de animais silvestres a domésticos, incluindo o homem, sendo o principal transmissor da febre maculosa no Brasil (RAMOS *et al.*, 2014; LABRUNA, 2009).

1.2.2. *Amblyomma parvum*

A espécie Neotropical *Amblyomma parvum* é um carrapato que ocorre desde a região sudeste do México até a região norte da Argentina (LABRUNA *et al.*, 2005), que parasita animais domésticos, silvestres e eventualmente, o homem (NAVA *et al.*, 2006) e é um vetor potencial de *Ehrlichia chaffensis* e de algumas espécies de patogenicidade desconhecida de *Rickettsia* (PACHECO *et al.*, 2013). No Brasil, ocorre principalmente dentro do Bioma Cerrado (GERARDI *et al.*, 2013), e alguns de seus constituintes salivares proteicos foram estudados visando controle desses ectoparasitos e das doenças transmitidas pelos mesmos (GARCIA *et al.*, 2014). Assim como o *A. sculptum*, é capaz de parasitar diversas espécies de hospedeiros (GERARDI *et al.*, 2013).

1.2.3. *Rhipicephalus sanguineus*

Conhecido como o “carrapato marrom do cão”, o *Rhipicephalus sanguineus* é a espécie de carrapato mais amplamente distribuída no mundo (PEGRAM *et al.*, 1987) e tem sido associado à várias doenças, como por exemplo a erliquiose e a babesiose (CUPP, 1991), que são essencialmente caninas, mas podem esporadicamente ocorrer em outros mamíferos, incluindo o homem (FERREIRA e SILVA, 1998). Alguns estudos com a saliva dessa espécie foram realizados, analisando a resposta imune do hospedeiro (FERREIRA e SILVA, 1998), o papel na veiculação de patógenos (MILHANO *et al.*, 2015) e a descrição das principais moléculas presentes em sua saliva, com funções diversas, como imunomodulação, vasodilatação e inibição da agregação plaquetária (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

1.3. A utilização da saliva de carrapato em pesquisas

A incidência de doenças transmitidas por carrapatos aumentou significativamente ao longo dos últimos anos (STEERE *et al.*, 2004; DUMLER *et al.*, 2005), resultando num aumento acentuado na pesquisa das interações parasito-hospedeiro. Como resultado, o conhecimento das moléculas presentes na saliva do carrapato e suas funções tem expandido de forma gradual (BROSSARD e WIKEL, 2004; VALENZUELA, 2004).

Carrapatos são ectoparasitas hematófagos obrigatórios presentes em todo o mundo. Durante sua alimentação, eles se mantem fixos em seu hospedeiro por vários dias, introduzindo saliva em sua pele. Assim como a saliva de outros animais hematófagos, como mosquitos, moscas, algumas espécies de nematódeos, dentre outros, a saliva do carrapato contém diversas moléculas fisiologicamente ativas que são cruciais para manutenção da fixação do carrapato no hospedeiro ou para a transmissão de patógenos (RAMAMOORTHY *et al.*, 2005), que interagem com processos do hospedeiro, incluindo coagulação e fibrinólise, imunidade e inflamação e angiogênese (FUKUMOTO *et al.*, 2006; MARITZ-OLIVIER *et al.*, 2007). Apesar da pesquisa crescente, a atividade farmacológica de poucas moléculas da saliva de carrapatos foi elucidada. Em Kazimirová *et al.* (2013), foram revisadas as descrições de diversas substâncias com grande importância na pesquisa, como por exemplo, as substâncias tHRF da saliva do carrapato *Ixodes scapularis* e IRS-2 da saliva do *Ixodes ricinus*, vasodilatadores que podem agir modulando a permeabilidade vascular (DAI *et al.*, 2010; CHMELAR *et al.*, 2011). Inibidores de agregação

plaquetária e da cascata de coagulação também foram descritos, além de substâncias ligadas diretamente à resposta imune do hospedeiro (KAZIMIROVÁ e STIBRANIOVÁ, 2013).

Uma análise proteômica da saliva do carrapato *Rhipicephalus microplus* comprovou a existências de várias moléculas bioativas que inibem a defesa do hospedeiro contra a atividade de alimentação do parasita, lipocalinas, peptidases, peptídeos antimicrobianos dentre outras (TIRLONI *et al.*, 2014).

Portanto, existem potencialmente muitas dessas moléculas com efeitos variados por descobrir no amplo espectro de carrapatos, 64 espécies no Brasil (MARTINS *et al.*, 2014) e nas quase 900 espécies no mundo (NAVA *et al.*, 2009). Estas potenciais variações na saliva se devem às variadas condições ecológicas e de especificidade por hospedeiros das diversas espécies de carrapato (SONENSHINE *et al.*, 2002). Pelos motivos expostos carrapatos podem ser considerados uma fonte importante de moléculas com propriedades terapêuticas, já que as moléculas usadas por esses ectoparasitos para evadir as respostas imune e homeostática possuem alta eficiência, e baixa imunogenicidade para o homem e para os animais domésticos.

1.4. A saliva de carrapato e o câncer

A saliva do carrapato é produzida por uma par de glândulas salivares altamente desenvolvidas e é tão eficaz no controle dos mecanismos de resposta do hospedeiro que os carrapatos são considerados “farmacologistas” (RIBEIRO, 1995). Alguns componentes da saliva do carrapato tem propriedades com um maior potencial antitumoral, tendo sido identificados e caracterizados. Por exemplo, a proteína Amblyomin X, extraída da saliva do carrapato da espécie *Amblyomma sculptum* (complexo *Amblyomma cajennense*) é um importante candidato para a terapia antitumoral, pois exerce efeitos citotóxicos em diversos tipos de células tumorais, incluindo o tumor de pâncreas e melanoma (SIMONS *et al.*, 2011). Além disso, a Amblyomin X induz uma regressão da massa tumoral e redução no número de eventos metastáticos em uma linhagem de melanoma murino (B16F10), possivelmente por segmentação do sistema ubiquitina-proteassoma, agindo em células tumorais que induzem a morte celular apoptótica (CHUDZINSK-TAVASSI *et al.*, 2010). Akagi *et al.* (2012) testaram o efeito biológico da Amblyomin X, na indução de morte celular pelo processo de apoptose *in vitro* em carcinoma de células renais (células Renca), sendo que comprovaram que Amblyomin X induz apoptose em células Renca de maneira dose-dependente (AKAGI *et al.*, 2012).

A proliferação celular, migração e invasão, uma característica de várias reações celulares, ocorrendo também em células neoplásicas, são inibidos pela saliva de várias espécies de carrapato (CARVALHO-COSTA *et al.*, 2015). O trabalho de Poole *et al.* (2013) apresenta resultados promissores da utilização da saliva em diferentes tipos de tumores, como citado anteriormente. Essa saliva também afeta a angiogênese, outra característica essencial do crescimento neoplásico. De acordo com Francischetti *et al.* (2010), a saliva pode atenuar a angiogênese por pelo menos dois mecanismos, como o bloqueio de integrina de células endoteliais e interferência de funções celulares referentes à cicatrização (FRANCISCHETTI *et al.*, 2010). Islam *et al.* (2012) apresentou a Haemangina, substância derivada do carrapato *Haemaphysalis longicornis*, que interrompe a angiogênese pela inibição da proliferação de células endoteliais e indução de apoptose (ISLAM *et al.*, 2012). Além disso, dados recentes demonstraram que a saliva e seus componentes isolados tem significativa atividade citotóxica seletiva em células tumorais (revisto por SOUSA *et al.*, 2015).

Finalmente, a descoberta de moléculas com propriedades terapêuticas e antitumorais é extremamente importante tanto para os seres humanos, quanto para os animais, domésticos e silvestres, visto de todos são afetados por vários tipos de tumores, e a busca de um tratamento menos prejudicial e mais eficaz torna-se essencial para a manutenção da qualidade de vida.

2. JUSTIFICATIVA

Diante da necessidade de terapias mais eficazes para tratamento das doenças que mais prejudicam a qualidade de vida da população, o câncer em especial, torna-se necessária a pesquisa de novos fármacos.

Neste trabalho, considerando a capacidade moduladora sobre as atividades celulares dos hospedeiros, avaliou-se o efeito da saliva dos carrapatos das espécies, *Amblyomma sculptum*, *Amblyomma parvum* e *Rhipicephalus sanguineus* sobre linhagens celulares tumorais de mama, no intuito de obter resultados favoráveis a utilização das substâncias presentes na saliva para que, futuramente, seja possível o desenvolvimento de novos fármacos e tratamentos anti-tumorais.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar o efeito da saliva dos carrapatos das espécies *Rhipicephalus sanguineus*, *Amblyomma sculptum* e *Amblyomma parvum* sobre linhagens celulares de câncer de mama MCF-7, MDA-MB-231 e células de Ehrlich.

3.2. Objetivos Específicos

1. Aperfeiçoar a técnica de coleta da saliva dos carrapatos, priorizando a preservação da mesma de forma a minimizar sua contaminação por agentes externos;
2. Avaliar e comparar possíveis efeitos citotóxicos das salivas das 03 espécies de carrapatos sobre as linhagens celulares de câncer de mama (MCF-7, MDA-MB-231 e células de Ehrlich);
3. Verificar os aspectos morfológicos das células após o tratamento com a saliva;
4. Investigar a ocorrência de apoptose e necrose nas linhagens de células tumorais após o tratamento com a saliva;
5. Analisar a via pela qual ocorre o processo de morte celular, através da análise da presença da atividade da caspase-3/7 nas células tumorais tratadas com a saliva dos carrapatos.

4. METODOLOGIA

4.1. Linhagens celulares tumorais

Foram utilizadas as seguintes linhagens tumorais características do câncer de mama: humanos - MCF-7, MDA-MB-231; e camundongos – células de Ehrlich, além das linhagem celular MCF-10A, uma linhagem de células mamárias não transformadas, utilizadas como controle. A célula MCF-7 foi cultivada em meio RPMI-1640 (Sigma, St. Louis, MI) enriquecido com soro fetal bovino inativado a uma concentração de 10% e mantidas em uma estufa de CO₂ a 37°C com 5% CO₂. A célula MDA-MB-231 foi cultivada da mesma maneira que as anteriores; no entanto, foram mantidas em uma estufa a 37°C sem CO₂, de acordo com as recomendações da ATCC (American Type Culture Collection). As células de Ehrlich foram subcultivadas na região peritoneal de camundongos BALB/c e coletadas a partir do líquido ascítico gerado, sendo prontamente utilizadas nos experimentos. A célula MCF-10A foi cultivada em meio DMEM (Sigma, St. Louis, MI) enriquecido com soro fetal bovino a uma concentração final de 5%, insulina humana a uma concentração final de 10 µg/mL, fator de crescimento epidermal a uma concentração final de 10 ng/mL e mantidas em uma estufa de CO₂ a 37°C com 5% de CO₂, de acordo com as recomendações da ATCC.

4.2. Carrapatos

As colônias de carrapatos *Amblyomma sculptum*, *Amblyomma parvum* e *Rhipicephalus sanguineus* foram criadas e mantidas no Laboratório de Ixodologia da Faculdade de Medicina Veterinária, na Universidade Federal de Uberlândia (LABIX-UFU). As infestações foram realizadas dentro de câmaras de alimentação, de material plástico, fixadas com uma cola no dorso tricotomizado de coelhos brancos New Zealand saudáveis. Para tanto, cilindros de plástico transparente foram colados a uma peça de borracha cortada em formato de disco contendo uma janela central com diâmetro equivalente ao do cilindro utilizado. Sob o disco de borracha foi colado um tecido de algodão de dimensão e formato iguais ao do disco, com o objetivo de tornar a superfície do disco adequada para a fixação na pele. A câmara de alimentação então foi fechada com uma tampa perfurada, após colocação dos carrapatos na referida câmara (Fig.1). Os coelhos são utilizados para alimentação dos carrapatos tanto para

coleta de saliva, quanto para perpetuação das colônias das espécies citadas, sendo estas mantidas em uma estufa incubadora umidificada, a uma temperatura de 29°C.



