



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**

Instituto de Ciências Biomédicas



Curso de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Laboratório de Imunoparasitologia “Dr. Mario Endsfeldz Camargo”

**Efeito imunomodulatório da saliva de *Amblyomma sculptum* durante a infecção  
por *Toxoplasma gondii***

**Mylla Spirandelli da Costa**

**Uberlândia – MG**

**Maio - 2016**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**

Instituto de Ciências Biomédicas



Curso de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Laboratório de Imunoparasitologia “Dr. Mario Endsfieldz Camargo”

**Efeito imunomodulatório da saliva de *Amblyomma sculptum* durante a infecção  
por *Toxoplasma gondii***

Dissertação apresentada ao Colegiado do  
Programa de Pós-Graduação em  
Imunologia e Parasitologia Aplicadas como  
parte de obtenção do título de Mestre.

**Mylla Spirandelli da Costa**

Prof. Dr. Tiago Wilson Patriarca Mineo  
Orientador

**Uberlândia – MG**

**Maio– 2016**

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

---

C837e      Costa, Mylla Spirandelli da,  
2016          Efeito imunomodulatório da saliva de *Amblyomma sculptum* durante  
a infecção por *Toxoplasma gondii* / Mylla Spirandelli da Costa. - 2016.  
75 p. : il.

Orientador: Tiago Wilson Patriarca Mineo.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,  
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.  
Inclui bibliografia.

1. Imunologia - Teses. 2. *Toxoplasma gondii* - Teses. 3.  
*Toxoplasma* - Teses. 4. Saliva - Teses. I. Mineo, Tiago Wilson  
Patriarca. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-  
Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. III. Título.

CDU: 612.017

---

## Agradecimentos

À Deus, por ser meu melhor amigo, por ter me dado condições de lutar e oportunidades de alcançar os objetivos pretendidos, por me erguer quando tudo parecia perdido e nunca desistir de mim;

À minha mãe, que sempre me apoiou e veio comigo nos finais de semana ao laboratório para que as tarefas fossem mais prazerosas, por ser minha companheira e principal incentivadora, obrigada por sempre acreditar em mim até mesmo quando eu não acreditava;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Tiago Mineo por participar ativamente do meu processo de aprendizado, com valiosos conselhos que me fizeram ter mais vontade de prosseguir na pesquisa científica;

Ao Prof. Dr. Matias Juan Pablo Szabó pela parceria nesse trabalho, pelos conhecimentos passados e por fazer eu me sentir parte de seu laboratório.

Ao Prof. Dr. José Roberto Mineo, por ter sido o primeiro a me abrir as portas do laboratório de Imunologia e me dar oportunidades de continuar e a Prof<sup>a</sup> Fernanda Maria Santiago por ter me ensinado as primeiras técnicas laboratoriais;

Aos meus queridos amigos do Laboratório de Imunoparasitologia, Vanessa, Flávia, Caroline, Cristina, Eliézer, Tamires, Vanessa Resende, Patrício, Mariana, Maraísa, Silas, Vinicius, Carol Salomão, Heber e ao meu namorado Murilo pelos conhecimentos compartilhados e por tornarem o ambiente de trabalho mais agradável e os momentos difíceis mais confortáveis;

Aos meus novos amigos do Laboratório de Ixodídeos, Rodrigo, Sheyla, Carol, Ana Carol, Jaciara, Marlene, Vanessa, Adalberto, Karina, Samantha, Jamile e Taynara, obrigada por me acolherem tão bem, pela amizade construída e por me passarem

conhecimentos valiosos que contribuíram com esse trabalho, vou levar sempre vocês no meu coração.

Ao meu grupo de jovens Tijolinho que nesse último ano fez toda a diferença na minha vida, me trazendo paz para o coração, me ensinando a acreditar em mim e que Deus tem um propósito para tudo na nossa vida, obrigada por me ajudarem a tentar me tornar um ser humano melhor.

Às minhas amigas de infância Rafaella, Gabriela e Daniela por sempre me apoiarem e acreditarem no meu trabalho, por ouvirem meus desabafos e mesmo ‘longe’ nunca deixarem de estar ao meu lado.

Aos técnicos do Laboratório de Imunoparasitologia Ana Cláudia, Marley e Zilda e ao secretário Max, pela boa vontade em sempre nos ajudar;

Aos animais utilizados, pela vida doada para os experimentos, sem eles esse trabalho não existiria.

Às agências financiadoras de pesquisa, CAPES, CNPq e FAPEMIG, pelo apoio financeiro fornecido para a execução deste trabalho e pela bolsa de auxílio financeiro oferecida.

## RESUMO

**Introdução:** A patogenicidade do *Toxoplasma gondii* varia de acordo com os hospedeiros e qualquer animal de sangue quente pode ser um hospedeiro intermediário para o parasito. *Amblyomma sculptum* possui uma saliva com composição molecular complexa para manter altos níveis de infestação, sendo capaz de modular a produção de citocinas no hospedeiro.

**Métodos:** Saliva foi extraída de fêmeas ingurgitadas e seu efeito imunomodulatório foi testado em camundongos durante a infecção por *T. gondii*. O aumento da susceptibilidade do camundongo exposto a saliva foi avaliada através de ensaios de sobrevivência, análise histopatológica de órgãos alvo de replicação parasitária, parasitismo, quantificação de citocinas e IgG total.

**Resultados:** Camundongos expostos à saliva de *A. sculptum* obtiveram uma piora na condição clínica durante a infecção por *T. gondii*, devido à diminuição da sobrevivência e aumento de lesões necróticas no fígado. O pulmão apresentou maior parasitismo quando comparado aqueles não expostos à saliva. Adicionalmente, a exposição à saliva induziu altos índices de produção de IL-6, enquanto reduziu produção de TNF no lavado peritoneal. Supreendentemente, não houve diferença na produção de IL-10 e IFN- $\gamma$  no lavado peritoneal e homogenatos de pulmão de fígado, porém durante o *recall* antigênico, células do baço expostas à saliva aumentaram os níveis de IL-10 e diminuíram a produção de IFN- $\gamma$ , após a estimulação com taquizoitos de *T. gondii*. Não observamos diferenças significantes entre os grupos quanto à produção de anticorpos específicos contra *T. gondii*.

**Conclusão:** A exposição à saliva de *A. sculptum* aumenta a suscetibilidade à infecção por *T. gondii* em camundongos, por meio da modulação órgão-dependente, aumentando assim a capacidade de replicação do protozoário durante a fase inicial da infecção.

**Palavras chave:** Saliva de carrapato, *Amblyomma sculptum*, *Amblyomma cajennense*, *Toxoplasma gondii*, toxoplasmose, efeito imune.

## ABSTRACT

**Background:** The pathogenicity of *Toxoplasma gondii* varies according to the specie of host infected and any warm-blooded animal can serve as an intermediate host for the parasite. *Amblyomma sculptum* has a complex molecular saliva composition in order to maintain high levels of infestation, being capable of suppress Th1 type cytokines, while increasing anti-inflammatory cytokines.

**Methods:** Saliva was pooled from engorged female ticks and its immunomodulatory effects were tested in mice during infection with *T. gondii*. Increased susceptibility of mice exposed to saliva was assessed by survival analysis, histopathology of target organs, parasite burden, cytokines quantification and specific quantification of total IgG.

**Results:** Mice exposed to *A. sculptum* saliva had worse clinical condition resulted of *T. gondii* infection due to a low percent of survival and areas of necrosis in liver. Parasitism in lungs was higher in comparison with mice not exposed to saliva. Additionally, saliva exposure induce higher production of IL-6 while reduce TNF production in peritoneal fluid. Surprisingly, there was no difference in production of IL-10 and IFN- $\gamma$  in peritoneal lavage and liver and lungs homogenate, otherwise during antigenic recall, spleen cells derived from saliva exposed mice increased levels of IL-10 and reduce IFN- $\gamma$  production, after stimulation with *T. gondii* tachyzoites. No significant differences were obtained in specific antibody production of *T. gondii*.

**Conclusions:** The exposure to *A. sculptum* saliva increases susceptibility of mice infected with *T. gondii*, by an organ-specific immune response, thus enhancing replication capacity of protozoan during an earlier acute of infection.

**Keywords:** Tick saliva, *Amblyomma sculptum*, *Amblyomma cajennense*, *Toxoplasma gondii*, toxoplasmosis, immune effect.



## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	11
1.1. <i>Toxoplasma gondii</i> .....	11
1.1.1. <i>Toxoplasma gondii</i> .....	11
1.1.2. Patogenicidade.....	13
1.1.3. Ciclo de vida e transmissão .....	15
1.1.4. Hospedeiros .....	19
1.1.5. Resposta imune.....	20
1.2. <i>Amblyomma sculptum</i> .....	24
1.2.1. Carrapato.....	24
1.2.2. Hospedeiros .....	25
1.2.3. Biologia.....	26
1.2.4. Importância médico-veterinária .....	27
1.2.5. Efeito da saliva de <i>A. sculptum</i> na resposta imune do hospedeiro. ....	29
2. JUSTIFICATIVA .....	32
3. OBJETIVOS .....	35
3.1. Objetivo geral.....	35
3.2. Objetivos específicos.....	35
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	37
4.1. Manutenção dos carrapatos .....	37
4.2. Coleta de saliva .....	38
4.3. Animais.....	38
4.4. Cultivo de <i>T. gondii</i> .....	39
4.5. Preparação de antígeno solúvel de <i>T. gondii</i> .....	39
4.6. Curva de mortalidade.....	40
4.7. Análise da resposta imune celular e humoral .....	40
4.8. Análise histopatológica .....	42
4.9. Homogenato de órgãos.....	43
4.10. Determinação da produção de citocinas <i>in vivo</i> .....	43
4.11. PCR em tempo real.....	44
4.12. Experimento <i>ex vivo</i> .....	45
4.13. Dosagem de IgG total contra <i>T. gondii</i> .....	46

4.14.	Análise estatística.....	47
4.15.	Normas de biossegurança .....	47
5.	Resultados .....	49
5.1.	Camundongos tratados com saliva de <i>A. sculptum</i> são mais susceptíveis a infecção por <i>T. gondii</i> .....	49
5.2.	A saliva modulou a produção de citocinas no lavado peritoneal durante a infecção por <i>T. gondii</i> . ....	53
5.3	Saliva não influenciou na produção de IgG anti- <i>T. gondii</i> .....	55
6.	Discussão .....	58
7.	Conclusão .....	63
8.	Referências .....	65
	ANEXO I – Autorização do Comitê de Ética em Utilização Animal (Coelhos).....	74
	ANEXO II – Autorização do Comitê de Ética em Utilização Animal(Camundongos) .....	75

## *Introdução*

---

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. *Toxoplasma gondii*

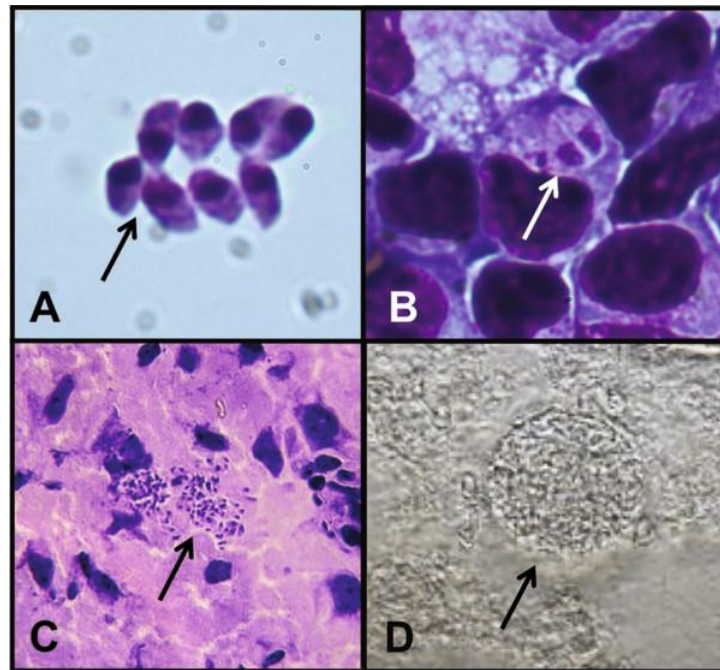
#### 1.1.1. *Toxoplasma gondii*

*Toxoplasma gondii* é um protozoário intracelular obrigatório pertencente ao filo Apicomplexa e subclasse Coccidia de distribuição geográfica mundial, com alta prevalência sorológica, podendo atingir mais de 60% da população em determinados países; no entanto, os casos de doença clínica são menos frequentes, (NICOLLE; MANCEAUX, 1908; KEAN, 1972; BRENIER-PICHART et al., 2006; DAHER et al., 2010), sendo ele o agente etiológico da toxoplasmose, uma doença que infecta animais de sangue quente como pássaros e mamíferos (NISCHIK et al., 2001) incluindo o humano, o primeiro caso de toxoplasmose em humanos foi relatado por Castellani em 1913.

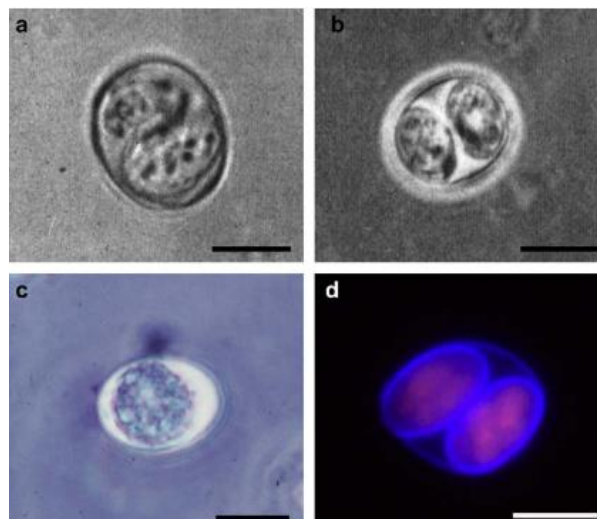
Há pouca variação entre os toxoplasmas presentes em diferentes partes do globo, podendo-se dizer que há, predominantemente, três tipos, sendo o tipo 1 altamente virulento e responsável pelos casos de encefalite grave em imunodeprimidos e passagem transplacentária. Os tipos 2 e 3 são avirulentas (HALONEN; WEISS, 2013).

*T. gondii* possui três formas infectantes, cada uma com suas características morfológicas. Os taquizoítos são pequenos, cilíndricos, em formato de bastão e se reproduzem por bipartição (Figura 1A e 1B), além de serem as formas infectantes circulantes nos hospedeiros intermediários. Enquanto os cistos estão presentes principalmente nos músculos esqueléticos e cérebro, possuem uma membrana própria que envolve os bradizoítos que se diferencia dos taquizoítos pela presença de granulos e amilopectinas que são utilizadas como fonte de energia para manter essa forma

sinérgica por muito tempo (Figura 1C e 1D) (MC-GOVERN; WILSON, 2013). Os oocistos possuem a forma não-esporulada que consiste em uma única massa citoplasmática envolta por uma parede dupla resistente, enquanto a forma esporulada consiste em dois esporocistos envoltos por uma parede dupla resistente (Figura 2) (FERGUSON, 2009).



**Figura 1.** Estágios de *T. gondii* visualizados por microscopia ótica. (A) Taquizoítos extracelulares do peritoneo de ratos sete dias após a infecção, marcados com Hematoxilina e Eosina (H&E). (63x) (B) Parasitos replicando dentro de um monócito corado com H&E. (63x) (C) Bradizoítos encontrados no cérebro de ratos cronicamente infectados, corado com H&E. (40x) (D) Cisto encontrado no homogenato de cérebro, não corado. (40x). **Fonte:** Mc-Govern; Wilson, 2013.



**Figura 2.** Imagens de oocistos de *T. gondii* isolado de fezes de gado (**A e B**) Cópia da micrografia original mostrando a estrutura original de “novos cistos” (oocisto) de *T. gondii* (Work; Hutchison, 1969). (**C**) Microscopia ótica de oocisto não esporulado mostrando uma única massa citoplasmática fotografada em 1969. (**D**) Imagem fluorescente de oocistos esporulados com dois esporocistos, mostrando a autofluorescência dos oocistos e parede do esporocisto. Barras representam 5µm (Imagens: DJP Ferguson). **Fonte:** Ferguson, 2009.

