



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE POS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

RESPOSTA IMUNE CELULAR E HUMORAL DE *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) DESAFIADOS COM *Leishmania infantum* (Nicolle, 1908)

ANA PAULA SAMPAIO FEITOSA

Recife/PE

2015

ANA PAULA SAMPAIO FEITOSA



RESPOSTA IMUNE CELULAR E HUMORAL DE *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) DESAFIADOS COM *Leishmania infantum* (Nicolle, 1908)

Tese apresentada a Banca Examinadora do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Doutor em Medicina Tropical.

Orientador: Prof. Dr. Fábio André Brayner dos Santos

Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Alves

Recife/PE

2015

Ficha catalográfica elaborada pela
Bibliotecária: Mônica Uchôa - CRB4-1010

F311r Feitosa, Ana Paula Sampaio.
Resposta imune celular e humoral de *Rhipicephalus sanguineus*
(Latreille, 1806) (acarí: ixodidae) desafiados com *Leishmania infantum*
(Nicolle, 1908) / Ana Paula Sampaio Feitosa. – Recife : O autor, 2015.
140 f.: il.; tab.; 30 cm.

Orientador: Fábio André Brayner dos Santos.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2015.
Inclui referências, apêndices e anexos.

1. *Rhipicephalus sanguineus*. 2. *Leishmania infantum*. 3. Fagocitose. 4.
Óxido nítrico. I. Santos, Fábio André Brayner dos (Orientador). II. Título.

618.9883

CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2015-072)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE)
PRÓ-REITORIA PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO (PROPSQ)
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE (CCS)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL (PPGMEDTROP)

RELATÓRIO DA BANCA EXAMINADORA DA TESE DA DOUTORANDA

ANA PAULA SAMPAIO FEITOSA

No dia 26 de fevereiro de 2015, às 09h00, no Auditório do Depto. de Enfermagem do CCS/UFPE, os Membros Doutores: a Profa. Dra. Ana Catarina de Souza Lopes (Presidente da Banca – UFPE), a Profa. Dra. Helena Rocha Corrêa de Araújo (USP), o Prof. Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira (UFRPE), a Profa. Dra. Valéria Wanderley Teixeira (UFRPE) e a Profa. Dra. Milena de Paiva Cavalcanti (CPqAM/FIOCRUZ), componentes da Banca Examinadora, em sessão pública, arguíram a doutoranda ANA PAULA SAMPAIO FEITOSA sobre a sua Tese intitulada “RESPOSTA IMUNE CELULAR E HUMORAL DE *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) DESAFIADOS COM *Leishmania infantum* (Nicolle, 1908)”, a qual foi orientada pelo Prof. Dr. Fábio André Brayner dos Santos (CPqAM/FIOCRUZ). Ao final da arguição de cada membro da Banca Examinadora e resposta da doutoranda, as seguintes menções foram publicamente fornecidas.

Profa. Dra. Ana Catarina de Souza Lopes

APROVADA

Profa. Dra. Helena Rocha Corrêa de Araújo

APROVADA

Prof. Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira

APROVADA

Profa. Dra. Valéria Wanderley Teixeira

APROVADA

Profa. Dra. Milena de Paiva Cavalcanti

APROVADA

Profa. Dra Ana Catarina de Souza Lopes

Profa. Dra. Helena Rocha Corrêa de Araújo

Prof. Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira

Profa. Dra. Valéria Wanderley Teixeira

Profa. Dra. Milena de Paiva Cavalcanti

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL
REITOR

Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Francisco de Souza Ramos

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Nicodemos Teles Pontes Filho

COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM MEDICINA TROPICAL

Valdênia Maria Oliveira de Souza

VICE-COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM MEDICINA TROPICAL

Vera Magalhães da Silveira

CORPO DOCENTE

Ana Catarina de Souza Lopes

Ana Lúcia Coutinho Domingues

Célia Maria Machado Barbosa de Castro

Celina Maria Turchi Martelli

Edmundo Pessoa de Almeida Lopes Neto

Fábio André Brayner dos Santos

Heloísa Ramos Lacerda de Melo

Maria Amélia Vieira Maciel

Maria de Fátima Pessoa Militão de Albuquerque

Maria Rosângela Cunha Duarte Coelho

Marli Tenório Cordeiro

Rejane Pereira Neves

Ricardo Arraes de Alencar Ximenes

Valdênia Maria Oliveira de Souza

Vera Magalhães de Silveira

Vláudia Maria Assis Costa

DEDICO,

*A minha família e aos meus amigos,
minha segunda família.*

AGRADECIMENTOS

- Agradeço a Deus por todas as oportunidades de lutar pelos meus ideais, pela minha saúde, física e mental e especialmente por me dá força diante de todas as dificuldades encontradas durante essa jornada;
- Aos meus pais Francisco Feitosa e Maria Lucia pelo carinho e confiança, e também por terem me mostrado a importância da educação nas nossas vidas;
- Ao meu esposo Ênio Virgílio pelo companheirismo, carinho, amizade e amor, que mesmo estando longe, sempre esteve muito presente;
- A minha irmã Isabel Cristina, pela amizade e especialmente por ter me inspirado para seguir o caminho da pesquisa;
- A minha sobrinha mais deliciosa, que me encheu com alegria tantas vezes que estava triste;
- Aos meus irmãos Rômulo e Rochael pela amizade e a minha cunhada Maria;
- As minhas tias, Vânia, Graça, Socorro, Jane-Eire e Maria pela grande apoio e força na minha formação;
- Aos meus orientadores Luiz Carlos e Fábio Brayner pelo apoio, ensinamentos e força para o desenvolvimento desse trabalho, especialmente nas horas que fraquejei;
- Aos meus amigos Luiz Carlos e Fábio Brayner pela amizade, por me passarem segurança e confiança, na verdade uma nova família que conquistei; e também a Leide, Andreia, Etienne e Aderisson pelo carinho sempre, não deixarei vocês jamais;
- À Minha grande amiga Dyana, que serei eternamente grata. Obrigada pela força que recebi quando cheguei ao laboratório, pelo carinho, pelas conversas e especialmente pela amizade, que tenho certeza que será para sempre;
- À Carmelita de Lima, uma grande amiga, que também pude contar e confiar em todos os momentos, uma das melhores pessoas que conheci e a toda sua família que sempre me receberam com muito carinho;
- A minha amiga Adriana Burgo e seus pais dona Fátima e seu Mendonça, que sempre me apoiaram e me deram muito carinho;
- A minha família LBCM, que sentia muita alegria em encontrá-los diariamente, pelo carinho e respeito que sempre recebi de todos. A Leandro e Everton pela ajuda com o projeto, e Amanda pela força e companheirismo. A Nairinho pelo carinho, Gabriel,

Elverson, Rafinho, Alberon, Dudinha, Camila, Fernanda, Grasi, Iany, Tiaguinho, Rubens e Catinha pelo carinho e amizade, jamais vou esquecer dos nossos momentos de alegria e também das dificuldades que passamos juntos. Tenho muito carinho por vocês;

- A meu amigo Marlos, que foi extremamente importante para o desenvolvimento do meu trabalho, agradeço pelo apoio, paciência e pelos nossos momentos de descontração;
- Aos meus queridos amigos do departamento de parasitologia Cristiane e Josué, pelos bons momentos juntos;
- A minha grande amiga Dayse Vasconcelos, pelo companheirismo e orientações no desenvolvimento deste trabalho;
- As minha amiga Glaydes pela companhia e amizade;
- A todos do departamento de parasitologia que contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho;
- Ao Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho, Diretor do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA-UFPE), pela colaboração e dedicação;
- Aos funcionários do NPT/CPqAM, Cássia, Vivi, e Marlos, pela dedicação e auxílio na execução de diversas técnicas utilizadas neste estudo.
- A todos os funcionários do Departamento de Medicina Tropical – UFPE, especialmente a Valter, pela prestatividade incondicional;
- Aos professores da pós-graduação, pelos ensinamentos, especialmente o Professor Ricardo Ximenes, por quem tenho muita admiração e respeito, por ser um exemplo de profissional e principalmente pela sua humildade.
- A todos que fazem o CPqAM/FIOCRUZ e LIKA/UFPE, que direta ou indiretamente me ajudaram a realizar este trabalho.

RESUMO

O *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) é um ectoparasita de cães domésticos e possui grande importância médica e veterinária por estar associado à transmissão de inúmeros patógenos, entre eles existe a suspeita de que está associado à transmissão da *Leishmania infantum*. O objetivo do presente estudo foi avaliar a resposta imune inata celular e humoral através da caracterização morfológica e ultraestrutural de hemócitos, avaliação da dinâmica hemocitária no 1º, 2º e 5º dia após infecção (dpi) com *L. infantum*, fagocitose com 1º dpi, atividade da fenoloxidase no 1º, 2º e 5º dpi, produção de óxido nítrico no 1º, 2º e 5º dpi, expressão gênica da defensina e Glutathione S-transferase em *Rh. sanguineus* no tempo 0 e no 1º, 2º, 5º e 7º dpi, além de avaliar a permanência do parasita no tempo 0 e nos dias 1, 2, 5 e 7 após a infecção com *L. infantum* (dpi). Foram identificados cinco tipos celulares, prohemócitos, plasmatócitos, granulócitos, esferulócitos e adipohemócitos na hemolinfa do *Rh. sanguineus*. A partir da contagem total e diferencial dos hemócitos circulantes na hemolinfa de fêmeas de *Rh. sanguineus* a média do número total de hemócitos no grupo inoculado com *L. infantum* apresentou-se significativamente elevado ($P < 0.001$), no 1º e 2º dpi em relação ao grupo controle. Na contagem diferencial de hemócitos observou-se que a percentagem de plasmatócitos e granulócitos no grupo infectado, aumentou significativamente no 1º, 2º e 5º dpi ($P < 0.001$). Nos ensaios de fagocitose observou-se que plasmatócitos e granulócitos foram capazes de realizar fagocitose de partículas de látex e promastigotas de *L. infantum*, no 1º dpi. A produção de NO aumentou significativamente ($P < 0.05$) no 2º e 5º dpi e a atividade da PO apresentou aumento significativo ($P < 0.05$) no 5º dpi. A expressão do gene 18S ribossomal de *L. infantum* teve um aumento significativo ($P < 0.05$) no 2º, 5º e 7º após a infecção em relação ao tempo 0. A expressão da GST foi maior no 1º e 2º dpi e o gene defensina foi maior apenas no 5º dpi. Embora não existam estudos sobre a resposta do *Rh. sanguineus* frente a infecção com *L. infantum*, estes resultados sugerem, que após a infecção com *L. infantum* a resposta imune celular e humoral em *Rh. sanguineus* é ativada, porém mais estudos são necessários para avaliar o impacto dessa resposta no combate a infecção.

Palavras-chave: *Rhipicephalus sanguineus*. *Leishmania infantum*. Fagocitose. Óxido nítrico.

ABSTRACT

The *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) is an ectoparasite of domestic dogs and has great medical and veterinary importance for being associated with the transmission of many pathogens, among them there is a suspicion of its association with the transmission of *Leishmania infantum*. The aim of this study was to evaluate the innate cellular and humoral immune response by morphological and ultrastructural characterization of hemocytes, hemocyte dynamics evaluation, phagocytosis, phenoloxidase activity, nitric oxide production at the 1st, 2nd and 5th dpi, gene expression of defensin and Glutathione S-transferase in *Rh. sanguineus* and on days 1, 2, 5 and 7 after infection with *L. infantum* and to evaluate the persistence of the parasite at time 0 and on days 1, 2, 5 and 7 after infection with *L. infantum* (dpi). Five cell types were identified, prohemocytes, plasmatocytes, granulocytes, and spherulocytes adipohemocytes in *Rh. sanguineus* hemolymph. From the total and differential counts of circulating hemocytes in the hemolymph of *Rh. sanguineus* females the average of total number of hemocytes in the group inoculated with *L. infantum* showed to be significantly higher ($P < 0.001$), on 1st and 2nd dpi in comparison to control group. In differential counting of hemocytes, it was observed that the percentage of granulocytes and plasmatocytes in the infected group, increased significantly at the 1st, 2nd and 5th dpi ($P < 0.001$). In phagocytosis assays, it was observed that plasmatocytes and granulocytes were able to perform phagocytosis of latex particles and promastigotes of *L. infantum*, 1 day after infection. NO production increased significantly ($P < 0.05$) in the 1st, 2nd and 5th dpi and the PO activity increased significantly ($P < 0.05$) in the 5th dpi. The expression of the 18S ribosomal gene expressed by *L. infantum* had a significant increase ($P < 0.05$) in the 2st, 5th and 7th after infection in comparison to time 0. The expression of GST was higher in the 1st and 2nd dpi and the defensin gene was higher only in 5 dpi. Although there are no studies on *Rh. sanguineus* response against infection with *L. infantum*, these results suggest that after infection with *L. infantum* cellular and humoral immune response in *Rh. sanguineus* is activate, nevertheless more studies are needed to assess the impact of such response in fighting infection.

Keywords: *Rhipicephalus sanguineus*. *Leishmania infantum*. Phagocytosis. Oxide Nitric

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Mecanismo de defesa inata na hemocele de invertebrados.....	28
Figura 2:	Esquema dos experimentos realizados no estudo.....	43
Figura 3:	Micrografias de hemócitos de <i>Rh. sanguineus</i>	55
Figura 4:	Eletromicrografias de hemócitos de <i>Rh. sanguineus</i>	56
Figura 5:	Micrografias dos hemócitos de <i>Rh. sanguineus</i>	57
Figura 6:	Eletromicrografias dos hemócitos de <i>Rh. sanguineus</i>	58
Figura 7:	Microscopia de Contraste de Interferência Diferencial de hemócitos de <i>Rh. sanguineus</i>	59
Figura 8:	Contagem total de hemócitos de <i>Rh. sanguineus</i> infectados com <i>L. infantum</i>	62
Figura 9:	Contagem diferencial de hemócitos de <i>Rh. sanguineus</i> infectados com <i>L. infantum</i>	63
Figura 10:	Contagem diferencial de hemócitos de <i>Rh. sanguineus</i> infectados com <i>L. infantum</i>	64
Figura 11:	Eletromicrografias dos hemócitos de <i>Rh. sanguineus</i> fagocitando partículas de látex 24 h após desafio.....	66
Figura 12:	Eletromicrografias dos hemócitos de <i>Rh. sanguineus</i> fagocitando <i>L. infantum</i> 24h após desafio.....	67
Figura 13:	Eletromicrografias dos hemócitos de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> fagocitando <i>L. infantum</i> 24h após desafio.....	68
Figura 14:	Comparação da concentração de NO ₂ na hemolinfa de <i>Rh. sanguineus</i> infectados com <i>L. infantum</i>	69
Figura 15:	Comparação da atividade do fenoloxidase na hemolinfa de <i>Rh. sanguineus</i> infectados com <i>L. infantum</i>	70
Figura 16:	Micrografias da atividade da fenoloxidase em hemócitos de <i>Rh. sanguineus</i> desafiados com <i>L. infantum</i>	71
Figura 17:	Temperaturas de meltings, eficiência, e coeficiente de correlação dos primers utilizados no estudo.....	73
Figura 18:	Expressão relativa do gene 18S ribossomal de <i>Leishmania</i>	74
Figura 19:	Expressão do gene defensina em <i>Rh. sanguineus</i> infectados com <i>L. infantum</i>	75
Figura 20:	Expressão do gene Glutathione-S-transferase (GST) em <i>Rh. sanguineus</i> infectados com <i>L. infantum</i>	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Oligonucleotídeos utilizados para amplificar genes de <i>Leishmania infantum</i> e <i>Rhipicephalus sanguineus</i> em qPCR	51
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

cDNA	Ácido desorribonucleico complementar
CEUA	Comissão de ética no uso de animais
Ct	<i>Cycle threshold</i>
CRT	Calreticulina
dCT	<i>Delta Cycle threshold</i>
ddCT	<i>Delta-Delta Cycle threshold</i>
DEPC	<i>Diethylpyrocarbonate</i> / Dietilpirocarbonato
DHI	Dihidroxi
dpi	Dias pós infecção
dsRNA	<i>Double strand Ribonucleic acid</i> / Ácido ribonucleico de fita dupla
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
eff	eficiência
eNOS	Oxido nítrico sintase endotelial
FAK/Src	Quinase de adesão focal
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
GFM	Grupo da Febre Maculosa
GST	Glutathione-S-transferase
iNOS	<i>Inducible Nitric oxide synthase</i> / Oxido nítrico sintase induzível
kDNA	<i>Kinetoplast Deoxyribonucleic acid</i> /ácido desoxirribonucleico do kinetoplasto
L-DOPA	<i>L-3,4-dihydroxyphenylalanine</i> / L-3,4- Dihidroxifenilalanina
LIKA	Laboratório de Imunologia Keizo Asami
LPS	Lipopolissacarídica
LV	Leishmaniose Visceral
MAPK	Proteína quinase ativada por mitogênio
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
NaCl	Cloreto de Sódio
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NO ₂	Dióxido de nitrogênio
nNOS	<i>neuronal Nitric oxide synthase</i> / Oxido nítrico sintase neuronal
NOS	<i>Nitric oxide synthase</i> / óxido nítrico sintetase

ON	Óxido nítrico
PAMs	Peptídeos antimicrobianos
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> / tampão fosfato-salino
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> / reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
PO	Fenoloxidase
PPO	Profenoloxidase
qPCR	<i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i> / reação em cadeia da polimerase quantitativa
QR	Quantificação relativa
R ²	Coeficiente de correlação
Redox	Redução-oxidação
RNAi	<i>Interfering RNA</i> / RNA de interferência
RNI	Radicais livres de nitrogênio
ROI	Radicais livres de oxigênio
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> / Espécies reativas de oxigênio
rpm	Rotações por minutos
T _m	Temperatura de <i>melting</i>

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	17
2.	REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1	Classificação dos carrapatos.....	19
2.2	Biologia e ciclo de vida da família Ixodidae.....	20
2.3	Doenças transmitidas por carrapatos.....	21
2.3.1	<i>Leishmania</i> e sua interação com artrópodes.....	22
2.4	Sistema Imune dos invertebrados.....	27
2.4.1	Resposta imune celular.....	28
2.4.2	Fagocitose.....	30
2.4.3	Nodulação e encapsulamento.....	32
2.5	Resposta imune humoral.....	33
2.5.1	Atividade da Fenoloxidase.....	33
2.5.2	Peptídeos antimicrobianos.....	35
2.5.3	Inibidores de Proteases.....	37
2.5.4	Lectinas.....	38
2.5.5	Homeostase redox nos carrapatos.....	39
2.5.6	Óxido nítrico.....	41
3.	OBJETIVOS.....	42
3.1	Objetivo Geral.....	42
3.2	Objetivos específicos.....	42
4.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
4.1	Estabelecimento e manutenção da colônia de <i>Rh. sanguineus</i>	43
4.2	Esquema experimental.....	44
4.3	Coleta de hemolinfa.....	44
4.4	Inoculação de carrapatos.....	45
4.5	Microscopia de Luz.....	45
4.6	Microscopia de Contraste de Interferência Diferencial.....	46
4.7	4.6 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	46
4.8	Atividade da fenoloxidase em hemolinfa e identificação de hemócitos positivos para profenoloxidase.....	47
4.9	Produção de Oxido Nítrico (ON)	47

4.10	Extração de RNA total e síntese de cDNA.....	48
4.11	PCR quantitativo em tempo real (qPCR).....	48
4.12	Análises estatísticas.....	51
4.12	Considerações éticas.....	51
5.	RESULTADOS.....	52
5.1	Caracterização morfológica e ultraestrutural de hemócitos de <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	52
5.2	Dinâmica hemocitária.....	60
5.3	Atividade de fagocitose de hemócitos.....	64
5.4	Dosagem de Óxido Nítrico.....	68
5.5	Atividade da fenoloxidase na hemolinfa e identificação dos tipos de hemócitos produtores de PO.....	69
5.6	Expressão dos gene 18S ribossomal de <i>Leishmania</i> , 18S ribossomal do <i>Rh. sanguineus</i> , defensina e Glutathione-S-Transferase.....	71
5.7	Expressão do gene 18S ribossomal de <i>Leishmania</i> em <i>Rh. sanguineus</i>	71
5.8	Expressão dos genes GST e Defensina de <i>Rh. sanguineus</i>	71
6.	DISCUSSÃO.....	76
7.	CONCLUSÃO.....	85
	REFERÊNCIAS	86
	APÊNDICE A.....	103
	APÊNDICE B.....	118
	ANEXO A	140

1. INTRODUÇÃO

O *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) é conhecido como o carrapato marrom do cão e é um ectoparasita de cães domésticos com distribuição mundial, principalmente em climas tropicais e temperados (DANTAS-TORRES et al., 2008). Esta espécie de carrapato é vetora e hospedeira de patógenos como a bactéria *Rickettsia conorii* e dos protozoários *Babesia vogeli* e *Hepatozoon canis* (PAROLA et al., 2008; BANETH et al., 2011; SCHNITTGER et al., 2012). Porém pouco é conhecido sobre a interação parasita-vetor, entre estes patógenos e o *Rh. sanguineus*.

Os carrapatos são ectoparasitas obrigatórios podendo parasitar animais domésticos e silvestre e ocasionalmente humanos. Causam danos ao hospedeiro através da perda de sangue ou da transmissão de uma variedade de patógenos, incluindo bactérias, vírus e protozoários (JONGEJAN; UIENBERG, 2004; DE LA FUENTE et al., 2008). O sucesso da transmissão de patógenos pelos carrapatos está relacionado a aspectos específicos da biologia do mesmo, como digestão sanguínea intracelular, evitando a ação de enzimas digestivas no lúmen intestinal. Além disso, a sobrevivência dos microrganismos ingeridos, parece está associada a proteínas presentes no carrapato e a manutenção do equilíbrio redox no intestino do mesmo (GRIESCH et al., 2000; SONENSHINE; HYNES, 2008). Para a manutenção do equilíbrio redox, enzimas antioxidantes como catalases, glutathione peroxidase e tioredoxina, glutathione S-transferase e selenoproteínas são expressas para destruir os radicais livres produzidos no intestino (ANDERSON et al., 2008; MEGY et al., 2012). Os carrapatos têm um sistema imunológico inato bem desenvolvido. No entanto, apesar de sua capacidade de resistir à infecção por diversos microrganismos, eles permanecem importantes vetores de numerosos agentes causadores de doenças, uma vez que esses parasitas podem evadir o sistema de imune dos mesmos. Os conhecimentos sobre esses mecanismos de evasão dos patógenos nos carrapatos ainda não estão bem esclarecidos (SONENSHINE; HYNES, 2008; KOPÁČEK et al., 2010).

A maior parte do conhecimento sobre a imunidade inata dos carrapatos está associada às respostas imunes celulares e humorais na hemocela do carrapato. A natureza da resposta imune inata envolve dois componentes principais: defesa celular, representada pelos hemócitos, que desempenham um importante papel na resposta imune inata dos carrapatos, quando expostos a algum patógeno ou dano tecidual. Os hemócitos também estão diretamente

relacionados aos processos de fagocitose e encapsulamento ou formação de nódulos destinados principalmente a patógenos maiores, tais como protozoários e metazoários. A resposta humoral envolve a produção de peptídeos antimicrobianos (PAMs) com atividade principalmente para bactérias e fungos. Os PAMs podem ser expressos pelos hemócitos, corpo gorduroso, intestino médio e em alguns casos por outros órgãos internos do corpo do carrapato. Outros peptídeos, não exclusivamente antimicrobianos, tais como lisozima, lectinas, inibidores de proteases, são também expressos em resposta ao desafio patogénico (GRIESCH et al., 2000; SHI; PASKEWITZ, 2006; SONENSHINE; HYNES, 2008).

Alguns estudos têm investigado o papel da possível relação do *Rh. sanguineus* com a *L. infantum* (COUTINHO et al., 2005, PAZ et al., 2010, DANTAS-TORRES et al., 2010, DANTAS-TORRES et al., 2011, COLOMBO et al., 2011, SOLANO-GALLEGO et al., 2013; DE MORAIS et al., 2013). No entanto, os estudos enfatizam a presença do DNA da leishmanias no carrapato, sendo necessário mais esclarecimento a respeito da interação parasita-vetor. O objetivo do presente estudo foi avaliar aspectos da resposta imune inata celular e humoral através da avaliação e caracterização da dinâmica hemocitária, produção de óxido nítrico, fagocitose, atividade da fenoloxidase e expressão dos genes para Glutathione-S-transferase e defensina em *Rh. sanguineus* desafiados com promastigotas de *Leishmania infantum*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Classificação dos carrapatos

Os carrapatos pertencem ao Filo Arthropoda, Classe Arachnida, Subclasse Acari, Ordem Ixodida, Subordem Parasitiforme e Superfamília Ixodoidea (JOHN et al., 2008; KEIRANS, 2009; NAVA et al., 2009). Todas as espécies de carrapatos (Acari: Ixodida) são agrupados em três famílias: Argasidae, composta por 186 espécies, são carrapatos moles que têm dorso sem quitina; Ixodidae, composta por 692 espécies, são carrapatos duros que têm um dorso totalmente ou parcialmente coberto com quitina; e Nuttalliellidae, uma família monotípica, pouco conhecida, representada pela *Nuttalliella namaqua*. A família Argasidae contém de 2 a 5 subfamílias, mas as relações entre os seus membros não estão bem esclarecidas. Já a Família Ixodidae é subdividida nos grupos Prostriata (gênero Ixodes) e Metastriata (todos os outros gêneros em Ixodidae) (NAVA et al., 2009).

Tradicionalmente, as classificações e inferências filogenéticas para Ixodida foram baseados em características morfológicas, biológicas e ecológicas (HOOGSTRAAL; AESCHLIMANN, 1982; KLOMPEN; OLIVER, 1993; FILIPPOVA, 1994).

Segundo Klompen; Oliver (1993), a família Argasidae está classificada nas subfamílias Argasinae e Ornithodorinae. Na subfamília Argasinae está incluído o gênero *Argas*, com os subgêneros *Argas*, *Secretargas*, *Ogadenus*, *Proknekallia* e *Alveonasus*. Na subfamília Ornithodorinae três gêneros estão incluídos, *Ornithodoros* (com os subgêneros *Ornithodoros*, *Pavlovskyella*, *Ornamentum* and *Microargas*), *Otobius* e *Carios*. Esta classificação é a mais aceita na atualidade para a família Argasidae.

De acordo com Hoogstraal e Aeschlimann (1982), a família Ixodidae, foi classificada com base na morfologia, ciclos de vida e associações com hospedeiros, onde reconhecem quatro subfamílias, Amblyomminae (gêneros *Amblyomma* e *Aponomma*), Haemaphysalinae (gênero *Haemaphysalis*), Hyalomminae (gênero *Hyalomma*) e Rhipicephalinae (gêneros *Anomalohimalaya*, *Boophilus*, *Cosmiomma*, *Dermacentor*, *Margaropus*, *Nosomma*, *Rhipicentor* e *Rhipicephalus*). Barker e Murrell, (2004), baseados em estudos mais recentes, usando evidências morfológicas e moleculares para entender a filogenia de carrapatos da família Ixodidae, desenvolveram uma nova classificação reconhecendo cinco subfamílias, Ixodidae (gênero *Ixodes*), Bothriocrotoninae (gênero *Bothriocroton*), Amblyomminae (gênero *Amblyomma*), Haemaphysalinae (gênero

Haemaphysalis), Rhipicephalinae (gêneros *Anomalohimalaya*, *Cosmiomma*, *Dermacentor*, *Hyalomma*, *Margaropus*, *Nosomma*, *Rhipicentor*, *Rhipicephalus*).

A família Ixodidae engloba a maioria das espécies de carrapatos do Brasil, dentre eles, os de maior importância médico-veterinária. Os gêneros *Amblioma*, *Anocentor* e *Rhipicephalus*, são os principais carrapatos encontrados parasitando hospedeiros vertebrados (LABRUNA, 2004).

2.2 Biologia e ciclo de vida da família Ixodidae

Os carrapatos Ixodídeos passam por quatro fases de desenvolvimento durante o seu ciclo de vida. Cada estágio de desenvolvimento alimenta-se somente uma vez antes de realizar a muda. O *Rh. sanguineus* apresenta quatro formas diferentes de estágios de desenvolvimento: ovo, larva, ninfa e adulto, este último é o único estágio com dimorfismo sexual. As larvas e as ninfas parasitam o hospedeiro de 3 a 11 dias, enquanto as fêmeas e os machos adultos parasitam de 5 a 21 dias, alimentando-se principalmente de sangue, também se alimentam de linfa, restos tissulares da derme e/ou epiderme lesada por diversas enzimas proteolíticas secretadas pela saliva do carrapato (BECHARA et al., 1995; LABRUNA, 2004; DANTAS-TORRES, 2008; SILVEIRA et al., 2009).

No final do período parasitário, as larvas e ninfas ingurgitadas se desprendem do hospedeiro para fazer no ambiente a ecdise para os próximos estágios evolutivos, daí ninfas e adultos retornam para o mesmo hospedeiro ou outros vertebrados (PAZ et al., 2001). As fêmeas ingurgitadas e fertilizadas sobre o hospedeiro se desprendem deste para fazerem a postura de ovos no ambiente. Cada fêmea pode colocar de 1.000 a 3.000 ovos, que após algumas semanas, darão origem às larvas. Os machos que ficam sobre o hospedeiro por vários dias ou semanas, não ingurgitam e não aumentam nitidamente de tamanho, mas podem fertilizar várias fêmeas neste período (LABRUNA, 2004).

Em geral, todos os estágios parasitários do *Rh. sanguineus* ocorrem no cão doméstico (*Cannis familiares*) que é o único hospedeiro importante para a manutenção das populações desses Ixodídeos no ambiente urbano, entretanto o mesmo também pode usar diferentes hospedeiros durante os seus três estágios evolutivos (KRAJE, 2001).

Concomitantemente ao período de sucção sanguínea ocorre também grande salivação, com o processo de regurgitação ocorrendo com frequência durante a alimentação do

carrapato. Este processo de intensa salivação e regurgitação é de grande importância para a transmissão de patógenos durante a alimentação sanguínea (PAROLA; RAOULT, 2001).

Os carrapatos têm despertado o interesse da comunidade científica e da saúde pública devido a sua participação na transmissão de babesiose, hepatozoonose, ehrlichiose, rickettsiose, borreliose e doenças fúngicas, além de poder estar envolvido na transmissão da *Leishmania* ssp. (FOONGLADDA et al., 2011; BRIANTI et al., 2012). Na ausência do flebótomo para a transmissão da *L. infantum*, suspeita-se que a transmissão seja mantida por outros ectoparasitos do cão, particularmente a pulga *Ctenocephalides felis felis* e o carrapato *Rh. sanguineus* (COUTINHO; LINARDI, 2007; DANTAS-TORRES, 2008). Porém, não existem registros na literatura da participação destes na transmissão da leishmaniose, a não ser de forma mecânica como foi descrito por Coutinho et al. (2005), após inoculação de carrapatos infectados com o parasita pelos cães durante o ato de se lambem ou morder uns aos outros.

2.3 Doenças transmitidas por carrapatos

Os carrapatos (Acari: Ixodidae) são ectoparasitas obrigatórios e se alimentam de sangue de muitos hospedeiros, incluindo mamíferos, aves e répteis. Podem causar muitos danos aos seus hospedeiros, em decorrência da perda de sangue, assim como também, por transmitirem uma larga variedade de patógenos para vertebrados, incluindo vírus, bactérias, protozoários e helmintos. Depois dos mosquitos, os carrapatos são o segundo maior grupo de artrópodes vetores de patógenos de importância médica-veterinária (DE LA FUENTE et al., 2008; OTRANTO et al., 2012).

O desenvolvimento de patógenos nos hospedeiros vertebrados e em carrapatos é mediado, por mecanismos moleculares de interação parasita-vetor. A caracterização molecular da interface carrapato-patógeno está avançando rapidamente e fornece novos caminhos para o desenvolvimento de novas estratégias de controle para ambas as infestações de carrapatos e a transmissão de seus patógenos associados (UILENBERG, 2006; DE LA FUENTE et al., 2008).

O sucesso da transmissão de patógenos pelo carrapato está relacionado ao longo período de co-evolução do parasita com o carrapato, que está relacionado a uma característica específica da biologia do mesmo. Além disso, patógenos ingeridos não são expostos à

atividade proteolítica de enzimas digestivas no lúmen do intestino do carrapato, uma vez que a digestão ocorre intracelularmente dentro de vesículas lisossomais, e também estão em contato com grande quantidade de proteínas oriundas do sangue ingerido e em um pH neutro, um ambiente ideal para proliferação microbiana (SONENSHINE, 1991; HAJDUŠEK et al., 2013).

Alguns patógenos são transmitidos pelo *Rh. sanguineus*, como *Rickettsia* que são bactérias cocobacilos gram-negativos. O *Rh. sanguineus* é o principal vetor da *R. conorii*, responsável pela transmissão da febre do mediterrâneo no velho mundo e da *R. rickettsii*, agente etiológico da febre das montanhas rochosas, nas Américas (PAROLA et al., 2008). O protozoário *Hepatozoon* pertence ao filo Apicomplexa e a família Hepatozoidae. A transmissão de *Hepatozoon* spp. aos vertebrados ocorre pela ingestão do hospedeiro definitivo invertebrado (BANETH et al., 2007), também já foi descrita a transmissão transtadial, de larvas para ninfas de *Rh. sanguineus* (GIANNELLI et al., 2013). Duas espécies *Hepatozoon americanum* e *Hepatozoon canis* são capazes de infectar cães. Enquanto *H. americanum* é restrita ao novo mundo, *H. canis* apresenta uma distribuição cosmopolita e tem sido relatada em diferentes regiões do sul da Europa, América, África e Ásia (BANETH et al., 2011; OTRANTO et al., 2011). O *Rh. sanguineus* é o principal vetor do parasita *H. canis*, encontrado em regiões tropicais e sub-tropicais, tornando amplo o potencial de transmissão dessa hepatozoonose por todo o mundo. Porém outras espécies de carrapatos que são ectoparasitas de cães, incluindo *Amblyomma ovale* no Brasil (RUBINI et al., 2009) e *Haemaphysalis longicornis* e *Haemaphysalis flava* no Japão (DE MIRANDA et al., 2011). O *Rh. sanguineus* também está relacionado a transmissão da Babesia, causando a babesiose em cães, sendo vetor da *B. vogeli* para cães, não só em regiões tropicais e subtropicais, mas também em áreas mais frias (UILENBERG, 2006; SCHNITTGER et al., 2012).

2.3.1 *Leishmania* e sua interação com artrópodes

A Leishmaniose Visceral (LV) é uma doença crônica grave, potencialmente fatal para o homem, cuja letalidade pode alcançar 10% quando não se institui o tratamento adequado. É causada por protozoários digenéticos da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania* e espécie pertencente ao complexo *Leishmania (Leishmania) donovani*. No Brasil, o agente etiológico é a *L. infantum* (GONTIJO; MELO, 2004; MURRAY et al.,

2005). Este parasito de ciclo heteroxênico, apresenta formas promastigotas flageladas extracelulares e formas amastigotas intracelulares obrigatórias, sendo estas últimas responsáveis por todas as manifestações clínicas da doença (OLIVEIRA et al., 2007). O vetor da *L. infantum* é um díptero da Família Psychodidae, hematófagos pertencentes aos gêneros *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomyia* (Novo Mundo), com vasta distribuição nos climas quentes e temperados (PIMENTA et al., 2012). No Brasil apenas duas espécies até o momento estão relacionadas com a transmissão da doença, são elas *Lu. longipalpis* e *Lu. cruzi*. A primeira espécie é considerada a principal transmissora da *L. infantum* (GALATI et al., 1997; OLIVEIRA et al., 2013). Apresentam hábitos peridomésticos e intradomiciliares e apenas a fêmea do *Lu. longipalpis* realiza o repasto sanguíneo que pode ser em várias espécies de animais.

A leishmania é ingerida pelos flebotomíneos na forma amastigota junto com o sangue do hospedeiro vertebrado. A infecção do vetor pode ser dividida em três períodos, dos quais o primeiro é caracterizado pela presença do bolo alimentar envolto pela matriz peritrófica, o segundo pela presença de leishmania aderidas ao epitélio do intestino médio abdominal do inseto e o terceiro pela colonização do intestino anterior do vetor (SACKS, 2001; SACKS; KAMHAWI, 2001). Com o início da ruptura da matriz peritrófica, cerca de 70 horas após a alimentação, os protozoários podem deixar o bolo alimentar e se aderir no glicocálice do epitélio do intestino médio. Parasitos não aderidos são excretados junto com o resíduo alimentar e até hoje não foi demonstrado nenhuma importância destes para o processo de transmissão da doença. Com aproximadamente uma semana do início da infecção, as leishmanias começam a migrar massivamente e colonizar a região anterior do tubo digestivo correspondente à porção torácica do intestino médio e à válvula estomodeal. Durante este processo, se aderem intimamente ao epitélio cuticular da válvula estomodeal via hemidesmossomos e umas às outras por meio de um material gelatinoso secretado. A forma metacíclica que é infectiva para o hospedeiro vertebrado, migra além da válvula estomodeal chegando ao esôfago, faringe e probóscide. Os parasitos secretam uma quitinase, acarretando a deformação da válvula estomodeal do inseto. A descaracterização estrutural deste órgão faz com que o aparelho sugador entre em colapso e as formas infectantes sejam regurgitadas no local da picada, completando assim a fase de transmissão do ciclo de vida da leishmania (ROGERS et al., 2008).

O tempo aproximado necessário para que o parasito complete seu desenvolvimento no flebotomíneo é de 6 a 9 dias, dependendo da espécie. Aparentemente, o protozoário é capaz de alterar o comportamento de alimentação dos flebotomíneos para aumentar a eficiência da transmissão (ROGERS; BATES, 2007). Vale ressaltar que o crescimento parasitário só será abundante se, após o repasto sanguíneo infectante, a fêmea vier a alimentar-se de sucos vegetais ou de substâncias açucaradas. Se, em lugar disso, houver nova refeição de sangue, por volta do quarto ou quinto dia, os flagelados degeneram ou a infecção torna-se leve. (SACKS, 2001).

Do ponto de vista parasitológico, a hematofagia proporciona um cenário para a transmissão de várias doenças, visto que inúmeros microorganismos patogênicos utilizam o hábito hematofágico dos insetos para a continuidade de seu ciclo de vida e podem passar de um hospedeiro a outro através (1) do fluxo salivar (*Plasmodium* spp.); (2) bloqueio mecânico do canal alimentar (*Leishmania* spp.); (3) excreção de fezes contaminadas durante a pré-diurese (*Trypanosoma cruzi*), e (4) rompimento do aparato bucal (*Wuchereria bancrofti*). Qualquer que seja a via de transferência, é durante a hematofagia que se estabelece o contato mais íntimo entre o inseto e seu hospedeiro (SACKS, 2001).

Alguns autores têm cogitado a possibilidade do *Rh. sanguineus* poder transmitir *L. infantum*, baseado no fato de existir regiões endêmicas para leishmaniose visceral canina e humana com baixa taxa de infectividade do flebótomo, assim como, ausência da população do mesmo, sugerindo a existência de um vetor alternativo (DANTAS-TORRES, et al., 2010). Dessa forma estudos sobre prevalência de kDNA de *Leishmania* em carrapatos têm sido desenvolvidos por alguns autores. Coutinho et al., (2005) avaliaram a positividade e infectividade da *L. infantum* em 39 espécimes de *Rh. sanguineus* coletadas de 25 cães positivos para leishmaniose visceral. Encontrou-se uma positividade 15,4% entre os carrapatos analisados, destes positivos procedeu-se uma maceração para posterior inoculação em 36 *hamsters*, com o objetivo de verificar a infectividade das *Leishmanias* spp. na transmissão da doença. Foram testadas duas vias de inoculação, oral e intraperitoneal, e após seis meses da inoculação os animais foram analisados por PCR quanto à presença de DNA de *L. infantum*, sendo diagnosticados positivos 20 animais que foram inoculados peritonealmente e 7 que inoculados oralmente.

Investigando a possibilidade de outros invertebrados estarem relacionados com a transmissão da leishmaniose, Coutinho e Linardi, (2007), investigaram a positividade e

infectividade de pulgas, *Ctenocephalides felis felis*, com *L. infantum*. Foram coletadas pulgas de 56 cães positivos para leishmaniose visceral, encontrando-se uma positividade de 20,9%. Para o teste da infectividade inoculou-se macerado de pulgas infectadas, oralmente e peritonealmente, em 30 *hamsters*. Após seis meses foram avaliados quanto à presença de DNA de *L. infantum*, observando-se uma positividade em 16 animais, sendo 11 derivados da inoculação peritoneal e 5 oral. Ambos os trabalhos citados anteriormente, mostram que existe positividade para *L. infantum* em ectoparasitas ligados ao cão como a pulga e o carrapato, podendo existir uma transmissão da *Leishmania* através da ingestão desses ectoparasitas infectados pelos cães. Ferreira et al. (2009), também realizaram um estudo com pulgas coletadas de 22 cães, uma vez positivas para kDNA de *Leishmania* foram maceradas e inoculadas em 22 *hamsters*, destes, 45% foram diagnosticados 4 meses após a inoculação, positivos para kDNA de *Leishmania*, demonstrando que existe uma viabilidade da infectividade das formas parasitárias encontradas no carrapato e inoculadas nos *hamsters*.

Dantas-Torres et al. (2010) avaliaram a presença de *L. infantum* em *Rh. sanguineus* coletados de cães com LV oriundos da zona rural no Sudeste da Itália e do Nordeste do Brasil, foram coletados 95 espécimes de carrapatos de 26 cachorros. Os carrapatos foram analisados quanto à presença de kDNA de *L. infantum* verificando 12,5% de positividade. Neste trabalho, foi avaliada a presença de kDNA de *Leishmania* em um pool de glândulas salivares dos carrapatos. Este foi o primeiro trabalho que descreveu kDNA de *Leishmania* em glândula salivar de carrapatos. Todos os trabalhos citados corroboram na taxa de infecção dos carrapatos e pulgas analisadas nos estudos, sugerindo um possível envolvimento destes ectoparasitas no ciclo epidemiológico da *L. infantum*.