Fig.1. Coelho utilizado para manutenção das colônias e alimentação dos carrapatos. No detalhe à direita, uma câmara de alimentação com fêmeas de *R. sanguineus* ingurgitadas.

4.3. Coleta de saliva dos carrapatos

Para a coleta de saliva foram realizadas infestações com 05 câmaras de alimentação em cada coelho (coelho branco New Zealand), onde foram liberados, em média, 25 fêmeas e 10 machos de carrapatos em cada câmara. Foram infestados coelhos diferentes para cada espécie de carrapato. Após cerca de 07 a 10 dias, dependendo da espécie, as fêmeas dos carrapatos semi ingurgitadas e ingurgitadas foram recolhidas, limpas com PBS 10% em temperatura ambiente (25°C), e foi inoculado subcuticularmente na hemocle cerca de 10 a 20 μ L de solução de Dopamina a 0,2%, com auxílio de uma agulha 12,5 x 0,33 mm. Os carrapatos foram então fixados em uma fita crepe, previamente disposta em uma superfície plana, rígida e limpa com álcool a 70%. A coleta da secreção salivar foi realizada com uma pipeta automática, sendo a saliva armazenada em eppendorfs de 2,0 mL mantidos em banho de gelo. Em seguida, foram filtradas em filtros com poros de 22 μ m e armazenadas a -80°C até o uso (Fig. 2). A concentração de proteínas foi quantificada através do método de Bradford. As coletas foram realizadas durante os 02 anos da pesquisa.

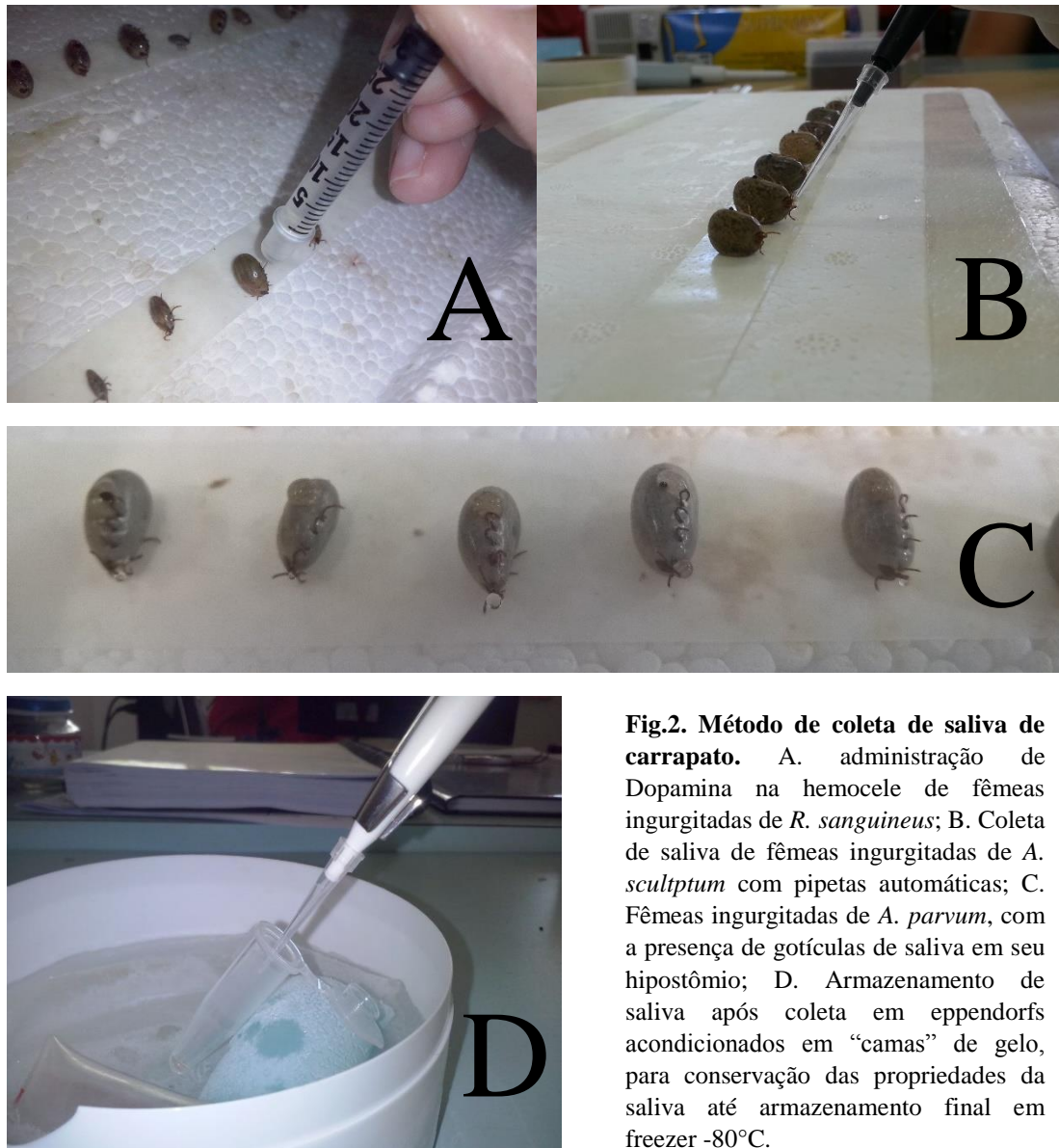


Fig.2. Método de coleta de saliva de carrapato. A. administração de Dopamina na hemocele de fêmeas ingurgitadas de *R. sanguineus*; B. Coleta de saliva de fêmeas ingurgitadas de *A. sculptum* com pipetas automáticas; C. Fêmeas ingurgitadas de *A. parvum*, com a presença de gotículas de saliva em seu hipostômio; D. Armazenamento de saliva após coleta em eppendorfs acondicionados em “camas” de gelo, para conservação das propriedades da saliva até armazenamento final em freezer -80°C.

4.4. Avaliação das alterações morfológicas

As alterações morfológicas e danos celulares foram qualitativamente investigados utilizando um microscópio digital invertido e fase de contraste (EVOSfl-AMG, Seattle, EUA). Para este propósito, as linhagens celulares MCF-7, MDA-MB-231 e MCF-10A foram cultivadas em uma placa de 48 poços, com uma quantidade total de 1×10^6 células/poço, sendo tratadas ou não com saliva pura em uma quantidade de 100 μ L ou 35 μ g/mL (quantidade essa definida após realização de outros experimentos e sendo padronizada por provocar alterações celulares), sendo incubadas em uma estufa a 37°C por 24 horas.

4.5. Ensaio de citotoxicidade – MTT

O ensaio com MTT é um ensaio colorimétrico para avaliar a viabilidade celular. Neste estudo, foram utilizadas placas de 96 poços com um número de 2×10^5 células/poço. Foram então colocados 150 μL de células das 04 linhagens celulares utilizadas, em placas diferentes, enriquecidas com meio RPMI, e 50 μL de saliva pura em cada poço (35 $\mu\text{g/mL}$), sendo dispostos em triplicatas. As placas foram então mantidas em uma estufa de CO_2 a 5% com uma temperatura de 37°C durante 24 horas. Após esse tempo, o meio foi removido dos poços, sendo adicionado 190 μL de RPMI e 10 μL de MTT (5mg/mL) em cada poço e as placas foram envolvidas com papel laminado, de forma a não ficarem expostas a luminosidade, e acondicionadas novamente na estufa sob as mesmas condições anteriormente descritas, por um período de 4 horas. Decorrido o tempo, o meio foi removido novamente, acrescentando 100 μL de solução detergente (Dodecil Sulfato de Sódio) SDS/50%DDF (Dimetil Formamida) para dissolução dos cristais formados pelo MTT. Após, as placas foram lidas em um espectrofotômetro, com uma absorbância de 540 nm.

4.6. Avaliação de Apoptose e Necrose

Para verificação da ocorrência dos eventos de apoptose e necrose nas células tumorais, após exposição aos diferentes tipos de saliva de carrapatos utilizadas na pesquisa, foi utilizado o kit FITC Annexin V/ 7AAD Apoptosis Detection (BD Pharmigen™, San Jose, Califórnia, EUA). Após incubação de 1×10^6 células/ poço em placas de 48 poços com 100 μL de saliva/poço (35 $\mu\text{g/mL}$), durante 24 horas, as células tumorais foram descoladas da placa, retirando-se o meio e adicionando 50 μL de Tripsina, encubando a placa por 20 minutos em uma estufa de CO_2 a 37°C . Foram então lavadas duas vezes com PBS frio e, em seguida, ressuspensas em um tampão de ligação em uma concentração de 1×10^6 células/ mL. Depois, 100 μL da solução foram transferidos para um tubo de cultura de 5mL, adicionando-se 5 μL de FITC Annexin V e 5 μL de 7AAD. As células foram suavemente agitadas e incubadas durante 15 minutos a temperatura ambiente (25°C) no escuro. Depois, foram adicionados 400 μL de tampão de ligação de 1x em cada tubo. A análise foi realizada por citometria de fluxo, no intervalo de tempo de 01 hora.

4.7. Análise da via de ocorrência de apoptose pela presença de Caspase-3/7

Foi utilizado o kit Caspase-Glo® 3/7 Assay (Promega Corporation · Madison, WI, USA), é um ensaio homogêneo, luminescente que mede a atividade de caspase-3 e -7. Foi removido das placas de 96 poços um conteúdo de 10^5 células tumorais, previamente tratadas e incubadas com diferentes tipos de saliva de carrapato pura durante 24 horas, até que as placas atingissem o equilíbrio à temperatura ambiente. Foi adicionado 100 µL do reagente Caspase-Glo® 3/7 Assay para cada poço, em uma placa de 96 poços de paredes e fundo brancos, contendo 100 µL de branco, células de controle negativo ou de células tratadas em meio de cultura RPMI. A placa foi coberta com uma tampa e o conteúdo dos poços foi misturado suavemente, utilizando um agitador de placas em 300-500 rpm durante 30 segundos e incubado à temperatura ambiente durante 2 horas. A luminescência foi mensurada utilizando-se o luminômetro de placas GloMax® 96 (Promega Corporation · Madison, WI, USA).

4.8. Aspectos éticos do estudo

Todos os experimentos com animais foram realizados em conformidade com os protocolos aprovados pela Comissão de Ética na Utilização de Animais da Universidade Federal de Uberlândia (CEUA-UFU), sob o número 033/14.

4.9. Análise estatística

Os experimentos foram realizados em triplicata. A significância das diferenças entre os tratamentos dos diferentes tipos de saliva de carrapato e células tumorais foi determinada pelos métodos One way ANOVA, utilizando pós-teste de Tukey e Bonferroni no GraphPad Prism versão 6.01 (©GraphPad Software Inc, 2007). Os resultados foram considerados estatisticamente significantes quando $P < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Coleta da saliva dos carrapatos

Os resultados das coletas de saliva estão apresentados na Tabela 1 e Figura 3. Para análise foram consideradas as médias de 05 coletas de saliva de cada espécie por período do dia, totalizando 45 coletas e um total de 20 fêmeas por coleta. Foram observadas diferenças na coleta conforme a espécie e horário de coleta.

ESPÉCIE	MANHÃ (07:00-11:00)	TARDE (13:00-17:00)	NOITE (19:00-21:00)
<i>Amblyoma sculptum</i>	1250 μ L	650 μ L	950 μ L
<i>Amblyomma parvum</i>	550 μ L	215 μ L	250 μ L
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	345 μ L	180 μ L	300 μ L

Tabela 1: Relação entre espécies de carrapatos utilizados nas coletas; períodos do dia nos quais as coletas foram realizadas e quantidade de saliva coletada (\pm SD).