### 1.1.2. Patogenicidade

A patogenicidade da toxoplasmose está relacionada com a habilidade do *T. gondii* em se diferenciar rapidamente entre seus diferentes estágios infectantes (taquizoítos, bradizoítos e oocistos). Os taquizoítos, ao contrário dos bradizoítos tem como característica o rápido crescimento e replicação, são formas circulantes e capazes de formar cistos principalmente nos músculos esqueléticos e cérebro, quando são fagocitadas essas formas liberam proteínas no interior do vacúolo formado onde se dividem por endodiogenia e endopoligenia (SIBLEY, 1995). A transformação da forma taquizoíta para bradizoíta e posterior formação dos cistos teciduais acontece em resposta a um estresse que envolve o desenvolvimento da resposta imune específica dos hospedeiros intermediários limitando a multiplicação de taquizoítas e passando a formar cistos teciduais no tecido muscular, coração, cérebro e retina (CARRUTHERS, 2002).

Esses bradizoítos presentes nos cistos podem se converter para a forma taquizoíta anos depois de terem se formado, causando uma reativação da doença se o hospedeiro estiver imuno comprometido, os cistos também podem infectar ao serem ingeridos (SKARIAH et al., 2010). Os oocistos, diferentemente das outras duas formas infectantes presentes em hospedeiros intermediários, são liberados através das fezes na forma não-esporulada pelos hospedeiros definitivos de *T. gondii* contaminando o ambiente, porém esses oocistos só se tornam capazes de infectar hospedeiros intermediários quando se tornam esporulados. São formas capazes de resistir a longos períodos no solo (HILL; DUBEY, 2002; YAN et al., 2016).

A toxoplasmose pode apresentar diferentes quadros clínicos, desde infecções assintomáticas até manifestações sistêmicas extremamente graves com comprometimentos oculares importantes, má formações fetais, hidrocefalia, neuropatias e alterações neuromusculares (FELÍCIO et al., 2011; LOPES et al., 2007). A forma mais grave é encontrada em crianças recém-nascidas, sendo caracterizada por encefalite, icterícia, urticária e hepatomegalia, geralmente associada com coriorrenite, hidrocefalia e microcefalia, com altas taxas de morbidade e mortalidade. A toxoplasmose crônica provoca retinocoroidite severa; fraqueza muscular, perda de peso, cefaléia e diarreia podem estar presentes (PITTMAN; KNOLL, 2015). Os sintomas são vagos e indefinidos, e o diagnóstico é difícil. Sinais clínicos de toxoplasmose não são específicos o suficiente para definir um diagnóstico, na verdade esses sintomas mimetizam uma série de outras doenças infecciosas, por este motivo, o diagnóstico da toxoplasmose na espécie humana necessita ser confirmado por exames laboratoriais, podendo ser feitos por métodos biológicos, sorológicos, histológicos ou moleculares, ou pela combinação destes (HILL; DUBEY, 2002).

### 1.1.3. Ciclo de vida e transmissão

Os hospedeiros intermediários se infectam através da ingestão de oocistos espulados nos alimentos contaminados. Estes oocistos, uma vez no organismo, invadem o epitélio intestinal entre outras células, desde que sejam mononucleares e se multiplicam por reprodução assexuada, formando taquizoitos. Os taquizoitos livres, quando na fase inicial, podem ser transmitidos de forma vertical para os fetos. Os taquizoitos se aderem ao epitélio, não sendo assim arrastado pelas fezes, mas alguns se transformam em cistos, que são formas resistentes inativas, que são eliminados nas fezes. Já nos hospedeiros definitivos, além da forma assexuada, o *T. gondii* também pode assumir a forma sexuada esta fase ocorre no intestino dos felinos, que por sua vez se contaminam através da ingestão de animais contaminados por taquizoitos ou bradizoitos. Menos de 50% dos felinos que ingerem taquizoitos eliminam oocistos, e 100% quando ingerem bradizoitos eliminam oocistos nas fezes. Na fase assexuada, o parasita passa por um processo chamado esquizogonia, onde o núcleo do parasita se divide várias vezes formando o esquizonte, passando por outro processo chamado gametogonia, onde esses esquizontes se dividirão em gametas, gerando zigotos (oocistos) (HILL et al., 2005; BOOTHROYD, 2009).

*T. gondii* apresenta um ciclo heteroxeno, no qual os gatos são os hospedeiros definitivos por possuírem o ciclo coccidiano, apresentando uma fase sexuada dentro do vacúolo parasitóforo do citoplasma, isso nas células epiteliais do intestino, e um ciclo assexuado ocorrendo em outros tecidos. O homem e outros animais são hospedeiros intermediários possuindo apenas o ciclo assexuado. O tempo decorrido entre a infecção e o aparecimento de novos oocistos nas fezes dos felídeos (período pré-patente) dependerá da forma do parasito ingerido. Este período será de três dias, quando a

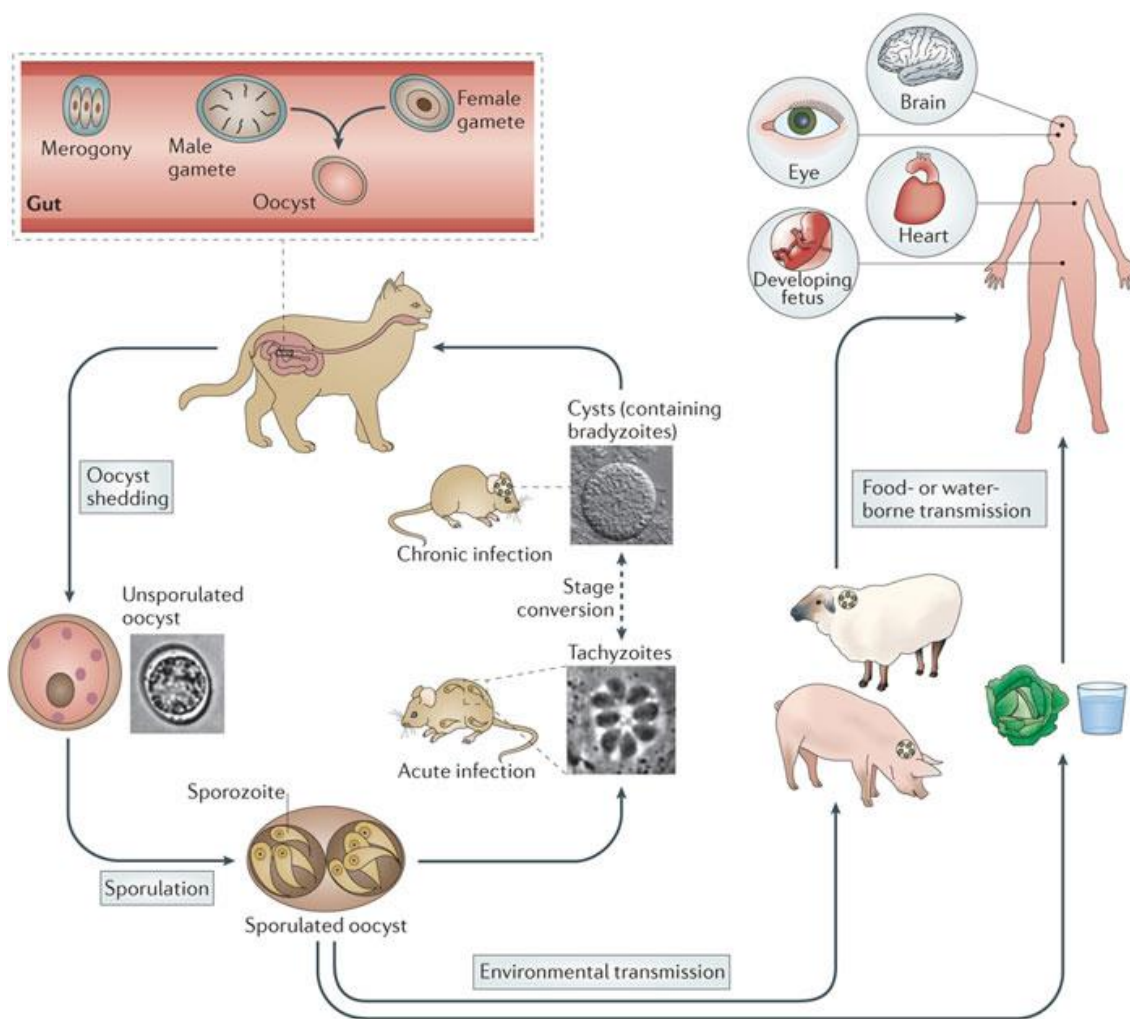


infecção ocorrer por cisto, 19 dias ou mais, por taquizoítos e 20 ou mais dias, por oocistos (DUBEY; FRENKEL, 1972; DUBEY, 2001).

O ciclo de vida se passa em duas fases distintas: a fase assexuada, e a fase sexuada. Na fase assexuada, um hospedeiro intermediário ingere oocistos ou entra em contato com taquizoítos eliminados no leite, ou ainda cistos encontrados na carne crua ou mal passada, poderá adquirir o parasito e desenvolver a fase assexuada. As formas que chegarem ao estômago serão destruídas, mas as que penetrarem na mucosa se reproduzirão, cada esporozoíto ou taquizoíto entrará numa célula e se reproduzirá intensamente (fase proliferativa); romperá a célula e liberará novos taquizoítos, que irão invadir novas células. Essa disseminação do parasito no organismo se dá por taquizoítos livres circulantes. Já o ciclo sexuada ocorre somente no epitélio intestinal de hospedeiros definitivos. Assim, um gato jovem e não imune, se infectando oralmente por oocistos, cistos ou taquizoítos, desenvolverá o ciclo sexuada em seu epitélio intestinal. O tempo decorrido dessa infecção até o aparecimento de novos oocistos em suas fezes (período pré-patente) dependerá da forma ingerida. Este período será de 3 a 5 dias, quando a infecção ocorrer por cistos; 5 a 10 por taquizoítos, e 20 a 24 dias para oocistos. Os esporozoítos ou taquizoítos, ao penetrarem no epitélio intestinal do gato, por um processo de esquizogonia, dão origem a vários merozoítos que, por sua vez, se transformarão em gametas (gametogonia). O macrogameta permanecerá dentro de uma célula epitelial, enquanto que o microgameta sairá de sua célula e irá fecundar o macrogameta, formando o ovo ou zigoto. Esse evoluirá dentro do epitélio, dando origem ao oocisto; depois, a célula epitelial, em alguns dias, se rompe, liberando o oocisto imaturo. Essa forma, através das fezes, alcançará o meio externo e, após um período de cerca de quatro dias, ficará maduro, isto é, apresentará 2 esporocistos e cada

um contendo 4 esporozoítos. O gato jovem é capaz de eliminar oocistos durante um mês (DUBEY; BEATTIE, 1988; FRENKEL, 1973; SMITH, 1993).

A infecção em gestantes ocorre geralmente por ingestão do oocisto com invasão de células do trato digestivo ou taquizoítos sendo fagocitado por leucócitos, seguido de multiplicação intracelular, lise celular e disseminação hematogênica ou linfática. No primeiro trimestre, podem existir repercussões graves no conceito, óbito fetal ou neonatal, seqüelas importantes. No segundo trimestre, o recém nascido apresentará manifestações subclínicas. No terceiro trimestre, manifestações subclínicas e mais raramente um quadro grave de parasitemia. O risco se aproxima de 100% se a infecção da genitora ocorre no último mês da gestação. Depende do fluxo sanguíneo placentário, virulência da cepa do *T.gondi*, susceptibilidade genética e carga parasitária que atinge a placenta (ANDRADE, 2008).



Nature Reviews | Microbiology

**Figura 2** – Ciclo de vida do *Toxoplasma gondii*. Os gatos são os hospedeiros definitivos onde ocorre a replicação sexual do *T. gondii*. Após replicação de merozoítos dentro dos enterócitos do intestino do gato (um processo conhecido como merogonia), gametas *T. gondii* macho e fêmea são formados no interior da célula do hospedeiro. A fusão de gametas leva à formação de oocistos diplóides que são eliminados nas fezes do gato e sofrem meiose no ambiente, para se obter esporozóitos de progeria oito haplóides. No hospedeiro intermediário (mostrado aqui como roedores) ocorre a replicação assexuada. A infecção aguda é caracterizada por taquizoítos (forma rapidamente replicantes) que disseminam por todo o corpo. Diferenciação de crescimento lento bradizoítas dentro de cistos teciduais resulta em infecção crônica de longo prazo. A ingestão de cistos teciduais via alimentar onívoro ou carnívoro pode levar à transmissão de qualquer outro hospedeiro intermediário ou para gatos re-iniciar a fase sexual do ciclo de vida. Oocistos são capazes de sobreviver no ambiente por longos períodos de tempo e oocistos (esporulados) podem contaminar os alimentos e água, proporcionando uma rota de infecção para hospedeiros intermediários. Muitos animais servem como hospedeiros intermediários, incluindo animais de fazenda. Os humanos são infectados pela ingestão de carne mal cozida contendo cistos teciduais ou pela ingestão de oocistos esporulados

em água contaminada. Embora a maioria das infecções humanas são suaves, a toxoplasmose pode causar sintomas graves no cérebro e outros órgãos em pacientes imunocomprometidos, bem como no feto em desenvolvimento após a infecção congênita. **Fonte:** Hunter; Sibley, 2012.

#### 1.1.4. Hospedeiros

Os hospedeiros definitivos são os felídeos, principalmente os gatos, nos quais esse protozoário realiza dois tipos de reprodução (FRENKEL, 1973).

Os hospedeiros intermediários são aqueles nos quais o parasita realiza somente a reprodução assexuada, são todos os outros animais de sangue quente. Os primeiros animais a serem identificados foram coelhos, cães domésticos e ratos (NICOLLE & MANCEAUX, 1909; MELLO, 1910; LEVADITI et al., 1928). A pouca exigência do parasito para um hospedeiro intermediário faz com que sua propagação seja notavelmente maior e capaz de estabelecer um risco para humanos através do consumo de carne, devido à presença de cistos (WEINMAN; CHANDLER, 1954). Essas características fazem com que o *T. gondii* esteja presente em todos os continentes, sendo o protozoário de maior distribuição mundial (WYROSDICK; SCHAEFER, 2015).

A infecção por *T. gondii* em ovelhas, cabras, bodes, cordeiros, porcos, gado, cavalos, entre outros é preocupante principalmente devido ao risco que pode trazer à saúde pública, através do consumo de carne e leite com presença do protozoário, ao ingerir essa carne crua e esse leite não fervido, o humano passa a ser hospedeiro intermediário da toxoplasmose. Outra preocupação é a grande perda econômica para os criadores desses animais de produção que além de poder levar ao comprometimento do animal, sua carne ou leite não poderão ser comercializados (DUBEY, 2010; DUBEY et al., 2014; PAPINI et al., 2015).

