

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
ÁREA DE GENÉTICA E BIOTECNOLOGIA

FELIPE DE OLIVEIRA VIEIRA

Dissertação de mestrado intitulada:

Estabelecimento de metodologia de isolamento e cultivo primário de hepatócitos bovinos para estudos do efeito modulador da saliva do carrapato *Rhipicephalus microplus* sobre expressão de genes relacionados à imunidade inata

Juiz de Fora

2018

FELIPE DE OLIVEIRA VIEIRA

**ESTABELECIMENTO DE METODOLOGIA DE ISOLAMENTO E
CULTIVO PRIMÁRIO DE HEPATÓCITOS BOVINOS PARA
ESTUDOS DO EFEITO MODULADOR DA SALIVA DO CARRAPATO
RHIPICEPHALUS MICROPLUS SOBRE EXPRESSÃO DE GENES
RELACIONADOS À IMUNIDADE INATA**

Dissertação de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Área: Genética e Biotecnologia, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas - Área: Genética e Biotecnologia.

Orientador: Dr. Marco Antonio Machado

Co-orientadora: Dra. Wanessa Araújo Carvalho

Juiz de Fora

2018

FELIPE DE OLIVEIRA VIEIRA

Estabelecimento de metodologia de isolamento e cultivo primário de hepatócitos bovinos para estudos do efeito modulador da saliva do carrapato *Rhipicephalus microplus* sobre expressão de genes relacionados à imunidade inata

Dissertação de Mestrado submetida à banca examinadora do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Ênfase em Genética e Biotecnologia, como parte dos requisitos necessários para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Biológicas

Aprovada em: __/__/____

BANCA EXAMINADORA:

Dr. Marco Antonio Machado - Orientador
Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora - MG

Dra. Wanessa Araújo Carvalho – Co-orientadora
Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora - MG

Dra. Simone Eliza Facioni Guimarães - Examinadora Externa
Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG

Dra. Heloisa D'Ávila da Silva Bizarro - Examinadora Interna
Universidade Federal de Juiz de Fora, Viçosa – MG

Dedico este trabalho com muito amor, ao meu filho que deu um novo sentido à minha vida, e com muita gratidão aos meus pais que sempre acreditaram na minha capacidade.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Antônio Dimas Duarte Vieira e Ana Maria de Oliveira Vieira, que sempre me apoiaram nas minhas escolhas, sempre estiveram ao meu lado nos momentos mais difíceis e fizeram o possível para me ver feliz, e me ensinaram os valores que carregarei para o resto da minha vida. Sou muito grato a vocês por tudo.

Ao meu filho, Tom Medeiros Vieira, pelo amor incondicional, pelo carinho e por me inspirar a ser um profissional de qualidade.

Ao meu orientador Dr. Marco Antonio Machado, pela disponibilidade em auxiliar e tirar minhas dúvidas e por todo o conhecimento passado durante este trabalho.

À minha co-orientadora Dra. Wanessa Araújo Carvalho por toda dedicação, disponibilidade, paciência, ajuda e por todo o ensinamento técnico e científico imprescindíveis para a conclusão deste trabalho.

Aos meus colegas de bancada Raquel Morais, Thiago Almeida, Giuliana Medeiros e Bianca Felizardo, por toda a ajuda e colaboração para o desenvolvimento deste experimento.

À Dra. Marta Fonseca Martins por todo o ensinamento e por estar sempre disposta a tirar minhas dúvidas quando requisitada.

A todos da equipe do Laboratório de Genética Molecular da Embrapa Gado de Leite, que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste experimento, e por formarem uma equipe tão agradável de conviver e trabalhar.

À Embrapa Gado de Leite pela oportunidade em desenvolver este trabalho e a todos os empregados que de alguma forma contribuíram com este trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora pela oportunidade de formação científica.

À CAPES, à FAPEMIG e ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos e pelo apoio financeiro que permitiram o desenvolvimento deste trabalho.

E por último, mas não menos importante, a Deus, que me acompanhou em todos os momentos e me permitiu chegar aonde cheguei.

RESUMO

A imunidade inata é a primeira linha de defesa do organismo contra lesões e invasões de micro-organismos. O sistema complemento desempenha um papel importante na mediação das respostas adquiridas e inatas na defesa contra infecções microbianas e parasitárias. Em bovinos, a resposta contra infestações por carrapato faz com que células da imunidade inata, residentes no tecido lesado, produzam citocinas pró-inflamatórias, sinalizando para o início de uma resposta mais específica, como a produção de proteínas de fase aguda (PFAs). Cerca de 80 a 90% dos componentes plasmáticos do complemento e proteínas de fase aguda são produzidas no fígado e liberadas sistemicamente para o controle de reações inflamatórias. Já existem metodologias bem estabelecidas de isolamento e cultivo de hepatócitos para estudos *in vitro*, bem como linhagens comerciais para humanos e murinos, no entanto para bovinos não existem metodologias de isolamento de hepatócitos bem estabelecidas, nem linhagens comerciais disponíveis para cultivo desse subtipo celular. O carrapato bovino, *Rhipicephalus microplus*, é um parasito que provoca perdas econômicas para a pecuária mundial. É sabido que raças bovinas diferem quanto à resistência ao carrapato, sendo as raças *Bos indicus* mais resistentes em comparação com as raças *Bos taurus*. Visto que existem diferenças na produção de moléculas do complemento e PFA entre bovinos resistentes e susceptíveis ao carrapato, este trabalho objetivou estabelecer uma metodologia de isolamento primário e cultivo *in vitro* de hepatócitos bovinos para verificar o efeito modulador induzido pela saliva do carrapato *R. microplus* sobre a expressão de genes relacionados à imunidade inata, tais como os fatores do complemento (C1, C3, C4, C5, lectina ligante de manose) e proteínas de fase aguda (Alpha 1 glicoproteína ácida, haptoglobina e amiloide sérica A). Para tal, foram avaliados diversos protocolos de isolamento e cultivo primário de hepatócitos, onde foi estabelecida a metodologia com maior viabilidade celular, qualidade morfológica e do material genético extraído. As análises de expressão gênica sugeriram que o modelo de cultivo *in vitro* pode não estar mantendo as características fisiológicas dos hepatócitos, visto que a expressão de alguns genes estava mais baixa nas células cultivadas quando comparada ao tecido hepático fresco. Embora os estímulos utilizados como controle positivo tenham regulado positivamente a expressão do gene que codifica a SAA, o mesmo não foi observado nos genes do complemento que são regulados pela mesma via de sinalização em murinos. Além disso, não foi observada diferença significativa entre as raças na expressão dos genes avaliados frente aos estímulos de saliva de carrapato e agente modulador de receptor nuclear relacionado com o controle hepático de inflamação em murinos. Os resultados obtidos sugerem que o isolamento primário e cultivo *in vitro* de hepatócitos bovinos podem estar provocando perda de função destas células, sendo necessárias maiores investigações em busca de melhor compreensão acerca dos processos fisiológicos desempenhados pelos hepatócitos.

Palavras-chave: Proteínas de fase aguda, Sistema complemento, Resistência ao carrapato bovino, Imunomodulação.

ABSTRACT

Innate immunity is the body's first line of defense against injury and invasion of microorganisms. The complement system plays a key role in mediating acquired and innate responses in defense against microbial and parasitic infections. In cattle, the response against tick infestations leads the innate immunity cells in the injured tissue to produce pro-inflammatory cytokines, signaling the onset of a more specific response, such as the production of acute-phase proteins (APPs). Approximately 80 to 90% of the plasma components of complement and APPs are produced in the liver and released systemically for the control of inflammatory reactions. There are well-established methods of isolation and culture of hepatocytes for *in vitro* studies, as well as commercial lines for human and murine, however for bovines there are no well-established methodologies for isolation of hepatocytes or commercial cell lines available for cultivation of this subtype. The bovine tick, *Rhipicephalus microplus*, is a parasite that causes great economic losses for the world livestock. It is known that bovine breeds differ in tick resistance, with the *Bos indicus* breeds being more resistant compared to the *Bos taurus* breeds. Since there are differences in the production of complement and APP molecules among resistant and susceptible ticks, this work aimed to establish a methodology for the primary isolation and *in vitro* culture of bovine hepatocytes to verify the modulatory effect induced by the *R. microplus* tick saliva on the expression of genes related to innate immunity, such as complement factors (C1, C3, C4, C5, mannose binding lectin) and APPs (Alpha 1 acid glycoprotein, haptoglobin e serum amyloid A). For this purpose, several protocols of isolation and primary culture of hepatocytes were evaluated. We were able to establish the methodology with high cellular viability, morphological features and quality of the genetic material. Gene expression analysis suggested that hepatocytes cultured *in vitro* might be losing the physiological features, since the expression of some genes was not detected in cultured cells. Although the stimuli used as a positive control have upregulated the expression of the SAA encoding gene, the same behavior has not been observed in complement genes regulated by the same signaling pathway in murine model. In addition, no significant difference was observed between breeds in the expression of the evaluated genes against the stimuli of tick saliva and nuclear receptor modulating agent related to the hepatic control of murine inflammation. Our results suggest that the primary isolation and *in vitro* culture of bovine hepatocytes might be causing loss of function of these cells, and further investigation is needed to better understand the physiological processes performed by hepatocytes.

Keywords: Acute-phase proteins, Tick-resistance, Immunomodulation, Complement system.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Vias de ativação do sistema complemento e a cascata proteolítica das fases iniciais. Fonte: ABBAS *et al.*, 2012..... 19
- Figura 2.** Ciclo de vida do carrapato *Rhipicephalus microplus*. Fonte: GONZALES *et al.*, 1974. 30
- Figura 3.** Organograma detalhando as atividades de isolamento, cultivo e avaliação da expressão gênica de hepatócitos bovinos submetidos a diferentes estímulos moduladores da imunidade inata. C1: fator do complemento 1; C3: fator do complemento 3; C4: fator do complemento 4; C5: fator do complemento 5; *MBL*: *mannose-binding lectin*; *AGP*: *α 1-acid glicoprotein*; *HP*: *Haptoglobin*; *SAA*: *serum amyloid A*. 37
- Figura 4.** Estabelecimento da concentração ideal de colagenase tipo II para digestão de tecido hepático bovino. Eixo X: Diferentes diluições de colagenase tipo II (0,1%; 0,2%; 0,4%) utilizadas para digestão de fragmentos de 5g de fígado, previamente divulsionados (cinza) ou não (preto). Eixo Y: Número absoluto de células viáveis x 10⁶ contadas por exclusão em Azul de Trypan na câmara de Neubauer..... 47
- Figura 5.** Rendimento e viabilidade de células de fígado bovino com diferentes metodologias. A) número absoluto de células viáveis x 10⁶ obtidas nos isolamentos mecânico e enzimático utilizando Colagenase Tipo II 0,2% (com e sem divulsão prévia do tecido). B) viabilidade celular nos diferentes tipos de isolamento celular de tecido hepático. Fragmentos de 5g de fígado foram utilizados para testar cada um dos protocolos. A contagem de células viáveis foi feita por exclusão em Azul de Trypan 0,5% na câmara de Neubauer. O cálculo da viabilidade foi realizado dividindo o número de células viáveis pelo número total de células contadas x 100. *P<0,05, teste *t* de Student. 48
- Figura 6.** Viabilidade de hepatócitos cultivados sobre diferentes revestimentos. Hepatócitos foram isolados de tecido divulsionado de fígado incubado com colagenase tipo II 0,2% e cultivados por 7 dias sobre diferentes matrizes de suporte (gelatina 0,2% e colágeno 300ug/ml). A viabilidade celular foi calculada por exclusão em Azul de Trypan

0,5% na câmara de Neubauer dividindo-se o número de células viáveis pelo número total de células contadas x 100. Não houve diferença estatística entre os tratamentos (P=0,3832 one-way Anova). 4

Figura 7. Cultivo primário de hepatócitos bovinos. Fotografias representativas de hepatócitos bovinos cultivados por 5 dias em A: placa de cultivo celular sem revestimento; B: Monocamada de gelatina 0,2%; e C: Sanduíche de gelatina 0,2%. 50

Figura 8. Qualidade do material genético (RNA) extraído de hepatócitos bovinos. A: Gel de eletroforese microfluídica das amostras de RNA extraídos dos cultivos de hepatócitos bovinos em monocamada de gelatina, sanduíche de gelatina e sem gelatina. As bandas mais escuras indicadas pelas setas vermelhas representam a banda 18S e 28S do RNA ribossômico. B: Gráfico comparativo dos valores de RIN das amostras cultivadas em monocamada de gelatina, sanduíche de gelatina e sem gelatina. *P < 0,05, one-way Anova. 52

Figura 9. Valor relativo da expressão dos genes que codificam proteínas do sistema complemento (C1, e C3) e a proteína de fase aguda SAA por hepatócitos bovinos em animais suscetíveis e resistentes ao carrapato *R. microplus*. Os hepatócitos bovinos foram tratados, após 5 dias de cultivo, por 48 horas com a associação das citocinas IL-1 β + IL-6 + TNF α em 3 concentrações; saliva 1:100; saliva 1:1000; inibidor sintético do PPAR, GW-6471 e o seu veículo DMSO, bem como a associação deste com as duas concentrações de saliva. Em A: SAA, serum amyloid A; B: C1, proteína do complemento 1; C: C3 proteína do complemento 3. *P<0,05 comparação da variação de expressão gênica entre os controles positivos (citocinas 1x, 2x e 4x) e outros estímulos experimentais; #P<0,05 comparação da variação de expressão gênica entre o GW-6471 e os demais estímulos em animais Gir (resistentes ao carrapato). Não houve diferença significativa na mesma comparação em animais susceptíveis. 55

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Visão geral das células e moléculas do sistema inume do hospedeiro e as medidas defensivas do carrapato. Fonte: Adaptado de BROSSARD & WIKEL, 2004... 24
- Tabela 2.** Estímulos experimentais utilizados no cultivo de hepatócitos, incluindo sua função e concentração utilizada para estudo do efeito da modulação da expressão de genes relacionados com a resposta imune inata em bovinos resistentes e susceptíveis ao carrapato *R. microplus*..... 41
- Tabela 3.** Sequências de primers utilizados para as reações de PCR em tempo real. . 45
- Tabela 4.** Quantificação e integridade do RNA extraído de hepatócitos bovinos cultivados *in vitro* após desafio com diversos estímulos imunomoduladores. 53
- Tabela 5.** Eficiência dos primers utilizados nos ensaios de PCR em tempo real. A eficiência foi calculada com base na inclinação da reta resultante dos valores de Ct obtidos em cinco diluições do *pool de* amostras de RNA feito com todos os estímulos experimentais ($E = 10^{(-1/\text{inclinação da reta})}$) 54
- Tabela 6.** Expressão gênica (ΔCt médio \pm desvio padrão) de SAA, C1 e C3 em hepatócitos bovinos estimulados com as citocinas IL-1, IL-6 e TNF- α 56

LISTA DE ABREVIATURA, SIGLAS E ACRÔNIMOS

α 1- AGP	<i>Alpha 1-acid glycoprotein</i> (Alfa 1-glicoproteína Ácida)
ANOVA	Análise de Variância
B-ACT	Beta actina
°C	Graus Célsius
C1	Proteína do complemento 1
C1q	Proteína do complemento 1 subunidade q
C2	Proteína do complemento 2
C3	Proteína do complemento 3
C4	Proteína do complemento 4
C5	Proteína do complemento 5
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico complementar
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CEJHB	Campo Experimental José Henrique Bruschi
CGIAR	<i>Consultative Group for International Agricultural Research</i>
Ct	<i>Threshold Cycle</i>
CRP	Proteína C reativa
CYP-450	Citocromo P-450
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
E	Eficiência
ECM	<i>Extracellular Matrix</i> (Matriz extracelular)
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
Embrapa	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EUA	Estados Unidos da América
g	Gravidade
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GM	Gabinete do Ministro
HB	Hemoglobina
HBSS	<i>Hank's balanced salt solution</i> (Solução salina balanceada de Hank)
HP	Haptoglobina
HPRT	<i>Hypoxanthine phosphoribosyltransferase</i>
IFN	Interferon

Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
ISAC	<i>I. scapularis</i> anti complement
kDa	Quilodáton
LPS	Lipopolissacarídeo
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
µM	Micromolar
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MAC	<i>Membrane attack complex</i> (Complexo de Ataque à
Membrana)	
MBL	<i>Mannose Biding Lectin</i> (Lectina Ligadora de Manose)
MASP	<i>Mannan biding lectin serino protease</i>
MEM	Aminoácidos essenciais
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i> (Complexo Principal De
Histocompatibilidade)	
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NF-κB	Fator Nuclear kappa B
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
nM	Nanomolar
NO	Óxido nítrico
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Tampão Fosfato Salino)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da
	Polimerase)
PFA	Proteína de fase aguda
PGE-2	Prostaglandina E-2
PPAR	Peroxisome Proliferator-activated receptor
psi	<i>Pound force per square inch</i>
qPCR	Reação em Cadeia de Polimerase quantitativo
RIN	<i>RNA integrity number</i> (número de integridade do RNA)
RNA	Ácido Ribonucleico
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> (Espécies reativas de oxigênio)
RPLP0	<i>Ribosomal Protein Lateral Stalk Subunit P0</i>
SCH	<i>Sandwich-cultured hepatocytes</i> (hepatócitos cultivados em
sanduíche)	

SAA	<i>Serum Amyloid A</i> (Amilóde Sérica A)
SFB	Soro Fetal Bovino
SGE	<i>Salivary Gland Extract</i> (Extrato de glândula salivar)
SR-BI	<i>Scavenger Receptor B-I</i>
STAT-3	Transdutor de sinal e ativador de transcrição 3
Th	Linfócito T <i>helper</i>
TNF α	Fator de Necrose Tumoral alfa

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	16
2.	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1.	Desenvolvimento da resposta imune em vertebrados.....	18
2.2.	O papel do receptor PPAR na imunidade inata	21
2.3.	Mecanismos imunológicos de resposta contra carrapatos	21
2.4.	O carrapato bovino <i>Rhipicephalus microplus</i>	28
2.4.1.	Resposta imune de bovinos contra o carrapato <i>R. microplus</i> : modelos de resistência e susceptibilidade	30
2.5.	Processos imunológicos em células hepáticas e suas aplicações em estudos <i>in vitro</i>	32
3.	OBJETIVOS	35
3.1.	Objetivo geral.....	35
3.2.	Objetivos específicos.....	35
4.	MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1.	Padronização do Isolamento e Cultivo de Hepatócitos Bovinos	36
4.1.2.	Cultivo de hepatócitos.....	38
4.2.	Avaliação da Modulação da Expressão de Genes Relacionados com a Imunidade Inata em Hepatócitos Bovinos	40
4.2.1.	Coleta de saliva do carrapato <i>R. microplus</i>	40
4.2.2.	Estimulação de hepatócitos bovinos <i>in vitro</i>	40
4.2.3.	Extração, quantificação e análise da integridade do RNA.....	42
4.2.4.	Síntese de cDNA e PCR em tempo real	43
4.2.5.	Análises estatísticas.....	46
5.	RESULTADOS	47
5.1.	Isolamento Celular	47
5.2.	Cultivo dos hepatócitos.....	49

5.3. Estimulação de hepatócitos <i>in vitro</i> para avaliação da expressão de moléculas relacionadas com a imunidade inata em bovinos	52
5.6. Ensaio de qPCR	53
5.6.1. Eficiência dos <i>primers</i>	53
5.6.2. Ensaio expressão gênica por qPCR para avaliação da expressão de C1, C3 e SAA em hepatócitos bovinos cultivados <i>in vitro</i>	55
6. DISCUSSÃO.....	59
7. CONCLUSÕES.....	64
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
ANEXO 1. Quantificação de proteínas e gel de poliacrilamida da saliva do carrapato <i>R. microplus</i>	80
ANEXO 2. Testes estatísticos:.....	80

1. INTRODUÇÃO

A imunidade inata é a primeira linha de defesa do organismo contra lesões e invasões de micro-organismos. O sistema complemento desempenha um papel importante na mediação das respostas adquiridas e inatas para se defender contra infecções microbianas e parasitárias (KIMBRELL & BEUTLER, 2001; HAJISHENGALLIS *et al.*, 2010). Em bovinos, a resposta contra infestações por carrapato faz com que células da imunidade inata, residentes no tecido lesado, produzam citocinas pró-inflamatórias, como as interleucinas 1 β e 6 (IL-1 β e IL-6) e o fator de necrose tumoral (TNF- α), sendo que a liberação destas moléculas na corrente sanguínea sinaliza o início de uma resposta mais específica, como a produção de proteínas de fase aguda no fígado (SUFFREDINI *et al.*, 1999).

O fígado, um dos órgãos mais importantes dos vertebrados, é composto por aproximadamente 80% de hepatócitos e 20% por células não parenquimáticas, que desempenham diversas funções metabólicas. Cerca de 80 a 90% dos componentes plasmáticos do complemento e proteínas de fase aguda (PFA) são produzidas no fígado (QIN & GAO, 2006) e liberadas sistemicamente para o controle de reações inflamatórias (CECILIANI *et al.*, 2012). Apesar da natureza uniforme da resposta de fase aguda, existem diferenças nos padrões de liberação de proteínas que medeiam essa resposta entre as diferentes espécies animais (TÓTHOVÁ *et al.*, 2011). Em bovinos, por exemplo, as principais PFAs são a Haptoglobina (HP) e a Amilóide A Sérica (SAA), enquanto em humanos as principais são a proteína-C reativa (CRP) e SAA, e em ratos são a α 1-glicoproteína ácida (α 1-AGP) e a α 2-macroglobulina (CRAY, *et al.*, 2009).

O carrapato bovino, *Rhipicephalus microplus*, é um parasito de grande importância econômica para a pecuária, por ser um vetor de doenças que trazem grandes prejuízos aos sistemas produtivos e altos gastos com o controle e profilaxia (CASTRO, 1997). É sabido que raças bovinas apresentam grandes diferenças quanto à resistência ou susceptibilidade ao carrapato, sendo as raças *Bos indicus* mais resistentes a esse parasito em comparação com as raças *Bos taurus* (WHARTON *et al.*, 1970). Para que obtenha sucesso em seu parasitismo, o carrapato precisa subverter as respostas imunes de seu hospedeiro, para isso inocula moléculas imunomoduladoras presentes em sua saliva que são decisivas para o ingurgitamento e transmissão de patógenos (KOTÁL *et al.*, 2015). Uma importante atividade observada na saliva de diversos artrópodes hematófagos é a ação inibitória do sistema complemento do hospedeiro (SCHROEDER *et al.*, 2006). Além de estarem presentes na saliva, moléculas que desempenham esta função também são encontradas no intestino dos parasitos estando diretamente ligadas à

sua sobrevivência, uma vez que o sistema complemento é um mecanismo do hospedeiro com grande capacidade de destruir suas células alvo (BARROS *et al.*, 2009). Ademais, já foi demonstrado que altos níveis de expressão de fatores do complemento estão associados com a resistência ao carrapato, inclusive na espécie bovina (revisado em Tabor *et al.*, 2017). Em estudos anteriores, do nosso grupo, foi investigado o mecanismo de resistência ao carrapato em animais *Bos taurus* x *Bos indicus*, e foi observado que o receptor PPAR α atua em vias de sinalização intracelular (CARVALHO *et al.*, 2014). Esse receptor participa de processos no metabolismo lipídico que atuam modulando a expressão de genes relacionados à imunidade inata, entre eles os que codificam proteínas do sistema complemento e de fase aguda em humanos e murinos (CORTON *et al.*, 1998; RAKHSHANDEHROO *et al.*, 2012).

Como o fígado é o principal órgão produtor de proteínas de fase aguda e complemento, além de desempenhar papel importantíssimo no metabolismo de lipídeos, que é a principal fonte fisiológica energética de ruminantes, faz-se necessário o estabelecimento de modelos experimentais *in vitro* para se caracterizar melhor a interação dessas respostas biológicas em bovinos. Em humanos e murinos já são bem estabelecidas as metodologias de isolamento e cultivo de hepatócitos sendo que, para estas espécies, existem linhagens comerciais de células que permitem o desenvolvimento de inúmeras pesquisas. Entretanto, para hepatócitos bovinos não existem metodologias bem estabelecidas de isolamento, bem como não há disponibilidade de linhagens comerciais para cultivo desse subtipo celular.