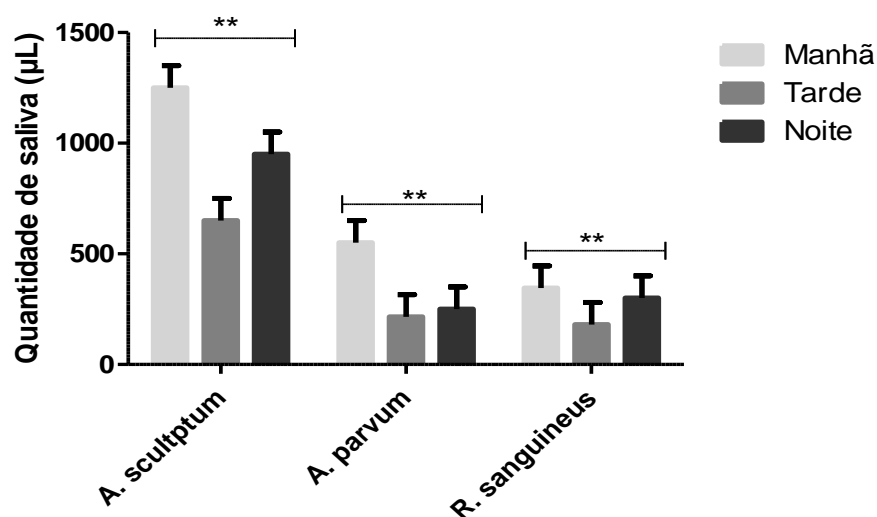


Fig.3. Gráfico representando as diferenças estatísticas entre as coletas de saliva de diferentes espécies de carrapato em diferentes períodos do dia. A diferença média entre as espécies foi calculada considerando o desvio padrão entre as coletas por espécie e por período do dia, tendo os valores considerados significativos, com valor de $P < 0,01$ (**).

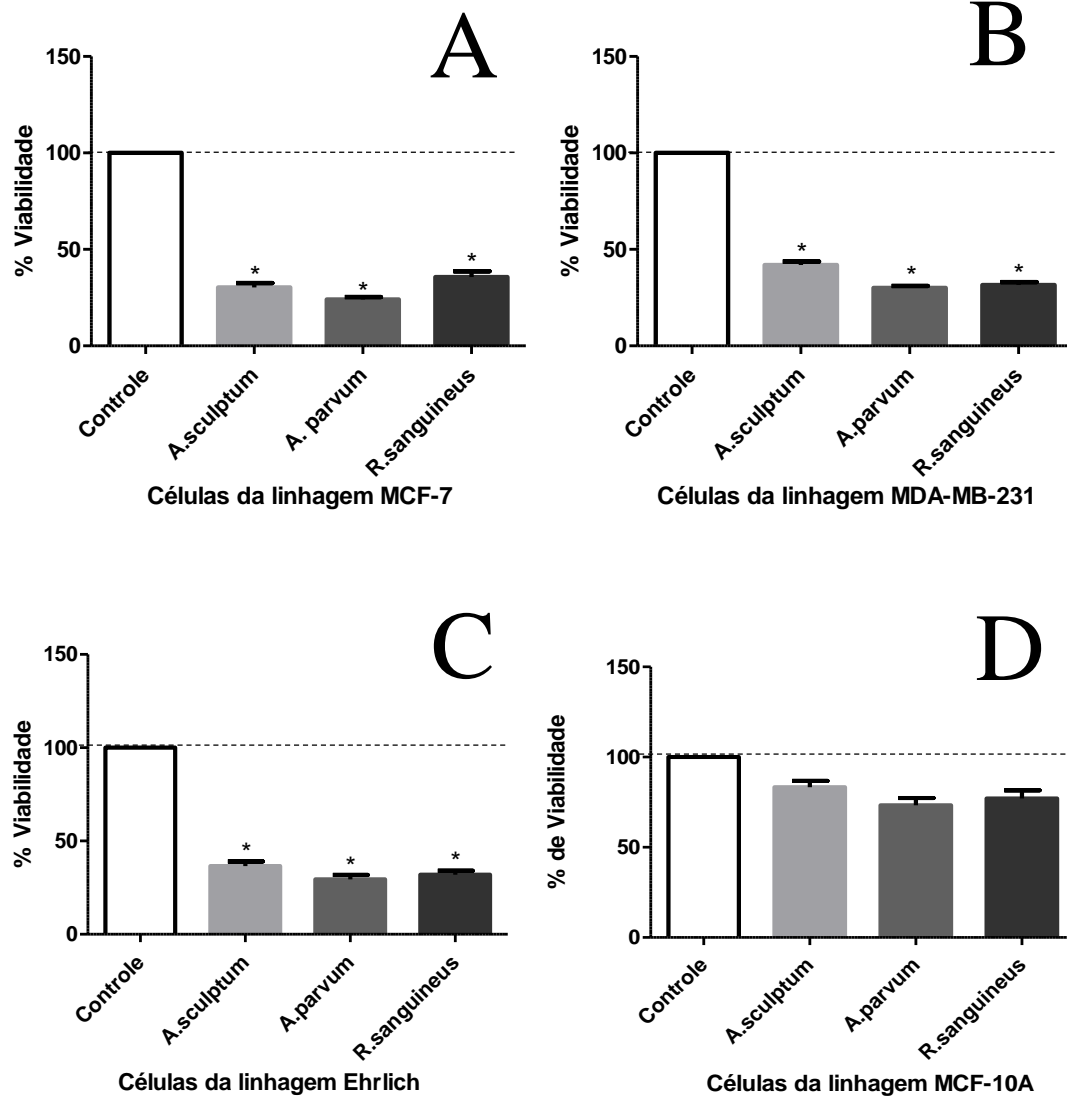
Conforme pode-se observar na Figura 3, existe uma diferença significativa na quantidade de saliva coletada por espécie e por período do dia. O carrapato *Amblyomma sculptum* apresentou a maior quantidade de secreção salivar por coleta, independentemente do horário da coleta e o *Amblyomma parvum* produziu mais saliva que o *R. sanguineus*, mas apenas no período da manhã. Ficou também evidente nas 03 espécies de carrapato uma maior produção de saliva no período da manhã, com uma queda no período da tarde e um novo aumento no período noturno.

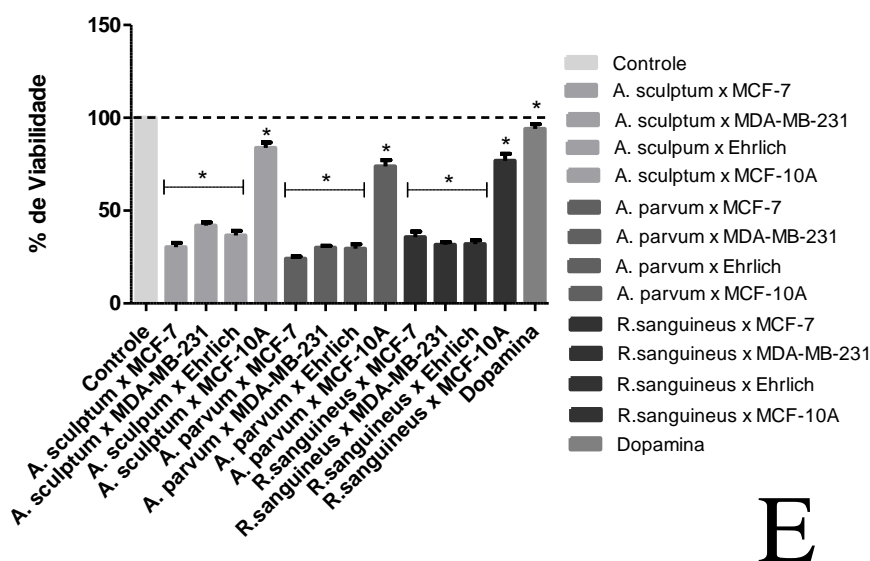
5.2. Citotoxicidade da saliva dos carrapatos frente às linhagens celulares MCF-7, MDA-MB-231, Ehrlich e MCF-10A

Para avaliar a viabilidade celular foi utilizado um ensaio colorimétrico com MTT. Este ensaio baseia-se na medida do dano induzido pelo composto/extrato em estudo no metabolismo celular de glicídeos usualmente através da avaliação da atividade de desidrogenases mitocondriais. A viabilidade mitocondrial, e consequentemente, a viabilidade celular, é quantificada pela redução do MTT (um sal de coloração amarela e solúvel em água) a formazan (sal de coloração arroxeada e insolúvel em água) pela atividade daquelas enzimas. Dessa forma, a redução do MTT a formazan, será diretamente proporcional à atividade mitocondrial e a viabilidade celular. A leitura da placa foi realizada em um espectrofotômetro, com um comprimento de onda de 540 nm.

As diferentes linhagens celulares tumorais MCF-7, MDA-MB-231, Ehrlich, e a linhagem de células mamárias não transformadas MCF-10A, foram tratadas com uma quantidade de 50 µL de saliva pura por poço (35 µg/mL), quantidade essa definida após realização de outros ensaios com concentrações diferentes, sendo que esta utilizada foi aquela que demonstrou ser citotóxica às células utilizadas na pesquisa. O tempo de exposição das células tumorais à saliva foi de 24 horas, haja visto que em testes com tempo superior ao citado (até 48 horas) mantiveram os mesmos níveis de citotoxicidade visualizados no tempo de 24 horas, sem aumento ou diminuição; e em tempos inferiores (até 12 horas), não houve citotoxicidade considerável. Foi utilizada a mesma quantidade de saliva de todas as espécies de carrapato e mesmo tempo para análise para todas as linhagens celulares utilizadas na pesquisa. A quantidade de células utilizadas foi de 1×10^5 células por poço, independente da linhagem celular analisada. Os experimentos foram realizados em triplicata, com um número mínimo de 05 experimentos independentes, realizados para cada linhagem celular e cada tipo de saliva. Também foi realizado um teste comparativo entre os três tipos de saliva e a dopamina 0,2%,

substância utilizada para estimular a secreção salivar dos carrapatos, visando eliminar quaisquer hipótese de que a mesma poderia interferir ou influenciar a ocorrência de citotoxicidade nas células tumorais tratadas com a saliva. O coeficiente de variação entre os experimentos ficou em torno de 6,15% para todos os testes e um valor de $P < 0,05$ foi considerado significativo para os resultados apresentados.





Linhagens celulares e respectivos tratamentos com a saliva dos carrapatos

Fig.4. Ensaio de citotoxicidade utilizando os diferentes tipos de saliva de carrapato com as diferentes linhagens celulares tumorais. Em A. linhagem MCF-7; B. MDA-MB-231; C. Ehrlich; D. MCF-10A; e E. Comparação de todos os testes de MTT com a Dopamina. Houve citotoxicidade significativa quando comparadas aos controles, mas não houve diferença de citotoxicidade entre as salivas no mesmo tipo de célula. Já na linhagem MCF-10A não apresentou citotoxicidade, demonstrando que a saliva não causou danos às células não transformadas. A Dopamina não apresentou citotoxicidade em nenhum tipo de célula tumoral, sendo demonstrado no gráfico a média geral de viabilidade apresentada em todos os experimentos com todas as linhagens celulares e tipos de saliva (* $P < 0,05$).

De acordo com os resultados obtidos, pode-se notar que a saliva é citotóxica para todas as linhagens celulares em níveis semelhantes, sendo que a média da porcentagem de viabilidade varia de 20 a 40% entre as salivas das diferentes espécies. A saliva da espécie *A. sculptum* demonstrou ser mais citotóxica para a linhagem MCF-7, demonstrando uma média de viabilidade em torno de 30,36% (considerando \pm SD 1,079) (Fig. 4 A), quando comparada à linhagem do tumor ascítico de Ehrlich (36,5% \pm SD 1,174) (Fig. 4 C), e à linhagem MDA-MB-231 (41,87% \pm SD 0,7292), sendo essa mais resistente à saliva do carrapato da espécie supracitada (Fig. 4 B); no entanto, quando realizado tratamento na linhagem MCF-10A, foi verificada uma média de viabilidade foi de 83,3% (\pm SD 1,109), demonstrando que a saliva não apresentou citotoxicidade diante dessa linhagem celular (Fig. 4 D).