### 1.1.5. Resposta imune

Em tecidos linfóides secundários, a expressão de citocinas pró-inflamatórias e os antígenos de *T. gondii* são processados e apresentados por células apresentadoras de antígeno (APC) para células TCD4+ e TCD8+, que ativam a ativação e proliferação de células T. Os linfócitos T CD4+ ativados secretam citocinas que promovem o crescimento, diferenciação e funções de linfócitos B, macrófagos e outras células. Dois subgrupos desses linfócitos podem ser definidos pelo tipo de citocinas que secretam: Th1 (T helper 1) e Th2 (T helper 2), mas antes de se tornarem Th1 ou Th2, esses linfócitos estão em estado de quiescência), sendo denominados Th naive que são capazes de produzir citocinas IL-2 e expressar receptores para a mesma, agindo na própria célula que a está secretando. Depois de um estímulo as Th naive passam para a circulação, passando a designar-se Th0 e acontece a diferenciação em Th1 ou Th2: a citocina que induz as células Th0 a diferenciarem-se em Th1 é a IL-12 e a citocina que induz as células Th0 a diferenciarem-se em Th2 é a IL-4. Outra maneira de diferenciar essas células é pelo padrão de resposta, depois de ativadas: as Th1 produzem citocinas relacionadas principalmente com a defesa mediada por fagocitose contra agentes infecciosos intracelulares, como INF- $\gamma$ , IL-2 e TNF, as Th2 secretam IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, relacionadas com a produção de anticorpos IgE e reações imunes mediadas por eosinófilos e mastócitos contra alérgenos e helmintos. Após a ativação destas duas subpopulações, Th1 e Th2 influenciam-se mutuamente e de forma antagônica. O INF- $\gamma$  produzido pelas Th1 inibe as Th2, e a IL-10 produzida pelas Th2 inibe as Th1. Existem outros dois tipos de diferenciação das células Th0 que são as células Th17, específica para o combate de bactérias extracelulares, fungos, artrite reumatóide, esclerose múltipla e doença de Crohn, Th22, envolvida na defesa da barreira de mucosas, reparo de tecidos, proliferação e sobrevivência de células epiteliais, sendo IL-1 $\beta$ , IL-6, TGF- $\beta$ ,

IL-23 responsável pela indução da primeira e IL-22 pela segunda, Th9 é induzida pela expressão de IL-9 e é encontrada na resposta contra parasitos e em processos alérgicos inflamatórios, por fim as Treg estão envolvidas na regulação e supressão da resposta imune em condições patológicas, a indução dessas células ocorre durante a timopoiese normal ainda é desconhecida, porém, acredita-se que estas células possam ser geradas mediante reconhecimento de Ag próprios no timo, através de receptores (TCR) de alta afinidade. (OLIVEIRA et al, 2013; NALBANT; ESKIER, 2016; PERUSINA LANFRANCA, 2016; ROJAS-ZULETA; VÁSQUEZ, 2016; MERCADANTE; LORENZ, 2016). Os linfócitos T CD8<sup>+</sup> têm ação citolítica, ou seja, são capazes de destruir células que carreguem na superfície peptídeos que eles reconheçam como estranhos e aos quais se liguem especificamente e existem dois mecanismos principais responsáveis pela morte dessas células por esses linfócitos. O primeiro mecanismo envolve a formação de poros nas membranas e com isso ocorre a entrada de íons e água na célula, e o segundo envolve a apoptose. Para que isso ocorra os linfócitos T CD8<sup>+</sup> ativados produzem duas proteínas envolvidas nesse processo: a perforina e a granzima. Essas proteínas se concentram em grânulos citoplasmáticos ligados à membrana e as membranas do linfócito e da célula alvo se fundem por um processo de exocitose, o linfócito T CD8<sup>+</sup> transfere o conteúdo desses grânulos que levam à lise celular. A perforina é uma proteína formadora de poros em membrana celular e as granzimas são serino-proteases que entram na célula alvo através dos poros formados pela perforina e induzem a apoptose (GOODSWEN et al., 2013)..

*T. gondii* ativa células fagocíticas inatas através das vias de interação parasito-hospedeiro a partir do reconhecimento de receptores de padrão (PRRs) nos monócitos, macrófagos e células dendríticas. Quando essas células são ativas elas secretam citocinas pró-inflamatórias (como: IL-12, TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-1), englobam os

parasitos ou células que foram parasitadas e migram para os linfonodos ou baço. A produção de citocinas locais também ativa outras células imunes inatas, como células *natural killers* (NK) e células T  $\gamma\delta$  (GOLDSZMID et al., 2012). O *T. gondii* ao invadir as células ativamente, forma o vacúolo parasitóforo e assim também se protege. As células NK também contribuem para a imunidade em uma atividade citotóxica e a liberação de citocinas pró-inflamatórias locais pode ativar apoptose ou necrose de tecidos normais. Sistemicamente, essas citocinas ativam a febre e alteram a hematopoiese (WEISS & DUBEY, 2009). Além de ser uma estratégia de defesa natural a resposta inata tem se mostrado fundamental para o desenvolvimento da resposta adquirida, principalmente, através das células apresentadoras de antígeno (APCs) que por seus PRRs reconhecem os padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs) expressos em todos patógenos. Um dos PRRs mais são os do tipo Toll (TLR). A interação entre PAMPs e TLRs durante a infecção por *T. gondii*, promove o recrutamento de fagócitos para o tecido infectado, estimula macrófagos e células NK e induz a produção de citocinas pró-inflamatórias para dar início a resposta imune inata como IL-12, TNF, IL-6 e IL-1 (JEBBARI et al., 1998; HAQUES et al. 1999). Os TLRs expressos nos macrófagos e nas células dendríticas tem um papel chave para o despertar da resposta inata e no desenvolvimento da imunidade adquirida. Existe uma grande variedade de PAMPs no parasita que interagem com TLRs expressos nas células da imunidade inata desencadeando diversos efeitos biológicos (GAZZINELLI; DENKERS, 2006).

A resposta imune adquirida envolve uma forte resposta de linfócitos TCD4<sup>+</sup> do perfil Th1, linfócitos TCD8<sup>+</sup> citotóxicos e produção de IFN- $\gamma$ , que induz a produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos, potencializando a resposta inata. Antes de invadirem as células, logo depois da infecção, ou quando lisam as células infectadas, o

protozoário pode ser alvo de anticorpos e do sistema complemento. Entretanto só esses mecanismo da imunidade humoral não são considerados suficientes para controlar a doença. O controle das infecções causadas pelo *T. gondii* é altamente dependente de linfócitos TCD8+ citotóxicos, não só pela sua capacidade de lisar as células infectadas, mas também pela produção de citocinas (DENKERS et al., 1997). Muitos parasitas ao longo da evolução desenvolveram mecanismos de escape do sistema imune, particularmente da resposta imune adaptativa, garantindo, assim, sua permanência no hospedeiro. Além da capacidade de evasão, também têm a capacidade de suprimir a resposta imune, ou até se alojar em determinados órgãos ou células que são inacessíveis ao ataque imune. Geralmente o grande problema de uma infecção não é o parasita em si, mas sim as consequências da resposta imune que ele desencadeia no organismo. Na tentativa de eliminar o patógeno, a resposta produzida contra ele pode levar a um processo inflamatório, gerando morte celular e danos teciduais ao hospedeiro, como febre e a inflamação induzida pela resposta inata (SPENCE & LANGHORNE, 2012).. O controle das infecções depende da indução de uma resposta Th1, no entanto para evitar-se a imunopatologia é necessária uma resposta imunossupressora com produção de citocinas antiinflamatórias como a IL-10 e o TGF- $\beta$ , que atua diminuindo os efeitos inflamatórios gerados pela IL-12, TNF e intermediários reativos do nitrogênio, como NO. Esses mecanismos supressores podem limitar os danos teciduais provocados pelo processo inflamatório, mas, também, permitem a permanência do parasita no hospedeiro (HOLSCHER et al., 2000).

Outras citocinas têm papéis importantes na imunoregulação durante a infecção por *T. gondii* como TGF- $\beta$  que pode promover e prevenir a imunopatologia desse protozoário, dependendo se a IL-6 e subgrupos de células T estão presentes e IL-27 que tem a capacidade de potencializar e inibir respostas do tipo Th1 (BUTLER et al., 2013).



Fica evidente que a modulação da resposta imune pelas citocinas, tanto pró-inflamatórias quanto anti-inflamatórias, refletirão no curso da toxoplasmose no hospedeiro. E os mecanismos de evasão de qualquer parasito, servem para driblar a resposta imune em favor do seu crescimento e manutenção, essa ação não é exclusiva de protozoários intracelulares, estão presentes em bactérias extracelulares, vírus, fungos, helmintos e também em parasitos externos como no caso de carrapatos que precisam se manter fixos no hospedeiro para se alimentar e manter os níveis de infestação.

## ***1.2.Amblyomma sculptum***

### **1.2.1. Carrapato**

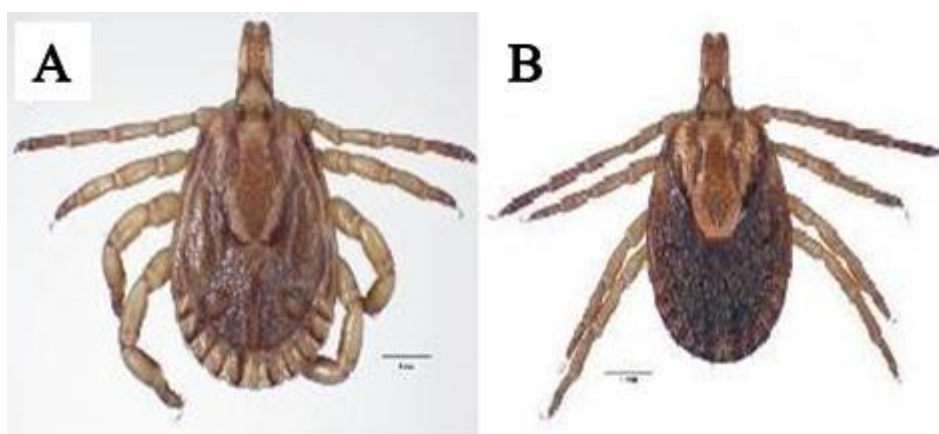
*Amblyomma cajennense* era considerado uma única espécie de carrapato que abrangia desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina mas, a partir de estudos baseados em características genéticas e morfológicas, definiu-se que esse carrapato na verdade é composto por um complexo de outros seis carrapatos: *A. cajennense sensu strictu*, *Amblyomma mixtum*, *Amblyomma sculptum*, *Amblyomma interandinum*, *Amblyomma pattinói* e *Amblyomma tonelliae* (NAVA et al., 2014a).

Cada uma dessas espécies é correspondente a uma região diferente. *A. cajennense sensu strictu* pertence à zona norte ocidental da bacia amazônica, *A. interandinum* na região inter-andina do Peru, *A. mixtum* é encontrada no sul dos Estados Unidos e ao noroeste da Colômbia, Equador e Venezuela. *A. sculptum* está presente nos estados brasileiros do sudeste (Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo), centro-oeste (Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul), Nordeste (Pernambuco e Piauí), sul do estado do Paraná, além do noroeste da Argentina. *A.*

*tonelliae* é estabelecida na região do Chaco da Argentina e Paraguai. E por fim, *A. pattinoi* no Oeste da Venezuela e Cordilheira Central na Colômbia. (NAVA et al, 2014b).

### 1.2.2. Hospedeiros

O carrapato *A. sculptum* é pouco exigente em relação a seus hospedeiros em sua fase adulta, contudo há preferência em parasitar equinos, bovinos, antas, capivaras, búfalos, cães, porcos, ovelhas, cabras e coelhos, além do homem em qualquer fase do seu desenvolvimento principalmente quando as populações desse carrapato estão muito numerosas (EVANS et al., 2000).



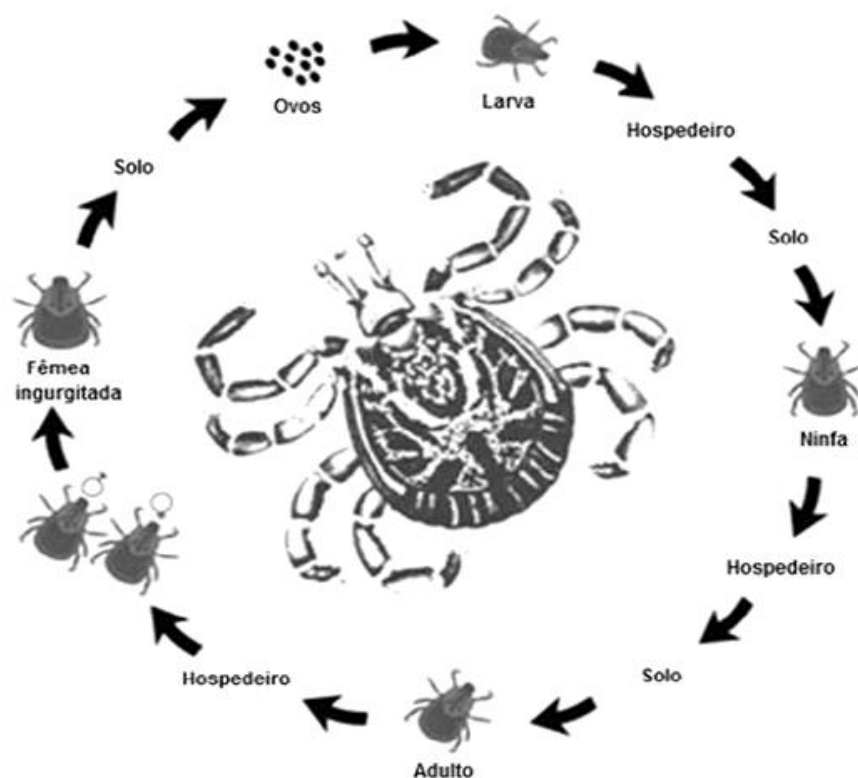
**Figura 3** – Morfologia do adultos de *A. sculptum*. (A) Macho e (B) fêmea.  
**Fonte:** Nava et al. (2014).

Os equinos são os principais hospedeiros domésticos para todos os estágios de *A. sculptum* nas áreas rurais do sudeste do Brasil, enquanto a capivara apresenta uma grande importância como hospedeiro silvestre em ambientes antropizados. (LABRUNA 2013).

### 1.2.3. Biologia

*A. sculptum* é um carrapato de três hospedeiros e realiza apenas uma muda por ano quando em condições naturais. As larvas são predominantes de abril a julho, as ninfas de julho a outubro e adultos de outubro a março (GUGLIELMONE et al., 2006).

As larvas eclodidas permanecem no solo sob a vegetação, sobem nas folhas do capim onde formam aglomerados à espera de um hospedeiro primário (como: equinos, antas e capivaras) onde se fixa por cinco dias, retorna ao solo e sofre muda. Após esse evento, o carrapato pode ficar longe do hospedeiro por até um ano, ao encontrá-lo se alimenta por cinco a sete dias e vai novamente para o solo e realiza sua segunda muda, diferenciando-se em macho ou fêmea, podendo permanecer até vinte e quatro meses sem se alimentar. No hospedeiro ocorre acasalamento e após, a fêmea se alimenta até ingurgitar, retornando ao solo para a postura dos ovos, onde eclodirão as larvas (KRANTZ & WALTER, 2009). A quantidade de *A. sculptum* local depende do microclima presente, sendo predominantes em áreas de densa cobertura vegetal (como: pastos “sujos”, caeiras e matas) (LABRUNA et al. 2001).



**Figura 4.** Ciclo de vida *Amblyomma sculptum*. As larvas eclodem no solo e buscam seu primeiro hospedeiro. Após repasto sanguíneo, as larvas ingurgitadas caem ao solo onde ocorre a ecdise para o estágio de ninfa. Ao encontrarem um novo hospedeiro, as ninfas realizam repasto sanguíneo e caem novamente ao solo onde ocorre a muda, para o estágio adulto. Os adultos (machos ou fêmeas) sobem no hospedeiro e, após a cópula, a fêmea inicia um período de alimentação rápida. Após ingurgitamento completo a fêmea cai ao solo para realizar a postura dos ovos. **Fonte:** Modificado de Aragão e Fonseca, 1961.

#### 1.2.4. Importância médico-veterinária

Os prejuízos causados pelo *A. sculptum* aos animais de produção ocorrem de várias maneiras. Geralmente é causado pelas fêmeas ingurgitadas, já que larvas, ninfas e machos são pequenos e, apesar de também se alimentarem de sangue, alimentam-se principalmente de linfa e substratos da pele, causando irritação cutânea e danos permanentes ao couro dos animais. Segundo relatos do setor coureiro, caso haja um controle eficiente do carrapato, 40% dos 80% de couros classificados como de sexta e sétima categorias retornariam à quinta categoria, agregando-se a este produto valores superiores a 25% (KAHSEY et al., 2015).