Visto que existem diferenças na produção de moléculas do complemento e PFA entre animais resistentes e susceptíveis ao carrapato (CARVALHO *et al.*, 2008), este trabalho objetivou estabelecer uma metodologia de isolamento primário e cultivo *in vitro* de hepatócitos bovinos para verificar o efeito modulador induzido pela saliva do carrapato *R. microplus* e pelo inibidor seletivo do PPAR (GW-6471) sobre a expressão de genes relacionados à imunidade inata, tais como os fatores do complemento (C1, C3, C4, C5 e MBL) e as proteínas de fase aguda (SAA, AGP, HP).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Desenvolvimento da resposta imune em vertebrados

O sistema imune é responsável pela defesa do organismo contra agentes invasores estranhos, sejam eles bactérias, protozoários, vírus ou endo/ectoparasitas. O desencadeamento dos diferentes padrões de resposta imune tem como função reestabelecer a homeostase em um organismo perturbado por algum destes agentes, e são didaticamente divididas em duas classes, a imunidade inata e a adaptativa. A imunidade inata caracteriza-se por reações imediatas e é composta por mecanismos celulares e humorais que agem conjuntamente no desenvolvimento da inflamação local e na ativação do padrão de resposta apresentado contra o estímulo. Esta resposta é considerada a primeira linha de defesa do organismo (KIMBRELL & BEUTLER, 2001; HAJISHENGALLIS *et al.*, 2010; ABBAS *et al.*, 2012). A imunidade adaptativa consiste em respostas mais longas e duradouras e possui duas importantes características: especificidade, ou seja, a capacidade de uma célula reconhecer moléculas presentes em agentes estranhos ao organismo, e a memória imunológica, que é a capacidade do sistema imune do hospedeiro reagir com mais intensidade e rapidez a um estímulo patogênico com o qual já teve contato prévio (ABBAS *et al.*, 2012). Apesar do tempo de resposta ser diferente nas duas classes, a imunidade inata exerce um papel determinante no desenvolvimento da imunidade adaptativa e de memória (CRAY *et al.*, 2009).

Dentre os diversos componentes humorais da imunidade inata podemos salientiar grande importância dos fatores do sistema complemento e das PFA's. O sistema complemento é formado por proteínas plasmáticas solúveis produzidas em maior quantidade no fígado (QIN & GAO, 2006). Resumidamente, baseia-se em cascatas proteolíticas e possui três vias distintas de ativação (Figura 1). A via clássica é ativada pelo reconhecimento de complexos de antígenos e anticorpos presentes na superfície de patógenos pelo componente C1 do complemento. A via alternativa é ativada quando a proteína C3 reconhece diretamente certas estruturas microbianas, como o lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano. A via das lectinas é iniciada pela formação de complexos de lectina ligante de manose (*mannose-binding lectin*, MBL) e proteases 1 e 2 (MASP-1 e MASP-2) que levam à ativação de C4. Todas as vias convergem para a formação de C5 convertase, que cliva C5 em duas subunidades, C5a e C5b, que conduzem, respectivamente, à sinalização para respostas imunes celulares e à formação do complexo de ataque de membrana (*membrane attack complex*, MAC) responsável pela formação de poros na membrana plasmática das células infectadas e patógenos, provocando sua morte (QIN; GAO, 2006). C3a, e especialmente C5a, são poderosos

quimiotáticos que atraem os neutrófilos, monócitos e macrófagos em direção aos locais de ativação do complemento. Assim, promovem a fagocitose através da interação de opsoninas com receptores do complemento (HAAS; Van STRIJP, 2007; VAN LOOKEREN *et al.*,2007).

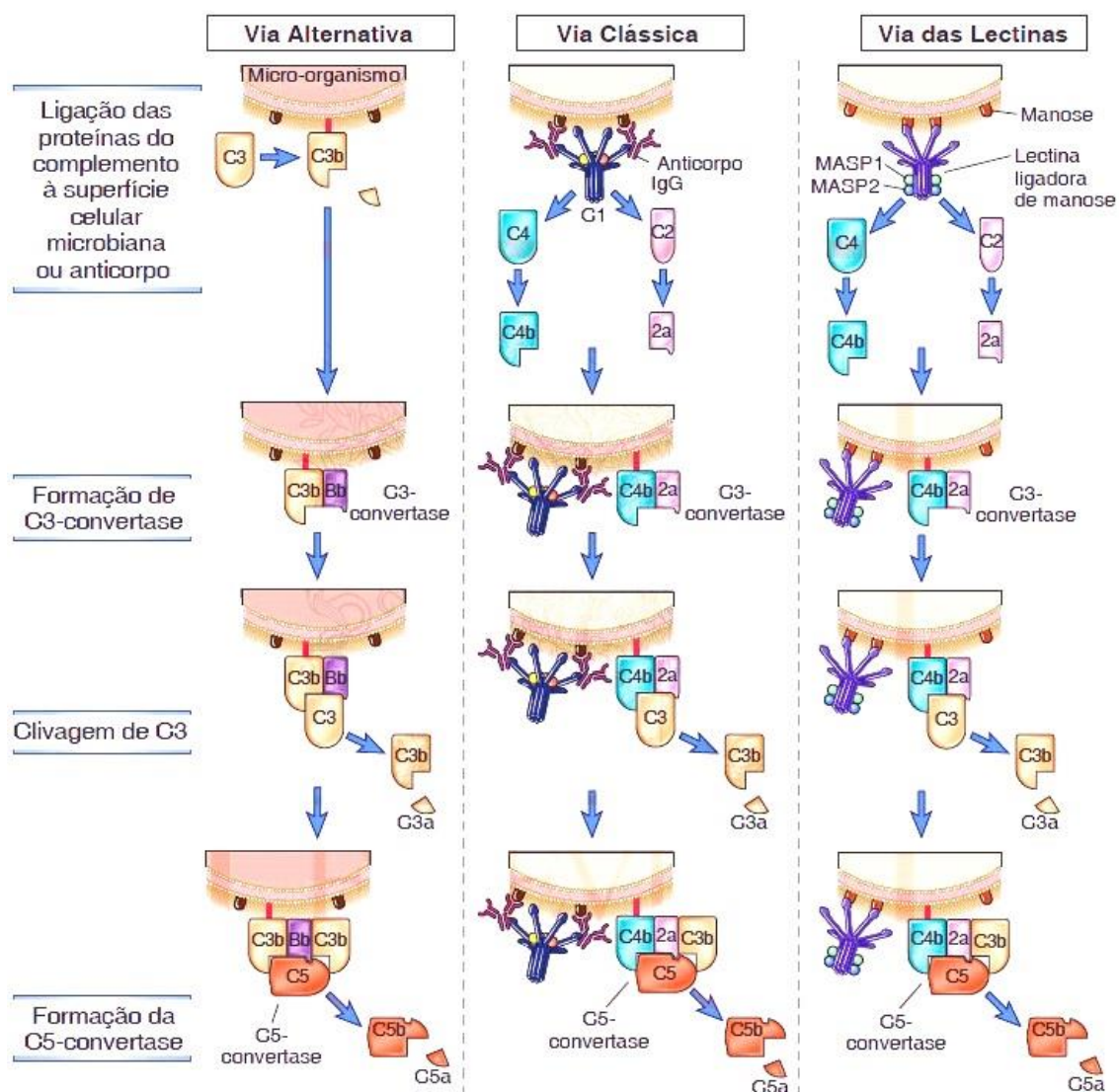


Figura 1. Vias de ativação do sistema complemento e a cascata proteolítica das fases iniciais. Fonte: ABBAS *et al.*, 2012.

Com a ativação das células residentes nos diversos tecidos do hospedeiro, como macrófagos e monócitos, ocorre a liberação de citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6 e TNF α , que através da circulação chegam até o fígado. Essas citocinas pró-inflamatórias regulam a produção de PFA via ativação do transdutor de sinal e ativador do fator de transcrição 3 (STAT3) e fator nuclear-kB (NF-kB; ZHOU *et al.*, 2016). Quando os hepatócitos recebem estes sinais patogênicos e inflamatórios inicia-se rapidamente a produção e secreção de diversas proteínas de fase aguda (GRUYS *et al.*,2005; CRAY *et*

al.,2009; ZHOU *et al.*, 2016). Por definição, a concentração sérica das proteínas de fase aguda aumenta (PFAs positivas) ou diminui (PFAs negativas) em pelo menos 25% durante uma resposta de fase aguda (CERON *et al.*, 2005; ECKERSALL & BELL, 2010). Essas proteínas matam diretamente os patógenos ou direcionam o sistema imunológico para uma depuração eficiente dos mesmos. Apesar da natureza biológica uniforme da resposta de fase aguda, existem numerosas diferenças nos padrões de secreção de diferentes proteínas de fase aguda entre as espécies de animais (PYÖRÄLÄ, 2000). A proteína C-reativa é um bom exemplo deste fenômeno, pois em humanos saudáveis é praticamente desprezível, mas tem um aumento significativo durante infecções, enquanto que em bovinos saudáveis está presente, mas não aumenta acentuadamente durante a resposta de fase aguda (STEEL & WHITEHEAD, 1994). Proteínas de fase aguda têm tipicamente seus representantes em diferentes espécies. Nos bovinos, a HP, a AGP e a SAA foram identificados como proteínas de fase aguda que mais sofrem oscilação frente a estímulos pró-inflamatórios (CRAY *et al.*,2009).

A haptoglobina é uma glicoproteína produzida principalmente pelos hepatócitos, está presente no plasma e possui a capacidade de se ligar à hemoglobina (HB) livre e liberada dos eritrócitos. Ao ligar-se à HB, a HP age como um antioxidante para a estabilização do ferro (LIM *et al.*, 1998). Isso resulta em uma redução dos danos oxidativos à própria HB (BUEHLER *et al.*, 2009). A HB livre pode se ligar ao óxido nítrico (NO) de maneira rápida e irreversível, eliminando o NO e limitando sua biodisponibilidade (ROTHER *et al.*, 2005). A ligação do complexo HP-HB ao CD163 de monócitos/macrófagos resulta na regulação positiva de mediadores anti-inflamatórios (PHILIPPIDIS *et al.*, 2004, SCHAEER *et al.*, 2006), ativando assim uma resposta anti-inflamatória. O papel da HP é se ligar à hemoglobina liberada dos eritrócitos danificados e ajudar a restringir a disponibilidade de ferro livre para as bactérias invasoras. Em bovinos com inflamação aguda, a concentração sérica da HP é significativamente maior do que em bovinos com inflamação crônica (HORADAGODA *et al.*, 1999).

A amiloide sérica A, outra PFA classificada como principal em bovinos, resulta na quimiotaxia de monócitos, leucócitos polimorfonucleares e linfócitos T. Além disso, SAA tem efeitos inibitórios e é considerada importante na regulação negativa do processo inflamatório com efeitos bacteriostáticos (CRAY *et al.*, 2009). Essa proteína é capaz de se ligar a receptores de formil peptídeo constituintes da família de receptores acoplados à proteína G, responsáveis pela transdução de sinais de ativação celular em uma série de células, inclusive basófilos, monócitos e neutrófilos (LE *et al.*, 2001; DE PAULIS *et al.*, 2004). Além do recrutamento de células imunes para o local da inflamação, a SAA promove a indução de enzimas capazes de degradar matrizes e o transporte de colesterol

ao fígado para secreção na bile, mediado pelo receptor scavenger B-I (SR-BI; VAN DER WESTHUYZEN *et al.*, 2005).

A α 1-glicoproteína ácida também é uma importante PFA de bovinos. Está armazenada em grânulos secundários em hepatócitos e é liberada das células após sua ativação, se ligando a mais de 300 moléculas e drogas diferentes (ISRAILI & DAYTON, 2001). Sua função de ligação e transporte é notável e pode aumentar significativamente a sua concentração durante a resposta de fase aguda, tornando-se uma das proteínas mais abundantes no soro (SHELDON *et al.*, 2001, ECKERSALL *et al.*, 2001). A AGP bovina reduz a apoptose de monócitos (CECILIANI *et al.*, 2007) e regula negativamente a liberação extracelular de espécies reativas de oxigênio (ROS) de neutrófilos (RINALDI *et al.*, 2008). Além disso, a AGP pode se ligar ao LPS e inibir sua atividade, combatendo as bactérias Gram-positivas (CRAY *et al.*, 2009).

2.2. O papel do receptor PPAR na imunidade inata

Os receptores nucleares *peroxisome proliferator-activated receptor* (PPAR) possuem ampla distribuição e atividade em órgãos e tecidos como o fígado, coração, musculatura esquelética e mucosa intestinal (TAVARES & HIRATA, 2007, FRUCHART *et al.*, 2001). Os receptores PPAR possuem um domínio na porção N-terminal ligante de DNA e um domínio de ligação C-terminal e são subdivididos em três classes de acordo com sua conformação química e função regulatória: PPAR α , β e γ . Quando regiões específicas do DNA se ligam aos receptores PPAR ocorre a transcrição de diversos genes envolvidos em processos fisiológicos bem como o controle direto e indireto de fatores de transcrição relacionados com atividade inflamatória e metabólica (WILLSON *et al.*, 2000).

Na imunidade inata o PPAR α atua na síntese de peptídeos com função microbicida pela sinalização do NF- κ B (TSUTSUMI-ISHII & NAGAOKA, 2002). Este receptor é capaz de regular a expressão de genes de importância para o metabolismo lipídico e resposta imune, como os fatores do complemento e as proteínas de fase aguda. Relatos recentes demonstram sua capacidade de atuar aumentando a produção de C3 (MOGILENKO *et al.*, 2013) e MBL (RAKHSHANDEHROO *et al.*, 2012) em linhagens e em cultura primária de hepatócitos humanos, respectivamente. Além disso, evidências apontam para uma possível intervenção da ativação de PPAR α sobre a resposta de fase aguda em modelo murino e em humanos (ZAMBON *et al.*, 2006; BELFORT *et al.*, 2010).

2.3. Mecanismos imunológicos de resposta contra carrapatos

Para subverter os mecanismos imunes do seu hospedeiro e garantir o sucesso em sua alimentação, o carrapato inocula no local de fixação no hospedeiro, uma grande

variedade de moléculas com propriedades anti-homeostáticas e imunomoduladoras, contidas em sua saliva. Grande parte destas moléculas são proteínas pertencentes às famílias das quitinasas, mucinas, ixostatinas, cistatinas, defensinas, hialuronidases, lectinas e lipocalinas (BROSSARD & WIKEL, 2004; FRANCISCHETTI *et al.*, 2009; Tabor *et al.*, 2018). Além destas proteínas, também podem atuar de forma local e sistêmica em cascatas de sinalização, moléculas não proteicas, como a dopamina e prostaglandinas (BINNINGTON & STONE, 1977; MEGAW & ROBERTSON, 1974; KAUFMAN, 1978), que possuem mecanismos de ação associados à analgesia e ao efeito anti-inflamatório, ambos importantes para o sucesso do parasitismo do carrapato. As medidas defensivas do carrapato contra o sistema imune do hospedeiro visam aquelas vias que se mostram importantes no desenvolvimento da imunidade adaptativa (WIKEL *et al.*, 1994; WIKEL, 1996), conforme pode ser observado na visão geral resumida na Tabela 1. A modulação da resposta imune do hospedeiro não só promove o sucesso da ingestão de sangue, mas também aumenta a capacidade dos agentes patogênicos, transmitidos pelo carrapato, se estabelecerem de forma eficaz no hospedeiro (WIKEL, 1996; WIKEL, 1999; SCHOELER & WIKEL, 2001).

Uma importante atividade observada na saliva de carrapatos é a ação inibitória do sistema complemento do hospedeiro (SCHROEDER *et al.*, 2006). Além de estarem presentes na saliva, moléculas que desempenham esta função também são encontradas no intestino dos carrapatos estando diretamente ligadas à sua sobrevivência, uma vez que o sistema complemento é um mecanismo do hospedeiro com grande capacidade de destruir suas células alvo (BARROS *et al.*, 2009). Durante a hematofagia, a ativação do sistema do complemento pode levar à opsonização de moléculas salivares por produtos da clivagem de C3 e na formação de anafilatoxinas inflamatórias, como C3a e C5a (RIBEIRO & SPIELMAN, 1986; DUNKELBERGER & SONG, 2010). A inibição desses fenômenos pode prevenir ou atrasar o início de uma resposta imune contra proteínas salivares e prevenir a inflamação no local de alimentação. A atividade anti-complemento pode ocorrer em diferentes fases da cascata proteolítica deste sistema, como na inibição da C3 convertase da via alternativa pela saliva do *Ixodes scapularis* (VALENZUELA *et al.*, 2000) ou da via clássica pela saliva do *Amblyoma cajennense* (FRANCO *et al.*, 2016).

As prostaglandinas são metabólitos oxigenados de ácidos graxos poli-insaturados, como o ácido araquidônico, e estão presentes em alta concentração na saliva de carrapatos (BOWMAN; DILLWITH; SAUER, 1996). A prostaglandina E2 (PGE2) atua no aumento da vasodilatação e inibe a agregação plaquetária, além de regular a produção de citocinas e inibir a diferenciação de células dendríticas e a proliferação de linfócitos T (KAZIMIROVA & STIBRANIOVA, 2013; POOLE *et al.*, 2013). As prostaglandinas possuem diferentes funções na regulação das respostas imunes, inclusive via receptores

nucleares como o PPAR (DINO & DAVIDSON, 2002), porém, seus papéis nas respostas ao carrapato ainda não são claros (HARRIS, *et al.*, 2002; BROSSARD & WIKEL, 2004).

Tabela 1. Visão geral das células e moléculas do sistema imune do hospedeiro e as medidas defensivas do carrapato. Fonte: Adaptado de BROSSARD & WIKEL, 2004.

Célula ou molécula	Papel na defesa imune	Medida defensiva do carrapato	Possível importância
Complemento (geral)	Vias clássicas, alternativas, das lectinas, para gerar mediadores inflamatórios e opsoninas	Deposição de C3b inibida pela saliva de <i>I. scapularis</i> (RIBEIRO, 1987).	Reduzir a resposta inflamatória e a lise de células do carrapato
Via alternativa do complemento	Independente de anticorpo, medeia a inflamação e direciona a lise de patógenos	Papel na resistência adquirida a <i>D. andersoni</i> (WIKEL, 1979). Inibido por SGEs de <i>I. ricinus</i> , <i>I. hexagonus</i> , <i>I. uriae</i> (LAWRIE <i>et al.</i> , 1999). Ligação de C3b e desacoplamento de Bb pela proteína 18,5kDa de <i>I. Scapularis</i> (VALENZUELA <i>et al.</i> 2000)	Reduzir a resposta inflamatória a carrapatos e patógenos transmitidos por carrapatos.
Anafilatoxina	Os componentes do complemento C3a, C4a, C5a ligam-se às células e promove inflamação aguda, quimiotaxia de neutrófilos, ativação de mastócitos.	Antagonista de anafilatoxinas da saliva de <i>I. scapularis</i> (RIBEIRO & SPIELMAN, 1986).	Reduzir infiltrado celular e liberação de mediadores de mastócitos (histamina, leucotrienos, citocinas)
Células NK	Linfócitos (nem B nem T) que matam diretamente as células infectadas por micróbios e secretam IFN- γ .	Função efetora do SGE de <i>D. reticulatus</i> em células NK de humanos saudáveis, afetando a interação entre as células efetora e o alvo (KUBES <i>et al.</i> , 2002). Atividade similar, porém menor, em SGEs de <i>A. ariegatum</i> e <i>H. inermis</i> (KUBES <i>et al.</i> , 2002).	Reduzir a morte de células infectadas por micróbios e suprimir o IFN- γ , que ativa os macrófagos e pode polarizar a resposta imune adquirida ao perfil Th1.
Quimiocinas	Citocinas que estimulam a migração de leucócitos (quimiotaxia) do sangue para os tecidos. Numerosas quimiocinas diferentes identificadas, incluindo IL-8.	Atividade anti-IL-8 em SGEs de <i>A. variegatum</i> , <i>D. reticulatus</i> , <i>H. inermis</i> , <i>I. ricinus</i> e <i>R. appendiculatus</i> (HAJNICKA <i>et al.</i> 2001).	A IL-8 é quimiotática para neutrófilos, basófilos e linfócitos-T. Todas essas células têm papéis nas respostas imunes do hospedeiro para limitar a ingestão de sangue pelos carrapatos. Bloqueio de IL-8 confere uma vantagem de sobrevivência para o carrapato

Célula ou molécula	Papel na defesa imune	Medida defensiva do carrapato	Possível importância
Moléculas de adesão	Moléculas de superfície que interagem com outras células ou matriz extracelular para promover a migração e ativação de células	Ninfas de <i>D. andersoni</i> reduziram a expressão das integrinas linfocitárias LFA-1 e VLA-4 em linfócitos murinos (MACALUSO & WIKEL, 2001).	Modulação da migração leucocitária do hospedeiro para o local da picada do carrapato e redução da resposta imune à infestação
Monócito/Macrófago	Os monócitos do sangue tornam-se macrófagos teciduais. Os macrófagos ativados fagocitam e apresentam antígenos aos linfócitos T CD4 além de secretar secretam citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 b, IFN γ e IL-12. Os macrófagos também podem produzir reativos de oxigênio, envolvidos na morte intracelular de patógenos	Produção de TNF α e IL-1 β por macrófagos é reduzida pelo SGE de <i>D. andersoni</i> (RAMACHANDRA & WIKEL, 1992). A saliva de <i>I. scapularis</i> suprime a produção de NO de macrófagos (URIESTE <i>et al.</i> 1994). Saliva de <i>R. sanguineus</i> inibe a ativação macrofágica de IFN γ e reduz a produção de NO (FERREIRA & SILVA, 1998). O SGE de <i>I. ricinus</i> reduz a produção de NO (KOPECKY & KUTHEJLOVA, 1998). O SGE de <i>I. ricinus</i> inibe a morte de macrófagos por <i>Borrelia afzelii</i> (KUTHEJLOVA <i>et al.</i> 2001). SGE de <i>R. appendiculatus</i> inibe a transcrição <i>in vitro</i> e a secreção de IL-1 α , TNF α , IL-10 e produção de NO por linhagem celular de macrófagos murinos (GWAKISA <i>et al.</i> 2001). O fator de inibição da migração de macrófagos em glândulas salivares de <i>A. americanum</i> (JAWORSKI <i>et al.</i> , 2001) inibiu a lise mediada por células NK e respostas de hipersensibilidade de tipo tardio	Prevenir respostas inflamatórias, reduzir citocinas que podem orquestrar respostas anti-carrapatos, reduzir a capacidade fagocítica de macrófagos e, possivelmente, alterar a apresentação de antígenos
Proliferação de linfócitos	A proliferação de linfócitos T e B são essenciais para uma resposta de memória. Numerosos fatores e interações receptor-ligante influenciam a proliferação de linfócitos.	Supressão da proliferação de células T <i>in vitro</i> como resultado da infestação ou a exposição de linfócitos <i>in vitro</i> à saliva, às moléculas de glândula salivar ou proteínas recombinantes da glândula salivar (SCHOELER & WIKEL, 2001).	Inibir a resposta imune contra proteínas salivares do carrapato. Também reduzem a imunidade do hospedeiro facilitando a transmissão de patógenos

Célula ou molécula	Papel na defesa imune	Medida defensiva do carrapato	Possível importância
Proteínas ligadoras de histamina e proteínas ligadoras de serotonina	Histamina e serotonina são mediadores da coceira. A histamina aumenta a permeabilidade vascular e é um mediador da inflamação. O bloqueio simultâneo dos receptores de histamina tipo 1 e tipo 2 reduziu a resistência adquirida a <i>D. andersoni</i> (Wikel, 1982). A histamina e a serotonina reduzem a sucção e a salivagem de <i>D. andersoni</i> (Paine <i>et al.</i> 1983).	Bloqueio de histamina por SGE de <i>R. sanguineus</i> (CHINERY & AYITEY-SMITH, 1977). Proteínas de ligação a histamina em SGE de <i>R. appendiculatus</i> (PAESEN <i>et al.</i> 1999). A lipocalina de <i>D. reticulatus</i> liga histamina e serotonina (SANGAMNATDEJ <i>et al.</i> 2002)	Redução da inflamação e da coceira no local da picada. Redução no impacto direto da histamina e serotonina na alimentação de carrapatos
Modulação de citocinas linfocitárias	As citocinas medeiam a diferenciação/ativação de linfócitos e outras células e orquestram respostas imunes inatas e adaptativas. IL-2: célula T, célula NK e célula B, proliferação e síntese de anticorpos. IL-4: polarização Th2/diferenciação e proliferação, inibe a ativação de macrófagos e proliferação de mastócitos. O inibidor de IL-10 da IL-12, altera a expressão do MHC de classe II e moléculas co-estimuladoras, inibe as células dendríticas ativadas/macrófagos. IFN- γ ativa macrófagos e polariza para resposta Th1	A influência de carrapatos nas citocinas do hospedeiro tem sido foco de inúmeros estudos. Um padrão geral que emergiu é a regulação negativa das respostas Th1 e a polarização para os perfis de citocinas Th2 (SCHOELER & WIKEL, 2001).	Modulação ou desvio de citocinas de linfócitos T pode reduzir as respostas imunes à alimentação do carrapato e por sua vez, facilitar a transmissão / estabelecimento de micróbios

Respostas de anticorpos	Os anticorpos realizam uma variedade de funções, incluindo neutralização, fixação de complemento (via clássica) e facilitação da interação de leucócitos com células-alvo (incluindo micróbios). Anticorpos ligados à expressão da resistência adquirida	A infestação por carrapatos reduz as respostas de anticorpos a antígenos heterólogos, mas a base para essa supressão é desconhecida	Reduzir a probabilidade de desenvolvimento de anticorpos capazes de neutralizar as proteínas da saliva do carrapato, essenciais para o sucesso da alimentação com sangue
----------------------------	--	---	--

Outro grupo de moléculas ativas na saliva dos carrapatos são as peptidases. Estas enzimas são capazes de quebrar outras proteínas e participam da digestão do sangue ingerido pelo parasito durante a alimentação (FRANTA *et al.*, 2010). Dentro deste grupo as metalopeptidases são de grande importância neste processo, sendo associadas à degradação de compostos do soro e participando da lise de fibrina e fibrinogênio e degradação de bradiginina (TIRLONI *et al.*, 2014). Sabe-se que a fibrina e o fibrinogênio são importantes efetores da coagulação sanguínea (WEISEL, 2005), enquanto a bradiginina atua em reações inflamatórias (MORAIS *et al.*, 1999).