A saliva do carrapato da espécie *A. parvum* apresentou citotoxicidades semelhantes para todos os tipos celulares utilizados na pesquisa, sendo que os valores médios da viabilidade entre os tipos celulares foram de: 24,01% para a linhagem MCF-7 (Fig. 4 A); 30,03% para a linhagem MDA-MB-231 (Fig. 4 B); 29,40% para a linhagem de Ehrlich (Fig. 4 C); e, demonstrou leve

citotoxicidade para a linhagem MCF-10A, apresentando um valor médio de viabilidade de 73,33% (Fig. 4 D).

As células tratadas com a saliva do carrapato da espécie *R. sanguineus* também apresentaram comportamento semelhante às anteriormente citadas, com os seguintes valores médios de viabilidade: 35,68% na linhagem MCF-7 (Fig. 4 A); 31,51% para a linhagem MDA-MB-231 (Fig. 4 B); 31,99% para a linhagem do tumor de Ehrlich (Fig. 4 C); e, novamente, apresentou leve citotoxicidade para a linhagem MCF-10A, com média de viabilidade de 77% (Fig. 4 D).

Pode-se observar que a linhagem celular MDA-MB-231 apresentou maior viabilidade dentre as linhagens tumorais testadas, possivelmente por ser uma linhagem mais agressiva e resistente que as demais, sendo necessários mais estudos para confirmar essa hipótese. Além disso, nenhum dos tipos de saliva dos carrapatos utilizados nesta pesquisa foi citotóxico, de acordo com o ensaio de MTT realizado, para a linhagem celular não transformada MCF-10A, sugerindo que a saliva de carrapato pode apresentar propriedades e componentes que reconheçam e causem danos apenas em tipos celulares tumorais. No entanto mais pesquisas devem ser realizadas no intuito de aprimorar essas questões e isolar as substâncias responsáveis por esses efeitos.

Todas as células foram tratadas com Dopamina 0,2% em ensaios de viabilidade para excluir a possibilidade de o efeito de citotoxicidade observado nas células tumorais tratadas com saliva serem causados por esta substância, utilizados na estimulação da secreção salivar dos carrapatos durante a coleta de saliva. De acordo com os resultados obtidos (Fig. 4. E), a porcentagem de viabilidade das células tratadas com Dopamina 0,2% foi de 94%, em média, em todas as linhagens celulares testadas, tanto as tumorais quanto a linhagem não transformada, comprovando que a Dopamina não exerce efeito no tratamento com a saliva de carrapato.

5.3. Avaliação de alterações morfológicas

A avaliação das alterações morfológicas foi realizada por meio da observação das características celulares quando em condições normais e ideais de cultura e crescimento comparadas às células tratadas com os diferentes tipos de saliva dos carrapatos. Ao finalizar o tratamento, as placas foram retiradas da estufa e fotografadas após 24 horas de incubação com a saliva de carrapato ou PBS (controle), sendo verificadas modificações estruturais em sua superfície e disposição nos poços, de modo geral.

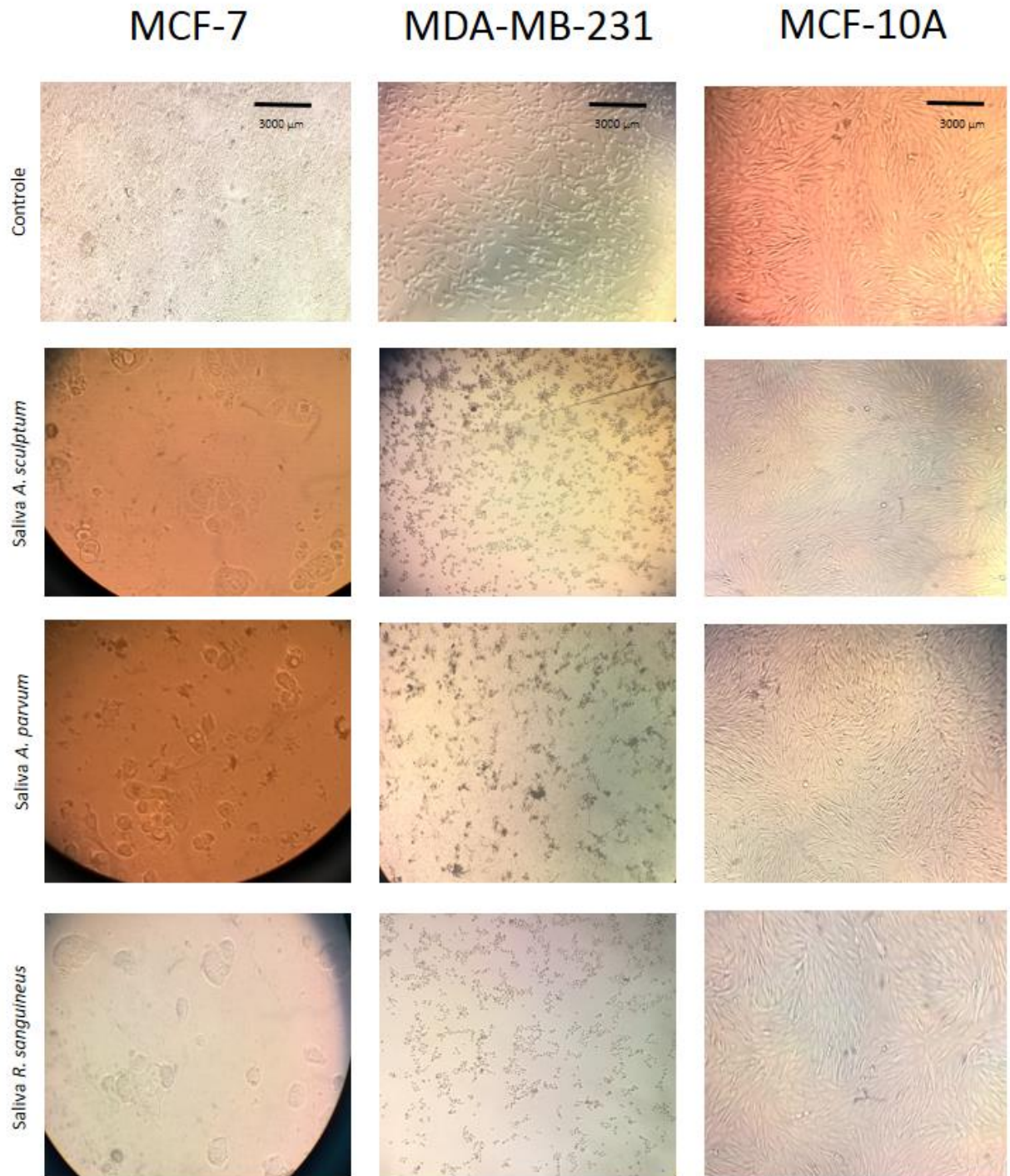


Fig. 5. Imagens das alterações morfológicas das linhagens celulares tumorais e não transformadas expostas as salivas das diferentes espécies de carrapatos.

Como pode ser observado na Figura 5, grandes alterações morfológicas foram observadas, dentre elas o arredondamento das células, alterações na conformação da superfície celular, anormalidade no tamanho e disposição das células, diminuição do número de células. Analisando as imagens de uma forma qualitativa, a linhagem celular que sofreu grandes alterações foi a MCF-7, quando comparado às imagens da MDA-MB-231 e MCF-10A. A

linhagem MDA-MB-231 também apresentou várias anormalidades, principalmente quanto ao formato da célula, se tornando arredondada, e diminuição no número. Já as células da linhagem MCF-10A não apresentaram alterações morfológicas significativas, confirmando e fortalecendo o conceito de que a saliva das espécies dos carrapatos apresentados nesse experimento apresentam atividade antitumoral apenas em células de linhagens tumorais e não causa danos aparentes em células não transformadas.

5.4. Avaliação da Apoptose e Necrose

De um modo geral, a apoptose ou “morte celular programada” pode ser descrita como um tipo de morte celular que ocorre de forma não acidental; como por exemplo: na organogênese e hemopoiese normal e patológica, na reposição fisiológica de certos tecidos maduros, na atrofia dos órgãos, na resposta inflamatória e na eliminação de células após dano celular por agentes genotóxicos (GRIVICICH *et al.*, 2007). A necrose é um tipo de morte na qual as células sofrem uma injúria que resulta em diversas alterações nas estruturas e organelas celulares, causando a liberação do conteúdo celular e, consequente dano às células vizinhas e uma reação inflamatória no local (GRIVICICH *et al.*, 2007).

Nesta pesquisa, após avaliar os efeitos citotóxicos e as alterações morfológicas causados às linhagens celulares tumorais pela saliva das diferentes espécies de carrapatos, procuramos identificar por qual mecanismo tais células morriam, através do kit FITC Annexin V/ 7AAD Apoptosis Detection (BD PharmingenTM, San Jose, Califórnia, EUA), que identifica células em necrose, apoptose e/ou apoptose tardia através da citometria de fluxo. Foram realizados dois experimentos, cada um com triplicatas do branco, controle, e todas as linhagens tratadas. Após a confluência, as células foram tratadas com 50 µL (35 µg/mL) dos 03 tipos diferentes de saliva e incubadas durante 24 horas antes da leitura no citômetro de fluxo.

Os gráficos a seguir apresentam os resultados encontrados, sendo no quadrante inferior esquerdo células viáveis, superior esquerdo células em necrose, superior direito células em apoptose tardia e inferior direito, células em apoptose inicial. Como pode ser observado, as células MCF-7 tratadas com a saliva do carrapato *A. sculptum* apresentaram cerca de 75,3% de apoptose inicial e 28,7% em apoptose tardia, não apresentando valores significativos de células viáveis e/ ou em necrose, demonstrando que a maioria estava em apoptose 24 horas após a exposição à saliva. O tratamento com a saliva de *A. parvum* demonstrou que aproximadamente 85,7% das MCF-7 estavam em apoptose inicial e 18,3% estavam em apoptose tardia. Já com a saliva de *R. sanguineus*, os valores obtidos foram 60,9% de células em apoptose tardia e 39,1%

de células em apoptose inicial, mostrando um padrão diferente em relação às outras duas espécies de saliva com a linhagem MCF-7. Esses valores demonstram que essa linhagem tumoral apresenta degradação principalmente por apoptose inicial, com uma grande dano de suas estruturas, exceto quando tratadas com a saliva de *R. sanguineus*, quando já se encontram, em sua maioria, em estágio final de apoptose. Esse resultado demonstra que apesar de efeitos similares, a saliva do carrapato apresenta diferentes componentes e mecanismos indutores de morte celular na linhagem MCF-7 quando as espécies são diferentes.

A linhagem celular MDA-MB-231 apresentou os seguintes resultados após análise: quando tratadas com saliva de *A. sculptum*, 79,7% estavam em fase de apoptose tardia e 20,3% em fase de apoptose inicial. Com a saliva de *A. parvum*, 87,9% das células estavam em apoptose tardia e 11,9% em apoptose inicial. Quando submetidas à tratamento com a saliva de *R. sanguineus*, 72,5% das células estavam em apoptose tardia e 27,5% em apoptose inicial. Essa linhagem celular apresentou um padrão mais constante entre os tratamentos realizados nesse grupo, o que pode ser explicado pelas diferenças existentes entre as linhagens MCF-7 e MDA-MB-231, já descritas anteriormente.