Economicamente, o Ministério da Agricultura Nacional, estima em um bilhão de dólares anuais os prejuízos causados por carrapatos no país, sendo 40% desse total relativo à diminuição da produção leiteira. De acordo com levantamento feito pelo Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal (SINDAN), o país gastou no período de um ano em 13,8 milhões de dólares na compra de carrapaticidas, representando 15% do total gasto com defensivos.

Outros problemas estão associados a infestações por carrapatos, tais como, diminuição na produção de leite, redução da natalidade, consumo de carrapaticidas, perda de peso e morte do animal e transmissão de patógenos que provocam graves enfermidades como a bactéria *Rickettsia rickettsi* que causa Febre Maculosa no Brasil (LABRUNA et al., 2011) e do vírus da encefalite eqüina (LINTHICUM et al., 1991), em menor escala, é vetor de *Ehrlichia ruminantium* (BARRÉ et al., 1987), *Theileria equi* (PECKLE et al., 2013) e também microsporídios (RIBEIRO & GUIMARÃES, 1998). Além de transmissão de patógenos que podem causar essas patologias associadas, *A. sculptum* pode causar também paralisia em animais domésticos (GUGLIELMONE et al., 2006) e no Brasil, paralisia em caprinos e ovinos (SERRA-FREIRE, 1983). Além disso, também pode estar envolvido na transmissão de um agente causal desconhecido que causa uma síndrome semelhante à doença de Lyme em humanos (SHINJO et al., 2009).

Em humanos, a picada do carrapato é respondida com reações de hipersensibilidade imediata ou tardia contra antígenos específicos que estejam presentes na saliva do carrapato, levando a produção de prurido e a uma lesão granulomatosa que persistem por vários dias ou meses no local da fixação (GUIMARÃES et al., 2001).

### 1.2.5. Efeito da saliva de *A. sculptum* na resposta imune do hospedeiro.

A laceração da pele causada pela inserção do apaelho bucal do carrapato para se alimentar causa uma lesão que inicia um complexo sincronizado de eventos com o objetivo de buscar a homeostase e repará-la, consiste em uma resposta imediata, inflamação, proliferação e migração de células, tornando-se um desafio para o carrapato permanecer no local para o repasto sanguíneo. A resposta imune inicial do hospedeiro envolve o influxo e ativação de neutrófilos para matar os patógenos que contribuem com o remodelamento da matriz extracelular, formação de novos vasos e epitélio.

A composição da saliva é pluripotente, composta por diferentes proteínas que podem causar múltiplos efeitos no hospedeiro por terem como alvos mais de um mecanismo ou via no mesmo tipo celular ou então esses alvos podem ter diferentes funções em diferentes tipos celulares. Modula a atração de neutrófilos através da modificação na produção de quimiocinas e citocinas, reduzindo a ativação e regulando negativamente espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico, também a expressão de integrinas, moléculas de adesão, angiogênese, migração de fibroblastos e presença de metaloproteases que remodelam a matriz extracelular. Atua diretamente na inibição de TGF- $\beta$ , fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e fator de crescimento de fibroblasto (FGF). Essas mudanças quando combinadas com redução da angiogênese contribuem para redução da rejeição do hospedeiro no local da picada (WIKEL, 2013; CHMELARŔ et al., 2016).

Já foi demonstrado que o tratamento de células do linfonodo de camundongos C3H/HeJ infestados com o carrapato *Rhipicephalus sanguineus* ao serem estimuladas com Concanavalina-A promoveram um perfil de citocinas Th2, levando ao aumento de citocinas como IL-4, IL-10 e TGF- $\beta$  e diminuindo os níveis de citocinas Th1 como IFN- $\gamma$  e IL-12 (FERREIRA; SILVA, 1999). Enquanto em cultura de células do linfonodo de

camundongos infestados com o carrapato *A. sculptum*, há aumento na produção de IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-10 ao serem estimuladas com Concanavalina-A, também inibe a expansão clonal de células T antígeno-específicas, diferenciação de células B, ativação de macrófagos e atividade de células NK (CASTAGNOLLI et al., 2008).

Pode-se observar que a saliva dos carrapatos age na produção de citocinas nos hospedeiros, dependendo da presença ou ausência de patógeno, de qual patógeno está sendo estudado, do re-estímulo utilizado nas células em cultura, entre diversos fatores, por isso é considerada imunomoduladora. Sabendo-se que tanto *A. sculptum* quanto *T. gondii* não são exigentes quanto aos seus hospedeiros, podemos aferir que naturalmente eles poderão parasitar animais ao mesmo tempo e *T. gondii* depende das citocinas produzidas pelo hospedeiro para se multiplicar, encistar e também para ser eliminado do organismo. Se a saliva modula diferentemente a produção de citocinas para cada patógeno, o parasitismo de *T. gondii* também poderia ser alterado na presença da saliva de *A. sculptum*.

*Justificativa*

---



## 2. JUSTIFICATIVA

A infecção por *T. gondii* em ovelhas, cabras, bodes, cordeiros, porcos, gado, cavalos, entre outros é preocupante principalmente devido ao risco que pode trazer à saúde pública, através do consumo de carne e leite com presença do protozoário, ao ingerir essa carne crua e esse leite não fervido, o humano passa a ser hospedeiro intermediário da toxoplasmose. Outra preocupação é a grande perda econômica para os criadores desses animais de produção que além de poder levar ao comprometimento do animal, sua carne ou leite não poderão ser comercializados (DUBEY, 2010; DUBEY et al., 2014; PAPINI et al., 2015).

Os prejuízos causados pelo *A. sculptum* aos animais de produção ocorrem de várias maneiras. Vão de irritação cutânea e danos permanentes ao couro dos animais, segundo relatos do setor coureiro, até problemas estão associados a infestações por carrapatos, tais como, diminuição na produção de leite, redução da natalidade, consumo de carrapaticidas, perda de peso e morte do animal, segundo SINDAN (KAHSEY et al., 2015). Economicamente, o Ministério da Agricultura Nacional, estima em um bilhão de dólares anuais os prejuízos causados por carrapatos no país.

Por serem pouco exigentes em relação a seus hospedeiros, *T. gondii* e *A. sculptum* podem, em condições naturais (como em fazendas, onde há a presença dos dois), se encontrar em um mesmo hospedeiro, e a junção de prejuízos causados por esses dois parasitos em um mesmo animal pode acarretar grandes perdas econômicas principalmente para os produtores de carne e leite. Além da capacidade de um interferir no parasitismo um do outro, visto que a saliva modula a produção de citocinas que são responsáveis pela manutenção ou eliminação de *T. gondii* no hospedeiro. Então, a intenção foi avaliar se saliva do carrapato *A. sculptum* aumenta a susceptibilidade à

infecção por *T. gondii*, visto que hospedeiros intermediários como ovelhas, cabras, bodes, cordeiros, porcos, gado, cavalos, entre outros hospedeiros comuns aos dois, podem ser infestados por carrapatos e infectados pelo protozoário ao mesmo tempo.

*Objetivos*

---

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1.Objetivo geral**

Avaliar o efeito imune celular-específico da saliva de *A. sculptum* durante a infecção por *T. gondii* em camundongos.

#### **3.2.Objetivos específicos**

- Avaliar a sobrevivência de camundongos infectados com *T. gondii*, na presença e na ausência de tratamento com saliva;
- Avaliar a produção de citocinas *in vivo* e *ex vivo* durante a infecção por *T. gondii*, na presença e ausência de saliva;
- Determinar a carga parasitária e inflamação tecidual nas fases aguda e crônica em camundongos infectados por *T. gondii* e tratados ou não com saliva;
- Quantificar anticorpos séricos antígeno-específicos das classes IgG em camundongos infectados com taquizoítos de *T.gondii*, tratados ou não com saliva;

*Materiais e métodos*

---

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Manutenção dos carrapatos

Para a manutenção das colônias de *A. sculptum*, foram coletadas ninfas presentes no ambiente, através do método de arraste, na fazenda Capim Branco da Universidade Federal de Uberlândia e mantidas em estufa BOD em condições de temperatura e umidade controladas ( $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$  e  $90 \pm 5\%$  de umidade). Para a manutenção do ciclo, larvas, ninfas e adultos foram alimentados em coelhos de acordo com a metodologia de Bouchard & Winkel em 2005, com modificações, obtidos de lojas agropecuárias. Essa metodologia se baseia na fixação de câmaras de alimentação em coelhos. As câmaras foram confeccionadas a partir de tubos de polipropileno de 50 mL e foram cortados permanecendo com aproximadamente 3,5 cm de altura. As tampas receberam pequenos furos para permitir a entrada de umidade. Os carrapatos de diferentes fases de desenvolvimento foram colocados nas câmaras fixadas nos animais.

As câmaras foram afixadas com adesivo de contato (Brascoplast Standard, Brascola) no dorso e após 24 horas da fixação das câmaras, as larvas, ninfas ou os casais de adultos foram colocados dentro das câmaras, que foram verificadas diariamente. Após completarem a alimentação, os espécimes foram retirados e mantidos em estufa BOD nas condições mencionadas acima.

Para coleta de saliva, coelhos foram mantidos no Laboratório de Ixodídeos da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia. Todos os experimentos foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética de Experimentação Animal da Universidade Federal de Uberlândia(CEUA/UFU#033/14 – Anexo I) de

acordo com os princípios éticos de experimentação animal regulamentado pelo Conselho Nacional de Controle e experimentação animal (CONCEA).

#### **4.2.Coleta de saliva**

A coleta de saliva do carrapato *A. sculptum* foi realizada como previamente descrito por Oliveira et al. (2011), com algumas modificações. Fêmeas ingurgitadas de *A. sculptum* foram lavadas em uma solução de fosfato em tampão bicarbonato à 0.1M, colocadas em posição dorsal em fita de dupla face e depois injetado 10-20 µl de solução de dopamina 0.2% em PBS, usando uma agulha 12.7 × 0.33 mm. Saliva foi coletada usando um pipetador automático e mantida em gelo. Ao fim da coleta, a saliva foi estocada no freezer -80°C até seu uso em experimentos. A concentração protéica dessa saliva foi determinada pelo Nanodrop Lite, ThermoScientific, USA. A média da concentração protéica obtida foi ~350µg/ml.

#### **4.3.Animais**

Camundongos C57BL/6 selvagens fêmeas com idade de 6-8 semanas foram mantidos no Centro de Bioterismo e Experimentação Animal (CBEA/UFU) sob temperatura controlada (22 a 25°C), mantidas no regime de 12 horas de período claro e 12 horas de período escuro com água e comida *ad libitum*. Todos os experimentos foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética de Experimentação Animal da Universidade Federal de Uberlândia (CEUA/UFU#052/12 – Anexo II).

#### 4.4. Cultivo de *T. gondii*

Células de epitélio uterino humano da linhagem HeLa (ATCC CCL-2) foram cultivadas em frascos de cultura celular de 25cm<sup>2</sup> contendo meio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute; Life Technologies Corporatin, Carlsbad-CA, EUA) suplementado com glutamina (2mM), antibiótico/antimicótico (100 U/mL penicilina, 100 µg/mL estreptomicina e 0,25 µg/mL anfotericina B) e 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Campinas, Brasil), em estufa a 37°C com 5% CO<sub>2</sub>, até atingirem confluência.

Taquizoítos de *T. gondii* da cepa PRU (Tipo II) construídos para expressar luciferase e GFP (PRU  $\Delta h x g p r t$  A7) (KIM et al., 2007), foram mantidos em monocamadas confluentes de células HeLa à 37°C com 5% CO<sub>2</sub>, em meio RPMI 1640 suplementado. Após a ruptura das células, os parasitas extracelulares foram obtidos através da centrifugação do sobrenadante à 800xg por 10 minutos à 4°C. O pellet foi ressuspendido em RPMI 1640 e os taquizoitos estimados em câmara de Neubauer para os experimentos *in vivo*.

#### 4.5.Preparação de antígeno solúvel de *T. gondii*

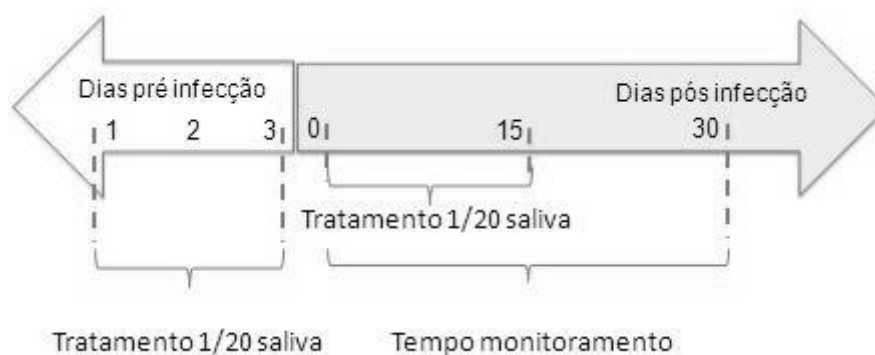
Antígenos solúveis de lisado de *T. gondii* da cepa RH (STAg) foram preparados de acordo com os métodos já descritos por Silva et al. (2007). Suspensões parasitárias foram diluídas em PBS e tratadas com coquetel de inibidores de protease (Complete Mini Roche, Basel, Suíça) e submetidas a lise celular por dez ciclos rápidos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho-maria a 37°C. Posteriormente parasitos lisados foram submetidos à centrifugação (10.000 × g, 30 min, 4°C) onde o sobrenadante resultante foi coletado e a concentração proteica quantificada



utilizando o método de Bradford (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) (BRADFORD, 1976). Alíquotas de STAg foram armazenados a  $-20^{\circ}\text{C}$  até sua utilização no ELISA.

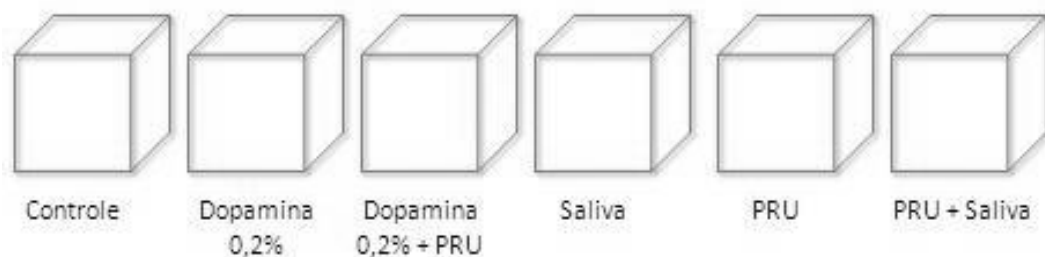
#### 4.6. Curva de mortalidade

Para esse experimento foram utilizados dois grupos contendo 10 camundongos cada, o primeiro foi tratado via intraperitoneal (I.P.) com uma concentração de 1/20 de saliva bruta diluída em PBS e o outro grupo tratado (I.P.) apenas com PBS, três dias antes da infecção I.P. com  $5 \times 10^4$  taquizoitos de *T. gondii*. O tratamento com saliva continuou por um período de 15 dias (a cada dois dias) após a infecção, para observar mortalidade e perda de peso.



#### 4.7. Análise da resposta imune celular e humoral

Para analisar a fase aguda da infecção foram utilizados 6 diferentes grupos experimentais, sendo 5 camundongos por grupo (N.I. – sem tratamento com saliva de *A. sculptum* e sem infecção por *T. gondii*; Dopamina 0,2% - apenas tratado com dopamina e não infectado; Dopamina 0,2% + PRU – tratado com dopamina e infectado com *T. gondii*; Saliva – apenas tratado com saliva 1/20; PRU – não tratado, apenas infectado com *T. gondii*; PRU+Saliva - tratado com saliva 1/20 e infectado com *T. gondii*).



Os camundongos tratados com a saliva, foram inoculados I.P. com uma concentração de 1/20 de saliva bruta diluída em PBS um dia antes da infecção I.P. com  $1 \times 10^4$  taquizoitos de *T. gondii* da cepa PRU e três dias alternados até completarem sete dias de infecção. Aqueles tratados com dopamina, foram inoculados I.P. com uma concentração de 0,2% de dopamina diluída em PBS um dia antes da infecção I.P. com  $1 \times 10^4$  taquizoitos de *T. gondii* da cepa PRU e três dias alternados até completarem sete dias de infecção. Após os sete dias de infecção foram coletados: soro, lavado peritoneal, pulmão e fígado dos camundongos.