Os carrapatos também secretam em sua saliva alguns inibidores de peptidases, como as serpinas e as cistatinas. As cistatinas dos carrapatos modulam processos relacionados à inflamação, processamento e apresentação de antígenos, fagocitose e expressão de citocinas pelo hospedeiro. Para o *R. microplus*, algumas cistatinas e suas cisteínas alvo foram caracterizadas, uma delas é a cistatina tipo 2 denominada Rmcistatina-3, que é expressa na gordura corporal do carrapato, nas glândulas salivares e em hemócitos, e inibe a catepsina L, B, e BmCl-1, uma cisteína endopeptidase do intestino, o que sugere seu papel na digestão de sangue ingerido (PARIZI *et al.*, 2015).

A histamina tem sido associada ao desenvolvimento da resistência à alimentação de carrapatos (WIKEL, 1982). A histamina e a serotonina são capazes de reduzir a salivação e a alimentação por *D. andersoni* (PAINE, *et al.*, 1983). Os mastócitos situados em uma localização perivascular seriam uma fonte de histamina à qual o carrapato seria exposto. As glândulas salivares de *R. appendiculatus* contêm proteínas de ligação à histamina (PAESEN *et al.* 1999). Duas proteínas de ligação à histamina estão presentes em fêmeas e uma em machos. As proteínas femininas são expressas no início da alimentação, com um pico às 48 horas, e não estão presentes nos machos, ninfas ou larvas. A proteína masculina é expressa durante toda a alimentação e está presente em ninfas e larvas. As proteínas de ligação à histamina são altamente específicas; eles contêm dois sítios de ligação à histamina com diferentes afinidades e a ligação é diferente dos receptores H1 e H2 dos mamíferos (PAESEN *et al.*, 1999). Muito provavelmente, proteínas de ligação à histamina serão encontradas na maioria, se não em todas, espécies de carrapatos (BROSSARD & WIKEL, 2004).

2.4. O carrapato bovino *Rhipicephalus microplus*

Um grande problema enfrentado pelos produtores de bovinos são as infestações por *Rhipicephalus microplus* que, segundo o *Consultative Group for International Agricultural Research* (CGIAR), são uma das principais causas de prejuízos à produção animal, principalmente em condições tropicais (CGIAR *Annual Report*, 2002). O carrapato *R. microplus* é responsável por perdas econômicas anuais bilionárias, geradas tanto pela

ação espoliativa e hematofagia quanto pela transmissão de agentes infecciosos causadores de diversas doenças como a babesiose e anaplasmoses, que estão associados com o aumento da mortalidade no rebanho, queda na produção de leite, diminuição do ganho de peso, além de gastos com controle e profilaxia (CASTRO, 1997).

A principal forma de combate ao carrapato é realizada por meio da aplicação de acaricidas, porém estas substâncias podem representar grandes ameaças à saúde animal, humana e ao meio ambiente. Além disso, há relatos da proliferação de carrapatos resistentes aos acaricidas em todas as regiões com produção pecuária intensa, o que leva à escassez de novas bases químicas para seu controle (RODRÍGUEZ-VIVAS *et al.*, 2007; ANDREOTTI *et al.*, 2011). No Brasil não há uma política que controle a administração de acaricidas utilizados no combate ao *R. microplus*, ficando sob responsabilidade do produtor selecionar os agentes utilizados contra o parasito. Muitas vezes não são escolhidos os acaricidas mais adequados, além de realizar-se a aplicação incorreta. O uso contínuo e de forma inadequada por um longo período pode promover a seleção de populações de carrapato com maior resistência (ANDREOTTI *et al.*, 2011; HIGA *et al.*, 2015). O *R. microplus* pode apresentar maior resistência aos acaricidas comerciais em relação a outros carrapatos, possivelmente devido ao menor período de tempo entre as gerações quando comparado a outras espécies (KOCAN, 1995). O conhecimento do produtor sobre métodos de controle do carrapato é essencial para a eficácia da metodologia empregada, no entanto, um estudo feito por Amaral (2011) demonstrou que quase todos desconhecem os parâmetros a serem aplicados para controle estratégico. Nesse sentido, torna-se importante, portanto, a comunicação entre pesquisadores, agentes públicos e privados e produtores, além de estabelecer treinamentos de natureza mais adequada aos produtores rurais (AMARAL, 2011). O controle estratégico consiste em uma série de cinco banhos consecutivos com acaricida, com intervalo de 21 dias, eliminando o maior número possível de uma geração de carrapatos, produzindo menor quantidade para os meses futuros e deve ser adaptado de acordo com as características climáticas de cada região, sendo realizado, de preferência, na época mais quente ou seca do local (FURLONG *et al.*, 2004). Com o aumento da resistência aos acaricidas, há um acréscimo no uso e gastos com produtos químicos e mão-de-obra para a sua aplicação, bem como de resíduos tóxicos na carne e no leite e a contaminação do meio ambiente. Isso estimula a procura de métodos biológicos e imunológicos menos impactantes como formas alternativas de controle do carrapato.

O *R. microplus* é um parasito monoxeno, ou seja, possui apenas um hospedeiro durante o seu ciclo de vida, que se divide em fase de vida livre e fase de vida parasitária, passando por quatro estágios: ovo, larva, ninfa e adulto (Figura 2). A fase de vida livre se inicia com a queda da fêmea adulta ingurgitada, chamada teleógina, que realiza a postura

dos ovos e morre, e vai até a eclosão dos ovos e transformação das neolarvas em larvas infestantes (GONZALES, 1974). A fase parasitária inicia-se com a fixação da larva infestante na pele do hospedeiro, onde ocorre a formação de uma lesão hemorrágica pela qual o parasito se alimenta (GONZALES, 1974). Durante esta fase os carrapatos se alimentam do sangue do hospedeiro e trocam de cutícula se diferenciando (FARIAS, 1995). Após diferenciação sexual as fêmeas transformam-se em partenóginas e, por fim teleóginas (GONZALES, 1974). Os machos não chegam a ingurgitar, se alimentam eventualmente e vagam pelo hospedeiro em busca de fêmeas para acasalar, podendo se mover de um animal para outro que esteja em contato (MCGREGOR, 2010).

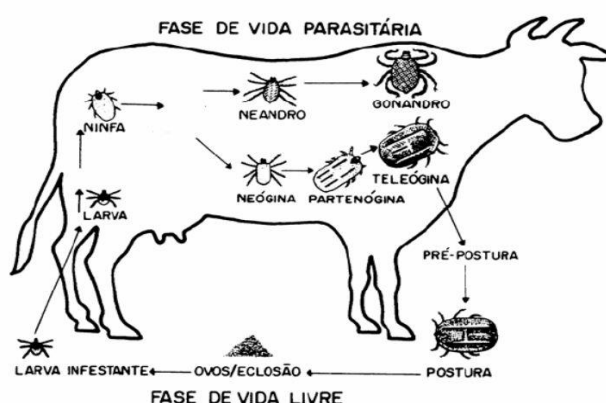


Figura 2. Ciclo de vida do carrapato *Rhipicephalus microplus*. Fonte: GONZALES et al., 1974.

O processo hematofágico inicia com a inserção do aparelho bucal da larva na pele do hospedeiro, a secreção do cimento, estrutura proteica responsável pela fixação do carrapato e saliva, responsável pela modulação da resposta imune do hospedeiro (OLIVEIRA *et al.*, 2013). Durante este processo acontece a lesão de capilares e outros pequenos vasos permitindo que o parasita se alimente do sangue que flui para o local da lesão (KAZIMIROVA & STIBRANIOVA, 2013). Em resposta a esta injúria, o organismo hospedeiro inicia um processo inflamatório, como dor, coceira, coagulação sanguínea e ativação do sistema imune inato e adaptativo (SILVA *et al.*, 2016; ABBAS, *et al.*, 2012). Para que sua alimentação seja efetiva, o carrapato necessita de estratégias capazes de modular o sistema imunológico de seu hospedeiro. A saliva inoculada pelo parasita no local de fixação possui um grande número de componentes fisiologicamente ativos que atuam de forma eficaz contra respostas imunológicas do hospedeiro (HOVIUS, 2009).

2.4.1. Resposta imune de bovinos contra o carrapato *R. microplus*: modelos de resistência e susceptibilidade

É sabido que bovinos de raças zebuínas de origem asiática (*Bos indicus*) são mais resistentes ao carrapato *R. microplus* quando comparados aos de raças taurinas (*Bos taurus*), apesar de haver variação entre os cruzamentos (WHARTON *et al.*, 1970). A

resistência à infestação por *R. microplus* é considerada como adquirida já que os níveis aumentam após a primeira infestação (CONSTANTINOIU *et al.*, 2010). Devido à migração global das raças europeias de *B. taurus* para a produção leiteira durante os séculos XVIII e XIX, este carrapato espalhou-se por regiões tropicais e subtropicais do mundo (FRISCH, 1999; ESTRADA-PEÑA *et al.*, 2006; BARRÉ & UILENBERG, 2010). As raças suscetíveis, que foram introduzidas em regiões nas quais o *R. microplus* é endêmico, não resistiram à infestação por carrapatos na mesma proporção que as raças resistentes, que desenvolveram uma resposta imune anti-carrapato mais eficaz devido à sua coevolução com o parasita (FRISCH, 1999). Está bem estabelecido que estes fenótipos de resistência ao carrapato em bovinos são hereditários, porém os genes do hospedeiro nem os correlatos imunológicos foram completamente descritos.

Parâmetros imunológicos da resistência ao carrapato diferem entre raças suscetíveis e resistentes, bem como entre indivíduos dentro das mesmas raças (FRISCH, 1999). A variação nos alotipos de IgG2 estão associadas a diferentes padrões de resposta imune a patógenos (TABOR *et al.*, 2017). Alotipos IgG2a e IgG2b diferem na sequência das regiões CH1-CH3. Foi observado que a IgG2b é mais eficiente em iniciar a cascata do complemento bovino, enquanto os animais com o alótipo IgG2a são mais suscetíveis a patógenos extracelulares (HEYERMANN & BUTLER, 1987; BASTIDA-CORCUERA *et al.*, 1999). Outros estudos mostraram que a distribuição e a presença de alotipos de IgG2 diferiram significativamente entre as raças taurina e zebuína (BUTLER *et al.*, 1994) e isso está relacionado diretamente com o sucesso da infestação pelo carrapato *R. microplus* que é maior em animais que expressam o alótipo IgG2a (CARVALHO *et al.*, 2011). Relatos demonstram que a saliva de artrópodes tem a capacidade de bloquear a ação do sistema complemento, o que garante o sucesso na alimentação destes parasitos (FRANCO, *et al.*, 2016). Já foram descritas moléculas presentes na saliva de carrapatos que possuem uma atividade anti-complemento, como a ISAC (*I. scapularis anti complement*), que atua bloqueando a via alternativa de ativação do complemento e quando ausente na saliva reduz o ganho de peso do parasito (SOARES *et al.*, 2005). A saliva de *R. microplus* possui a capacidade de bloquear a via clássica do sistema complemento, bloqueando a clivagem de C4 e a deposição de C4b, e a via alternativa se ligando ao C3b e à properdina, impedindo a formação da C3 convertase desta via (SILVA *et al.*, 2016). Ademais, ensaios de microarranjo demonstraram que bovinos resistentes à infestação pelo *R. microplus* apresentam maior expressão de genes codificantes de fatores do complemento em relação aos animais suscetíveis (CARVALHO *et al.*, 2014).

As respostas de fase aguda desencadeadas pela inflamação no local da picada do carrapato também se mostraram diferentes em bovinos com composições genéticas distintas. A saliva de *R. microplus* promove aumento da expressão de CD86 em

macrófagos e polarização Th2 da resposta imune (BRAKE *et al.*, 2010), ademais o extrato de glândula salivar também demonstra inibição da produção de IFN, IL-12 e TNF- α em murinos, ressaltando consequências que podem ser importantes para a produção de proteínas de fase aguda. Já foi demonstrado que infestações com o *R. microplus* aumentam a concentração sérica de HP e SAA e diminuem a concentração de AGP e transferrina (CARVALHO *et al.*, 2008).

Nesse contexto, apesar do fígado ser o principal órgão responsável pela manutenção dos níveis séricos de fatores do complemento e produção de PFA, não existem relatos acerca da participação de hepatócitos no controle sistêmico do desenvolvimento da resposta imune em bovinos nem tampouco seu papel na interação carrapato-hospedeiro.

2.5. Processos imunológicos em células hepáticas e suas aplicações em estudos *in vitro*

O fígado é o maior órgão sólido dos mamíferos, onde 70% do número de células, ou 80% do seu volume, é composto por hepatócitos que realizam funções metabólicas. O restante do fígado é constituído por células não parenquimatosas, incluindo células endoteliais, células estreladas, células de Kupffer e linfócitos, além de matriz extracelular (GAO *et al.*, 2008). Como desempenha um papel fundamental nas defesas imunológicas inatas contra patógenos através da produção de PFA e manutenção dos níveis de fatores séricos do complemento, o fígado pode ser, portanto, considerado um órgão imunológico (RACANELLI, REHERMANN, 2006).

Culturas celulares de hepatócitos têm sido amplamente utilizadas para estudar as funções do fígado, no entanto deve-se ter bastante cautela, pois as células podem perder parte da sua função comprometendo algumas atividades metabólicas e imunológicas (TONG *et al.*, 1992; GODOY, 2009). Como alternativa, para esses estudos *in vitro*, algumas linhagens de hepatócitos são utilizadas, como a HepG2 e a HepaRG de humanos (DONATO *et al.*, 2008; GRIPON *et al.*, 2002), e a AML12, de murinos (WU *et al.*, 1994). Não existem linhagens comerciais de hepatócitos bovinos, o que dificulta o estudo utilizando este modelo experimental animal. Nesse cenário, a cultura de células primárias é o material mais viável para o estudo *in vitro* das células hepáticas bovinas (PANDA *et al.*, 2015).

Para o isolamento primário de hepatócitos podem ser utilizados protocolos não enzimáticos (KRAVCHENKO *et al.*, 2002), enzimáticos sem perfusão (SPOTORNO *et al.*, 2006), e perfusão manual enzimático (PANDA *et al.*, 2015). A metodologia mais utilizada para o isolamento de hepatócitos de murinos e humanos é baseada na perfusão enzimática em dois passos, utilizando o ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) como

quelante de Ca^{2+} , no primeiro passo, seguido pela perfusão de solução contendo colagenase, que é capaz de dissolver a matriz extracelular presente no tecido, isolando os hepatócitos sem danificar a integridade da membrana plasmática (BERRY & FRIEND, 1969; SEGLEN, 1979; MALARKEY *et al.*, 2005). Entretanto, realizar a perfusão do fígado de um camundongo é relativamente simples se comparado a um fígado bovino, devido ao grande tamanho deste, o que gera bastante dificuldade. Além disso, a esta metodologia requer grande quantidade de soluções e equipamentos especializados (PANDA *et al.*, 2015).

O protocolo enzimático sem perfusão baseia-se na incubação de fragmentos do fígado em solução de colagenase e pode consistir em uma alternativa para órgãos de maior tamanho, como os da espécie bovina (EHRHARDT & SCHMICKE, 2016). Apesar da alta viabilidade obtida no isolamento com a colagenase, sua utilização requer cuidados ao avaliar vias de sinalização intracelular, visto que o uso da colagenase pode desencadear a ativação do sistema de estresse oxidativo de hepatócitos após 4 a 6 horas de cultivo (TIRMENSTEIN *et al.*, 2000). Nesse sentido, o cultivo de hepatócitos primários isolados por metodologia enzimática deve ser mantido por maiores tempos para que as células se ambientem e voltem a apresentar suas características fisiológicas normais. Porém, alguns autores relatam que essas células podem perder parte das suas principais funções, como desintoxicação e síntese de proteínas plasmáticas (TONG, *et al.*, 1992; GODOY, 2009).

Por serem poligonais e multipolarizados, os hepatócitos necessitam de pelo menos duas superfícies basolaterais e duas apicais para interagir e exibir sua funcionalidade natural (ROJKIND, 1980; ADAY *et al.*, 2011; SHRI *et al.*, 2017). Para prover este ambiente, vários estudos utilizam placas de cultura revestidas com as proteínas da matriz extracelular (ECM), como colágeno, Matrigel, gelatina biomatrízes e derivados de proteoglicanos em placas de cultura (ROJKIND, 1980; ADAY *et al.*, 2011; SHRI *et al.*, 2017).

Apesar de existirem várias metodologias descritas para isolamento de hepatócitos, poucos trabalhos caracterizaram o cultivo de hepatócitos bovinos como modelo de estudo *in vitro*, principalmente de respostas associadas com a produção de PFA e fatores do complemento (PANDA *et al.*, 2015). Uma vez que a resistência ao carrapato *R. microplus* envolve uma maior produção e atividade do sistema complemento (SILVA, *et al.*, 2016; CARVALHO *et al.*, 2014), além da produção diferenciada de PFA em resposta a infestação (CARVALHO *et al.*, 2008), o presente trabalho visou estabelecer um modelo de cultivo primário de hepatócitos *in vitro* que permita a avaliação molecular dos sinais regulatórios induzidos pela saliva desse parasito e agentes imunomoduladores em bovinos. Essa abordagem poderá constituir um avanço importante no conhecimento para

a área veterinária possibilitando o uso dessa ferramenta para compreender melhor o metabolismo hepático em ruminantes e sua participação no desenvolvimento da resposta imune adaptativa, bem como interação carrapato-hospedeiro.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Estabelecer um protocolo de isolamento e cultivo de hepatócitos bovinos para análise do efeito modulador, *in vitro*, da saliva do carrapato *R. microplus* e receptor PPAR α sobre a expressão de genes codificantes de proteínas de fase aguda e de fatores do complemento.

3.2. Objetivos específicos

- Estabelecer um protocolo de isolamento primário e cultivo *in vitro* de hepatócitos bovinos com qualidade para estudos de expressão gênica.
- Verificar efeito modulador da saliva de carrapato de inibidor do receptor PPAR sobre a expressão de proteínas do complemento e de fase aguda em hepatócitos bovinos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Para verificar o efeito modulador de moléculas sobre hepatócitos bovinos, foi necessária uma padronização prévia da expansão primária destas células, *in vitro*, visando uma maior integridade do material genético extraído. Uma vez estabelecido o modelo, hepatócitos bovinos foram incubados com diferentes moléculas para verificar diferenças na expressão de genes que codificam fatores do complemento e PFA conforme o organograma apresentado na Figura 3.

4.1. Padronização do Isolamento e Cultivo de Hepatócitos Bovinos

4.1.1. Isolamento de hepatócitos

Para o isolamento de hepatócitos, foram coletados fígados bovinos no abatedouro Fripai em Juiz de Fora, Minas Gerais. Todos os procedimentos para este fim foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Embrapa Gado de Leite, sob o protocolo 31/2015. Os cuidados com a paramentação cirúrgica foram adequados à Portaria GM nº 3214, de 08 de junho de 1978 (norma regulamentadora nº 6, anexo I) em todas as coletas.

Para os experimentos de padronização do isolamento e cultivo de hepatócitos, o lobo caudal do fígado foi excisado com auxílio de um bisturi estéril e armazenado assepticamente em gelo durante o transporte para a Embrapa Gado de Leite (Juiz de Fora, Minas Gerais), onde foi imediatamente processado. Foram utilizados 30 g de tecido central do lobo que foram utilizados para testar três métodos de isolamento dos hepatócitos: um mecânico, um enzimático sem perfusão e um mecânico/enzimático.

O protocolo mecânico, adaptado de Kravchenko *et al.*, (2002), consistiu na moagem manual do fragmento de fígado com o auxílio de uma tesoura seguida de lavagem com 30mL de PBS 1X com penicilina e estreptomicina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Foi feita a filtração das células utilizando dois *cell strainers*, um de 70 µm e outro de 40 µm (Corning Inc., Corning, NY, EUA). Após a filtração foi realizada centrifugação a 50 x g seguida por duas lavagens em PBS 1X. Após a segunda lavagem, as células ressuspendidas em PBS 1X foram submetidas ao gradiente de Percoll 1,124 g/mL (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido). O anel de hepatócitos foi então lavado em HBSS contendo SFB 10% e centrifugado à temperatura ambiente. Em seguida o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em 1mL de meio DMEM/F12 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) suplementado com L-glutamina 1% (Lonza, Basileia, Suíça), antibiótico 1%, aminoácidos essenciais 1% (MEM; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), SFB 10% e insulina 0,1%.

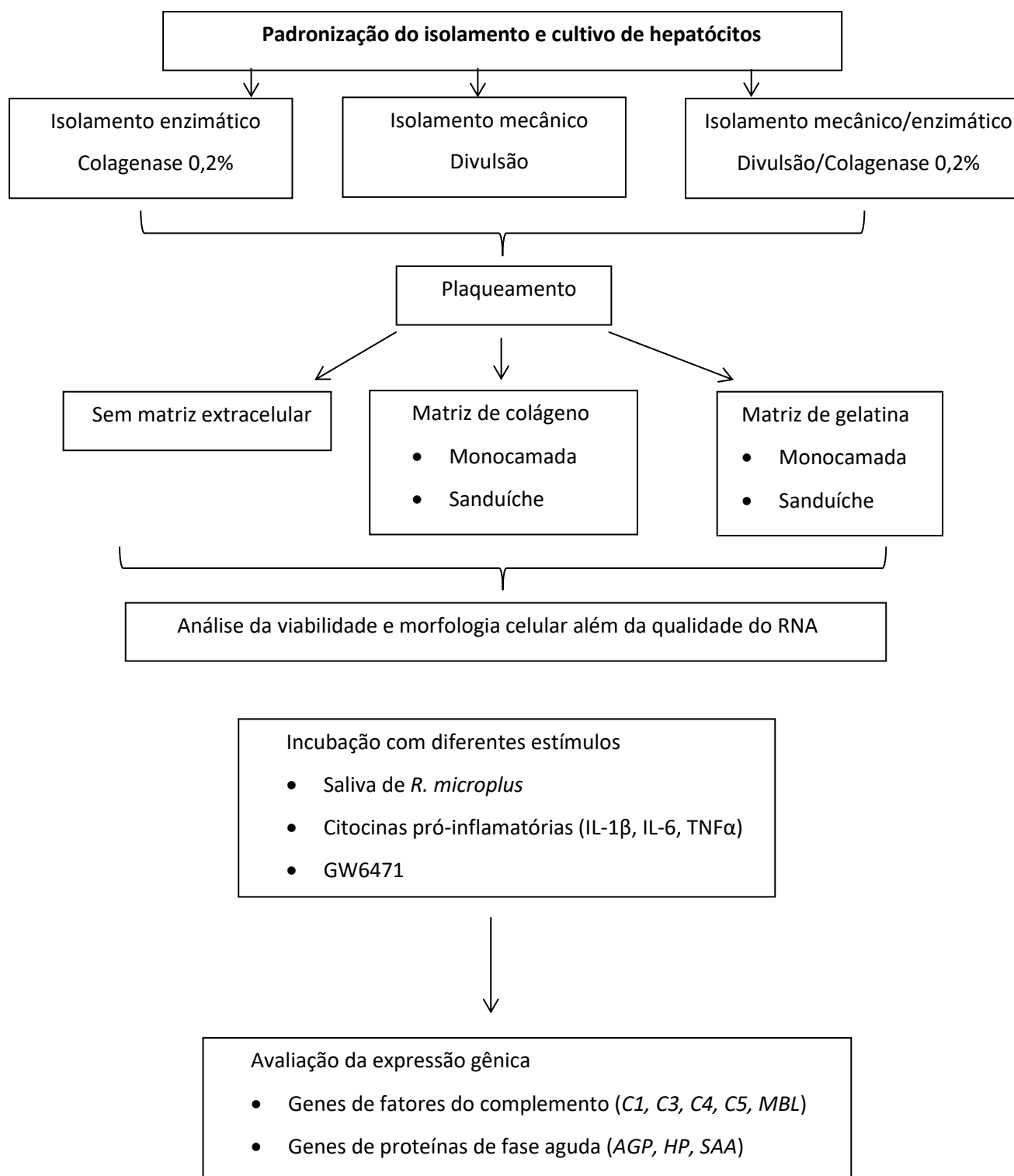


Figura 3. Organograma detalhando as atividades de isolamento, cultivo e avaliação da expressão gênica de hepatócitos bovinos submetidos a diferentes estímulos moduladores da imunidade inata. C1: fator do complemento 1; C3: fator do complemento 3; C4: fator do complemento 4; C5: fator do complemento 5; MBL: mannose-binding lectin; AGP: α 1-acid glicoprotein; HP: Haptoglobin; SAA: serum amyloid A.