Paz et al. (2010) investigaram a relação de cada representante do ciclo de vida do *Rh. sanguineus* com o ciclo de vida da *L. infantum*. Os carrapatos foram avaliados quanto a presença de kDNA de *Leishmania* no período de até 7 dias após alimentação nos cães infectados. Todos os pools avaliados, com exceção das larvas, apresentaram-se positivos para kDNA de *Leishmania*. Podendo-se concluir que existe kDNA de *Leishmania* no carrapato por um período de até sete dias. Colombo et al. (2011), avaliaram pulgas e carrapatos, após alimentarem-se em 73 cães positivos para LV, quanto a presença de kDNA de *Leishmania* no período de 7 e 10 dias após o repasto sanguíneo, dos 73 cães analisados, 17 apresentaram o pool de pulgas positivas para kDNA de *Leishmania*, 14 apresentaram pool de ninfas infectadas com kDNA de *Leishmania*, 20 com adultos machos de carrapato infectados e 30 com fêmeas

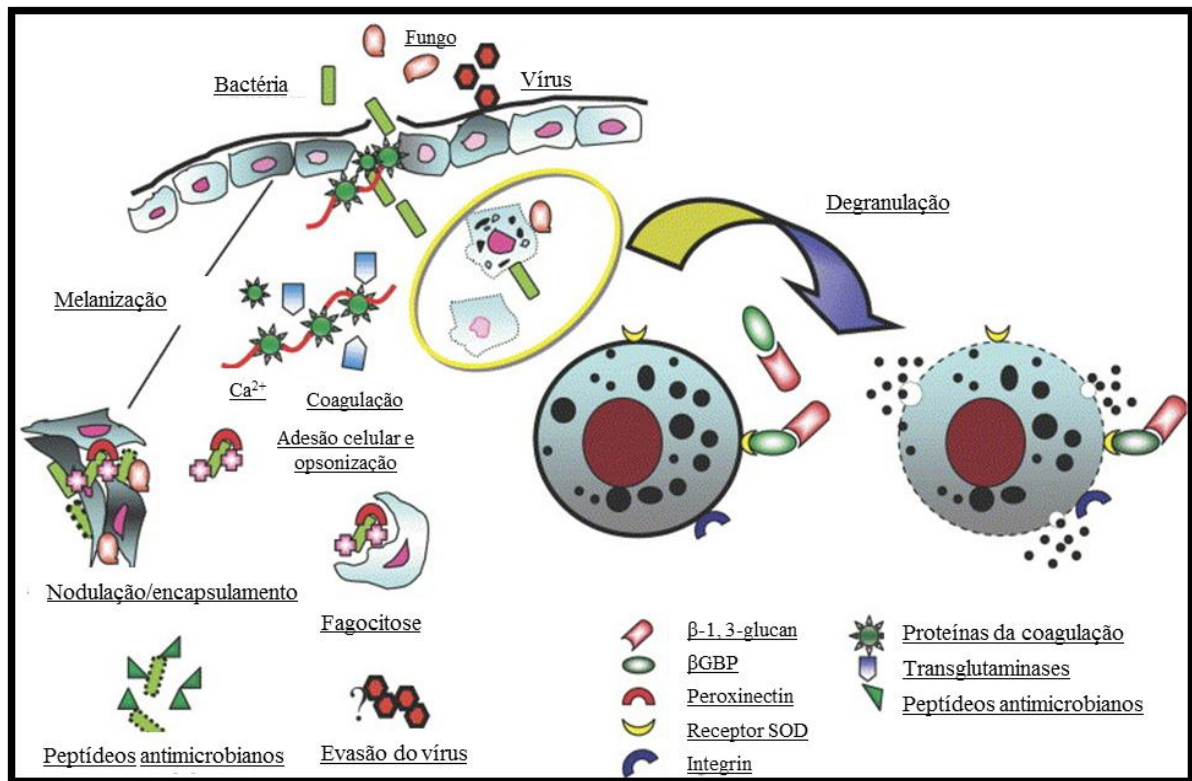
adultas infectadas. Também foi investigada a viabilidade do parasita no carrapato, um grupo de 25 ninfas até a realização da ecdise para a fase adulta. Mesmo após a ecdise foi identificado kDNA de *Leishmania* no pool de carrapatos analisados. Este estudo é o primeiro a descrever a permanência do kDNA de *Leishmania* até a passagem transestadial. De acordo com os dois trabalhos citados anteriormente, os autores puderam sugerir que a *Leishmania* permaneça viável no carrapato, uma vez que o após a morte do parasita o seu DNA degrada-se rapidamente, como foi descrito por Prina et al. (2007). Mesmo tendo sido elucidado muitas questões relacionadas a relação do carrapato no ciclo da LV, faz-se necessários mais estudos que possam esclarecer a viabilidade do parasita no *Rh. sanguineus*.

2.4 Sistema Imune dos invertebrados

Nos últimos anos, o conhecimento dos mecanismos imunológicos em invertebrados tem sido mais estudado, motivado pela importância vetorial dos mesmos, assim como pelo fato de serem hospedeiros intermediários na transmissão de patógenos para doenças graves, como malária, febre amarela, filariose e tripanossomíases (RIVERO, 2006). A natureza da resposta imune inata envolve dois componentes principais: defesas celulares, fagocitose e encapsulamento ou formação de nódulos destinados principalmente a patógenos maiores, tais como parasitas protozoários e metazoários e de respostas humorais, envolvendo a secreção de proteínas de reconhecimento padrão (PRP) (Fig. 1) (destinado a bactérias e fungos), expressos pelos hemócitos, corpo gorduroso, intestino médio e em alguns casos por outros órgãos internos do corpo e tecidos. Outros peptídeos, não exclusivamente antimicrobianos, tais como lisozima, lectinas e inibidores de proteases, são também expressos em resposta ao desafio patogênico (GRIESCH et al., 2000; SONENSHINE, HYNES, 2008). A ocorrência de lesões, assim como também, agentes patogênicos invasores, pode induzir uma cascata proteolítica que também contribui para a defesa imune, embora deva ser regulada para limitar os danos para os tecidos do corpo (GRIESCH et al., 2000). O intestino médio dos carrapatos e outros artrópodes apresentam um caso especial, pois após a alimentação regula a expressão de cisteína proteases, inibidores de serina-protease (serpinas) e cistatinas, lectinas, glutathione S-transferases (GSTs), peptídeos antimicrobianos bem como peroxirredoxinas e outras proteínas que reduzem o estresse oxidativo, que podem inibir ou destruir patógenos ingeridos (SHI; PASKEWITZ, 2006).

As informações sobre a resposta imune inata em carrapatos é bastante fragmentada e permite apenas comparações com outras espécies de invertebrados, especialmente artrópodes (SONENSHINE; HYNES, 2008; KOPACEK et al., 2010). No entanto, mesmo esses dados dispersos indicam que os carrapatos possuem mecanismos de defesa protegendo-os contra a infecção de patógenos. Ao nível celular, que compreende a fagocitose, encapsulamento e nodulação de elementos estranhos. Em nível de defesa humoral, baseia-se numa variedade de proteínas de padrões de reconhecimento e moléculas efetoras, tais como lectinas e um amplo espectro de PAMs comuns ou específicos para cada patógeno (KOPACEK et al., 2010).

Figura 1: Mecanismo de defesa inata na hemocele de invertebrados.



Fonte: Adaptado de Jiravanichpaisal et al. (2006)

2.4.1 Resposta imune celular

Assim como os outros artrópodes, os carrapatos possuem um sistema circulatório aberto, com a hemolinfa circulando sobre os seus órgãos internos. A morfologia do sistema circulatório dos Argasidae e Ixodidae foi descrita por Obenchain e Oliver (1976). Resumidamente os carrapatos possuem um coração na região anterior dorsal do corpo, uma aorta e vasos arteriais. As artérias facilitam a disseminação da hemolinfa dentro dos espaços na hemocele. A hemolinfa dos carrapatos é um fluido complexo, composto por plasma e hemócitos e tem como função transportar nutrientes moleculares, hormônios e produtos de metabolismo celular, além de estar envolvida na proteção de injúrias físicas e invasão de patógenos. A quantidade de hemolinfa em artrópodes varia entre as espécies e depende do estágio de desenvolvimento e de alimentação (GUDDERRA et al., 2002).

O plasma compõe aproximadamente 90% da hemolinfa, e as proteínas constituem o maior componente solúvel do plasma (GUDDERRA et al., 2002). Os hemócitos

compreendem mais de 99% das células circulantes na hemolinfa e possuem uma variedade de moléculas de defesa, percorrendo quase todas as regiões do corpo dos insetos, devido aos seus movimentos ameboides, podendo inclusive mover-se em sentido contrário ao fluxo da hemolinfa. Podem também estarem aderidos ao corpo gorduroso, traquéia e sistema digestivo. (IWANAGA; LEE, 2005). Em artrópodes, os hemócitos possui numerosas funções, eles são responsáveis pela coagulação da hemolinfa, após algum ferimento na cutícula e ruptura da epiderme, resposta imunitária específica e geral, e opsonização. Além disso, produzem e armazenam substâncias que podem ser lançadas na hemolinfa após infecções, tais como substâncias antibacterianas e elementos do sistema fenoxidase, bem como substâncias antibacterianas, lectinas e hemolisinas (GUPTA, 1968; XYLANDER, 2009).

Os hemócitos desempenham um importante papel na resposta imune inata dos carrapatos, quando expostos a bactéria, vírus, protozoários ou outros microorganismos, são ativados para controlar a infecção. A população de hemócitos aumenta significativamente, por vários dias, até que a invasão tenha sido combatida (SONENSHINE, HYNES, 2008). Existem poucos estudos sobre a caracterização ultraestrutural de hemócitos de carrapatos. Baseado em estudos de morfologia e fisiologia com diferentes espécies de carrapatos, no mínimo três tipos de hemócitos, denominados plasmatócitos, granulócitos tipo I e granulócito tipo II, têm sido descritos em carrapatos duros e moles utilizando a microscopia eletrônica de transmissão. Borovickova e Hyspa, (2005), trabalhando com as espécies *Ixodes ricinus* e *Ornithodoros moubata*, descreveram quatro tipos celulares, prohemócitos, plasmatócitos, granulócitos tipo I e granulócito tipo II em *I. ricinus* e os mesmo tipos celulares adicionado de esferulócitos foram descritos para *O. moubata*. Kuhn e Haug (1994) em estudo realizado com *I. ricinus*, descreveram os tipos celulares, células tipo prohemócitos, plasmatócitos, granulócitos tipo I e granulócito tipo II. O primeiro estudo com hemócitos da espécie *Rh. sanguineus*, foi desenvolvido por Carneiro et al. em 1997, utilizando apenas microscopia de luz, e descreveram seis tipos celulares, prohemócitos, plasmatócitos, granulócitos, esferulócitos, adipohemócitos e oenocitóide. Silva et al. (2002), descreveram os mesmos seis tipos celulares em *Boophilus microplus* inoculados com *Penicillium* spp., também utilizando apenas microscopia de luz.

2.4.2 Fagocitose

A fagocitose é uma resposta imune inata mediada por receptor contra agentes patogênicos como bactérias, protozoários, fungos e células apoptóticas. Em mamíferos a fagocitose é realizada principalmente por macrófagos, monócitos e neutrófilos, enquanto que em insetos e demais artrópodes é realizada principalmente por plasmatócitos ou granulócitos (LAMPROU et al., 2007; BORGES et al., 2008).

Estudos sobre fagocitose indicaram que os carrapatos utilizam os hemócitos para remover organismos patogênicos da hemolinfa, semelhantes aos insetos. A fagocitose de corpos estranhos e microrganismos por hemócitos de carrapatos foi estudada *in vivo* e *in vitro* em várias espécies de carrapatos. Johns et al. (2000) mostraram que hemócitos de *Dermacentor variabilis* são capazes de fagocitar *Borrelia burgdorferi* da hemolinfa e combater a multiplicação bacteriana. A maioria dos trabalhos com carrapatos são realizados com os carrapatos Argasídeos, especialmente a espécie *O. moubata*. Loosova et al. (2001) demonstraram que carrapatos da espécie *O. moubata*, possuem um sistema de defesa eficiente em combater infecção na hemocele pelo fungo *Candida haemulonii*, através de fagocitose pelos hemócitos. Buresova et al. (2006) observaram a fagocitose da bactéria Gram-negativa *Chryseobacterium indologenes* pelos hemócitos de *O. moubata* e *I. ricinus*, porém, a taxa de fagocitose foi mais eficiente em *I. ricinus*. Apesar da resposta celular ativa contra estes microrganismos, a infecção por esses patógenos causou altas taxas de mortalidade nessas espécies de carrapato. Kuhn e Haug (1994), inocularam bactérias *Micrococcus lysideicticus* e partículas de látex em fêmeas ingurgitadas de *I. ricinus* e observaram fagocitose de látex por granulócitos e da bactéria por plasmatócitos e granulócitos.

Inoue et al. (2001) também trabalhando com *O. moubata*, porém inoculando partículas de látex fluorescentes na hemocele, encontraram plasmatócitos e granulócitos realizando fagocitose. Pereira et al. (2001) inocularam o fungo *Saccharomyces cerevisiae* em *Rhipicephalus (Boophilus) Microplus* e detectaram dois tipos de hemócitos, plasmatócitos e granulócitos, com índices de fagocitose não diferindo entre as células.

Estudos com RNAi de α 2-macroglobulinas de *I. ricinus*, demonstraram que este inibidor de protease está envolvido na fagocitose de bactérias *Chryseobacterium indologenes* por hemócitos. O silenciamento do gene IrAM por dsRNA de interferência, em estudos *in vitro* e *in vivo*, reduziu a fagocitose de *C. indologenes* por hemócitos, (BURESOVÁ et al.,

2009). Este trabalho demonstra que o processo de fagocitose de microorganismos por carrapatos está associado com mecanismos de defesa humoral.

O processo de fagocitose em diferentes tipos celulares envolve sinalização específica, contato com o patógeno, transdução de sinal, formação de pseudopodes e formação de fagossomo. O contato inicial ocorre a partir de troca de sinalização, que podem ser libertados diretamente a partir do agente patogênico ou gerado pela superfície da célula os receptores que medeiam o reconhecimento do patógeno (HAJDUŠEK et al., 2013).

As rotas de sinalizações que participam da fagocitose em hemócitos de invertebrados, ainda não estão esclarecidas, existe pouca informação sobre os mecanismos moleculares que ativam os hemócitos e a melanogênese em resposta a infecção microbiana em insetos. As mais importantes vias de transdução de sinal são a quinase de adesão focal (FAK / Src) e proteína quinase ativada por mitogênio (MAPK) que ativam a cascata profenoloxidase (PPO). As enzimas convertem a PPO na superfície de hemócitos à fenoloxidase ativa (PO), a qual catalisa as etapas iniciais do processo de formação de melanina (JIRAVANICHPAISAL et al., 2006; LAMPROU et al., 2007). Além disso, fatores externos à hemócitos, foram relatados aumentando o processo de fagocitose. Entre estes a ecdisona, que está associado a compensação fagocítica das células de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) em barbeiros (FIGUEIREDO et al., 2006). Outra molécula de sinalização importante é calreticulina (CRT), em estudo com hemócitos de borboleta *Pieris rapae*, foi verificado a super-regulação de CRT na superfície dos hemócitos e provavelmente estaria relacionada à fagocitose de células fúngicas (ASGARI; SCHMIDT, 2003). Esta proteína é encontrada em várias espécies de carrapatos e têm uma variedade de funções biológicas, que vai além do papel na imunidade inata (GAO et al., 2008). As partículas fagocitadas são internalizadas por endocitose em vesículas, que podem por sua vez, se fundirem com os lisossomos, formando um fagolisossomo. Uma vez no interior do fagolisossomo, uma cascata de enzimas intracelulares, especialmente ácido fosfatases e lisozimas, são ativadas, levando à morte rápida e digestão do patógeno ou partícula (SONENSHINE, HYNES, 2008). A literatura também relata a presença de espécies reativas de oxigênio (ROS) por hemócitos de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, na oxidação dos patógenos (PEREIRA et al., 2001).

2.4.3 Nodulação e encapsulamento

A nodulação parece ser uma resposta imunitária celular que é restrita para os invertebrados, em defesa contra corpos estranhos muito grandes para a fagocitose por hemócitos individuais. Nodulação refere-se a agregados multicelulares hemocitários, que aprisionam um grande número de bactérias, fungos ou outros microrganismos em um material extracelular. Finalmente, a nodulação é completada com a ativação da PPO e melanização dos patógenos para, em seguida, serem encapsulados (JIRAVANICHPAISAL et al., 2006).

Em insetos, a formação de nódulos é um importante processo, ainda mal compreendido mediado por três principais grupos de eicosanóides, prostaglandinas, produtos derivados de lipoxigenase, dentre outros (MILLER et al., 1994; FRANSSENS et al., 2005). Vários trabalhos com espécies diferentes de insetos demonstram a importância desses eicosanóides para a formação de nodulação. Stanley-Samuelson et al. (1991) em estudo com *Manduca sexta*, Stanley-Samuelson et al. (1997) com *Bombyx mori* e Miller et al. (1999) com inseto heterometabolo *Gryllus assimilis*, entre outros trabalhos. Uma nova proteína conhecida como nodular, foi altamente expressa na mariposa, *Antheraea Mylitta*, infectada com bactéria e mostrou-se está envolvida na nodulação, ligando-se aos microrganismos (GANDHE et al., 2007).

Em carrapatos, hemócitos reconhecem componentes nas superfícies de bactérias, tais como LPS, e respondem com o processo de nodulação. Este processo é similar ao dos insetos, inicialmente os hemócitos envolvem os microrganismos resultando no aprisionamento dos mesmos. Além disso, lectinas agem como moléculas opsonizantes realizando a agregação das bactérias como foi descrito por Kovar et al. (2000), que isolaram da hemolinfa do carrapato *Ornithodoros moubata* uma lectina denominada, Dorin-M, que possui atividade hemaglutinante. Outra lectina, denominada Ixoderin A, foi isolada do intestino do carrapato *Ixodes ricinus* (REGO et al., 2005). Ceraul et al. (2002) trabalhando com *Dermacentor variabilis*, inocularam *E. coli* na hemocele do carrapato e observaram formação de agregados celulares 1 h após a inoculação. Subsequentemente observaram a formação de agregados bacterianos e massa celular, evento característico de nodulação. O reconhecimento das lectinas ligadas aos microrganismos, leva ao recrutamento de hemócitos, que formam uma massa espessa em torno do agregado bacteriano e eventualmente pode levá-los a morte. Este

processo, denominado nodulação, é semelhante ao observado no encapsulamento melanótico em insetos, mas sem melanina (SONENSHINE, HYNES, 2008).

No processo de encapsulamento, inicialmente os granulócitos degranulam e depositam um material ao redor da partícula ou do microrganismo. Posteriormente, os plasmatócitos sofrem apoptose, tornam-se altamente achatadas e formam uma camada espessa encapsulando a partícula. Nodulação e encapsulamento são processos muito similares, diferem em particular, apenas pela presença de melanina. A melanização, os radicais livres de nitrogênio (RNI) e oxigênio (ROI), e peptídeos antibacterianos têm sido sugeridos como agentes que podem destruir o parasita dentro da cápsula (NAPPI et al., 1995; NAPPI et al., 2000; SONENSHINE, HYNES, 2008). Dois tipos de hemócitos em Lepidoptera são mais encontrados no processo de encapsulamento, plasmatócitos e granulócitos, e lamelócitos em *Drosophila* (SCHMIDT et al., 2001; VASS; NAPPI, 2001). Os mesmos tipos celulares descritos em insetos, envolvidos no processo de encapsulação, também foram descritos em carrapato no estudo de Eggenberger et al. (1990), que inseriram pedaços de Epon-Araldite, sob a cutícula do *Dermacentor variabilis*, e observaram sucessivas deposições de granulócitos tipo I e II e plasmatócitos, formando gradualmente uma cápsula celular ao redor do implante.

2.5 Resposta imune humoral

A resposta imune humoral dos carrapatos consiste de três subdivisões: Além de participação no encapsulamento, ocorre a hemaglutinação e síntese de um conjunto de fatores humorais, os quais consistem de peptídeos antimicrobianos, lectinas, proteases e inibidores de proteases (CHRUDESKÁ et al., 2009).

2.5.1 Atividade da Fenoloxidade

Em invertebrados, injúrias mecânicas ou presença de organismos estranhos, tais como parasitas e microrganismos resulta em deposição de melanina ao redor do tecido danificado ou em torno do objeto estranho que ocorre durante o processo de encapsulamento. A melanina se origina a partir de quinonas formadas através da enzima fenoloxidase (PO). Esta enzima é sintetizada pelos hemócitos em uma forma inativa, profenoloxidase (PPO) e é convertida em sua forma ativa por uma cascata de serina proteases (BALI; KAUR, 2013). O

sistema PPO-PO é bastante eficiente em invertebrados e podem reconhecer e responder a concentrações picomolares de lipopolissacarídeos (LPS), peptidoglicanos de bactérias e β -1,3-glucano de fungos. Os compostos intermediários gerados no processo de melanização como semiquinonas, espécies reativas de oxigênio e a própria melanina são tóxicos aos microrganismos (SONDERHALL; CERENIUS, 1998).

O principal papel do PO na melanogênese é converter fenóis quinonas, para que, posteriormente, se polimerizam para formar melanina (SONDERHALL; CERENIUS, 1998). A melanina é formada a partir do aminoácido fenilalanina, que é primeiro hidroxilado para fenilalanina hidroxilase por tirosina. A tirosina é então hidroxilada pela PO para produzir DOPA. A DOPA oxida-se então a dopaquinona a qual é imediatamente convertido a dopacromo por uma reação espontânea não enzimática. Um rearranjo não-enzimático estrutural de dopacromo, seguido pela descarboxilação produz 5-6 dihidroxi (DHI). O dihidroxi é oxidado pelo PO para formar 5-6 indolquinonas. Finalmente, são polimerizadas para eumelanina que produz uma cor castanho escuro ou enegrecido (NAPOLITANO et al., 2000; NAPPI; CHRISTENSEN, 2005). Por não existir um mecanismo de sinalização da PO na hemolinfa dos invertebrados, acredita-se que essa liberação seja realizada a partir da lise hemocitária (JIANG et al., 1997; KANOST; GORMAN, 2008). Uma vez na hemolinfa, a PO livre, tende a se ligar a superfícies estranhas, como microrganismos invasores, lesões teciduais, além das superfícies dos próprios hemócitos (LING; YU, 2005).

A atividade da enzima fenoloxidase é mais bem estudado em insetos, *Rhodnius prolixus* infectado com *Trypanosoma rangeli* (MELO et al. 1995), *Spodoptera litura* infectado com o fungo *Beauveria bassiana* (BALI, KAUR, 2013), *Bombyx mori* inoculados com LPS (VISHNUPRIYA; SOMASUNDARAM, 2012) e em crustáceos, *Pacifastacus leniusculus* (LIU et al., 2007), ostra *Crassostrea gigas* (HELLIO et al., 2007).

Pouco é conhecido sobre o sistema PPO-PO em aracnídeos. Zhioua et al. (1997), não detectaram atividade da fenoloxidase nos carrapatos *Amblyomma americanum*, *Dermacentor variabilis* e *Ixodes scapularis*, os autores sugerem que a não existência pode ser decorrência de fatores inibitórios. No entanto, Kadota et al. (2002) encontraram atividade da enzima PO no carrapato *Ornithodoros moubata*.

Em insetos, a única fonte de produção de PO são os hemócitos e não está restrita a apenas um tipo celular (ASHIDA; BREY, 1997). No *Bombyx mori* e outros Lepidópteros, os oenocitóides são os principais produtores de PO (LIU et al., 2012). Estudos indicam que

granulócitos e esferulócitos são capazes de produzir PO em *Manduca sexta* (LING; YU, 2005), e em *Culex pipiens quinquefasciatus*, plasmatócitos produtores de PO durante o estágio larval, além de prohemócitos, granulócitos e oenocitóides em outros estágios (WANG et al., 2011).

2.5.2 Peptídeos antimicrobianos

Peptídeos antimicrobianos (PAMs) são amplamente distribuídos das plantas aos animais. Apesar de compartilhar algumas características comuns, tais como tamanho pequeno (muitas vezes abaixo de 10 kDa) e um caráter catiônico, a maioria dos PAMs diferem na sua sequência de aminoácido e modo de ação (FOGACA et al., 2004). Até o momento, são escassos os estudos sobre PAMs de carrapatos, a maioria do conhecimento sobre PAMs em invertebrados estão focados em insetos. Os únicos PAMs descritos em carrapatos são defensinas e lisozimas (SONENSHINE; HYNES, 2008).

Uma das principais famílias de PAMs que têm sido caracterizadas são as defensinas (BERMUDEZ et al., 2004). Foram identificadas em diversos insetos, e mostraram atividade sobre bactérias Gram- negativas e fungos inoculados em *Anopheles gambiae* (VIZIOLI et al., 2001). Em *Musca domestica* mostrou atividade para bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*) e menor atividade para bactérias Gram-negativa (*Escherichia coli*) e fungo (*Fusisporium culmorum*) (DANG et al., 2010). Apesar de não está claro o mecanismo de atividade das defensinas e outros peptídeos antimicrobianos sobre protozoários, eles possuem propriedades anti-protozoários potentes. Em estudos anteriores, duas defensinas isoladas e purificadas a partir de outras espécies de insetos, *Aeschna cyanea* (odonata) e *Phormia terranova* (díptero) foram testadas para atividade contra o *Plasmodium gallinaceum*, tendo um efeito tóxico no desenvolvimento de oocistos, no intestino médio de *Aedes aegypti*, bem como em esporozoítos isolados (SHAHABUDDIN et al., 1998; HILLYER et al., 2007). Kulkarni, (2009) demonstraram que PAMs de diferentes subclasses podem destruir *Leishmania* spp., através do aumento da permeabilidade da membrana celular. Boulanger et al. (2004) avaliando o possível papel dos PAMs durante infecção parasitária *Phlebotomus–Leishmania*, encontraram duas defensinas com atividade antiparasitária contra as formas promastigotas de *L. major*, que residem normalmente no intestino de *Phlebotomus duboscqi*, observou-se que a defensina poderia ser induzida por infecções na hemolinfa e no

intestino do vetor. A síntese de defensina teve um pico nas primeiras 24 h após a infecção com bactéria e 4 dias quando infectado com *Leishmania*.

Telleria et al. (2013) em estudo para avaliar a expressão de defensina em *Lu. longipalpis* após infecção com as bactérias, *E. coli*, *Ochrobactrum sp.*, *S. marcescens*, *M. luteus*, *P. agglomerans* e com protozoário, *L. mexicana*, observaram que ocorreu aumento da expressão de defensina nos tempos de 48 e 72h, após a alimentação com algumas espécies de bactérias. Já em fêmeas de *Lu. longipalpis* após alimentação com *L. mexicana*, a expressão da defensina aumentou acentuadamente em 48 h após a alimentação e, em seguida, diminuiu lentamente até 144 h, quando comparado ao grupo controle.

Em carrapatos, pelo menos 20 diferentes defensinas já foram identificadas, sendo 11 encontradas em diferentes espécies de Ixodídeos e Argasídeos. Defensinas têm sido isoladas e caracterizadas como parte da resposta imune inata de várias espécies de carrapatos (SONENSHINE, HYNES, 2008; SAITO et al., 2009). Já foram descritas defensinas com função antibacteriana, com atividade para muitas bactérias gram-positivas (*Bacillus cereus* e *Enterococcus faecalis*), mas alguns isoformas também revelaram a atividade contra bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli*), fungos do tipo leveduras (*Pichia pastoris*) e protozoários (NAKAJIMA et al., 2002; TSUJI et al., 2007). Por exemplo, longicin, uma defensina isolada do carrapato *Haemaphysalis longicornis*, demonstrou capacidade para inibir a proliferação de merozoítos em eritrócitos infectados com *Babesia equi*, matando parasitas e, em experimentos *in vivo*, esta defensina induziu a redução da parasitemia em animais infectados com *Babesia microti* (TSUJI et al., 2007). Longicin foi encontrada sendo expressa no intestino de *H. longicornis*, e foi relatada sendo ativa contra uma variedade de micróbios, incluindo bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, fungos e várias espécies de babesias. (TSUJI et al., 2007). A defensina catiônica varisin foi identificada em hemócitos de carrapato duro, *Dermacentor variabilis* (JOHNS et al., 2001). Defensinas também foram descritas na hemolinfa de *D. variabilis*, 15 min permanecendo até 18 h após a inoculação com a bactéria *Borrelia burgdorferi* (CERAUL et al., 2003). Outras moléculas foram identificadas em *Ixodes persulcatus* (SAITO et al., 2009), em *Ixodes ricinus* após desafio microbiano (CHUDIMSKÁ et al., 2011), em *Ornithodoros moubata* após desafio com as bactérias *E. coli* e *S. aureus* e observou-se a expressão aumentada de duas isoformas de defensinas uma hora após a inoculação das bactérias (NAKAJIMA et al., 2002). Ainda foram identificadas duas isoformas não catiônicas em *Amblyomma hebraeum* (LAI et al., 2004), Isoformas A, B,

e C em *Amblyomma americanum* (TODD et al., 2007) e em *Ixodes scapularis* (HYNES et al., 2005). Em *Dermacentor variabilis* foram identificadas várias defensinas de baixo peso molecular no intestino após o desafio com bactérias através de alimentação artificial por capilar (SONENSHINE et al., 2002).

Quatro diferentes mRNAs de defensinas em *Ornithodoros moubata* são induzidas por alimentação sanguínea e por inoculação com agulha. Estes peptídeos foram relacionados a lise de bactérias Gram-positivas, mas não em bactérias Gram-negativas (NAKAJIMA et al., 2002). Apesar de alguns estudos que identificaram peptídeos antimicrobianos em algumas espécies de carrapatos pouco é conhecido sobre o papel desses peptídeos antimicrobianos na resposta imune inata.

As lisozimas são enzimas bacteriolíticas expressas por uma ampla variedade de espécies animais. Foram inicialmente descritas em insetos e possuem atividade antibacteriana em várias espécies de carrapatos, além de possuir atividade junto a outros peptídeos antimicrobianos para destruir patógenos invasores. Estas são capazes de lisar as bactérias a partir da clivagem das pontes 1,4 ligações glicosídicas entre o ácido N-acetilmurâmico e resíduos de N-acetilglucosamina na cadeia de peptideoglicanos presentes na parede de celular das bactérias (SIMSER et al., 2004; CHRUDIMSKÁ et al., 2011). Kopáček et al. (1999), purificaram lisozima de *Ornithodoros moubata* e observaram que ela possui atividade contra *Micrococcus luteus*. O carrapato mole, *Ornithodoros moubata*, super-expressam lisozimas durante a digestão sanguínea (GRUNCLOVÁ et al., 2003). Também foi observada alta expressão de lisozimas em *Dermacentor variabilis* quando inoculado com *Borrelia burgdorferi* (JOHNS et al., 2000). Alta expressão de lisozimas tipo-c foi observada em hemócitos de *Dermacentor variabilis* inoculado com *E.coli* e células de linhagem embrionárias de *D. andersoni* (SIMSER et al., 2004)

2.5.3 Inibidores de Proteases

Inibidores de proteases são moléculas capazes de inibir a atividade de diversas classes de proteases. Em carrapatos existem dois tipos principais de inibidores de proteases: inibidor de serina proteases, serpin e inibidor de cisteína, cistatinas. Podem desempenhar um papel importante na imunidade dos carrapatos através da inibição de proteinases específicas produzidas por microorganismos. Um grupo importante de proteínas antimicrobianas são os

inibidores de proteases de cisteína (cistatinas). Cisteína proteases secretadas por bactérias infecciosas ou protozoárias patogênicos servem como importantes fatores de virulência. Cistatinas inibem a atividade destas enzimas, minimizando, assim, a capacidade dos patógenos de colonizar o trato digestivo do carrapato e outros tecidos (TAYLOR et al., 2006; SONENSHINE, HYNES, 2008). Alguns relatos de cistatinas já foram descritos por alguns autores, como por exemplo, no intestino de *Haemaphysalis longicornis*, onde o nível de expressão de um inibidor de cistatinas (Hlcyst-2) aumentou em resposta à alimentação sanguínea, à injeção de LPS e à infecção experimental com *Babesia gibsoni* (ZHOU et al., 2006). Duas cistatinas (Om-cystatin 1 and 2) foram isoladas do intestino de *Ornithodoros moubata* (GRUNCLOVA et al., 2006). Uma cistatina, denominada Bmcistatin, foi isolada de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (LIMA et al., 2006).

2.5.4 Lectinas

As lectinas são proteínas ou glicoproteínas que possuem uma interação específica reversível com uma porção hidrato de carbono específico, podendo possuir um ou mais sítios de ligações e dessa são capazes de ligar e agregar microorganismos. Interações proteína-carboidrato é um fenômeno básico para o reconhecimento em todos os organismos, e lectinas representam o principal grupo de família de proteínas que participam dessa interação (GRUBHOFFER et al., 2004). As lectinas são encontradas em uma grande variedade de organismos, incluindo fungos, bactérias, vírus, plantas e animais (SHARON, 2008).

As lectinas que exibem especificidade para o ácido siálico com afinidade de ligação para N-acetilamino-D-hexosaminas e D-galactose, estão presentes nos fluídos corporais de artrópodes, incluindo carrapatos. Estas lectinas estão envolvidas na defesa contra microorganismos que expressam ácido siálico ou seus análogos na sua superfície (TUNKIJJANUKIJ et al., 1998; KOPACEK et al., 2000). Segundo Kopáček et al. (2000), os primeiros trabalhos com lectinas de carrapatos foram realizados em hemolinfa de *Ornithodoros tartakovskyi*, *O. papilipes* e *Argas polonicus* (GRUBHOFFER; MATHA, 1991; GRUBHOFFER et al., 1991; VEREŠ; GRUBHOFFER, 1991). Apesar da maioria dos trabalhos em artrópodes serem com insetos, existem trabalhos que caracterizam algumas lectinas em carrapatos duros e moles, elucidando a sua importância para o sistema imune inato dos mesmos. Foram descritas lectinas no intestino e glândula salivar de *Rhipicephalus*

appendiculatus (KAMWENDO et al., 1993). Kuhn et al. (1996), caracterizaram lectina na hemolinfa de *Ixodes ricinus* e utilizaram anticorpos específicos para marcar esta lectina nos tecidos do carrapato. Foi identificado lectina nos granulócitos tipo I e II, e células do epitélio intestinal de *I. ricinus*. Posteriormente, Grubhoffer e Kovar (1998) e Kovar et al. (2000) identificaram uma lectina no plasma de *O. moubata*, denominada, Dorin M, que mostrava alta atividade de hemaglutinação. Após este estudo em carrapatos moles, Rego et al. (2005), estudando o carrapato duro, *Ixodes ricinus*, clonaram duas proteínas relacionadas de fibrinogênio, Ixoderin A e Ixoderin B, que mostraram alta homologia com a lectina, Dorin M descrita em *O. moubata*. Várias proteínas relacionadas de fibrinogênio, detectadas na hemolinfa de Ixodideos, *Dermacentor marginatus*, *Rhipicephalus appendiculatus*, *R. pulchellus*, e *R. sanguineus* foram reconhecidas por anticorpos dirigidos a lectinas de *O. moubata*, Dorin M e a atividade de hemaglutinação dos carrapatos *R. appendiculatus* e *D. marginatus* (STERBA et al., 2011). Apesar dos estudos sobre lectinas de carrapatos ainda serem escassos, temos evidências da existência dessas moléculas participando ativamente no sistema imune inato desses invertebrados.

2.5.5 Homeostase redox nos carrapatos

Por outro lado, muito pouco se sabe sobre a manutenção de homeostase redox no intestino médio dos carrapatos, com exceção de um relato mostrando o papel da catalase na regulação do estresse oxidativo em carrapato *Rhipicephalus microplus* (CITELLI et al., 2006). No entanto, dados da genômica e transcriptômica de outras espécies de carrapatos sugerem que os carrapatos mantêm a homeostase redox no seu intestino médio através de enzimas antioxidantes como catalases, glutathione peroxidase e tioredoxina, glutathione S-transferases e selenoproteínas, que eliminam os radicais livres (ANDERSON et al, 2008; MEGY et al., 2012).

A glutathione-S-transferase (GST) foram encontradas e caracterizadas a partir de uma variedade de organismos, incluindo plantas, invertebrados, mamíferos e até mesmo organismos procariontes. As GSTs são conhecidas por desempenhar um papel importante nas respostas celulares ao estresse oxidativo e a desintoxicação de compostos xenobióticos e metabólitos endógenos em células eucariontes e procariontes (HAYES et al., 2005; QIN et al., 2013). Em insetos foi evidenciado que a GST realiza uma ampla gama de funções nas células,

tais como a remoção de espécies reativas de oxigênio, regeneração de proteínas tiolada-S (ambas consequências do estresse oxidativo), catálise de conjugações com ligantes endógenos, e catálise de reações de vias metabólicas não associados com a desintoxicação (QIN et al., 2013).

A maioria dos estudos sobre o papel da GST em invertebrados foram realizados em insetos, porém alguns estudos têm caracterizado GST em carrapatos, como *Boophilus microplus* (HE et al., 1999; ROSA DE LIMA et al., 2002), *Haemaphysalis longicornis* e um em *Rhipicephalus appendiculatus* (DA SILVA, et al., 2004). Além da caracterização molecular alguns estudos têm avaliado a expressão diferencial de GST frente à infecção com alguns patógenos. Rudenko et al. (2005) realizaram estudo para avaliar a expressão diferencial de genes de *Ixodes ricinus* e *Dermacentor variabilis* induzidos pela infecção com *Borrelia burgdorferi*, e observaram um aumento da expressão gênica de algumas moléculas relacionadas ao sistema imune do carrapato, como tioredoxinas peroxidases, glutathione-S-transferase e defensina. Apesar do *D. variabilis* não ser o vetor para *B. burgdorferi*, o mesmo responde a infecção com alteração de algumas moléculas relacionadas ao sistema imune.

Também foi relatado aumento da expressão gênica de moléculas relacionadas ao combate do estresse oxidativo, entre elas a GST, em ovários de *Dermacentor variabilis* infectados com *Rickettsia* (MULENGA et al., 2003). Em estudo de Dreher-Lesnick et al. (2006) foram identificadas e parcialmente caracterizadas duas GSTs de *Dermacentor variabilis*. Observou-se que ambas as GSTs são super-expressas em tecidos do intestino em resposta à alimentação sanguínea, e são parcialmente suprimidas após infecção com *Escherichia coli*.

Também trabalhando com *D. variabilis*, de La Fuente et al. (2007) avaliaram o papel da bactéria *Anaplasma marginale* na expressão diferencial de alguns genes, como a GST, do *D. variabilis*, em resposta a infecção, e descreveram uma elevada expressão desse gene durante a infecção. Já Kocan et al. (2009) realizaram silenciamento desses genes, para avaliar o impacto sobre o desenvolvimento do *A. marginale* em diferentes tecidos do carrapato e dessa forma avaliar o impacto nos níveis de infecção após o silenciamento. Foi observado que após o silenciamento do gene GST, ocorreu inibição da infecção no intestino e nas glândulas salivares do *D. variabilis*.

2.5.6 Óxido nítrico

O óxido nítrico (ON) é radical de nitrogênio instável, conhecido como molécula mensageira, que desempenha um papel chave em muitos processos fisiológicos e patológicos nos seres vivos. O ON é sintetizado pela enzima óxido nítrico sintase (NOS), que está presente em todos os organismos eucariotos, pela conversão de arginina, oxigênio molecular e NADPH como substrato, para citrulina (COLASANTI et al., 1995; NAPPI, OTTAVIANI, 2000; GONZÁLEZ-DOMENECH; MUÑOZ-CHÁPULI, 2010).

Em invertebrados, o ON está relacionado a mecanismos de sinalização como molécula citotóxica, derivada da fagocitose, ou seja, produção de óxido nítrico pelas células fagocíticas (FARALDO et al. 2005). Já foram descritas em invertebrados, três isoformas de NOS; duas são constitutivas, endotelial (eNOS), neuronal (nNOS) e um induzível (iNOS) (GONZÁLEZ-DOMENECH, MUÑOZ-CHÁPULI, 2010, CHEN et al., 2015). O gene para NOS foi clonado em algumas espécies de insetos, *Drosophila melanogaster*, *Anopheles stephensi*, *Anopheles gambiae* e *Rhodnius prolixus* (REGULSKI; TULLY, 1995; YUDA et al., 1996; LUCKHART et al., 1998; LUCKHART et al., 1999; IMAMURA et al., 2002). Ribeiro e Nussenzveig, (1993) encontraram a atividade da NOS na glândula salivar de *Rhodnius*. A enzima é inibida por análogo de arginina e dependente de Ca^{2+} calmodulina, NADPH e FAD. Baseado nestes resultados, os autores deduziram existir similaridade com a NOS de vertebrados. Chen et al. (2015), e descreveram atividade de NOS para produção de óxido nítrico, em *Litopenaeus vannamei*, quando inoculado com bactéria *Vibrio harveyi*.

Em estudo realizado com o carrapato *Dermacentor variabilis*, encontrou-se atividade da enzima NOS no epitélio, ao redor dos ductos das glândulas salivares (BHATTACHARYA et al., 2000). González-domenech; Muñoz-chápuli, (2010), também descreveram, *in silico*, a presença de NOS em ovos embrionados de *Ixodes scapularis*.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a resposta imune inata celular e humoral, através da caracterização e dinâmica dos hemócitos, fagocitose, dosagem da fenoloxidase, óxido nítrico e expressão de defensina e glutatona-S-transferase em fêmeas de *Rh. sanguineus* infectado com *L. infantum*.

3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar a morfologia e ultraestrutura dos diferentes tipos de hemócitos em fêmeas de *Rh. sanguineus*;
- Avaliar a presença de *L. infantum* em *Rh. sanguineus* no 1º, 2º, 5º e 7º dia após a infecção;
- Avaliar a dinâmica hemocitária de *Rh. sanguineus* infectados com *L. infantum*, no 1º, 2º e 5º dia após a infecção;
- Identificar os tipos celulares que realizam atividade fagocítica em *Rh. sanguineus* inoculados com partículas de látex e com *L. infantum*;
- Avaliar a atividade da fenoloxidase em *Rh. sanguineus* no 1º, 2º e 5º dia após a infecção com *L. infantum*;
- Avaliar a concentração de óxido nítrico em *Rh. sanguineus* no 1º, 2º e 5º dia após a infecção com *L. infantum*;
- Avaliar a expressão do gene defensina e glutatona-S-transferase em *Rh. sanguineus* no 1º, 2º, 5º e 7º dia após infecção com *L. infantum*;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Estabelecimento e manutenção da colônia de *Rh. sanguineus*

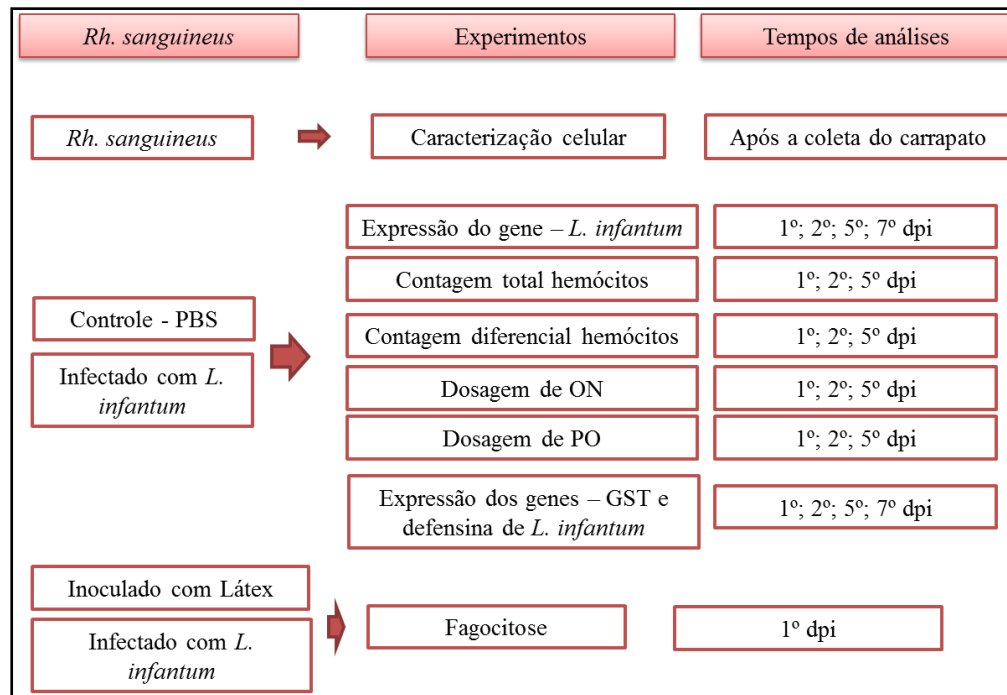
A colônia foi estabelecida a partir de fêmeas de *Rh. sanguineus* ingurgitadas foram coletadas de cães saudáveis, originados do Centro de Controle de Zoonoses/Mossoró/RN (CCZ-RN). Uma média de duas fêmeas foi colocada para ovipositar em tubos plásticos de 15 mL fechados com tela, para que ocorra a oxigenação. Foram acondicionados à temperatura de $25 \pm 3^\circ\text{C}$ e $85 \pm 10\%$ de umidade relativa (UR). O período de oviposição durou em média de 16 a 18 dias, após este tempo as fêmeas foram retiradas e desprezadas e os ovos foram acondicionados por um período que varia de 18 a 25 dias, para a eclosão das larvas. Após a eclosão, as larvas, foram alimentadas em Coelho, *Oryctolagus cuniculus* da linhagem Nova Zelândia, por um período médio de 3 a 7 dias, em seguida, foram novamente acondicionados nas mesmas condições de temperatura e umidade citadas anteriormente por um período médio que varia de 15 a 20 dias, necessário para a ecdise e transformarem-se em ninfas. As ninfas foram novamente alimentadas em Coelho, *O. cuniculus*, de 3 a 10 dias e realizaram a última muda para a fase adulta, em um período médio de 15 a 35 dias. Os adultos alimentaram-se no hospedeiro por um período médio de 5 a 21 dias. O ciclo de vida do *Rh. sanguineus* pode ser completado em um período médio de 63 a 91 dias. (BECHARA et al., 1995; DANTAS-TORRES, 2008; SILVEIRA et al., 2009). A colônia de *Rh. sanguineus* foi mantida no Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami - LIKA / UFPE.