Foi realizada também uma infecção de quinze dias. Os camundongos foram tratados com a saliva e inoculados I.P. com uma concentração de 1/20 de saliva bruta diluída em PBS um dia antes da infecção I.P. com  $1 \times 10^4$  taquizoitos de *T. gondii* da cepa PRU e em dias alternados até completarem quinze dias de infecção. Após os quinze dias de infecção foram coletados: soro, baço e cérebro dos camundongos.



Para avaliar a resposta imune humoral, ELISA de IgG total contra *T. gondii* foi realizado nos soros coletados dos camundongos infectados por *T. gondii* e tratados e não tratados com saliva.

#### 4.8. Análise histopatológica

Amostras teciduais de pulmão, fígado e cérebro de camundongos infectados com  $1 \times 10^4$  taquizoítos de *T. gondii*, tratados e não tratados com saliva, foram coletadas e fixadas em formol 10% em tampão PBS por 24 horas. No dia seguinte, os órgãos foram incluídos em parafina e cortados ( $5 \mu\text{m}$  de espessura) com o auxílio de um micrótomo para fixação em lâminas, as quais foram posteriormente coradas com Hematoxilina e Eosina como previamente descrito (MINEO et al., 2009). As imagens dos cortes foram obtidas ao microscópio invertido automatizado FSX100 (Olympus, Tóquio, Japão), e foi avaliada a presença de alterações como: edema celular, congestão, infiltrados multifocais e mistos e necrose.

#### **4.9. Homogenato de órgãos**

Para análise da produção de citocinas órgãos de animais previamente infectados, tratados ou não com saliva, foram posteriormente coletados e processados. A quantidade de órgãos foi ajustada para 100 mg de tecido (pulmão e fígado) e adicionado aos mesmos 500  $\mu$ L de solução contendo inibidor de protease (Complete Mini Roche, Basel, Suíça). As amostras foram trituradas com o auxílio de um homogeneizador sendo em seguida centrifugada a  $10.000 \times g$  por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e armazenado a -70°C até o momento do uso.

#### **4.10. Determinação da produção de citocinas *in vivo***

Produção de citocinas IFN- $\gamma$  e IL-10 foi mensurada em lavado peritoneal e homogenatos de pulmão e fígado (100mg de tecido) e nas células do baço de camundongos previamente infectados, utilizando kits de ELISA comerciais de acordo com protocolos recomendados pelo fabricante (BD Biosciences, San Diego, EUA). Em suma, placas de poliestireno de alta afinidade (Corning Incorporates Costar®, Corning Laboratories Inc., New York, EUA) foram sensibilizadas com anticorpo de captura específico para cada citocina e incubadas overnight à 4°C. Posteriormente houve o bloqueio de sítios inespecíficos utilizando 10% de SFB em PBS 0.01M (pH7,2) por 1 hora, seguido pela adição das amostras a serem testadas à placa. Concomitantemente, curvas padrão das respectivas citocinas testadas foram acrescidas em diluições seriadas. Após 2 horas de incubação, anticorpos de detecção biotinizados acrescidos de estreptavidina-peroxidase específicos para cada citocina foram incubados por 1 hora. Entre cada etapa da reação as placas foram lavadas cinco vezes com PBS contendo Tween 20 a 0,05% (PBS-T). A reação foi desenvolvida utilizando o substrato

enzimático tetrametilbenzidina (TMB) seguido pela adição de ácido sulfúrico 2M para interromper a reação. A densidade óptica (DO) foi determinada em leitor de placa (*SpectraMaxM2e*, Molecular Devices, EUA) a 450nm, sendo a concentração de cada citocina determinada a partir da curva padrão e expressas em pg/ml. Limite de detecção: IFN- $\gamma$  - 4.1 pg/ml; IL-10 - 31.3 pg/ml.

IL-6 e TNF foram mensurados em lavado peritoneal de camundongos previamente infectados por meio do ensaio multiplex *Flex Set Cytometric Bead Array-CBA* (BD Biosciences, San Diego, EUA), de acordo com informações do fabricante. O ensaio foi realizado em tubo, onde foi acrescentado 25  $\mu$ L de beads de captura; 25  $\mu$ L curva padrão ou amostras e 25  $\mu$ L anticorpo de detecção. Após 3 horas de incubação à temperatura ambiente foi adicionado 500  $\mu$ L do tampão de lavagem e centrifugado ( $200 \times g$  / 5 minutos). Posteriormente, foi desprezado o sobrenadante e acrescentado 300  $\mu$ L do tampão, a leitura do experimento foi realizada no citômetro de fluxo (BD FACSCanto II, BD Biosciences, EUA). Os dados foram processados e analisados utilizando *software* apropriado (FlowJo, TreeStar Inc., Asland, Oregon, EUA). Limite de detecção: IL-6 – 1.4 pg/mL; TNF – 0.9 pg/mL.

#### **4.11. PCR em tempo real**

O parasitismo em amostras de tecido e células do lavado peritoneal dos animais infectados com dose sub-letal de taquizoítas de *T. gondii* foi quantificado pela amplificação específica de cópias de DNA por meio de *Real-time* PCR e normalização com GAPDH como previamente descrito (JOHNSON; WIDLANSKI, 2004). Inicialmente, o DNA das amostras foi extraído a partir de 50mg de tecido ou pellet celular e foi adicionado 500  $\mu$ L de Tampão NLB (10 mM Tris-HCl, 400 mM NaCl e 2 mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH 8.2), 16  $\mu$ L de SDS 10% e 8  $\mu$ L de Solução proteinase K

(20mg/ml). Após a incubação a 50°C *overnight*, foi acrescentado às amostras 150 µL de Tampão NaCl 6 M em banho de gelo por 10 minutos com posterior centrifugação a 13400 rpm durante 15 minutos. O sobrenadante foi coletado e acrescentou-se 800 µL de etanol absoluto. Em seguida, o DNA foi coletado e ressuspensionado com 150-200 µL de água livre de nuclease. A concentração de DNA extraído foi determinada em espectrofotômetro UV (260 nm; Nanodrop, ThermoScientific, Wilmington, EUA) e ajustada para 40 ng/µL com água estéril e livre de DNase (água DEPC).

A reação foi realizada no equipamento de PCR em tempo real (Real time PCR System, Life Technologies Corporation, Carlsbad, EUA) com *primers* específicos para *Toxoplasma gondii* (5'-GCT CCT CCAGCC GTC TTG-3'; Reverse: 5'-TCC TCA CCC TCG CCT TCA T- 3'), GAPDH (Forward: 5'- CTC GTC CCG TAG ACA AAA TGG- 3'; Reverse: 5'-AAT CTC CAC TTT GCC ACT GCA) (Exxtend) e um mastermix com o sistema de detecção *SYBR green* (Promega, Madison, EUA). A carga parasitária foi estimada por meio da extrapolação do número de cópias de DNA de *Tg* nas amostras comparado com curva padrão com quantidades de DNA conhecidas de *T. gondii* usando o *software* StepOne Plus (AppliedBiosystems, Foster City, EUA). Os resultados foram expressos em picogramas de DNA do parasito / µg de DNA total.

#### **4.12. Experimento *ex vivo***

Para analisar as citocinas em células do baço *ex vivo* quinze dias após a infecção/tratamento, animais foram eutanaziados e o baço coletado em meio RPMI. O baço foi macerado e as suspensões resultantes foram lavadas e centrifugadas a 400 × g por 10 minutos a 4°C em meio RPMI. O sedimento de células obtidas foi ressuspensionado em tampão de lise de hemácias (0.16 M NH<sub>4</sub>Cl e 0.17 M Tris-HCl, pH 7.5) e, após cinco minutos de incubação foram lavados por duas vezes em meio RPMI. Após

centrifugação o pellet contendo células foi ressuspensão em meio RPMI suplementado (meio RPMI incompleto; 200  $\mu$ M L-glutamina; 10% de soro fetal bovino;  $5 \cdot 10^{-5}$  M 2-mercapoetanol), depois essas células foram plaqueadas em uma placa de 96 poços e re-estimuladas com taquizoítos de *T. gondii* (MOI 1), sobrenadante foi coletado e IFN- $\gamma$  e IL-10 mensurados.

#### **4.13. Dosagem de IgG total contra *T. gondii***

Ensaio imunoenzimático (ELISA) foi realizado para detectar a cinética de anticorpos IgG anti-*T. gondii* em amostras de soros dos camundongos infectados com a dose sub-letal de  $1 \times 10^4$  taquizoítos de *T. gondii*, com 0, 7 e 14 dias após a infecção, seguindo o protocolo já descrito com algumas modificações (SILVA et al., 2007).

Placas de 96 poços de alta afinidade (Corning-Costar, New York, EUA) foram sensibilizadas com antígeno solúvel de *T. gondii* (STAg), em concentração de 10  $\mu$ g/ml em tampão carbonato 0,06 M (pH 9,6) por 18 horas a 4°C. As placas foram lavadas com PBS contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T) e os sítios inespecíficos bloqueados com leite em pó desnatado em PBS-T (PBS-TM) a 5%. Após novas lavagens, as amostras de soros dos camundongos infectados foram adicionadas, em duplicata, na diluição de 1:25 (*T. gondii*) em PBS-TM 1%, por 1 hora. Após incubação a 37°C, as placas foram lavadas e foi adicionado o anticorpo secundário (anti-IgG de camundongo) na diluição 1:1000 marcado com peroxidase (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) e incubado durante uma hora a 37°C. Após um ciclo final de lavagens, as placas foram reveladas pela adição do substrato enzimático ( $H_2O_2$  a 0,03%) em tampão cromógeno consistindo de Ácido 2, 2'-Azino-Bis-3-Ethylbenzothiazoline-6-Sulfônico 0,01M (ABTS; Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) em tampão citrato-fosfato 0,07 M (pH 4,2). Após incubação por 20-30 minutos à temperatura ambiente, a densidade óptica

(DO) foi determinada em leitor de placas a 405 nm. O ponto de corte da reação foi determinado pela média dos valores de DO dos soros controles negativos acrescido de três desvios padrões. Os títulos de anticorpos foram expressos em densidade óptica (D.O.).

#### **4.14. Análise estatística**

A análise estatística foi calculada utilizando-se o software *GraphPad Prism 5.0* para os ensaios *in vitro* e *in vivo*. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão e as diferenças consideradas estatisticamente significantes quando  $p < 0,05$ , como determinado pelo método Two-Way ANOVA com pós-teste de comparação múltipla de Bonferroni, Teste T ou Mann Whitney, dependendo da peculiaridade de cada protocolo experimental. A análise estatística de mortalidade foi estimada utilizando análise pelo método de Kaplan-Meier sendo a curva de sobrevida comparadas através do teste Log-rank (MantelCox).

#### **4.15. Normas de biossegurança**

Todos os procedimentos no laboratório tais como realização de experimentos, manuseio de equipamentos, coleta de materiais biológicos e utilização de reagentes foram realizados de acordo com normas de biossegurança previamente descritas (MINEO et al., 2005).



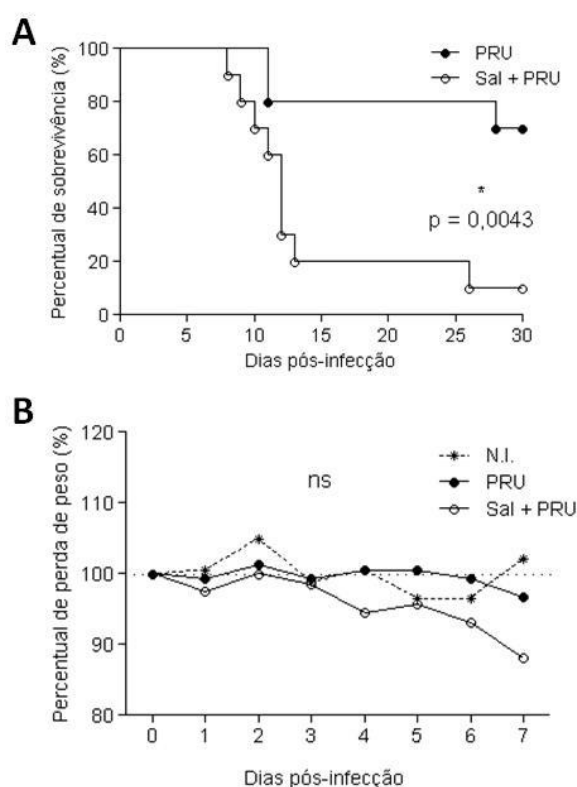
*Resultados*

---

## 5. Resultados

### 5.1. Camundongos tratados com saliva de *A. sculptum* são mais susceptíveis a infecção por *T. gondii*

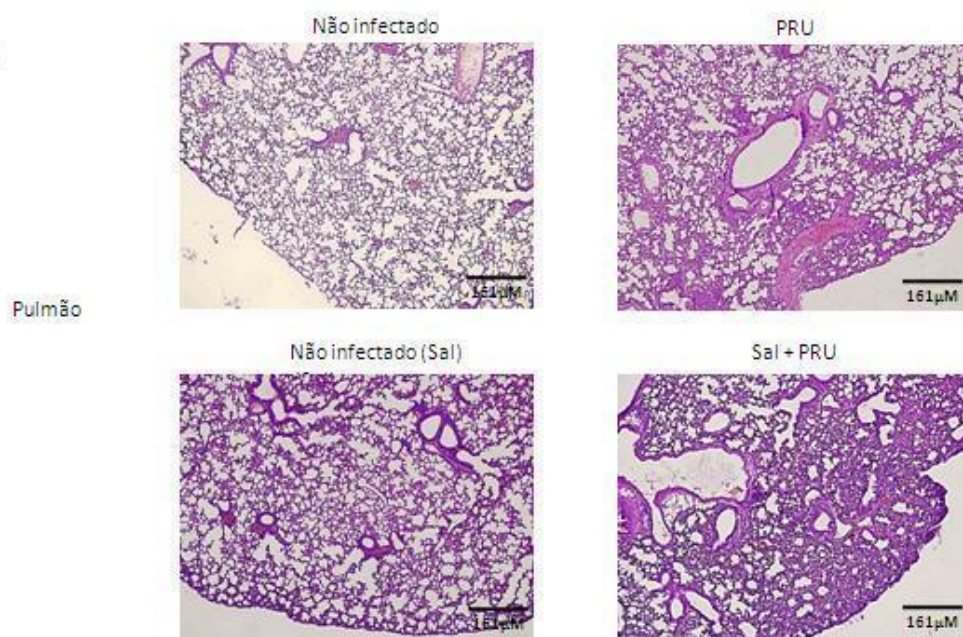
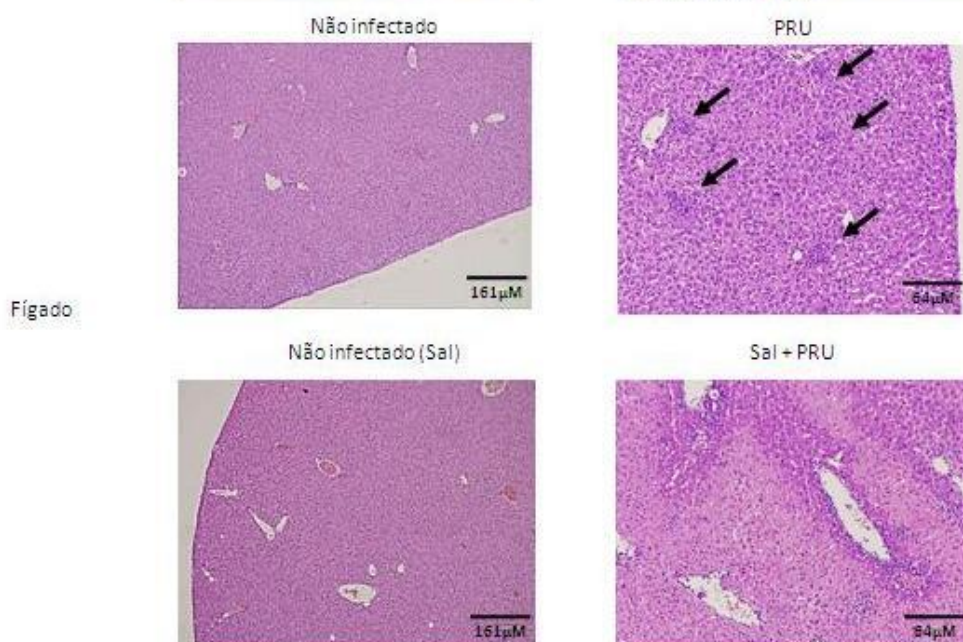
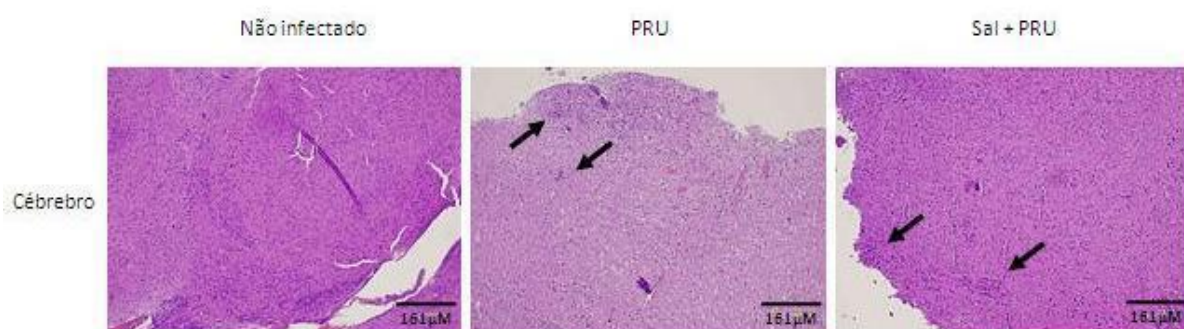
Para avaliar o efeito da saliva de *A. sculptum*, durante 30 dias de infecção por *T. gondii* foi realizada a curva de sobrevida. O grupo tratado com saliva apresentou uma sobrevida de apenas 10% dos camundongos, enquanto aquele grupo tratado apenas com PBS, 70% dos camundongos sobreviveram ( $p = 0.0043$ ) (Figura 5A). Observou-se também que ao terceiro dia de infecção os animais iniciaram perdas de peso mais significativas (Figura 5B), entretanto essa perda de peso foi na mesma proporção entre os grupos comparados.