Os protocolos enzimáticos consistiram basicamente na digestão do tecido, tanto em fragmentos maiores (adaptado de ADAY *et al.* 2011) quanto previamente divulsionados (adaptado de SPOTORNO *et al.* 2006), em solução de colagenase II 0,2% (Worthington Industries, Columbus, OH, EUA) por 15 minutos a 37°C. Para a determinação da concentração de uso da enzima foram realizados testes com três diluições distintas (0,1%, 0,2% e 0,4%) na qual foi escolhido a que apresentou maior viabilidade de células isoladas e rendimento suficiente para desenvolvimento dos ensaios propostos. Ambos os fragmentos, maiores e divulsionados, foram incubados com a colagenase tipo II 0,2% e a solução resultante da digestão foi filtrada em membrana de nylon de 70 µm (Corning Inc., Corning, NY, EUA) e adicionada a uma de Solução Balanceada de Hanks (HBSS; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) contendo 10% de Soro Fetal Bovino (SFB; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e 2 mM de ácido etilenoglicol tetra-acético (EGTA; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) para a neutralização da ação da enzima. Em seguida foi realizada uma centrifugação para a obtenção de um precipitado contendo as células e o sobrenadante foi descartado. O *precipitado* foi então submetido a três lavagens com tampão fosfato salino 1X (PBS; Amresco, Cleveland, OH, EUA). Após a última lavagem as células foram centrifugadas por 500g por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi ressuscitado em PBS 1X e esta solução foi submetida ao gradiente de Percoll (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido) com densidade de 1,124 g/mL. O anel de hepatócitos foi então lavado em HBSS contendo SFB 10% e centrifugado à temperatura ambiente. Em seguida o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuscitado em 1mL de meio DMEM/F12 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) suplementado com L-glutamina 1% (Lonza, Basileia, Suíça), antibiótico 1%, aminoácidos essenciais 1% (MEM; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), SFB 10% e insulina 0,1%.

Ao final do isolamento com as três metodologias (mecânica, enzimática com fragmentos grandes ou tecido divulsionado) foi avaliada a contagem e viabilidade celular por contagem em Câmara de Neubauer em microscópio invertido com utilização de Azul de Tripán (Casa da Química, Brasília, Brasil) 0,5% em solução salina 0,85%.

4.1.2. Cultivo de hepatócitos

Para o cultivo dos hepatócitos foram utilizadas placas de 4 e 96 poços. As placas de cultura foram recobertas com dois materiais que simularam uma matriz extracelular: a gelatina 2% m/v (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA), ou o colágeno tipo I (300 µg/mL; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, EUA). As placas de 4 poços foram cobertas com 120 µL de cada solução e as de 96 poços com 55 µL nas configurações de mono e bicamada.

Além dos dois materiais utilizados como matriz extracelular nas diferentes configurações, também foi testado o cultivo em placas sem tratamento.

Para o preparo da solução de gelatina, foram dissolvidos 0,2 g de gelatina em pó em 10 mL de água MilliQ estéril. Esta mistura foi autoclavada a 121°C e 15 psi por 30 minutos, após isso, a gelatina foi adicionada à placa e acondicionada sem tampa na capela por duas horas para polimerização. Para a cobertura com colágeno tipo I foi preparada uma solução na concentração de 300 µg/mL em tampão fosfato salino conforme recomendação do fabricante (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, EUA). A solução foi então adicionada à placa de cultivo e mantida tampada à temperatura ambiente por 18 horas para polimerização do colágeno. No dia seguinte foram realizadas duas lavagens com água destilada e secagem por duas horas na capela de fluxo laminar.

Foram testadas duas configurações distintas para cada material usado como matriz de suporte: uma em monocamada cobrindo somente o fundo da placa e outra em sanduíche, que consistiu na presença de uma camada abaixo e uma acima das células em cultivo conforme protocolo descrito por Dunn *et al.* (1991). Basicamente, após contagem e cálculo da viabilidade feito com azul de Tripán 0,5%, os hepatócitos bovinos isolados foram transferidos para as placas de cultivo celular cobertas, ou não, com as matrizes de suporte de gelatina e colágeno. Foram transferidas $2,5 \times 10^6$ células por poço cultivadas em meio de cultura DMEM/F12 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) suplementado com L-glutamina 1% (Lonza, Basileia, Suíça), antibiótico 1% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), MEM 1% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), SFB 10% e insulina 0,1% (Lonza, Basileia, Suíça). Na configuração de sanduíche das matrizes de suporte celular, a segunda camada foi adicionada 24 horas após o plaqueamento conforme protocolo descrito por Dunn *et al.* (1991), onde foi retirado o meio de cultura e adicionados 120 µL da solução de gelatina 0,2% ou colágeno Tipo I 300 µg/mL. Após a secagem por 2 horas o meio de cultura foi adicionado novamente. O cultivo dos hepatócitos foi mantido por 7 dias em estufa a 37 °C e 5% de CO₂ e umidade controlada, sendo realizadas trocas do meio a cada 48 horas.

A análise da morfologia e integridade celular e da qualidade do RNA extraído dos hepatócitos cultivados foram utilizadas para definição da melhor metodologia de cultivo para parte experimental. Foi utilizada microscopia ótica para análise da morfologia e integridade celular. Foram observadas a integridade da membrana, presença ou ausência de alongamentos citoplasmáticos e fragmentação nuclear baseadas em fotomicrografias descritas por Aday *et al.* (2011), Zhang *et al.* (2011) e Spotorno *et al.* (2006). A integridade do RNA foi analisada por eletroforese capilar microfluídica, utilizando o equipamento Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA) e o RNA 6000 Pico kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA). O valor da integridade foi

determinado pelo *software* do próprio equipamento a partir do perfil obtido no eletroferograma, e baseados na razão entre as densitometrias das bandas 28S e 18S do RNA ribossômico. O RNA *Integrity Number* (RIN) é a medida da integridade do RNA e varia de 1 a 10, onde 1 indica RNA muito degradado e 10 indica RNA íntegro (SCHROEDER *et al.*, 2006).

4.2. Avaliação da Modulação da Expressão de Genes Relacionados com a Imunidade Inata em Hepatócitos Bovinos

4.2.1. Coleta de saliva do carrapato *R. microplus*

Para a obtenção da saliva do *R. microplus* foi realizado um procedimento de salivação induzida, no qual foram utilizados carrapatos coletados de bovinos artificialmente infestados com o parasito, criados no Campo Experimental José Henrique Bruschi (CEJHB) da Embrapa Gado de Leite, em Coronel Pacheco, Minas Gerais. Toda a parte experimental utilizando animais foi devidamente autorizada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Embrapa Gado de Leite (protocolo Nº 5578010817).

A infestação artificial foi realizada fixando-se seringas contendo cerca de 60.000 larvas por animal. Estas larvas se desenvolveram até a fase de teleógina/partenógena, as quais foram retiradas do couro do animal com cuidado para não danificar a probóscide. Para realizar o processo de salivação, as fêmeas do carrapato foram então fixadas na lateral de uma estaca com fita dupla-face, com o aparelho bucal voltado para cima. Foi aplicada uma solução de pilocarpina a 5%, que é um agonista de receptores adrenérgicos os quais, quando ativados, provocam a contração da glândula salivar e secreção da saliva através da probóscide do parasito (KAUFMAN, 1978). Após aproximadamente duas horas teve início a coleta da saliva, que foi acondicionada em microtubos em gelo. Ao final da coleta a saliva foi armazenada em freezer a -20°C. Após a obtenção de todo o volume de saliva necessário para o experimento foi preparado um *pool* contendo todas as amostras. Este *pool* foi centrifugado, o precipitado formado foi descartado e a saliva separada em alíquotas. Foi realizada então análise quantitativa de proteínas presente na saliva, por meio de espectrofotometria pelo método de Bradford (Biorad®, Hercules, CA, EUA) conforme recomendação do fabricante, e análise qualitativa por eletroforese em gel desnaturante de gradiente (8-15%; Biorad®, Hercules, CA, EUA).

4.2.2 Estimulação de hepatócitos bovinos *in vitro*

Uma vez definida a metodologia de cultivo primário dos hepatócitos bovinos, foram coletados em abatedouro local os fígados de animais com diferentes características raciais, porém sem um conhecimento prévio da composição genética de cada animal. Os fragmentos de tecidos (30g por animal) foram submetidos aos protocolos de isolamento

mecânico/enzimáticos e cultivados com o meio de cultura DMEM/F12 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) suplementado com L-glutamina 1% (Lonza, Basileia, Suíça), antibiótico 1% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), MEM 1% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), SFB 10% e insulina 0,1% (Lonza, Basileia, Suíça), conforme descrito no item 4.1.1. Os hepatócitos foram mantidos em cultivo por sete dias, em estufa a 37 °C e 5% de CO₂ onde, nas últimas 48 horas, foram adicionados diferentes estímulos, conforme detalhado na tabela 2.

Tabela 2. Estímulos experimentais utilizados no cultivo de hepatócitos, incluindo sua função e concentração utilizada para estudo do efeito da modulação da expressão de genes relacionados com a resposta imune inata em bovinos resistentes e susceptíveis ao carrapato *R. microplus*

Estímulo	Função	Concentração
Citocinas pró- inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e TNF α) 1X	Simulação de inflamação sistêmica	IL-1 β 10 ng/mL
		IL-6 10 ng/mL
		TNF α 50 ng/mL
Citocinas pró inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e TNF α) 2X	Simulação de inflamação sistêmica	IL-1 β 20 ng/mL
		IL-6 20 ng/mL
		TNF α 100 ng/mL
Citocinas pró inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e TNF α) 4X	Simulação de inflamação sistêmica	IL-1 β 40 ng/mL
		IL-6 40 ng/mL
		TNF α 200 ng/mL
GW6471	Inibidor do receptor PPAR α	10 μ M
DMSO	Veículo do GW6471	10 μ M
Saliva de <i>R. microplus</i>	Alvo experimental	1:100
Saliva de <i>R. microplus</i>	Alvo experimental	1:1000
GW6471 + Saliva 1:100	Alvo experimental	10 μ M + 1:100
GW6471 + Saliva 1:1000	Alvo experimental	10 μ M + 1:1000

Além do uso da saliva do carrapato *R. microplus* como estímulo no cultivo dos hepatócitos, foi utilizado um coquetel das citocinas pró-inflamatórias IL-1 (PeproTech, Rocky Hill, NJ, EUA), IL-6 (ThermoFisher, Waltham, MA, EUA) e TNF- α (PeproTech, Rocky Hill, NJ, EUA) para confirmar se os hepatócitos estão ativos e responsivos aos estímulos, mantendo sua função imune *in vitro*. Este coquetel foi utilizado em três diferentes concentrações, conforme descrito na tabela 2. O GW-6471 é um inibidor sintético específico do receptor *peroxisome proliferator-activated receptor alpha* (PPAR α) que atua regulando vários genes de importância para o metabolismo celular, entre eles os genes das proteínas de fase aguda e do complemento em humanos e murinos (ZAMBON *et al.*, 2006; BELFORT *et al.*, 2010; RAKHSHANDEHROO *et al.*, 2012; MOGILENKO *et al.*, 2013), não havendo nada descrito para bovinos. Uma vez que este inibidor sintético é diluído em dimetilsulfóxido (DMSO), este foi utilizado como controle de ativação na resposta induzida pelo ligante do receptor PPAR alpha.

4.2.3. Extração, quantificação e análise da integridade do RNA

Foram testadas duas metodologias para a extração do RNA total das células cultivadas, uma utilizando coluna de separação, com o SV RNA Isolation System kit (Promega, Madison, WI, EUA), e outra utilizando TRIzol (ThermoFisher, Waltham, MA, EUA), ambos de acordo com as recomendações do fabricante. Resumidamente, a metodologia com coluna baseou-se na retirada do meio de cultivo da placa e adição do tampão de lise fornecido pelo kit, passando as células por uma seringa com agulha, seguida pela adição de etanol e injeção na coluna. Após alguns passos de lavagem da coluna e tratamento com a DNase 1, o RNA foi isolado e eluído em água livre de nucleases. A metodologia do TRIzol iniciou-se com a retirada do meio de cultivo da placa e posterior adição deste reagente para a lise das células aderidas à placa. O lisado foi então transferido para um tubo, onde foi adicionado clorofórmio e submetido à centrifugação para a separação em três fases, das quais a fase aquosa contém o RNA. Esta fase foi então transferida para um novo tubo, onde foram adicionados isopropanol e glicogênio para precipitação do RNA. Após uma nova centrifugação, o *precipitado* contendo o RNA foi lavado com etanol e ressuspendido em água livre de nucleases. Após isso as amostras foram incubadas a 55°C para melhor solubilização do material genético.

A quantidade e qualidade do RNA extraído das amostras de hepatócitos foi analisada previamente no espectrofotômetro Nanodrop 1000 (ThermoFisher, Waltham, MA, EUA). Após a quantificação, o RNA foi dividido em alíquotas e armazenado em temperatura de -80°C até o momento da análise de integridade por eletroforese microfluidica utilizando o equipamento Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA) e o kit RNA 6000 Pico (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA). O

valor da integridade foi determinado pelo software do próprio equipamento a partir do eletroferograma baseado-se na razão entre as densitometrias das bandas 28S e 18S do RNA ribossômico. O RIN é a medida da integridade do RNA e varia de 1 a 10, onde 1 indica RNA muito degradado e 10 indica RNA íntegro (SCHROEDER *et al.*, 2006).

4.2.4. Síntese de cDNA e PCR em tempo real

As amostras de RNA obtidas a partir de hepatócitos bovinos cultivados *in vitro* foram utilizadas como molde para a síntese da primeira fita de cDNA, utilizando o kit ProtoScript® II (New England Biolabs, Ipswich, MA, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante. O volume de RNA utilizado variou de acordo com a sua quantificação, sendo ajustado para conter 700ng por reação, em todas as amostras. A síntese do cDNA envolveu dois passos: primeiro as amostras de RNA foram desnaturadas junto ao oligodT fornecido pelo kit, para eliminar possíveis estruturas secundárias desta molécula. Nesse passo, as amostras foram incubadas por 5 minutos a 65° C e transferidas imediatamente para o gelo. Na etapa seguinte, foi adicionado um tampão de reação e a enzima transcriptase reversa. Nesse passo, a incubação foi realizada a 42° C por uma hora para a síntese da primeira fita de cDNA e depois 80° C por 5 minutos, para inativar a enzima. Ao final do processo de incubação as amostras foram transferidas imediatamente para o gelo e armazenadas a -20° C.

As reações de qPCR foram preparadas com o PowerUp SYBR Green Master Mix (ThermoFisher, Waltham, MA, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. Foram adicionados os *primers* dos genes de interesse e água livre de nucleases em placas ópticas de 96 poços. O *7500 Software v2.3* (ThermoFisher, Waltham, MA, EUA) foi utilizado para analisar os dados obtidos pelo equipamento *7500 fast Real-Time PCR Systems* (ThermoFisher, Waltham, MA, EUA).

Para a escolha dos genes de interesse deste estudo foi considerado processo inflamatório local provocado pela picada do carrapato e inoculação da sua saliva no hospedeiro bovino. Visto que a inflamação provoca alteração na produção de moléculas da imunidade inata, como proteínas de fase aguda e do sistema complemento, que também estão associadas com respostas protetoras contra o carrapato em bovinos, e que o fígado é o principal órgão produtor destas proteínas, foi verificada a expressão dos genes *C1*, *C3*, *C4*, *C5*, *MBL*, *AGP*, *SAA* e *HP* pelos hepatócitos. As sequências dos *primers* dos genes que codificam estas proteínas foram obtidas no banco de dados GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) e submetidas à análise na plataforma Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) por alinhamento a sequências existentes no banco de dados, a fim de se encontrar uma região exclusiva em bovinos, na sequência do mRNA. Para a escolha dos *primers*, foi utilizado o *software Primer Express* (ThermoFisher,

Massachusetts, EUA), que permite avaliar características importantes para o funcionamento destes na reação de PCR, como a razão do conteúdo de nucleotídeos de citosina e guanina próximos a 50%, bem como a ausência ou baixa formação de estruturas secundárias, como dímeros (ligação entre os *primers* de cada par) e formação de *hairpins* (ligação entre nucleotídeos em um *primer*). As sequências dos *primers* utilizados estão descritas na Tabela 3. Todos os *primers* foram utilizados na concentração de 100 nM com a temperatura de ligação de 60° C.

Tabela 3. Sequências de primers utilizados para as reações de PCR em tempo real.

Gene	Sequência dos primers (5'-3')
<i>Proteína do complemento 1</i>	F: GGCCCGAGCGCATTGAT R: CCCTGACTCGTCCGTGAAGA
<i>Proteína do complemento 3</i>	F: GCTGCACGAGGCTAAAGACAT R: TTCGCAACTCTCTGTAGTGGTTTT
<i>Proteína do complemento 4</i>	F: GGCTCCAGCCATGTCGATT R: CCCATAGCAGCAGGTGTAGCA
<i>Proteína do complemento 5</i>	F: CAGACTCCAGGTGTCCATCGT R: GCTGACCTTTAGGCGTTTTCA
<i>Lectina ligadora de manose</i>	F: GCCTCTGATACCGCCTTCCT R: GCCTAGCCTTCCTCCAGTTACA
<i>Amiloide sérica A</i>	F: ACCTTTCCACGGGCATCAT R: CCCTTGACCAGCTTCCTTGA
<i>α1-glicoproteína ácida</i>	F: GCTCTCTGGCAAGTGGTTTTATATT R: GCCGCCTGGATTGCTCTA
<i>Haptoglobina</i>	F: GTGGACCAGGTGCAGAGGAT R: CGTGGCTCCCGAGATGAG
<i>GAPDH</i>	F: GCGTGAACCACGAGAAGTATAA R: CCCTCCACGATGCCAAAGT
<i>RPLP 0</i>	F: CAACCCTGAAGTGCTTGACAT R: AGGCAGATGGATCAGCCA
<i>HPRT</i>	F: GCCGACCTGTTGGATTACAT R: ACATTCGAGGGGTCCTTTT
<i>B-ACT</i>	F: AGCAAGCAGGAGTACGATGAGT R: ATCCAACCGACTGCTGTCA

F: sequência *forward* do primer; R: Sequência reverse do primer; GAPDH: gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase; RPLP0: *Ribosomal Protein Lateral Stalk Subunit P0*; HPRT: *Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase*; B-ACT: *β-actin*.

A análise dos resultados de qPCR foi realizada por meio da avaliação das variações do *cycle threshold* (Ct), valor obtido pelo software do equipamento de acordo com a intensidade de fluorescência emitida pelos componentes da reação, onde foi gerado um gráfico que indica a amplificação do material genético. O Ct é o ciclo no qual o limiar da curva de amplificação é atingido (PFAFFL, 2004). Quanto maior for este valor menor é a quantidade de RNA inicial e, conseqüentemente menor é a expressão do gene. Essa análise foi feita para cada um dos genes de interesse de acordo com os primers desenhados para a avaliação da eficiência dos primers na reação.

As reações de PCR em tempo real foram realizadas em duplicata para cada gene. Para o cálculo da eficiência das reações foi formado um *pool* com todas as amostras de cDNA obtidas a partir do RNA proveniente dos hepatócitos bovinos cultivados *in vitro* conforme padronizado previamente. Este *pool* foi feito juntando um volume de cada amostra de modo que todas elas contivessem a mesma massa de RNA total, estimada

pela quantificação por espectrofotometria. Para o cálculo da eficiência da reação (E), no qual foram testadas 5 diluições do *pool*, as amostras (*in natura*, 1:2, 1:4, 1:8 e 1:16) foram utilizadas para a construção de uma curva padrão baseada nos valores de Ct, de acordo com a equação:

$$E = 10^{(-1/\text{inclinação da reta})}$$

Para o estudo da expressão gênica é necessária a utilização de genes de referência (ou genes constitutivos) que sejam igualmente expressos em nas células avaliadas mesmo na presença de estímulos que perturbem o seu funcionamento. A análise de estabilidade dos genes de referência (*GAPDH*, *RPLP0*, *HPRT* e *B-ACT*) foram calculadas pelo software geNorm a partir de um valor (M), que é a variação média de determinado gene em relação aos outros testados. Quanto menor o valor de M, mais estável é a expressão do gene e confiável seu uso como referencia em estudos utilizar PCR em tempo real relativo (VANDESOMPELE *et al.*, 2002).

4.2.5 Análises estatísticas

Foram utilizados os métodos do $\Delta\Delta Ct$ (*fold change*= $2^{-\Delta\Delta Ct}$) e do ΔCt para analisar a expressão gênica relativa (LIVAK & SCHMITTGENT, 2001). Todos os testes estatísticos utilizados foram realizados no *software SAS (Statistical Analysis System Institute, Inc., Carolina do Norte, EUA)*, e basicamente consistem em testar igualdade entre médias da variação de expressão gênica relativa das diferentes raças e tratamentos considerados neste experimento. Foi adotado $P < 0,05$ para representar diferenças significativas nos contrastes experimentais analisados.

5. RESULTADOS

5.1. Isolamento Celular

Para escolha da melhor metodologia de isolamento primário de hepatócitos bovinos foram avaliadas a viabilidade e a morfologia celular, bem como qualidade do material genético (RNA) extraído de células isoladas por diferentes protocolos, mecânicos e enzimáticos, descritos obtidos na literatura. Inicialmente, para estabelecimento do protocolo enzimático, foi necessário verificar a concentração ideal de colagenase tipo II (Worthington Industries, Columbus, OH, EUA), utilizada para digerir o tecido hepático, por meio da contagem de células viáveis ao final da digestão de fragmentos de peso aproximado (5g), divulsionados ou não. Foram testadas três diluições enzimáticas (0,1%, 0,2% e 0,4%) de acordo com a recomendação do fabricante e dados de literatura (SPOTORNO *et al.*, 2006; ADAY *et al.*, 2011). Os resultados demonstraram que a incubação do fragmento de tecido previamente divulsionado aumentou em mais de três vezes a recuperação de células viáveis mesmo nas menores concentrações de colagenase (Figura 4). A digestão do fragmento íntegro de tecido hepático apresentou maior eficiência no número de células isoladas na diluição de 0,2% ($3,94 \times 10^6$ células/mL; Figura 4), no entanto continuou sendo menos eficiente que o tecido divulsionado ($13,30 \times 10^6$ células/mL; Figura 4). Apesar da divulsão do tecido e incubação com colagenase 0,4% ter apresentado o maior número de células viáveis, foi padronizado o uso da colagenase 0,2% visando menor interferência enzimática no cultivo celular e possibilidade de comparação entre os dois protocolos enzimáticos utilizados nesse trabalho.

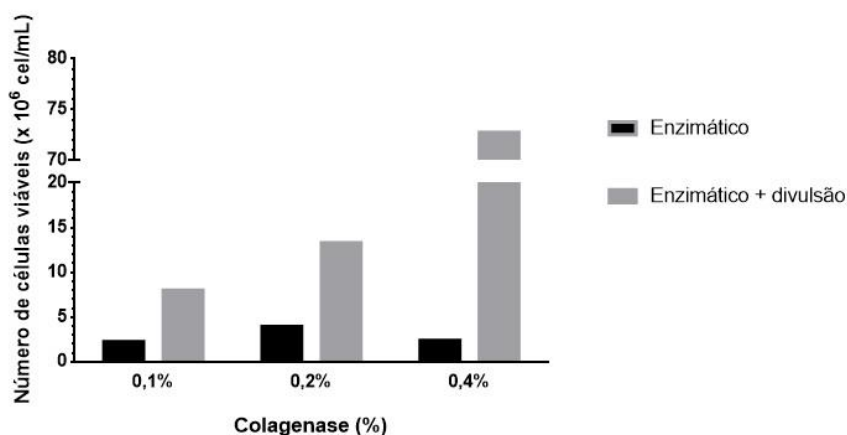


Figura 4. Estabelecimento da concentração ideal de colagenase tipo II para digestão de tecido hepático bovino. Eixo X: Diferentes diluições de colagenase tipo II (0,1%; 0,2%; 0,4%) utilizadas para digestão de fragmentos de 5g de fígado, previamente divulsionados (cinza) ou não (preto). Eixo Y: Número absoluto de células viáveis x 10^6 contadas por exclusão em Azul de Trypan na câmara de Neubauer.