A alimentação dos estágios do ciclo de vida do carrapato, foram realizadas dentro de câmaras de alimentação fixadas com uma cola atóxica (Britannia Adhesives® P4 104 Latex, UK) ao dorso do animal previamente tricotomizado, de acordo com metodologia de Paz et al., (2010). As câmaras foram elaboradas de cilindros plásticos com 2,5 cm de largura por 3,0 cm de profundidade, foram colados em uma peça de borracha fina de 1-2 mm de espessura, cortada em formato de disco (com diâmetro de 7,0 cm), contendo uma janela central de diâmetro equivalente ao do cilindro utilizado. Sob o disco de borracha colou-se um tecido de algodão de dimensões e formatos iguais ao do disco, tornando a superfície do disco adequada para serem colados na pele tricotomizada dos animais. A câmara de alimentação, uma vez fixada, ficou fechada com uma tampa de encaixe perfurada, para que haja ventilação no seu interior.

4.2 Esquema experimental

Todos os experimentos realizados no estudo foram com fêmeas adultas ingurgitadas de *Rh. sanguineus* e estão esquematizados na figura 2.

Figura 2 – Esquema dos experimentos realizados no estudo.



4.3 Coleta de hemolinfa

A hemolinfa foi coletada em três momentos, logo após a coleta dos carrapatos do coelho, para a realização da caracterização celular, após a inoculação com *L. infantum* nos períodos 1º, 2º e 5º dia para avaliação da dinâmica hemocitária e nos experimentos de fagocitose no 1º dia após inoculação com *L. infantum* e látex. A hemolinfa foi coletada por meio de corte nas patas dianteiras na articulação do trocanter coxal, usando tubos capilares de vidro siliconizado, em anticoagulante de citrato de sódio (0,14 M de NaCl, 0,1 de glucose, citrato de sódio 30 mM, EDTA a 10 mM, pH 4,6, para evitar a coagulação e degranulação dos hemócitos e não alterar a sua morfologia (INOUE et al., 2001). O mesmo material coletado dos grupos controle e infectado foi utilizado para realização dos experimentos descritos neste estudo.

4.4 Inoculação em carrapatos

Promastigotas de *Leishmania infantum*, cepa MHOM/BR/70/BH46, foram crescidas a 25 °C em Meio Schneider (Sigma Aldrich, EUA). As promastigotas foram lavada três vezes e ressuspensas em PBS à 2×10^8 células/mL, 2 µL da suspensão foi inoculado nos carrapatos utilizando uma seringa Hamilton 100 mL (Hamilton, Reno, NV) com uma agulha hipodérmica de 31 *gauge*. Após a inoculação de *Leishmania*, os carrapatos foram mantidos a 25 °C e 60 % UR no escuro. Também foi inoculado em outro grupo de carrapatos, 2 µL de esferas de látex de poliestireno modificado por carboxilato, de 0,3 µm de diâmetro (solução aquosa a 10 %) (Sigma Aldrich, EUA), foram diluídas a 1:10 em solução salina tamponada com fosfato estéril (PBS, pH 7,2). Um dia após a infecção, a hemolinfa foi coletada conforme descrito anteriormente e fixada em 2,5 % de glutaraldeído em tampão de cacodilato (pH 7.2) e 4% de paraformaldeído. O processamento para microscopia eletrônica de transmissão (MET) ocorreu 24h após a fixação de acordo com a metodologia de Brayner et al. (2005). Foram inoculados 50 carrapatos para cada grupo. O grupo controle foi inoculado com 2 µL de PBS à 1X.

Os carrapatos inoculados com *L. infantum* também foram utilizados para avaliação da dinâmica hemocitária, dosagem de fenoloxidase e óxido nítrico, no 1º, 2º e 5º dia após a infecção e avaliação da expressão dos genes, 18S rRNA para leishmania, GST e defensina, no 1º, 2º, 5º e 7º dia após a infecção.

4.5 Microscopia de Luz

Para microscopia óptica a hemolinfa foi coletada de carrapatos inoculados com *L. infantum* para avaliação da dinâmica hemocitária, no 1º, 2º e 5º dia após a infecção e diretamente colocada sobre lâmina de vidro, onde foram deixadas para secar a temperatura ambiente por 20-30 min. As células foram fixadas com metanol por 10 min. Após a fixação, as lâminas secas, foram coradas com Giemsa (diluído 1:9 em água destilada tamponada) (Sigma-Aldrich, EUA) por 10-15 min, em seguida as lâminas foram rapidamente lavadas em água destilada tamponada (BRAYNER et al., 2005). Em seguida foi realizada contagem diferencial dos hemócitos a partir dos esfregaços de cada grupo experimental, utilizou-se a hemolinfa de um carrapato para a elaboração de uma lâmina, onde três lâminas foram

analisadas por experimento e quatro experimentos foram realizados. Para realização da percentagem relativa de cada tipo celular, realizou-se uma contagem de 200 células, a caracterização dos tipos celulares foi acordo com parâmetros morfológicos anteriormente descrito por Brayner et al. (2005). Para a contagem total dos hemócitos, a hemolinfa total de cada carrapato, foi colocada em câmara de Neubauer. Os resultados dos experimentos foram representados por média $\pm$ desvio padrão.

4.6 Microscopia de Contraste de Interferência Diferencial (DIC)

Para a caracterização dos hemócitos *Rh. sanguineus*, foi observado a viabilidade dos hemócitos vivos, uma amostra de hemolinfa (5 μ L) de fêmea ingurgitada, no momento que foi coleta do coelho, foi coletada e diluída em meio GRACE, 1:500 (Sigma-Aldrich, EUA). A amostra foi colocada em placa de cultura (MatTEK) e incubada por 30 min a temperatura ambiente (SOARES et al., 2013). Após este tempo, os hemócitos foram examinados usando microscopia de contraste de interferência diferencial (Leica SP2 confocal microscope).

4.7 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A hemolinfa foi coletada como descrito no tópico 4.2., e em seguida centrifugada a 800 $\times$ g por 10 min a 4 °C. O pellet foi lavado com tampão citrato de sódio, pH 4,6. As células foram ressuspensas em fixador glutaraldeído a 4% (Sigma-Aldrich, EUA) em tampão cacodilato 0,1 (Sigma-Aldrich, EUA), pH 7,2, *overnight* (BRAYNER et al., 2005). As amostras foram lavadas em solução de sucrose em 0,2 M tampão cacodilato pH 7,2 e pós-fixadas com tetróxido de ósmio a 1% (Sigma-Aldrich, EUA) em tampão cacodilato. Depois realizou-se a desidratação, com soluções de acetona a 30%, 50%, 70%, 90% e três séries de 100%. As amostras foram embebidas em EMBED 812/Araldite (Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA). Os cortes ultrafinos foram contrastados com acetato de uranila (Sigma®), e identificados por microscópio eletrônico de transmissão TecNai G2 Spirit TEM (FEI).

4.8 Atividade da fenoloxidase na hemolinfa e identificação de hemócitos positivos para profenoloxidase

Alíquotas de 2 µL de hemolinfa foi coletada de cada carrapato, desafiados com *L. infantum* e grupo controle inoculadas com PBS 1X, no 1º, 2º e 5º após inoculação, a hemolinfa foi incubada durante 10 min com 28 µL de tampão de cacodilato 0,01M contendo CaCl_2 a 0,0005 M, pH 7,0, em placas de fundo plano de 96 poços (JET biofilm, Guangzhou, China). Dez microlitros de solução saturada de L-DOPA (Sigma-Aldrich, EUA) a 4 mg/mL, foi adicionado a mistura por 20 min, a temperatura ambiente e em seguida a absorbância foi medida em um leitor de placas de ELISA (Power Wave, BioTek) a 490 nm, de acordo com protocolo de Melo et al. (1995). Cinco experimentos foram realizados e as amostras formalidas em triplicata.

Para a identificação de hemócitos positivos para profenoloxidase resumidamente, 10 µL de hemolinfa, coletado de fêmea ingurgitada de *Rh. sanguineus*, no momento da coleta da mesma do coelho, foram adicionadas a 50 µL de meio de cultura Grace (Sigma - Aldrich, EUA) lamínula de vidro dentro de uma placa de cultura de 12 poços. A placa foi colocada em câmara úmida e incubada por 15 min para que os hemócitos pudessem aderir na lâmina. Em seguida foram realizadas três lavagens, cada uma durante 5 minutos, com solução de PBS (fosfato de sódio 25 mM, 137 mM de NaCl e KCl 3 mM, pH 6,8). Posteriormente foi adicionado solução de L - DOPA à 1 mg/mL em 35 % etanol e os hemócitos foram incubadas durante 30 min. Para os controles, foi adicionado 35% de álcool, na ausência do substrato e o mesmo procedimento citado anteriormente foi repetido. Os hemócitos foram observados por microscopia Óptica (Nikon Eclipse TE2000 - L), sob o aumento de 40X.

4.9 Produção de Oxido Nítrico (ON)

Foi avaliada a produção de ON na hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Rh. sanguineus* nos dias 1, 2 e 5 após inoculação de *L. infantum* e comparada ao grupo controle inoculado com PBS 1X. Cada grupo foi composto por 5 carrapatos, e o experimento foi repetido 5 vezes. Foi coletado 10 µL de hemolinfa de cada carrapato e a quantificação foi realizada utilizando o reagente de Griess (Promega, EUA). Para as análises, 50 µL de hemolinfa de cada grupo experimental, foram colocadas em placa de 96 poços (JET biofilme,

Guangzhou, China), todas as amostras foram realizadas em triplicata. Uma alíquota de 100 µL de 1% de sulfanilamida em ácido fosfórico a 2,5 % foi adicionada a cada poço, seguido de 100 µL de 0,1 % de N- naftil-etileno-diamina. A absorção a 540 nm foi medida em um leitor de placa de ELISA (Power Wave, BioTek). A concentração molar de nitrito na amostra foi determinada a partir de curva padrão com concentrações conhecidas de nitrito de sódio (TAFALLA et al., 2002; FARALDO et al., 2005).

4.10 Extração de RNA total e síntese de cDNA

O RNA total das amostras foi extraído utilizando isotiocianato de guanidina (4M) segundo metodologia de Chomczynski, (1993). Inicialmente o *pool* de três carrapatos foi colocado em 300 µL de Isotiocianato de guanidina (Sigma-Aldrich, EUA) e macerado, acrescido de 200 µL de fenol ácido (pH 5,0), 100 µL de clorofórmio (Sigma-Aldrich, EUA) e 50 µL de acetato de sódio (2M). O material foi agitado por inversão e em seguida centrifugado a 4°C a 10.000 rpm por 20 min. A porção superior do sobrenadante foi retirada e colocada em outro tubo, então acrescido igual volume com isopropanol (Sigma-Aldrich, EUA) e novamente o material foi agitado por inversão. Em seguida as amostras foram armazenadas a -20°C por 12 h e em seguida centrifugadas a 12.000 rpm por 20 min. O sobrenadante foi descartado e deixado para evaporar o restante do isopropanol, deixando o tubo invertido por 15 min. O *pellet* foi reidratado com 20 µL de água ultrapura tratada com DEPC e armazenados a - 80 °C até a construção do cDNA. A concentração do RNA foi quantificada em Nanodrop (Thermo Scientific, Estados Unidos) e a qualidade do RNA também foi avaliada. Após o controle quantitativo e qualitativo, o RNA foi utilizado para a elaboração do cDNA a partir de 1 µg do RNA total, utilizando oligo (dT) (Promega, EUA) e a enzima transcriptase reversa M-MLV RT (Promega, EUA), a reação foi preparada para um volume final de 20 µL de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante.

4.11 PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

A análise quantitativa da expressão do mRNA dos genes 18S ribossomal da *Leishmania*, para identificação da presença e avaliar em qual dos períodos após a inoculação com promastigotas de *L. infantum* ocorre uma maior expressão dos genes da *Leishmania*. Para

a normalização da reação foi utilizado o gene 18S ribossomal do *Rh. sanguineus* desenhado a partir de sequência de mRNA depositada no NCBI sob o número de acesso L76342.1. Os genes relacionados ao sistema imune do *Rh. sanguineus*, defensina e Glutathione S-transferase (GST), também foram desenhados a partir das sequências gênicas depositadas sob os números de acesso, EZ406198.1 e KC514943.1 respectivamente. O gene 18S ribossomal do *Rh. sanguineus* também foi utilizado para normalizar a reação. As sequências de oligonucleotídeos específicas para cada gene estão descritos na tabela 1.

As quantificações foram realizadas através da utilização do Real Time PCR, utilizando corante fluorescente SYBR Green I. A reação de qPCR foi realizada no termociclador ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems, EUA). As reações foram realizadas em triplicata, para evitar problemas de reprodutibilidade dos dados. Utilizou-se o Master Mix Sybr Green I (Applied Biosystems, EUA). As reações foram realizadas em volume de 15 µL, sendo, 1 µL de cDNA, 7,5 µL de Sybr Green I 1X, primers específicos à 0,3 µM e 6 µL de água ultra pura. As condições ciclagem incluíram uma desnaturação inicial e ativação da enzima hot-start DNA polimerase a 95 °C durante 10 min, seguidos de 40 ciclos de desnaturação a 95 °C durante 20 seg e o anelamento e extensão a 60 °C por 1 min. Após a amplificação, a curva de dissociação foi obtida e posteriormente utilizada para análise da especificidade dos primers a partir da comparação das temperaturas de dissociação ou *melting* (T_m) dos amplicons formados.

A expressão relativa dos níveis de transcrição do gene para *L. infantum* no tempo 0 e nos dias 1, 2, 5 e 7 após a inoculação e dos genes relacionados com resposta imune humoral, defensina e GST entre os grupos infectados e controle foram medidos utilizando o método do Ct comparativa, método ($2^{-\Delta\Delta C_t}$), utilizando um gene de referência para a normalização de resultados, neste estudo utilizamos 18S ribossomal do *Rh. sanguineus* e uma amostra de calibrador, um tempo de análise de um gene, neste caso o tempo 0 após a infecção, onde os níveis de expressão foram utilizados como pontos de referência para as comparações entre os diferentes tempos de análises nas amostras. A interpretação dos nossos dados foi realizada utilizando uma unidade arbitrária conhecida como unidade de quantificação relativa (QR unidade) a qual é calculada pela equação aritmética $2^{-\Delta\Delta C_t}$ e representada pela expressão dos genes, 18S *Leishmania*, GST e defensina normalizados pelo 18S ribossomal do *Rh. sanguineus* e relativamente normalizados pela expressão desses genes no tempo 0, após a

infecção com a *L. infantum*, que serviu como calibrador para este estudo. Segue abaixo esquema de análise de acordo com metodologia de Florou et al. (2013).

- **Quantificação relativa do gene Defensina**

I) ΔCt das amostras = Ct (defensina) - Ct (18S *Rh. sanguineus*)

II) ΔCt do calibrador = Ct (defensina) - Ct (18S *Rh. sanguineus*)

$\Delta\Delta Ct = I - II$

QR da defensina = $2^{-\Delta\Delta Ct}$

- **Quantificação relativa do gene Glutathione S-transferase**

I) dCT das amostras = Ct (Glutathione S-transferase) - Ct (18S *Rh. sanguineus*)

II) dCT do calibrador = Ct (Glutathione S-transferase) - Ct (18S *Rh. sanguineus*)

ddCt = I – II

QR da Glutathione S-transferase = 2^{-ddCt}

- **Quantificação relativa do gene 18S Ribossomal da *Leishmania* spp.**

I) dCT das amostras = Ct (18S *Leishmania* spp.) - Ct (18S *Rh. sanguineus*)

II) dCT do calibrador = Ct (18S *Leishmania* spp.) - Ct (18S *Rh. sanguineus*)

ddCt = I – II

QR da 18S *Leishmania* spp. = 2^{-ddCt}

Tabela 1 – Oligonucleotídeos utilizados para amplificar genes de *Leishmania infantum* e *Rhipicephalus sanguineus* em qPCR.

Genes Alvos	Sequencia primer (5' – 3')	Autor	Tamanho do Amplicon (pb)
18S ribossomal <i>Leishmania</i> spp.	TACTGGGGCGTCAGAG GGGTGTCATCGTTTGC	Prina et al. (2007); Bezerra- Vasconcelos et al. (2011)	153
Defensina <i>Rh. sanguineus</i>	ACCGCTTCTCTCAACGAAA GCCCGACGCCTAATACTG	Autor	122
Glutathione S- Transferase <i>Rh. sanguineus</i>	GGCTCAACGAGAAGACCAAG ATACGGAAGTCGGCAAACCTG	Autor	190
18S ribossomal <i>Rh. sanguineus</i>	TACATGCAGTGAGCCTGGAG CGAACCCTGATTCTCCGTTA	Autor	219

4.12 Análises estatísticas

Para as análises de expressão gênica, concentração de ON e atividade de PO foi realizado o teste two way ANOVA com correção bonferroni, utilizando o *software* Graph-Pad Prism (San Diego, CA, USA). Os resultados foram expressos através de média $\pm$ desvio padrão e foi considerado significativo quando apresentava o ($P < 0.05$). Para as análises de contagens de hemócitos, representadas por média $\pm$ desvio padrão. Os dados foram analisados por Kruskal-Wallis e Mann - Whitney não paramétrico usando o *software* Graph-Pad Prism (San Diego, CA, EUA) ($P < 0.05$ e $P < 0.001$).

4.13 Considerações éticas

O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética para uso de Animais (CEUA) do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães – FIOCRUZ/Pernambuco sob o número de protocolo 30/2011 (Anexo A).

5. RESULTADOS

5.1 Caracterização morfológica e ultraestrutural de hemócitos de *Rhipicephalus sanguineus*

Dentro da variabilidade de células circulantes na hemolinfa de adultos de *Rh. sanguineus* foram identificados, cinco tipos celulares bem característicos morfolologicamente. Eles são prohemócitos, plasmatócitos, granulócitos, esferulócitos e adipohemócitos.

- Prohemócitos

Células com formato oval ou esférico de aproximadamente 8µm de diâmetro. Possui um grande núcleo, localizado centralmente e ocupando grande parte do citoplasma da célula (Figs. 3A-B, 4A-B e 5A). O núcleo apresenta ilhas de cromatina eletrondensa distribuídas na periferia da membrana nuclear (Fig. 4A-B). No citoplasma poucas organelas podem ser visualizadas mitocôndria, além de vesícula (Fig. 4B).

- Plasmatócitos

Célula medindo aproximadamente 13µm de diâmetro, de formato polimórfico variando de oval a fusiforme com núcleo acêntrico ou central (Figs. 3C-D, 4C-D e 7B). Este tipo celular apresenta em seu citoplasma poucos grânulos de forma e tamanhos variados, vesículas de tamanhos variados e mitocôndrias (Figs. 4C-D e 7B). A membrana plasmática exibe filopodia e pseudopodia (Figs. 4D e 7B).

- Granulócitos

Célula medindo aproximadamente 20µm de diâmetro, de forma elíptica, com núcleo centralizado acompanhando o formato da célula ou acêntrico (Figs. 5A-B e 6A-B). Membrana plasmática irregular apresentando inúmeras projeções citoplasmáticas (Figs. 6B e 7C-D). O citoplasma contém muitos grânulos de diferentes tamanhos e eletrondensidades que caracteriza este tipo celular. Apresenta vesícula no citoplasma (Figs. 6B e 7D).

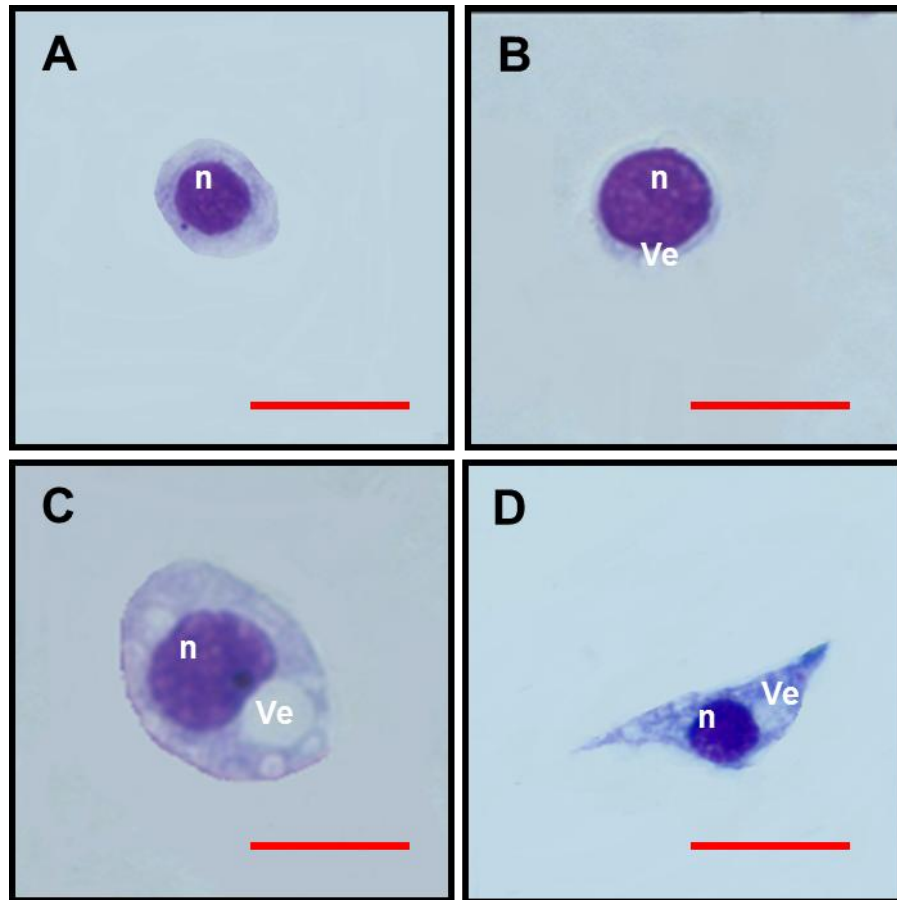
- Esferulócitos

São células com formato oval, medindo aproximadamente 18µm de diâmetro (Fig. 5C). Ao redor do núcleo é encontrada cromatina condensada. No citoplasma observa-se a presença de vários esférulos de tamanhos e formas uniformes, além de organelas como mitocôndrias, Golgi e vesículas de tamanhos variados (Fig. 6C). Na microscopia de luz, frequentemente, observou-se a liberação das esférulas.

- Adipohemócitos

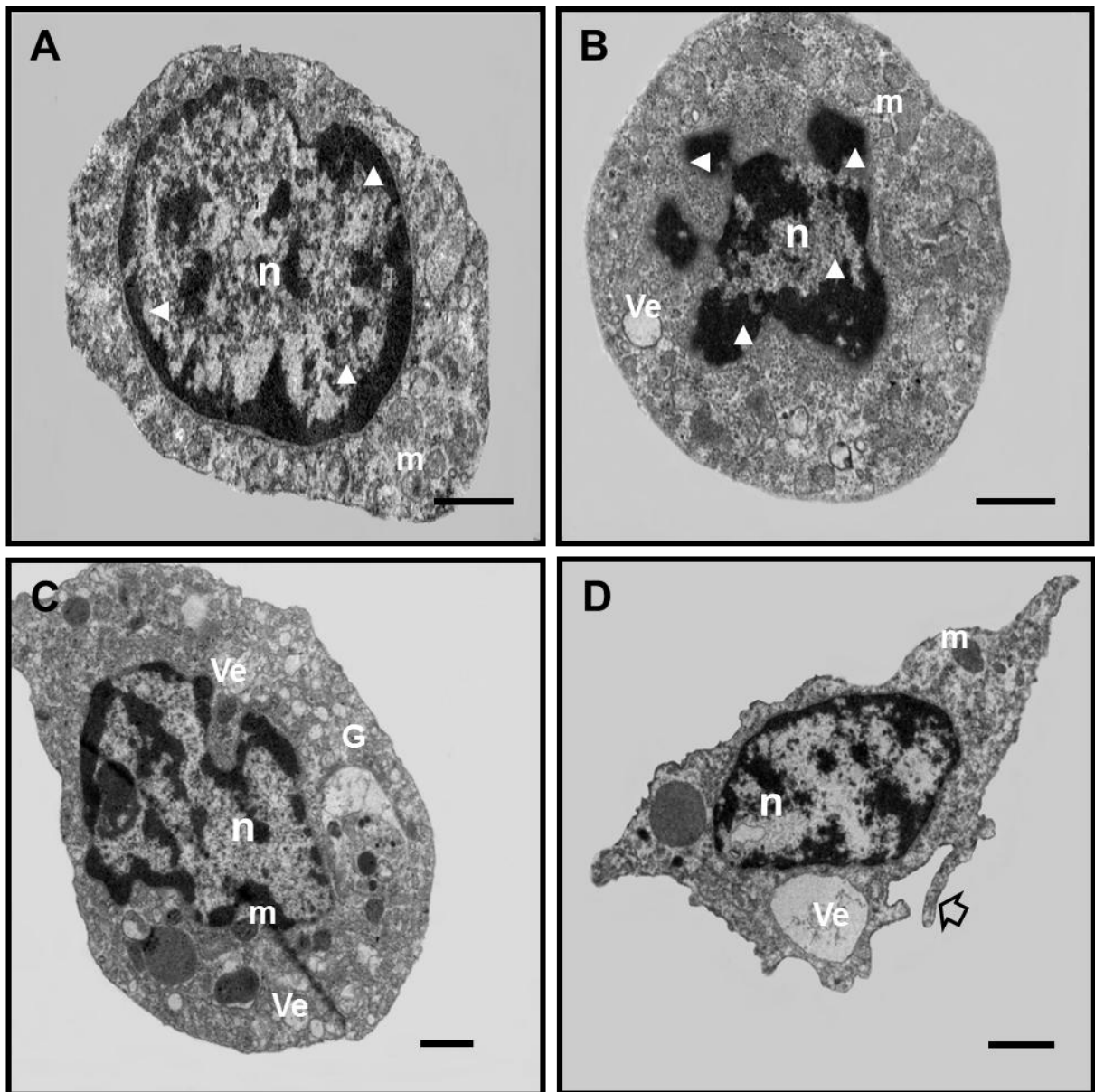
São células raramente encontradas na hemolinfa, com formato irregular, medindo aproximadamente 13µm de diâmetro (Fig. 5D). No citoplasma são observadas várias inclusões lipídicas preenchendo grande parte do espaço citoplasmático (Figs. 6D e 7F), também observa-se no citoplasma a presença de vesículas (Fig. 7F) e mitocôndrias (Fig. 6D).

Figura 3: Micrografias de hemócitos de *Rh. sanguineus*.



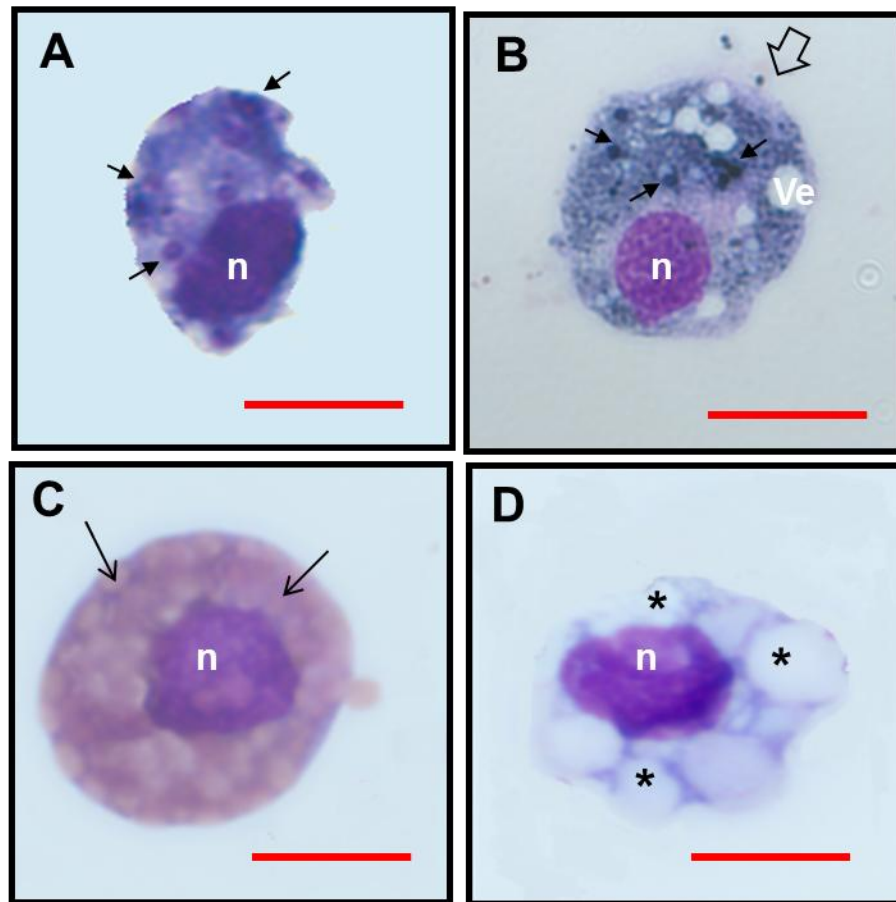
Fonte: Autor, 2014. **Nota:** (A-B) Prohemócitos – célula relativamente pequena apresentando forma oval e redonda com o núcleo (n) bem desenvolvido em relação ao citoplasma, pode apresentar vesícula (Ve). (C-D) Plasmatócitos – célula grande que apresenta forma variando de oval a fusiforme com núcleo (n) central ou deslocado e presença de vesícula (Ve) no citoplasma. Barras = 10 μ m.

Figura 4: Eletromicrografias de hemócitos de *Rh. sanguineus*.



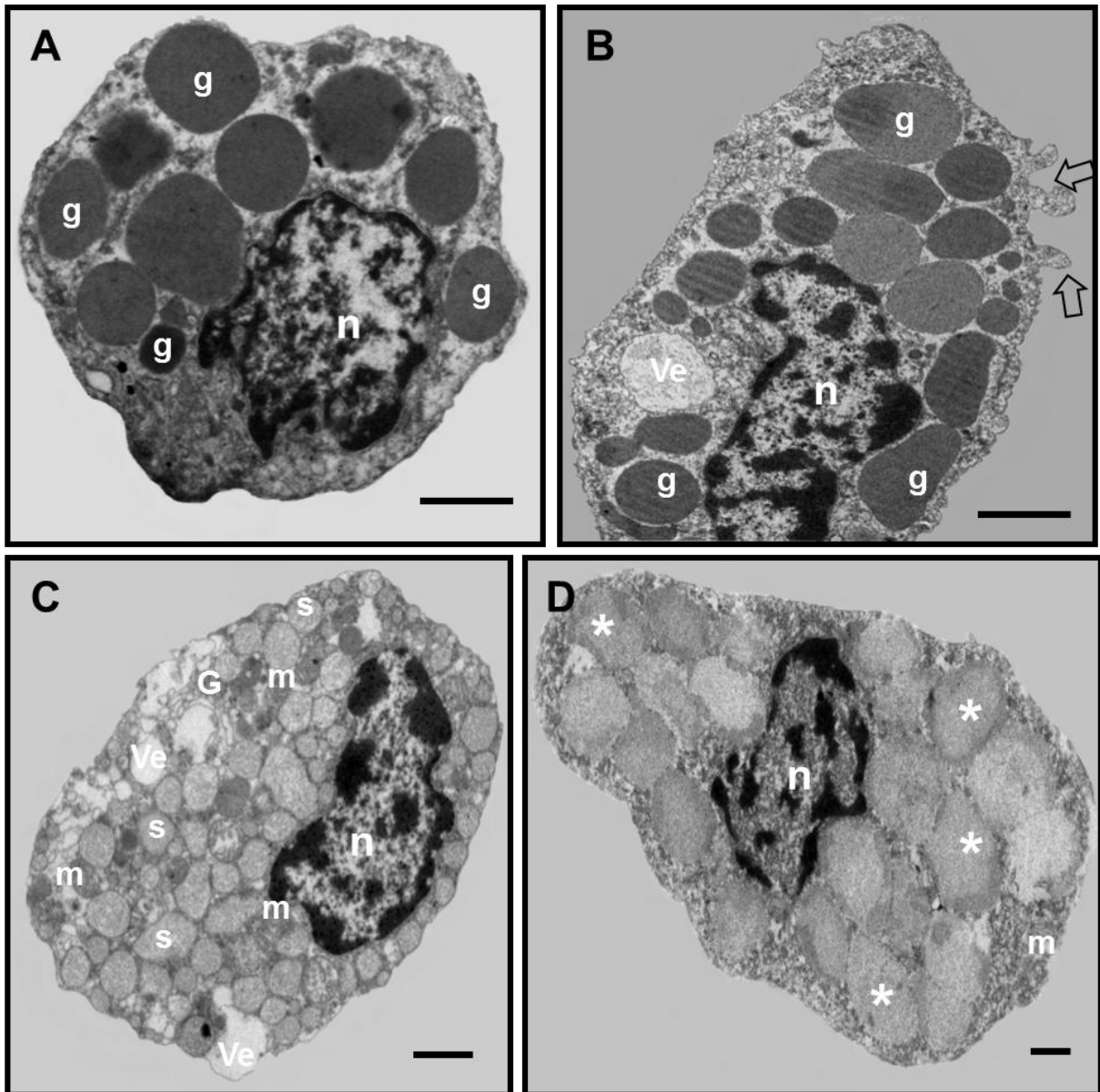
Fonte: Autor, 2014. **Nota:** **(A-B)** Prohemócito – célula com formato oval e redonda, núcleo (n) bem desenvolvido com ilhas de cromatina eletrondensa (ponta de seta) distribuídas na membrana nuclear. **(C-D)** Plasmatócito – célula grande que apresenta forma variando de oval a fusiforme com núcleo (n) central ou acêntrico e presença de vesículas (Ve) e Golgi (G) no citoplasma e projeção da membrana citoplasmática (seta aberta). m=mitocôndria. Barras = 1 μ m.

Figura 5: Micrografias dos hemócitos de *Rh. sanguineus*.



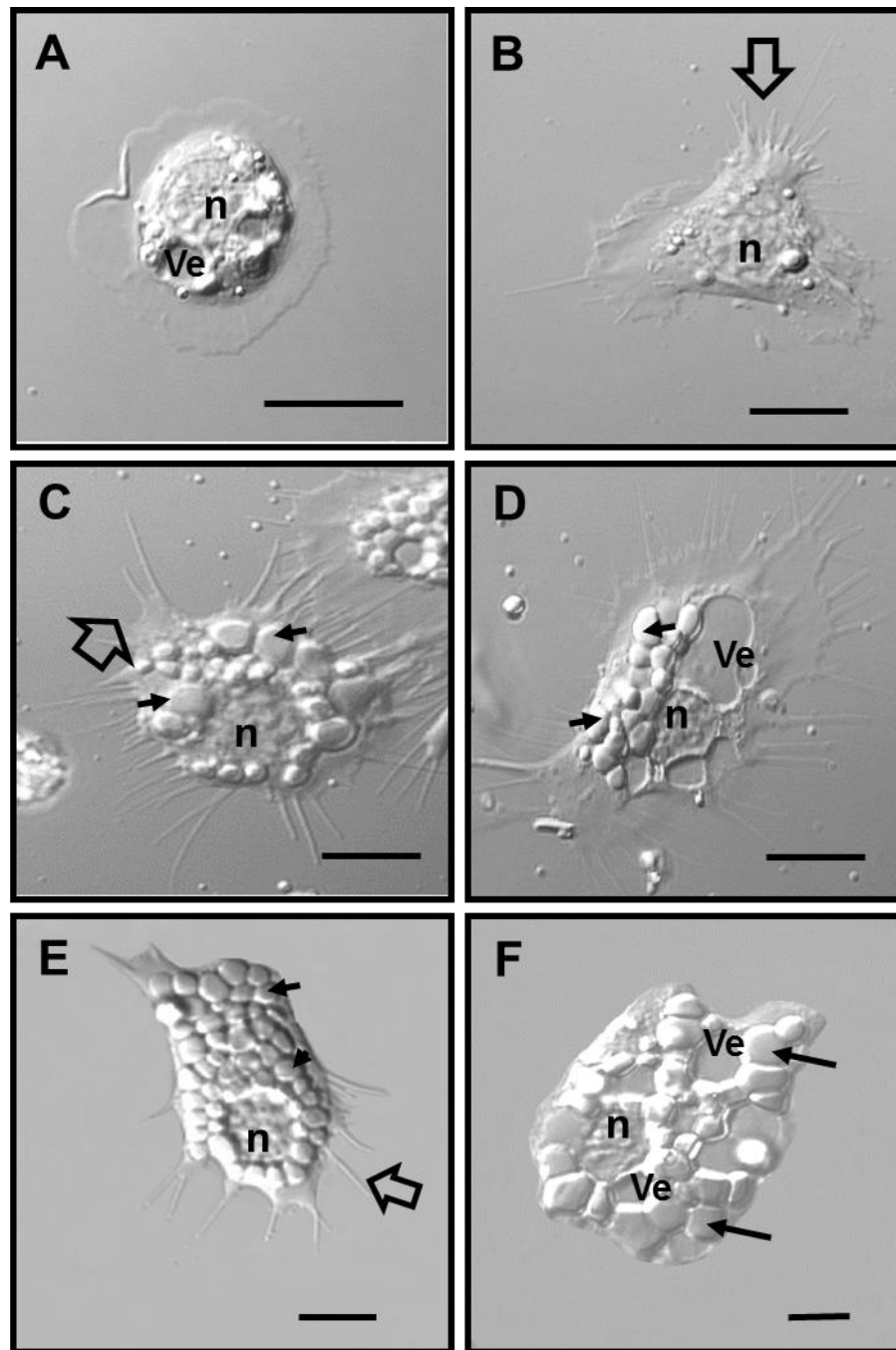
Fonte: Autor, 2014. **Nota:** **(A-B)** Granulócito – célula com núcleo (n) acompanhando o formato da célula, presença de projeções da membrana citoplasmática (seta aberta), citoplasma contendo grânulos (seta) e vesículas (Ve). **(C)** Esferulócito – célula com núcleo (n) deslocado, e caracterizada pela presença de vários esférulos (seta longa) de formas e tamanhos uniformes. **(D)** Adipohemócito – célula grande com núcleo (n) comprimido pela presença das inclusões lipídicas (asterisco). Barras = 10μm.

Figura 6: Eletromicrografias dos hemócitos de *Rh. sanguineus*.



Fonte: Autor, 2014. **Nota:** **(A-B)** Granulócitos – célula com núcleo (n) acompanhando o formato da célula, presença de projeções da membrana citoplasmática (setas abertas) e citoplasma contendo vesícula (Ve) e grânulos (g) de diferentes eletrondensidades. **(C)** Esferulócito – célula com núcleo (n) deslocado e caracterizado pela presença de vários esferulos (s) de formas e tamanhos variados. **(D)** Adipohemócito – célula grande com núcleo (n) comprimido pela presença das inclusões lipídicas (asterisco). G = Golgi, m=mitocôndria. Barras = 1µm.

Figura 7: Microscopia de Contraste de Interferência Diferencial de hemócitos de *Rh. sanguineus*



Fonte: Autor, 2014. **Nota:** **(A)** Prohemócito com núcleo (n) grande em relação ao citoplasma e presença de vesícula (Ve). **(B)** Plasmatócito com formato irregular com projeções citoplasmáticas como filopoidia e pseudopoidia (seta aberta). **(C-D)** Granulócitos com núcleo (n) irregular, no citoplasma observou-se a presença de grânulos (setas curtas) e vesículas (Ve) além de projeções citoplasmáticas como filopoidia e pseudopoidia (seta aberta). **(E)**

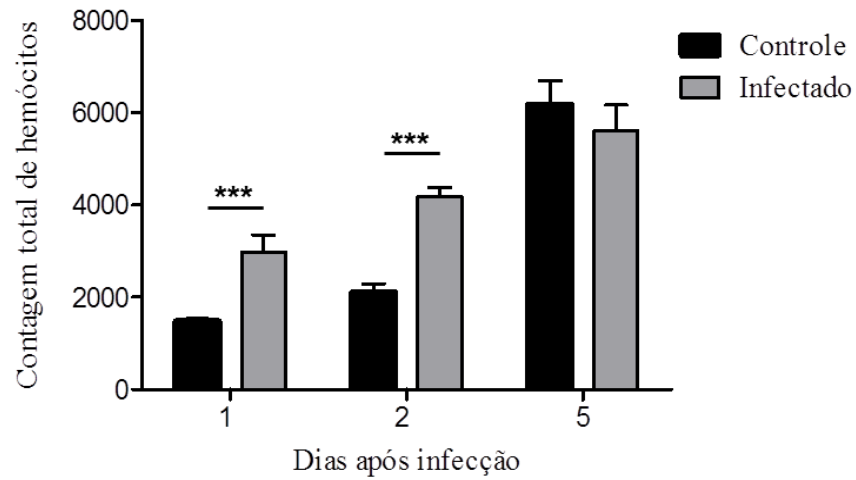
Esferulócito com núcleo (n) acêntrico e citoplasma preenchido com esférulos de tamanhos uniformes (setas curtas). **(F)** Adipohemócito com núcleo (n) acêntrico e presença de inclusões lipídicas (setas) e vesículas (Ve) no citoplasma. Barras= 13µm.