**Figura 5. A saliva interfere na sobrevivência de camundongos infectados com *T. gondii*.** Curva de sobrevida de grupos de camundongos WT (n=10 camundongos/grupo) infectados I.P. com  $5 \times 10^4$  taquizoítos de *T. gondii*, sendo um grupo tratado com saliva

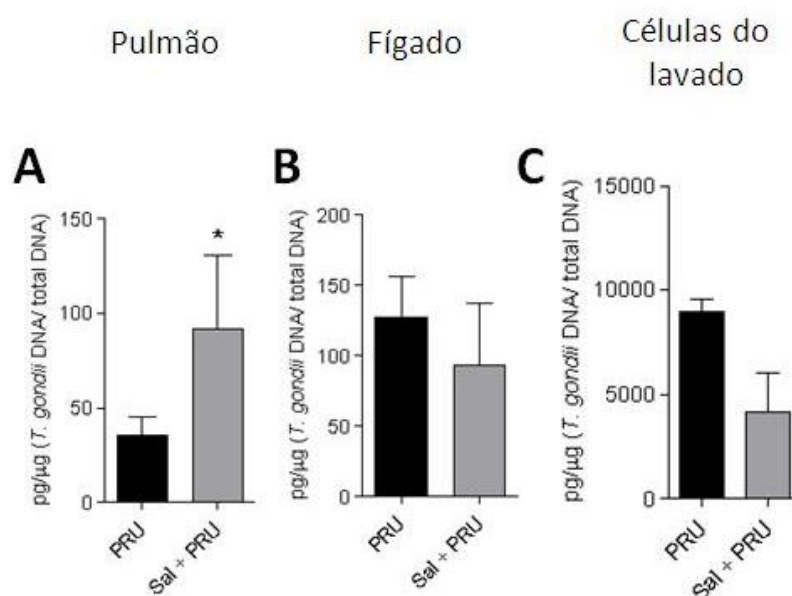
I.P. na diluição de 1/20 antes e 10 dias após a infecção (a cada dois dias) e outro grupo tratado com PBS. (A) Os animais foram monitorados durante 30 dias pós infecção para determinação da curva de sobrevida. Diferença entre grupos foi comparada usando análise de sobrevivência por Kaplan-Meier, através do teste de log-rank. (B) Monitoramento da perda de peso dos grupos ao longo da infecção. N.I. – não infectado/não tratado.

Com o objetivo de avaliar as causas da maior suscetibilidade em relação à saliva, camundongos foram submetidos à infecção com  $1 \times 10^4$  taquizoitos de *T. gondii*, para análise da inflamação tecidual em camundongos tratados e não tratados com saliva. De acordo com os resultados obtidos, foi observado que o fígado de camundongos submetidos ao tratamento sofreu mais com a infecção por *T. gondii* do que aqueles que não entraram em contato com a saliva (Figura 6B), vale ressaltar inclusive que o tecido apresentou necrose em 4 dos 6 camundongos tratados, associado frequentemente à infiltrados inflamatórios. Não houve diferença significativa no pulmão (Figura 6A) e nem no cérebro (Figura 6B). Animais tratados apenas com a dopamina não apresentaram alterações em seus tecidos.

**A****B****C**

**Figura 6: Saliva causa alterações histológicas no fígado de animais infectados com *T. gondii*.** Imagens histológicas após 7 dias de infecção I.P. com  $1 \times 10^4$  taquizoitos e tratamento I.P. com 1/20 de saliva no (A) pulmão, (B) fígado e 15 dias do (C) cérebro. As imagens foram obtidas a partir da coloração com hematoxilina-eosina de lâminas com cortes histológicos. As setas pretas indicam infiltrados inflamatórios.

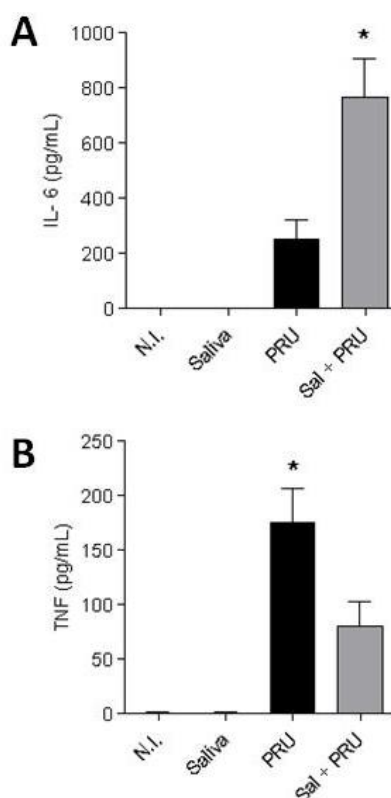
Células do lavado peritoneal, tecido hepático e pulmonar foram coletados para a análise do parasitismo na fase aguda da infecção. O DNA genômico de *T. gondii* foi quantificado através da técnica de qPCR e apenas o pulmão (Figura 7A) apresentou um aumento nas cópias de DNA de *T. gondii*. Os animais tratados com dopamina não apresentaram diferença no parasitismo.



**Figura 7. Quantificação em sítios específicos da carga parasitária em animais tratados e não tratados com saliva.** Camundongos foram infectados com  $1 \times 10^4$  taquizoitos de *T. gondii*(Tg) e tratados com saliva, foram sacrificados sete dias para coleta de lavado peritoneal, pulmão e fígado. Os dados foram obtidos a partir da reação de qPCR pela amplificação do gene Tg. Os valores são expressos como média e  $\pm$  erro padrão da média (SEM). Os dados foram analisados através do teste de Mann Whitney não apresentando diferenças significativas.

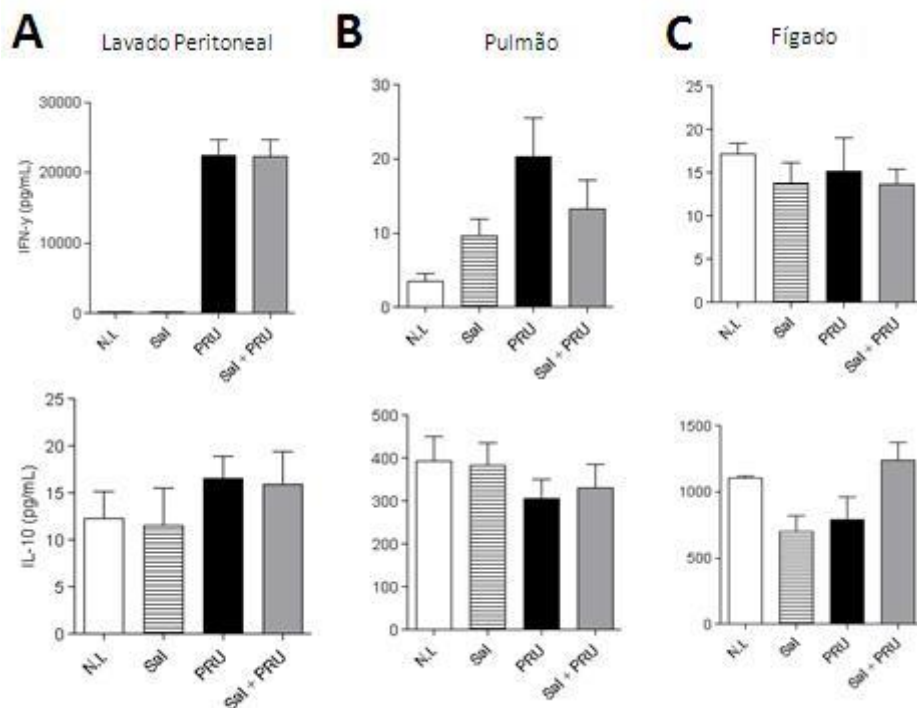
## 5.2. A saliva modulou a produção de citocinas no lavado peritoneal durante a infecção por *T. gondii*.

Para análise do efeito induzido pelo tratamento com a saliva de *A. sculptum* na produção de mediadores imunes de padrão Th1 e anti-inflamatórios, foi determinado a produção de TNF, IFN- $\gamma$ , IL-6 e IL-10 em camundongos infectados com  $1 \times 10^4$  taquizoítos de *T. gondii*. Em camundongos tratados após sete dias de infecção foi encontrado um aumento significativo nos níveis de IL-6 em fluidos de lavado peritoneal e uma diminuição dos níveis de TNF (Figura 8), quando comparado com camundongos não tratados.



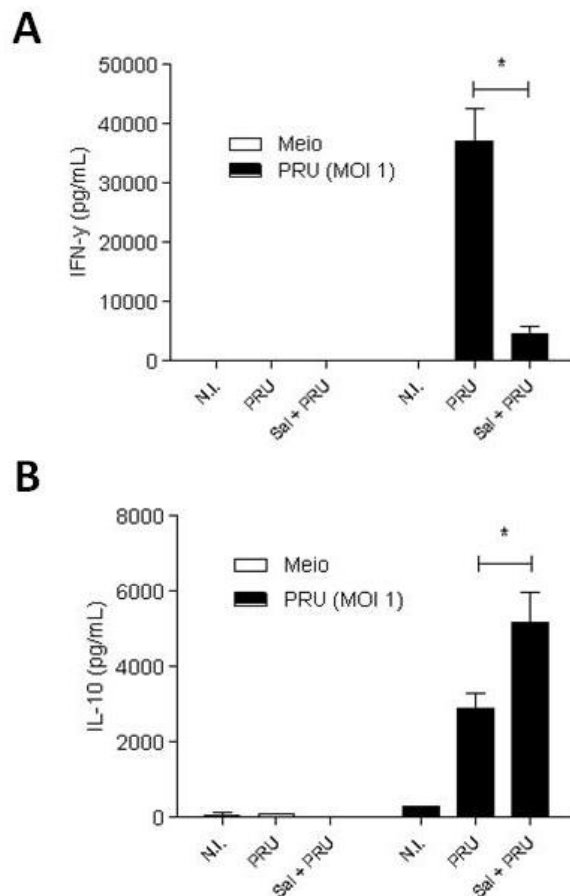
**Figura 8: Saliva interfere na produção de IL-6 e TNF no lavado peritoneal durante a infecção por *T. gondii*.** CBA do lavado peritoneal após 7 dias de infecção (n = 5) foi feito em citômetro de fluxo. (A) IL-6 e (B) TNF. Resultados foram expressos como média  $\pm$  SEM (\*p<0,0001).

Os camundongos tratados com saliva não apresentaram diferenças na produção de IFN- $\gamma$  e IL-10 no lavado peritoneal, homogenatos de pulmão e fígado quando comparados aos camundongos não tratados (Figura 9).



**Figura 9. Saliva não altera produção de IFN- $\gamma$  e IL-10 no lavado peritoneal e homogenato dos órgãos durante a infecção por *T. gondii*.** Grupos de animais WT foram tratados com saliva (ou não) e infectados com  $1 \times 10^4$  taquizoítos de *T. gondii* (PRU) e analisados. A produção de IFN- $\gamma$  e IL-10 foi mensurada 7 dias pós infecção em (A) lavado peritoneal, (B) homogenato de pulmão e (C) fígado. Os dados foram obtidos a partir da reação de ELISA.

Células do baço foram coletadas de diferentes grupos de camundongos infectados com PRU (tratados com saliva e não tratados) para análise *ex vivo*. A produção de IFN- $\gamma$  ficou claramente comprometida após um *recall* antigênico (re-estimulação da célula do baço com o taquizoito do mesmo parasito que o camundongo foi infectado) em camundongos tratados (Figura 10A). Por outro lado, a produção de IL-10 foi maior nessas mesmas células do baço (Figura 10B).

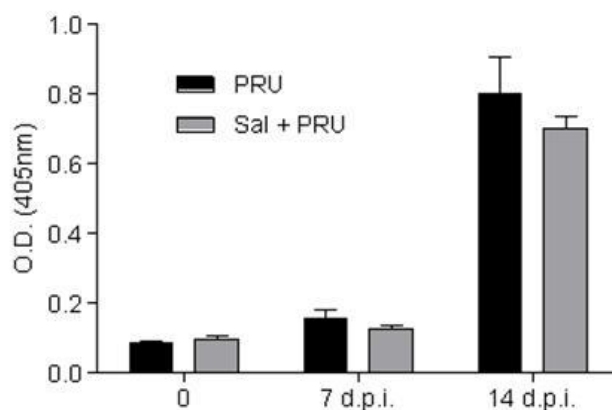


**Figura 10: Saliva modula produção das citocinas IFN- $\gamma$  e IL-10 em células do baço após *recall* antigênico.** Células do baço de camundongos previamente infectados (15 dias) foram estimuladas em cultura (*ex vivo*) com *T. gondii* (MOI 1). (A) IFN- $\gamma$  e (B) IL-10 foram quantificadas. Resultados foram apresentados como média  $\pm$  SEM (\* $p < 0,001$ ).

### 5.3 Saliva não influenciou na produção de IgG anti-*T. gondii*

Com o objetivo de se avaliar o envolvimento da saliva na resposta imune humoral contra *T. gondii*, a produção de anticorpos IgG antígeno-específicos foi analisada no soro de camundongos infectados, tratados e não tratados com saliva. Foi observado que os níveis de IgG anti-*T. gondii* foram similares nos grupos experimentais durante todos os dias de infecção testados (Figura 11).





**Figura 11. Saliva não influencia na produção de IgG total.** Quantificação da cinética de produção de IgG anti-*T. gondii* no soro de camundongos tratados e não tratados com saliva ( $n = 5$ ) infectados com  $1 \times 10^4$  taquizoítos. As dosagens foram realizadas por ELISA com 0, 7 e 14 dias após a infecção. Valores são mostrados como densidade óptica (D.O) e foram obtidos a 405nm. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão, analisados através do teste Two-way ANOVA seguido pelo pós teste de Bonferroni e são representativos de três experimentos independentes.