Uma vez estabelecida a concentração de colagenase a ser testada nos protocolos enzimáticos de isolamento de hepatócitos, foi comparado o rendimento e viabilidade celular para estabelecimento da melhor metodologia a ser adotada para os testes de imunomodulação, com base nas referências já descritas (KRAVCHENKO *et al.*, 2002; SPOTORNO *et al.*, 2006; ADAY *et al.*, 2011). O isolamento mecânico de hepatócitos apresentou as menores contagens ($2,18 \times 10^6 \pm 0,19$ células/mL; Figura 5A) e viabilidade celular ($17,96\% \pm 4,54$; Figura 5B) quando comparado às outras metodologias testadas. No isolamento enzimático, sem divulsão prévia do tecido, foi observado um aumento na contagem de células ($3,94 \times 10^6 \pm 0,44$ células/mL; Figura 5A) e maior viabilidade celular quando comparado à metodologia mecânica ($82,18\% \pm 4,40$; $P < 0,05$; Figura 5B). O protocolo enzimático, com divulsão prévia do tecido, apresentou o maior rendimento celular ($88,05 \times 10^6 \pm 10,96$ células/mL; $P < 0,05$; Figura 5A) e viabilidade em comparação aos outros protocolos testados ($93,06\% \pm 1,0$; Figura 5B). De acordo com os resultados, a divulsão prévia do tecido e posterior digestão com colagenase tipo II 0,2% foi definida como melhor metodologia dada a alta viabilidade e maior recuperação celular.

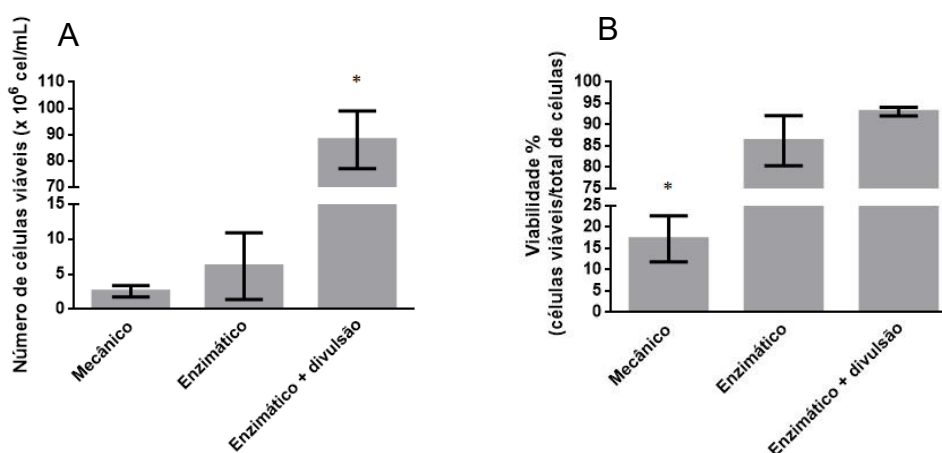


Figura 5. Rendimento e viabilidade de células de fígado bovino com diferentes metodologias. A) número absoluto de células viáveis x 10⁶ obtidas nos isolamentos mecânico e enzimático utilizando Colagenase Tipo II 0,2% (com e sem divulsão prévia do tecido). B) viabilidade celular nos diferentes tipos de isolamento celular de tecido hepático. Fragmentos de 5g de fígado foram utilizados para testar cada um dos protocolos. A contagem de células viáveis foi feita por exclusão em Azul de Trypan 0,5% na câmara de Neubauer. O cálculo da viabilidade foi realizado dividindo o número de células viáveis pelo número total de células contadas x 100. * $P < 0,05$, teste t de Student.

5.2. Cultivo dos hepatócitos

Para simular uma matriz extracelular nas placas de cultivo foram utilizadas duas soluções distintas, o colágeno 300 µg/ml e a gelatina a 2%, nas configurações de monocamada, recobrando a placa de cultivo, e bicamada “em sanduíche” com células intercalantes. Também foi realizado o cultivo celular sem a adição de nenhuma solução de matriz de suporte como controle. A viabilidade foi calculada após 7 dias de cultivo com auxílio de uma solução de dissociação celular não enzimática para soltar as células aderidas. Foi observado que não houve diferença estatística significativa entre os tratamentos pela análise de variância (Figura 6). Uma vez que não houve diferença na viabilidade de hepatócitos cultivados nos diferentes revestimentos, optou-se utilizar a gelatina devido ao custo mais baixo e disponibilidade no nosso laboratório.

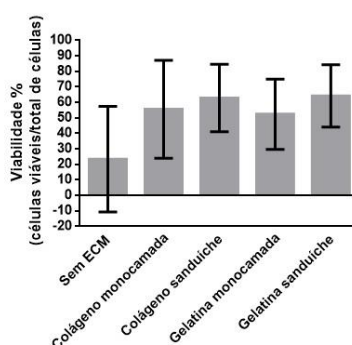


Figura 6. Viabilidade de hepatócitos cultivados sobre diferentes revestimentos. Hepatócitos foram isolados de tecido divulsionado de fígado incubado com colagenase tipo II 0,2% e cultivados por 7 dias sobre diferentes matrizes de suporte (gelatina 0,2% e colágeno 300µg/ml). A viabilidade celular foi calculada por exclusão em Azul de Trypan 0,5% na câmara de Neubauer dividindo-se o número de células viáveis pelo número total de células contadas x 100. Não houve diferença estatística entre os tratamentos ($P=0,3832$ one-way Anova).

Em isolamentos primários de hepatócitos, com metodologia enzimática, é recomendado realizar uma etapa de estabilização celular que consistiu em 7 dias de cultivo em estufa, com temperatura e umidade controladas. Uma vez escolhida a gelatina como matriz de suporte para o cultivo dos hepatócitos isolados, foi verificado se haveria diferenças morfológicas quando colocadas por 5 dias em cultivo utilizando mono ou bicamadas comparando com os poços sem tratamento (Figura 7). Nos cultivos de hepatócitos, sem a presença da matriz de suporte, foi observado que os complexos celulares eram menos numerosos e havia predominância de células com o formato esférico (Figura 7A). As células cultivadas em monocamada apresentaram formação de complexos celulares com um formato hexagonal tal qual esperado para hepatócitos (Figura 7B). Já na configuração de sanduíche, os hepatócitos apresentaram-se mais isolados e com um formato mais esférico (Figura 7C).

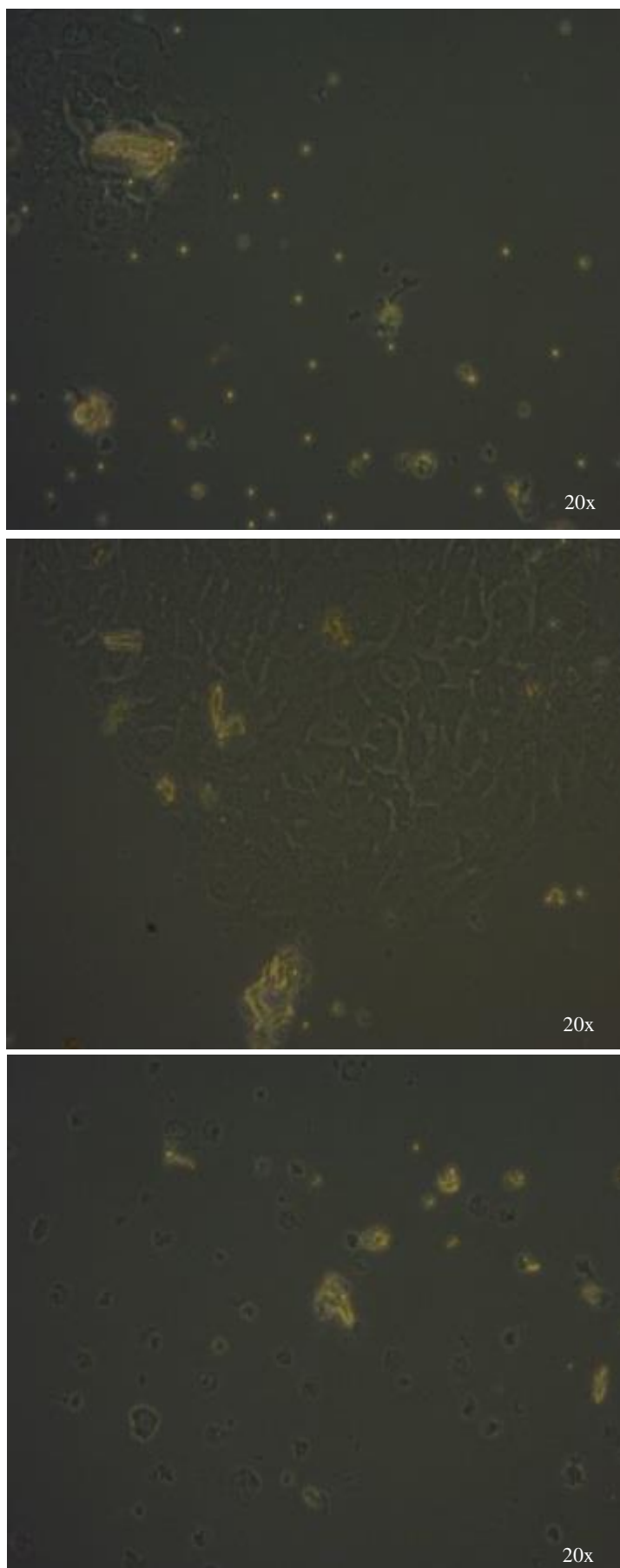


Figura 7. Cultivo primário de hepatócitos bovinos. Fotografias representativas de hepatócitos bovinos cultivados por 5 dias em A: placa de cultivo celular sem revestimento; B: Monocamada de gelatina 0,2%; e C: Sanduíche de gelatina 0,2%.

Além da análise morfológica, também foi avaliada a integridade do RNA extraído dessas células. Foram testadas duas metodologias para a extração do RNA total dos hepatócitos cultivados *in vitro*, sendo uma utilizando o SV RNA *Isolation System* kit (Promega, Madison, WI, EUA), e outra utilizando TRIzol (ThermoFisher, Waltham, MA, EUA), ambos de acordo com as recomendações do fabricante. A extração de RNA realizada com o TRIzol apresentou concentrações mais elevadas ($203,73 \pm 79,66$ ng/ μ L), enquanto o kit comercial apresentou valores muito baixos de concentração (<10 ng/ μ L). Sendo assim, foi então escolhida a metodologia do TRIzol para a extração do RNA nos ensaios posteriores.

A integridade do RNA de hepatócitos bovinos, cultivados sobre as diferentes superfícies (placa sem tratamento, mono e bicamada de gelatina), foi então avaliada com base na razão entre as densitometrias das bandas 18S e 28S do RNA ribossômico (Figura 8). A utilização da bicamada de gelatina como matriz de suporte celular resultou em uma maior degradação do RNA (Figura 8A) e valor mais baixo de RIN ($1,42 \pm 0,58$, $P < 0,05\%$) quando comparado com outros protocolos (Figura 8B). O cultivo de hepatócitos bovinos em monocamada de gelatina apresentou alta integridade do RNA e melhores valores de RIN ($8,69 \pm 0,82$). Apesar do RNA estar bastante integro nas células cultivadas em placa não tratada, a morfologia desses hepatócitos estava alterada nas análises de morfologia por microscopia (Figura 7). Nesse sentido, para avaliação da expressão gênica nos diferentes estímulos imunomoduladores, foi padronizado o uso de hepatócitos bovinos isolados por meio de divulsão de fragmentos do lobo caudal do fígado seguido pela digestão enzimática com colagenase tipo II 0,2% e cultivo em monocamada de gelatina 0,2% por 7 dias em meio DMEM/F12 suplementado com L-glutamina 1% (Lonza, Basileia, Suíça), antibiótico 1% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), MEM 1% (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), SFB 10% e insulina 0,1% (Lonza, Basileia, Suíça).

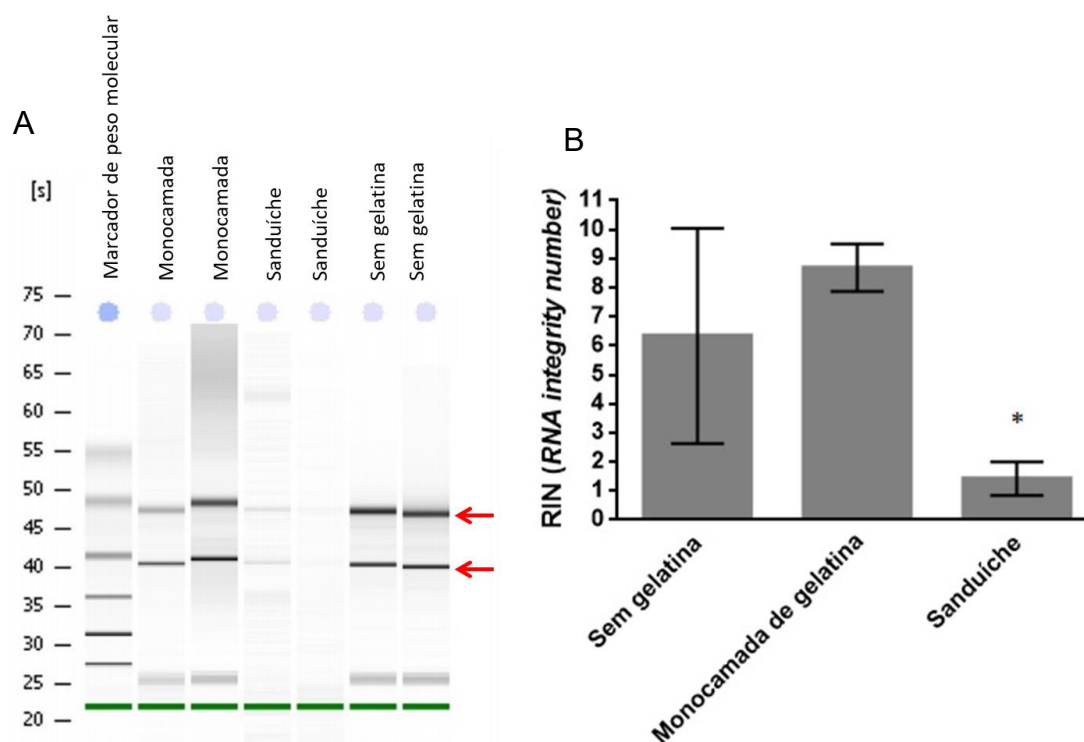


Figura 8. Qualidade do material genético (RNA) extraído de hepatócitos bovinos. A: Gel de eletroforese microfluídica das amostras de RNA extraídos dos cultivos de hepatócitos bovinos em monocamada de gelatina, sanduíche de gelatina e sem gelatina. As bandas mais escuras indicadas pelas setas vermelhas representam a banda 18S e 28S do RNA ribossômico. B: Gráfico comparativo dos valores de RIN das amostras cultivadas em monocamada de gelatina, sanduíche de gelatina e sem gelatina. *P < 0,05, one-way Anova.

5.3. Estimulação de hepatócitos *in vitro* para avaliação da expressão de moléculas relacionadas com a imunidade inata em bovinos

Uma vez definida a metodologia de cultivo primário dos hepatócitos bovinos, foram coletados fígados de bovinos de um grupo heterogêneo, sem uma informação precisa da raça de cada animal avaliado, porém todos do sexo masculino. Como estímulo, foi utilizado um coquetel das citocinas pró-inflamatórias IL-1, IL-6 e TNF- α para mimetizar uma inflamação sistêmica e verificar se os hepatócitos estão ativos e responsivos imunologicamente. Este coquetel foi utilizado em três diferentes concentrações, conforme descrito na Tabela 2. Como estímulos imunomoduladores experimentais, foram utilizados o GW-6471, que é um inibidor sintético específico do receptor PPAR α , ligado ao controle da produção de complemento em modelo humanos (RAKSHANDEHROO *et al.*, 2012; MOGILENKO *et al.*, 2013), a saliva do carrapato *R. microplus* em duas diluições, coletada e quantificada conforme item 4.2.1 do material e métodos (Anexo 1) e a associação entre estes para cada raça bovina avaliada.

Para verificar se todos os estímulos utilizados no cultivo celular gerariam um RNA íntegro para a realização dos ensaios de qPCR, todas as amostras foram quantificadas e submetidas à análise de integridade. A Tabela 4 contém a média \pm desvio padrão da concentração de RNA obtida, bem como as razões 260/280 e 260/230, que indicam a pureza das amostras, e também o valor de RIN. Todas as amostras de RNA apresentaram excelente integridade para os ensaios de qPCR de acordo com os parâmetros analisados.

Tabela 4. Quantificação e integridade do RNA extraído de hepatócitos bovinos cultivados *in vitro* após desafio com diversos estímulos imunomoduladores.

Tratamento	ng/ul (média \pm DP)	260/280 (média \pm DP)	260/230 (média \pm DP)	RIN (média \pm DP)
Sem estímulo	190,71 \pm 53,73	1,76 \pm 0,06	0,49 \pm 0,13	8,90 \pm 0,19
Citocinas 1X	244,00 \pm 84,51	1,81 \pm 0,10	0,72 \pm 0,34	9,00 \pm 0,65
Citocinas 2X	327,40 \pm 201,95	1,75 \pm 0,10	0,54 \pm 0,22	8,68 \pm 0,84
Citocinas 4X	299,17 \pm 163,29	1,78 \pm 0,10	0,66 \pm 0,23	9,14 \pm 0,45
GW 6471	283,18 \pm 85,61	1,85 \pm 0,11	0,82 \pm 0,34	8,61 \pm 0,57
DMSO	329,19 \pm 157,80	1,81 \pm 0,14	0,82 \pm 0,52	9,31 \pm 0,31
Saliva 1:100	272,88 \pm 59,50	1,84 \pm 0,07	0,75 \pm 0,18	8,88 \pm 0,47
Saliva 1:1000	359,61 \pm 297,16	1,81 \pm 0,10	0,68 \pm 0,22	9,25 \pm 0,36
GW 6471 + Saliva 1:100	299,09 \pm 158,31	1,78 \pm 0,11	0,67 \pm 0,31	8,65 \pm 0,50
GW 6471 + Saliva 1:1000	351,69 \pm 185,05	1,75 \pm 0,12	0,60 \pm 0,18	8,87 \pm 0,25

5.6. Ensaios de qPCR

5.6.1. Eficiência dos *primers*

Para avaliar o efeito imunomodulador da saliva do carrapato sobre os hepatócitos cultivados com os estímulos descritos no item 4.2, foram realizadas reações de qPCR, onde, para cada tratamento, foi avaliada a expressão dos genes dos fatores do complemento (C1, C3, C4, C5 e MBL) e de proteínas de fase aguda (AGP, SAA e HP). Primeiramente, foi realizada uma bateria de reações para verificar a eficiência dos *primers* utilizando um *pool* de cDNA obtido a partir da reação em transcriptase reversa de quantidades semelhantes de RNA de todas as amostras experimentais. O cálculo da eficiência demonstrou que a amplificação dos genes que codificam o C4 e a haptoglobina estavam fora da variação tolerada para o ensaio ($100 \pm 10\%$; ROGERS-BROADWAY & KARTERIS, 2015; Tabela 5), contudo não foram testadas diferentes concentrações destes *primers*, o que poderia ajustar estes valores tornando-os mais próximos do aceitável. A escolha dos genes de referência para cálculo da expressão relativa dos alvos foi baseada na análise de estabilidade calculada com o *software* geNorm (VANDESOMPELE *et al.*, 2002). O valor de estabilidade M deve ser inferior a 0,15, sendo

que quanto mais baixo for este valor, maior a estabilidade do gene endógeno. Os genes que se apresentaram mais estáveis foram o *HPRT* (M=0,067) e o *GAPDH* (M=0,072), os genes *B-ACT* (M=0,105) e *RPLP0* (M=0,097) foram os menos estáveis e descartados do ensaio.

Tabela 5. Eficiência dos primers utilizados nos ensaios de PCR em tempo real. A eficiência foi calculada com base na inclinação da reta resultante dos valores de Ct obtidos em cinco diluições do pool de amostras de RNA feito com todos os estímulos experimentais ($E = 10(-1/\text{inclinação da reta})$).

Gene	Eficiência (%)
Proteína do complemento 1	103,07
Proteína do complemento 3	94,99
Proteína do complemento 4	57,19
Proteína do complemento 5	94,18
Lectina ligadora de manose	98,77
Amiloide sérica A	92,19
α 1-glicoproteína ácida	101,76
Haptoglobina	214,46
GAPDH	93,26
RPLP0	99,68
HPRT	96,91
B-ACT	90,22

GAPDH: gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase; RPLP0: *Ribosomal Protein Lateral Stalk Subunit P0*; HPRT: *Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase*; B-ACT: β -actin.

Apesar de alguns genes como *C5*, *AGP*, *MBL* terem apresentado valor dentro deste intervalo (Tabela 5), foi observada amplificação tardia (valores de Ct: *C5* = $34,63 \pm 0,95$; *AGP* = $35,78 \pm 1,16$; *MBL* = $36,30 \pm 1,31$). Devido à amplificação tardia destes genes experimentais foi realizada uma reação de PCR em tempo real com o RNA proveniente de amostras de tecido fresco, extraído com a mesma metodologia, para verificar a eficiência dos primers e expressão basal em material *ex vivo*. Os valores de Ct resultantes desta corrida foram mais baixos (*C5* = $21,77 \pm 1,04$; *AGP* = $22,51 \pm 1,16$; *MBL* = $18,16$), o que significa que estes genes estavam sendo expressos *in vivo* e, após isolamento e cultivo de hepatócitos, por algum motivo, eles não estão sendo detectáveis. Como a quantidade de material genético extraído previamente nos ensaios não permitiu o uso de concentrações maiores de cDNA na reação de PCR em tempo real, esses alvos não foram analisados frente aos diferentes estímulos experimentais.

5.6.2. Ensaio expressão gênica por qPCR para avaliação da expressão de C1, C3 e SAA em hepatócitos bovinos cultivados *in vitro*

A expressão dos genes *C1*, *C3* e *SAA*, únicos que apresentaram eficiência aceitável nos testes (Tabela 5), foi avaliada para cada um dos tratamentos experimentais (descritos no item 4.2.). Foi realizada uma análise de expressão gênica com base nos valores de ΔCt , que é a diferença entre os valores de *Ct* do gene alvo e a média geométrica dos valores de *Ct* dos genes de referência, para verificar se as células estavam respondendo ao controle positivo (citocinas 1X, 2X e 4X). Todas as análises estatísticas podem ser visualizadas no anexo 2. O gene *SAA* apresentou diferença significativa entre o controle positivo nas três concentrações utilizadas (citocinas 1X, 2X e 4X) e o controle negativo ($P < 0,0001$; procedimento *GLIMMIX*; Tabela 6 e anexo 2). Já o gene *C1* apresentou diferença significativa ($P < 0,05$; procedimento *GLIMMIX*; Tabela 6 e anexo 2) entre o controle negativo e o controle positivo nas duas concentrações mais altas (citocinas 2X e 4X). O gene *C3* não apresentou diferença significativa entre os controles positivos e negativo.

Tabela 6. Expressão gênica (ΔCt médio \pm desvio padrão) de SAA, C1 e C3 em hepatócitos bovinos estimulados com as citocinas IL-1, IL-6 e TNF- α .

Gene	Tratamento	ΔCt Médio \pm DP
SAA	Sem estímulo	2,71 \pm 1,81
	Citocinas 1X	-1,62 \pm 1,62 ^A
	Citocinas 2X	-1,21 \pm 1,68 ^A
	Citocinas 4X	-1,29 \pm 2,48 ^A
C1	Sem estímulo	5,35 \pm 1,74
	Citocinas 1X	4,58 \pm 1,44
	Citocinas 2X	4,48 \pm 1,41 ^B
	Citocinas 4X	3,99 \pm 1,63 ^B
C3	Sem estímulo	3,10 \pm 0,95
	Citocinas 1X	2,99 \pm 1,09
	Citocinas 2X	3,10 \pm 1,08
	Citocinas 4X	2,70 \pm 1,12

A letra A indica diferença estatística significativa ($P < 0,0001$, procedimento GLIMMIX) e a letra B diferença significativa ($P < 0,05$, procedimento GLIMMIX) entre o controle negativo (sem estímulo) e os controles positivos (citocinas 1X, 2X, 4X) dentro de cada gene analisado.

Após a confirmação de que as células estavam responsivas ao controle positivo foi realizada a análise da expressão relativa dos três genes para todos os estímulos experimentais (Figura 9) pelo método do $\Delta\Delta Ct$, que é a diferença entre o valor de Ct da amostra e o valor de Ct do calibrador (amostra sem estímulo). Os valores relativos de expressão (*fold change*) foram obtidos utilizando a fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Primeiramente, foram feitas comparações da expressão gênica entre os diferentes estímulos, com o objetivo de averiguar a interferência da saliva e do receptor PPAR α sobre a resposta de hepatócitos. Foi observada diferença significativa de expressão do gene SAA entre os controles positivos (citocinas 1X, 2X e 4X) e os demais tratamentos, contudo não foi observada nenhuma diferença nos tratamentos entre si ($P < 0,05$, Método Tukey-Kramer; Figura 9).

Os genes C1 e C3 não apresentaram diferença significativa de expressão entre os controles positivos e os demais tratamentos (Figuras 10 e 11, respectivamente e Anexo 2).