5.2 Dinâmica hemocitária

A partir da contagem total e diferencial dos cinco tipos de hemócitos circulantes na hemolinfa de fêmeas de *Rh. sanguineus* (plasmatócitos, granulócitos, esferulócitos, prohemócitos e adipohemócitos) observou-se que a média do número total de hemócitos no grupo de *Rh. sanguineus* infectado com *L. infantum* apresentou-se significativamente elevada ($P < 0.001$), nos dias 1 e 2 após a infecção (dpi) em relação ao grupo controle. A população de hemócitos de *Rh. sanguineus* aumentou gradualmente até o 5º dpi, porém não apresentou diferença significativa quando comparado ao grupo controle, para este tempo (Fig. 8). Foram encontradas mudanças na contagem diferencial de hemócitos após a infecção. A percentagem de prohemócitos apresentou-se mais elevada ($P < 0.001$) em todos os tempos no grupo controle (Fig. 9A). Já a percentagem de esferulócitos, apresentou-se significativamente mais elevada ($P < 0.05$), no 1º e 2º dpi no grupo controle (Fig. 9B). Enquanto as percentagens de granulócitos e plasmatócitos foram estatisticamente mais elevadas ($P < 0.001$) nos três tempos analisados no grupo infectado (Fig. 10A-B). Nenhuma diferença estatística foi observada na percentagem de adipohemócitos entre os grupos nos tempos analisados.

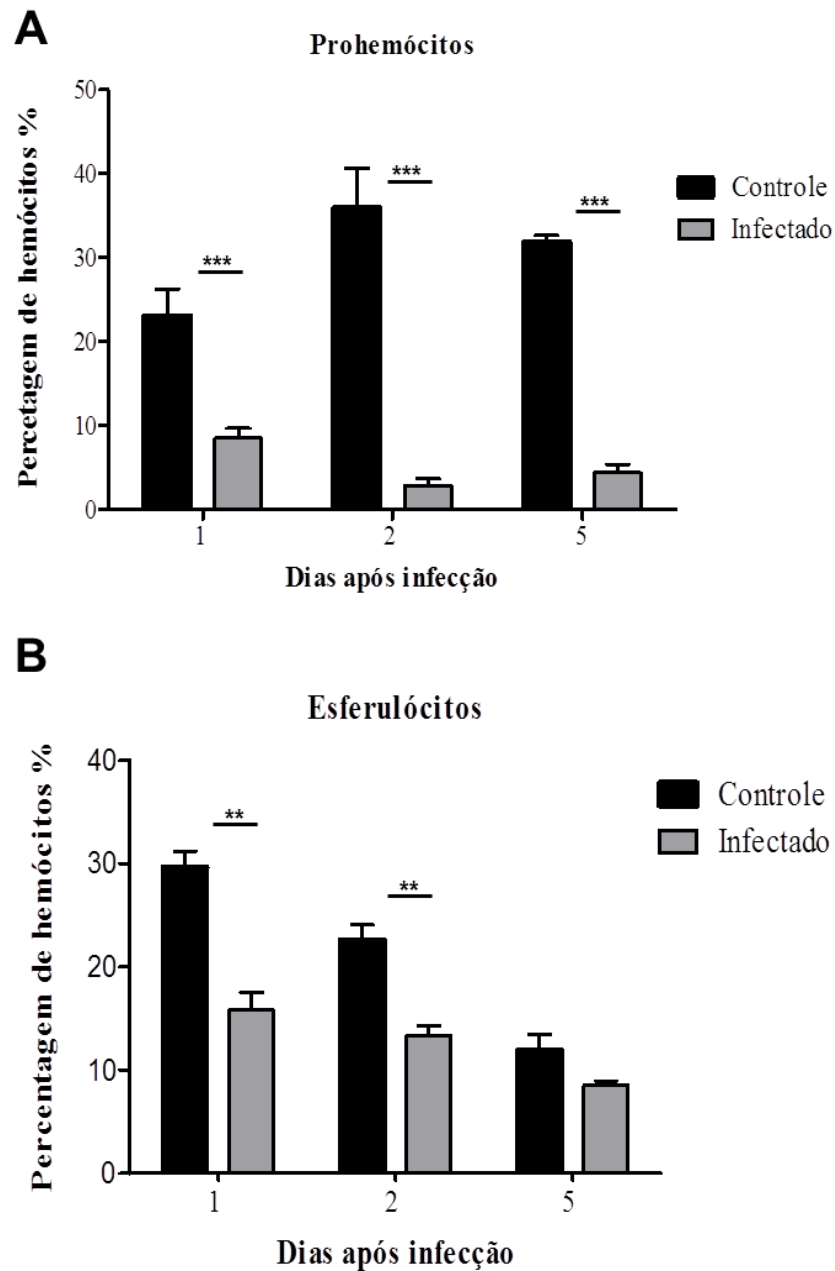
Foram realizadas análises da dinâmica hemocitária para cada grupo, comparando as proporções nos dias pós-infecção. No grupo controle a proporção de prohemócitos variou de 20,7% no 1º, 35% no 2º e 28,4% no 5º dpi e ocorreu uma diminuição na proporção de granulócitos do 1º (22,8%) para o 2º (14%) e 5º (12,1%) dpi. Enquanto que no grupo infectado ocorreu uma variação crescente na proporção de granulócitos de 25%, 31% e 32% para o 1º, 2º e 5º dpi, respectivamente. Já a proporção de plasmatócitos que mostrou-se elevada em todos os tempos avaliados com 48,3%, 52% e 53%, foi a célula com maior proporção. As proporções de adipohemócitos não variaram nos grupos controle e infectado em nenhum dos tempos analisados.

Figura 8: Contagem total de hemócitos de *Rh. sanguineus* infectados com *L. infantum*.



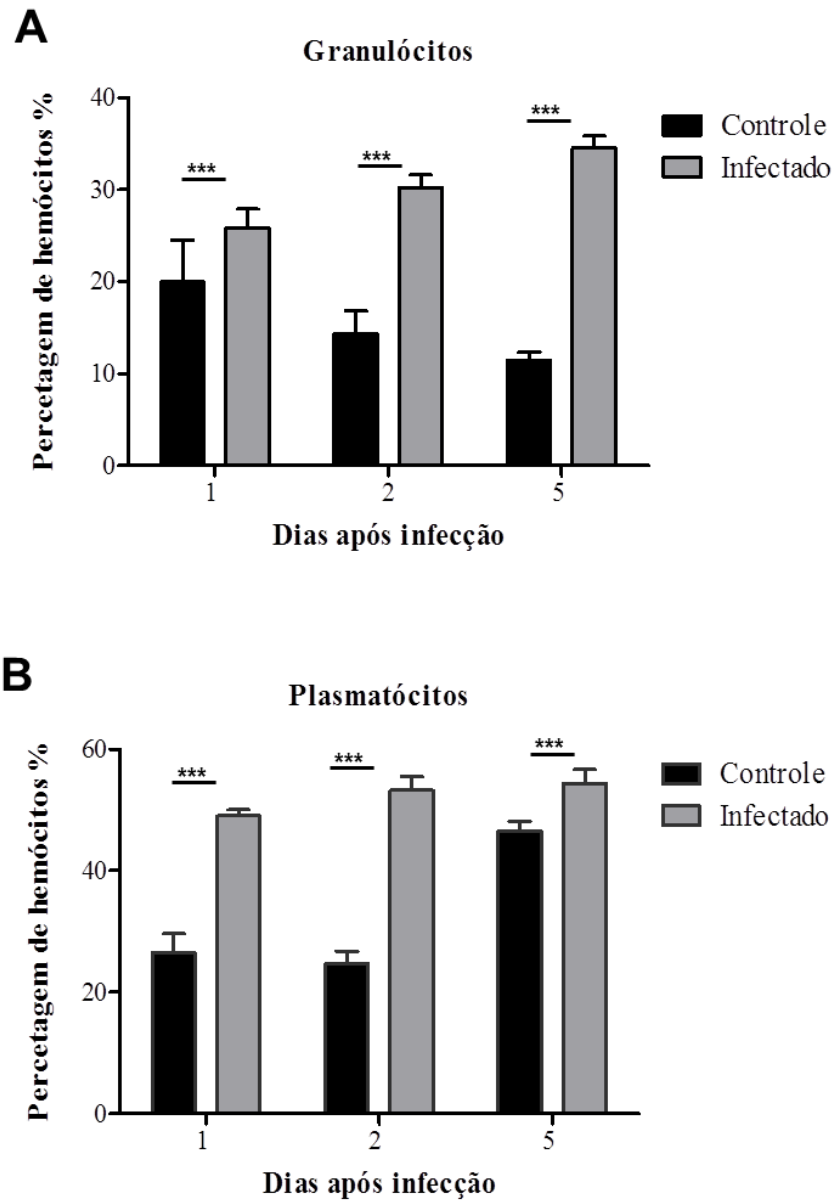
Fonte: Autor, 2014. **Nota:** Gráfico de barra representa a média $\pm$ DP de 5 repetições com análises de 3 carrapatos, para cada repetição. Asterisco indica significância estatística com $P < 0,001$.

Figura 9: Contagem diferencial de hemócitos de *Rh. sanguineus* infectados com *L. infantum*



Fonte: Autor, 2014. **Nota:** Os gráficos de barras representam a média $\pm$ DP de 5 repetições com análises de 3 carrapatos, para cada repetição. (A) Prohemócitos (B) esferulócitos. Asterisco indica significância estatística de $P < 0.001$ (***) e $P < 0.05$ (**).

Figura 10: Contagem diferencial de hemócitos de *Rh. sanguineus* infectados com *L. infantum*



Fonte: Autor, 2014. **Nota:** Os gráficos de barras representam a média $\pm$ DP de 5 experimentos com 3 carrapatos (A) granulócitos (B) plasmatócitos. Asterisco indica significância estatística de $P < 0,001$.

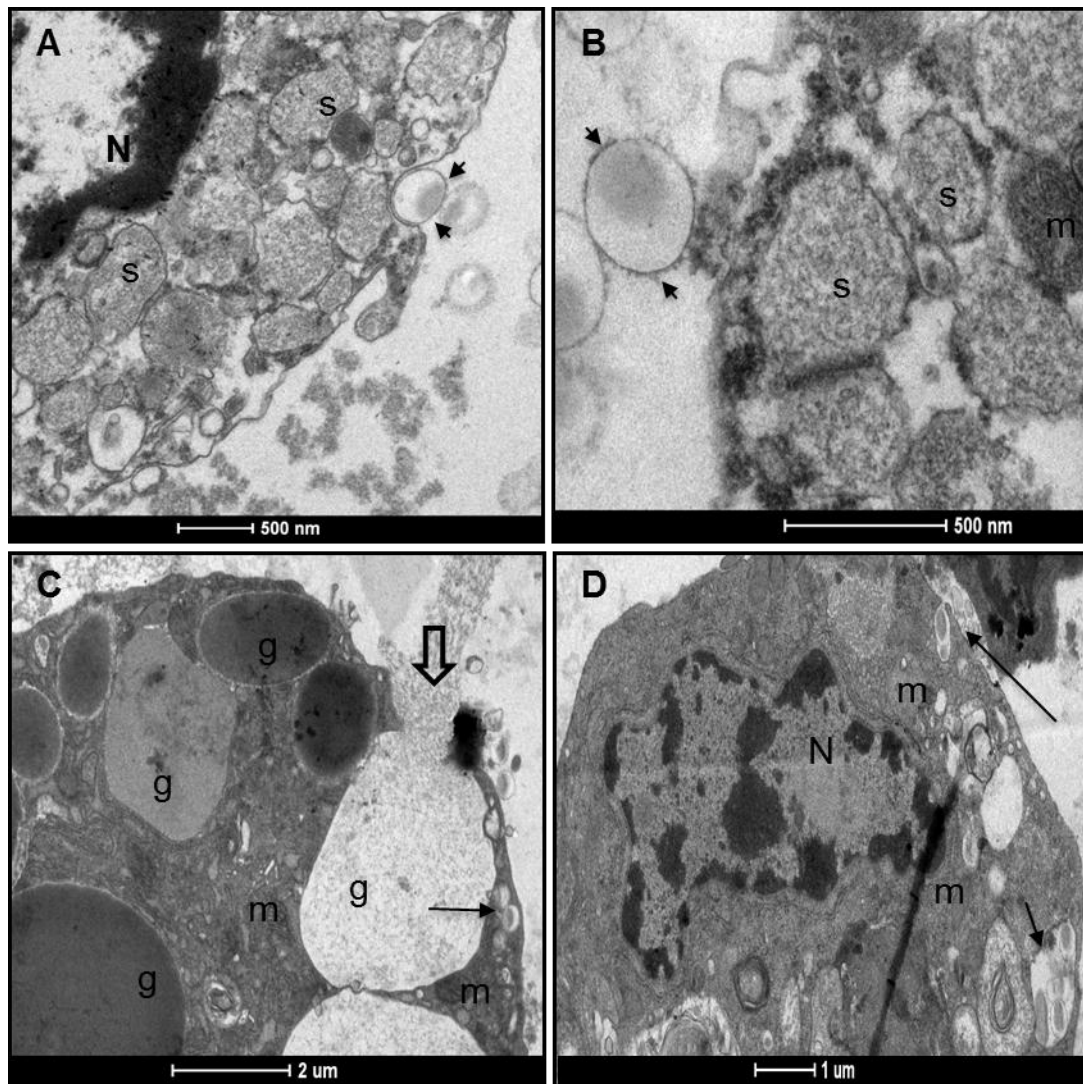
5.3 Atividade fagocítica de hemócitos

Dentre os hemócitos circulantes na hemolinfa de *Rh. sanguineus*, foi possível observar por microscopia eletrônica de transmissão que granulócitos e plasmatócitos foram capazes de realizar a fagocitose de partículas de látex (Fig. 11C-D) e formas promastigotas de *L. infantum* (Fig. 12D-F) no 1º dpi. Além disso, foi encontrado esferulócitos em contato com partículas de látex que apresentavam material eletrondenso em sua superfície (Fig. 11A-B).

A fagocitose da partícula de látex foi observada por dois tipos celulares, plasmatócitos, granulócitos. Observou-se granulócito mostrando fagossomos contendo uma ou várias partículas de látex. As partículas de látex apresentaram-se com deposição de substância amorfa sobre sua superfície. A célula apresenta estruturas granulares com eletrondensidades diferentes e material granular sendo extravazado para o exterior da célula. Na Figura 11C-D, observou-se plasmatócito contendo várias partículas de látex e estruturas membranares no citoplasma. Foi verificado um contato direto entre a partícula de látex e a célula, iniciando-se o processo de fagocitose, porém não foi registrada a presença de filopodia. Os plasmatócitos mostraram-se com alteração em sua morfologia com mitocôndrias espalhadas no citoplasma, retículo endoplasmático rugoso desenvolvido e presença de vesículas (Fig. 11D).

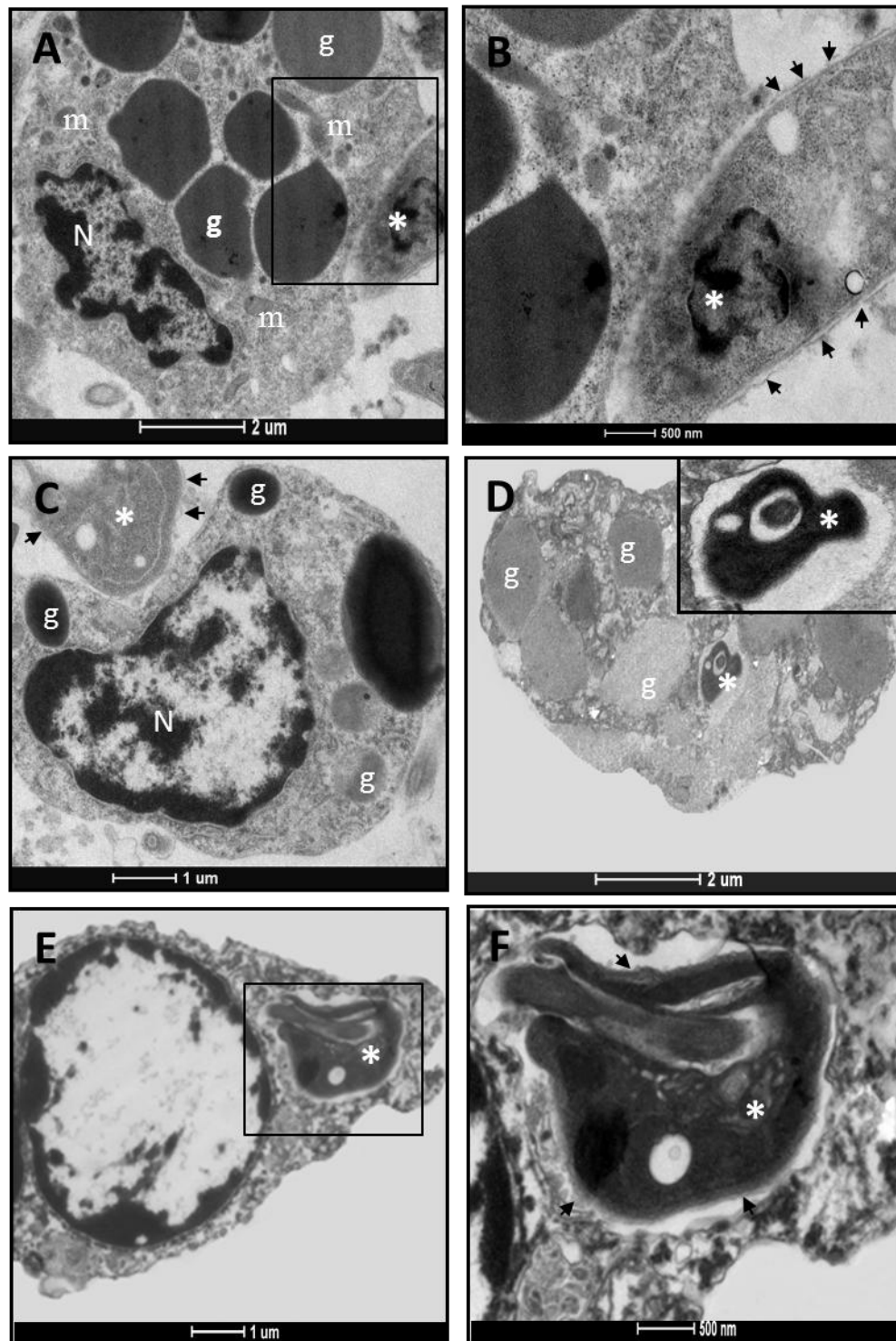
Também foi encontrado granulócitos em contato com a leishmania, para realização da fagocitose (Fig. 12A-C). O granulócito apresentava grânulos total ou parcialmente preenchidos com diferentes eletrondensidades (Fig. 12C). Ainda no granulócito foi encontrada leishmania fagocitada com deposição de substância eletrondensa sobre a membrana do parasita, sugestivo de melanização (Fig. 12D). Além dos granulócitos, observou-se plasmatócitos fagocitando leishmania. No vacúolo do plasmatócito foi possível observar leishmania apresentando morfologia íntegra com deposição de substância eletrondensa sobre a membrana do parasita, sugestivo de melanização, além de vacúolos com estruturas indeterminadas (Fig. 12E-F). No grupo experimental incubado com leishmania, observou-se um grande número de granulócitos apresentando aspectos morfológicos de ativação com liberação de substâncias amorfas indicativa de exocitose. Além disso, algumas células foram encontradas em processo de degradação citoplasmática com leishmania no seu interior apresentando a membrana e material celular totalmente desorganizado, com deposição de material eletrondenso na superfície do parasito (Fig. 13A-D).

Figura 11: Eletromicrografias dos hemócitos de *Rh. sanguineus* fagocitando partículas de látex 24h após desafio.



Fonte: Autor, 2014. **Nota:** (A-B): Esferulócito em contato com a partícula de látex. Note a presença de material eletrondenso (ponta de seta) na superfície das partículas. C: Granulócito com presença de partículas de látex no seu citoplasma (seta curta) e material granular (seta aberta) sendo extravasado para o exterior da célula. D: Plasmatócito fagocitando partículas de látex (seta longa) sem formação de vacúolo e presença de partículas de látex no seu citoplasma (seta curta) em vacúolo. Observe estruturas membranares (estrela) no citoplasma da célula. N = núcleo, s = esférulo, m = mitocôndria, g = grânulo.

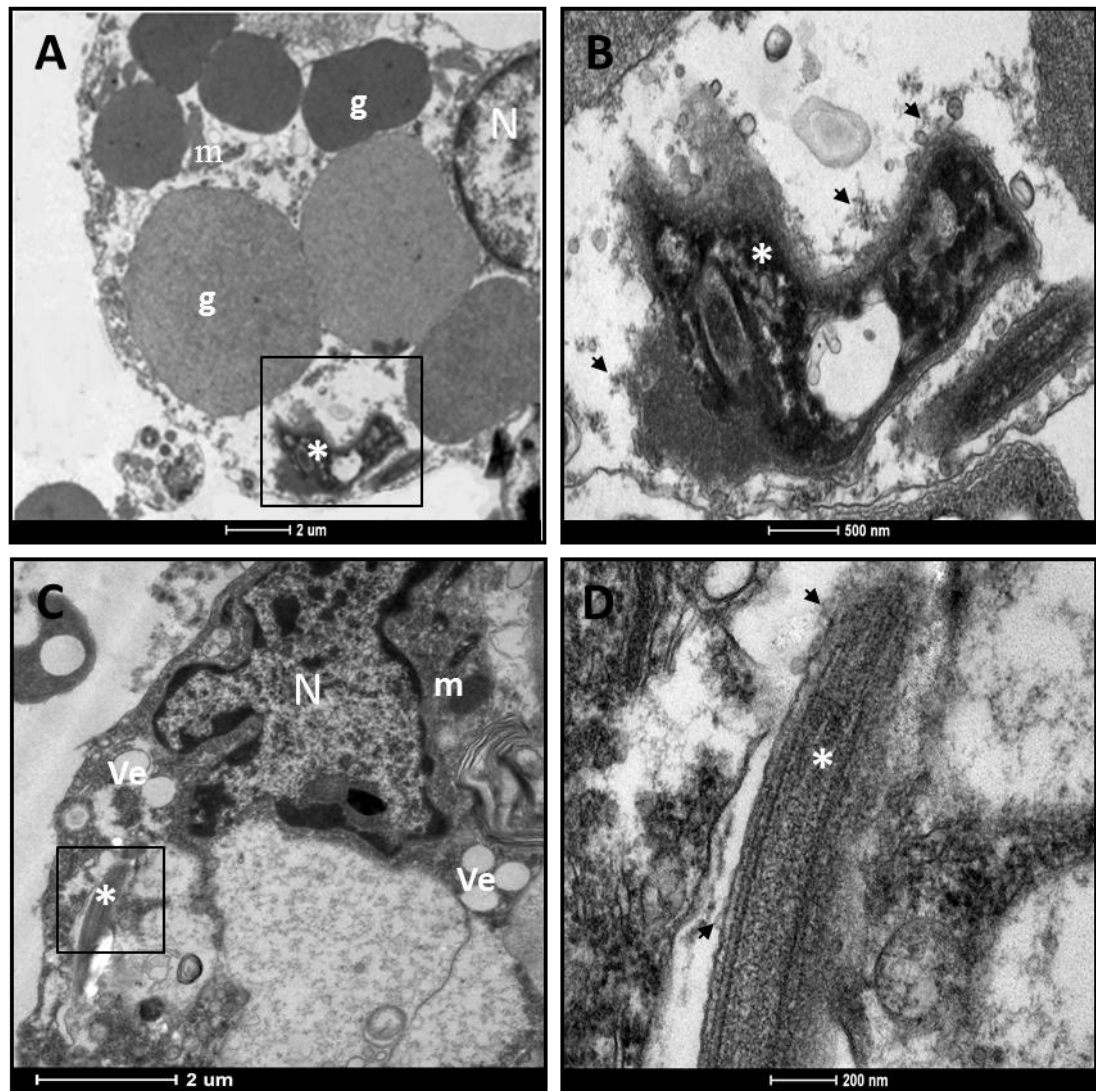
Figura 12: Eletromicrografias dos hemócitos de *Rh. sanguineus* fagocitando *L. infantum* 24h após desafio



Fonte: Autor, 2014. **Nota:** (A-C): Granulócito em contato com a *L. infantum* (asterisco). Note a presença de material eletrondenso (ponta de seta) na superfície da leishmania. **D:** Granulócito com presença de leishmania (asterisco) no seu citoplasma. Em detalhe note a

presença de vacúolo (v). E-F: Plasmatócito com presença de *L.infantum* (asterisco) no seu citoplasma com formação de vacúolo (v). Note a presença de material eletrondenso (ponta de seta) na superfície da leishmania. N=núcleo, m=mitocôndria, g=grânulo.

Figura 13: Eletromicrografias dos hemócitos de *Rh. sanguineus* fagocitando *L. infantum* 24h após desafio



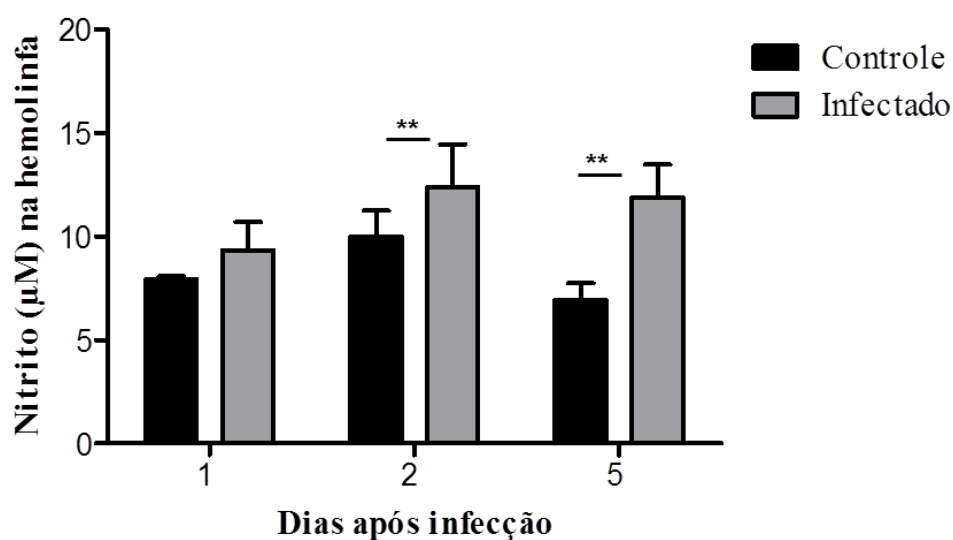
Fonte: Autor, 2014. **Nota:** (A-B): Granulócito com morfologia alterada com presença de *L. infantum* (asterisco) no interior do citoplasma com características de degradação. Note que a membrana e material celular da leishmania estão totalmente desorganizados com deposição de material eletrondenso na superfície do parasito. C-D: Plasmatócito com morfologia alterada devido a presença de leishmania (asterisco) no seu citoplasma. Em detalhe note a presença de

material eletrondenso (ponta de seta) na superfície da leishmania. N=núcleo, m=mitocôndria, g=grânulo, Ve=vesícula.

5.4 Dosagem de Óxido Nítrico

Observamos que ocorreu um aumento, estatisticamente significativo ($P < 0.05$), nos níveis de óxido nítrico no grupo de carrapatos infectados com *L. infantum* em relação ao grupo controle no 1º, 2º e 5º dia após a infecção (Fig. 14).

Figura 14: Comparação da concentração de NO_2 na hemolinfa de *Rh. sanguineus* infectados com *L. infantum*.

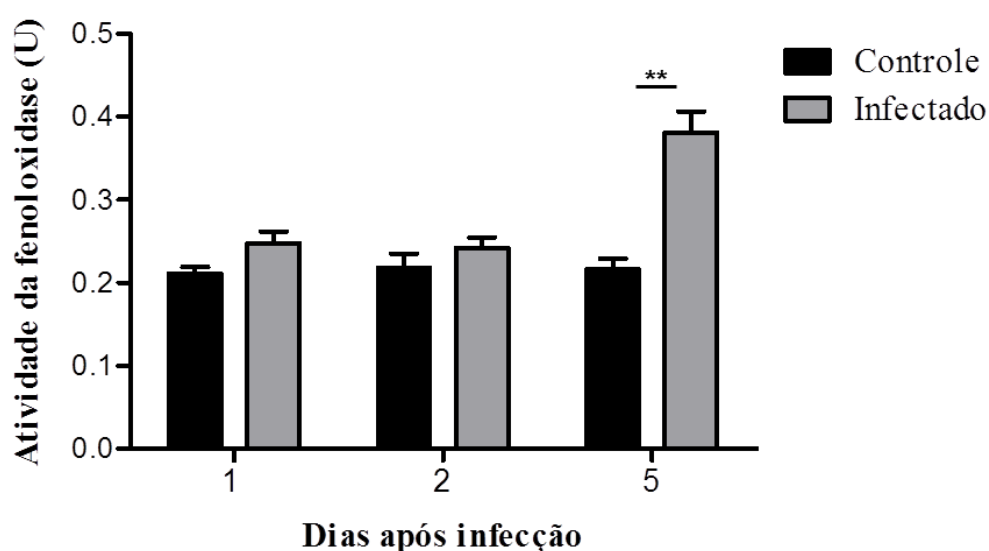


Fonte: Autor, 2014. **Nota:** Os gráficos de barras representam a média $\pm$ DP de 5 repetições com 3 carrapatos, cada repetição. Asterisco indica significância estatística de $P < 0.05$.

5.5 Atividade da fenoloxidase na hemolinfa e identificação dos tipos de hemócitos produtores de PO

A atividade da enzima PO em adultos de *Rh. sanguineus* inoculados com *L. infantum*, apresentou um aumento, estatisticamente significativo ($P < 0,05$), da atividade enzimática no 5º dpi, não tendo sido observada alteração significativa nos dias 1 e 2 após a inoculação com a leishmanias (Fig. 15).

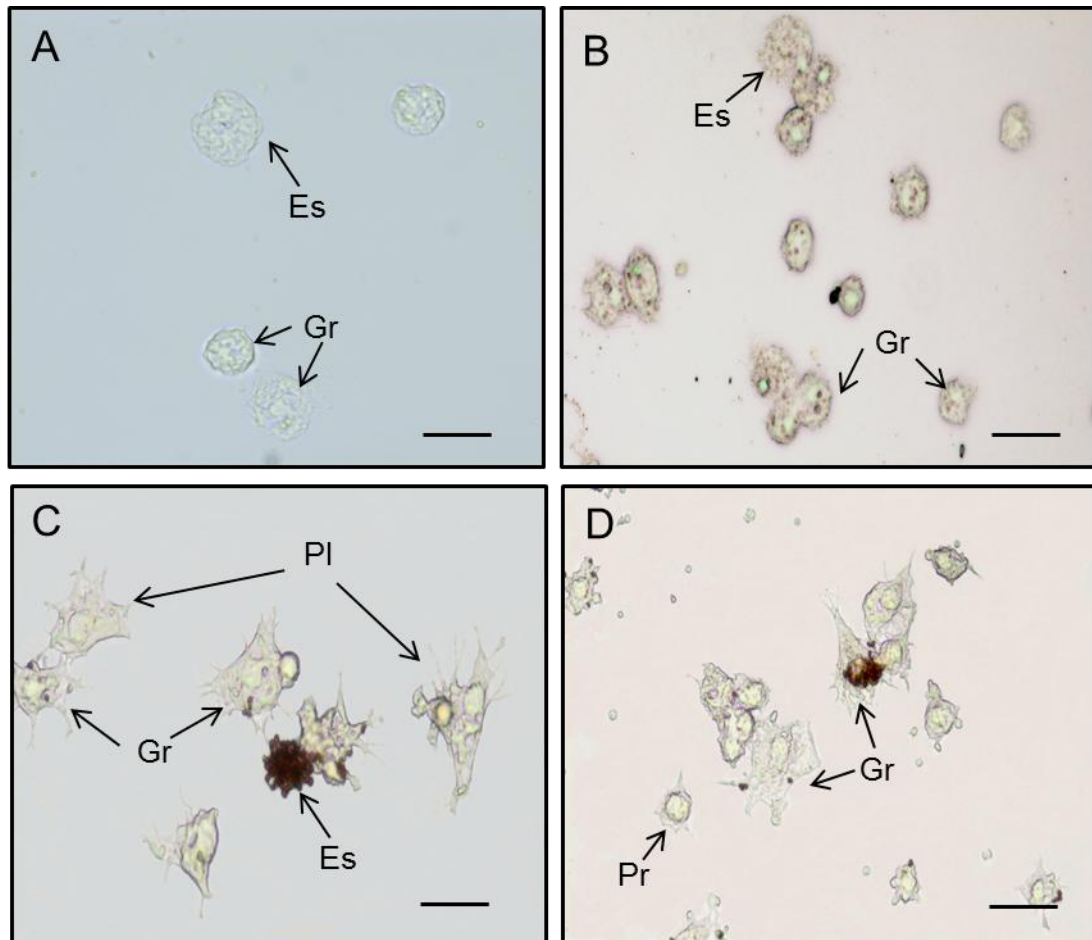
Figura 15: Comparação da atividade do fenoloxidase na hemolinfa de *Rh. sanguineus* infectados com *L. infantum*



Fonte: Autor, 2014. **Nota:** Os gráficos de barras representam a média $\pm$ DP de 5 experimentos com 3 carrapatos. Asterisco indica significância estatística de $P < 0,05$.

No experimento de identificação dos tipos celulares produtores de PO, observou-se que as células granulares como plasmatócitos, granulócitos e esferulócitos são produtoras de PO (Fig.16A-D).

Figura 16: Micrografias da atividade da fenoloxidase em hemócitos de *Rh. sanguineus* desafiados com *L. infantum*.



Fonte: Autor, 2014. **Nota:** **A:** Controle da reação sem a presença do substrato L-DOPA. **B-D:** Hemócitos granulares incubados com o substrato L-DOPA por 30 minutos. Note coloração marron, indicando atividade da PO oxidando o substrato. Células, granulócitos (Gr) e esferulócitos (Es) apresentaram-se mais marcadas, enquanto plasmatócitos (Pl) e prohemócitos (Pr) não apresentam reação. Barras = 50 µm.

5.6 Expressão dos gene 18S ribossomal de *Leishmania*, 18S ribossomal do *Rh. sanguineus*, defensina e Glutathione-S-Transferase

Todos os primers utilizados neste estudo apresentaram uma temperatura de melting TM, específica para seus amplicons. Além de apresentarem uma eficiência (eff%) acima de 92% e um coeficiente de correlação (R^2) acima de 0,98. (Fig.17).

5.7 Expressão do gene 18S ribossomal de *Leishmania* em *Rh. sanguineus*

Os amplicons dos genes analisados, 18S ribossomal *Leishmania* e 18S ribossomal *Rh. sanguineus*, apresentaram temperatura de melting TM específicas para cada gene, sendo T_m de 79 ± 0,5 °C e 82 ± 0,7 °C, respectivamente. Neste estudo observamos um aumento estatisticamente significativo ($P < 0.001$), da expressão do gene 18S ribossomal da *L. infantum* nos dias 1, 5 e 7 após a infecção com promastigotas, quando comparados ao tempo 0 após a inoculação, no entanto, observou-se uma queda da expressão no primeiro dia após a infecção (Fig. 18).

5.8 Expressão dos genes GST e Defensina de *Rh. sanguineus*

Os amplicons dos genes analisados, GST e defensina, apresentaram temperatura de melting (T_m) específicas para cada gene, sendo T_m de 83 ± 0,4 °C e 81 ± 0,5°C respectivamente. A expressão do gene defensina foi elevada, estatisticamente significativa ($P < 0,05$), no 7º dia após infecção, não sendo observada alteração nos demais períodos analisados quando comparados com o controle (Fig. 19). Já a expressão do gene GST, apresentou aumento nos níveis de expressão no 1º e 2º dpi, não apresentando alteração nos demais períodos analisados (Fig. 20).

Figura 17: Temperaturas de *meltings*, eficiência, e coeficiente de correlação dos primers utilizados no estudo.

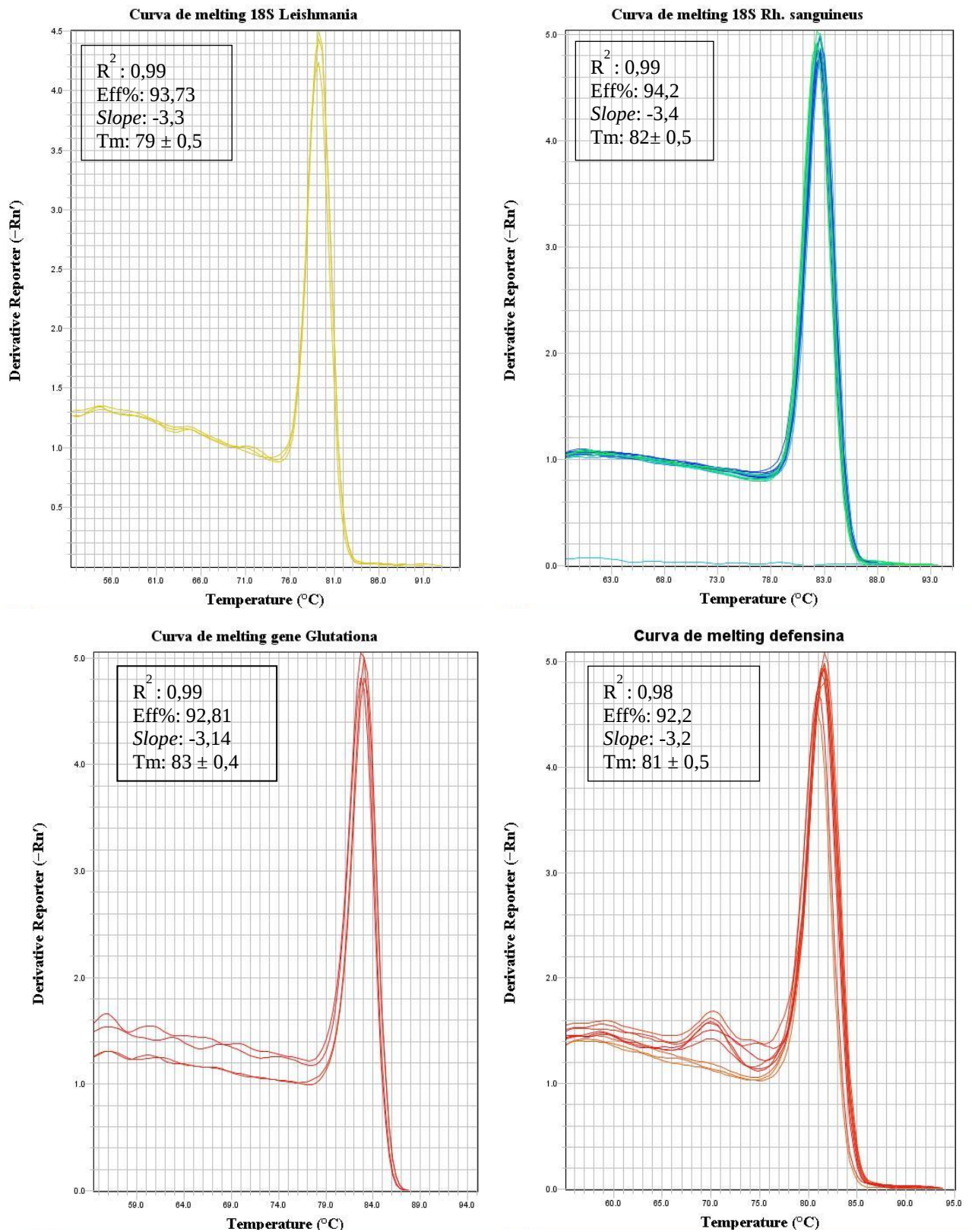
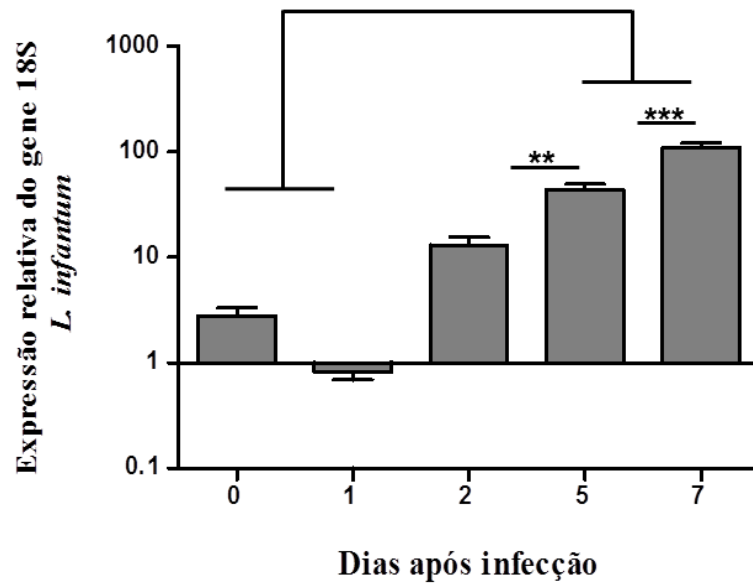
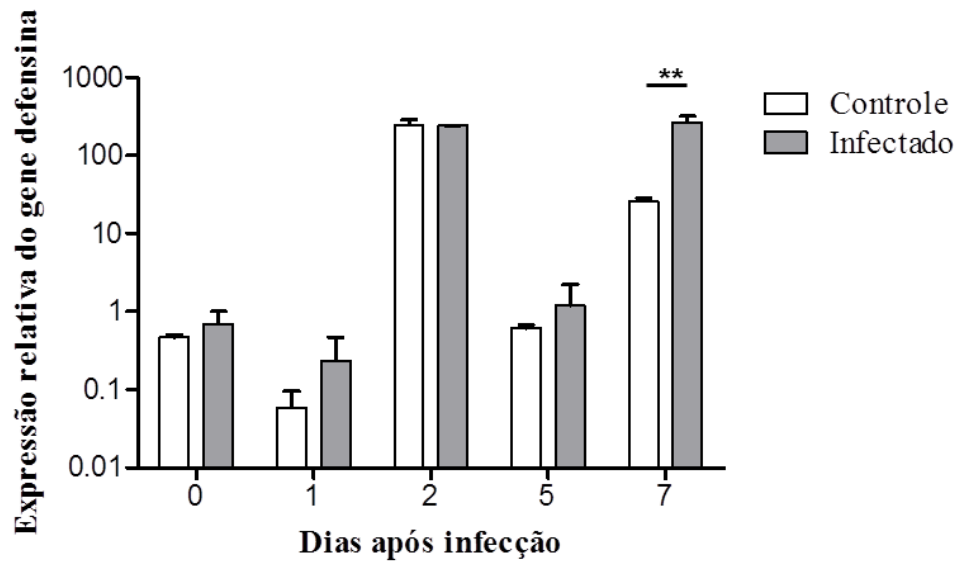


Figura 18: Expressão relativa do gene 18S ribossomal de *Leishmania*



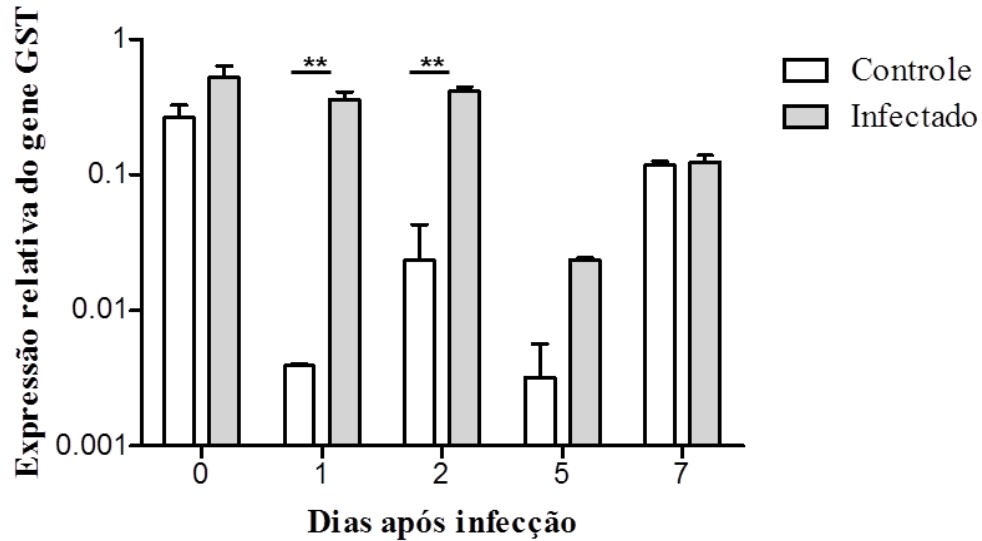
Fonte: Autor, 2014. **Nota:** No tempo 0 e nos dias 1, 2 , 5 e 7 após a infecção com promastigotas de *L. infantum*, (normalizados em relação ao controle endógeno gene 18S ribossomal do *Rh. sanguineus*). Os gráficos de barras representam a Média $\pm$ DP de 5 experimentos com 3 carrapatos. Asterisco indica significância estatística de $P < 0,05$ (**) e $P < 0,001$ (***).