Confirmando os resultados apresentados nos experimentos anteriores, a linhagem celular MCF-10A não apresentou quantidade significativa de células em qualquer um dos tipos de morte celular avaliados, mostrando em todos os eventos, um valor considerável de células viáveis. Quando tratadas com saliva de *A. sculptum*, a porcentagem de células viáveis foi de 97,6%; com a saliva de *A. parvum*, o valor obtido foi de 93,3%; e, com o tratamento com a saliva de *R. sanguineus*, o resultado de células viáveis apresentado foi de 97,6%, demonstrando mais uma vez que nenhum dos três tipos de saliva utilizados nesta pesquisa foi citotóxico para células não transformadas.

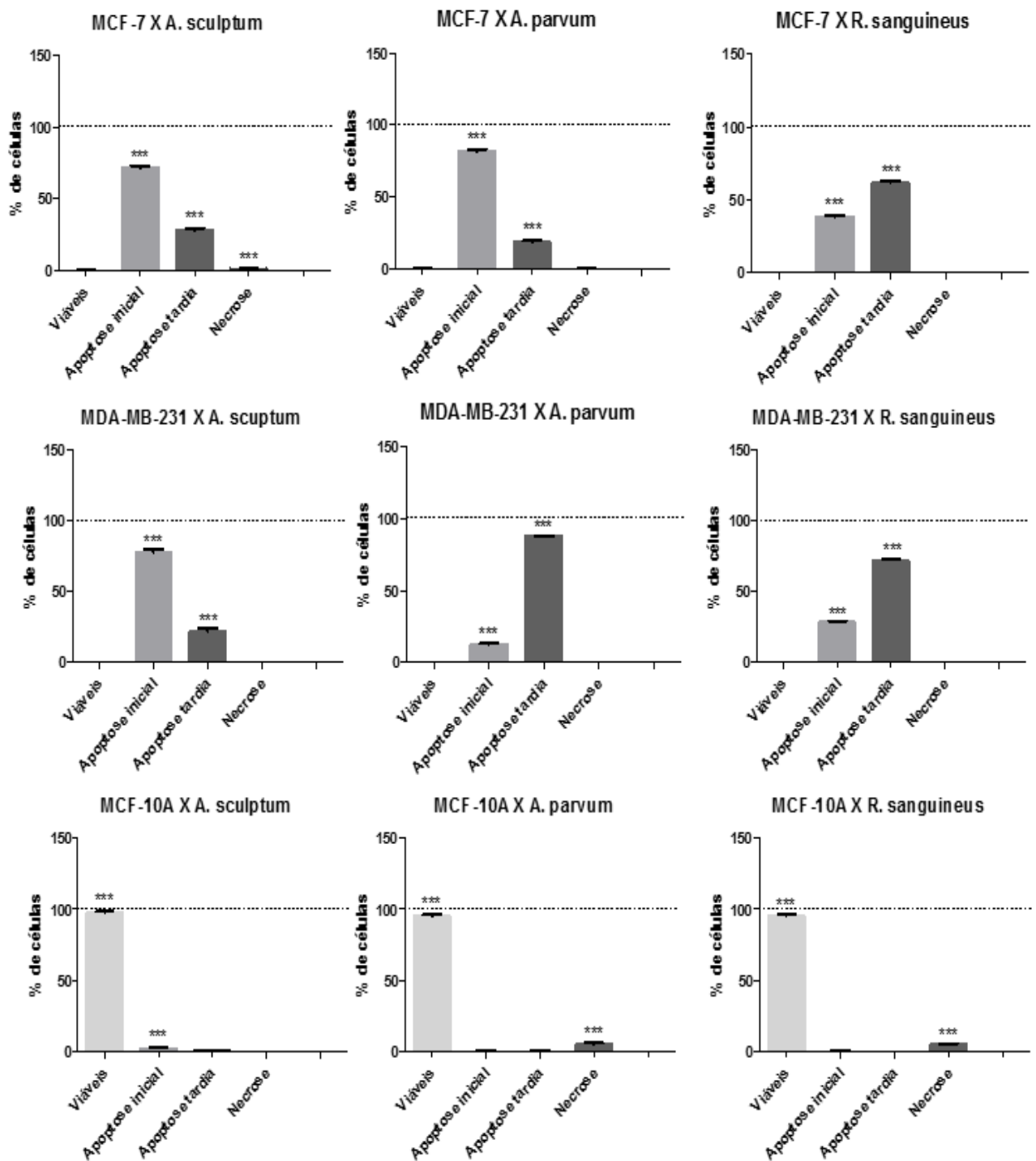


Fig. 6. Gráficos de Apoptose/ Necrose das linhagens celulares tumorais tratadas com as salivas das diferentes espécies de carrapatos. A linhagem celular MCF-7 apresentou uma maior quantidade de células em apoptose inicial, exceto quando tratadas com saliva do carrapato *R. sanguineus* (gráficos à esquerda); a linhagem celular MDA-MB-231 apresentou maior quantidade de células em apoptose tardia quando tratadas com os 03 tipos de saliva (gráficos ao centro); a linhagem celular MCF-10A apresentou quase 100% de células viáveis quando tratadas com os 03 tipos de salivas (gráficos à direita) (***) $P < 0,01$.

5.5. Análise da presença de caspase-3/7 nas linhagens celulares tumorais tratadas com saliva de carrapato para averiguar a via de ocorrência da apoptose

Após analisar que a maioria das células tumorais utilizadas apresentavam-se em estágio de apoptose tardio após tratamento com os três diferentes tipos de saliva utilizados na pesquisa, procuramos identificar se a via utilizada para ocorrência dessa apoptose era a via das caspases-3/7. As caspases (*cysteine-dependent aspartate-specific proteases*) sinalizam para a apoptose e clivam os substratos de aspartato levando à condensação e fragmentação nuclear, externalização de fosfolipídios de membrana que irão sinalizar para estas células serem fagocitadas por macrófagos (BOATRIGHT *et al.*, 2003). São conhecidas 14 caspases humanas, sendo que seis (caspases -3, -6, -7, -8, -9, -10) participam da apoptose (BOATRIGHT *et al.*, 2003). As caspases -1, -4, -5, -11, -12, -13, -14 estão envolvidas na maturação de citocinas, e sua contribuição na apoptose permanece não esclarecida (DENAULT *et al.*, 2002). As caspases 3/7 são caspases efetoras, responsáveis pela clivagem de substratos e, particularmente, a caspase-3 é responsável pela iniciação da apoptose.

Para avaliar a presença das caspases, foi utilizado o kit Caspase-Glo® 3/7 (Promega Corporation · Madison, WI, USA), que mede a quantidade de caspase-3 e -7 através da luminescência. As células das linhagens tumorais foram plaqueadas em placas com paredes e fundo brancos e tratadas com os três tipos de saliva após total confluência. O experimento foi realizado 02 vezes (02 experimentos independentes), em quadruplicatas, e os resultados obtidos foram analisados com o software GraphPad Prism versão 6.01 (©GraphPad Software Inc, 2007).

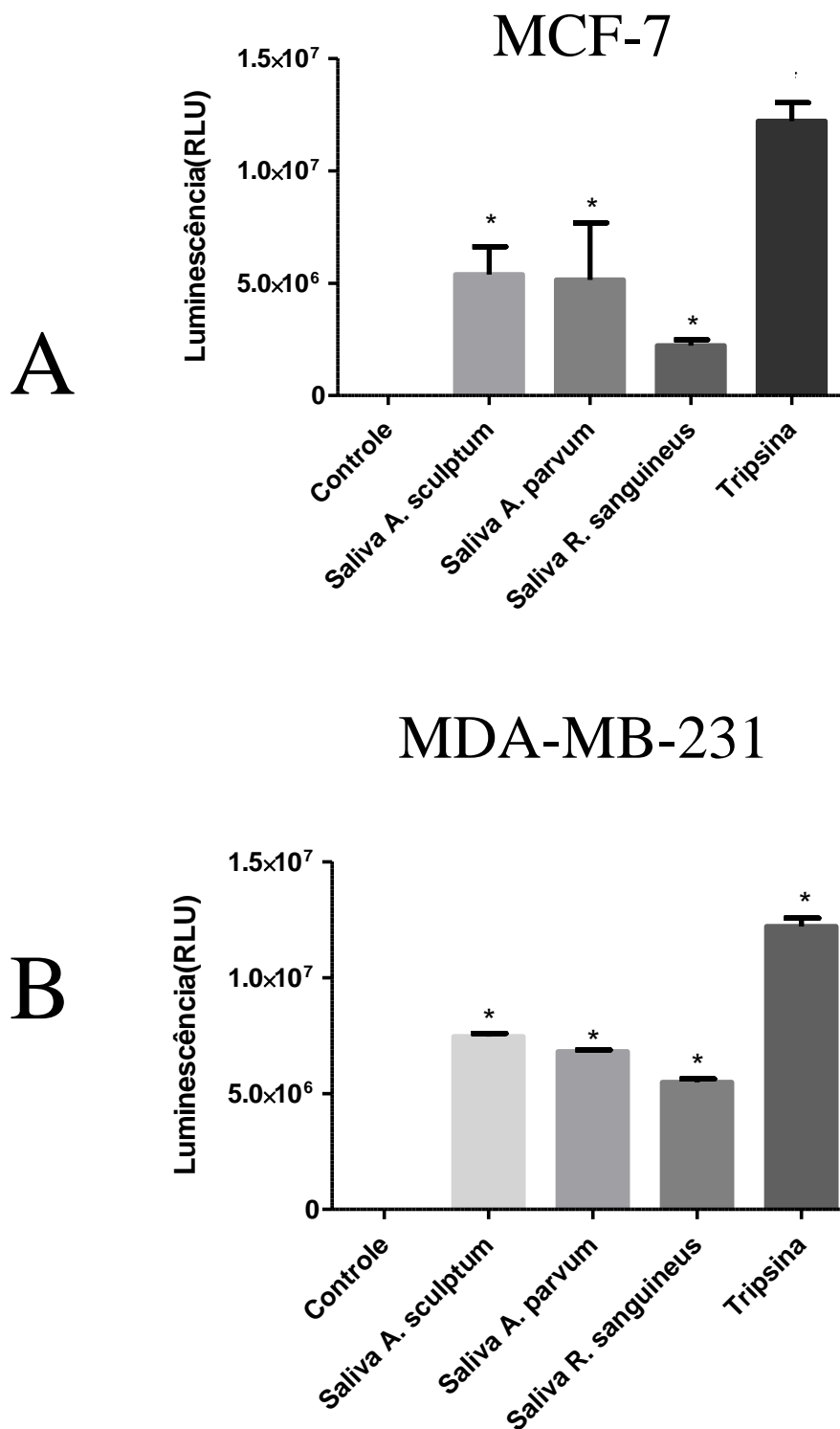


Fig. 7. Luminescência derivada da presença de caspase-3/7 nas linhagens celulares tumorais MCF-7 e MDA-MB-231 tratadas com os 03 tipos de saliva de carrapato. Em A, apresenta as unidades relativas de luminescência (RLU) da linhagem celular MCF-7 e B na linhagem celular MDA-MB-231 após tratamento com os diferentes tipos de saliva e com tripsina (* $P < 0,05$). Houve diferença estatística entre os tratamentos entre os 03 tipos de salivas diferentes e entre as salivas e a tripsina, em ambas as linhagens celulares.

Como pode ser analisado nos gráficos acima da Figura 7, a intensidade de luminescência dos grupos tratados com saliva de todas as espécies, em ambas as linhagens celulares, representou valores significantes comprovando a presença de caspase-3/7. No entanto, na linhagem celular tumoral MCF-7, houve diferença entre as salivas, notando uma maior luminescência no tratamento com a saliva de *A. parvum*, quando comparado com as outras espécies, e uma menor luminescência no tratamento com a saliva de *R. sanguineus*. Já nas células MDA-MB-231, houve uma maior estabilidade e constância na luminescência apresentada, comprovando uma maior presença de caspase-3/7 nas células tratadas com os 03 tipos de saliva, comprovando os resultados anteriormente apresentados de que essas células estavam em apoptose tardia após 24 horas de exposição à saliva do carrapato. Devido ao fato de a linhagem celular MCF-10A não ter apresentado valores significativos de ocorrência de morte celular por apoptose em nenhum dos experimentos com nenhum dos 03 tipos de saliva pesquisados, os testes para verificar a presença de caspase-3/7 não foram realizados.