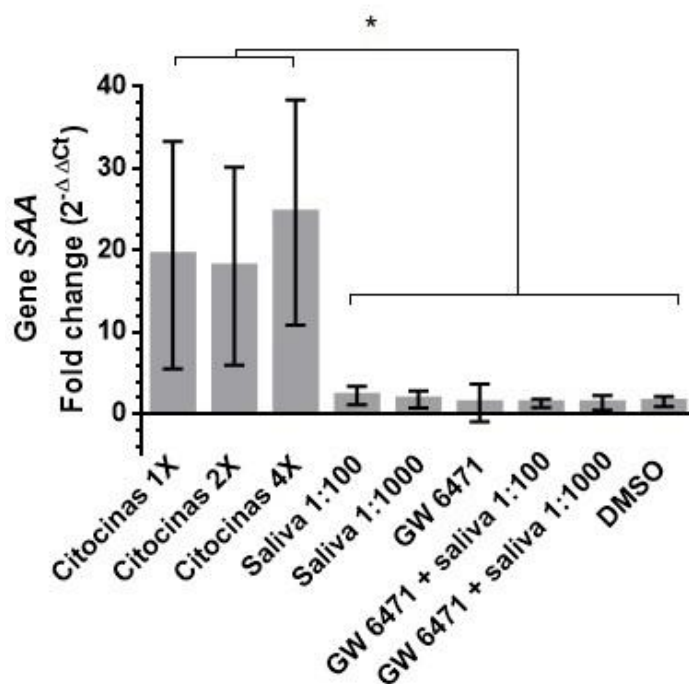


Figura 9. Valor relativo da expressão do gene que codifica a proteína de fase aguda SAA por hepatócitos bovinos. Os hepatócitos bovinos foram tratados, após 5 dias de cultivo, por 48 horas com a associação das citocinas IL-1 β + IL-6 + TNF α em 3 concentrações; saliva 1:100; saliva 1:1000; inibidor sintético do PPAR, GW-6471 e o seu veículo DMSO, bem como a associação deste com as duas concentrações de saliva. * P<0,05 Teste de Tukey-Kramer.

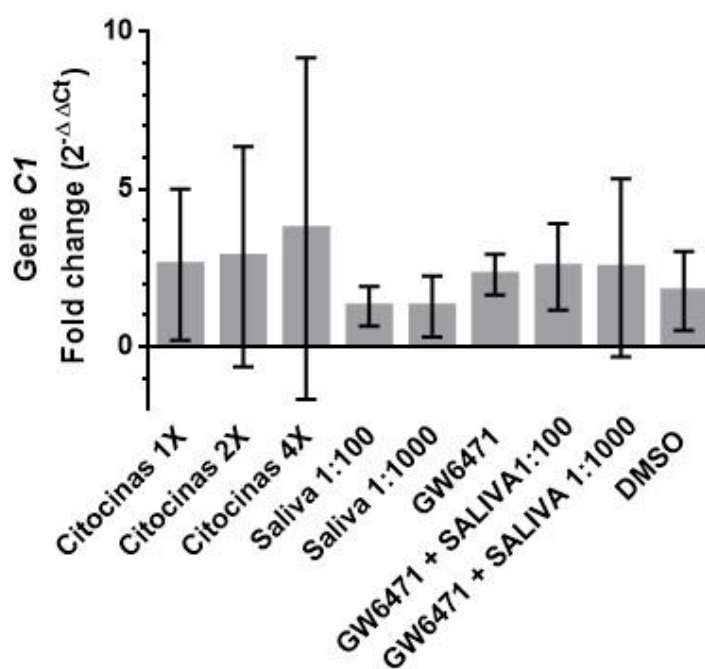


Figura 10. Valor relativo da expressão do gene que codifica o fator do complemento C1 por hepatócitos bovinos. Os hepatócitos bovinos foram tratados, após 5 dias de cultivo, por 48 horas com a associação das citocinas IL-1 β + IL-6 + TNF α em 3 concentrações; saliva 1:100; saliva 1:1000; inibidor sintético do PPAR, GW-6471 e o seu veículo DMSO, bem como a associação deste com as duas concentrações de saliva. * P<0,05 Teste de Tukey-Kramer

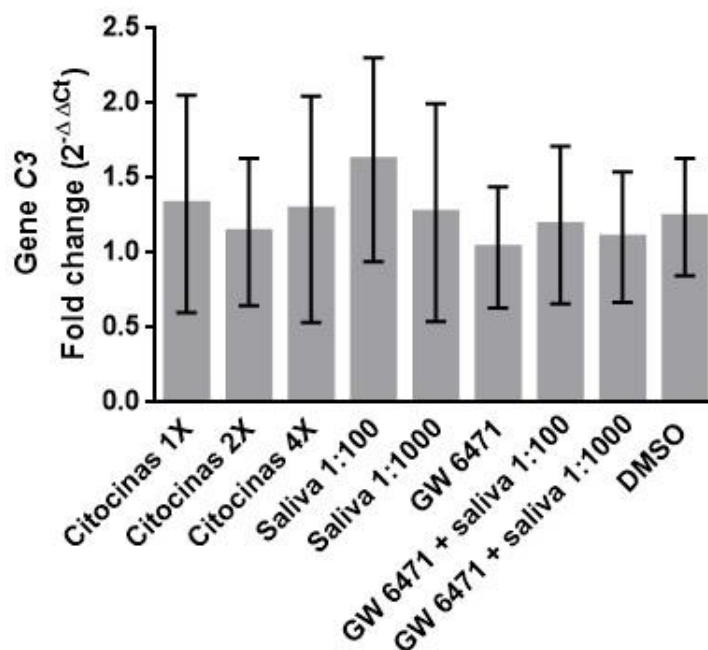


Figura 11. Valor relativo da expressão do gene que codifica o fator do complemento C3 por hepatócitos bovinos. Os hepatócitos bovinos foram tratados, após 5 dias de cultivo, por 48 horas com a associação das citocinas IL-1 β + IL-6 + TNF α em 3 concentrações; saliva 1:100; saliva 1:1000; inibidor sintético do PPAR, GW-6471 e o seu veículo DMSO, bem como a associação deste com as duas concentrações de saliva.

6. DISCUSSÃO

Sistemas de cultura de hepatócitos, *in vitro*, representam uma importante ferramenta para o estudo das diversas funções desempenhadas pelo fígado, como o metabolismo, a biotransformação de drogas e o armazenamento de diferentes moléculas (SHULL *et al.*, 1987). Estes sistemas são capazes, por exemplo, de reduzir o uso de animais para a experimentação de novos fármacos. Embora seja realizado há muito tempo, no estudo do metabolismo do fígado, o cultivo de hepatócitos ainda pode representar um grande desafio a diversos pesquisadores na área de imunologia. Já foram estabelecidas metodologias de isolamento e cultivo primário de hepatócitos humanos e murinos, bem como linhagens imortalizadas destas espécies para o estudo metabólico do fígado, porém, para bovinos ainda não há linhagens de células comerciais nem uma metodologia de isolamento e cultivo bem estabelecida que seja capaz de representar a atividade dos hepatócitos semelhante aos estudos *in vivo* (PANDA *et al.*, 2015). Com este desafio, este trabalho teve como um dos objetivos testar metodologias de isolamento de hepatócitos bovinos para o estudo da expressão de genes relacionados à imunidade inata no fígado.

Por não haver ainda uma metodologia padronizada para o isolamento de hepatócitos bovinos, foram realizados testes a fim de obter resultados de viabilidade e rendimento celular, necessários para os ensaios propostos, atentando conjuntamente, para a qualidade do RNA. Diversos autores demonstraram que o isolamento celular utilizando a enzima colagenase é o mais indicado para o cultivo primário de hepatócitos (FRY, *et al.*, 1976; BERRY & FRIEND, 1969; SEGLEN, 1976; DUNN, *et al.*, 1989). Nossos resultados indicaram que a metodologia que utilizou apenas a incubação de fragmentos do tecido hepático com colagenase, geraram células com boa taxa de viabilidade, porém um número baixo de células. Segundo SPOTORNO *et al.* (2006), a incubação do tecido fragmentado em solução de colagenase pode ser uma boa alternativa para o isolamento de hepatócitos sem a perda de suas características fenotípicas. Adaptações a este protocolo foram realizadas e resultaram em um isolamento com alta viabilidade (93,06% \pm 1,0), que proporcionou um cultivo de hepatócitos dos quais obteve-se a integridade do RNA (RIN = 8,69 \pm 0,82), necessária para a realização de ensaios de PCR em tempo real para o estudo de expressão gênica.

Diversos autores relataram que, para a manutenção das funções metabólicas dos hepatócitos em cultivo celular, os mesmos necessitam da presença de uma matriz extracelular (DUNN, *et al.*, 1989; SWIFT *et al.*, 2011; DE BRUYN *et al.*, 2013). A ruptura da arquitetura tecidual normal, que ocorre durante o isolamento dos hepatócitos, pode destruir as junções entre os hepatócitos e resultar em uma perda da polaridade celular

normal, fazendo com que os hepatócitos em cultura percam suas funções (ELAUT, *et al.*, 2006). Existem na literatura inúmeros relatos da utilização do colágeno com esta função, sendo que alguns autores utilizaram outros materiais como Matrigel®, colágeno, gelatina ou quitosana, para esta finalidade (ADAY *et al.*, 2011).

A metodologia mais utilizada em cultivos com a presença de matriz extracelular é a de cultivo de hepatócitos entre duas camadas de colágeno, conhecida como cultura de hepatócitos em sanduíche (SCH, do inglês *sandwich-cultured hepatocytes*) que, segundo de BRUYN *et al.* (2013), constitui uma ferramenta única que permite a exploração e previsão, *in vitro*, dos mecanismos básicos realizados pelos hepatócitos, *in vivo*, como a hepatotoxicidade induzida por drogas. Alguns autores destacam que hepatócitos humanos cultivados em monocamada de matriz extracelular podem sofrer desdiferenciação e perder suas funções nas primeiras 24 horas de cultivo, principalmente por uma queda na atividade de enzimas citocromo P-450 (CYP-450) e na secreção de albumina, consideradas marcadores de atividade hepática (DUNN, *et al.*, 1989; SCHYSCHKA, *et al.*, 2013; ZEIGERER, *et al.*, 2017). Além disso, o cultivo em monocamada de substrato pode induzir alteração do citoesqueleto para uma morfologia celular mais achatada. Essa mudança na morfologia celular pode alterar as interações entre as células e a matriz, resultando perda de vias de sinalização necessárias para a função normal dos hepatócitos (GODOY, *et al.*, 2013). Entretanto, o estudo realizado por ADAY *et al.* (2011) utilizando diferentes materiais, como colágeno, gelatina e quitosana, nas duas configurações, monocamada e sanduíche, em que foram avaliadas a viabilidade e a atividade celular dos hepatócitos em cultivo primário, mostrou similaridade entre a monocamada de colágeno e gelatina, sendo estes os tratamentos que apresentaram maior viabilidade celular e atividade mitocondrial.

Os testes que foram realizados nesse trabalho com gelatina e colágeno, ambos utilizados no sistema de sanduíche e também em camada única, não apresentaram diferença quanto à viabilidade celular ao fim do cultivo. Análises morfológicas dos hepatócitos bem como a viabilidade celular e a integridade do RNA foram os parâmetros utilizados para a escolha da conformação em monocamada de gelatina para os cultivos do ensaio. Os hepatócitos cultivados na configuração de sanduíche não apresentaram formação de complexos celulares conforme descrito em literatura. Além disso, o baixo valor de RIN extraído das células cultivadas na gelatina em formato de bicamada sanduíche ($RIN=1,42 \pm 0,58$) não permitiria a realização dos ensaios de análise de expressão gênica.

Sabe-se que a enzima colagenase altera a capacidade oxidativa de hepatócitos após 6 horas em cultivo (TIRMENSTEIN *et al.*, 2000) sendo necessário alguns dias para que essas células se estabilizem novamente. Sendo assim, definida a metodologia de

isolamento e cultivo dos hepatócitos, foram iniciados os ensaios experimentais, nos quais os hepatócitos foram cultivados por 5 dias para estabilização das células e desafiados por 48h com os estímulos experimentais. Após o cultivo foi realizada a extração do RNA para o estudo da expressão gênica, onde todas as amostras apresentaram a concentração de RNA necessária para a realização da síntese de cDNA para os ensaios de qPCR ($295,69 \text{ ng}/\mu\text{L} \pm 159,74$), bem como altos valores de integridade ($\text{RIN}=8,92 \pm 0,53$). Os testes de eficiência foram realizados com um *pool* de cDNA contendo todas as amostras experimentais de forma equimolar. Dos oito *primers* selecionados (*C1*, *C3*, *C4*, *C5*, *MBL*, *AGP*, *SAA* e *HP*), dois não funcionaram nas condições testadas (*C4* e *HP*), apresentando eficiência fora dos padrões necessários para a realização do ensaio apesar da curva de *melting* ter apresentado pico único. Nesse sentido, seriam necessários novos ensaios para ajuste de eficiência de ambos os *primers*, que serão alvo de experimentos futuros dado a baixa disponibilidade de RNA para realização desse ensaio. Os genes *C5*, *AGP* e *MBL* apresentaram valores de eficiência dentro da normalidade, no entanto, foi observada uma amplificação muito tardia, com valores de $\text{Ct} > 33$ (Figura 9). Ensaios com amostras de RNA de tecido fresco, extraídas com a mesma metodologia, demonstraram que o *C5*, *AGP* e *MBL* estavam sendo expressos *in vivo* e, após isolamento e cultivo de hepatócitos, por algum motivo, a expressão desses genes não foi detectável. Neste caso pode-se sugerir que estes genes tenham perdido sua função nos cultivos *in vitro*. Porém não é possível generalizar a perda de função celular para todos os genes, visto que o gene *SAA* continuou sendo expresso frente aos estímulos de controle positivo nos cultivos.

Segundo de Bruyn e colaboradores (2013), hepatócitos em cultivo *in vitro*, apresentam perda de função metabólica entre 75-95%. Não existem relatos acerca da função imunológica, mas os dados de comparação do tecido hepático e hepatócitos bovinos cultivados *in vitro* sugerem perda de função imunológica frente à diminuição da expressão relativa de *C5*, *AGP* e *MBL*. Uma vez que para estabelecimento das condições de reação em tempo real foram utilizados *pools* com quantidade equimolar de todas as amostras de RNA, deverão ser feitos ensaios posteriores para verificar se esse fenômeno equivale realmente a uma perda de função dos hepatócitos derivado do cultivo *in vitro*, ou à oscilação na produção das moléculas analisadas frente aos diferentes estímulos testados. Para tal seria necessária avaliação dos níveis de expressão e produção de moléculas relacionadas com a imunidade inata sem estímulos específicos com tecido hepático, que será alvo de experimentos futuros dado a baixa disponibilidade de RNA para realização desse ensaio.

Avaliando a expressão dos genes *C1*, *C3* e *SAA*, que demonstraram amplificação com eficiência aceitável nas condições testadas em cultivo de hepatócitos bovinos, foi possível verificar que o *SAA* e o *C1* apresentaram aumento significativo de expressão

frente ao estímulo com citocinas pró-inflamatórias (controle positivo do ensaio) em ambos os grupos de animais testados. De acordo com GODSON *et al.* (1995), as citocinas pró inflamatórias IL-1, IL-6 e TNF- α regulam a produção de proteínas de fase aguda em bovinos, no entanto a IL-1 e IL-6 atuam regulando diferentes PFAs quando analisadas separadamente. De acordo com Zhou *et al.* (2016) a SAA é uma importante PFA que pode ter sua concentração sérica aumentada em até mais de 1.000 vezes acima da sua concentração basal em uma inflamação aguda em humanos, e é altamente dependente de IL-1, IL-6 e TNF- α , que ativam a sinalização via STAT3, NF- κ B. Apesar de nossos resultados apontarem o aumento da expressão da SAA e C1 pelos hepatócitos quando estimulados pelas citocinas pró-inflamatórias, o mesmo comportamento não foi observado para o fator do complemento C3, que tem sua expressão regulada pelas mesmas vias que a SAA em humanos (ZHOU, *et al.*, 2016) Em um estudo realizado com linhagem de hepatócitos humanos foi observado um efeito sinérgico da combinação de IL-1 β com IL-6 na secreção de C3 (ANDREWS *et al.*, 2003), corroborando os resultados de FALUS *et al.* (1990) que descreveram um efeito semelhante de IL-1 β e IL-6 combinadas na secreção de C3 pela linhagem de hepatócitos humanos HepG2.

Segundo MORGAN e GASQUE (1997) hepatócitos humanos *in vitro* são capazes de sintetizar C1r e C1s, mas não produzem C1q e, portanto, não podem montar a macromolécula C1 completa. Estes autores sugerem que o aumento dos níveis séricos de C1 em humanos seja ocasionado com a síntese extra-hepática das moléculas C1q por fibroblastos, células epiteliais e por monócitos/macrófagos. Em seres humanos C1q possui outras funções além da tradicional ativação do complemento, como durante a gestação, por exemplo, onde atua no remodelamento da decídua materna. Este fator do complemento exerce atividade também sobre o desenvolvimento embrionário, em processos da cascata de coagulação e em atividades de sinapse neurológica (LUBBERS, *et al.*, 2017), e ainda não é claro o processo de síntese de C1 pelos hepatócitos. Não há na literatura relatos sobre a expressão de C1 pelos hepatócitos bovinos, contudo a diferença na expressão deste gene (Tabela 6 e Anexo 2) sugere que há produção deste fator do complemento pelo fígado de bovinos. Estudos de microarranjo realizados por Carvalho *et al.* (2014) demonstraram que o fator do complemento C1q tem sua expressão aumentada em bovinos infestados pelo carrapato *R. microplus*, portanto a expressão do gene *C1* observada em nosso ensaio sugere que é possível que em bovinos esta proteína seja produzida pelos hepatócitos.

A ausência de modulação da expressão do fator do complemento C3 analisado nesse trabalho frente aos estímulos com o coquetel de citocinas (controle positivo) sugere que as vias moduladoras dessa resposta em bovinos talvez sejam distintas do que é observado em humanos e murinos para o gene C3 (MOGILENKO *et al.*, 2013). Em

conjunto, os dados obtidos nesse trabalho sugerem que os hepatócitos isolados estão respondendo aos estímulos pró-inflamatórios, no entanto são necessárias melhorias nas metodologias para verificar se a ausência de alteração na expressão de C3 estaria relacionada com variações observadas nas vias de sinalização celular que existem entre as espécies monogástricas e ruminantes, ou se poderiam estar ocorrendo frente a uma desestabilização dos hepatócitos nas condições de cultivo *in vitro* desenvolvidas nesse trabalho.

O bloqueio da atividade do sistema complemento é uma atividade importante da saliva de carrapatos ixodídeos (SCHROEDER *et al.*, 2006), além de realizar esta atividade, a saliva de artrópodes hematófagos contém uma variedade de moléculas com propriedades imunomodulatórias, que tem como finalidade subverter o sistema imune de seu hospedeiro e garantir o sucesso em sua alimentação. Bovinos resistentes ao *R. microplus* apresentam maior produção de PFAs e fatores do complemento quando comparados aos susceptíveis, esta diferença de resposta contra o parasito pode estar associada ao metabolismo de lipídeos, que favorece a sinalização celular por vias pró-inflamatórias e se apresentou prejudicada em animais suscetíveis (CARVALHO, *et al.*, 2014). Segundo Carvalho *et al.* (2008) a SAA é uma proteína de fase aguda que tem seus níveis séricos aumentados em resposta a infestação por *R. microplus* em animais resistentes, mas não nos susceptíveis. Como os resultados obtidos neste trabalho foram provenientes de uma população heterogênea não é possível afirmar precisamente o efeito da raça quanto a produção *in vitro* desta proteína de fase aguda

Em busca de um melhor entendimento da ação da saliva do carrapato na expressão de genes relacionados à imunidade inata pelos hepatócitos, foi realizada uma coleta de saliva para ser utilizada como estímulo no cultivo de hepatócitos. Tanto a saliva quanto o inibidor do PPAR α , bem como a associação destas substâncias não diferiram entre si na modulação da expressão dos genes avaliados, somente quando comparados ao controle positivo foi observada diferença na expressão gênica, sendo assim, não foi possível identificar o efeito imunomodulador destas substâncias nos hepatócitos bovinos. Isto sugere que o processo inflamatório provocado pela picada do carrapato possui maior efeito na regulação dos genes relacionados à imunidade inata durante a infestação. Contudo, não podemos descartar a possibilidade de perda de função e alterações nas vias de sinalização dos hepatócitos *in vitro*. Sabe-se que, em camundongos, os ativadores sintéticos do PPAR α regulam negativamente as proteínas de fase aguda (CORTON *et al.*, 1998). Nesse sentido, maiores investigações devem ser feitas para avaliar a participação do PPAR α na resposta de fase aguda já que nesse estudo foi utilizado somente uma concentração do GW-6471 para prospectar efeito sinérgico ou antagônico ao da saliva do *R. microplus*. Serão necessários mais estudos em relação ao

cultivo de hepatócitos bovinos devido às diferenças fisiológicas com mamíferos monogástricos, como humanos e camundongos, principalmente em relação ao aproveitamento de lipídeos como fonte energética que apresenta uma alta atividade reguladora da resposta imune em vertebrados.

7. CONCLUSÕES

Foi estabelecido um protocolo de isolamento e cultivo primário de hepatócitos bovinos que apresentou bons valores de integridade de RNA (>8,0), necessários para a realização de estudos da expressão gênica pela técnica de qPCR. Para melhor compreensão do efeito imunomodulador da saliva do carrapato sobre a expressão de genes ligados à imunidade inata pelos hepatócitos bovinos, *in vitro*, devem ser realizados cultivos que sejam mais bem caracterizados quanto às funções imunomoduladoras.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. H. I. V. **Imunologia celular e molecular**. 7. ed. Elsevier, 2012.
- ACOSTA, D. A., MITCHELL, D. B., SORENSEN, E. M. & BRUCKNER, J. V. **The metabolism and toxicity of xenobiotics in a primary culture system of postnatal rat hepatocytes**. Em *The Isolated Hepatocyte: Use in Toxicology and Xenobiotic Biotransformations*. Academic Press Inc. p.189–214 1987
- ADAY, S.; HASIRCI, N. ; GURHAN, I.D. **A Cost-Effective and Simple Culture Method for Primary Hepatocytes**. *Animal Cells and Systems*, v. 15, n.1, p. 19–27 2011.
- ALLEN J.W.; HASSANEIN T.; BHATIA S. **Advances in bioartificial liver devices**. *Hepatology*. 34: pp. 447-455, 2001
- AMARAL, M. A. **Percepção e atitude dos produtores de leite de Minas Gerais sobre a biologia e controle do carrapato dos bovinos**. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, São Carlos, 2011.
- ANDREOTTI, R.; GUERRERO, F.D.; SOARES, M.A.; BARROS, J.C.; MILLER, R.J.; LÉON, A.P.D. **Acaricide resistance of Rhipicephalus (Boophilus) microplus in State of Mato Grosso do Sul, Brazil**. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.20, p.127-133, 2011.
- ANDREWS, E.; FELDHOFF, P.; FELDHOFF, R.; LASSITER, H. **Comparative Effects of Cytokines and Cytokine Combinations on Complement Component C3 Secretion by HepG2 Cells**. *Cytokine*, v.23, n.6, p.164–69, 2003
- BARRÉ, N., UILENBERG, G. **Spread of parasites transported with their hosts: case study of two species of cattle tick**. *Rev. Sci. Tech.* v.29, p.149–160, 2010.
- BARROS, V. C.; ASSUMPCAO, J.G.; CADETE, A.M.; SANTOS, V.C.; CAVALCANTE, R.R.; ARAUJO, R.N.; PEREIRA, M.H.; GONTIJO, N.F. **The role of salivary and intestinal complement system inhibitors in the midgut protection of triatomines and mosquitoes**. *PLoS One*, v.4, p.6047, 2009.
- BASTIDA-CORCUERA, F.D.; BUTLER, J.E.; YAHIRO, S.; CORBEIL, L.B.; **Differential complement activation by bovine IgG2 allotypes**. *Vet. Immunol. Immunopathol.* v.71, p.115–123, 1999.
- BELFORT, R.; BERRIA, R.; CORNELL, J.; CUSI, K. **Fenofibrate reduces systemic inflammation markers independent of its effects on lipid and glucose metabolism in patients with the metabolic syndrome**. *J Clin Endocrinol Metab.*, v.95, p.829-36, 2010.
- BERRY, M.N.; FRIEND D.S.; **High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study**. *The Journal of Cell Biology*, v.43, n.3, p.506–20, 1969.
- BINNINGTON, K.C.; STONE, B. F. **Distribution of catecholamines in the cattle tick Boophilus microplus**. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v.58, p.21-28. 1977.