## *Díscussão*

---

## 6. Discussão

Baseado nos resultados obtidos, o trabalho apresentou em camundongos tratados com saliva e infectados com *T. gondii* uma sobrevivência de apenas 10%, necrose no tecido hepático, aumento no parasitismo dos pulmões, aumento na produção de IL-6 e diminuição na produção de TNF no lavado peritoneal e no baço um aumento de IL-10 e diminuição de IFN- $\gamma$ .

Saliva de *Amblyomma sculptum* revelou um importante papel na progressão da toxoplasmose, onde apenas 10% dos camundongos tratados com saliva sobreviveram à infecção contra 70% dos camundongos não-tratados. De acordo com nossos resultados, um estudo envolvendo extrato de glândula salivária (EGS) de *Ixodes scapularis* mostrou a facilidade da transmissão e disseminação do *Powassan vírus* e todos os camundongos tratados com EGS, sucumbiram mesmo quando foram utilizadas uma menor carga viral (HERMANCET et al., 2015). As moléculas bioativas da saliva modulam o organismo do hospedeiro, fazendo com que haja uma imunossupressão temporária, tornando o sistema do hospedeiro mais favorável para transmissão e estabelecimento do patógeno.

A histopatologia mostrou que o pulmão não mostrou diferença na quantidade de infiltrados inflamatórios, o mesmo perfil foi observado durante uma infecção bacteriana por *Rickettsia conorii* e infestação com *Rhipicephalus sanguineus* (MILHANO et al., 2015). Enquanto no fígado, foi observado que a quantidade de infiltrados inflamatórios era menor em camundongos tratados com a saliva e que apresentavam quadro de necrose, foi visto que macacos Rhesus quando infectados com *Rickettsia parkeri* e infestados com *Amblyomma maculatum* apresentavam concentrações elevadas de proteína C reativa (BANAJEE et al., 2015) e como já se sabe essa proteína pode ser um indicador de infecção bacteriana, reações de hipersensibilidade, aterosclerose, isquemia

e necrose (ROSE & CARVALHO, 2009). Portanto, a presença de proteína C reativa nesses macacos infestados com carrapatos pode indicar de um quadro de lesão hepática, como observado quando analisados os fígados dos animais tratados com a saliva e infectados com *T. gondii*. Assim como o pulmão, o cérebro não mostrou diferenças significativas entre os grupos analisados 15 dias após a infecção, o mesmo foi visto em um estudo envolvendo uma proteína purificada da saliva de carrapato (Salp15) quando usada no tratamento da encefalomielite autoimune experimental induzida em camundongos, a presença dessa proteína da saliva não aumentou a infiltração de células no sistema nervoso central (JUNCADELLA et al, 2010).

Quatro citocinas foram testadas no lavado peritoneal: IL-6, TNF, IFN- $\gamma$  e IL-10. IL-6 mostrou uma produção aumentada na presença de saliva e *T. gondii*, esses resultados corroboram com os encontrados na infecção por espiroquetas de borrelia e EGS de *Ixodes ricinus*, ao analisar a produção de citocinas pelas células dos linfonodos, camundongos mostraram uma inicial supressão de IL-6 com posterior aumento (PECHOVÁ et al., 2002). Outro trabalho envolvendo dosagem de IL-6 em células mononucleares do sangue periférico tratadas com EGS de *I. ricinus* é que também estava aumentada, o mesmo para os esplenócitos (KOVÁR et al., 2001; KOVÁR et al., 2002), todos esses resultados indicam que os eventos em humanos e camundongos são similares, mas também que esses experimentos envolvendo EGS estão de acordo com aos experimentos que envolvem a inoculação de saliva intraperitonealmente. A produção de TNF foi inibida no lavado peritoneal de camundongos infectados com *T. gondii* e tratados com saliva de *A. sculptum*, assim como foi observado em células dendríticas infectadas com *Borrelia afzelii* ou vírus da encefalite tratados com saliva de *I. ricinus* (FIALOVÁ et al., 2010; SLÁMOVÁ et al., 2011). Em células dendríticas derivadas de medula óssea, não infectadas e apenas tratadas com saliva de *A. sculptum*,

a produção de TNF também diminuiu (COSTA et al., 2015). TNF é uma citocina do perfil Th1 enquanto IL-6 é pró-inflamatória contra *T. gondii*, esses efeitos demonstram que a saliva está regulando a resposta imune do hospedeiro, mesmo que esteja promovendo proliferação de patógenos que são ameaçados pela resposta imune do tipo Th1 no organismo de camundongos, por outro lado induz IL-6 que age contra o patógeno, talvez esse contrabalanço no lavado peritoneal justifique o fato de não haver diferença no parasitismo das células do lavado peritoneal.

Um resultado surpreendente foi que não houve diferença na produção de IFN- $\gamma$  e IL-10 em sobrenadante do lavado e homogenatos de pulmão e fígado nos camundongos tratados e não tratados com saliva. Porém células do baço quando reapresentadas ao antígeno em que foram previamente infectadas e os camundongos que eram do grupo tratado com saliva reduziu drasticamente a produção de IFN- $\gamma$  enquanto aumentou a de IL-10. De acordo com nossos resultados, um estudo anterior que envolve essas mesmas células, porém infectadas com *Trypanosoma cruzi*, na presença da saliva de *Rhipicephalus sanguineus*, reduziu em 84.6% a produção de IFN- $\gamma$  e dobrou a produção de IL-10 (FERREIRA & SILVA, 1998). Enquanto EGS de *I. ricinus* suprimiu a produção de IFN- $\gamma$  em esplenócitos de ratos estimulados com lipopolissacarídeos (LPS), a produção de IL-10 foi aumentada em comparação com aquelas células não tratadas com EGS de *I. ricinus* em cultura (KOPECKÝ et al., 1999). Mesmo que no lavado e nos homogenatos não tenham diferença significativa entre os grupos analisados, a ação da saliva nas células do baço foi claramente de aumentar a produção de IL-10 e conseqüentemente inibir IFN- $\gamma$ . E esse efeito imunossupressor pode ser uma explicação do estabelecimento e propagação do patógeno *T. gondii* no organismo dos camundongos.

Em relação a resposta imune humoral, IgG total anti-*T. gondii* foi testada, porém a presença de saliva não alterou a produção dessa imunoglobulina. Isso pode ser devido ao fato de que as diferenças encontradas nesse trabalho não estão relacionadas com a resposta imune humoral, mas sim com a produção de diversas citocinas que levam ao aumento da transmissão dos patógenos e à inflamação local.

O objetivo do trabalho não era elucidar por completo a ação da saliva, mas sim ser um trabalho pioneiro envolvendo esse parasito de grande importância mundial, mimetizando um encontro que ocorreria na natureza por motivos já discutidos na justificativa. Estudos ainda são necessários para descobrir efetivamente onde a saliva do carrapato está atuando no sistema imune murino durante a infecção.

*Conclusão*

---

## 7. Conclusão

Baseando-se nos resultados obtidos com esse trabalho podemos concluir que a saliva de *A. sculptum* atua no organismo do camundongo durante a infecção com *T. gondii* aumentando a suscetibilidade dos animais, por meio da resposta imune órgão-dependente contra o protozoário, aumentando assim a capacidade de replicação do protozoário durante a fase inicial da infecção.



## *Referências*

---

## 8. Referências

- ANDRADE, G. M. Q. et al. Deficiência auditiva na toxoplasmose congênita detectada pela triagem neonatal. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 74, p. 21-28, 2008.
- BANAJEE, K. H. et al. *Amblyomma maculatum* Feeding Augments *Rickettsia parkeri* Infection in a Rhesus Macaque Model: A Pilot Study. **PLoSOne**. 10:e0135175. 2015.
- BARRÉ, N.; UILENBERG, G.; MOREL, P. C.; CAMUS, E. Danger of introducing heartwater onto the American mainland: potential role of indigenous and exotic *Amblyomma* ticks. **The Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 54, p. 405-417, 1987.
- BLISS, S. K.; BUTCHER, B. A.; DENKERS, E. Y. Rapid recruitment of neutrophils containing pre stored IL-12 during microbial infection. **The Journal of Immunology**, v. 165, p. 4515-4521, 2000.
- BOOTHROYD, J. C. *Toxoplasma gondii*: 25 years and 25 major advances for the field. **International Journal for Parasitology**, v. 39, p. 935-946, 2009.
- BOUCHARD, K. R.; WIKEL, S. K. Care, Maintenance, and Experimental Infestation of Ticks in the Laboratory Setting. **Biology of Disease Vectors**, v. 2, p. 705–712, 2005.
- BRADFORD, H. F.; RICHARDS, C. D. Specific release of endogenous glutamate from piriform cortex stimulated in vitro. **Brain Research**, v. 105, p. 168-172, 1976.
- BRENIER-PICHART, M. P. et al. The *Toxoplasma gondii* protein SAG1 triggers efficient in vitro secretion of chemokine ligand 2 (CCL2) from human fibroblast. **Microbes and Infection**. v. 8, p. 254-261, 2006.
- BUTLER, N. S.; HARRIS, T. H.; BLADER, I. J. Regulation of immunopathogenesis during *Plasmodium* and *Toxoplasma* infections: more parallels than distinctions? **Trends in parasitology**, v. 29, e: 10.1016, 2013.
- BUZONI-GATEL, D.; SCHULTHESS, J.; MENARD, L. C.; KASPER, L. H. Mucosal defenses against orally acquired protozoan parasites, emphasis on *Toxoplasma gondii* infections. **Cellular Microbiology**, v.8, p. 535-544, 2006.
- CARRUTHERS, V. B. Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii*. **ActaTropica**, v. 81, p. 111–122, 2002.
- CARVALHO-COSTA, T. M. et al, Immunosuppressive effects of *Amblyomma cajennense* tick saliva on murine bone marrow-derived dendritic cells. **Parasites & Vectors**, v. 8, p. 22, 2015.

- CASTAGNOLLI, K. C.; FERREIRA, B. R.; FRANZIN, A. M.; DE CASTRO, M. B.; SZABÓ, M. P. Effect of *Amblyomma cajennense* ticks on the immune response of BALB/c mice and horses. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 149, p. 230-244, 2008.
- CASTELLANI, A. Note on certain protozoa-like bodies in a case of protracted fever and splenomegaly. **Journal of Tropical Medicine**, v. 17, p. 113-114, 1914.
- CHMELAR, J.; KOTÁL, J.; KOPECKÝ, J.; PEDRA, J. H. F.; KOTSYFAKIS, M. All For One and One For All on the Tick–Host Battlefield. **Trends in Parasitology**, v. 32, p. 368–377, 2016.
- CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M.; MORAIS, K. L.; PACHECO, M. T.; PASQUALOTO, K. F.; DE SOUZA, J. G. Tick salivary gland as potential natural source for the discovery of promising antitumor drug candidates. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 77, p. 14-19, 2016.
- DAHER, W. et al. Concerted action of two formins in gliding motility and host cell invasion by *Toxoplasma gondii*. **PLoS Pathogens**. v. 6, p. 1-14, 2010.
- DENKERS, E. Y., et al. Perforin-mediated cytolysis plays a limited role in host resistance to *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Immunology**, v. 159, p. 1903-1908, 1997.
- DUBEY, J. P. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v. 28, p. 1019-1024, 1998.
- DUBEY, J. P. Oocyst shedding by cats fed isolated bradyzoites and comparison of infectivity of bradyzoites of the VEG strain *Toxoplasma gondii* to cats and mice. **Journal of Parasitology**. v. 87, p. 215–219, 2001.
- DUBEY, J. P.; FRENKEL, J. K. Cyst-induced toxoplasmosis in cats. **Journal of Protozoology**, v. 19, p. 155–177. 1972.
- DUBEY, J. P. A review of toxoplasmosis in cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 22, p. 177-202, 1986.
- DUBEY, J.P. et al. Detection and survival of *Toxoplasma gondii* in milk and cheese from experimentally infected goats. **Journal of Food Protection**, n. 77, p. 1747-1753, 2014.
- DUBEY, J.P. Toxoplasmosis of Animals and Humans. **CRC Press**, v. 2, p. 313, 2010.
- DUBEY, J.P.; BEATTIE, C.P. Toxoplasmosis of Animals and Man. **Boca Raton, FL: CRC Press**, 1988.
- DUPONT C. D.; CHRISTIAN D. A.; HUNTER, C. A. immune response and immunopathology during toxoplasmosis. **Seminars in Immunopathology**, n. 34, p. 793-813, 2012.

EVANS, D. E.; MARTINS, J. R.; GUGLIELMONE, A. A. A review of the ticks (Acari, ixodida) of Brazil, their hosts and geographic distribution - 1. The state of Rio Grande do Sul, southern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, p. 453-470, 2000.

FELÍCIO, P. S. et al. Eco-Epidemiology of *Toxoplasmosis* in Ruminant and the Experimental Model Evidence from Mice Bioassay for Transmission of Infection Starting of Contaminated Soil Samples Confirmed by Polymerase Chain Reaction (PCR) and Indirect Immunofluoresce Reaction (RIFI) Techniques Diagnostic. **Global Veterinaria**. v. 6, p. 78-90, 2011.

FERGUSON, D. J. Identification of faecal transmission of *Toxoplasma gondii*: Small science, large characters. **International Journal of Parasitology**, v. 39, p. 871-875, 2009.

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

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

FIALOVÁ, A.; CIMBUREK, Z.; IEZZI, G.; KOPECKÝ, J. *Ixodes ricinus* tick saliva modulates tick-borne encephalitis virus infection of dendritic cells. **Microbes and Infection**, v. 12, p. 580-585, 2010.

FONSECA, L. A. Impactos econômicos causados pela infestação de carrapatos em bovinos e o controle estratégico. **Revista ProCampo**, v. 39, 2012.

FRENKEL, J. K.; DUBEY, J. P.; MILLER, N.L. *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. **Science**. v. 167, p. 893–896, 1970.

FRENKEL, J.K. Toxoplasmosis: Parasite Life Cycle, Pathology and Immunology. **Baltimore, MD: University Park Press**, p. 343–410, 1973.

GAZZINELLI, R. T.; DENKERS, E. Y. Protozoan encounters with Toll-like receptor signalling pathways: implications for host parasitism. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, p. 895-906, 2006.

GAZZINELLI, R. T.; HIENY, S.; WYNN, T. A.; WOLF, S.; SHER A. Interleukin 12 is required for the T-lymphocyte-independent induction of interferon gamma by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell-deficient hosts. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, p. 6115-6119, 1993.

GOLDSZMID, R. S. et al. NK cell-derived interferon- $\gamma$  orchestrates the cellular dynamics and differentiation of monocytes into inflammatory dendritic cells at the site of infection. **Immunity**, v. 36, p. 1047-1059, 2012.