6. DISCUSSÃO

Atualmente, o câncer de mama é a maior causa de morte entre as mulheres em todo o mundo; nos países desenvolvidos, a segunda causa de morte por câncer, atrás do câncer de pulmão; nos países em desenvolvimento, a maior causa de câncer (INCA, 2015). De forma geral, o tratamento do câncer de mama pode ser cirúrgico, através da mastectomia unilateral ou bilateral, que é a retirada da mama de um ou dos dois lados e pode ser parcial ou total, dependendo da localização e extensão do tumor; por quimioterapia, que é um método que utiliza compostos químicos que afetam tanto as células tumorais quanto as células normais (estas em menor número) e podem comprometer outros sistemas do organismo; e a radioterapia, que é um método capaz de destruir as células tumorais empregando feixes de radiações ionizantes, aplicada localmente e capaz de danificar algumas estruturas próximas ao tumor (KURIAN *et al.*, 2014; INCA, 2015).

Baseado em estudos e pesquisas que buscam alternativas para um tratamento menos invasivo e menos prejudicial ao paciente, cada vez mais novas terapias baseadas em biomoléculas de origem vegetal e animal têm sido pesquisadas, visando o aumento da qualidade de vida e a possibilidade de descoberta de novos agentes quimioterápicos que auxiliem na sobrevida de pessoas diagnosticadas com esta doença.

Nesta pesquisa, pode-se observar que a saliva de carrapato de 03 espécies existentes no Brasil apresentam efeitos citotóxicos à diferentes linhagens celulares de câncer de mama, algumas já utilizadas em pesquisa e outras ainda inéditas. Outro resultado interessante foi a diferença na liberação de secreção salivar entre as espécies nos diferentes períodos do dia. A razão para as diferenças na quantidade de secreção salivar nos diversos períodos do dia e entre as 03 espécies são desconhecidas. Especulamos que fatores como diferenças morfológicas e estruturais entre as espécies, hábitos alimentares, sazonalidade, ambiente natural, diferenças entre o tamanho de cada espécie e hospedeiros específicos, dentre outros poderiam interferir no processo. Por exemplo, a espécie *Amblyomma sculptum* apresenta uma menor especificidade por hospedeiros, podendo acometer mamíferos de diversos tamanhos e espécies, como equinos, bovinos, suínos, cães, animais selvagens/ silvestres e até o homem, além de ser o maior em tamanho quando comparado com as outras duas espécies apresentadas na pesquisa. A espécie *Amblyomma parvum* continua sendo pesquisada à respeito de sua especificidade de hospedeiros, podendo acometer os seres humanos também. Já a espécie *Rhipicephalus sanguineus* demonstra maior especificidade por caninos (FERREIRA *et al.*, 2003).

Em um estudo conduzido pela equipe de Poole *et al.* (2013) tratando células da linhagem MDA-MB-231 com saliva de carrapato da espécie *Dermacentor variabilis*, conhecido como uma espécie de carrapato que acomete cães no continente norte americano, o grupo de pesquisa avaliou a capacidade de migração, invasão e sinalização da linhagem celular supracitada após tratamento com a saliva, visando analisar sua capacidade de diminuir os mecanismos das células tumorais e seu consequente desaparecimento. Esta pesquisa forneceu mais uma visão de como os carrapatos regulam a migração, invasão e sinalização celular, que são importantes no controle da resposta celular do hospedeiro, indicando que os componentes da saliva do carrapato não são capazes apenas de modular a regulação das células envolvidas na coagulação e cicatrização, mas também é capaz de modular as atividades migratórias e invasivas de outras células do hospedeiro, como por exemplo as células tumorais, através da interferência na transdução de sinalização (POOLE *et al.*, 2013).

O grupo de pesquisa brasileiro do Instituto Butantã, coordenado pela professora Dra. Ana Marize Chudzinsk-Tavassi foram pioneiros no Brasil com relação ao estudo dos efeitos antitumorais da saliva do carrapato *Amblyomma cajennense*, atual *Amblyomma sculptum*, em diferentes tipos de tumores, como pode-se observar na pesquisa publicada em 2011, que demonstra que a saliva exerce consideráveis efeitos citotóxicos nas células tumorais das linhagens SK-MEL-28 (células de melanoma humano) e MIA PaCa-2 (células de câncer de pâncreas humano), e, não causa efeito algum em células normais (fibroblastos humanos). Dentre estes efeitos, além da citotoxicidade, eles observaram alterações morfológicas nas linhagens tumorais e morte celular, não tendo sido observado os mesmos efeitos nos fibroblastos também tratados com a mesma dose de saliva (Simons *et. al*, 2011). Uma pesquisa anterior demonstrou que moléculas presentes na saliva dos carrapatos *Rhipicephalus appendiculatus* e *Amblyomma variegatum* foram capazes de suprimir o crescimento de células HeLa (linhagem celular de câncer de colo de útero) por apoptose (KAZIMÍROVÁ *et al.*, 2006).

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que a saliva dos carrapatos das espécies *Amblyomma sculptum*, *Amblyomma parvum* e *Rhipicephalus sanguineus* utilizada para tratar as linhagens tumorais de mama MCF-7, MDA-MB-231 e células de Ehrlich, apresentou citotoxicidade frente à estas células, conforme o resultado apresentado pelo teste de MTT. Pode-se observar que a linhagem celular MDA-MB-231 apresentou maior resistência e menor índice de citotoxicidade dentre as linhagens tumorais testadas, possivelmente por ser uma linhagem mais agressiva e resistente que as demais, sendo necessários mais estudos para viabilizar essa hipótese. Um tipo de células não transformadas, MCF-10A foi utilizado para verificar se a saliva poderia apresentar o mesmo efeito observado nas linhagens tumorais.

Conforme os dados obtidos, nenhum dos tipos de saliva dos carrapatos utilizados nesta pesquisa foi citotóxico para a linhagem celular não transformada MCF-10A, sugerindo que a saliva de carrapato pode apresentar propriedades e componentes que reconheçam e causem danos apenas em linhagens celulares tumorais, resultado similar ao apresentado na pesquisa de Simons et. al (2011). O fato de a saliva de carrapato danificar apenas as linhagens tumorais e não prejudicar linhagens celulares não transformadas foi verificada pelo grupo de pesquisa de Chudzinsk-Tavassi *et al.*(2010), que verificou que a proteína Amblyomin X apresenta importantes efeitos citotóxicos contra células tumorais, principalmente demonstrada em células de melanoma, além de propor que tal proteína possui como alvo o sistema ubiquitina-proteassoma presente em células tumorais e ausente em células normais, perturbando sua atividade catalítica resultando na apoptose de células tumorais (CHUDZINSK-TAVASSI *et al.*, 2010).

As alterações morfológicas nas células tumorais tratadas com os 03 diferentes tipos de saliva também puderam ser observadas, sendo mais evidentes mudanças relacionadas ao número e ao formato das células. A linhagem tumoral MCF-7 demonstrou maior sensibilidade e alterações mais visíveis quando comparadas à linhagem MDA-MB-231, assim como os resultados do MTT. As células MCF-10A não apresentaram alterações significativas quando comparadas às demais, comprovando que nenhum dos tipos de saliva alterou morfolologicamente esta linhagem celular.

A citotoxicidade apresentada pela saliva foi analisada e confirmada verificando qual tipo de morte celular ocorria nas células após 24 horas de exposição. Os resultados obtidos mostraram a ocorrência principalmente de apoptose nas linhagens celulares tumorais. Na pesquisa de Akagi *et. al* (2012) foi verificado os efeitos pró-apoptóticos da proteína Amblyomin X, extraída da saliva do carrapato *Amblyomma sculptum*, em células murinas de câncer renal; através da análise das alterações morfológicas das células compatíveis com o processo de apoptose, como por exemplo encolhimento, rearranjos do citoesqueleto e fragmentação do DNA (AKAGI et. al, 2012). No presente trabalho, foi comprovado por marcação da fosfatidilserina com anexina V que a saliva das 03 espécies estudadas induzem apoptose e esse fenômeno foi observado nas suas fases inicial e tardia. Como evidenciado nos experimentos apresentados acima que a maioria das células apresentavam-se em apoptose, seja ela em estágio inicial ou final, foi verificado se ocorria a atividade de caspase-3/7 nas células tumorais após 24 horas de tratamento com os 03 tipos de saliva analisados. Os resultados demonstraram que nas células MCF-7, todos os tratamentos comprovaram a atividade de caspase-3/7, em proporções diferentes entre os tipos de saliva. Relacionando esses dados com a porcentagem de ocorrência da apoptose em diferentes estágios pode-se perceber que as células

tratadas com a saliva de *A. sculptum*, que apresentaram quase 80% de apoptose inicial, apresentou uma maior luminescência e, conseqüentemente, uma maior atividade de caspase-3/7, quando comparada às outras salivas testadas. Pode-se então sugerir que, quando tratadas com esse tipo de saliva, as células MCF-7 apresentam morte celular por apoptose, provavelmente sendo ativada pela via intrínseca, que ocorre por estresse intracelular ou extracelular como a deprivação de fatores de crescimento, danos no DNA, induzindo a permeabilização mitocondrial e conseqüente liberação de moléculas pró-apoptóticas nela presentes (pró-caspase-3, por exemplo) (DESAGHER *et al.*, 2000). As células tratadas com a saliva de *A. parvum* apresentaram um comportamento semelhante ao grupo tratado com a saliva de *A. sculptum*, tanto no experimento que evidencia uma maior ocorrência de morte celular por apoptose inicial quanto na análise da presença de caspase, com intensidade de luminescência semelhantes, considerando o desvio padrão. Pode-se hipotetizar que a apoptose das células tratadas com essa saliva também é ativada pela via intrínseca. No tratamento com a saliva de *R. sanguineus*, houve uma maior porcentagem de células em apoptose terminal e, no experimento de análise da presença de caspase-3/7, foi o tratamento que apresentou uma menor intensidade de luminescência e, portanto, uma menor presença de caspase-3/7. Nesse caso, provavelmente a apoptose terminal evidenciada também pode ocorrer pela via intrínseca, uma vez que a caspase-3/7 estão presentes em maior concentração no momento inicial da ativação da apoptose, e conforme o processo de morte celular finaliza, a presença da atividade dessas caspases diminui, apresentando portanto, menor luminescência nas células tumorais em apoptose terminal. Já nas células da linhagem MDA-MB-231, os tratamentos com os 03 tipos de saliva apresentaram padrões similares com relação a intensidade de sinal da presença de caspase-3/7 nas células analisadas. Considerando a intensidade e sensibilidade da luminescência apresentada no gráfico B da Figura 7, pode-se concluir que existe a possibilidade de que a apoptose seja ativada pela via intrínseca, devido à uma maior presença de caspase-3/7. Apesar das células tratadas com a saliva de *A. sculptum* apresentarem uma maior porcentagem de morte por apoptose final, a intensidade de luminescência/ presença de caspase pode determinar que, independente do estágio de apoptose em que as células se encontram, a via de ativação da morte celular programada pode ser a mesma.