- BOWMAN, A.S., DILLWITH, J. W., SAUER, J.R. **Tick salivary prostaglandins: presence, origin and significance.** *Parasitology Today*, v.12, p.388–396, 1996.
- BOWMAN, A.S., SAUER, J. **Tick salivary glands: function, physiology and future.** *Parasitology*, v. 129, n. 07, p. S67, 2005.
- BUSTIN, S.A., BENES, V., NOLAN, T., PFAFFL, M.W.,. **Quantitative real-time RT-PCR—a perspective.** *Journal of Molecular Endocrinology* v. 34, p. 597–601 2005.
- BUSTIN, S.A., NOLAN, T. **Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction.** *Journal of Biomolecular Techniques* v. 15 p. 155–166. 2004.
- BUTLER, J.E.; NAVARRO, P.; HEYERMANN, H. **Heterogeneity of bovine IgG2: comparative specificity of monoclonal and polyclonal capture antibodies for IgG2a (A1) and IgG2a (A2).** *Vet Immunol Immunopathol* v.40, p.119–133, 1994.
- BRAKE D.K., WIKEL S.K., TIDWELL J.P., PÉREZ DE LEÓN A.A. **Rhipicephalus microplus salivary gland molecules induce differential CD86 expression in murine macrophages.** *Parasites & Vectors* v.3, p.103-110 2010.
- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Assessoria de Gestão Estratégica. Valor Bruto da Produção. Janeiro de 2014.
- BROSSARD, M.; WIKEL, S.K. 2004. **Tick immunobiology.** *Parasitology*, v.129, Suppl, S166-S176, 2004.
- BUEHLER P.W., ABRAHAM B., VALLELIAN F., LINNEMAYR C., PEREIRA C.P., CIPOLLO J.F. **Haptoglobin preserves the CD163 hemoglobin scavenger pathway by shielding hemoglobin from peroxidative modification.** *Blood* v.113, p.2578-2586, 2009.
- CARVALHO, W.A.; BECHARA, G.H.; MORÉ D.D.; FERREIRA B.R.; SILVA, J.S.; SANTOS, I.K.F.M. **Rhipicephalus (Boophilus) Microplus: Distinct Acute Phase Proteins Vary during Infestations According to the Genetic Composition of the Bovine Hosts, Bos Taurus and Bos Indicus.** *Experimental Parasitology*, v.118, n.4, p.587–91, 2008
- CARVALHO, W.A.; IANELLA, P.; ARNOLDI, F.G.; CAETANO, A.R.; MARUYAMA, S.R.; FERREIRA, B.R.; CONTI, L.H.; DA SILVA, M.R.; PAULA, J.O.; MAIA, A.A.; SANTOS, I.K. **Haplotypes of the bovine IgG2 heavy gamma chain in tick-resistant and tick-susceptible breeds of cattle** *Immunogenetics.*, v.63(5), p.319-24, 2011.
- CARVALHO, W.A. DOMINGUES, R.; PRATA, M.C.A.; SILVA, M.V.G.B.; OLIVEIRA, G.C.; GUIMARÃES, S.E.F.; MACHADO, M.A. **Microarray Analysis of Tick-Infested Skin in Resistant and Susceptible Cattle Confirms the Role of Inflammatory Pathways in Immune Activation and Larval Rejection.** *Veterinary Parasitology*, v.205, n.1–2, p.307–17, 2014.
- CASTRO, J. **Sustainable tick and tickborne disease control in livestock improvement in developing countries.** *Veterinary Parasitology*, v. 71, n. 2-3, p. 77-97, 1997.

CECILIANI, F.; POCAQUA, V. **The acute phase protein α 1-acid glycoprotein: a model for altered glycosylation during diseases.** *Current Protein and Peptide Science*. v.8 p. 91-108, 2007

CECILIANI F., POCACQUA V., MIRANDA-RIBERA A., BRONZO V., LECCHI C., SARTORELLI P. **Alpha 1-acid glycoprotein modulates apoptosis in bovine monocytes.** *Vet Immunol Immunopathol* v.116, p.145–152, 2007.

CERON J.J., ECKERSALL P.D., MARTYNEZ-SUBIELA S. **Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives.** *Vet Clin Pathol* v.34 p.85–99 2005

CGIAR (Consultative Group on International Agricultural Research). Annual Report, 2002 : **Research for sustainable development - from words to action.** CGIAR, Washington, DC, USA. 61 pp.,2002.

CHINERY, W.A., AYITEY-SMITH, E. **Histamine blocking agent in the salivary gland homogenate of the tick, *Rhipicephalus sanguineus*.** *Nature* v.265, p.366–367, 1977.

CONSTANTINOIU, C.C.; JACKSON, L.A.; JORGENSEN, W.K.; LEW-TABOR, A.E.; PIPER, E.K.; MAYER, D.G.; VENUS, B.; JONSSON, N.N. **Local immune response against larvae of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* cattle** *Int. J. Parasitol.*, v.40, p. 865–875, 2010.

CRAY C, ZAIAS J, ALTMAN NH. **Acute phase response in animals: a review.** *Comp Med*, v.59, p.517-526, 2009.

CORTON, J.C.; FAN, L.Q.; BROWN, S.; ANDERSON, S.P.; BOCOS, C.; CATTLEY, R.C.; MODE, A.; GUSTAFSSON, J.A. **Down-regulation of cytochrome P450 2C family members and positive acute-phase response gene expression by peroxisome proliferator chemicals.** *Mol Pharmacol*, v.54, p. 463-473, 1998.

DALTON, J.P.; MULCAHY, G. **Parasite vaccines a reality?** *Vet. Parasitol.*, v.98, p.149-167, 2001.

DE BRUYN, T.; SAGNIK CHATTERJEE, S.; FATTAH, S., KEEMINK, J.; NICOLAÏ, J.; AUGUSTIJNS, P.; ANNAERT, P. **Sandwich-Cultured Hepatocytes: Utility for in Vitro Exploration of Hepatobiliary Drug Disposition and Drug-Induced Hepatotoxicity.** *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, v.9, n.5, p. 589–616, 2013.

DE LA FUENTE, J.; ALMAZÁN, C.; CANALES, M.; PÉREZ DE LA LASTRA, J.M.; KOCAN, K.M.; WILLADSEN, P. **A ten-year review of commercial vaccine performance for control of tick infestations on cattle.** *Anim Health Res Rev*, v.8,p.23–28, 2007.

DE PAULIS, A.; MONTUORI, N.; PREVETE, N.; FIORENTINO, I.; ROSSI, F.W.; VISCONTI, V.; ROSSI, G.; MARONE, G.; RAGNO, P. **Urokinase Induces Basophil Chemotaxis through a Urokinase Receptor Epitope That Is an Endogenous Ligand for Formyl Peptide Receptor-Like 1 and -Like 2.** *J Immunol*, v.173 (9) p.5739-5748, 2004.

DINARELLO C.A. **Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family.** *Annu Rev Immunol*, v. 27, p.519–550, 2009.

DINO R.; DAVIDSON J. **Prostaglandin and PPAR Control of Immune Cell Function.** *Immunology*, v.105, n.1, p. 20–22, 2002.

DONATO, M.T.; LAHOZ, A.; CASTELL, J.V.; GOMÉZ-LECHÓN, M.J. **Cell lines: a tool for *in vitro* drug metabolism studies.** *Curr Drug Metab.*, v.9, p.1-11, 2008.

DROCHMANS, P.; WANSON, J.C.; MOSSELMANS, R. **Isolation and Subfractionation on Ficoll Gradients of Adult Rat Hepatocytes.** *The Journal of Cell Biology*, v.66, p.1-22, 1975.

DUNKELBERGER, J.R.; SONG, W.C. **Complement and its role in innate and adaptive immune responses.** *Cell Res.* v.20, p.34-50, 2010.

DUNN, J.C.; TOMPKINS, R.G.; YARMUSH, M.L. **Long-term *in vitro* function of adult hepatocytes in a collagen sandwich configuration.** *Biotechnol Prog.*, v.7, p.237-245, 1991.

DUNN J.C.; YARMUSH M.L.; KOEBE H.G.; TOMPKINS R.G. **Hepatocyte function and extracellular matrix geometry: long-term culture in a sandwich configuration.** *FASEB J.* 3: pp.174-177, 1989.

ECKERSALL, P.D., BELL, R. **Acute phase proteins: Biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine.** *The Veterinary Journal*, v.185, p. 23-27, 2010.

ECKERSALL, P.D., YOUNG, F.J., MCCOMB, C., HOGARTH, C.J., SAFI, S., WEBER, A., MCDONALD, T., NOLAN, A.M. & FITZPATRICK, J.L. **Acute phase proteins in serum and milk from dairy cows with clinical mastitis.** *Veterinary Record*, v.148, p.35-41, 2001.

EDER C. **Mechanisms of interleukin-1beta release.** *Immunobiology*, v.214 p.543–553, 2009.

EHRHARDT, S.; SCHMICKE, M. **Isolation and cultivation of adult primary bovine hepatocytes from abattoir derived liver.** *EXCLI Journal*, v.15, p.858-866, 2016.

EMPRESA BRASILEIRA DE AGRICULTURA E PECUÁRIA (EMBRAPA). **Goiás lança campanha de controle de carrapato bovino.** Disponível em: <http://www.agronline.com.br/agronoticias/noticia.php?id=1632>. Acesso em: 23/06/2016.

ESTRADA-PEÑA, A., BOUATTOUR, A., CAMICAS, J. L., GUGLIELMONE, A., HORAK, I., JONGEJAN, F. **The known distribution and ecological preferences of the tick subgenus *Boophilus* (Acari: Ixodidae) in Africa and Latin America.** *Exp. Appl. Acarol.* V.38, p.219–235, 2006

ELAUT, G.; HENKENS, T.; PAPELEU P.; SNYKERS, S.; VINKEN, M.; VANHAECKE, T.; ROGIERS, V. **Molecular Mechanisms Underlying the Dedifferentiation Process of Isolated Hepatocytes and Their Cultures.** *Current Drug Metabolism*, v.7, n.6, p.629–60, 2006

FALUS A. ROKITA H., WALCZ E. BROZIK M. HIDVÉGI T. MERÉTEY K. **Regulation of complement biosynthesis by tissue-specific and hormonal factors** *Immunol Lett*, v.24, p.227-230, 1990

FARIAS, N. A. R. **Diagnóstico e controle da tristeza parasitária bovina,** Guaíba: Agropecuária, 1995.

FERNANDES, E. K. K.; ANGELO, I. C.; RANGEL, D. E.N.; BAHIENSE, T. C.; MORAES, A.M.; ROBERTS, D. W.; BITTENCOURT, V. R. **An intensive search for promising**

fungal biological control agents of ticks, particularly *Rhipicephalus microplus*. *Vet Parasitol*, vol. 182, p. 307–318, 2011.

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

FLEIGE, S.; WALF, V.; HUCH, S.; PRGOMET, C.; SEHM, J.; PFAFFL, M.W. **Comparison of relative mRNA quantification models and the impact of RNA integrity in quantitative real-time RT-PCR.** *Biotechnol Lett*, v.28, p.1601-1613, 2006.

FRANCISCHETTI, I.; SA-NUNES A.; MANS B. J.; SANTOS I. M.; RIBEIRO J. M. **The role of saliva in tick feeding.** *Frontiers in Bioscience*, n. 14, p. 2051, 2009.

FRANCO, P.F., SILVA N.C.S., DO VALE V.F., ABREU J.F., SANTOS V.C., GONTIJO N.F., VALENZUELA J.G., PEREIRA M.H., SANT'ANNA M.R.V., GOMES A.P.S., ARAUJO R.N. **Inhibition of the Classical Pathway of the Complement System by Saliva of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae).** *Experimental Parasitology*, v.164, p.91–96, 2016.

FRANTA, Z.; FRANTOVÁ, H.; KONVIČKOVÁ, J.; HORN, M.; SOJKA, D.; MAREŠ, M.; KOPÁČEK, P.. **Dynamics of digestive proteolytic system during blood feeding of the hard tick *Ixodes ricinus*.** *Parasites Vectors*, v. 3, n. 1, p. 119, 2010.

FRISCH, J.E. **Towards a permanent solution for controlling cattle ticks.** *International Journal for Parasitology*, v.29, p. 57–71, 1999.

FRUCHART, J.C. **Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (PPAR α): At the crossroads of obesity, diabetes and cardiovascular disease.** *Atherosclerosis*, v.205, p.1-8, 2009.

FURLONG, J. **Controle do carrapato dos bovinos na região Sudeste do Brasil.** *Caderno Técnico da Escola de Veterinária UFMG*, Belo Horizonte, n.8, p.49-61, 1993.

FURLONG, J.; MARTINS, J. R.; PRATA, M. **Controle estratégico do carrapato bovino.** *A hora veterinária, Porto Alegre*, v. 23, n. 137, p. 53-56, 2004.

GAO, B., WON-IL J., ZHIGANG T. **Liver: An Organ with Predominant Innate Immunity.** *Hepatology*, vol. 47, n.2, p. 729–36, 2007.

GODOY, P. **Extracellular matrix modulates sensitivity of hepatocytes to fibroblastoid dedifferentiation and transforming growth factor beta-induced apoptosis.** *J. Hepatol.* v.49, p.2031–2043, 2009.

GODOY, P, *et al.* **Recent Advances in 2D and 3D in Vitro Systems Using Primary Hepatocytes, Alternative Hepatocyte Sources and Non-Parenchymal Liver Cells and Their Use in Investigating Mechanisms of Hepatotoxicity, Cell Signaling and ADME.** *Archives of Toxicology*, v. 87, n.8, p.1315–530, 2013.

GODSON, D.L.; BACA-ESTRADA, M.E.; VAN KESSEL, A.G.; HUGHES, M.; MORSY, A.; VAN DONKERSGOED, J.; HARLAND, R.J.; BABIUK, L.A. **Regulation of bovine acute phase responses by recombinant interleukin- 1 β .** *Can J Vet Res*; v.59, p.249-255, 1995.

GONZALES, J.C. **O carrapato do boi: vida, resistência e controle.** *São Paulo: Mestre Jou*, p. 101, 1974.

- GONZALES, J.C. **O controle dos carrapatos dos bovinos.** *Porto Alegre: Sulina*, p.104, 1975.
- GRIPON, P.; RUMIN, S.; URBAN, S.; LE SEYEC, J.; GLAISE, D.; CANNIE, I.; GUYOMARD, C.; LUCAS, J.; TREPO, C.; GUGUEN-GUILLOUZO, C. **Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus.** *Proc Natl Acad Sci USA*, v.99, p.15655-60, 2002.
- GRISI, L., MASSARD, C.L., MOYA BORJA, G.E., PEREIRA, J.B. **Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil.** *Hora Vet.*, v.21, p.8-10, 2002.
- GRISHAM, J.W. **Use of hepatic cell cultures to detect and evaluate the mechanisms of action of toxic chemicals.** *Int J Clin Exp Pathol*, v.20, p.123–210 1979
- GRUYS, E.; TOUSSAINT, M. J. M.; NIEWOLD, T. A.; KOOPMANS, S. J. **Acute phase reaction and acute phase proteins .** *Journal of Zhejiang University. Science. B*, v.6(11), p.1045–1056, 2005.
- GUERRERO, F.; MILLER, R.; LEÓN, A. **Cattle tick vaccines: Many candidate antigens, but will a commercially viable product emerge?** *International Journal for Parasitology*, v. 42, n. 5, p. 421-427, 2012.
- GUERRERO, F.D.; LOVIS, L.; MARTINS, J.R. **Acaricide resistance mechanisms in *Rhipicephalus microplus*.** *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v.21, p.1-6, 2012.
- GWAKISA, P., YOSHIHARA, K., TO, T.L., GOTOH, H., AMANO, F. MOMOTANI, E. **Salivary gland extract of *Rhipicephalus appendiculatus* ticks inhibits in vitro transcription and secretion of cytokines and production of nitric oxide by LPS-stimulated JA-4 cells.** *Veterinary Parasitology*, v.99, p.53–61, 2001.
- HAAS, P.J. & VAN STRIJP, J. **Anaphylatoxins: their role in bacterial infection and inflammation.** *Immunol. Res.* v.37, p.161–175 2007.
- HAJISHENGALLIS, G.; LAMBRIS, J. **Crosstalk pathways between Toll-like receptors and the complement system.** *Trends in Immunology*, v. 31, n. 4, p. 154-163, 2010.
- HAJNICKÁ , V., KOCÁ KOVÁ , P., SLÁ VIKOVÁ , M., SLOVÁ K, M., GASPERÍK, J., FUCHSBERGER, N., NUTTALL, P. A. **Anti-interleukin-8 activity of tick salivary gland extracts.** *Parasite Immunology* v.23, p.483–489, 2001.
- HARRIS, S.G., PADILLA, J., KOUMAS, L., RAY, D., PHIPPS, R.P.. **Prostaglandins as modulators of immunity.** *Trends in Immunology* v.23, p.144–150, 2002.
- HEYERMANN, H., AND BUTLER, J. E. **The heterogeneity of bovine IgG2— IV. Structural differences between IgG2a molecules of the A1 and A2 allotypes.** *Mol. Immunol.* V.24, p.1327–1334, 1987.
- HIGA, L. O. S.; GARCIA, M. V.; BARROS, J. C.; KOLLER, W. W.; ANDREOTTI, R. **Acaricide Resistance Status of the *Rhipicephalus microplus* in Brazil: A Literature Overview.** *Med chem.*, v.5, p.326-333, 2015.
- HOCHEPIED, T.; BERGER, F.; BAUMANN, H.; LIBERT, C. **Alpha(1)-Acid glycoprotein: an acute phase protein with inflammatory and immunomodulating properties.** *Cytokine & growth factor reviews*, v.14(1), p.25–34, 2003.

HORADAGODA N.U., KNOX K.M.G., GIBBS H.A., REID S.W.J., HORADAGODA A. EDWARDS S.E.R. **Acute phase proteins in cattle: discrimination between acute and chronic inflammation.** *Veterinary Record* v.144, p.437-441, 1999.

HOVIUS, J. **Spitting image: Tick saliva assists the causative agent of lyme disease in evading host skin's innate immune response.** *Journal of Investigative Dermatology*, v. 129, n. 10, p. 2337-2339, 2009.

INOKUMA, H.; KEMP, D.; WILLADSEN, P. **Prostaglandin E2 production by the cattle tick (*Boophilus microplus*) into feeding sites and its effect on the response of bovine mononuclear cells to mitogen.** *Veterinary Parasitology*, v. 53, n. 3-4, p. 293-299, 1994.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE), 2014. Disponível em <http://www.ibge.gov.br>. Acesso em: 24/08/2017.

ISRAILI Z.H., DAYTON P.G. **Human alpha-1-glycoprotein and its interactions with drugs.** *Drug Metab Rev* v.33, p.161-235, 2001.

JAWORSKI, D.C., JASINSKAS, A., METZ, C.N., BUCALA, R., BARBOUR, A.G. **Identification and characterization of a homologue of the pro-inflammatory cytokine macrophage migration inhibitory factor in the tick, *Amblyomma americanum*.** *Insect Molecular Biology*, v.10, p.323–331, 2001.

JIANG, Q.D.; LI, H.P.; LIU, F.J.; WANG, X.J.; GUO, Y.J.; WANG, L.F.; LU, W.F.; LI, H.J.; LI, X.P.; YANG, G.Y. **Isolation and identification of bovine primary hepatocytes.** *Genet. Mol. Res.*, v.12 (4), p.5186-5194, 2013.

KAUFMAN, W. R. **Actions of some transmitters and their antagonists on salivary secretion in a tick.** *American Journal of Parasitology*, v.235 (1978), pp. 76-81, 1978.

KAZIMIROVA, M. STIBRANIOVA, I. **Tick salivary compounds: their role in modulation of host defences and pathogen transmission.** *Front. Cell. Infect. Microbiol*, v.3, 2013.

KERR, R.; FRISCH, J.; KINGHORN, B. **Evidence for a major gene for tick resistance in cattle** *Proceedings of the 5th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Guelph, Ontario*, v. 20, p. 265–268, 1994.

KIMBRELL, D. A.; BEUTLER, B. **The evolution and genetics of innate immunity.** *Nature Reviews Genetics*, v.2(4), p.256-267, 2001.

KOCAN, K.M. **Targeting ticks for control of selected haemoparasitic diseases of cattle.** *Veterinary Parasitology*. v.57, p.121-151, 1995.

KOPECKY, J., KUTHEJLOVA, M. **Suppressive effect of *Ixodes ricinus* salivary gland extract on mechanisms of natural immunity in vitro.** *Parasite Immunology*, v.20, p.169–174, 1998.

KOTÁL, J.; LANGHANSOVÁ, H.; LIESKOVSKÁ, J.; ANDERSEN J.F.; FRANCISCHETTI I.M.; CHAVAKIS, T.; KOPECKÝ, J.; PEDRA J.H.; KOTSYFAKIS, M.; CHMELARŮ, J. **Modulation of Host Immunity by Tick Saliva.** *Journal of Proteomics*, v.128, p. 58–68, 2015.

- KRAVCHENKO, L.; PETRENKO, A.; SHANINA, I.; FULLER, B. **A Simple Non-enzymatic Method for the Isolation of High Yields of Functional Rat Hepatocytes.** *Cell Biology international*, v.26, p.1003-1006, 2002.
- KUBES, M., KOCAKOVA, P., SLOVAK, M., SLAVIKOVA, M., FUCHSBERGER, N., NUTTALL, P.A. **Heterogeneity in the effect of different ixodid tick species on natural killer cell activity.** *Parasite Immunology* v.24, p.23–28, 2002.
- KUTHEJLOVA, M., KOPECKY, J., STEPANOVA, G. & MACELA, A. **Tick salivary gland extract inhibits killing of *Borrelia afzelli* spirochetes by mouse macrophages.** *Infection and Immunity* v.69, p.575–578, 2001.
- LAWRIE, C.H., RANDOLPH, S.E., NUTTALL, P.A. **Ixodes ticks: serum species sensitivity of anticomplement activity.** *Experimental Parasitology* v.93, p.207–214 1999
- LE, Y.; OPPENHEIM, J.J.; WANG, J.M. **Pleiotropic roles of formyl peptide receptors.** *Cytokine Growth Factor Reviews*, v.12, p.91-105, 2001.
- LEE, D.G.; AHSAN, N.; LEE, S.H.; KANG, K.Y.; BAHK, J.D.; LEE, I.J.; LEE, B.H. **A proteomic approach in analyzing heat-responsive proteins in rice leaves.** *Proteomics*, v.7, p.3369-3380, 2007.
- LIM S.K., KIM H., LIM S.K., BIN ALI A., LIM Y.K., WANG Y., CHONG S.M., COSTANTINI F., BAUMMAN H. **Increased susceptibility in Hp knockout mice during acute hemolysis.** *Blood* v.92, p.1870-1877, 1998.
- LIVAK K.J.; SCHMITTGENT T.D. **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and 2- $\Delta\Delta$ CT method.** *Methods* v.25: p.402–408, 2001.
- LUBBERS, R.; VAN ESSEN, M. F.; VAN KOOTEN, C.; TROUW L. A. **Production of Complement Components by Cells of the Immune System: Production of Complement Components.** *Clinical & Experimental Immunology*, v.188, n.2, p.183–194, 2017.
- MACALUSO, K. R. & WIKEL, S. K. **Dermacentor andersoni: effects of repeated infestations on lymphocyte proliferation, cytokine production, and adhesionmolecule expression by BALB/c mice.** *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, v.95, p.413–427, 2001.
- MALARKEY, D.E.; JOHNSON, K.; RYAN, L.; BOORMAN, G.; MARONPOT, R.R. **New Insights into Functional Aspects of Liver Morphology.** *Toxicol Pathol.*, v.33, p.27-34, 2005.
- MCGREGOR, P. **Cattle ticks: Primefacts.** 2010. Disponível em: www.dpi.nsw.gov.au/__data/assets/pdf_file/0004/51781/Cattle-ticks.pdf. Acesso em: 24/08/2017
- MEGAW, M.W.J.; ROBERTSON, H.A. **Dopamine and Noradrenaline in the Salivary Glands and Brain of the Tick, *Boophilus Microplus*: Effect of Reserpine.** *Experientia*, v.30, n.11, p. 1261–62, 1974.
- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), 2015. Disponível em: www.agricultura.gov.br/noticias/valor-bruto-da-producao-agropecuaria-bate-recorde-em-2015/valor-bruto-producao.xlsx. Acesso em: 24/08/2017.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), 2015. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/bovinos-e-bubalinos>. Acesso em: 24/08/2017.

MOGILENKO, D.A.; KUDRIAVTSEV, I.V.; SHAVVA, V.S.; DIZHE, E.B.; VILENSKAYA, E.G.; EFREMOV, A.M.; PEREVOZCHIKOV, A.P.; ORLOV, S.V. **Peroxisome proliferator-activated receptor α positively regulates complement C3 expression but inhibits tumor necrosis factor α mediated activation of C3 gene in mammalian hepatic-derived cells.** *J Biol Chem.*, v.288, p.1726-38, 2013.

MORAIS, F.V.; MOLINA, H.M.; BORGES, D.R.; KOUYOUMDJIAN, M. **Enzima inativadora de bradicinina liberada de fígado preservado ex-vivo.** Revista da Associação Médica Brasileira, v. 45, n. 1, p. 19-23, 1999

MORGAN, B.P.; P. GASQUE. **Extrahepatic Complement Biosynthesis: Where, When and Why?** *Clinical and Experimental Immunology*, v.107, n.1,p. 1–7, 1997.

MOSCATO, S.; MATTII, L.; D'ALESSANDRO, D.; CASCONI, M.G.; LAZZERI, L. SERINO, L.P.; DOLFI, A.; BERNARDINI, N. **Interaction of human gingival fibroblasts with PVA/gelatine sponges.** *Micron*. 39, pp.569 579, 2008.