Figura 19: Expressão do gene defensina em *Rh. sanguineus* infectados com *L. infantum*.



Fonte: Autor, 2014. **Nota:** No tempo 0 e nos dias 1, 2, 5 e 7 após a infecção. A expressão relativa foi normalizada com o gene 18S ribossomal do *Rh. sanguineus*. As barras representam Média $\pm$ DP de 5 *pools* de 3 carrapatos. Asterisco representa significância estatística de $P < 0.05$.

Figura 20: Expressão do gene Glutathiona-S-transferase (GST) em *Rh. sanguineus* infectados com *L. infantum*.



Fonte: Autor, 2014. **Nota:** No tempo 0 e nos dias 1, 2, 5 e 7 após a infecção. A expressão relativa foi normalizada com o gene 18S ribossomal do *Rh. sanguineus*. As barras representam Média $\pm$ DP de 5 *pools* de 3 carrapatos. Asterisco representa significância estatística de $P < 0.05$.

6. DISCUSSÃO

Os hemócitos são classificados de acordo com características morfológicas e ultraestruturais, além da caracterização funcional (KADOTA et al., 2003). Na literatura são escassos os estudos sobre hemócitos de carrapatos, portanto para realizar a caracterização dos hemócitos de *Rhipicephalus sanguineus* foi utilizada a descrição dos hemócitos de outras espécies de carrapatos (BOROVICKOVÁ; HYPsa, 2005; INOUE et al., 2001; CARNEIRO; DAEMON, 1997; KUHN; HAUG, 1994) e também de outros invertebrados (SOARES et al., 2013 e BRAYNER et al., 2005).

O único estudo que relata a descrição de hemócitos de *Rh. sanguineus*, data de 1997 por Carneiro e Daemon. Os hemócitos foram observados através da microscopia de campo claro e foram classificadas em cinco tipos definidos como prohemócitos, plasmatócitos, granulócitos, esferulócitos, oenocitóides, adipohemócitos e células não definidas, sendo os esferulócitos, seguidos de plasmatócitos e granulócitos os tipos celulares mais abundantes. Em nosso estudo, utilizando técnicas de microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão, encontramos cinco tipos celulares, prohemócitos, plasmatócitos, granulócitos, esferulócitos e adipohemócitos, diferindo dos achados de Carneiro e Daemon (1997), apenas em um tipo celular, oenocitóide. Já em estudo de Carneiro e Daemon (2001) descrevendo hemócitos em carrapatos adultos de *Amblyomma cajennense* e de *Haemaphysalis* spp., observaram apenas três tipos celulares, prohemócito, plasmatócito e esferulócito, diferindo dos encontrados em nosso estudo.

Os prohemócitos no nosso estudo apresentam morfologia e tamanho similares descritas em outros estudos com invertebrados, como Soares et al. (2013) em estudo de ultraestrutura com *Lasiadora* sp., Kuhn e Haug, (1994) em estudo com *Ixodes ricinus*, Habeeb e El-Hag, (2008) em estudo com *Hyalomma dromedarii*, Borovicková e Hypsa, (2005) em trabalho com *Ornithodoros moubata* e *Ixodes ricinus*, e em Brayner et al. (2005) em estudo com *Culex quinquefasciatus*. As características similares dos prohemócitos, em diferentes invertebrados, podem está relacionada à sua classificação como célula precursora, baseado nos estudos de Lavine e Strand (2002).

Em nosso trabalho encontramos plasmatócitos com presença de grânulos e projeções citoplasmáticas, contrariamente o que foi descrito por Borovicková e Hypsa, (2005) em estudo com hemócitos de *Ornithodoros moubata* e *Ixodes ricinus*. Porém o tamanho celular, formato polimórfico e a presença de organelas, como mitocôndrias e vesículas foram

encontrados no citoplasma, semelhante ao que foi descrito por Borovicková e Hypsa, (2005) e Inoue et al. (2001). Em alguns invertebrados este tipo celular está altamente envolvido na resposta imune, provavelmente o plasmatócitos de *Rh. sanguineus* por apresentar grânulos e projeções no seu citoplasma seja responsável pelos processos de encapsulamento e fagocitose. Porém, mais estudos são necessários para comprovar este fato.

Em estudo realizado com *O. moubata* e *Ixodes ricinus*, Borovicková e Hypsa, (2005), descreveram dois tipos de granulócitos (granulócito tipo I e II), a classificação dos autores foi baseada no critério da relação de eletrondensidade com maturação dos grânulos. Embora nossos granulócitos também apresentem grânulos com tamanhos variados e diferentes eletrodensidades, denominamos apenas de granulócitos, por apresentarem o mesmo tamanho e mesmos padrão de organelas celulares, consideramos ser a mesma célula em diferentes fases de maturação.

Os esferulócitos descritos em *Rh. sanguineus*, no presente trabalho não foram encontrados em nenhum outro estudo ultraestrutural com hemócitos de carrapatos, exceto em *Ornithodoros moubata* onde estas células foram caracterizadas por Borovicková e Hypsa (2005) apresentando tamanho celular pequeno em relação ao nosso estudo, além de estruturas granulares com tamanhos e formas variadas, diferindo do nosso estudo onde encontramos esférulos com tamanhos, formatos e eletrondensidade uniformes. Soares et al. (2013) e Brayner et al. (2005), por microscopia eletrônica, descreveram em *Lasiadora* spp. e *C. quinquefasciatus*, respectivamente, esferulócitos com pequenos esférulos preenchendo completamente o citoplasma e presença de poucas organelas, tais como mitocôndrias e complexo de golgi, corroborando com nosso estudo. Porém, o tamanho do esferulócito aqui descrito, foram compatíveis com os encontrados por Brayner et al. (2005), e maior do que os encontrados por Soares et al. (2013). Esta célula, provavelmente, é específica ou mais comum em *Rh. sanguineus*, uma vez que não foi relatado em nenhuma outra espécie de carrapato. A maior abundância desta célula na hemolinfa de *Rh. sanguineus*, também foi descrita por Carneiro e Daemon (1997). A literatura relata que os esferulócitos estão envolvidos na renovação tecidual, transporte de substâncias como hormônios, produção de algumas proteínas da hemolinfa, participação na defesa contra bactérias e nutrição (SASS et al. 1994; NEGREIROS et al., 2004). Dessa forma pode-se justificar o elevado número dessa célula na hemolinfa.

Carneiro e Daemon, (1997), descreveram adipohemócitos através da microscopia de luz, como células arredondadas, com citoplasma preenchido de gotas refringentes. Em nosso estudo os adipohemócitos foram células raras e apresentam-se com formatos irregulares, citoplasma repleto de gotículas lipídicas, presença de vesículas e mitocôndrias, além de diâmetro celular similar ao descrito por Brayner et al. (2005). Assim como esferulócitos, Adipohemócitos não foram descritos em trabalhos com ultraestrutura de hemócitos de carrapatos.

Os hemócitos estão intimamente relacionados à resposta imune inata dos invertebrados. Portanto quando nos propomos a investigar algum modelo de interação parasita-vetor, é extremamente importante caracterizar os tipos de hemócitos presentes na hemolinfa, pois apesar de existir um padrão geral, os tipos celulares diferem bastante entre as espécies. Nessa espécie de carrapato, *Rh. sanguineus*, não existe estudos prévios que caracterizem a ultraestrutura dos hemócitos. Apesar de ser uma espécie relacionada à transmissão de inúmeros patógenos, os estudos sobre interação parasita-vetor ainda são escassos. Em nosso estudo nos propomos a investigar o modelo experimental *Rh. sanguineus-Leishmania*, com o objetivo de elucidar alguns aspectos dessa interação, na resposta imune desta espécie de carrapato.

Após a caracterização dos hemócitos do *Rh. sanguineus*, realizamos uma infecção experimental com promastigotas de *L. infantum*, para avaliar a viabilidade desse protozoário no carrapato, além de avaliar a sua resposta imune frente a essa infecção. Pudemos observar a presença de *Leishmania* em *Rh. sanguineus*, assim como, o aumento da expressão gênica até o 7º dia após a infecção, sugerindo que as promastigotas de *L. infantum* inoculadas na hemocèle, permanecem viáveis no *Rh. sanguineus*, uma vez que ainda encontram-se em ativo estágio de expressão gênica. Esse dado é reforçado por estudo de Prina et al. (2007), com o intuito de monitorar a degradação do DNA de *Leishmania amazonensis* após tratamento, que foi possível concluir que, após a morte parasitária, o DNA degradou-se em 1 h, restando menos de 1% de DNA parasitário, logo as mesmas não poderiam expressar seus genes.

Além da presença do parasita observamos que a população hemocitária do *Rh. sanguineus*, aumenta significativamente durante a infecção, com maior percentual de plasmatócitos e granulócitos. Esta característica têm sido bem descrita na literatura em estudos com outras espécies de carrapatos e invertebrados. De acordo com Sonenshine e Hynes, (2008), quando os carrapatos são expostos a bactéria, vírus, protozoários ou outros

microrganismos, a população hemocitária aumenta significativamente por vários dias, até que a invasão tenha sido combatida, pois os hemócitos destes invertebrados estão diretamente envolvidos na resposta imune inata para controlar a infecção. Silva et al. (2002), Hillyer e Christensen (2002) e Hillyer et al. (2005) descreveram que estas alterações na contagem dos hemócitos ocorre porque estes tipos celulares desempenhem um papel importante na resposta imune celular dos invertebrados contra patógenos invasores.

Dentre as alterações nas percentagens dos tipos celulares encontrados na hemolinfa de carrapatos infectados, observamos uma diminuição na proporção de prohemócitos no grupo desafiado. Estudos anteriores demonstraram que prohemócitos são produzidos em órgãos hematopoiéticos e na hemolinfa de várias espécies de insetos e podem funcionar como células tronco, nas quais, após estímulo, se diferenciam em outros tipos celulares (YAMASHITA; IWABUCHI, 2001; LING et al., 2005). Portanto, a diminuição de prohemócitos em nosso estudo pode está relacionado à diferenciação de hemócitos em plasmatócitos e granulócitos, os quais foram encontrados em maior proporção, mostrando relação com o aumento da expressão do gene da *Leishmania*, nestes mesmos tempos analisados (1 2 e 5 dpi). Johns et al. (1998), em estudo realizado com carrapato *Dermacentor variabilis*, observaram que a população de hemócitos aumentou significativamente dentro de 48 horas, quando inoculados com a bactéria *Bacillus subtilis*. Ainda inoculando esta mesma espécie de carrapato com espiroqueta, *Borrelia burgdorferi*, observou-se um aumento na população de hemócitos, logo na primeira hora após a infecção. Por outro lado, ocorreu uma diminuição dos hemócitos nas primeiras 24h, logo após a destruição de todas as bactérias da hemolinfa do carrapato.

No entanto encontramos um aumento percentual de granulócitos e plasmatócitos em nosso estudo, que permaneceu elevado em todos os tempos analisados. Provavelmente o aumento da população total de hemócitos está associado a esses dois tipos celulares, que são as principais células relacionadas ao processo de fagocitose. Johns et al., (1998) e Inoue et al., (2001), em estudo realizado com *Ornithodoros moubata* inoculado com partículas de látex, também observaram aumento na proporção de plasmatócitos e granulócitos até 72 h após a inoculação, também corroborando com nossos achados. Como discutido por outros autores, as células fagocíticas aumentam na hemolinfa, até que o patógeno seja eliminado, porém em nosso estudo só avaliamos essa dinâmica hemocitária até o 5º dpi, quando ainda observamos a existência do patógeno.

Nos nossos ensaios de fagocitose, observamos que dos cinco tipos celulares, apenas granulócitos e plasmatócitos realizaram fagocitose de partículas de látex e promastigotas de *L. infantum*. O nosso estudo é pioneiro na caracterização funcional ultraestrutural de hemócitos de carrapatos da espécie *Rh. sanguineus*, especialmente com os ensaios de fagocitose com *Leishmania*. Quando comparamos nossos resultados a outros trabalhos com carrapatos, Argasídeos, moles e Ixodídeos, duros, os nossos resultados estão de acordo com os achados dos demais autores que demonstram que plasmatócitos e granulócitos possuem atividade fagocítica em ambos os tipos de carrapatos (KUHN, HAUG, 1994; PEREIRA et al., 2001; INOUE et al. 2001; BOROVIČKOVA; HYPŠA, 2005). Buresová et al. (2006), em estudo com *Ornithodoros moubata* e *Ixodes ricinus* infectados com bactéria Gram-negativa, *Chryseobacterium indologenes*, observaram que a bactéria é fagocitada na hemocele por hemócitos de ambas as espécies de carrapatos estudados, eliminando o patógeno completamente da hemocele do carrapato. Os mesmos resultados foram encontrados por Johns et al. (2000), em estudo com *Dermacentor variabilis* inoculados com a bactéria *Borrelia burgdorferi* na hemolinfa e combater a multiplicação bacteriana. Diferindo do nosso estudo, no qual apesar de descrevermos a fagocitose de *Leishmania* por hemócitos, não observamos a eliminação total do protozoário na hemolinfa do carrapato nos períodos analisados. A *Leishmania* pode ter desenvolvido algum mecanismo para conseguir sobreviver na hemocele do *Rh. sanguineus* por pelo menos, 7 dpi. O período para eliminação do parasita também não está esclarecido na literatura, porém podemos observar em estudos de fagocitose de hemócitos de *Ixodes ricinus* inoculados com bactéria *Micrococcus lysideicticus*, a eliminação do agente patogênico pode ocorrer até 24 h após a inoculação (KUHN; HAUG, 1994). A literatura também demonstra fagocitose de fungos, *Candida haemulonii* e *Penicillium* spp., por hemócitos de carrapatos *Ornithodoros moubata* e *Boophilus microplus*. (LOSSOVÁ et al., 2001; SILVA et al. 2006). Dessa forma já está bem descrito na literatura que hemócitos de carrapatos são capazes de fagocitar bactérias, partículas de látex e fungos, e este é o primeiro estudo que descreve a fagocitose de promastigotas de *L. infantum*.

Fagocitose de protozoários por hemócitos de invertebrados foi descrita anteriormente, em inseto *Rhodnius prolixus*, onde foi observado que plasmatócitos são capazes de fagocitar o protozoário flagelado *Trypanosoma rangeli*, observando flagelados íntegros e em processo de degeneração no interior dos hemócitos (OLIVEIRA; DE SOUZA, 2003). Estas mesmas características também foram observadas em nosso estudo, no entanto

vale salientar que o *R. prolixus* é o principal vetor para o *T. rangeli*, interação não descrita entre *Rh. sanguineus* e *Leishmania*.

Além do processo de fagocitose, a melanização é outro método bastante utilizado pelos artrópodes para destruir patógenos na hemocele, particularmente bactérias Gram-negativas e para organismos maiores que não podem ser fagocitados. O papel da melanização e atividade dos peptídeos antimicrobianos tem sido estudado como importantes mecanismos dos hemócitos para fagocitar e destruir microrganismos, porém os detalhes desses mecanismos não são bem compreendidos em carrapatos (INOUE et al., 2001). A maior parte dos estudos sobre melanização está relacionada a estudo com insetos, e pouco é conhecido sobre o sistema de ativação da fenoloxidase (PO) em aracnídeos. Em nosso estudo com *Rh. sanguineus* observamos um aumento da atividade de PO na hemolinfa, no grupo inoculado com promastigotas de *L. infantum*. O aumento da atividade da PO foi observado no 5 dpi e pode está relacionado à maior expressão do gene do parasita no carrapato, indicando uma maior presença do parasita.

A maior atividade de PO na hemolinfa também foi registrada em estudos realizados com insetos, como o estudo de Melo et al. (1995) em *R. prolixus* infectado com *T. rangeli* que observaram o aumento da atividade de PO no 1º e 2º dpi com o flagelado. Também foi observada maior atividade de PO na hemolinfa de *Spodoptera litura* infectado com o fungo *Beauveria bassiana* (BALI; KAUR, 2013). A PO é produzida pelos hemócitos e, portanto uma maior concentração de PO na hemolinfa está associada à lise dos mesmos (GONZÁLEZ-SANTOYO et al, 2012). Em nosso estudo observamos aumento da população total de hemócitos nos dias 1 e 2 após a infecção não sendo registrado alteração no 5º dpi entre os grupos infectado e controle. Esse fato pode está associado à lise celular com liberação da PO na hemolinfa para combater o parasita. Os tipos celulares produtores de PO em *Rh. sanguineus* foram granulócitos, esferulócitos e plasmatócitos. Vale salientar que nenhum trabalho até o momento identificou o tipo de hemócitos com atividade de PO em carrapatos. Porém, em insetos vários tipos celulares podem ser responsáveis pela produção da PO, que pode variar de acordo com as espécies, como oenocitóide em *Bombyx mori* e outros Lepidópteros (LU et al., 2014), Oenocitóide, células granulares e esferulócitos em *Manduca sexta* (LING et al., 2005).

Alguns estudos com invertebrados demonstram a importância do óxido nítrico na resposta imune humoral contra diversos patógenos invasores. Este intermediário reativo de

nitrogênio desempenha um importante papel no arsenal citotóxico para destruir os organismos estranhos na hemocele do hospedeiro e está intimamente ligado ao processo de fagocitose (FARALDO et al. 2005). Nosso estudo demonstrou aumento crescente da concentração de óxido nítrico na hemolinfa de adultos de *Rh. sanguineus* infectados com *L. infantum* no 1º, 2º e 5º dpi. Coincidentemente, em nosso estudo, podemos observar nesses mesmos tempos um aumento em plasmatócitos e granulócitos que estão comprovadamente relacionado a fagocitose do parasita. Desta forma podemos sugerir que o aumento na concentração do NO está associado a maior percentagem destas células na hemolinfa. Pouco é conhecido sobre a produção de NO em aracnídeos, a maioria dos estudos foram desenvolvidos com insetos. Nappi et al. (2000) observaram aumento da produção de NO por *Drosophila melanogaster* infectada com a vespa *Leptopilina boulardi*, e por Faraldo et al. (2005), quando avaliou o efeito da inoculação do fungo *Saccharomyces cerevisiae* em larvas de *Chrysomya megacephala*, corroborando com nossos achados. Porém o Faraldo et al. (2005) observaram um pico de produção de óxido nítrico 24 horas após a inoculação, seguida de uma queda, fato que não foi encontrado em nosso estudo.

Diante do exposto, nossos resultados sugerem que o *Rh. sanguineus* ativa a resposta imune celular e humoral após a infecção com a *L. infantum*, porém mais estudos são necessários para avaliar o impacto dessa resposta no combate a infecção.

Investigamos também, a expressão do gene defensina e glutathione-S-Transferase em fêmeas de *Rh. sanguineus* inoculados com *L. infantum* porque observamos que poucos estudos têm caracterizado a expressão de genes em carrapatos envolvidos na resposta à infecção patogênica. Expressão diferencial de genes em resposta a algumas infecções foram caracterizados em *Ixodes ricinus* e *I. scapularis* infectados com *B. burgdorferi* em resposta a infecção por *D. variabilis*. A elucidação dos genes induzidos proporciona uma melhor compreensão da competência do *I. ricinus* como um vetor de *B. burgdorferi* e permitir uma comparação mais direta com carrapatos que não funcionam como vetor, como *D. variabilis* (RUDENKO et al., 2005). No nosso estudo com *Rh. sanguineus*, observamos a alteração na expressão diferencial dos genes defensina e GST após a infecção com *L. infantum* na hemocele, e observamos uma alteração da expressão da defensina, no 7º dia após a infecção, quando ocorreu um aumento na expressão comparado ao grupo controle, não sendo observada alteração nos demais tempos. Já a expressão de GST, ocorreu alteração no 1º e 2º dpi. Assim como no trabalho de Rudenko et al. (2005), que observou resposta do *D. variabilis* quando

infectado com *B. burgdorferi*, o *Rh. sanguineus* também não é descrito como o principal vetor para *L. infantum*, mas responde a infecção alterando a expressão de GST e defensina, moléculas importantes na interação parasita hospedeiro. Mulega et al. (2003) também avaliaram aumento da expressão de GST em ovários de *Dermacentor variabilis* infectados com *Rickettsia*. De la Fuente et al. (2007) avaliaram o papel da bactéria *Anaplasma marginale* na alteração da expressão do gene GST, no *D. variabilis*, e descreveram um elevada expressão desse gene durante a infecção. Kocan et al. (2009), realizaram silenciamento do gene GST em *D. variabilis*, para avaliar o impacto sobre o desenvolvimento do *A. marginale* e observaram que após o silenciamento do gene, ocorreu inibição da infecção no intestino e nas glândulas salivares.

As GSTs são conhecidas por desempenharem um importante papel nas respostas celulares ao estresse oxidativo e, portanto podem trazer benefícios aos patógenos através da diminuição do efeito deletério que os metabólitos do estresse oxidativo celular pode desempenhar sobre o desenvolvimento e a multiplicação bacterianas, dessa forma é compreensível que o aumento da expressão de GST esteja correlacionado com o desenvolvimento da infecção. Já em nosso estudo, o aumento da expressão da GST ocorreu no 1º e 2º dia, momento em que descrevemos uma menor expressão do gene para leishmania, não apresentando alteração nos demais tempos que apresentaram uma maior expressão do gene do parasito. Dessa forma nossos resultados diferem dos achados dos demais autores, porém nossos estudos foram realizados com protozoário, modelo ainda não descrito. Possivelmente, no modelo *Rh. sanguineus-Leishmania*, o aumento da expressão do gene GST no carrapato tenha favorecido o estabelecimento do parasita uma vez que foi observado uma expressão do gene do parasita até o 7º dpi, porém a diminuição da expressão do gene de *Leishmania* encontrada no início da infecção pode está relacionada a resposta imune celular que apresentou aumento significativo exatamente no 1º e 2º dpi.

Ceraul et al. (2003), observaram em *Dermacentor variabilis* aumento na expressão de defensinas, após o inoculação com bactérias *B. burgdorferi*. Os autores sugerem que a defensina seja disponibilizada na hemolinfa nas primeiras 24 horas após a inoculação, podendo permanecer em níveis aumentados até 48 h, como também têm sido encontrado em estudos com insetos (MITA et al., 1999). Estes dados diferem do nosso estudo, no qual observamos aumento da expressão da defensina apenas no 7º dia após a inoculação com *L. infantum*.

Em estudo com *D. variabilis*, utilizando western blot, verificou-se a presença de defensina em lisados de hemócitos coletados de carrapatos não estimulados, sugerindo que a defensina esteja armazenado nos hemócitos do carrapato e é libertado na hemolinfa após estimulação bacteriana (CERAUL et al., 2003). Esta hipótese também é reforçada em trabalhos com *Ornithodoros moubata*, onde foram encontradas duas isoformas de defensinas sendo expressa, 1 h após inoculação com as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (NAKAJIMA et al., 2001). Quando comparamos nossos achados com o trabalho realizado por Boulanger et al. (2004), que estudaram a cinética da indução de defensina em *Phlebotomus duboscqi* infectado com *L. major*. A mensuração foi realizada em tempos correspondentes ao ciclo da *L. major*, no flebótomo, que foi até o 1º dia, diferenciação de amastigotas e promastigotas, 4º dia, rápida multiplicação e 10º dia último estágio infeccioso. Os autores observaram que ocorreu pouca indução de defensina até o 10º dia de infecção, quando foi encontrado um aumento de quatro vezes em relação aos demais tempos, neste momento, onde os parasitas na de forma promastigotas eram abundantes. Em nosso estudo encontramos um aumento no 7º dpi, corroborando com o período que encontramos maior expressão do gene para *Leishmania*, porém o nosso estudo não ocorreu com o vetor natural e ainda trabalhamos com formas promastigotas. Ainda no estudo de Boulanger et al. (2004), também foi realizada uma inoculação direta com promastigotas e observou-se um aumento nos níveis de expressão da defensina apenas no 4º dia após a infecção. Em estudo de Telleria et al. (2013) com fêmeas adultas alimentadas com sangue ou sangue com *L. mexicana*, observou-se a que a expressão defensina aumentou acentuadamente em 48 h e, em seguida, diminuiu lentamente até 144 h pós alimentação. Em outro grupo de flebótomos injetados com promastigotas de *L. mexicana*, observou-se uma expressão reduzida de defensina após a inoculação, mostrando uma elevação 72h após a inoculação quando comparado ao grupo controle. Por outro lado, o estudo de Telleira et al. (2013) conclui que o elevado número de parasitas está correlacionado com a baixa expressão da defensina. Já em nosso estudo ocorreu um aumento da expressão da defensina, correlacionado com o aumento da expressão do parasita, no 7º dia após a inoculação com *L. infantum*, discordando dos achados de Telleira et al. (2013). Porém no nosso estudo não utilizamos um modelo de interação parasita-vetor competente e, portanto mais estudos são necessários para elucidar os aspectos dessa interação.

7. CONCLUSÃO

Estes resultados sugerem, que após a infecção com a *L. infantum* a resposta imune celular e humoral em *Rh. sanguineus* é ativada, porém a infecção não é combatida. No entanto mais estudos são necessários para avaliar o impacto dessa resposta no combate à infecção.

REFERÊNCIAS

- ASGARI, S. SCHIMIDT, O. Is cell surface involved in phagocytosis by insect hemocytes. **Journal of insect Physiology**, Oxford-GB, v. 49, p. 545-550, 2003.
- ANDERSON, J. M., SONENSHINE, D. E., VALENZUELA, J. G. Exploring the mialome of ticks: an an notated catalogue of midgut transcripts from the hard tick, *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae). **BMC Genomics**, London-GB, v. 9, n. 9, p. 552, 2008.
- ANTHONY, J. et al. Nitric Oxide Involvement in Drosophila Immunity. Nitric oxide: **Biology and Chemistry**, Orlando-US, v. 4, n. 4, p. 423–430, 2000.
- ASHIDA, M.; BREY, P.T. Recent advances in research on the insect prophenoloxidase cascade. Molecular Mechanisms of Immune Responses in Insects. **Chapman & Hall**, London, p. 135–172, 1998.
- BALI, G. K.; KAUR, S. Phenoloxidase activity in haemolymph of *Spodoptera litura* (Fabricius) mediating immune responses challenge with entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillmin. **Journal of Entomology and Zoology Studies**, [S.l.], v. 1, n. 6, p. 118-123, 2013.
- BANETH, G. Perspectives on canine and feline hepatozoonosis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam-NL, v.181, p.3–11, 2011.
- BANETH, G.; SAMISH, M.; SHKAP, V. Life cycle of *Hepatozoon canis* (Apicomplexa: adeleorina: Hepatozoidae) in the tick *Rhipicephalus sanguineus* and domestic dog (*Canis familiaris*). **Journal of Parasitology**, Lawrence-US, v. 93, n. 2, p. 283–299, 2007.
- BARKER S. C.; MURRELL, A. Systematics and evolution of ticks with a list of valid genus and species names. **Parasitology**, London-GB, v. 129, p. S15-S36, 2004.
- BECHARA, et al. *Rhipicephalus sanguineus* in Brazil: feeding and reproductive aspects under laboratorial conditions. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, BR. v. 4, p. 61–66, 1995.
- BERMUDEZ, J. M. V. et al. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. **Immunological Reviews**, Copenhagen-DK, v. 198, p. 169–84, 2004.
- BEZERRA-VASCONCELOS, D. R. et al. Real-time PCR to assess the *Leishmania* load in *Lutzomyia longipalpis* sand flies: screening of target genes and assessment of quantitative methods. **Experimental Parasitology**, New York, US, v. 129, n. 3, p. 234-9, 2011.
- BHATTACHARYA, S. T. et al. Nitric Oxide Synthase and cGMP Activity in the Salivary Glands of the American Dog Tick *Dermacentor variabilis*. **Experimental Parasitology**, New York-US , v. 94, p. 111–120, 2000.

- BOROVICKOVÁ, B.; HYPŠA, V. Ontogeny of tick hemocytes: a comparative analysis of *Ixodes ricinus* and *Ornithodoros moubata*. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam-NL, v. 35, p. 317–333, 2005.
- BORGES A. R. et al. Phagocytosis of latex beads and bacteria by hemocytes of the triatominae bug *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae). **Micron**, Oxford, GB, v. 39, n. 4, p. 486-94, 2008.
- BOULANGER, N. et al. Characterization of a defensin from the sand fly *Phlebotomus duboscqi* induced by challenge with bacteria or the protozoan parasite *Leishmania major*. **Infection and immunity**, Washington, US, v. 72, p. 7140–7146, 2004.
- BOULANGER, N.; BULET, P.; LOWENBERGER, C. Antimicrobial peptides in the interactions between insects and flagellate parasites. **TRENDS in Parasitology**, Oxford, GB, v. 22, n. 6, 2006.
- BRAYNER, F. A. et al. Ultra-structural characterization of the hemocytes of *Culex quinquefasciatus* (DIPTERA: Culicidae), **Micron**, Oxford-GB, v. 36, p. 359-367, 2005.
- BRIANTI, E. et al. *Rhipicephalus sanguineus* (Ixodida, Ixodidae) as intermediate host of a canine neglected filarial species with dermal microfilariae. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam-NL, v. 183, p. 330–337, 2012.
- BURESOVÁ, V. et al. IrAM-An alpha2-macroglobulin from the hard tick *Ixodes ricinus*: characterization and function in phagocytosis of a potential pathogen *Chryseobacterium indologenes*. **Developmental & Comparative Immunology**, Elmsford-US, v. 33, p. 489-498, 2009.
- BURESOVÁ, V.; FRANTA, Z.; KOPACEK, P. A comparison of *Chryseobacterium indologenes* pathogenicity to the soft tick *Ornithodoros moubata* and hard tick *Ixodes ricinus*. **Journal Invertebrate Pathology**, New York-US, v. 93, p. 96–104, 2006.
- CARNEIRO, M.E., DAEMON, E. Caracterização dos tipos celulares presentes na hemolinfa de adultos de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (IXODOIDEA: Ixodidae) em diferentes estados nutricionais. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, BR, v.6, n.1, p.1-9, 1997.
- CARNEIRO, M. E., DAEMON, E. Influência de diferentes temperaturas sobre os tipos celulares presentes na hemolinfa de adultos de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (IXODOIDEA: Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, BR, v. 10, n. 1, p. 21-27, 2001.
- CERAUL, S. M.; SONENSHINE, D. E.; HYNES, W. L. Resistance of the tick *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae) following challenge with the bacterium *Escherichia coli* (Enterobacteriales: Enterobacteriaceae). **Journal of Medical Entomology**, Honolulu-US, v. 39, p. 376-383, 2002.

CERAUL, S. M.; SONENSHINE, R. R. E.; HYNES, W. L. An arthropod defensin expressed by the hemocytes of the American dog tick, *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford-GB, v. 33, p. 1099–103, 2003.

CHEN, T. et al. Nitric oxide as an antimicrobial molecule against *Vibrio harveyi* infection in the hepatopancreas of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Fish & Shellfish Immunology**, [S.l.] v. 42, p. 114-120, 2015.

CHOMCZYNSKI, P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. **Biotechniques**, Natick-US, v. 15, n. 3, p. 532-4, 1993.

CHRUDEMSKA, T. et al. New defensins from hard and soft ticks: Similarities, differences and phylogenetic analyses. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam-NL, v. 167, p. 298-303, 2011

CITELLI, M. et al. Oxidative stress impairs heme detoxification in the midgut of the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam-NL, v. 51, n. 1, p. 81-8, 2006.

COLASANTI, M., LAURO, G. M., VENTURINI, G. NO in hydra feeding response. **Nature**. v. 374, n. 505, 1995.

COLASANTI, M.; VENTURINI, G. Nitric Oxide in Invertebrates. **Molecular Neurobiology**, New York, US, v. 17, n. 1-3, p. 157-174, 1998.

COLOMBO et al. Detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* RNA in fleas and ticks collected from naturally infected dogs. **Parasitology Research**, Berlin-DE, v. 109, n. 2, p. 267-74, 2011.

COUTINHO, M. T. Z. et al. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, Berlin-DE, v. 128, p. 149-155, 2005.

COUTINHO, M. T. Z., LINARDI, P. M. Can fleas from dogs infected with canine visceral leishmaniasis transfer the infection to other mammals? **Veterinary Parasitology**, Berlin-DE, v. 147, p. 320–325, 2007.

DA SILVA, S. B.; SAVASTANO, G.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Tipos celulares envolvidos na resposta imune de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* inoculados com *Metarhizium anisopliae* e *Penicillium* spp. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo-BR, v. 15, n. 3, p. 128-131, 2006.

DA SILVA, V. I. et al. Cloning, expression and partial characterization of a *Haemaphysalis longicornis* and a *Rhipicephalus appendiculatus* glutathione S-transferase. **Insect Molecular Biology**, Oxford, GB, v. 13, p. 329–335, 2004.

DANG, X. L. et al. Purification and Characterization of an Antimicrobial Peptide, Insect Defensin, from Immunized House Fly (Diptera: Muscidae). **Journal Medical Entomology**, Honolulu, US, v. 47, n. 6, p. 1141-1145, 2010.

DANTAS-TORRES F: The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille,1806) (Acari: Ixodidae): From taxonomy to control. **Veterinary parasitology**, Amsterdam-NL, v.152, n.3, p.173–85, 2008.

DANTAS-TORRES, et al. Detection of *Leishmania infantum* in *Rhipicephalus sanguineus* ticks from Brazil and Italy. **Parasitology Research**, Berlin, DE, v. 6, p. 857–860, 2010.

DANTAS-TORRES, F.; OTRANTO, D. Cold-stress response of engorged females of *Rhipicephalus sanguineus*. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam-NL, v. 54, n. 3, p. 313-8, 2011.

DE LA FUENTE, J. et al. Functional genomic studies of tick cells in response to infection with the cattle pathogen, *Anaplasma marginale*. **Genomics**, San Diego CA, US, v. 90, p. 712-722, 2007.

DE LA FUENTE, J. et al. Overview: Ticks as vectors of pathogens that cause disease in humans and animals. **Frontiers in Bioscience**, Tampa, US, v. 13, p. 6938–6946, 2008.

DE MIRANDA, R. L. et al. Oocysts of *Hepatozoon canis* in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* collected from a naturally infected dog. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam-NL, v. 177, p.392–396, 2011.

DE MORAIS, R. et al. Detection of *Leishmania infantum* in animals and their ectoparasites by conventional PCR and real time PCR. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, NL, v. 59, p. 473–481, 2013.

DREHER-LESNICK, S. M. et al. Differential expression of two glutathione S-transferases identified from the American dog tick, *Dermacentor variabilis*. **Insect Molecular Biology**, Oxford, GB, v. 15, n. 4, p. 445-453, 2006.

EGGENBERGER, L. R.; LAMOREAUX, W. J.; COONS, L. B. Hemocytic encapsulation of implants in the tick *Dermacentor variabilis*. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam-NL, v. 9, p. 279-287, 1990.

FARALDO, A. C. et al. Nitric oxide production in blowfly hemolymph after yeast inoculation. **Nitric Oxid**, [S.l], v. 13, p. 240-246, 2005.

FARALDO, A.C. et al. Prophenoloxidase activation in blowfly hemolymph after yeast inoculation. **Anais do XIII Congresso da Sociedade Brasileira de Biologia Celular**, Rio de Janeiro-BR, p. 136, 2006.

FERREIRA et al. Potential role for dog fleas in the cycle of *Leishmania* spp. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam-NL, v. 165, p. 150–154, 2009.

FIGUEIREDO, M. B. et al. Cellular immune response in *Rhodnius prolixus*: role of ecdysone in hemocyte phagocytosis. **Journal of insect physiology**, Oxford-GB, v. 52, p. 711 – 716, 2006.

FILIPPOVA, N. A. Classification of the subfamily Amblyomminae (Ixodidae) in connection with a reinvestigation of the chaetotaxy of the anal valves. **Journal of Parasitology**, Lawrence-US, v. 28, p. 3-12, 1994.

FLOROU, D. et al. Effect of doxorubicin, oxaliplatin, and methotrexate administration on the transcriptional activity of BCL-2 family gene members in stomach cancer cells. **Cancer Biology & Therapy**, Georgetown, US, v. 14, n. 7, p. 587–596, 2013.

FOGACA, A. C. et al. Cysteine-rich antimicrobial peptides of the cattle tick *Boophilus microplus*: isolation, structural characterization and tissue expression profile. **Developmental & Comparative Immunology**, Elmsford-US, v. 28, p. 191–200, 2004.

FOONGLADDA, S. et al. Rickettsia, Ehrlichia, Anaplasma, and Bartonella in ticks and fleas from dogs and cats in Bangkok. **Vector Borne Zoonotic Disease**, v. 11, p. 1335-41, 2011.

FRANSSENS, V. et al. Eicosanoids mediate the laminarin-induced nodulation response in larvae of the flesh fly, *Neobellieria bullata*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 59, n. 1, p. 32–41, 2005.

GALATI, E. A. B. et al. Estudo de flebotomínios (*Díptera: Psychodidae*) em foco de leishmaniose visceral, no Estado de Mato do Sul, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, BR, v. 31, n. 4, p. 378-390, 1997.

GANDHE, S. et al. A novel immune up-regulated protein mediates nodulation response in insects. **Journal of immunology**, Baltimore-US, v. 179, p. 6943-6951, 2007.

GAO, J. et al. Cloning and characterization of a cDNA clone encoding calreticulin from *Haemaphysalis qinghaiensis* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, Berlin-DE, v. 102, n. 4, p. 737-46, 2008.

GIANNELLI, A. Comments on potential efficacy of monthly administrations of spot-on moxidectin 2.5 %/imidacloprid 10 % in the simultaneous prevention of major canine filarioses. **Parasitology Research**, Berlin-DE, v. 112, n. 11, p. 3979-3980, 2013.

GILLESPIE, J. P., KANOST, M. R., TRENCZEK, T. Biological mediators of insect immunity. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto-US, v. 42, p. 611–643, 1997.

GONTIJO F. M. C.; MELO, M. M. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, BR, v. 7, n. 3, 2004.

GONZALEZ-DOMENECH, C. M.; MUNOZ-CHAPULI, R. Molecular evolution of nitric oxide synthases in metazoans. Comparative biochemistry and physiology - Part D - **Genomics & Proteomics**, Amsterdam-NL, v. 5, n. 4, p. 295-301, 2010.

GONZÁLEZ-SANTOYO, I.; CÓRDOBA-AGUILAR, A. Phenoloxidase: a key component of the insect immune system. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Amsterdam-NL, v. 142, n. 1, p. 1–16, 2012.

GRIESCH, J.; EDDE, M.; VILCINSKAS, A. Recognition and regulation of metalloproteinase activity in the hemolymph of *Galleria mellonella*: a new pathway mediating induction of humoral immune responses. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford-GB, v. 30, p. 461-472, 2000.

GRUBHOFFER, L.; KOVÁŘ, V. Arthropod lectins: affinity approaches in analysis and reparation of carbohydrate binding proteins. A. Wiesner, G.B. Dunphy, V.J. Marmaras, I. Morishima, M. Sugumaran, M. Yamakawa (Eds.), **Techniques in Insect Immunology FITC-5, SOS Publications**, New Haven, CT, p. 47–57, 1998.

GRUBHOFFER, L.; MATHÁ, V. New lectins in invertebrates. **Zoological Science**, [S.l.], v. 8, p. 1001–1003, 1991.

GRUBHOFFER, L.; V. KOVA, R.; RUDENKO N. Tick lectins: structural and functional properties. **Parasitology**, London, GB, v. 129, p. 113–S125, 2004.

GRUBHOFFER, L.; VERĚS, J.; DUSBÁBEK, F. Lectins as the molecular factors of recognition and defence reaction of ticks. **Modern Acarology**, Prague-CZ, v. 2, p. 381–388, 1991.

GRUNCLOVA, L. Et al. Lysozyme from the gut of the soft tick *Ornithodoros moubata*: the sequence, phylogeny and post-feeding regulation. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, Oxford-US, v. 27, p. 651–660, 2003.

GRUNCLOVA, L. M. et al. Two secreted cystatins of the soft tick *Ornithodoros moubata*: differential expression pattern and inhibitory specificity. **Biological Chemistry**, Berlin-DE, v. 387, p. 1635-1644, 2006.

GUDDERRA, N. P. et al. Hemolymph proteins in ticks. **Journal of Insect Physiology**, Oxford-GB, n. 48, p. 269-278, 2002.

GUPTA, A. P. Hemocytes of *Scutigerella immaculate* and the ancestry of Insecta. **Annals of the Entomological Society of America**, College Park-US, v. 61, p. 1028-1029, 1968.

GUPTA, A. P. Insect immunocytes and other hemocytes: roles in cellular and humoral immunity. **Immunology of Insects and Other Arthropods**, [S.l.], p. 19–118, 1991.

HABEE, S. M. EL-HAG, H. A. A. Ultrastructural Changes in Hemocyte Cells of Hard tick (*Hyalomma dromedarii*: Ixodidae): A model of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* H14 - endotoxin mode of action. **American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences**, [S.l.], v. 3, n. 6, p. 829-836, 2008.

HAHN, U. K., BENDER, R. C., BAYNE, C. J. Involvement of nitric oxide in killing of *Schistosoma mansoni* sporocysts by hemocytes from resistant *Biomphalaria glabrata*. **Journal of Parasitology**, Lawrence, US, v. 87, p. 778–785, 2001.

HAJDUŠEK, O. et al. Interaction of the tick immune system with transmitted pathogens. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [S.l.], v. 16, 2013.

HAYES, J. D.; FLANAGAN, J. U.; JOWSEY, I. R. Glutathione transferases. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, Palo Alto, US, v. 45, p. 51–88, 2005.

HE, H. et al. Characterization and molecular cloning of a glutathione S-transferase gene from the tick, *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, GB, v. 29, p. 737–743, 1999.

HELLIO, C. et al. Demonstration of a true phenoloxidase activity and activation of a ProPO cascade in Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg) in vitro. **Fish Shellfish Immunology**, [S.l.], v. 22, n. 4, p. 433–40, 2007.

HILLYER, J. F. et al. Age-associated mortality in immune challenged mosquitoes (*Aedes aegypti*) correlates with a decrease in haemocyte numbers. **Cellular Microbiology**, Oxford-GB, v. 7, p. 39–51, 2005.