A via intrínseca, como já citado anteriormente, pode ser ativada por estresse intra ou extracelular. Vários estudos sobre apoptose apontam a mitocôndria como principal mediador desse tipo de morte, sendo que essa organela integra os estímulos de morte celular, induzindo a permeabilização mitocondrial e conseqüente liberação de moléculas pró-apoptóticas nela presentes (DESAGHER *et al.*, 2000), como por exemplo a Bax, Bid e Bak, proteínas pró-

apoptóticas (HENGARTNER, 2000). A expressão de Bcl-2 é capaz de inibir a geração de espécies reativas do oxigênio e a acidificação intracelular, bem como estabilizar o potencial de membrana da mitocôndria. A homeostasia é mantida pelo controle da quantidade de proteínas antiapoptóticas e pró-apoptóticas. Estímulos, como dano ao DNA, levam ao aumento na expressão das proteínas pró-apoptóticas. Esse desequilíbrio induz a apoptose (PETROS *et al.*, 2004). Em um estudo com um polissacarídeo de uma planta *Angelica sinensis* (ASP), foi comprovada que sua atividade antitumoral estava relacionada com suas atividades biológicas. Ele suprimia uma variedade de fatores pró-proliferativos ou anti-apoptóticos, que são expressos em células cancerígenas de determinados tipos, nesse caso, células de câncer de mama do tipo T47D, que super expressam AMP cíclico em resposta ao elemento de ligação (CREB) (ZHUANG *et al.*, 2015). Além disso, o resultado também demonstrou que a morte celular causada pela ASP foi relacionada com a atividade da caspase, acompanhada pela perda de potencial de membrana mitocondrial, liberação de citocromo c, Bax e translocação do citosol para a mitocôndria, comprovando que ASP causa morte das células tumorais de câncer de mama através da indução à apoptose (ZHUANG *et al.*, 2015).

Conforme os exemplos apresentados acima, a apoptose causada nas células tumorais pela saliva dos carrapatos apresentados nesse trabalho pode ser causado pela liberação de agentes pró-apoptóticos provocados pela exposição dos tipos celulares à essa substância, que provoca tais efeitos apenas em células cancerizadas e não em células normais pelas peculiaridades e alterações que aquelas apresentam em comparação com estas.

Enfim, a apoptose na prática clínica é alvo para um potencial uso terapêutico da morte celular programada ou para a compreensão dos mecanismos de resistência à radioterapia e à quimioterapia. A elucidação de alguns dos mecanismos moleculares da apoptose abriram perspectivas de modulação desses processos. As estratégias se baseiam em induzir a morte nas células tumorais através do bloqueio de genes com oligonucleotídeos *antisense* e drogas convencionais, ou ainda a substituição de função desses genes com o uso de moléculas recombinantes (NICHOLSON, 2000). A compreensão dos mecanismos e das alterações nos componentes das vias apoptóticas e sua correlação com a ocorrência do câncer são importantes para o desenvolvimento de novas terapias e métodos de prevenção do câncer.

7. CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos, podemos concluir que a saliva das espécies de carrapato *Amblyomma sculptum*, *Amblyomma parvum* e *Rhipicephalus sanguineus* apresentam efeitos citotóxicos nas linhagens celulares tumorais de mama MCF-7, MDA-MB-231 e Ehrlich, e não apresentam os mesmos efeitos na linhagem celular não transformada MCF-10A. Além da citotoxicidade pelo teste de MTT, importantes alterações morfológicas foram observadas nas células tumorais tratadas, enquanto nas células normais, não foi percebido nenhuma mudança significativa.

Também pode ser constatado que as células tumorais tratadas com os 03 tipos de saliva sofrem morte celular pelo processo de apoptose, enquanto que a linhagem MCF-10A apresentou uma maior porcentagem de células viáveis, mesmo após 24 horas de exposição à saliva das diferentes espécies. A presença de caspase-3/7 foi analisada através de um ensaio de luminescência, que comprovou que as diferentes linhagens tumorais apresentam ativação da apoptose possivelmente pela via intrínseca, estando presente em todos os tratamentos analisados.

Os diferentes comportamentos de cada uma das salivas utilizadas pode ser explicado pelas diferenças existentes entre as espécies, evidenciada desde o início da pesquisa, durante a coleta da saliva, que apresentou diferenças de uma espécie para outra, além de diferenças de comportamento nos diversos períodos do dia. Cada espécie apresenta diferenças tanto no habitat, quanto no comportamento, preferência por hospedeiros diferentes, distribuição geográfica, enfim, diferenças características e competentes às espécies. Esse dado, juntamente com os resultados apresentados, pode conferir um número maior de possibilidades nos estudos e pesquisas na descoberta e desenvolvimento de substâncias com potencial antitumoral, pois, mesmo com comportamentos diferentes, 03 novas substâncias apresentaram efeito citotóxico frente às diferentes linhagens tumorais de mama.

Portanto, novas perspectivas na pesquisa de biomoléculas com potencial antitumoral são reforçadas com os resultados apresentados nessa pesquisa. Além disso, a especificação e sintetização das proteínas presentes no extrato bruto utilizado (saliva pura) responsáveis pelo efeito antitumoral necessitam de mais estudos e pesquisas para sua descoberta e possível produção, como já acontece com a proteína Amblyomin X, no caso da saliva do carrapato *Amblyomma cajennense*, possibilitando o aumento de oportunidades para o surgimento de um tratamento mais efetivo e menos prejudicial ao paciente e visando o possível desenvolvimento de fármacos que induzam a cura de uma das doenças mais graves e prevalentes na atualidade.

8. REFERÊNCIAS

- AKAGI, E.M.; JÚNIOR, P.L.; SIMONS, S.M.; BELLINI, M.H.; BARRETO, S.A.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A.M. Pro-apoptotic effects of Amblyomin-X in murine renal cell carcinoma “*in vitro*”. **Biomed. Pharmacother.** 66 (1), 64 e 69, 2012.
- ANDERSON, J.F.; MAGNARELLI, L.A. Biology of ticks. **Infect. Dis. Clin. North. Am.** 2008; 22: 195-215.
- BARROS-BATTESTI, DM; ARZUA, M; BECHARA, GH (eds). **Carrapatos de importância médico-veterinária da Região Neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies.** Vox/ICTTD-3/Butantã, São Paulo, pp 182–189, 2006.
- BOATRIGHT, KM; SALVESEN, GS. Mechanisms of caspase activation. **Curr Opin Cell Biol.** 2003;15: 725-31.
- BROSSARD, M; WIKEL, SK. Tick immunobiology. **Parasitology** 129 (Suppl): S161-S176, 2004.
- BUDJHARDJO, I; OLIVER, H; LUTTER, M; LUO, X; WANG, X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. **Annu Rev Cell Dev Biol.** 1999; 15: 269-90.
- CABRERA, R.R.; LABRUNA, M.B. Influence of photoperiod and temperature on the larval behavioral diapause of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). **J Med Entomol** 2009; 46:1303–9.
- CAILLEAU, R.M. et al., 1974. Breast tumor cell lines from pleural effusions. **J Natl Cancer Inst** 53 (3): 661-74
- CARNEIRO-LOBO, T.C.; KONIG, S.; MACHADO, D.E.; NASCIUTTI, L.E.; FORNI, M.F.; FRANCISCHETTI, I.M. Ixolaris, a tissue factor inhibitor, blocks primary tumor growth and angiogenesis in a glioblastoma model. **J Thromb Haemost** 2009; 7:1855–64.
- CARVALHO-COSTA, T.; MENDES, M.; DA SILVA, M.; DA COSTA, T.; TIBURCIO, M.; ANHE, A.; RODRIGUES, V.; OLIVEIRA, C. Immunosuppressive effects of *Amblyomma cajennense* tick saliva on murine bone marrow-derived dendritic cells. **Parasites Vectors** 8 (1), 22, 2015.
- CHRISTOFFERSON, D.E.; YUAN, J. Necroptosis as an alternative form of programmed cell death. **Curr Opin Cell Biol** 2010; 22:263–8.
- CHUDZINSKI-TAVASSI, A.M.; DE-SÁ JÚNIOR, P.L.; SIMONS, S.M.; MARIA, D.A.; VENTURA, J.S.; BATISTA, I.F.C. A new tick Kunitz type inhibitor, amblyomin-X, induces tumor cell death by modulating genes related to the cell cycle and targeting the ubiquitin-proteasome system. **Toxicon** 2010; 56:1145–54.
- CUPP, E.P. Biology of ticks. **Veterinary Clinics of North America: Small animal practice.** Saunders, London, pp. 1±27, 1991.

DAWE, C.J. Comparative neoplasia. In: HOLLAND, J. F. & FREI III, E. **Cancer medicine**. 2. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1982. p. 209. EHRLICH, P. 1879 apud SELYE, H. The mast cells. USA: Butterworths, 1965. p. 293.

DENAULT, JB; SALVESEN, GS. Caspases: keys in the ignition of cell death. **Chem Rev**. 2002; 102: 4489-500.

DE OLIVEIRA ADA, S.; LIMA, L.G.; MARIANO-OLIVEIRA, A.; MACHADO, D.E.; NASCIUTTI, L.E.; ANDERSEN, J.F.; PETERSEN, L.C.; FRANCISCHETTI, I.M.; MONTEIRO, R.Q. Inhibition of tissue factor by ixolaris reduces primary tumor growth and experimental metastasis in a murine model of melanoma. **Thromb. Res.**, 2012. 130 (3), 163e170.

DESAGHER, S; MARTINOU, JC. Mitochondrial as the central control point of apoptosis. **Trends Cell Biol**. 2000; 10: 369-76.

DUMLER, JS; CHOI, KS; GARCIA-GARCIA, JC; BARAT, NS; SCORPIO, DG, et al. Human granulocytic anaplasmosis and *Anaplasma phagocytophilum*. **Emerg Infect Dis** 11: 1828-1834, 2005.

FERREIRA, B. R.; SILVA, J. S. Saliva of *Rhipicephalus sanguineus* tick impairs T cell proliferation and IFN-gamma-induced macrophage microbicidal activity. **Vet Immunol Immunopathol**. 1998 Jul 31;64(3):279-93.

FERREIRA, B. R.; Szabo, M. P. J.; CAVASSANI, K. A.; BECHARA, G. H.; SILVA, J. S. Antigens from *Rhipicephalus sanguineus* ticks elicit potent cell-mediated immune responses in resistant but not in susceptible animals. **Veterinary Parasitology**, v. 115, p. 35-48, 2003.

FRANCISCHETTI, I.M.; SA-NUNES, A.; MANS, B.J.; SANTOS, I.M.; RIBEIRO, J.M. The role of saliva in tick feeding. **Front Biosci** 2009; 14:2051–88.

FRANCISCHETTI, I.M.; VALENZUELA, J.G.; ANDERSEN, J.F.; MATHER, T.N.; RIBEIRO, J.M. Ixolaris, a novel recombinant tissue factor pathway inhibitor (TFPI) from the salivary gland of the tick, *Ixodes scapularis*: identification of factor X and factor Xa as scaffolds for the inhibition of factor VIIa/tissue factor complex. **Blood** 2002; 99:3602–12.

FUKUMOTO, S; SAKAGUCHI, T; YOU, M; XUAN, X; FUJISAKI, K. Tick troponin I-like molecule is a potent inhibitor for angiogenesis. **Microvasc Res** 71: 218-221, 2006.

FURLAN, M. Sticky and promiscuous plasma proteins maintain the equilibrium between bleeding and thrombosis. **Swiss Med Wkly** 2002; 132:181–9.

GARCIA, GR; GARDINASSI, LG; RIBEIRO, JM; ANATRIELLO, E; FERREIRA, BR; MOREIRA, HN; MAFRA, C; MARTINS, MM; SZABÓ, MP; DE MIRANDA-SANTOS, IK; MARUYAMA, SR. The sialotranscriptome of *Amblyomma triste*, *Amblyomma parvum* and *Amblyomma cajennense* ticks, uncovered by 454-based RNA-seq. **Parasit Vectors**. 2014 Sep 8; 7: 430.