- GOODSWEN, S.J.; KENNEDY, P.J.; ELLIS, J.T. A review of the infection, genetics, and evolution of *Neosporacanium*: From the past to the present. **Infection, Genetics and Evolution**, v.13, p. 133–150, 2013.
- GRISI, L.; et al. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, p. 150-156, 2014.
- GUGLIELMONE, A. A. et al. Ticks (Ixodidae) on humans in South America. **Experimental and Applied Acarology**, v. 40, p. 83-100, 2006.
- GUIMARÃES, J. H.; TUCCI, E.C. BARROS-BATTESTI, D. M. Ectoparasitas De Importância Veterinária. **São Paulo: editor plêiade/ FAPESP**, p. 52-104, 2001.
- HALONEN, S. K.; WEISS, L. M. Toxoplasmosis. **Handbook of Clinical Neurology**. v. 114, p. 125-145, 2013.
- HAQUE, S.; FRANCK, J.; DUMON, H.; KASPER, L. H.; HAQUE, A. Protection against lethal toxoplasmosis in mice by an avirulent strain of *Toxoplasma gondii*: stimulation of IFN-gamma and TNF-alpha response. **Experimental Parasitology**, v. 93, p. 231-240, 1999.
- HERMANCE, M. E.; THANGAMANI, S. Tick Saliva Enhances *Powassan Virus* Transmission to the Host, Influencing Its Dissemination and the Course of Disease. **Journal of Virology**, v. 89, p. 7852-7860, 2015.
- HILL, D. E.; CHIRUKANDOTH, S.; DUBEY, J. P. Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. **Animal Health Research Reviews**, v. 6, p. 41-61, 2005.
- HILL, D.; DUBEY J.P. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. **Clinical Microbiology & Infection**, v. 8, p. 634-640, 2002.
- HOFF, E. F.; CARRUTHERS, V. B. Is *Toxoplasma* egress the first step in invasion. **TRENDS in Parasitology**. v. 18, p. 251-255, 2002.
- HOLSCHER, C.; et al. Tumor necrosis factor alpha-mediated toxic shock in *Trypanosoma cruzi*-infected interleukin 10-deficient mice. **Infection Immunity**, v. 68, p. 4075-4083, 2000.
- HUNTER, C. A.; SIBLEY, L. D. Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence effectors. **Nature Reviews Microbiology** v. 10, p. 766-778, 2012.
- HUNTER, C. A.; SUBAUSTE, C. S.; VAN CLEAVE, V. H.; REMINGTON, J. S. Production of  $\gamma$  interferon by natural killer cells from *Toxoplasma gondii*-infected SCID mice: regulation by interleukin-10, interleukin-12, and tumor necrosis factor  $\alpha$ . **Infection and Immunity**, n. 62, p. 2818-2824, 1994.
- INNES, E. A.; ANDRIANARIVO, A. G.; BJÖRKMAN, C.; WILLIAMS, D. J.; CONRAD, P. A. Immune responses to *Neospora caninum* and prospects for vaccination. **Trends in Parasitology**, v. 18, n. 11, p. 497-504, 2002.

- INNES, E.A, et al. Interferon-gamma inhibits the intracellular multiplication of *Neospora caninum*, as shown by incorporation of h-3 uracil. **Journal of Comparative Pathology**, v. 113, p. 95-100, 1995.
- INNES, E.A.; VERMEULEN, A.N. Vaccination as a control strategy against the coccidial parasites *Eimeria*, *Toxoplasma* and *Neospora*. **Parasitology**, v.133, p.145-168, 2006.
- JEBBARI, H.; ROBERTS, C. W.; FERGUSON, D. J.; BLUETHMANN, H.; ALEXANDER, J. A protective role for IL-6 during early infection with *Toxoplasma gondii*. **Parasite Immunology**, v. 20, p. 231–239, 1998.
- JOHNSON, D. C.; WIDLANSKI, T. S. Overview of the synthesis of nucleoside phosphates and polyphosphates. **Current protocols in nucleic acid chemistry** v. 13, p. 1311, 2004.
- JUNCADELLA, I. J. et al. The tick saliva immunosuppressor, Salp15, contributes to Th17-induced pathology during Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. **Biochemical and Biophysical Research**, v. 402, p. 105-109, 2010.
- KAHSAY, T.; NEGASH, G.; HAGOS, Y.; HADUSH, B. Pre-slaughter, slaughter and post-slaughter defects of skins and hides at the Sheba Tannery and Leather Industry, Tigray region, northern Ethiopia. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**. v. 82; E1-7, 2015.
- KEAN, B. H. Clinical toxoplasmosis. **Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**.v. 66, p. 549-571, 1972.
- KIM, S. K.; KARASOV, A.; BOOTHROYD, J. C. Bradyzoite-specific surface antigen SRS9 plays a role in maintaining *Toxoplasma gondii* persistence in the brain and in host control of parasite replication in the intestine. **Infection and Immunity**, v. 75, p. 1626–1634, 2007.
- KOPECKÝ, J.; KUTHEJLOVÁ, M.; PECHOVÁ, J. Salivary gland extract from *Ixodes ricinus* ticks inhibits production of interferon-gamma by the upregulation of interleukin-10. **Parasite Immunology**, v.21, p. 351-356, 1999.
- KOVÁ, R. L.; KOPECKÝ, J.; RÍHOVÁ, B. Salivary gland extract from *Ixodes ricinus* tick modulates the host immune response towards the Th2 cytokine profile. **Parasitology Research**, v, 88, p. 1066-1072, 2002.
- KOVÁR, L.; KOPECKÝ, J.; RÍHOVÁ, B. Salivary gland extract from *Ixodes ricinus* tick polarizes the cytokine profile toward Th2 and suppresses proliferation of T lymphocytes in human PBMC culture. **Parasitology**, v. 87, p. 1342-1348, 2001.
- KRANTZ, G. W.; WALTER D. E. **A Manual of Acarology**, 3<sup>a</sup>ed., 2009.
- LABRUNA, M. B. Brazilian spotted fever: the role of capybaras. Capybara: Biology, Use and Conservation of an Exceptional Neotropical Species. **New York: Springer Science + Business Media**, p. 371-383, 2013.

LABRUNA, M. B. et al. Risk factors to tick infestations and their occurrence on horses in the state of São Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.97, p. 1-14, 2001.

LANFRANCA M. P.; LIN Y.; FANG, J.; ZOU, W.; FRANKEL, T. Biological and pathological activities of interleukin-22. **Journal of Molecular Medicine**, v. 94, p. 523-534, 2016.

LEVADITI, C.; SCHOEN, R.; SANCHIS-BAYARRI, V. L'encéphalo-myélite toxoplasmique chronique du lapin et de la souris. **International Journal for Parasitology**, n. 99, p. 37-40, 1928.

LINTHICUM, K. J. et al. Venezuelan equine encephalomyelitis virus infection in and transmission by the tick *Amblyomma cajennense* (Arachnida: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 28, p. 405-409, 1991.

LOPES, F. M. R. et al. *Toxoplasma gondii* infection in pregnancy. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.11, p. 496-506, 2007.

LYONS, R. E.; McLEOD, R.; ROBERTS, C. W. *Toxoplasma gondii* tachyzoite bradyzoite interconversion. **Trends in Parasitology**, v. 18, p. 198-201, 2002.

MC-GOVERN, K. E.; WILSON, E. H. Dark side illuminated: imaging of *Toxoplasma gondii* through the decades. **Parasites & Vectors**, v. 6, p. 334, 2013.

MEJRI, N.; BROSSARD, M. Splenic dendritic cells pulsed with *Ixodes ricinus* tick saliva prime naive CD4<sup>+</sup>T to induce Th2 cell differentiation in vitro and in vivo. **International Immunology**, v. 19, p. 535-543, 2007.

MELLO, V. Uncas de toxoplasmose du chien observé à Turin. **Bulletin of the Exotic Pathology Society**, v.28, p.359-363, 1910.

MERCADANTE, E. R.; LORENZ, U. M. Breaking Free of Control: How Conventional T Cells Overcome Regulatory T Cell Suppression. **Frontiers in Immunology**, v. 18, p. 193, 2016.

MILHANO, N. et al. The role of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato saliva in the dissemination of *Rickettsia conorii* in C3H/HeJ mice. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 29, p. 225-229, 2015.

MINEO, J. R.; et al. Pesquisa na área biomédica: do planejamento à publicação. **Uberlândia: EDUFU**, p. 273. 2005.

MINEO, T.W.P. et al. Pigeons (*Columba livia*) are a suitable experimental model for *Neospora caninum* infection in birds. **Veterinary Parasitology**, v.159, p.149-153, 2009.

MORRISSETTE, N. S.; WEBSTER, P.; BEDIAN, V.; ROOS, D. S. Characterization of extreme apical antigens from *Toxoplasma gondii*. **Experimental Parasitology**. v. 79, p. 445-459, 1994.

NALBANT, A.; ESKIER, D. Genes associated with T helper 17 cell differentiation and function. **Frontiers in Bioscience (Elite Ed)**, v. 8, p. 427-435, 2016.

NAVA, S. et al. 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 sculptum* (Ixodida: Ixodidae). **Ticks Tick Borne Diseases**, v. 5, p. 252-276, 2014a.

NAVA, S.; GUGLIELMONE, A. A meta-analysis of host specificity in Neotropical hard ticks (Acari: Ixodidae). **Bulletin of Entomological Research**, v. 103, p. 216-224, 2014b.

NICOLLE, C.; MANCEAUX, L. Sur une infection à corps de *Leishman* (ou organisms voi sins) du gondi. **Comptes Rendus des Seances de l'Academie des Sciences**. v. 147, p. 763-766, 1908.

NISCHIK, N. et al. Attenuation of mouse-virulent *Toxoplasma gondii* parasites is associated with a decrease in interleukin-12-inducing tachyzoite activity and reduced expression of actin, catalase and excretory proteins. **Microbes and Infection**. v. 3, p. 689-699, 2001.

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

OLIVEIRA, R. T.; et al. Detection of TCD4+ subsets in human carotid atheroma. **Cytokine**, v. 62, p. 131-140, 2013.

PAPINI, R. A. et al. Seroprevalence and Genotyping of *Toxoplasma gondii* in Horses Slaughtered for Human Consumption in Italy. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 35, p. 657-661, 2015.

PECHOVÁ, J.; STĚPÁNOVÁ, G.; KOVÁR, L.; KOPECKÝ, J. Tick salivary gland extract-activated transmission of *Borrelia afzelii* spirochaetes. **Folia Parasitologica**, v. 49, p. 153-159, 2002.

PECKLE, M. Molecular epidemiology of *Theileria equi* in horses and their association with possible tick vectors in the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Parasitology Research**, v. 112, p. 2017-2025, 2013.

PITTMAN, K. J.; KNOLL LJ. Long-Term Relationships: the Complicated Interplay between the Host and the Developmental Stages of *Toxoplasma gondii* during Acute and Chronic Infections. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. V. 79, p. 387-401, 2015.

RIBEIRO, M. F.; GUIMARÃES, A. M. Encephalitozoon-like microsporidia in the ticks *Amblyomma cajennense* and *Anocentornitens* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 35, p. 1029-1033, 1998.



ROJAS-ZULETA, W. G.; VÁSQUEZ, G. Th9 lymphocytes: A recent history from IL-9 to its potential role in rheumatic diseases. **Autoimmunity Reviews**, v. 15, p. 649-655, 2016.

ROSA NETO, N. S.; CARVALHO, J. F. O uso de provas de atividade inflamatória em reumatologia. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v.49, p. 413-430, 2009.

SERRA FREIRE, N. M. Tick paralysis in Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, v.15, p. 124-126, 1983.

SHINJO, S. K. et al. Neurological manifestations in Baggio -Yoshinari (Brazilian Lyme disease-like syndrome). **The Brazilian Journal of Rheumatology**, v. 49,p. 492-505, 2009.

SIBLEY, L. D. Invasion of vertebrates cell by *Toxoplasma gondii*. **Trends in Cell Biology**, v. 5, p. 129- 132, 1995.

SILVA, D. A. O.; LOBATO, J.; MINEO, T. W.; MINEO, J. R. Evaluation of serological tests for the diagnosis of *Neospora caninum* infection in dogs: optimization of cut off titers and inhibition studies of cross-reactivity with *Toxoplasma gondii*. **Veterinary Parasitology**, v. 143, p. 234–244,2007.

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

SKARIAH, S.; MCINTYRE, M. K.; MORDUE, D. G. *Toxoplasma gondii*: determinants of tachyzoite to bradyzoite conversion. **Parasitology Research**, v. 107, p. 253-260, 2010.

SLÁMOVÁ, M.; SKALLOVÁ, A.; PÁLENÍKOVÁ, J.; KOPECKÝ, J. Effect of tick saliva on immune interactions between *Borrelia afzelii* and murine dendritic cells. **Parasite Immunology**, v. 33, p. 654-660, 2011.

SMITH, J. E. A ubiquitous intracellular parasite: the cellular biology of *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**. v. 5, p. 1301-1309, 1995.

SMITH, J. L. Documented outbreaks of Toxoplasmosis: Transmission of *Toxoplasma gondii* to humans. **Journal of Food Protection**, v. 56, p. 630–639, 1993.

SOUSA, A. C.; SZABÓ, M. P.; OLIVEIRA, C. J.; SILVA, M. J. Exploring the anti-tumoral effects of tick saliva and derived components. **Toxicon**, v. 102, p. 69-73, 2015.

SPENCE, P. J.; LANGHORNE, J. T cell control of malaria pathogenesis. **Current Opinion in Immunology**, v. 24, p. 444-448, 2012.

WEINMAN, D.; CHANDLER, A. H. Toxoplasmosis in swine and rodents; reciprocal oral infection and potential human hazard. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, n.87, p. 211–216, 1954.

- WEISS, L. M.; DUBEY, J. P. Toxoplasmosis: A history of clinical observations. **International Journal for Parasitology**, v. 39, p. 895-901, 2009.
- WHITMARSH, R. J. et al. A critical role for SOCS3 in innate resistance to *Toxoplasma gondii*. **Cell Host & Microbe**, v. 10, p. 224-236, 2011.
- WIKEL, S. Ticks and tick-borne pathogens at the cutaneous interface: host defenses, tick countermeasures, and a suitable environment for pathogen establishment. **Frontiers in Microbiology**, v. 19, p. 337, 2013.
- WORK, K.; HUTCHISON, W. M. A new cystic form of *Toxoplasma gondii*. **Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica**, v. 75, p. 191–192, 1969.
- WYROSDICK, H. M.; SCHAEFER, J. J. *Toxoplasma gondii*: history and diagnostic test development. **Animal Health Research Reviews**, n. 16, p. 150-162, 2015.
- YAN, C.; LIANG, L.; ZHENG K.; ZHU, X. Impact of environmental factors on the emergence, transmission and distribution of *Toxoplasma gondii*. **Parasites & Vectors**, v. 9, p. 137, 2016.

**ANEXO I – Autorização do Comitê de Ética em Utilização Animal (Coelhos)**

Universidade Federal de Uberlândia  
– Comissão de Ética na Utilização de Animais –

**CERTIFICADO**

Certificamos que o protocolo para uso de animais em experimentação nº 033/14, sobre o projeto de pesquisa intitulado "Manutenção de colônias e coleta de saliva e órgãos internos de carrapatos", sob a responsabilidade do **Prof. Dr. Matias Pablo Juan Szabó** está de acordo com os princípios éticos na experimentação animal conforme regulamentações do Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA) – UFU em reunião de **13 de Junho de 2014**.

(We certify that the protocol nº 033/14, about "Manutenção de colônias e coleta de saliva e órgãos internos de carrapatos", agrees with the ETHICAL PRINCIPLES ON ANIMAL RESEARCH as regulations of National Advice of Control and Animal Experimentation (CONCEA) and approved by Ethics Commission on Use of Animals (CEUA) – Federal University of Uberlândia in 13/06/2014).

Uberlândia, 16 de Junho de 2014.

**Prof. Dr. César Augusto García**  
Coordenador da CEUA/UFU

## ANEXO II – Autorização do Comitê de Ética em Utilização Animal (Camundongos)



Universidade Federal de Uberlândia  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)  
Avenida João Naves de Ávila, nº. 2160 - Bloco A - Campus Santa Mônica -  
Uberlândia-MG –  
CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4131; e-mail: ceuaufu@yahoo.com.br;  
[www.comissoes.propp.ufu.br](http://www.comissoes.propp.ufu.br)

### ANÁLISE FINAL Nº 087/12 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 052/12

Projeto Pesquisa: "Padronização de modelo de infecção por *Neospora caninum* pela via oral utilizando mecanismos de indução de interconversão de estágio in vitro"

Pesquisador Responsável: Prof. Dr. Tiago Wilson Patriarca Mineo

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

OBS: O CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEUA PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

AO FINAL DA PESQUISA DEVE SER ENTREGUE À CEUA UM RELATÓRIO. O MODELO DESTA ESTÁ NO SITE.

Uberlândia, 26 de Setembro de 2012

Prof. Dr. Jonas Dantas Batista  
Coordenador Pro tempore da CEUA/UFU