HILLYER, J. F.; BARREAU, C.; VERNICK, K. D. Efficiency of salivary gland invasion by malaria sporozoites is controlled by rapid sporozoite destruction in the mosquito haemocoel. **International Journal Parasitology**, [S.l.], v. 37, n. 6, p. 673–681, 2007.

HILLYER, J. F.; CHRISTENSEN, B. M. Characterization of hemocytes from yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. **Histochemistry and Cell Biology**, Berlin-DE, v. 117, p. 43 – 440, 2002.

HOOGSTRAAL, H.; AESCHLIMANN, A. Tick-host specificity. **Bull of Society Entomology Suisse**, [S.l.], v. 55, p. 5–32, 1982.

HYNES, W. L. et al. A defensin-like gene expressed in the black-legged tick, *Ixodes scapularis*. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford-GB, v. 19, p. 339–344, 2005.

IMAMURA, M.; YANG, J.; YAMAKAWA, M. cDNA cloning, characterization and gene expression of nitric oxide synthase from the silkworm, *Bombyx mori*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford-GB, v. 11, p. 257–265, 2002.

INOUE, N. et al. Characterization of phagocytic hemocytes in *Ornithodoros moubata* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, Honolulu-US, v. 38, p. 514–519, 2001.

IWANAGA, S.; LEE, B.L. Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, Seoul, KR, v. 38, p. 128–150, 2005.

JIANG H, WANG Y, MA C, KANOST MR. Subunit composition of pro-phenoloxidase from *Manduca sexta*: molecular cloning of subunit proPO-P1. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, GB, v. 27, p. 835–850, 1997.

JIRAVANICHPAISAL P, LEE BL, SODERHALL K. Cell-mediated immunity. **Immunobiology**, Stuttgart, DE, v. 211, n. 4, p. 213–236, 2006.

JOHN, F.; ANDERSON, J. F.; MAGNARELLI, L. A. Biology of Ticks. **Infectious Disease Clinics of North America**, Philadelphia-US, v. 22, p. 195–215, 2008.

JOHNS, R.; SONENSHINE, D. E.; HYNES W. L. Identification of a defensin from the hemolymph of the American dog tick, *Dermacentor variabilis*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford-GB, v. 31, p. 857– 65, 2001.

JOHNS, R.; SONENSHINE, D. E.; HYNES, W. L. Control of bacterial infections in the hard tick *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae): evidence for the existence of antimicrobial proteins in tick hemolymph. **Journal of Medical Entomology**, Honolulu-US, v. 35, p. 458–464, 1998.

JOHNS, R.; SONENSHINE, D. E.; HYNES, W. L. Response of the tick *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae) to hemocoelic inoculation of *Borrelia burgdorferi* (Spirochetales). **Journal of Medical Entomology**, Honolulu-US, v. 37, p. 265–270, 2000.

JONGEJAN, F., UILENBERG, G. The global importance of ticks. **Parasitology Research**, Berlin, v. 129, S1, p.S3–S14, 2004.

KADOTA, K. et al. Morphological and Populational Characteristics of Hemocytes of *Ornithodoros moubata* Nymphs During the Ecdysial Phase. **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, US, v. 40, n. 6, p. 770–776, 2003.

KADOTA, K. et al. Existence of phenol oxidase in the argasid tick *Ornithodoros moubata*. **Parasitology Research**, Berlin, DE, v. 88, p. 781–784, 2002.

KAMWENDO, S. P. et al. Haemagglutinin activity in tick (*Rhipicephalus appendiculatus*) haemolymph and extracts of gut and salivary glands. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, Liverpool-GB, v. 87, p. 303–305, 1993.

KEIRANS, J. E. Order Ixodida. A manual of acarology. **Texas Tech University**. 3rd ed Press, p.111–123, 2009.

KLOMPEN, J. S. H.; OLIVER, J. H. Systematic relationships in the soft ticks (Acari: Ixodida: Argasidae). **Systematic Entomology**, Oxford-GB, v. 18, p. 313–331, 1993.

KANOST, M. R.; GORMAN, M. J. Phenoloxidases in insect immunity. In *Insect Immunology* (ed. Beckage, N. E.), Boston: Academic Press, p. 69–96, 2008.

KOCAN, K. M. et al. Silencing of genes involved in *Anaplasma marginale*-tick interactions affects the pathogen developmental cycle in *Dermacentor variabilis*. **BMC Developmental Biology**, London, GB, v. 9, n. 42, 2009.

KOPÁČEK, P. et al. Tick innate immunity. *Invertebrate Immunity*. 2010.

KOPACEK, P. et al. Purification and characterization of the lysozyme from the gut of *Parasitology*, Londres, UK, v. 20, p. 433–439, 1999.

KOVÁR, V.; KOPACEK, V. K, P.; GRUBHOFFER, L. Isolation and characterization of Dorin M, a lectin from plasma of the soft tick *Ornithodoros moubata*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, GB, v. 30, n. 3, p. 195–205, 2000.

KRAJE, A. C. Canine haemobartonellosis and babesiosis. **Compendium on Continuing Education for the Practising Veterinarian**, v. 23, n. 4, p. 310–319, 2001.

KUHN, K. H.; J. UHLÍŘ; GRUBHOFFER, L. Ultrastructural localization of a sialic acid—specific hemolymph lectin in the hemocytes and other tissues of the hard tick *Ixodes ricinus* (Acari: Chelicerata). **Parasitology Research**, Berlin, DE, v. 82, p. 215–221, 1996.

KUHN, K.H., HAUG, T. Ultrastructural, cytochemical, and immunocytochemical characterization of haemocytes of the hard tick *Ixodes ricinus* (Acari: Chelicerata). **Cell and Tissue Research**, Berlin, DE, v. 277, p. 493–504, 1994.

KULKARNI, M. M. Antimicrobial peptide induced apoptotic death of leishmania results from calcium-dependent, caspase-independent mitochondrial toxicity. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, US, v.84, p.15496–15504, 2009.

LABRUNA, M. B. Biologia e ecologia de *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 13, supl. 1, p. 123–124, 2004.

LAI, R. et al. Two novel non-cationic defensin-like antimicrobial peptides from haemolymph of the female tick, *Amblyomma hebraeum*. **Biochemical Journal**, London-GB, v. 1, n. 379, p. 681–5, 2004.

LAMPROU, I. et al. Distinct signaling pathways promote phagocytosis of bacteria, latex beads and lipopolysaccharide in medfly hemocytes. **Immunology**, Oxford-GB, v. 121, n. 3, p. 314–327, 2007.

LANDON, C. et al. Rational design of peptides active against the gram positive bacteria *Staphylococcus aureus*. **Proteins**, New York, US, v. 72, n. 1, 2008.

LAVINE, M. D., STRAND, M. R. Insect hemocytes and their role in immunity. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, GB, v. 32, p. 1295–1309, 2002.

LEWIS, B. Nitric Oxide Synthase and cGMP Activity in the Salivary Glands of the American Dog Tick *Dermacentor variabilis*. **Experimental Parasitology**, New York-US, v. 94, p. 111–120, 2000.

LIMA, C. A.; SASAKI, S. D.; TANAKA A. S. Bmcystatin, a cysteine proteinase inhibitor characterized from the tick *Boophilus microplus*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York-US, v. 347, p. 44–50, 2006.

LIMA, R. et al. Cloning and partial characterization of a *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) glutathione S-transferase **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, GB, v. 32, p. 747–754, 2002.

LING, E. YU, XIAO-QIANG. Prophenoloxidase binds to the surface of hemocytes and is involved in hemocyte melanization in *Manduca sexta*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford-GB, v. 35, p. 1356–1366, 2005.

LIU, F. et al. *Drosophila melanogaster* prophenoloxidases respond consistently to Cu^{2+} and have different activity *in vitro*. **Developmental and Comparative Immunology**, Elmsford, NY, v. 36, p. 619–628, 2012.

LIU, H. et al. Phenoloxidase is an important component of the defense against *Aeromonas hydrophila* infection in a Crustacean, *Pacifastacus leniusculus*. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore-US, v.282, n.46, p.33593–33598, 2007.

LOOSOVÁ, G.; JINDRAK, L.; KOPACEK, P. Mortality caused by experimental infection with the yeast *Candida haemulonii* in the adults of *Ornithodoros moubata* (Acarina: Argasidae). **Folia Parasitology**, Praha-US, v. 48, p. 149–153, 2001.

LU, A. et al. Insect prophenoloxidase: the view beyond immunity. **Frontiers in Physiology**, [S.l.], v. 5, n. 5, p. 252, 2014.

LUCKHART, S. et al. The mosquito *Anopheles stephensi* limits malaria parasite development with inducible synthesis of nitric oxide. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington-US, v.95, p.5700–5705, 1998.

LUCKHART, S.; ROSENBERG, R. Gene structure and polymorphism of an invertebrate nitric oxide synthase gene. **Gene**, Amsterdam-NL, v.232, p.25–34, 1999.

MAYER A. M. Polyphenol oxidases in plants and fungi: going places. A review. **Phytochemistry**, New York, US, v. 67, p. 2318–2331.

MEGY, K. et al. Vector Base: improvements to a bioinformatics resource for invertebrate vector genomics. **Nucleic Acids Research**, London-GB, v. 40, p. 729–734, 2012.

MELO, C. B. et al. *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*: Interplay with Hemolymph components of *Rhodnius prolixus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York -US, v. 65, p. 261–268, 1995.

MILLER, J. S.; NGUYEN, T.; STANLEY-SAMUELSON, D.W. Eicosanoids mediate insect nodulation responses to bacterial infections. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington-US, v. 91, p. 12418–12422, 1994.

MILLER J. S. Eicosanoids mediate nodulation reactions to bacterial infections in adults of the cricket, *Gryllus assimilis*. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, GB, v. 45, p. 75–83, 1999.

MITTA, G. et al. Mussel defensins are synthesised and processed in granulocytes then released into the plasma after bacterial challenge. **Journal of Cell Science**, London, GB, v. 112, p. 4233–4242, 1999.

MULENGA, A. et al. Dynamics of Rickettsia–tick interactions: identification and characterization of differentially expressed mRNAs in uninfected and infected *Dermacentor variabilis*. **Insect Molecular Biology**, Oxford, GB, v. 12, p. 185–193, 2003.

MULENGA, A. et al. Four serine protease inhibitors (serpin) from the brown ear tick, *Rhipicephalus appendiculatus*, cDNA cloning and preliminary characterization. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. Oxford, GB, v. 33, p. 237 – 276, 2003.

MURRAY, H. W. et al. Advances in leishmaniasis. **Lancet**, London, GB, v. 366, 1561–77, 2005.

NAKAJIMA, Y. et al. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore-US, v. 269, p. 13725–13728, 1994.

NAKAJIMA, Y. et al. Antibacterial peptide defensin is involved in midgut immunity of the soft tick, *Ornithodoros moubata*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, GB, v. 11, p. 611–618, 2002.

NAKAJIMA, Y. et al. Two isoforms of a member of the arthropod defensin family from the soft tick, *Ornithodoros moubata* (Acari:Argasidae). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, GB, v. 31, p. 747–751, 2001.

NAPOLITANO, A.; DI DONATO, P.; PROTA, G. New regulatory mechanisms in the biosynthesis of pheomelanins: rearrangement vs. redox exchange reaction routes of a transient 2H-1, 4- benzothiazine-o-quinonimine intermediate. **Biochimica et Biophysica Acta**, [S.l.], v. 1475, p. 47–54, 2000.

NAPPI, A. J. et al. Nitric Oxide Involvement in *Drosophila* Immunity. **NITRIC OXIDE: Biology and Chemistry**, London-GB, v. 4, n. 4, p. 423–430, 2000.

NAPPI, A. J. et al. Superoxide anion generation in *Drosophila* during melanotic encapsulation of parasites. **European Journal of Cell Biology**, Stuttgart-DE, v. 68, p. 450–456, 1995.

- NAPPI, A. J.; CHRISTENSEN, B. M. Melanogenesis and associated cytotoxic reactions: applications to insect innate immunity. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, GB, v. 35, p. 443–459, 2005.
- NAPPI, A. J.; OTTAVIANI, E. Cytotoxicity and cytotoxic molecules in invertebrates, **Bioessays**, Nova Jersey, US, v. 22, p. 469–480, 2000.
- NAVA, S. et al. An overview of systematics and evolution of ticks. **Frontiers in Bioscience**, Tampa-US, v. 14, n. 1, p. 2857-2877, 2009.
- OBENCHAIN, F.D.; OLIVER, J. H. The heart and arterial circulatory system of the ticks (Acari: Ixodidae). **Journal of Arachnology**, Lubbock, US, v. 3, p. 57-74, 1976.
- OLIVEIRA, E. F. et al. Behavioral aspects of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in urban area endemic for visceral leishmaniasis. **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, US, v. 50, n. 2, p. 277-84, 2013.
- OLIVEIRA, F. S. et al. PCR-based diagnosis for detection of *Leishmania* in skin and blood of rodents from an endemic area of cutaneous and visceral leishmaniasis in Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, NL, v. 129, p. 219–227, 2007.
- OLIVEIRA, M. A.; DE SOUZA, W. Further morphological studies on the behavior of *Trypanosoma rangeli* in the hemocytes of *Rhodnius prolixus*. **Parasitology**, London, GB, v. 52, p. 299–307, 2003.
- OTRANTO, D. et al. Apparent tick paralysis by *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in dogs. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, NL, v. 188, p. 325–329, 2012.
- OTRANTO, D. et al. Diagnosis of *Hepatozoon canis* in young dogs by cytology and PCR. *Parasit. Vector* 4, 55 oxide synthases in metazoans. Comparative biochemistry and physiology Part parasites. **Infection and Immunity**, Washington-US, v. 75, p. 3633–3640, 2011.
- PAROLA, P. et al. Warmer weather linked to tick attack and emergence of severe rickettsioses. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, US, v. 2, p. 338, 2008.
- PAROLA, P.; RAOULT, D. Tick-borne bacterial diseases emerging in Europe. **Clinical Microbiology and Infection**, Oxford, US, v. 7, n. 2, p. 80-83, 2001.
- PAZ, G. F. et al. Ritmo de queda de *Rhipicephalus sanguineus* (ACARI:IXODIDAE) de cães. **Revista Brasileira de Parasitologia**, v. 37, n. 234, 2001.
- PAZ, G. F. et al. Evaluation of the vectorial capacity of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the transmission of canine visceral leishmaniasis. **Parasitology Research**, Berlin, DE, v. 106, p. 523–528, 2010.
- PEREIRA, L. S. et al. Production of reactive oxygen species by hemocytes from the cattle tick *Boophilus microplus*. **Experimental Parasitology**, New York, US, v. 99, p. 66–72, 2001.

PIMENTA, P. F. *et al.* Development of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in Its Natural Sandfly Vector *Lutzomyia longipalpis*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, US, v. 86, n. 4, p. 606–612, 2012.

PRINA, E. *et al.* *Leishmania* DNA is rapidly degraded following parasite death: an analysis by microscopy and real-time PCR. **Microbes and Infection**, Paris, FR, v. 9, p. 1307–1315, 2007.

QIN, G. *et al.* Characterization and Functional Analysis of Four Glutathione S-Transferases from the Migratory Locust, *Locusta migratoria*. **PLOS ONE**, San Francisco, US, v. 8, n. 3, 2013.

REGO, R. O. *et al.* Molecular cloning and comparative analysis of fibrinogen-related proteins from the soft tick *Ornithodoros moubata* and the hard tick *Ixodes ricinus*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, GB, v. 35, p. 991–1004, 2005.

REGULSKI, M.; TULLY, T. Molecular and biochemical characterization of dNOS: a *Drosophila* Ca²⁺/calmodulin-dependent nitric oxide synthase, **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, US, v. 92, p. 90722–90726, 1995.

RIBEIRO, J. M. C.; NUSSENZVEIG, R. H. Nitric oxide synthase activity from a hematophagous insect salivary gland. **FEBS Journal**, Oxford, GB, v. 330, p. 165–168, 1993.

RIVERO, A. Nitric oxide: an antiparasitic molecule of invertebrates. **Trends in Parasitology**, Oxford, GB, v. 22, n. 8, p. 352, 2006.

ROGERS, M. E. *et al.* *Leishmania* chitinase facilitates colonization of sand fly vectors and enhances transmission to mice. **Cellular Microbiology**. Oxford, GB, v. 10, p. 1363–72, 2008.

ROGERS, M. E.; BATES, P. A. *Leishmania* manipulation of sand fly feeding behavior results in enhanced transmission. **PLoS Pathogens**, San Francisco, US, v. 3, n. 6, p. 91, 2007.

ROSA DE LIMA, M.F. *et al.* Cloning and partial characterization of a *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) Glutathione S-transferase. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, GB, v. 32, n. 7, p. 747–754, 2002.

RUBINI, A. S. *et al.* Acquisition and transmission of *Hepatozoon canis* (Apicomplexa: Hepatozoidae) by the tick *Amblyomma ovale* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, NL, v. 164, p. 324–327, 2009.

RUDENKO, N. *et al.* Differential Expression of *Ixodes ricinus* Tick Genes Induced by Blood Feeding or *Borrelia burgdorferi* Infection. **Journal Medical Entomology**, Honolulu, US, v. 42, n. 1, p. 36–41, 2005.

SACKS D. L.; KAMHAWI S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. **Annual Reviews: Microbiology**, [S.l.], v. 55, p. 453–83, 2001.

SACKS, D. L. Leishmania-sand fly interactions controlling species-specific vector competence. **Cellular Microbiology**. Oxford, GB, v. 3, n. 4, p. 189-96, 2001.

SAITO, Y. et al. Identification and characterization of antimicrobial peptide, defensin, in the taiga tick, *Ixodes persulcatus*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford-GB, v. 18, p. 531-539, 2009.

SCHMIDT, O.; THEOPOLD, U., STRAND, M. R. Innate immunity and evasion by insect parasitoids. **BioEssays**, Cambridge, US, v. 23, p. 344–351, 2001.

SCHNITTGER, L. et al. Babesia: A world emerging. **Infection, Genetics and Evolution**, Amsterdam, NL, v. 12, p. 1788–1809, 2012.

SHAHABUDDIN, M. et al. *Plasmodium gallinaceum*: Differential killing of some mosquito stages of the parasite by insect defensin. **Experimental Parasitology**, New York, US, v. 89, n.1, p. 103–112, 1998.

SHARON, N. Lectins: past, present and future. **Biochemical Society Transactions**. London, GB, v. 36, p. 1457-1460, 2008.

SHI, L., PASKEWITZ, S. M. Proteomics and insect immunity. **Invertebrate Survival Journal**, [S.l.] v. 3, p. 4 – 17, 2006.

SILVA, S. B. et al. Celulares envolvidos na resposta imune de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* inoculados com *Metarhizium anisopliae* E *Penicillium* spp. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, BR, v. 15, n. 3, p. 128-131, 2006.

SILVA, J. E. B., BOLELI, I. C., SIMÕES, Z. L. P. Hemocytes types and total differential counts in unparasitized and parasitized *Anastrepha obliqua* (Diptera: Tephritidae) larvae. **Brazilian Journal of Biology**, São Paulo, BR, v. 62, p. 689–699, 2002.

SILVEIRA, J. A. G.; PASSOS, L. M. F.; RIBEIRO, M. F. B. Population dynamics of *Rhipicephalus sanguineus* (Latrielle, 1806) in Belo Horizonte, Minas Gerais state, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, NL, v. 161, p. 270–275, 2009.

SIMSER, J. A. et al. Immune-responsive lysozymes from hemocytes of the American dog tick, *Dermacentor variabilis* and an embryonic cell line of the Rocky Mountain wood tick, *D. andersoni*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, GB, v. 34, p. 1235-1246, 2004.

SMITH, V.J., SODERHALL, K. Induction of degranulation and lysis of haemocytes in the fresh water crayfish, *Astacus astacus* by components of the prophenoloxidase activating system in vitro. **Cell and Tissue Research**, Berlin, DE, v.233, n. 2, p. 295–303, 1983.

SOARES, T. Ultrastructural characterization of the hemocytes of *Lasiodora* spp. (Koch, 1850) (Araneae: Theraphosidae). **Micron**, Oxford, GB, v. 48, p. 11–16, 2013.

SODERHALL, K. Invertebrate Immunity: Chapter 8- TICK INNATE IMMUNITY. Kopáček, P., Hajdušek, O., Burešová, V., Daffre, S. **Lands Bioscience**. 2010.

SOLANO-GALEGO, L. et al. Detection of *Leishmania infantum* DNA mainly in *Rhipicephalus sanguineus* male ticks removed from dogs living in endemic areas of canine leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, London, GB, v. 4, n. 86, 2011.

SONDERHALL, K., CERENIUS, L. Role of the Prophenoloxidase- activating system in invertebrate immunity. **Current Opinion in Immunology**, Philadelphia, US, v. 10, p. 23-8, 1998.

SONENSHINE, D. E. Biology of ticks vol. 1. New york: Oxford University Press. 1991.

SONENSHINE, D. E. et al. Expression of defensin-like peptides in tick hemolymph and midgut in response to challenge with *Borrelia burgdorferi*, *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, NL, v.28, p.127-134, 2002.

SONENSHINE, D. E., HYNES, W. L. Molecular characterization and related aspects of the innate immune response in ticks. **Frontiers in Bioscience**, Tampa, US, v. 13, p. 7046-7063, 2008.

STANLEY-SAMUELSON, D. W. et al. Eicosanoids mediate nodulation responses to bacterial infections in larvae of the silkworm, *Bombyx mori*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, New York, US, v. 118, p. 93–100, 1997.

STANLEY-SAMUELSON, D. W. et al. Insect immune response to bacterial infection is mediated by eicosanoids. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, USA, v. 88, p. 1064–1068, 1991.

STERBA, J. et al. Fibrinogen-related proteins in ixodid ticks. **Parasites & Vectors**, London, GB, v. 4, p. 127, 2011.

TAFALLA, C.; NOVOA, B.; FIGUERAS, A. Production of nitric oxide by mussel (*Mytilus galloprovincialis*) hemocytes and effect of exogenous nitric oxide on phagocytic functions. Comparative biochemistry and physiology - Part B - **Biochemistry and Molecular Biology**. Oxford, GB, v. 132, p. 423–431, 2002.

TAYLOR, D. Innate Immunity in Ticks: A review **Journal of the Acarological Society of Japan**, Japan, v. 15, n. 2, p. 109-127, 2006.

TELLERIA, E. L. et al. Bacterial feeding, Leishmania infection and distinct infection routes induce differential defensin expression in *Lutzomyia longipalpis*. **Parasites & Vectors**, London, GB, v. 6, n. 12, 2013.

TODD, S. M., SONENSHINE, D. E., HYNES, W. L. Tissue and life-stage distribution of a defensin gene in the Lone Star tick, *Amblyomma americanum*. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, GB, v. 21, p. 141-147, 2007.

TSUJI, N. et al. Babesial vector tick defensin against *Babesia* spp. **Infection and Immunity**, Washington, US, v. 75, n. 7, p. 3633-3640, 2007.

TUNKIJJANUKIJ, S. et al. Sialic acid in hemolymph and affinity purified lectins from two marine bivalves. **Comparative Biochemistry and Physiology**, New York, US, v. 119, p. 705–713, 1998.

UILENBERG, G. Babesia – A historical overview. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, NL v. 138, p. 3–10, 2006.

VALBUENA, G. et al. Identification of fucosylated glycoconjugates in *Xenopus laevis* testis by lectin histochemistry. **Histochemistry and Cell Biology**, Berlin, DE, v. 134, p. 215-225, 2010.

VASS, E., NAPPI, A. J. Fruit fly immunity. **Bio Essays**, [S.l.] v. 51, p. 529-535, 2001.

VERĚS, J.; GRUBHOFFER, L. Detection and partial characterisation of a new plasma lectin in the hemolymph of the tick *Ornithodoros tartakovskyi*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, NL, v. 45, p. 61–64, 1991.

VISHNUPRIYA, S., SOMASUNDARAM, P. Role of Bacterial Endotoxin for Identification of Immune Defence and Genetic Hardiness on the Enzyme Control in Silkworm *Bombyx mori* (L.). **The Scitech Journal**, [S.l.] v. 1, n. 7, 2014.

VIZIOLI, J et al. The defensin peptide of the malaria vector mosquito *Anopheles gambiae*: antimicrobial activities and expression in adult mosquitoes. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, GB, v. 31, p. 241–248, 2001.

WANG et al. Systematic study on hemocyte identification and plasma Prophenoloxidase from *Culex pipiens quinquefasciatus* at different developmental stages. **Experimental Parasitology**, New York, US, v. 127, p. 135–141, 2011.

WHITTEN, M. M. A. et al. Role of Superoxide and Reactive Nitrogen Intermediates in *Rhodnius prolixus* (Reduviidae)/*Trypanosoma rangeli* Interactions. **Experimental Parasitology**, New York, US, v. 98, p. 44–57, 2001.

XYLANDER, W. Hemocytes in Myriapoda (Arthropoda): a review. **Senckenberg Museum Für Naturkunde Görlitz**. v. 6, p. 114-124, 2009.

YAMASHITA, M.; IWABUCHI, K. *Bombyx mori* prohemocytes division and differentiation in individual microcultures. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, US, v. 47, p. 325–331, 2001.

YUDA, M. et al. cDNA cloning, expression and characterization of nitric oxide synthase from the salivary glands of the blood-sucking insect *Rhodnius prolixus*. **European journal of Biochemistry**, Berlin, DE, v. 242, p. 807–812, 1996.

ZHIOUA, E.; YEH, M. T.; LEBRUN, R. A. Assay for phenoloxidase activity in *Amblyomma americanum*, *Dermacentor variabilis*, and *Ixodes scapularis*. **Journal of Parasitology**, Lawrence, US, v.83, n.3, p.553-4, 1997.

ZHOU, J. et al. A secreted cystatin from the tick *Haemaphysalis longicornis* and its distinct expression patterns in relation to innate immunity. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. Oxford, GB, v. 36, n. 7, p. 527-35, 2006.

APENDICE A - Artigo 1 – Submetido a Experimental and Applied Acarology

ULTRASTRUCTURAL CHARACTERIZATION OF THE HEMOCYTES OF *Rhipicephalus sanguineus* (ACARI: IXODIDAE)

A.P.S. Feitosa^{a,b,c}, D.L. Veras^{a,b}, E.M. Silva^b, A.S.S. Aliança^{a,b,c}, G.G.A. Gonçalves^{a,b}, M.M.

Chaves^a, L.C. Alves^{a,b,d}, F.A. Brayner^{a,b,c}

^a Departamento de Parasitologia, Laboratório de Biologia Celular e Molecular, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (FIOCRUZ).

^b Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil.

^c Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical – UFPE.

^d Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade de Pernambuco, Recife, Brazil.

Corresponding author Address: Departamento de Parasitologia, Laboratório de Biologia Celular e Molecular, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (FIOCRUZ), Recife, Brazil.

Av. Moraes Rego s/n, Recife 50670-420, Brazil

Tel.: +55 81 2101 2693, Fax: +55 81 2101 2671

E-mail addresses: sampaiofeitosa@hotmail.com (A.P.S. Feitosa)

brayner.santos@gmail.com (F.A. Brayner)

Abstract Few studies are found in literature about the ticks' cellular immune response, which demonstrates the need for further researches on the characterization of ticks' hemocytes, especially those of *Rhipicephalus sanguineus* species, in view of its importance for medical and veterinary purposes. The aim of this study was to characterize - morphologically and ultrastructurally - different types of hemocytes of adult *Rh. sanguineus* maintained in laboratory. The hemocytes were characterized through light and transmission electron microscopy. Five cell types were identified within the variability of circulating cells in the adult *Rh. sanguineus* hemolymph: prohemocytes, plasmatocytes, granulocytes, spherulocytes and adipohemocyte. The prohemocytes are the smallest cells found in the haemolymph. Plasmatocytes have polymorphic morphology with vesicles and cytoplasmic projections. Granulocytes have an elliptical shape with cytoplasm filled with granules of different sizes and electrodensities. As for the spherulocytes, they are characterized by the presence of several spherules of uniform shapes and sizes filling the whole cytoplasm, while adipohemocytes have an irregular shape with multiple lipid inclusions occupying almost

the entire cytoplasmic space. Regarding the differential counting of hemocytes, we observed an increased frequency of spherulocytes followed by granulocytes, plasmatocytes, prohemocytes and adipohemocytes.

Keywords *Rhipicephalus sanguineus* · Hemocytes · Microscopy · Ultrastructure

Introduction

Invertebrates defend themselves from infections with an innate immune system which has antibodies or memory cells. The arthropods' immune system is composed of cellular and humoral responses (Lavine and Strand 2002). The tegument and intestine are the invertebrates' first lines of defense. The complex interaction of cellular and humoral reactions occurs when invaders overcome these barriers. Innate immune responses are not specific, consisting of cell mediated response through hemocytes such as phagocytosis, nodule formation, encapsulation, whereas the humoral response comprises the humoral encapsulation, hemagglutination and production of antimicrobial proteins (Lavine and Strand, 2002; Falleiros et al. 2003; Taylor 2006; Browne et al. 2013). The population of circulating hemocytes is an important tool for understanding the host-parasite interaction. The increased number of hemocyte and their differentiation can contribute to the protection against a particular pest (Da Silva et al. 2000).

Most data on arthropods' hemocytes, including their classification, schemes and terminology, originates from studies on insects, a group containing important vectors of human diseases (Hernandez et al. 1999). When compared to insects' hemocytes, little is known about features and functions of ticks' hemocytes (Borovicková and Hypsa, 2005). Three basic types of hemocytes, prohemocytes, plasmatocytes and granular hemocytes have been found in Ixodidea families, in the species *Ixodes ricinus* and in Argasidea, in the species *Ornithodoros moubata* (Taylor 2006; Borovicková and Hypsa, 2005). The hemocytes are classified in accordance with the presence, size and shape of granules, the cell format and pseudopodia, the shape of the nucleus and cytoplasm nucleus ratio, the endocytic activity, the presence of vesicles, primary and secondary lysosomes, other intracellular organelles and cytoplasm homogeneity (Borovicková and Hypsa, 2005).

Ticks are related to the transmission of a variety of pathogenic organisms including viruses, bacteria, nematodes and protozoa (Hajdušek et al. 2013). Thus, studies on the characterization of ticks' hemocytes, especially of the species with medical or veterinary importance, are required. The aim of this study was to characterize the morphology and ultrastructure of different types of hemocytes of *Rh. sanguineus*, maintained in laboratory, using light and electron transmission microscopy.

Materials and methods

Obtaining ticks and collecting the hemolymph

Ticks of the species *Rhipicephalus sanguineus*, obtained in the Laboratory of Immunopathology Keizo Asami-LIKA/UFPE, Recife strain, were used for the study. *Oryctolagus cuniculus* rabbits of New Zealand lineage were used for feeding the colony. The colony was maintained at $25 \pm 3^\circ\text{C}$ and $85 \pm 10\%$ relative humidity. In the current work adult ticks of both genders were used and fed. The collected hemolymph was made with an incision at the trochanter-coxal forepaw of the ticks using siliconized glass capillary tubes, according to a methodology adapted from Inoue et al. (2001). The collection was made through a sodium citrate buffer (0.14 M NaCl, 0.1 glucose, 30mM sodium citrate, 10mM EDTA, pH 4.6 (Soderhall and Smith 1983), to avoid hemocytes' coagulation and degranulation and not change their morphology. Hemocytes' plasma was removed by centrifugation at $800 \times g$ for 10 min at 4°C .

Characterization of hemocytes

Light Microscopy

For optical microscopy, hemolymph was collected and directly placed on a glass slide, where they were left to dry at room temperature for 20-30 min. Cells were fixed with methanol for 10 min. After fixation, the dried slides were stained with Giemsa (diluted 1: 9 in buffered distilled water) (Sigma[®]) for 10-15 min, then slides were quickly washed in buffered distilled water (Brayner et al. 2005).

Differential interference contrast microscopy

The visualization of live hemocytes was made with a hemolymph sample (5 μ L), being collected and diluted in half GRACE, 1: 500 (Sigma®). The sample was placed in culture plate (MatTEK) and incubated for 30 min at room temperature (Smith et al., 2013). Then, the hemocytes were examined using differential interference contrast microscopy (Leica SP2 confocal microscope).

Transmission Electron Microscopy (TEM)

The hemolymph was centrifuged at 800 $\times$ g for 10 min at 4 °C. The pellet was washed with sodium citrate buffer, pH 4.6. The cells were resuspended in glutaraldehyde fixative at 4% (Sigma®) in 0.1 cacodylate buffer (Sigma®), pH 7.2, overnight (Brayner et al. 2005). Samples were rinsed in 0.2M sucrose solution, pH 7.2 cacodylate buffer and post-fixed with osmium tetroxide (1% Sigma®) in cacodylate buffer. Then dehydration was carried out with acetone solutions at 30%, 50%, 70%, 90% and three series of 100%. The samples were embedded in EMBED 812/Araldite (Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA). The ultrathin sections were contrasted with uranyl acetate (Sigma®) and observed in a transmission electron microscope TecNai G2 Spirit TEM (FEI).

Differential counts of hemocytes

The collected hemolymph was used for differential counts, using the cells' morphology as parameters by counting differential types of hemocyte and calculating their relative percentages. Smears were made on glass slides, stained with Giemsa (four plates were prepared with fresh hemolymph, using 10 μ L of hemolymph per plate). At least 400 cells were counted for each tick and examined using an optical microscope with 100x magnification. The differential counting was performed in triplicate.

Results

Cell types

Within the variability of hemolymph circulating cells of adult *Rhipicephalus sanguineus* hemolymph, five morphologically-distinctive cell types were identified, which are: prohemocytes, plasmatocytes, granulocytes, spherulocytes and adipohemocytes.

Prohemocytes

Cells with oval or spherical diameter of approximately 8µm, with large, centrally located nucleus occupying much of the cell's cytoplasm (Figs. 1A-B, 2A-B and 5A). The nucleus has electrondensa chromatin islands distributed on the periphery of nuclear membrane (Figs. 2A-B). In few cytoplasmic organelles we can view, as a bead (Fig. 1A), vesicles and mitochondria (Fig. 2B). This cell represents approximately 13% of the total population of hemocytes.

Plasmatocytes

Cell measuring approximately 13µm in diameter, with a polymorphic form ranging from oval to spindle shape with displaced or central nucleus (Figs. 1C-D, 2C-D and 5B). This cell type has few granules in its cytoplasm and varied sizes, vesicles of varying sizes and mitochondria (Figs. 2C-D and 5B). The plasma membrane displays filopodia and pseudopodia (Figs. 2D and 5B). This type of cell represented about 22% of the total amount of hemocytes.

Granulocytes

Cell measuring approximately 20µm in diameter, of elliptical shape, with centralized nucleus accompanying cell format or nucleus moved to the periphery (Figs. 3A-B and 5C-D). Plasma membrane showing numerous irregular cytoplasmic projections (Figs. 4B and 5C-D). The cytoplasm contains many granules of different sizes and electrondensities that characterize this cell type. It shows vesicle into the cytoplasm (Figs. 4B and 5D). This cell type represents approximately 28% of the total quantity of hemocytes.

Spherulocytes

Oval-shaped cells measuring approximately 18µm in diameter (Fig. 3C). Around the nucleus there's a condensed chromatin. In the cytoplasm we observe the presence of various sizes and shapes of spherule as well as organelles such as mitochondria, Golgi and varying sizes of vesicles (Fig. 4C). In light microscopy, we often observed the release of spherules. This cell type represents about 36% of the total quantity of haemocytes.

Adipohemocytes

Cells rarely found in the hemolymph, irregularly shaped, measuring approximately 13µm in diameter (Fig. 3D). Various lipid inclusions filling most of the cytoplasmic space are observed in the cytoplasm (Figs. 4D and 5F). We also observed the presence of vesicles (Fig. 5F) and mitochondria (Fig. 4D) in the cytoplasm. This cell type represents approximately 1% of the total quantity of haemocytes.

Discussion

The hemocytes are classified according to morphological and ultrastructural characteristics, besides the functional characterization (Kadota et al. 2003). There are few studies on ticks' hemocytes in literature, so the characterization of the *Rhipicephalus sanguineus*' hemocytes was made by describing the hemocytes of other species of ticks (Kuhn and Haug 1994; Carneiro and Daemon 1997; Inoue et al. 2001; Borovicková and Hypsa 2005) and also of other invertebrates (Brayner et al. 2005; Soares et al. 2013).

The only study that reports the description of hemocytes of *Rh. sanguineus* dates back from 1997, by Carneiro and Daemon. The hemocytes were observed by bright field microscopy and classified into five types: prohemocytes, plasmatocytes, granulocytes, spherulocytes, oenocytoids, adipohemocytes and non-defined cells, with the spherulocytes followed by plasmatocytes and granulocytes as the most abundant cell types. In our study, using techniques of light and transmission electron microscopy, we found five cell types, prohemocytes, plasmatocytes, granulocytes, and spherulocytes adipohemocytes, differing from the findings from Carneiro and Daemon (1997), who found only a single type of cell, eonocytoid. As for Carneiro and Daemon (2001), they describe hemocytes in *Amblyomma* and *Haemaphysalis* sp adult ticks and observed only three cell types, prohemocyte, plasmatocyte and spherulocyte, differing from those found in our study.

The prohemocytes in our study have similar morphology and size to those described in other studies with invertebrates such as Soares et al. (2013) in a study of ultrastructure with *Lasiadora* sp., Kuhn and Haug (1994) in a study of *Ixodes ricinus*, Habeeb and El-Hag (2008) in a study with *Hyalomma dromedarii*, Borovicková and Hypsa (2005) in a study with *Ornithodoros moubata* and *Ixodes ricinus*, Brayner et al. (2005) in a study with *Culex quinquefasciatus*. The similar characteristics of prohemocytes in different invertebrates can be related to its classification as a precursor cell, based on studies by Lavine and Strand (2002).

In this study, we found plasmacytes with the presence of granules and cytoplasmic projections, unlike what was described by Borovicková and Hypsa (2005). However, the cell size, polymorphic shape and the presence of organelles, such as mitochondria and vesicles were found in the cytoplasm, similar to that described by Borovicková and Hypsa (2005) and Inoue et al. (2001). In some invertebrates this cell type is highly involved in the immune response, probably the plasmacytes of *Rh. sanguineus*, by presenting projections and granules in their cytoplasm, are responsible for the processes of phagocytosis and encapsulation. However, further studies are needed to confirm this fact.

In a study with *Ornithodoros moubata* and *Ixodes ricinus*, Borovicková and Hypsa (2005) described two types of granulocytes (granulocytic type I and II) based on the criteria: relationship of electron density with granules maturation. Although our granulocytes also present granules with varying sizes and different electron densities, the so called granulocytes, for presenting the same size and cell organelles, we considered it as the same cell at different stages of maturation.

The spherulocytes described in *Rh. sanguineus*, in the present work, were not found in any other ultrastructural study of ticks' haemocytes, except for *Ornithodoros moubata* where these cells were characterized by Borovicková and Hypsa (2005) featuring a small cell size in relation to our study, besides the granular structures with various sizes and forms, differing from our study, where we found spherules with uniform sizes, shapes and electron density. Soares et al. (2013) and Brayner et al. (2005), by electron microscopy, described, in *Lasiadora sp.* and *C. quinquefasciatus*, respectively, spherulocytes with small spherules completely filling the cytoplasm, as well as the presence of few organelles, such as mitochondria and Golgi complex, corroborating our study. However, the sizes of spherulocyte described here were consistent with those found by Brayner et al. (2005) and larger than those reported by Smith et al. (2013).

Carneiro and Daemon (1997) described adipohemocytes, through light microscopy, as rounded cells with cytoplasm filled with refringent droplets. In our study the adipohemocyte cells were rare and had irregular shapes, cytoplasm full of lipid droplets, with vesicles and mitochondria and a similar diameter to that described by Brayner et al. (2005). This type cell has not been described in studies with ultrastructure of ticks' hemocytes.

The present study showed a higher cell frequency of spherulocytes, followed by granulocytes, plasmacytes and prohemocytes. The largest percentage of spherulocytes

among hemocytes of *Rh. sanguineus* corroborates with Carneiro and Daemon (1997), which also reported higher frequency of this cell type in the same species. The greater abundance of this cell in the hemolymph of *Rh. sanguineus* was also described by Carneiro and Daemon (1997). The literature reports that spherulocytes are involved in tissue renewal, transport of substances such as hormones, production of some proteins of the hemolymph, participation in defense against bacteria and nutrition (Sass et al. 1994; Negreiros et al. 2004). The second most common cell in our study was granulocyte, followed by plasmatocytes, cells that are related to phagocytic activity, according to Inoue et al. (2001), therefore justifying its high frequency. Kuhn and Haug (1994), although not describing the same cell types, when working with *I. ricinus*, observed a higher percentage of granulocytes, followed by plasmatocytes and prohemocytes, partially corroborating our findings. On the other hand, Smith et al. (2013) reported higher frequency of granulocyte type I and II, followed by plasmatocytes, spherulocytes and prohemocytes, disagreeing with our work especially due to spherulocytes' frequency. As for the adipohemocytes they were less frequent in both our study and in other works with arthropods (Carneiro and Daemon 1997; Brayner et al. 2005; Soares et al. 2013).

In this scenario, the work reveals differences and similarities between hemocytes of other tick species and arthropods in general, thus highlighting the difficulties in establishing a single classification of hemocytes among arthropods, as there are very characteristic differences within some species.

Five cell types were identified, through ultrastructure, in the hemolymph of *Rh. sanguineus*. The hemocytes were named prohemocyte, plasmatocyte, granulocytes, spherulocyte and adipohemocyte. When compared to studies published so far, our analysis adds information on the ultrastructural classification and characterization about hemocytes of *Rh. sanguineus*. Further studies are needed to perform the functional characterization of these cells.

Acknowledgements The authors express their gratitude to the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) by fellowships. We thank Dra. Cássia Docena for helping in the DIC experiments. This work was developed in the Laboratory of Imunopatologia Professor Keizo Asami (LIKA)/UFPE and Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (FIOCRUZ/PE).

References

- Borovicková B, Hypsa V (2005) Ontogeny of tick hemocytes: a comparative analysis of *Ixodes ricinus* and *Ornithodoros moubata*. *Experimental and Applied Acarology* 35: 317–333.
- Brayner FA, Araújo HRC, Cavalcanti MGS, Alves LC, Peixoto CA (2005). Ultrastructural characterization of the hemocytes of *Culex quinquefasciatus* (DIPTERA: Culicidae). *Micron* 36, 359-367.
- Browne N, Heelan M, Kavanagh, Kevin, (2013) An analysis of the structural and functional similarities of insect hemocytes and mammalian phagocytes. *Virulence* 4:7, 597-603.
- Carneiro ME, Daemon E (1997) Caracterização dos tipos celulares presentes na hemolinfa de adultos de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (IXODOIDEA: Ixodidae) em diferentes estados nutricionais. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 6:1, 1-9.
- Carneiro ME, Daemon E (2001) Influência de diferentes temperaturas sobre os tipos celulares presentes na hemolinfa de adultos de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (IXODOIDEA: Ixodidae). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 10:1, 21-27.
- Da Silva JB, Albuquerque CMR, Araújo EC, Peixoto CA, Hurd H (2000) Immune defense mechanisms of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) against *Candida albicans* infection. *Journal of Invertebrate Pathology* 76, 257–262.
- Falleiros AMF, Bombonato MTS, Gregório EA (2003). Ultrastructural and quantitative studies of hemocytes in the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Brazilian Archives of Biology and Technology* 46, 287–294.
- Habeeb SM, El-Hag HAA (2008) Ultrastructural Changes in Hemocyte Cells of Hard tick (*Hyalomma dromedarii*: Ixodidae): A model of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* H14 - endotoxin mode of action. *American-Eurasian journal of agricultural & environmental sciences* 3:6, 829-836.
- Hajdušek O, Šíma R, Ayllón N, Jalovecká M, Perner J, De La Fuente J, Kopáček P (2013) Interaction of the tick immune system with transmitted pathogens. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 3, 1-15.