GERARDI, M; MARTINS, MM; NAVA, S; SZABÓ, MP. Comparing feeding and reproductive parameters of *Amblyomma parvum* tick populations (Acari: Ixodidae) from Brazil and Argentina on various host species. **Vet Parasitol.** 2013 Oct 18;197(1-2):312-7.

GUGLIELMONE, A.A.; BEATI, L.; BARROS-BATTESTI, D.M.; LABRUNA, M.; NAVA, S.; VENZAL, J.M. *et al.* Ticks (Ixodidae) on humans in South America. **Exp Appl Acarol** 2006; 40:83–100.

HENGARTNER, MO. The biochemistry of apoptosis. **Nature.**2000; 407: 770-76.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil). Estimativa 2012. **Incidência do Câncer no Brasil.** Rio de Janeiro: INCA, 2011.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Disponível em: <www.inca.com.br>. Acesso em: 09 de Outubro de 2015.

ISLAM, M.K.; TSUJI, N.; MIYOSHI, T.; ALIM, M.A.; HUANG, X.; HATTA, T.; FUJISAKI, K.; 2009. The Kunitz-like modulatory protein haemangin is vital for hard tick bloodfeeding success. **PLoS Pathog.** 5 (7), e1000497.

GRIVICICH, I; REGNER, A; DA ROCHA, AB. Morte celular por apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia** 2007; 53(3): 335-343.

KAUFMAN, W.R. Actions of some transmitters and their antagonists on salivary secretion in a tick. **Am J Physiol** 1978; 235:R76–81.

KAZIMIROVÁ, M.; DOVINOVÁ, I.; ROLNÍKOVÁ, T.; TÓTHOVÁ, L.; HUNÁKOVA, L. Antiproliferative activity and apoptotic effect of tick salivary gland extracts on human HeLa cells. **Neuro Endocrinol Lett** 2006; 2:48–52.

KAZIMÍROVÁ, M; ŠTIBRÁNIOVÁ I. Tick salivary compounds: their role in modulation of host defences and pathogen transmission. **Front Cell Infect Microbiol.** 2013 Aug 20; 3: 43.

KEIRANS, J.E.; DURDEN, L.A. Tick systematics and identification. In: Goodman JL, Dennis DT, SONENSHINE, DE (eds). **Tick-borne diseases of humans**, ASM Press, pp 123-140, 2005.

KURIAN, A.W.; MITANI, A.; DESAI, M.; YU, P.P.; SETO, T.; WEBER, S.C.; OLSON, C.; KENKARE, P.; GOMEZ, S.L.; DE BRUIN, M.A.; HORST, K.; BELKORA, J.; MAY, S.G.; FROSCH, D.L.; BLAYNEY, D.W.; LUFT, H.S.; DAS, A.K. Breast Cancer Treatment Across Health Care Systems. Linking Electronic Medical Records and State Registry Data to Enable Outcomes Research. **Cancer.** v. 120, p. 103-11, 2014.

LABRUNA, MB. Ecology of rickettsia in South America. **Ann NY Acad Sci** 1166:156–166, 2009.

LABRUNA, M.B.; AHID, S.M.M.; SOARES, H.S.; SUASSANA, A.C.D. Hyperparasitism in *Amblyomma rotundatum* (Acari: Ixodidae). **J. Parasitol.** 2007; 93: 1531-1532.

- LABRUNA, MB; JORGE, RS; SANA, DA; JÁCOMO, AT; KASHIVAKURA, CK; FURTADO, MM; FERRO, C; PEREZ, SA; SILVEIRA, L; SANTOS, TS Jr; MARQUES, SR; MORATO, RG; NAVA, A; ADANIA, CH; TEIXEIRA, RH; GOMES, AA; CONFORTI, VA; AZEVEDO, FC; PRADA, CS; SILVA, JC; BATISTA, AF; MARVULO, MF; MORATO, RL; ALHO, CJ; PINTER, A; FERREIRA, PM; FERREIRA, F; BARROS-BATTESTI, DM. Ticks (Acari: Ixodida) on wild carnivores in Brazil. **Exp Appl Acarol.** 2005;36(1-2):149-63.
- LACROIX, M; LECLERQ, G. "Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update". **Breast Research and Treatment** 83 (3): 249–289, 2004.
- LEVENSON, AS; JORDAN, VC. MCF-7: the first hormone-responsive breast cancer cell line. **Cancer Research** 57 (15): 3071–3078, 1997.
- MARITZ-OLIVIER, C; STUTZER, C; JONGEJAN, F; NEITZ, AW; GASPAS, AR. Tick anti-hemostatics: targets for future vaccines and therapeutics. **Trends Parasitol** 23: 397-407, 2007.
- MARTINS, TF; VENZAL, JM; TERASSINI, FA; COSTA, FB; MARCILI, A; CAMARGO, LM; BARROS-BATTESTI, DM; LABRUNA, MB. New tick records from the state of Rondônia, western Amazon, Brazil. **Exp Appl Acarol.** 2014 Jan;62(1):121-8. doi: 10.1007/s10493-013-9724-4.
- MILHANO, N; SAITO, TB; BECHELLI, J; FANG, R; VILHENA, M; DE SOUSA, R; WALKER, DH. The role of *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* saliva in the dissemination of *Rickettsia conorii* in C3H/HeJ mice. **Med Vet Entomol.** 2015 Sep;29(3):225-9.
- NAVA, S; BEATI, L; LABRUNA, MB; CÁCERES, AG; MANGOLD, AJ; GUGLIELMONE, AA. Reassessment of the taxonomic status of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) 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* Koch, 1844 and *Amblyomma sculptum* Berlese, 1888 (Ixodida: Ixodidae). **Ticks Tick Borne Dis** 5(3):252–276, 2014.
- NAVA, S; GUGLIELMONE, AA; MANGOLD, AJ. An overview of systematics and evolution of ticks. **Front Biosci** (Landmark Ed). 2009 Jan 1;14:2857-77. Review.
- NAVA, S; MANGOLD, AJ; GUGLIELMONE, AA. The natural hosts for larvae and nymphs of *Amblyomma neumanni* and *Amblyomma parvum* (Acari: Ixodidae). **Exp Appl Acarol.** 2006;40(2):123-31.
- NAZARETH, R.A.; TOMAZ, L.S.; ORTIZ-COSTA, S.; ATELLA, G.C.; RIBEIRO, J.M.; FRANCISCETTI, I.M.; MONTEIRO, R.Q. Antithrombotic properties of Ixolaris, a potent inhibitor of the extrinsic pathway of the coagulation cascade. **Thromb Haemost.** 2006; 96:7–13.
- NICHOLSON, DW. From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents. **Nature.** 2000;407:810-16.
- OLIVEIRA, CJ; SÁ-NUNES, A; FRANCISCETTI, IM; CARREGARO, V; ANATRIELLO, E; SILVA, JS; SANTOS, IK; RIBEIRO, JM; FERREIRA, BR. Deconstructing tick saliva: non-

- protein molecules with potent immunomodulatory properties. **J Biol Chem.** 2011 Apr 1;286(13).
- PACHECO, RC; ECHAIDE, IE; ALVES, RN; BELETTI, ME; NAVA, S; LABRUNA, MB. *Coxiella burnetii* in Ticks, Argentina. **Emerg Infect Dis** 19:344–346, 2013.
- PEGRAM, R.G.; CLIFFORD, C.M.; WALKER, J.B.; KEIRANS, J.E. Clarification of the *Rhipicephalus sanguineus* group (Acari; Ixodoidea, Ixodidae). I. *R. sulcatus* (Neuman, 1908) and *R. turanicus* (Pomerantsev, 1936). **Sys. Parasitol.** 10, 3±26, 1987.
- PETROS, AM; OLEJNICZAK, ET; FESIK, SW. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. **Biochim Biophys Acta.** 2004;1644:83-94.
- POOLE, N.M.; NYINDODO-OGARI, L.; KRAMER, C.; COONS, L.B.; COLE, J.A. Effects of tick saliva on the migratory and invasive activity of Saos-2 osteosarcoma and MDA-MB-231 breast cancer cells. **Tick Borne Dis.** 2013 Feb;4(1-2):120-7.
- RAMAMOORTHY, N; NARASIMHAN, S; PAL, U; BAO, F; YANG, XF, et al. The Lyme disease agent exploits a tick protein to infect the mammalian host. **Nature** 436: 573-577, 2005.
- RAMOS, V do N; PIOVEZAN, U; FRANCO, AH; OSAVA, CF; HERRERA, HM; SZABÓ, MP. Feral pigs as hosts for *Amblyomma sculptum* (Acari: Ixodidae) populations in the Pantanal, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Exp Appl Acarol.** 2014 Nov;64(3):393-406.
- RIBEIRO, J.M., 1995. How ticks make a living. **Parasitol. Today** 11 (3), 91 e 93.
- SHAFI, G.; MUNSHI, A.; HASAN, T.N.; ALSHATWI, A.A.; JYOTHY, A.; LEI, D.K. Induction of apoptosis in HeLa cells by chloroform fraction of seed extracts of *Nigella sativa*. **Cancer Cell Int** 2009;27(9):29.
- SIMONS, S.M.; JUNIOR, P.L.; FARIA, F.; BATISTA, I.F.; BARROS-BATTESTI, D.M.; LABRUNA, M.B.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A.M. The action of *Amblyomma cajennense* tick saliva in compounds of the hemostatic system and cytotoxicity in tumor cell lines. **Biomed. Pharmacother.** 65 (6), 443 e 450, 2011.
- SONENSHINE, DE; CERAUL, SM; HYNES, WE; MACALUSO, KR; AZAD, AF. Expression of defensin-like peptides in tick hemolymph and midgut in response to challenge with *Borrelia burgdorferi*, *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. **Exp Appl Acarol.** 2002;28(1-4):127-34.
- SOULE, HD.; MALOUNEY, TM; WOLMAN, SR; PETERSON, WD Jr; BRENNER, R; McGRATH, CM; RUSSO, J; PAULEY, RJ; JONES, RF; BROOKS, SC. Isolation and characterization of a spontaneously immortalized human breast epithelial cell line, MCF-10. **Cancer Res.** 1990 Sep 15;50(18):6075-86.

SOULE, HD; VAZGUEZ, J; LONG, A; ALBERT, S; BRENNAN, M. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. **J Natl Cancer Inst.** 1973 Nov;51(5):1409-16.

SOUSA, AC; SZABÓ, MP; OLIVEIRA, CJ; SILVA, MJ. Exploring the anti-tumoral effects of tick saliva and derived components. **Toxicon.** 2015 Aug;102: 69-73.

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

STEERE, A. C.; COBURN, J.; GLICKSTEIN, L. The emergence of Lyme disease. **J Clin Invest** 113:1093-1101, 2004.

TIRLONI, L; RECK, J; TERRA, R M; MARTINS, JR; MULENGA, A; SHERMAN, NE; FOX, JW; YATES, JR 3rd; TERMIGNONI, C; PINTO, AF; VAZ IDA, S Jr. Proteomic analysis of cattle tick *Rhipicephalus* (Boophilus) microplus saliva: a comparison between partially and fully engorged females. **PLoS One.** 2014 Apr 24;9(4):e94831. doi: 10.1371/journal.pone.0094831. eCollection 2014.

VALENZUELA, JG. Exploring tick saliva: from biochemistry to ‘sialomes’ and functional genomics. **Parasitology** 129 (Suppl): S83-S94, 2004.

ZHAO, J; AGUILAR, G; PALENCIA, S; NEWTON, E; ABO, A. rNAPc2 inhibits colorectal cancer in mice through tissue factor. **Clin Cancer Res.** 2009 Jan 1;15(1):208-16. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-0407.

ZHUANG, H; ZHOU, ZY; SONG, CJ. Angelica sinensis polysaccharides promotes apoptosis in human breast cancer cells via CREB-regulated caspase-3 activation. **Biochem Biophys Res Commun.** 2015 Sep 29. [Epub ahead of print].