- Hernandez S, Lanz H, Rodríguez MH, Torres JA, Matri'nez-Palomo A, Tsutsumi V (1999) Morphological and cytochemical characterization of female *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae) Hemocytes. *Journal of Medical Entomology* 36:4, 426–434.
- Inoue N, Hanada K, Tsuji N, Igarashi I, Nagasawa H, Mikami T, Fujisaki H (2001) Characterization of Phagocytic Hemocytes in *Ornithodoros moubata* (Acari: Ixodidae). *Entomological Society of America* 38:4, 514-519.
- Kadota K, Walter S, Claveria FG, Igarashi I, Taylor D, Fujisaki K (2003) Morphological and populational characteristics of hemocytes of *Ornithodoros moubata* nymphs during the ecdysal phase. *Journal of Medical Entomology* 40, 770–776.
- Kuhn KH, Haug T (1994) Ultrastructural, cytochemical, and immunocytochemical characterization of haemocytes of the hard tick *Ixodes ricinus* (Acari: Chelicerata) *Cell Tissue Research* 277, 493-504.
- Lavine MD, Strand MR (2002) Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 32, 1295–1309.
- Negreiro MCC, Andrade FG, Falleiros AMF (2004) Immunology defense system in insects: an approach in velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), AgMNPV-resistant. *Semina: Ciências Agrárias* 25:4, 293-308.
- Sass M, Kiss A, Locke M (1994) Integument and hemocyte peptides. *Journal of Insect Physiology* 40:5, 407–42.
- Smith VJ, Soderhall K (1983) Induction of degranulation and lysis of haemocytes in the fresh water crayfish, *Astacus astacus* by components of the prophenoloxidase activating system in vitro. *Cell and Tissue Research* 233:2, 295–303.
- Soares T, Cavalcanti MGS, Ferreira FRB, Cavalcanti, MMS, Alves LC, Brayner, FA, Paiva PMG (2013) Ultrastructural characterization of the hemocytes of *Lasiadora* sp. (Koch, 1850) (Araneae: Theraphosidae). *Micron* 48, 11–16.
- Taylor D (2006) Innate Immunity in Ticks: A review. *Journal of the Acarological Society of Japan* 15:2, 109-127.

FIGURES

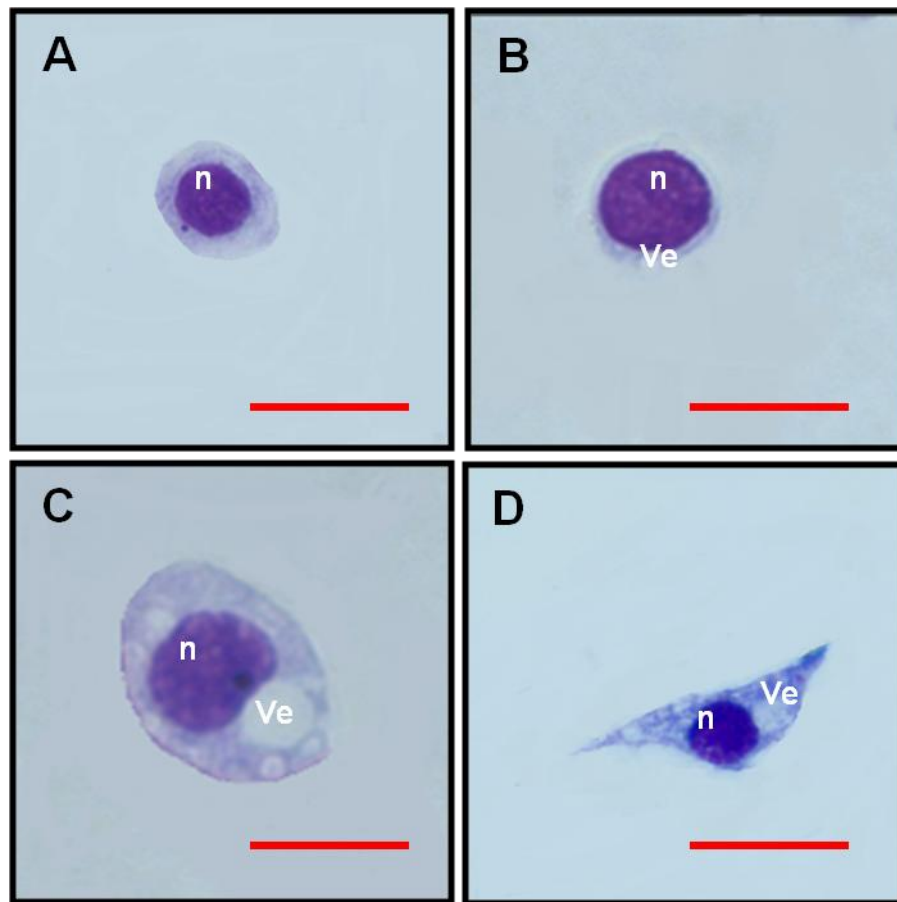


Fig. 1 (A-D) Micrographs of light microscopy of *Rhipicephalus sanguineus* hemocytes. **(A-B)** Prohemocytes - relatively small cell, oval and round shaped with well developed nucleus (n) in relation to the cytoplasm. It can present vesicle (Ve). **(C-D)** Plasmatocytes - Large cell ranging from oval to spindle shape with central or displaced nucleus or nucleus (n) and the presence of vesicle (Ve) in the cytoplasm. Bar = 10 μ m.

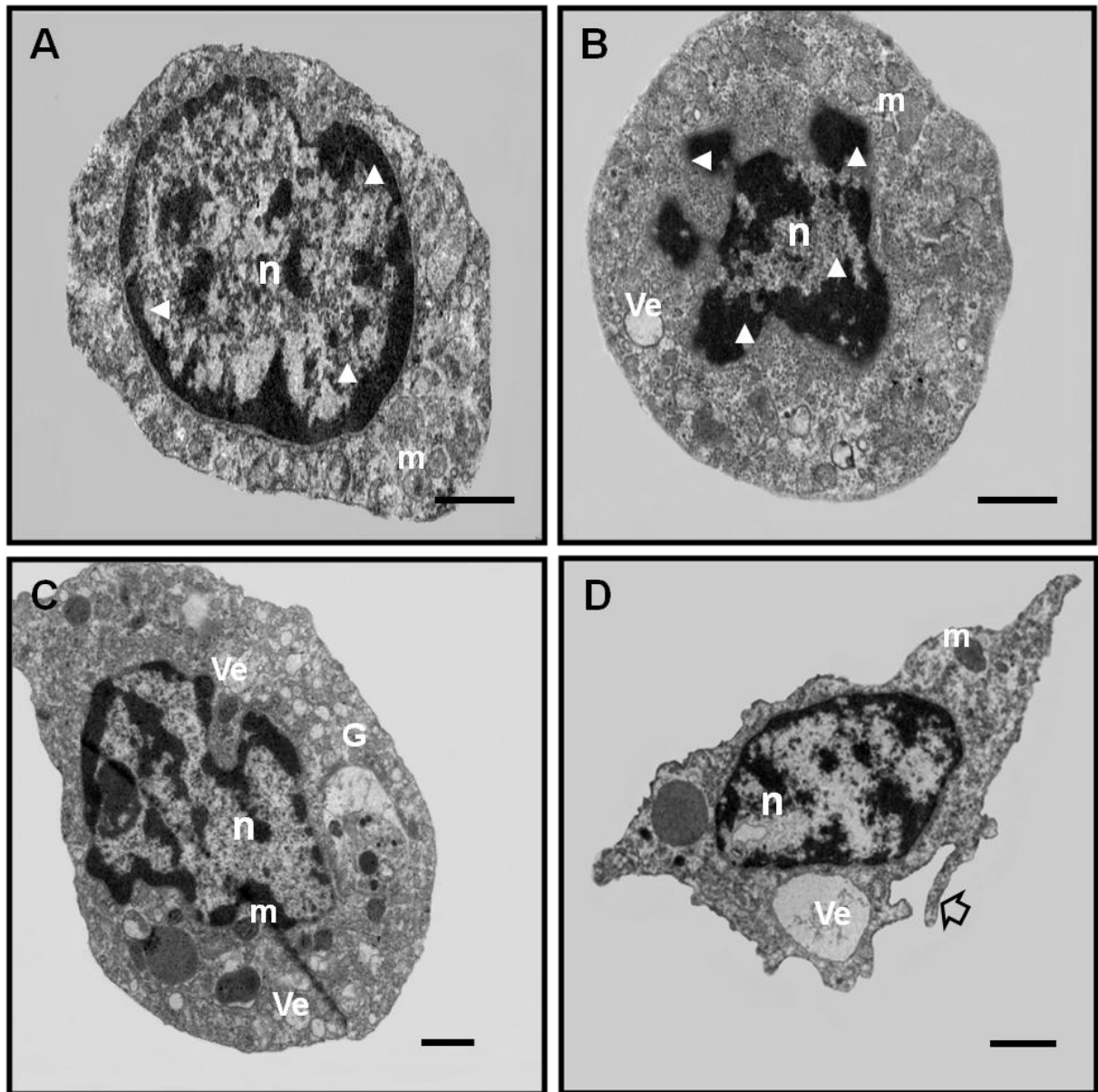


Fig. 2 (A-D) Electron micrographs of *Rhipicephalus sanguineus* hemocytes. **(A-B)** Prohemocyte - cell with oval and round shape, well-developed nucleus (n) with electron dense chromatin. (arrowhead) distributed at the periphery of the nuclear membrane. **(C-D)** Plasmatocytes - great cell presenting with shape ranging from oval to fusiform with central or displaced nucleus (n) and the presence of vesicles (Ve) and Golgi (G) in the cytoplasm and cytoplasmic membrane projection (open arrow). m = mitochondria. Bar = 1µm.

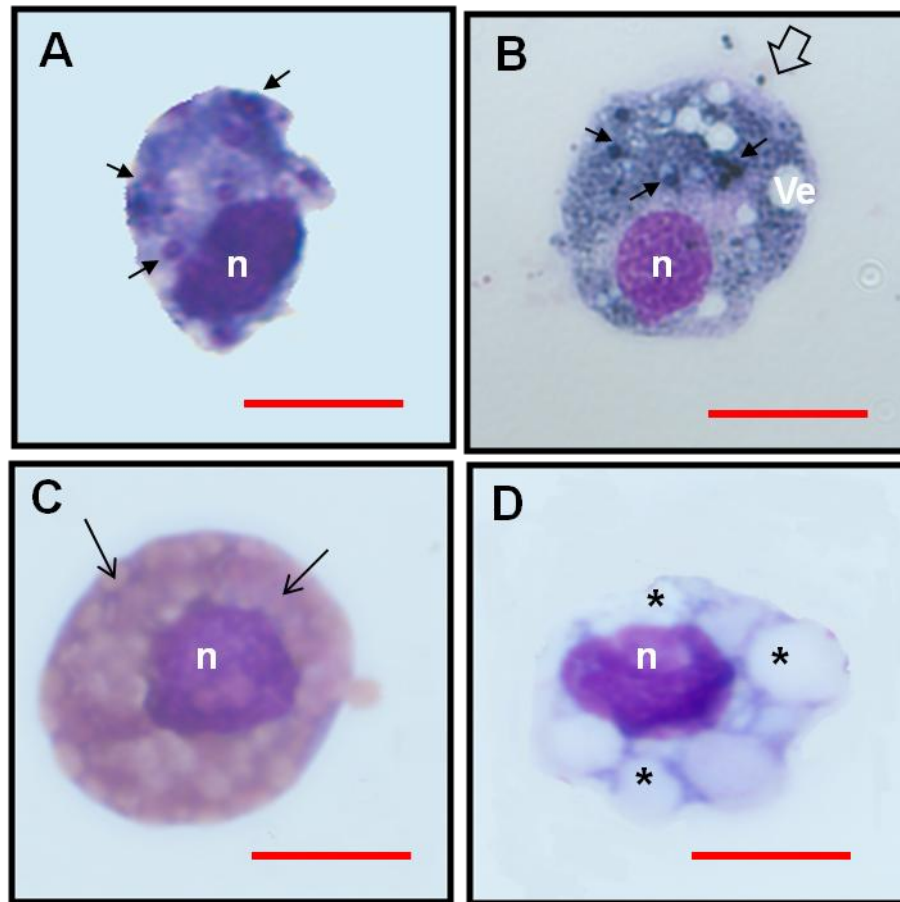


Fig. 3 (A-D) Micrographs of light microscopy of hemocytes of *Rh.sanguineus*. **(A-B)** granulocyte - cell with nucleus (n) following the format of the cell, presence of cytoplasmic membrane projections (open arrow), cytoplasm containing granules (arrow) and vesicles (Ve). **(C)** Spherulocyte - cell with nucleus (n) shifted and characterized by the presence of several spherules (long arrow) of uniform shapes and sizes. **(D)** Adipohemocytes - large cell with nucleus (n) compressed by the presence of lipid inclusions (asterisk). G = Golgi, m = mitochondria. Bar = 10 μ m.

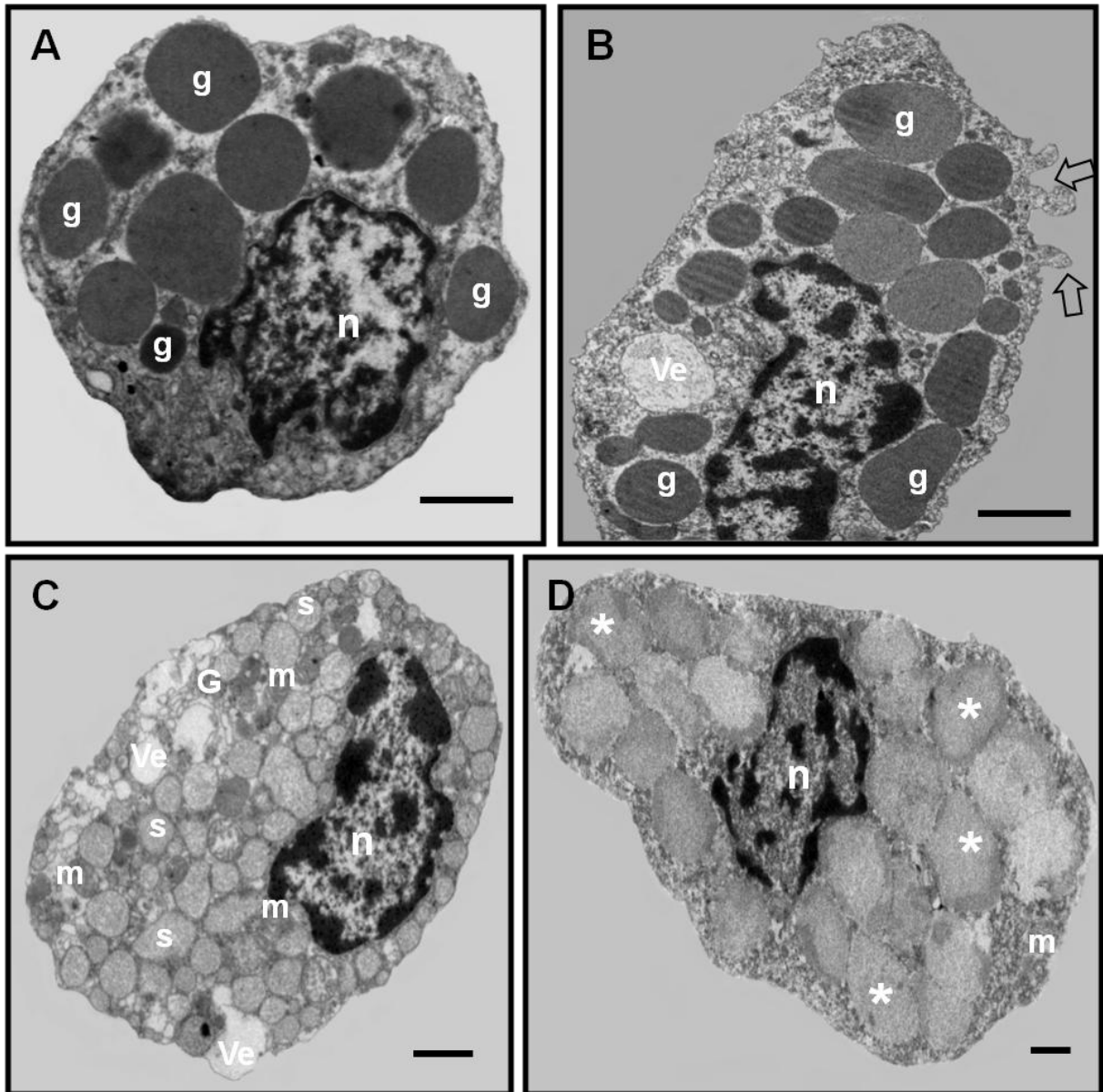


Fig. 4 (A-D) Electron micrographs of hemocytes of *Rh. sanguineus*. **(A-B)** Granulocyte - cell with nucleus (n) following the format of the cell, presence of cytoplasmic membrane projections (open arrows) and cytoplasm containing vesicles (Ve) and granules (g) of different electron densities. **(C)** Spherulocyte - cell containing nucleus (n) shifted and characterized by the presence of various spherule(s) of varying shapes and sizes. **(D)** Adipohemocyte - large cell with nucleus (n) compressed by the presence of lipid inclusions (asterisk). G = Golgi, m=mitochondria. Bar = 1µm.

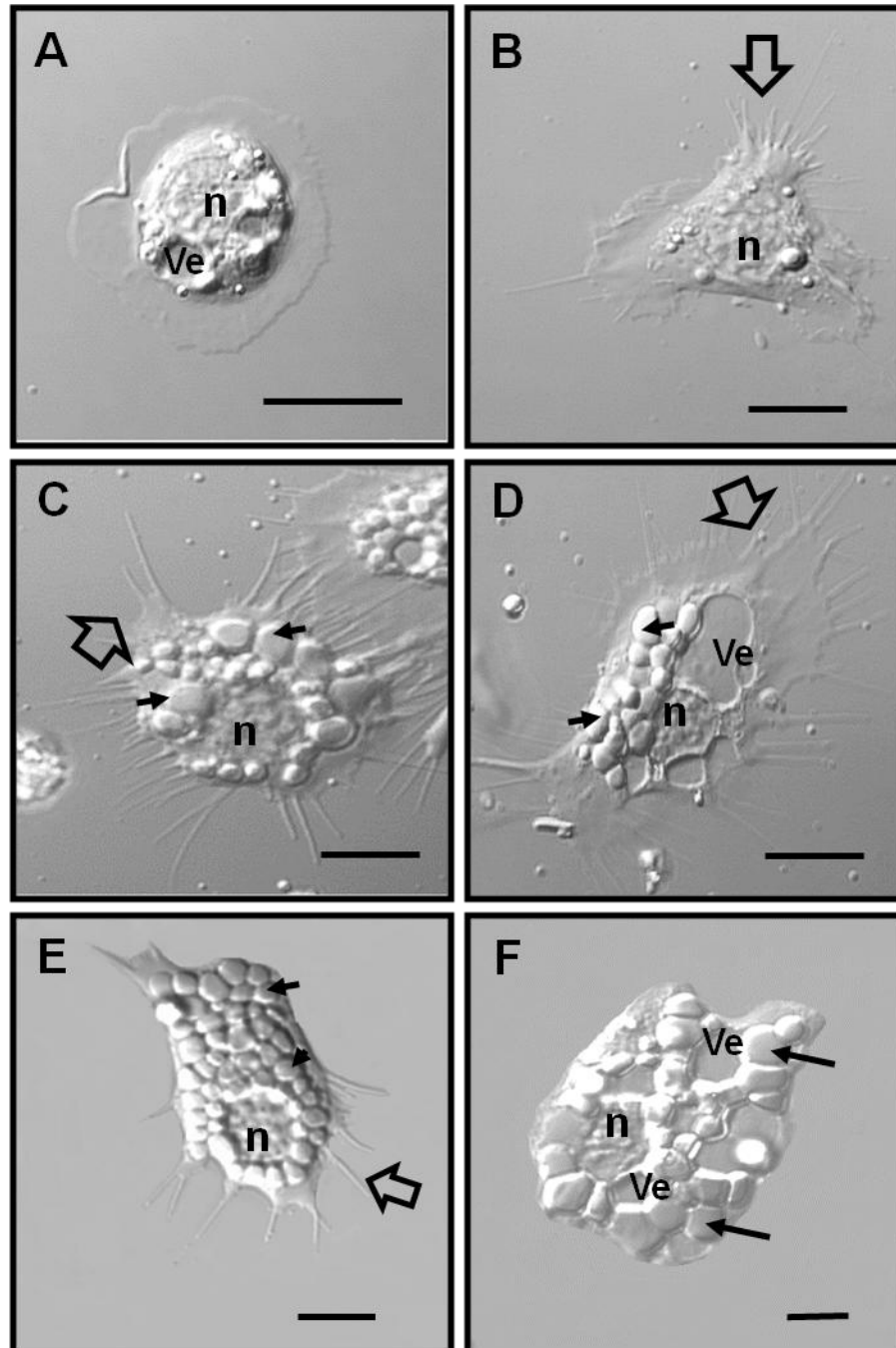


Fig. 5 (A–F) Differential interference contrast microscopy of *Rh. sanguineus* hemocytes. **(A)** Prohemocyte with nucleus (n) large in relation to the cytoplasm and with the presence of vesicle (Ve). **(B)** Plasmatocytes irregularly shaped with cytoplasmic projections as filopodia and pseudopodia (open arrow). **(C–D)** Granulocyte with nucleus (N) irregular, with granules (short arrows) and vesicles (Ve). **(E)** Spherulocyte with displaced nucleus (n) and cytoplasm filled with spherules of uniform sizes (short arrows). **(F)** Adipohemocyte with nucleus (n) shifted and with the presence of lipid inclusions (arrows) and vesicles (Ve) in the cytoplasm. Bar: 13 μ m.

APENDICE B – Artigo 2 – Submetido a Journal of Invertebrate Pathology

Assessing the cellular and humoral immune response in *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) infected with *Leishmania infantum* (Nicolle, 1908)

A.P.S. Feitosa^{a,b,c}, D.L. Veras^{a,b}, D.M.V. De Deus^c, A.S.S. Aliança^{a,b,c}, M.M. Chaves^a, L.C. Alves^{a,b,d}, F.A. Brayner^{a,b,c}

^a Departamento de Parasitologia, Laboratório de Biologia Celular e Molecular, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (FIOCRUZ),

^b Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil

^c Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical - UFPE

^d Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade de Pernambuco, Recife, Brazil.

Corresponding author Address: Departamento de Parasitologia, Laboratório de Biologia Celular e Molecular, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (FIOCRUZ), Recife, Brazil.

Av. Moraes Rego s/n, Recife 50670-420, Brazil

Tel.: +55 81 2101 2693, Fax: +55 81 2101 2671

E-mail addresses: sampaiofeitosa@hotmail.com (A.P.S. Feitosa)

brayner@cpqam.fiocruz.br (F.A. Brayner)

Abstract

The objective of this study was to evaluate aspects of the innate cellular and humoral immune response by evaluating the hemocyte dynamics, phagocytosis, phenol oxidase activity and nitric oxide production in *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) inoculated with *Leishmania infantum* promastigotes and to evaluate the parasite permanence at time 0 and on days 1, 2, 5 and 7 after inoculation. From the total and differential count of the five types of hemocytes circulating in the hemolymph of *Rh. sanguineus* females the average total number of hemocytes in the group inoculated with *L. infantum* showed to be significantly higher ($p < 0.05$) on days 1 and 2 after infection compared to the control group. In hemocyte differential count was observed that the average plasmatocytes and granulocytes increased significantly on days 1, 2 and 5 after infection with *L. infantum* compared to the control group ($p < 0.001$). In phagocytosis assays was observed that plasmatocytes and granulocytes were able to perform phagocytosis of latex particles and promastigotes of *L. infantum* 1 day after infection. NO production was significantly increased ($p < 0.001$) on days 1, 2 and 5 after infection with *L. infantum* and PO activity increased significantly ($p < 0.05$) on day 5 post infection. The expression of the 18S ribosomal gene expressed by *L. infantum* had significant increase ($p < 0.001$) on days 1, 5 and 7 after infection compared to time 0. Despite there being no studies on *Rh. sanguineus* response against infection with *L. infantum*, these results suggest that the *Rh. sanguineus* activates the cellular and humoral immune response after infection with *L.*

infantum, but more studies are needed to assess the impact of such response in fighting infection.

Keywords: *Rhipicephalus sanguineus*, *Leishmania infantum*, phagocytosis, phenoloxidase, nitric oxide

1. Introduction

Ticks are obligate ectoparasites that may parasitize domestic and wild animals and occasionally humans. Cause harm to the host via blood loss or transmission of a variety of pathogens, including bacteria, viruses and protozoa (Jongejan F; Uienberg G, 2004; de la Fuente et al., 2008). The success of pathogen transmission by ticks is related to specific aspects of its biology, such as intracellular blood digestion by preventing the action of digestive enzymes in the intestinal lumen. Moreover, the survival of ingested microorganisms seems to be associated with proteins present in tick and maintaining the redox balance in the intestine thereof (Griesch et al., 2000; Sonenshine and Hynes, 2008). To maintain the redox balance, antioxidant enzymes such as catalase, glutathione peroxidase and thioredoxin, S-transferase glutathione and selenoproteins are expressed to destroy free radicals produced in the intestine (Anderson et al., 2008; Megy et al., 2012). Ticks have a well-developed innate immune system. However, despite their capacity to resist infection by various microorganisms, they remain important vectors of numerous causative agents of diseases, since these parasites can evade the immune system thereof. Knowledge of these evasion mechanisms of pathogens in ticks are still poorly understood (Sonenshine and Hynes, 2008; Kopáček et al., 2010).

Most of the knowledge of the innate immunity of ticks is associated with cellular and humoral immune responses in the tick hemocoel. The nature of the innate immune response involves two main components: cellular defense represented by the hemocytes, which play an important role in the innate immune response of ticks when exposed to any pathogen or tissue damage. The hemocytes are also directly related to phagocytosis and encapsulation processes or lumps intended mainly to major pathogens such as protozoa and metazoan. The humoral response involves the production of antimicrobial peptides (AMPs) with activity mainly for bacteria and fungi. The AMPs may be expressed by the hemocytes, fat body, midgut and in some cases by other internal organs of the tick body. Other peptides, not limited to antimicrobials, such as lysozyme, lectins, protease inhibitors, are also expressed in response

to pathogen challenge (Griesch et al., 2000; Shi and Paskewitz, 2006; Sonenshine and Hynes, 2008).

The *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) is known as the brown dog tick and ectoparasite of domestic dogs with worldwide distribution, mainly in tropical and temperate climates (Dantas-Torres et al., 2008). This tick species is the vector and host of pathogens such as *Rickettsia conorii* bacterium and the protozoa *Babesia vogeli* and *Hepatozoon canis* (Parola et al., 2008; Baneth et al., 2011; Schnittger et al., 2012). However, little is known about the parasite-vector interaction between these pathogens and the *Rh. sanguineus*. Some studies have investigated the role of the possible relationship of *Rh. sanguineus* with *L. infantum* (Coutinho et al., 2005, Paz et al., 2010, Dantas-torres et al., 2010, Dantas-Torres et al., 2011, Colombo et al., 2011, Solano-Gallego et al., 2012, De Moraes et al., 2013). However, studies emphasize the presence of parasite DNA in ticks, necessitating further clarification concerning to the vector-parasite interaction. The aim of this study was to evaluate aspects of the cellular and humoral innate immune response by evaluating the hemocyte dynamics, phagocytosis, phenol oxidase activity and nitric oxide production in *Rh. sanguineus* challenged with *Leishmania infantum* promastigotes.

2. Material and Methods

2.1. Obtaining ticks and collecting hemolymph

Ticks of the species *Rhipicephalus sanguineus*, obtained in the Laboratory of Immunopathology Keizo Asami - LIKA / UFPE, Recife strain, were used for the study. Rabbits, *Oryctolagus cuniculus* New Zealand lineage, were used to feed the colony. The *Rh. sanguineus* colony was maintained at 25 ± 3 °C and $85 \pm 10\%$ relative humidity (RH). In this study were used only adult females of *Rh. sanguineus*. The hemolymph was collected by cutting the front legs of the coxal trochanter joint using siliconized glass capillary tubes in sodium citrate anticoagulant (0.14 M NaCl, 0.1 glucose, 30 mM sodium citrate, 10 mM EDTA, pH 4.6 (Soderhall and Smith, 1983) to avoid coagulation and degranulation of hemocytes and do not change their morphology (Inoue et al., 2001). The same material collected from control and inoculated groups was used for the experiments described in this study.

2.2. Inoculation of ticks

Promastigotes of *Leishmania infantum*, MHOM / BR / 70 / BH46 strain, were grown at 25 °C in Schneider Medium (Sigma Aldrich, USA). The promastigotes were washed three times and resuspended in PBS at 2×10^8 cells/mL, 2 μ L of the suspension was inoculated in ticks by using a 100-mL Hamilton syringe (Hamilton, Reno, NV) with a 31-gauge hypodermic needle. After inoculation of *Leishmania*, ticks were maintained at 27 °C and 60% RH in the dark. In another group of ticks was also inoculated 2 μ L of polystyrene latex spheres modified by carboxylate, 0.3 mm in diameter (10% aqueous solution) (Sigma Aldrich, USA) were diluted at 1:10 in sterile phosphate buffered saline solution (PBS, pH 7.2). One day after infection, the hemolymph was collected as described above and fixed in 2.5% glutaraldehyde in cacodylate buffer (pH 7.2) and 4% paraformaldehyde. The processing for transmission electron microscopy (TEM) occurred 24 hours after fixing according to the methodology of Brayner et al. (2005). Fifty ticks were inoculated for each experimental group and the collection of hemolymph was carried out in pools of 10 ticks. Three experiments were performed. The control group was inoculated with 2 μ L of PBS at 1X.

For light microscopy analysis, hemolymph smears were performed on the glass slide immediately dried, and fixed in methanol for 10 min. The specimens were stained with Giemsa solution for 10 min (Inoue et al., 2001). In addition, total and differential counts of hemocytes were performed from the smears of each experimental group. Cells were counted in 50 fields (100X objective) and relative percentage of each cell type determined according to morphological criteria previously described by Brayner et al. (2005). All counts were performed in triplicate and represented by mean $\pm$ standard deviation. Data were analyzed by Kruskal-Wallis and nonparametric Mann-Whitney tests using the Graph-Pad Prism software (San Diego, CA, USA) ($p < 0.05$).

2.3 Total RNA extraction, cDNA synthesis and quantification of the gene expression of *Leishmania*

The total RNA of samples was extracted using guanidine isothiocyanate according to the methodology of Chomczynski, (1993). After the quantitative and qualitative control, the RNA was used for preparing the cDNA from 1 μ g of total RNA using the M-MLV RT reverse transcriptase enzyme (Promega, United States) according to the manufacturer's protocol. To evaluate the presence and expression level of the gene of *Leishmania* at time 0

and on days 1, 2, 5 and 7 after infection of *Rh. sanguineus* specific primer was used, 18S ribosomal of the leishmania (5'-TACTGGGGCGTCAGAG-3' and 5'-GGGTGTCATCGTTTGC-3') described by Prina et al. (2007) and Bezerra-Vasconcelos et al. (2011), for reaction standardization was used the endogenous gene of *Rh. sanguineus*, 18S ribosomal, and the primer was designed from the coding sequence deposited in NCBI under accession number L76342.1 (TACATGCAGTGAGCCTGGAGCGAACCCTGATTCTCCGTTA). Primers were evaluated for specificity and efficiency. The quantification of gene expression was performed using Master Mix Syber Green (Applied Biosystems, United States) and the reaction conditions were followed according to the manufacturer's protocol. The reactions were performed in ABI PRISM 7500 thermal cycler (Applied Biosystems, United States). Four experiments with analysis of 5 ticks were performed. Data were analyzed using the comparative Ct method (2^{-ddCt}).

2.4 Phenoloxidase activity in the hemolymph and identification of positive hemocytes to prophenoloxidase

Aliquots of 2 μ L of hemolymph was collected from each tick challenged with *L. infantum* and a control group inoculated with 1X PBS and incubated for 10 min with 28 μ L of 0.01 M cacodylate buffer containing 0.0005 M CaCl_2 , pH 7.0, in flat-bottomed 96-well plates (JET biofilm, Guangzhou, China). Ten microliters of saturated solution of L-DOPA (Sigma-Aldrich, USA) at 4 mg/mL was added to the mixture for 20 min at room temperature and then the absorbance was measured on an ELISA plate reader (Power Wave, BioTek) at 490nm according to the protocol of Melo et al. (1995). Four experiments were performed and samples were read in triplicate. For detection of phenoloxidase activity in hemocytes was used a L- DOPA solution (Sigma-Aldrich, USA) at 1 mg / mL dissolved in 35% ethanol, according to protocol of Ling et al. (2005).

2.5 Nitric Oxide (NO) production

NO production in the hemolymph of *Rh. sanguineus* was evaluated on days 1, 2 and 5 after inoculation of *L. infantum* and compared to the control group inoculated with 1X PBS. Each group consisted of 5 semi-engorged adult female ticks, and the experiment was repeated 4 times. 10 μ L hemolymph was collected from each tick and the quantification was performed

using the Griess reagent (Promega, United States). For analysis, 50 μ L hemolymph from each experimental group was plated in 96-well plate (JET biofilm, Guangzhou, China), all samples were performed in triplicate. An aliquot of 100 μ L of 1% sulphanilamide in 2.5% phosphoric acid was added to each well, followed by 100 μ L of 0.1% N-naphthyl-ethylenediamine. The absorbance at 540 nm was measured in ELISA plate reader (Power Wave BioTek). The molar concentration of nitrite in the sample was determined from the standard curve with known concentrations of sodium nitrite (Tafalla et al., 2002; Faraldo et al., 2005).

3. Results

3.1. Presence of Leishmania in *Rh. sanguineus* and hemocyte dynamics

The amplicons of genes analyzed, 18S ribosomal *Leishmania* spp. and 18S ribosomal *Rh. sanguineus* showed melting temperature (T_m) specific to each gene, and T_m of $79^\circ\text{C} \pm 0.5$ and $82 \pm 0.7^\circ\text{C}$, respectively. This study showed a statistically significant increase ($p < 0.05$) of the 18S ribosomal gene expression of *L. infantum* on days 1, 5 and 7 after infection with promastigotes of *L. infantum* compared to time 0 after inoculation. However, there was a decreased expression on the first day after infection (Figure 1).

From the total and differential count of the five types of circulating hemocytes in the hemolymph of female *Rh. sanguineus* (plasmatocytes, granulocytes, spherulocytes, prohemocytes and adipohemocytes) the average total number of hemocytes in the group *Rh. sanguineus* infected with *L. infantum* showed to be significantly higher ($p < 0.001$) on days 1 and 2 after infection (dpi) compared to the control group. The hemocytes population of *Rh. sanguineus* gradually increased until the 5th dpi, but not significantly different when compared to the control group (Fig. 2). Changes were found in the differential counting of hemocytes after infection. The percentage of prohemocytes was higher ($p < 0.001$) at all times in the control group (Fig. 3 A), while granulocytes and plasmatocytes were statistically significant higher ($p < 0.001$) at the three times in the infected group (Fig. 3 B-C). The percentage of spherulocytes, was significantly higher ($p < 0.05$) in 1st dpi in the control group showing no differences in other times (Fig. 3 D). No statistical difference was observed in the percentage of adipohemocytes between groups in the periods analyzed.

Analyzes on hemocyte dynamics were performed for each group, comparing the proportions in the days post-infection. In the control group the ratio of prohemocytes ranged from 20.7% at 1, 35% on the 2nd and 28.4% in the 5th dpi and there was decreased proportion of

granulocytes from the 1st (22.8%) to 2nd (14%) and 5th (12.1%) dpi. In the infected group there was increased variation in the proportion of granulocytes from 25%, 31% and 32% for the 1st, 2nd and 5th dpi, respectively. The proportion of plasmatocytes that was high at all times evaluated with 48.3%, 52% and 53% was the cell with the highest proportion. The adipohemocyte proportions did not change in the control and infected groups in any of the times analyzed.

Phagocytosis activity of hemocytes

Among the circulating hemocytes in the hemolymph of *Rh. sanguineus* was observed by transmission electron microscopy that plasmatocytes and granulocytes were able to perform phagocytosis of latex particles (Fig.4 C-D) and promastigotes of *Leishmania infantum* (Fig.5 A-F) in 1st dpi. Furthermore, it was found spherulocytes in initial contact with latex particles that had electrondense material in their surface (Fig. 4 A-B).

Phagocytosis of latex particle was observed by three cell types, plasmatocytes, granulocytes and spherulocytes. However, there was no latex particle within a parasitophorous vacuole in spherulocytes, only the initial contact. There was granulocyte showing phagosomes containing single or multiple latex particles. Latex particles showed deposition of amorphous material on its surface. The cell has different granular structures with different electrondensities and granular material spilling the cell. In Fig.4 D was observed plasmatocyte containing latex particles, and various membrane structures in the cytoplasm. A membrane invagination with early and direct contact between the latex particle and the cell was verified, starting the process of phagocytosis, but the presence of phyllopodia was not recorded. Plasmatocytes showed up with changes in morphology with scattered mitochondria in the cytoplasm, developed rough endoplasmic reticulum and the presence of vesicles.

It was also found granulocytes in contact with *Leishmania*, showing invagination of the cell membrane to perform phagocytosis (Fig. 5 A-C). The granulocyte had granules total or partially filled with different electrondensities (Fig. 5 C). Also in granulocyte was found *leishmania* phagocytosed with deposition of electrondense substance on the parasite membrane, suggesting melanization. In addition to the granulocytes, plasmatocytes were observed phagocytosing *leishmaniasis*. In plasmatocyte vacuole was observed *Leishmania* with

full morphology with deposition of electrondense substance on the parasite membrane, suggesting melanization, and vacuoles with indeterminate structures (Fig.5D-F). In the experimental group incubated with leishmania, there were a large number of granulocytes showing morphological aspects of activation with release of amorphous substances indicative of exocytosis. Additionally, some cells were found in cytoplasmic degradation process with Leishmania inside presenting totally disorganized membrane and cell material with deposition of electrondense material on the parasite surface (Fig. 6A-D).

3.3 Nitric Oxide dosage

There was statistically significant increase ($p < 0.05$) in nitric oxide levels in ticks of the group infected with *L. infantum* compared to the control group at 1, 2 and 5 dpi (Fig. 7).

3.4 Phenoloxidase activity in the hemolymph and identification of the types of PO producer hemocytes.

Results of the PO enzyme activity in adults of *Rh. sanguineus* inoculated with *L. infantum* showed that parasite inoculation led to a statistically significant increase in enzyme activity on the 5th dpi, being observed no significant change on days 1 and 2 after inoculation with leishmania (Fig. 8).

In the experiment for identification of PO-producer cell types, it was observed that the granular cells as plasmatocytes, granulocytes and spherulocytes are PO producers (Fig. 9).

4. Discussion

Study by Prina et al. (2007) to monitor DNA degradation of *Leishmania amazonensis* was concluded that after parasite death, DNA degraded in 1h, with less than 1% of parasitic DNA remaining, and then they could not express their genes. In our study, the presence of Leishmania in *Rhipicephalus sanguineus*, as well as increased expression observed until 7th dpi suggests that *L. infantum* inoculated into the hemocoel, remain viable in *Rh. sanguineus*, since it is still in active stage of gene expression.

According to Sonenshine and Hynes, (2008), where ticks are exposed to bacteria, viruses, protozoa and other microorganisms, the hemocyte population increases significantly several days until the invasion has been countered, because the hemocytes of these invertebrates are directly involved in the innate immune response to infection control. Our

data demonstrate increase in the total population of hemocytes in *Rh. sanguineus* challenged with *L. infantum*, besides the increase in the proportion of plasmatocytes and granulocytes in the challenged group. According to Silva et al. (2002), Hillyer and Christensen (2002) and Hillyer et al. (2005), these changes in the counting of hemocytes occur because these cell types play important role in cellular immune response against invading pathogens in invertebrates. Moreover, there was decrease in the proportion of prohemocytes in the challenged group. Previous studies have shown that prohemocytes are produced in the haemolymph and hematopoietic organs of various insects species and can serve as stem cells, which after stimulation differentiate into other cell types (Yamashita and Iwabuchi, 2001; Ling et al., 2005). Therefore, the prohemocytes decrease in our study may be related to the hemocyte differentiation in plasmatocytes and granulocytes, which have been found in higher proportion showing relationship with increased expression of the Leishmania gene in these times analyzed (1, 2 and 5 dpi). Johns et al. (1998) studying the tick *Dermacentor variabilis*, observed that the population of hemocytes increased significantly within 48 hours when inoculated with *Bacillus subtilis*. Still inoculating the same tick species with spirochete, *Borrelia burgdorferi*, there was increased population of hemocytes within the first hour after infection. On the other hand, there was decrease of hemocytes in the first 24 hours after the destruction of all bacteria from the tick hemolymph. The increase in total number of hemocytes and proportion of plasmatocytes and granulocytes has also been observed in our study, being high up to the 2nd dpi, according to Johns et al., (1998). Inoue et al., (2001) studying *Ornithodoros moubata* inoculated with latex particles, also observed increased proportion of plasmatocytes and granulocytes up to 72 h after inoculation, also corroborating our findings. The literature shows that the increased population of hemocytes in the hemolymph is generally associated with increased plasmatocytes and granulocytes, which are the main cells related to phagocytosis.

Plasmatocytes and granulocytes are the main hemocytes responsible for the phagocytosis, which has been shown as important primary line of defense to suppress the spread of pathogens in several tick species (Kuhn and Haug 1994; Zhioua et al. 1997). The melanization process is another method widely used by arthropods to destroy pathogens in hemocele, particularly Gram-negative bacteria and larger organisms that cannot be phagocytosed. In our study, among the five cell types, only granulocytes and plasmatocytes performed phagocytosis of latex particles and promastigotes of *L. infantum*. Our study is

pioneer in ultrastructural functional characterization of hemocytes of *Rh. sanguineus* tick species, especially with phagocytosis assays with *L. infantum*. When comparing these results with those of other studies on hard and soft ticks, our results are in agreement with the findings of other authors showing that plasmatocytes and granulocytes have phagocytic activity in both (Kuhn, Haug, 1994; Pereira et al., 2001; Inoue et al. 2001; Borovickova and Hypsa, 2005). Burenová et al. (2006), studying *Ornithodoros moubata* and *Ixodes ricinus* infected with gram-negative bacteria, *Chryseobacterium indologenes*, observed that the bacterium is phagocytosed in the hemocoel by hemocytes of both tick species studied, completely eliminating the pathogen from the tick hemocoel. The same results were found by Johns et al. (2000) when studying *Dermacentor variabilis* inoculated with the bacterium *Borrelia burgdorferi* in the hemolymph to fight bacterial multiplication. Differing from our study, in which despite describing phagocytosis of leishmania by hemocytes, there was no total elimination of the parasite in tick hemolymph in the periods analyzed. The leishmania may have developed some mechanism to survive in the *Rh. sanguineus* hemocoel for at least 5 dpi. The period for parasite elimination is not clear in the literature, studies on phagocytosis of hemocytes of *Ixodes ricinus* inoculated with *Micrococcus lysodeikticus* show that pathogen elimination can occur up to 24 h after inoculation (Kuhn and Haug, 1994). The literature also shows phagocytosis of fungi, *Candida haemulonii* and *Penicillium* spp., by hemocytes of *Ornithodoros moubata* and *Boophilus microplus* ticks. (Lossová et al., 2001; Silva et al. 2006). Thus, it is already well described in the literature that ticks' hemocytes are able to phagocytose bacteria, fungi and latex particles, and this is the first study describing the phagocytosis of promastigotes of *L. infantum*.

The phagocytosis of protozoa by invertebrate hemocytes was previously described in insect *Rhodnius prolixus*, where plasmatocytes are able to phagocytose the flagellate protozoan *Trypanosoma rangeli*, observing intact flagella and under degenerative process within the hemocytes ((Oliveira; De Souza, 2003). These same characteristics were also observed in our study; however, it is worth noting that *R. prolixus* is the main vector for *T. rangeli*, interaction not described between *Rh. sanguineus* and *Leishmania*.

The role of melanization and activity of antimicrobial peptides have been studied as important mechanisms of hemocytes to phagocytose and destroy microorganisms, but the details of these mechanisms are not well understood in ticks (Inoue et al., 2001). Most studies on melanization are related to studying insects, and little is known about the system for

activation of phenol oxidase (PO) in arachnids. In our study on *Rh. sanguineus* there was increased PO activity in the hemolymph in the group inoculated with promastigotes of *L. infantum*. The increased PO activity on 5th dpi can be related to the increased expression of the parasite gene on tick, indicating higher presence of parasite.

The highest PO activity in the hemolymph was also reported in studies on insects such as the study of Melo et al. (1995) on *Rhodnius prolixus* infected with *Trypanosoma rangeli* who observed the increased PO activity on 1st and 2nd dpi with flagellate. Also, there was a higher PO activity in the hemolymph of *Spodoptera litura* infected with the fungus *Beauveria bassiana* (Bali, Kaur, 2013). PO is produced by hemocytes and, therefore a higher PO concentration in the haemolymph is associated with its lysis (González-Santoyo et al, 2012). In our study we observed increased total hemocyte population on days 1 and 2 after infection not being observed any change on the 5th dpi between infected and control groups. This fact can be associated with cell lysis with PO release in the hemolymph to combat the parasite. Cell types producers of PO in *Rh. sanguineus* were granulocytes, plasmatocytes and spherulocytes. It is noteworthy that no work has identified the type of hemocytes with PO activity in ticks yet. However, various cell types may account for the increased PO production in insects, which can vary according to species, such as oenocitoid in *Bombyx mori* and other Lepidopteran (Lu et al., 2014), Oenocitoid, granular cells and spherulocytes in *Manduca sexta* (Ling et al., 2005).

Some studies on invertebrates show the importance of nitric oxide in the humoral immune response against many invading pathogens. This reactive nitrogen intermediate plays an important role in the cytotoxic arsenal to destroy foreign bodies in the host haemocoel and it is closely related to phagocytosis (Faraldo et al. 2005). Our study demonstrated increasing nitric oxide concentration in the hemolymph of adults of *Rh. sanguineus* infected with *L. infantum* on 1st, 2nd and 5th dpi. Coincidentally, this study shows increase of plasmatocytes and granulocytes in those times demonstrably related to parasite phagocytosis. Thus, it is suggested that the increased NO concentration is associated with a higher percentage of these cells in the hemolymph. Little is known about the NO production in arachnids, most studies have been developed on insects. Nappi et al. (2000) reported increased NO production by *Drosophila melanogaster* infected with the wasp *Leptopilina boulardi*, and Faraldo et al. (2005) when assessing the effect of inoculation of the fungus *Saccharomyces cerevisiae* in larvae of *Chrysomya megacephala*, corroborating our findings. However, Faraldo et al. (2005)

observed nitric oxide production peak 24 hours after inoculation, followed by decrease, a fact not found in our study.

As the literature shows no studies related to *Rh. sanguineus* response against infection with *L. infantum*, our results suggest that the *Rh. sanguineus* activates the cellular and humoral immune response after infection with *L. infantum*, but more studies are needed to assess the impact of such response in fighting infection.

Acknowledgements The authors express their gratitude to the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) by fellowships. We thank Dra. Cássia Docena for helping in the DIC experiments. This work was developed in the Laboratory of Imunopatologia Professor Keizo Asami (LIKA)/UFPE and Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (FIOCRUZ/PE).

References

- Anderson, J. M., Sonenshine, D. E., Valenzuela, J. G. Exploring the mialome of ticks: an annotated catalogue of midgut transcripts from the hard tick, *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae). BMC Genomics, v.9, n.9, p.552, 2008.
- Baneth, G. (2011) Perspectives on canine and feline hepatozoonosis. Veterinary Parasitology, 181, 3–11.
- Bali, G. K., Kaur, S. (2013) Phenoloxidase activity in haemolymph of *Spodoptera litura* (Fabricius) mediating immune responses challenge with entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillmin. Journal of Entomology and Zoology Studies, 1, 6, 118-123
- Bhattacharya, S. T., Bayakly, N., Lloyd, R., Benson, M. T., Davenport, J., Fitzgerald, M. E. C., Rothschild, M., Lamoreaux, W. J., Coons, L. B. (2000). Nitric Oxide Synthase and cGMP Activity in the Salivary Glands of the American Dog Tick *Dermacentor variabilis*. Experimental Parasitology, 94, 111–120.
- Borovicková, B., Hypsa, V. (2005). Ontogeny of tick hemocytes: a comparative analysis of *Ixodes ricinus* and *Ornithodoros moubata*. Experimental and Applied Acarology, 35: 317–333.
- Brayner, F. A., Araújo, H. R. C., Cavalcanti, M. G. S., Alves, L. C., Peixoto, C. A. (2005) Ultra-structural characterization of the hemocytes of *Culex quinquefasciatus* (DIPTERA: Culicidae). Micron, 36, 359-367.
- Burenová, V., Hajdusek, O., Franta, Z. (2009) IrAM-An alpha2-macroglobulin from the hard tick *Ixodes ricinus*: characterization and function in phagocytosis of a potential pathogen *Chryseobacterium indologenes*. Developmental & Comparative Immunology, 33, 489-498.
- Chomczynski, P. (1993) A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. Biotechniques, 15, 3, 532-4.

- Colombo, F. A., Odorizzi, R. M., Laurenti, M. D., Galati, E. A., Canavez, F., Pereira-Chioccola, V. L. (2011) Detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* RNA in fleas and ticks collected from naturally infected dogs. *Parasitology Research*, 109, 2, 267-74.
- Dantas-Torres, F. (2008) The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): From taxonomy to control. *Veterinary Parasitology*, 152, 3-4, 173-85.
- Dantas-Torres, F., Lorusso, V., Testini, G., de Paiva-Cavalcanti, M., Figueredo, L. A., Stanneck, D., Mencke, N., Brandão-Filho, S. P., Alves, L. C., Otranto, D. (2010) Detection of *Leishmania infantum* in *Rhipicephalus sanguineus* ticks from Brazil and Italy. *Parasitol Research*, 6, 857–860.
- Dantas-Torres, F., Otranto, D. (2011) Cold-stress response of engorged females of *Rhipicephalus sanguineus*. *Experimental and Applied Acarology*, 54, 3, 313-8.
- de la Fuente, J., Estrada-Pena, A., Venzal, J. M., Kocan, K. M., Sonenshine, D. E. (2008) Ticks as vectors of pathogens that cause disease in humans and animals. *Frontiers in Bioscience*, 13, 6938-6946.
- de la Fuente, J., Estrada-Pena, A., Venzal, J. M., Kocan, K.M., Sonenshine, D. E. (2008) Overview: Ticks as vectors of pathogens that cause disease in humans and animals. *Frontiers in Bioscience*, 13, 6938–6946.
- de Moraes, R. C., Gonçalves, S. C., Costa, P. L., da Silva, K. G., da Silva, F. J., Silva, R. P., de Brito, M. E., Brandão-Filho, S. P., Dantas-Torres, F., de Paiva-Cavalcanti, M. (2013) Detection of *Leishmania infantum* in animals and their ectoparasites by conventional PCR and real time PCR. *Experimental and Applied Acarology*, 59, 473–481.
- Faraldo, A. C., Sanunes, A., Faccioli, L. H., Del Bel, E. A., Lello, E. (2005). Nitric oxide production in blowfly hemolymph after yeast inoculation. *Nitric Oxid.* 13, 240-246.
- González-Santoyo, I., Córdoba-Aguilar, A. (2012) Phenoloxidase: a key component of the insect immune system. *Entomologia Experimentalis Applicata*, 142, 1, p.1–16.
- Griesch, J., Wedde, M., Vilcinskas, A. (2000) Recognition and regulation of metalloproteinase activity in the hemolymph of *Galleria mellonella*: a new pathway mediating induction of humoral immune responses. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 30, 461-472.
- Hillyer, J. F., Christensen, B. M. (2002) Characterization of hemocytes from yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Histochemistry and Cell Biology*, 117, 431 – 440.
- Hillyer, J. F., Schmidt, S. L., Fuchs, J. F., Boyle, J. P., Christensen, B. M. (2005) Age-associated mortality in immune challenged mosquitoes (*Aedes aegypti*) correlates with a decrease in haemocyte numbers. *Cellular Microbiology*, 7, 39–51.
- Inoue, N., Hanada, K., Tsuji, N. (2001) Characterization of phagocytic hemocytes in *Ornithodoros moubata* (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology*, 38, 514-519.
- Johns, R., Sonenshine, D. E., Hynes, W. L. (1998). Control of bacterial infections in the hard tick *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae): evidence for the existence of antimicrobial proteins in tick hemolymph. *Journal of Medical Entomology*, 35, 458-464.
- Jongejan, F., Uilenberg, G. (2004). The global importance of ticks. *Parasitology*, 129, S1-S12.
- Kuhn, K. H., Uhliř, J., Grubhoffer, L. (1996) Ultrastructural localization of a sialic acid—specific hemolymph lectin in the hemocytes and other tissues of the hard tick *Ixodes ricinus* (Acari: Chelicerata). *Parasitology Research*, 82: 215–221.

- Ling, E., Yu, X. Q. (2005). Prophenoloxidase binds to the surface of hemocytes and is involved in hemocyte melanization in *Manduca sexta*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35, 1356–1366, 2005.
- Loosová, G., Jindrák, L., Kopáček, P. (2001) Mortality caused by experimental infection with the yeast *Candida haemulonii* in the adults of *Ornithodoros moubata* (Acarina: Argasidae). *Folia Parasitologica*. 48, 2, 149-53.
- Megy, K., Emrich, S. J., Lawson, D., Campbell, D., Dialynas, E., Hughes, D. S. Vector Base: improvements to a bioinformatics resource for invertebrate vector genomics. *Nucleic Acids Research*, v. 40, p. D729–D734, 2012.
- Melo, C.B., Garcia, E.S., Ratcliffe, N.A., Azambuja, P. *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*: interplay with hemolymph components of *Rhodnius prolixus*. *Journal Invertebrate Pathology*, v.3, p.261-8, 1995.
- Nappi, A. J., Vass, E., Frey, F., Carton, Y. (2000). Nitric Oxide Involvement in *Drosophila* Immunity. *NITRIC OXIDE: Biology and Chemistry*, 4, 4, 423–430 .
- Oliveira, M.A., De Souza, W., (2003). Further morphological studies on the behavior of *Trypanosoma rangeli* in the hemocytes of *Rhodnius prolixus*. *Parasitol. Int.* 52, 299–307.
- Parola, P., Socolovschi, C., Jeanjean, L., Jeanjean, L., Bitam, I., Fournier, P. E., Sotto, A., Labauge, P., Raoult, D. (2008) Warmer weather linked to tick attack and emergence of severe rickettsioses. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2, 338.
- Paz, G. F. , Ribeiro, M. F., Michalsky, E. M., da Rocha, Lima, A. C., França-Silva, J. C., Barata, R. A., Fortes-Dias, C. L., Dias, E. S. (2010) Evaluation of the vectorial capacity of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the transmission of canine visceral leishmaniasis. *Parasitol Research*, 106, 523–528.
- Pereira, L. S., Oliveira, P. L., Barja-Fidalgo, C., Daffre, S. (2001) Production of reactive oxygen species by hemocytes from the cattle tick *Boophilus microplus*. *Experimental Parasitology*, 99, 66 – 72.
- Prina, E., Roux, E., Mattei, D., Milon, G. (2007) Leishmania DNA is rapidly degraded following parasite death: an analysis by microscopy and real-time PCR. *Microbes and Infection*, 9, 1307 e 1315.
- Schnittger, L., Rodriguez, A. E., Florin-Christensen, M., Morrison, D. A. (2012) Babesia: A world emerging. *Infection, Genetics and Evolution*, 12, 1788–1809.
- Shi, L., Paskewitz, S. M. (2006) Proteomics and insect immunity. *Invertebrate Survival Journal*, 3, 4 – 17.
- Silva, J. E. B., Boleli, I. C., Simões, Z. L. P. (2002) Hemocytes types and total differential counts in unparasitized and parasitized *Anastrepha obliqua* (Diptera, Tephritidae) larvae . *Brazilian Journal of Biology*, 62, 689 – 699.
- Smith, V.J., Soderhall, K., 1983. Induction of degranulation and lysis of haemocytes in the fresh water crayfish, *Astacus astacus* by components of the prophenoloxidase activating system in vitro. *Cell and Tissue Research*. 233:2, 295–303.
- Solano-Gallego, L., Rossi, L., Scroccaro, A. M., Montarsi, F., Caldin, M. Furlanello, T., Trotta, M. (2011) Detection of *Leishmania infantum* DNA mainly in *Rhipicephalus sanguineus* male ticks removed from dogs living in endemic areas of canine leishmaniasis. *Parasites & Vectors*, 4, 86.
- Sonenshine, D. E., Hynes, W. L. (2008) Molecular characterization and related aspects of the innate immune response in ticks. *Frontiers in Bioscience*, 13, 7046-7063.
- Tafalla, C., Novoa, B., Figueras, A.(2002) Production of nitric oxide by mussel (*Mytilus galloprovincialis*) hemocytes and effect of exogenous nitric oxide on phagocytic functions. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 132, 423–431.

Yamashita, M., Iwabuchi, K., (2001). *Bombix mori* prohemocytes division and differentiation in individual microcultures. *J. Insect Physiol.* 47, 325–331.

Zhioua, E., Yeh, M. T., Lebrun, R. A. (1997). Assay for phenoloxidase activity in *Amblyomma americanum*, *Dermacentor variabilis*, and *Ixodes scapularis*. *Journal Parasitology*, 83, 3, 553-4.

FIGURES

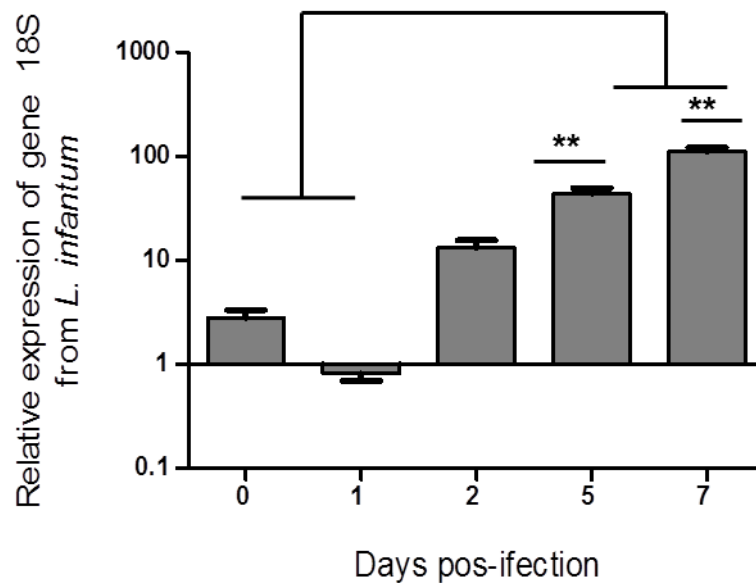


Figure 1: Relative expression of the gene 18S ribosomal of *Leishmania infantum* at time 0 and on days 1, 2, 5 and 7 after infection with *L. infantum* promastigote, (normalized against the housekeeping internal control gene 18S ribosomal of the *Rh. sanguineus*). Bar charts represent Mean $\pm$ SEM of 5 pools of 3 ticks. Asterisk indicates statistical significance at $p < 0.05$ (**).

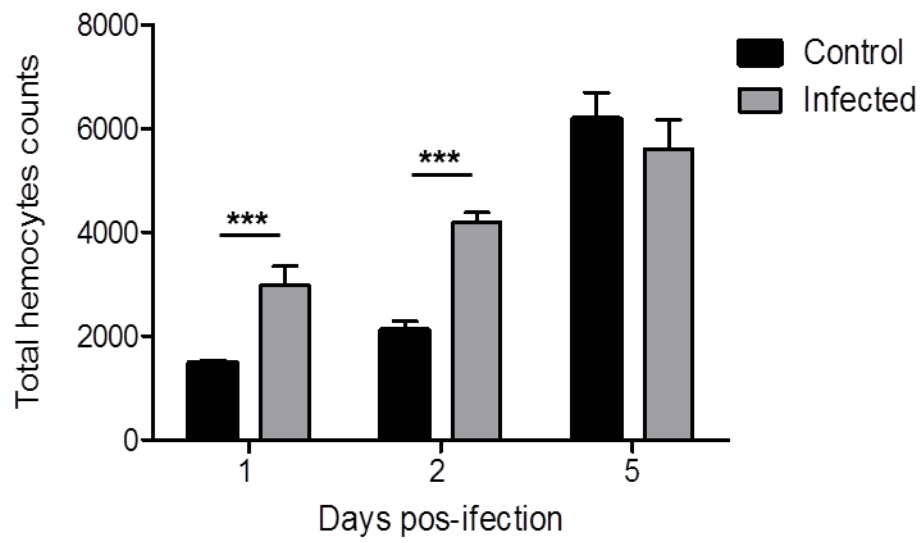


Figure 2: Counts total of hemocytes of *Rh. sanguineus* infected with *L. infantum* Bar charts represent mean $\pm$ SEM of 5 experiment with 3 ticks. Asterisk indicates statistical significance at $p < 0.001$.

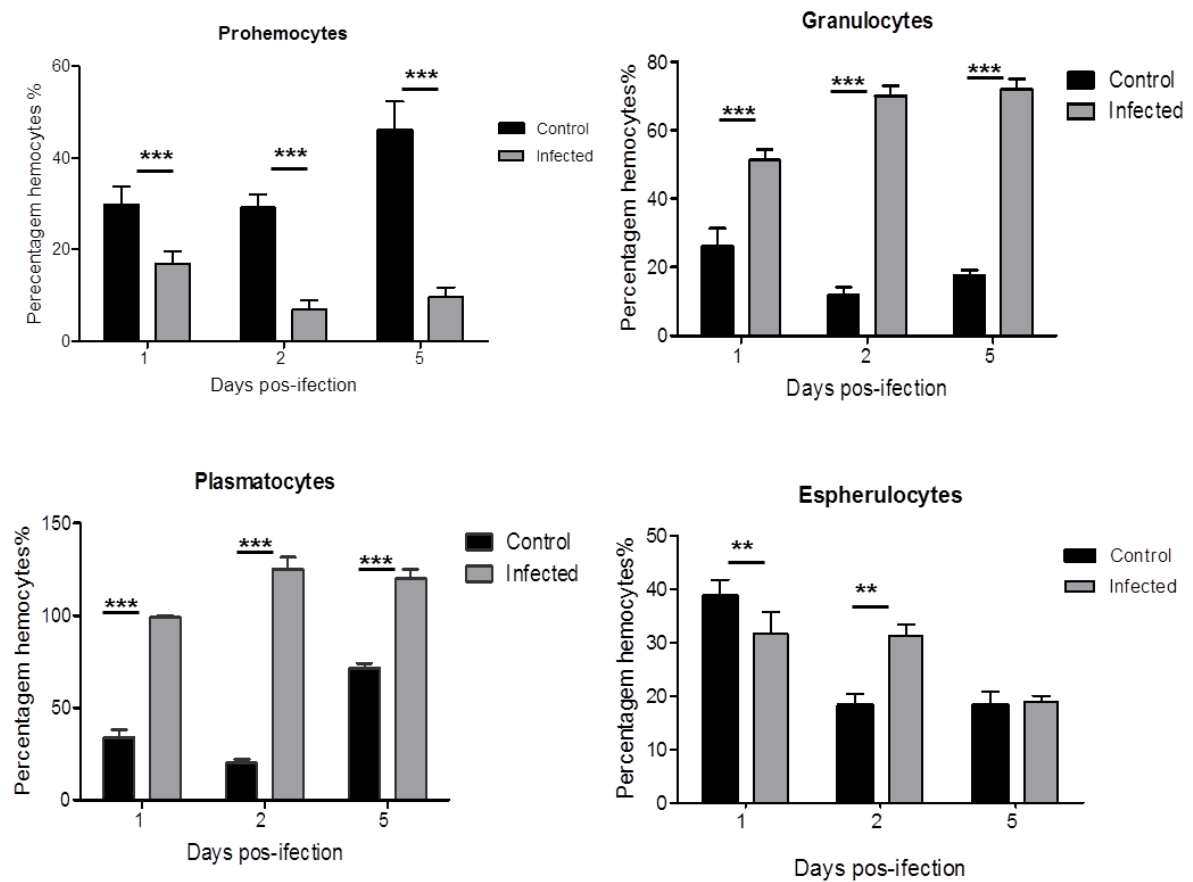


Figure 3: Hemocytes differential counts of *Rh. sanguineus* infected and non-infected with *L. infantum*. Bar charts represent Mean $\pm$ SEM of 5 experiment with 3 ticks (A) prohemocytes (B) granulocytes (C) plasmotocytes and (D) espherulocytes. Asterisk indicates statistical significance at $p < 0.001$ and $p < 0.05$ (**).

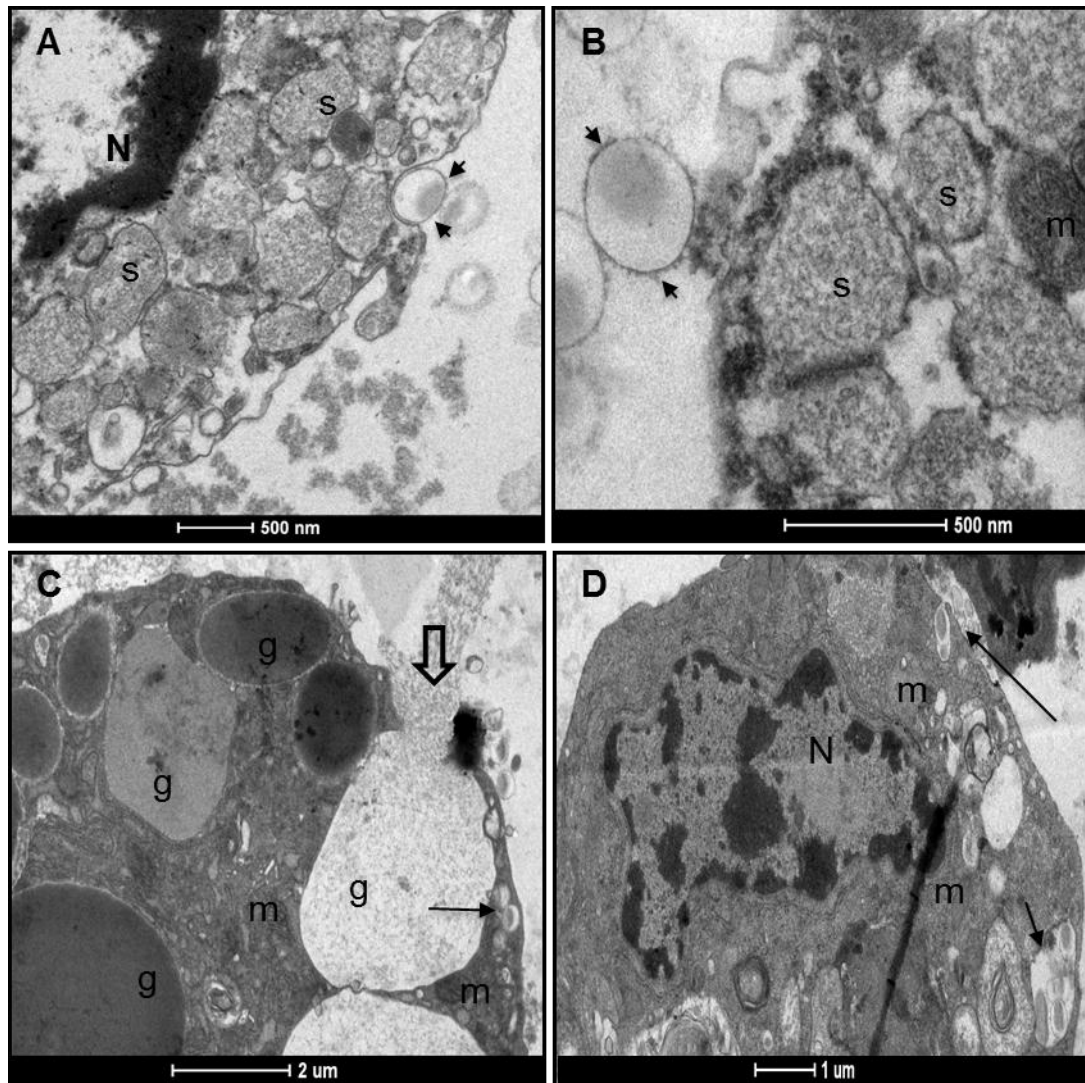


Figure 4(A-D): Electron micrographs of *Rhipicephalus sanguineus* hemocyte phagocytosing latex particles 24 after challenge. A-B: Spherulocyte in contact with the latex particle. Note the presence electrondense material (arrowhead) on the particles surface. C: Granulocyte with presence of latex particles in its cytoplasm (short arrow) and granular material (open arrow) being spilled out the cell. D: Plasmatocyte phagocytosing latex particles (long arrow) without vacuole formation and presence of latex particles in its cytoplasm (short arrow) in the vacuole. Note membrane structures (star) in the cell cytoplasm. N = nucleous, s = spherule, m = mitochondria g = granule.

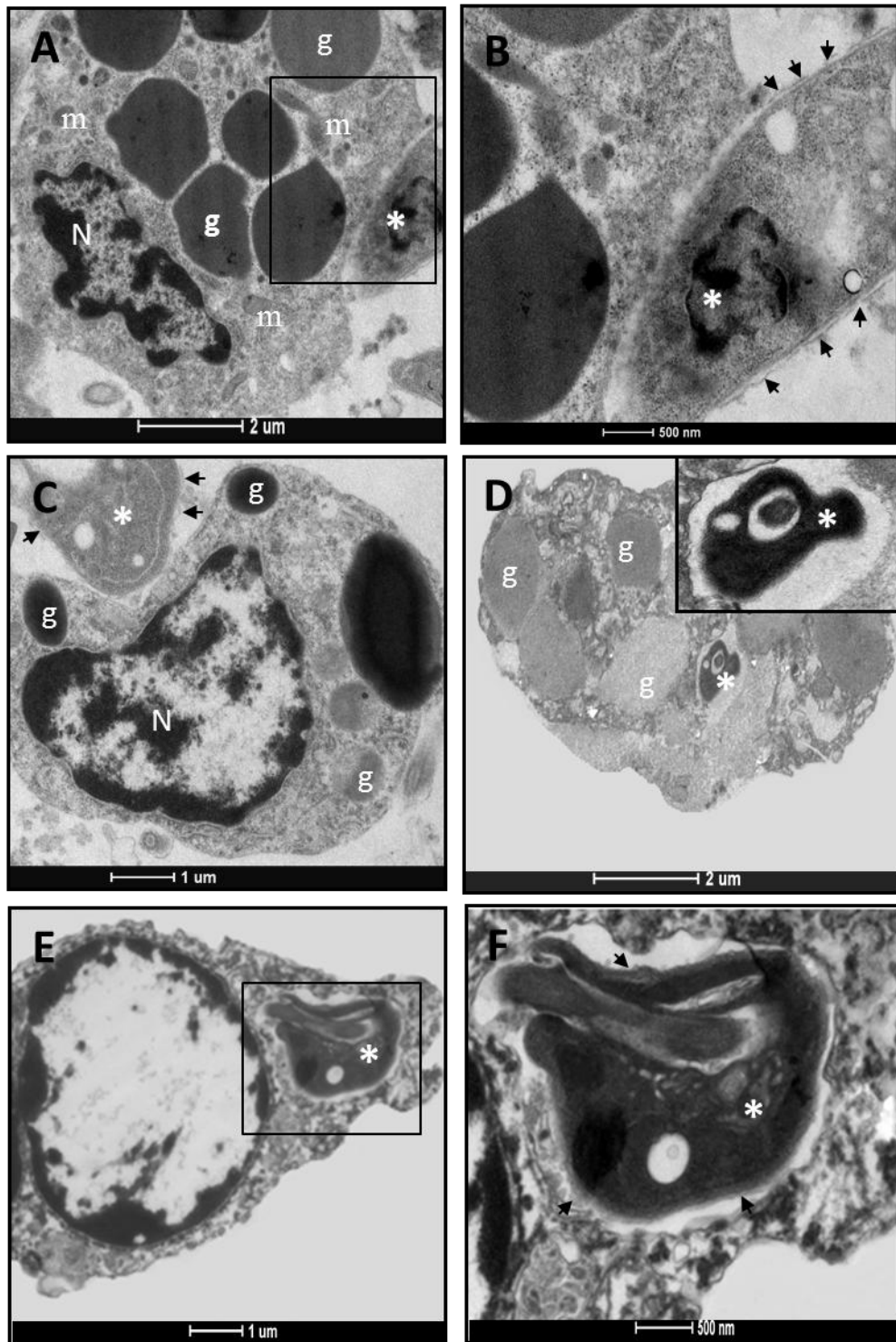


Figure 5(A-F): Electron micrographs of *Rhipicephalus sanguineus* hemocytes phagocytosing *Leishmania infantum* 24 hours after challenge. A-C: Granulocyte in contact with *Leishmania infantum* (asterisk). Note the presence of electrondense equipment (arrowhead) on the surface of *Leishmania*. D: Granulocyte with presence of leishmania (asterisk) in its cytoplasm. In detail note the presence of vacuole (V). E-F: Plasmatocytes with the presence of *Leishmania*

infantum (asterisk) in the cytoplasm with formation of vacuole (v). Note the presence of electrondense material (arrowhead) on the surface of Leishmania. N = nucleus, m = mitochondria, g = granule.

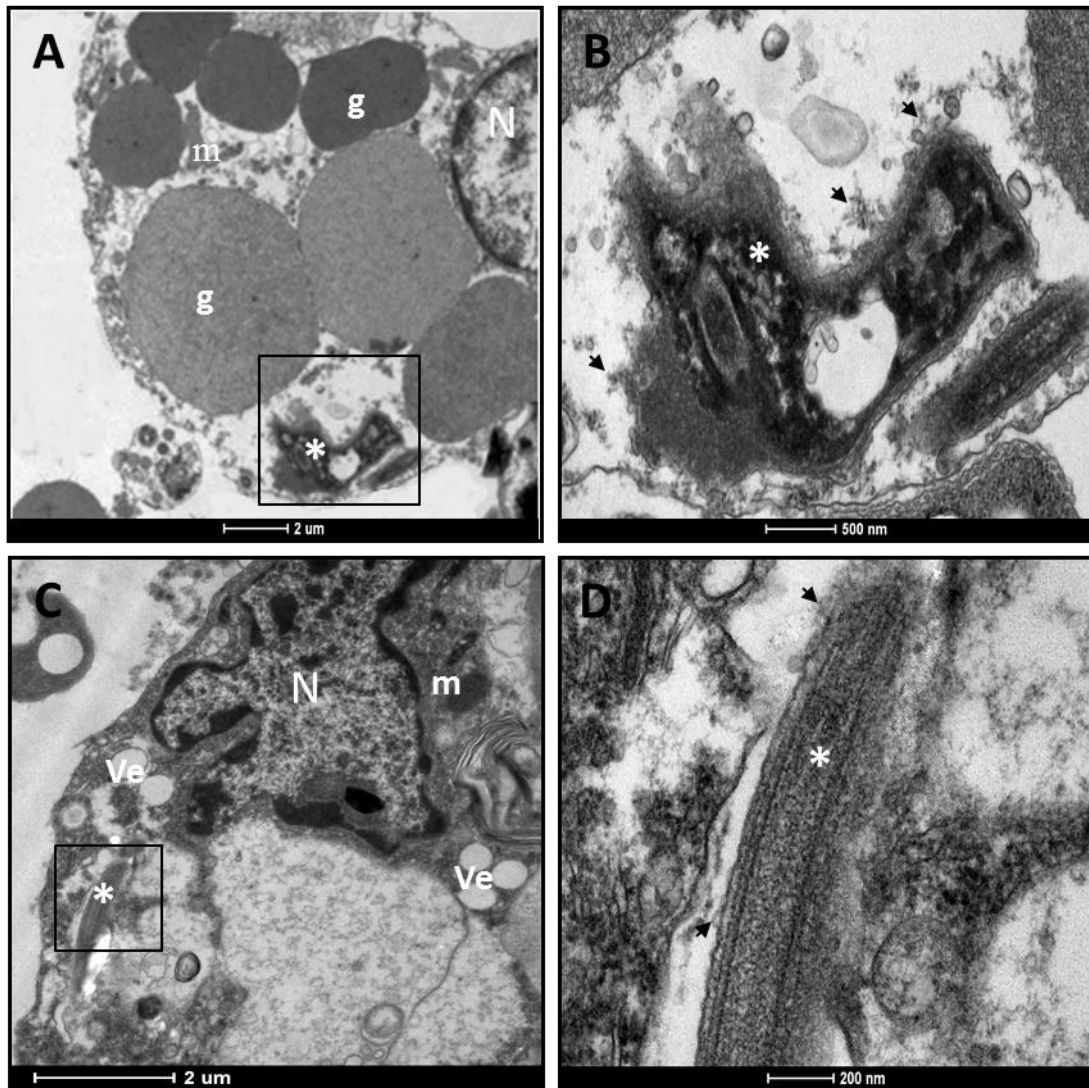


Figure 6 (A-D): Electron micrographs of *Rhipicephalus sanguineus* hemocytes phagocytosing *Leishmania infantum* 24 hours after challenge. A-B: Granulocyte with altered morphology by the presence of *Leishmania infantum* (asterisk) into the cytoplasm and degradation characteristics. Note that the membrane and cell material of leishmania are fullyunorganized with electrondense material deposition on the arasite surface. C-D: Plasmatocyte with altered morphology by the presence of leishmania (asterisk) in its cytoplasm. In detail note the presence of electrondense material (arrowhead) on the leishmania surface. N = nucleus, m = mitochondria, g = granule, Ve = vesicle.

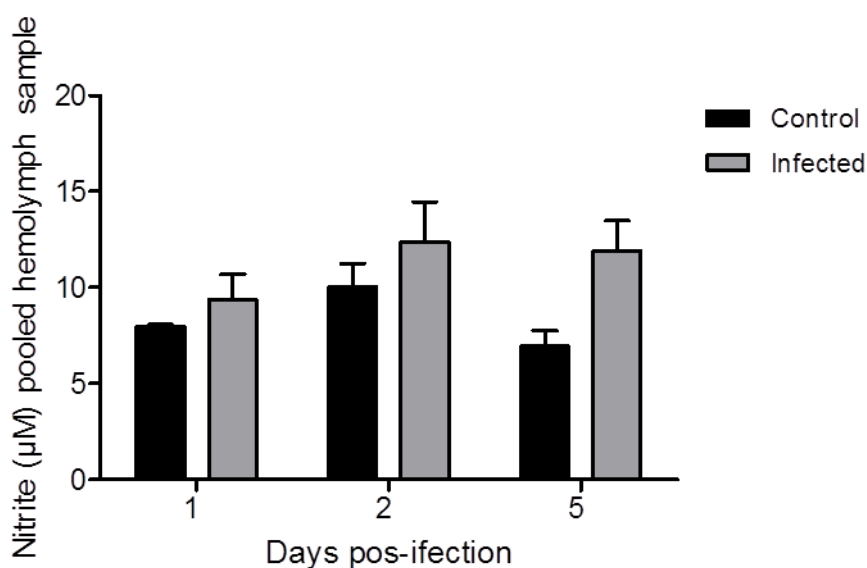


Figure 7: Comparison of NO₂ concentration in hemolymph pool in groups control and infected. Bar charts represent Mean $\pm$ SEM of 5 experiment with 3 ticks. Asterisk indicates statistical significance at $p < 0.05$.

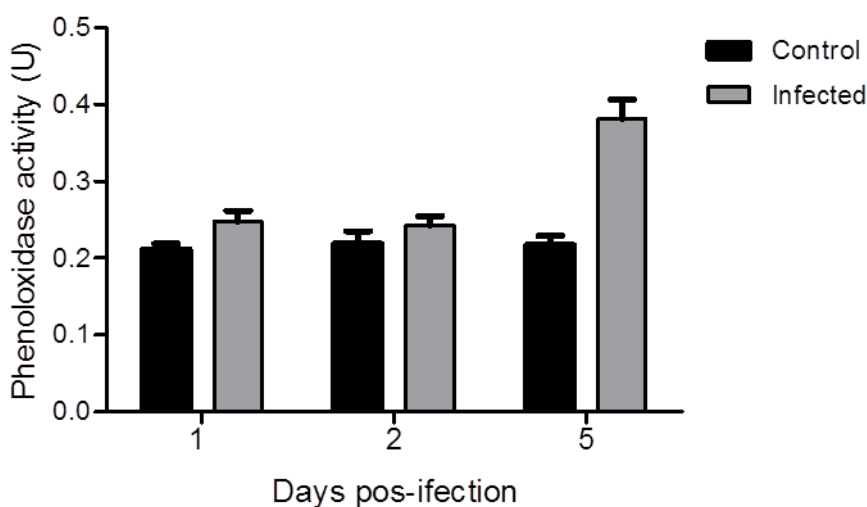


Figure 8: Comparison of activity of the Phenoloxidase in hemolymph pool in groups control and infected. Bar charts represent Mean $\pm$ SEM of 5 experiment with 3 ticks. Asterisk indicates statistical significance at $p < 0.05$.

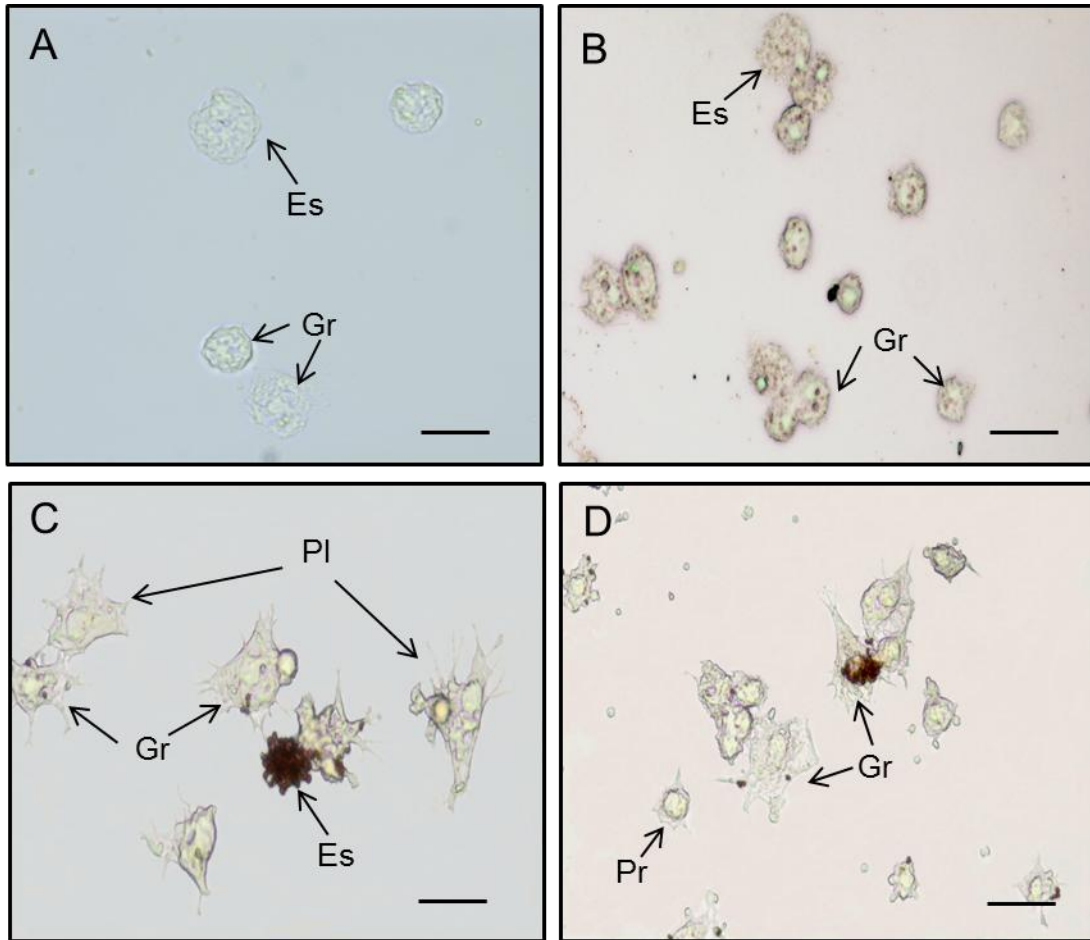


Figure 9 (AD): Micrographs of phenoloxidase activity in hemocyte *Rhipicephalus sanguineus* challenged with *Leishmania infantum*. A: Control reaction in the absence of L-DOPA substrate. B-D: Granular hemocytes incubated with L-DOPA substrate for 30 minutes. Note brown color, indicating PO activity of substrate oxidation. Cells, granulocytes (Gr) and spherulocytes (Es) were more pronounced while plasmatocytes (Pl) and prohemocytes (Pr) have no reaction. Barra = 50 μm.

ANEXO A



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Recife, 19, de junho de 2012

Carta – Resposta

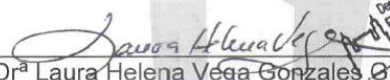
Projeto nº 30/2011

Ao pesquisador: Dr. Fabio André Brayner dos Santos.

Informo que o projeto, Avaliação do envolvimento do *Rhipicephalus sanguineus* na transmissão da leishmaniose visceral em condições laboratoriais.

Proposto por V.S. foi aprovado pela CEUA/CPqAM em 19/06/2012, seguindo, anexo o respectivo Certificado de Aprovação pela Secretaria da CEUA/CPqAM.

Cordialmente


Dr^a Laura Helena Vega Gonzales Gil
Coordenadora CEUA/CPqAM

Dr^a Laura Gil
Diretor de Inovação e Inovação Experimental
Pesquisador em Saúde Pública
Mar. Saúde 1555302
CPqAM - FIOCRUZ