NODAR, E.F.; ROMA, G.C.; FURQUIM, K. C. S.; BECHARA, G. H.; MATHIAS, M. I. C. **Cytotoxic effects of permethrin in salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) semi-engorged females.** *Experimental Parasitology*, v.128, n.2, p.151–158, 2011.

NUNN, M. A.; SHARMA, A.; PAESEN, G. C.; ADAMSON, S.; LISSINA, O.; WILLIS, A. C.; NUTTALL, P. A. **Complement inhibitor of C5 activation from the soft tick *Ornithodoros moubata*.** *J. Immunol.*, v.174, p.2048-2091, 2005.

OLIVEIRA, C.J.; ANATRIELLO, E.; MIRANDA-SANTOS, I.K.; FRANCISCHETTI, I.M.; SÁ-NUNES, A.; FERREIRA, B.R.; RIBEIRO, J.M.C. **Proteome of *Rhipicephalus sanguineus* tick saliva induced by the secretagogues pilocarpine and dopamine.** *Ticks and Tick-borne Diseases*, v. 4, n. 6, p. 469-477, 2013.

OSYPIW, J.C.; ALLEN, R.L.; BILLINGTON, D. **Subpopulations of rat hepatocytes separated by Percoll density-gradient centrifugation show characteristics consistent with different acinar locations.** *Biochem J.*, v.304, p.617-624, 1994.

PAESEN, G.C., ADAMS, P.L., HARLOS, K., NUTTALL, P.A., STUART, D.I. **Tick histamine-binding proteins: isolation, cloning, and three-dimensional structure.** *Molecular Cell*, v.3, p.661–671, 1999.

PAINE, S. H., KEMP, D. H. & ALLEN, J. R. **In vitro feeding of *Dermacentor andersoni* (Stiles): effects of histamine and other mediators.** *Parasitology*, v.86, p,419–428, 1983.

PANDA, S.; BISHT, S.; MALAKAR, D.; MOHANTY, A.K.; JAI, K.K. **In vitro culture of functionally active buffalo hepatocytes isolated by using a simplified manual perfusion method.** *PLoS ONE* 10 (3): e0118841, 2015.

PARIZI, L.; SABADIN G.A.; ALZUGARAY, M.F.; SEIXAS A.; LOGULLO, C.; KONNAI, S.; OHASHI, K.; MASUDA, A.; VAZ, I.S. ***Rhipicephalus microplus* and *Ixodes ovatus* cystatins in tick blood digestion and evasion of host immune response.** *Parasites & Vectors*, v. 8, n. 1, p. 122, 2015.

- PATARROYO, J.H.; PORTELA, R.W.; DE CASTRO, R.O.; COUTO-PIMENTEL, J.; GUZMAN, F.; PATARROYO, M.E.; VARGAS, M.I.; PRATES, A.A.; MENDES, M.A.D. **Immunization of cattle with synthetic peptides derived from the *Boophilus microplus* gut protein (Bm86)** *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.88, p.163–172, 2002.
- PEREZ-NOVO, C.A., CLAEYS, C., SPELEMAN, F., CAUWENBERGE, P.V., BACHERT, C., VANDESOMPELE, J. **Impact of RNA quality on reference gene expression stability.** *Biotechniques* v. 39, p. 52–56 2005.
- PFAFFL, M.W. **Quantification strategies in real-time PCR.** *International University Line*, chapter 3, p. 87-112, 2004
- PHILIPPIDIS P., MASON J.C., EVANS B.J., NADRA I., TAYLOR K.M. HASKARD D.O. **Hemoglobin scavenger receptor CD163 mediates interleukin-10 release and heme oxygenase-1 synthesis-antiinflammatory monocyte-macrophage responses in vitro, in resolving skin blisters in vivo and after cardiopulmonary bypass surgery.** *Circ Res* v.94 p.119-126, 2004.
- POOLE, N. M., MAMIDANNA, G., SMITH, R. A., COONS, L. B. E COLE, J. A. **Prostaglandin E2 in tick saliva regulates macrophage cell migration and cytokine profile.** *Parasites & Vectors*, v. 6, n. 1, p. 261, 2013.
- PRUETT, J. **Immunological control of arthropod ectoparasites - A review.** *International Journal for Parasitology*, v. 29, n. 1, p. 25-32, 1999.
- PYÖRÄLÄ, S. **Hirvonen's thesis on acute phase response in dairy cattle**, University of Helsinki, ISBN 951-45-9104-6, Helsinki, Finland, 2000.
- RACANELLI V.; REHERMANN B. **The liver as an immunological organ.** *Hepatology*, n.43, n. S1, p.S54-62, 2006.
- QIN, X.; GAO, B. **The complement system in liver diseases.** *Cell Mol Immunol.*, v.3, p.333–340, 2006.
- RAKSHSHANDEHROO, M.; STIENSTRA, R.; WIT, N.J.,E.; BRAGT, M.C.; HALUZIK, M.; MENSINK, R.P.; MÜLLER, M.; KERSTEN, S. **Plasma mannose-binding lectin is stimulated by PPAR α in humans.** *Am J Physiol Endocrinol Metab.*, v.302(5), p.595-602, 2012.
- RAMACHANDRA, R.N., WIKEL, S.K. **Modulation of host-immune responses by ticks (Acari: Ixodidae): effect of salivary gland extracts on host macrophages and lymphocyte cytokine production.** *Journal of Medical Entomology*, v.29, p.818–826, 1992.
- RIBEIRO, J.M.C. **Role of saliva in blood-feeding by arthropods.** *Annual Review of Entomology* v.32, p.463–478 1987.
- RIBEIRO, J. M.C.; MAKOUL, G. T.; LEVINE, J.; ROBINSON, D. R.; SPIELMAN, A. **Antihemostatic, antiinflammatory, and immunosuppressive properties of the saliva of a tick, *Ixodes dammini*.** *J. Exp. Med.*, v.161, p.332-344, 1985.
- RIBEIRO, J.M.C.; SPIELMAN, A. ***Ixodes dammini*: salivary anaphilatoxin inactivating activity.** *Exp. Parasitol.*, v.62, p.292-297, 1986.

RINALDI M., CECILIANI F., LECCHI C., MORONI P., BANNERMAN D.D. **Differential effects of alpha 1-acid glycoprotein on bovine neutrophil respiratory burst activity and IL-8 production.** *Vet Immunol Immunopathol* v.126 p.199-210 2008

RODRÍGUEZ-VIVAS, R.I.; Rivas A. L.; Chowell G.; Fragoso S. H.; Rosario C.R.; García Z.; Smith S. D.; Williams J. J.; Schwager S. J.; **Spatial distribution of acaricide profiles (Boophilus microplus strains susceptible or resistant to acaricides) in southeastern Mexico.** *Veterinary Parasitology*, v. 146, n. 1-2, p. 158-169, 2007.

RODRÍGUEZ, M.; MASSARD, C.L.; FONSECA, A.H.; RAMOS, N.F.; MACHADO, H.; LABARTA, V.; DE LA FUENTE, J. **Effect of vaccination with a recombinant Bm86 antigen preparation on natural infestations of Boophilus microplus in grazing dairy and beef pure and cross-bred cattle in Brazil.** *Vaccine*, v.13, p.1804-8,1995.

ROGERS-BROADWAY, K. R.; KARTERIS, E. **Amplification efficiency and thermal stability of qPCR instrumentation: Current landscape and future perspectives.** *Experimental and therapeutic medicine*, v.10, p.1261-1264, 2015.

ROJKIND, M.; GATMAITAN, Z.; MACKENSEN, S.; GIAMBRONE, M.A.; PONCE, P.; REID, L.M.; **Connective tissue biomatrix: its isolation and utilization for long-term cultures of normal rat hepatocytes.** *J. Cell Biol.* v.87, p.255–263, 1980.

ROTHER R.P., BELL L., HILLMEN P., GLADWIN M.T. **The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin — a novel mechanism of human disease.** *JAMA* v.293, p.1653-1662, 2005.

SANGAMNATDEJ, S., PAESEN, G. C., SLOVAK, M., NUTTALL, P. A.. **A high affinity serotonin- and histamine binding lipocalin from tick saliva.** *Insect Molecular Biology*, v.11, p.79–86, 2002.

SEGLER, P. O. **Preparation of isolated rat liver cells.** *Methods Cell Biol.*, v.13, p.29-83, 1976.

SCHAER C.A.; SCHOEDON G.; IMHOF A.; KURRER M.O.; SCHAER D.J. **Constitutive endocytosis of CD163 mediates hemoglobin-heme uptake and determines the noninflammatory and protective transcriptional response of macrophages to hemoglobin.** *Circ Res* v.99, p.943-950, 2006

SHEN, L.; HILLEBRAND, A.; WANG, D. K. H.; LIU, M. **Isolation and Primary Culture of Rat Hepatic Cells.** *J Vis Exp.*, v. 64, p.3917, 2012.

SCHOELER, G. B. ; WIKEL, S. K. **Modulation of host immunity by haematophagous arthropods.** *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, v.95, p.755–771, 2001.

SCHOOR, O.; WEINSCHENK, T.; HENNENLOTTER, J.; CORVIN, S.; STENZL, A.; RAMMENSEE, H.G.; STEVANOVIC, S. **Moderate degradation does not preclude microarray analysis of small amounts of RNA.** *BioTechniques* v. 35, p. 1192–1201. 2003.

SCHROEDER, A.; MUELLER, O.; STOCKER, S.; SALOWSKY, R.; LEIBER, M.; GASSMANN, M.; LIGHTFOOT, S.; MENZEL, W.; GRANZOW, M.; RAGG, T. **The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements.** *BMC Mol Biol*, v.31, 2006.

SCHYSCHKA L.; SÁNCHEZ J.J.; WANG Z.; BURKHARDT B.; MÜLLER-VIEIRA U.; ZEILINGER K.; BACHMANN A.; NADALIN S.; DAMM G.; NUSSLER A.K. **Hepatic 3D Cultures but Not 2D Cultures Preserve Specific Transporter Activity for Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity.** *Archives of Toxicology*, v.87, n.8, p. 1581–93, 2013.

SEVERGNINI, M.; SHERMAN, J.; SEHGAL, A.; JAYAPRAKASH, N.K.; AUBIN, J.; WANG, G.; ZHANG, L.; PENG, C.G.; YUCIUS, K.; BUTLER, J.; FITZGERALD, K. **A rapid two-step method for isolation of functional primary mouse hepatocytes: cell characterization and asialoglycoprotein receptor based assay development.** *Cytotechnology*, v.64, p. 187-195, 2012.

SHELDON I.M., NOAKES D.E., RYCROFT A. DOBSON H () **Acute phase protein responses to uterine bacterial contamination in cattle after calving.** *Veterinary Record* v.148, p.172-175, 2001.

SHRI, M.; AGRAWAL, H.; RANI, P.; SINGH, D.; ONTERU, S.K. **Hanging Drop, A Best Three-Dimensional (3D) Culture Method for Primary Buffalo and Sheep Hepatocytes.** *Scientific Reports*, v 7, n.1, 2017.

SHULL L.R., KIRCH D.G., LOHSE C.L., WISNIEWSKI J.A. **Application of isolated hepatocytes to studies of drug metabolism in large food animals.** *Xenobiotica*, v. 17, p.345–363, 1987.

SILVA N. C.; VALE V. F.; FRANCO P. F.; GONTIJO N. F.; VALENZUELA J. G.; PEREIRA M. H.; SANT'ANNA M. R.; RODRIGUES D. S.; LIMA W.S.; FUX B.; ARAUJO R. N.; **Saliva of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) inhibits classical and alternative complement pathways.** *Parasites Vectors*, v. 9, n. 1, 2016.

SOARES, A.C., CARVALHO-TAVARES, J., GONTIJO, N. DE F., DOS SANTOS, V.C., TEIXEIRA, M.M., PEREIRA, M.H.,. **Salivation pattern of *Rhodnius prolixus* (Reduviidae; Triatominae) in mouse skin.** *J. Insect Physiol.* v.52, p.468-472, 2006.

SPOTORNO, V. G.; HIDALGO, A.; BARBICJ, M.; LORENTI, A.; ZABAL, O. **Culture of bovine hepatocytes: a non-perfusion technique for cell isolation.** *Cytotechnology*, v.51(2), p.51-6, 2006.

STEEL, D.M., WHITEHEAD, A.S. **The major acute phase reactants: C-reactive protein, serum amyloid P component and serum amyloid A protein.** *Immunology Today*, v.15, p.81-88, 1994.

SUFFREDINI A.F.; FANTUZZI G.; BADOLATO R., OPPENHEIM J.J.; O'GRADY N.P. **New insights into the biology of the acute phase response.** *Journal Clinical of Immunology*, v.19, p.203-214, 1999

SUTHERST, R. W.; BOURNE, A. S. **The effect of desiccation and low temperature on the viability of eggs and emerging larvae of the tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini) (Ixodidae)** *Int. J. Parasitol.*, v.36, p. 193–200, 2006.

TABOR A.E.; ALI A.; REHMAN G.; ROCHA GARCIA G.; ZANGIROLAMO A.F.; MALARDO T.; JONSSON N.N. **Cattle Tick *Rhipicephalus microplus*-Host Interface: A Review of Resistant and Susceptible Host Responses.** *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v.7:506, 2017.

- TATCHELL, R.J. **A modified method for obtaining tick oral secretion.** *Journal of Parasitology*, v.53, p. 1106-7, 1967.
- TAVARES V.; HIRATA M.H.; HIRATA R.D. **Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma): molecular study in glucose homeostasis, lipid metabolism and therapeutic.** *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2007;51:526–533
- TIRMENSTEIN, M.A.; NICHOLLS-GRZEMSKI, F.A.; SCHMITTGEN, T.D.; ZAKRAJSEK, B.A.; FARISS, M.W. **Characterization of nitric oxide production following isolation of rat hepatocytes.** *Toxicol Sci.*, v.53, p.56-62, 2000.
- TIRLONI, L.; RECK, J.; TERRA, R.M.S.; MARTINS, J.R.; MULENGA, A.; SHERMAN, N.E.; FOX, J.W.; YATES, J.R.; TERMIGNONI, C.; PINTO, A.F.M.; VAZ, I.S. **Proteomic Analysis of Cattle Tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* Saliva: A Comparison between Partially and Fully Engorged Females.** *Plos One*, v.9, 2014.
- TONG, J.Z., DE LAGUSIE, A., FURLAN V., CRESTEIL T., BERNARD O., ALVAREZ, F. **Long-term culture of adult rat hepatocyte spheroids.** *Exp Cell Res.* v.200, p.326–332, 1992.
- TÓTHOVÁ, CSILLA, OSKAR NAGY, HERBERT SEIDEL AND GABRIEL KOVÁČ **Acute Phase Proteins as Markers of Diseases in Farm Animals.** *Acute Phase Proteins as Early Non-Specific Biomarkers of Human and Veterinary Diseases*, organizado por Francisco Veas, InTech, 2011.
- TSUTSUMII-ISHII, Y.; NAGAOKA, I. **NF- κ B-mediated transcriptional regulation of human β -defensin-2 gene following lipopolysaccharide stimulation.** *J. Leukocyte Biol.*, v.71, p.154-162, 2002
- TUNIN, K.P.; PACKER, I.U.; SILVA, M.V.G.B.; REGITANO, L.C.A.; COUTINHO, L.L.; VERNEQUE, R.S.; MACHADO, M.A.; MARTINEZ, M.L. **Mapeamento de QTL para resistência a carrapatos no cromossomo 23 de bovinos (BTA23).** *53º Congresso Brasileiro de Genética*, Águas de Lindoia, São Paulo, 2007.
- URIOSTE, S., HALL, L.R., TELFORD, S.R., TITUS, R.G. **Saliva of the Lyme disease vector, *Ixodes dammini*, blocks cell activation by a nonprostaglandin E2-dependent mechanism.** *Journal of Experimental Medicine*, v.180, p.1077–1085, 1994.
- UTECH, K.B.W., WHARTON, R.H., KERR, D.J. **Resistance to *B. microplus* (Canestrini) in different breeds of cattle.** *Australian Journal Agricultural Research*, East Melbourne, v.29, n.4, p.885-95, 1978.
- VALENZUELA, J. G.; CHARLAB, R.; MATHER, T. N.; RIBEIRO, J. M. C. **Purification, Cloning, and Expression of a Novel Salivary Anticomplement Protein from the Tick, *Ixodes scapularis*.** *Journal of Biological Chemistry*, v.275, p. 18717-23, 2000.
- VAN DER WESTHUYZEN D.R., CAI, L., DE BEER M. C., DE BEER F.C. **Serum Amyloid A Promotes Cholesterol Efflux Mediated by Scavenger Receptor B-I.** *Journal of Biological Chemistry*, v.280, n.43, p.35890–35895, 2005.
- VAN LOOKEREN CAMPAGNE, M., WIESMANN, C., BROWN, J. **Macrophage complement receptors and pathogen clearance.** *Cell. Microbiol.* v.9, p.2095–2102 2007.

- VANDESOMPELE, J.; PRETER, K.D.; PATTYN, F.; POPPE, B.; ROY, N.V.; PAEPE, A.D.; SPELEMAN, F. **Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes.** *Genome Biology*, v.3, 2002.
- VAZ, J.R.; MARTINEZ, R.H.; OLIVEIRA, A.; HECK, A.; LOOGULLO, C.; GONZALES, J.C.; DEWES, H.; MASUDA, A. **Functional bovine immunoglobulins in *Boophilus microplus* hemolymph.** *Vet. Parasitol*, v.62, p.155-160, 1996.
- Watanabe M.; Zemack H.; Johansson H.; Hagbard L.; Jorns C.; Li M. **Maintenance of Hepatic Functions in Primary Human Hepatocytes Cultured on Xeno-Free and Chemical Defined Human Recombinant Laminins.** *PLoS ONE* v.11, n.9, 2016
- WEISEL, J. **Fibrinogen and fibrin.** *Adv Protein Chem*, 2005.
- WHARTON, R.H.; UTECH, K.B.W.; TURNER, H.G. **Resistance to cattle tick, *Boophilus microplus* in a herd of Australian Illawarra Shorthorn Cattle – its assessment and heritability** *Aust. J. Agric. Res.*, v.21, p.163–180, 1970.
- WILLSON, T.M.; BROWN, P.J.; STERNBACH, D.D.; HENKE, B.R.** The PPARs: From Orphan Receptors to Drug Discovery. *J. Med. Chem.*, v.43, p.527-550, 2000.
- WIKEL, S.K. **Acquired resistance to ticks. Expression of resistance by C4-deficient guinea pigs.** *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* v.28, p.586–590, 1979
- WIKEL, S. K. **Histamine content of tick attachment sites and the effects of H1 and H2 histamine antagonists on the expression of resistance.** *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, v.76, p.179–185, 1982.
- WIKEL, S. K. **Host immunity to ticks.** *Annual Review of Entomology*, v.41, p.1–22, 1996.
- WIKEL, S. K. **Tick modulation of host immunity: An important factor in pathogen transmission.** *International Journal for Parasitology* v.29, p.851–859, 1999.
- WIKEL, S. K., RAMACHANDRA, R. N. & BERGMAN, D. K. **Tick-induced modulation of the host immune response.** *International Journal for Parasitology* v.24, p.59–66, 1994.
- WU, J.C.; MERLINO, G.; FAUSTO, N. **Establishment and characterization of differentiated, nontransformed hepatocyte cell lines derived from mice transgenic growth factor alpha.** *Proc Natl Acad Sci USA*, v.91, p.674-678, 1994.
- XU, L.; BADOLATO, R.; MURPHY, W.J. **A novel biologic function of serum amyloid A. Induction of T lymphocyte migration and adhesion.** *The Journal of Immunology*, v.155, p.1184-1190, 1995.
- ZAMBON, A.; GERVOIS, P.; PAULETTO, P.; FRUCHART, J.C.; STAELS, B. **Modulation of hepatic inflammatory risk markers of cardiovascular diseases by PPAR-alpha activators: clinical and experimental evidence.** *Arteriosclerosis, thrombosis and vascular biology*, v.26(5), p.977-86, 2006.
- ZEIGERER, A.; WUTTKE, A.; MARSICO, G.; SEIFERT, S.; KALAIIDZIDIS, Y.; ZERIAL, M. **Functional Properties of Hepatocytes in Vitro Are Correlated with Cell Polarity Maintenance.** *Experimental Cell Research*, v.350, n.1, p.242–52, 2017.

ZHOU Z.; XU, M.J.; GAO, B. **Hepatocytes: a key cell type for innate immunity.**
Cellular & Molecular Immunology v.13 , p.301-315 ; 2016

ANEXO 1. Quantificação de proteínas e gel de poliacrilamida da saliva do carrapato *R. microplus*

A quantificação das proteínas presente na saliva do carrapato *R. microplus* foi realizada pelo método de Bradford, conforme recomendações do fabricante, apresentando uma quantidade média de 1254 µg/mL. A avaliação do perfil proteico eletroforético da saliva por gel desnaturante de poliacrilamida revelou a integridade das proteínas frente a ausência de bandas indicativas de degradação abaixo de 20kDa.

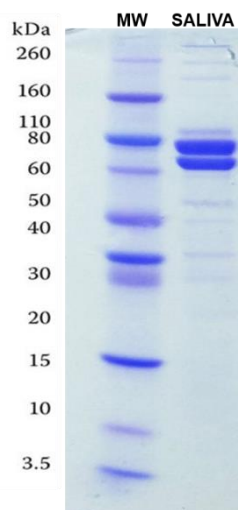


Figura suplementar 1: Análise da saliva do carrapato *R. microplus*, *in natura*, em gel de de gradiente de poliacrilamida (Amershan ECL, gel 8-16%). MW: Marcador molecular.

ANEXO 2. Testes estatísticos:

1. Contrastes dos controles positivos com o controle negativo:

Procedimento GLIMMIX

Δ Ct gene *C1*

Ajuste estimado para multiplicidade: Simulado						
Contraste	Estimativa	Erro padrão	GL	t valor	Pr > t	P ajustado
Citocinas 1X vs sem estímulo	0,8120	0,3568	61	2,28	0,0264	0,0689
Citocinas 2X vs sem estímulo	0,9367	0,3568	61	2,63	0,0109	0,0301
Citocinas 4X vs sem estímulo	1,0393	0,3737	61,03	2,80	0,0068	0,0181

ΔCt gene C3

Ajuste estimado para multiplicidade: Simulado						
Contraste	Estimativa	Erro padrão	GL	t valor	Pr > t 	P ajustado
Citocinas 1X vs sem estímulo	0,1738	0,3285	62,01	0,53	0,5987	0,9107
Citocinas 2X vs sem estímulo	0,05194	0,3285	62,01	0,16	0,8749	0,9975
Citocinas 4X vs sem estímulo	0,1105	0,3413	62,04	0,32	0,7471	0,9762

ΔCt gene SAA

Ajuste estimado para multiplicidade: Simulado						
Contraste	Estimativa	Erro padrão	GL	t valor	Pr > t 	P ajustado
Citocinas 1X vs sem estímulo	3,9652	0,4042	63	9,81	< 0,0001	< 0,0001
Citocinas 2X vs sem estímulo	3,9555	0,4042	63	9,79	< 0,0001	< 0,0001
Citocinas 4X vs sem estímulo	4,2269	0,4042	63	10,46	< 0,0001	< 0,0001

GL: graus de liberdade; Pr: probabilidade

2. Contrastes entre todos os tratamentos

Procedimento GLIMMIX **$2^{-\Delta\Delta Ct}$ gene C1**

Estimativas de parâmetro de covariância		
Param cov	Estimativa	Erro padrão
Animal (raça)	3,4198	2,0472
Resíduo	3,2641	0,6289

Testes tipo III de efeitos fixados				
Efeito	GL num	GL den	Valor F	Pr > F
Tratamento	8	53,92	1,44	0,2024

Agrupamento Tukey-Kramer para média dos mínimos quadrados dos tratamentos (Alpha=0,05)		
Média dos mínimos quadrados com a mesma letra não se diferem significativamente		
Tratamento	Estimativa	
Citocinas 4X	3,7581	A
		A
Citocinas 2X	2,8766	A
		A
Citocinas 1X	2,6062	A
		A
GW6471 + SALIVA 1:100	2,5435	A
		A
GW6471 + SALIVA 1:1000	2,5139	A
		A
GW6471	2,2925	A
		A
DMSO	1,7755	A
		A
Saliva 1:100	1,2873	A
		A
Saliva 1:1000 1.2808 A	1,2808	A

2^{- $\Delta\Delta$ Ct} gene C3

Estimativas de parâmetro de covariância		
Param cov	Estimativa	Erro padrão
Animal (raça)	0,0222	0,02799
Resíduo	0,2611	0,04976

Testes tipo III de efeitos fixados				
Efeito	GL num	GL den	Valor F	Pr > F
Tratamento	8	55,2	0,88	0,5379

Agrupamento Tukey-Kramer para média dos mínimos quadrados dos tratamentos (Alpha=0,05)		
Média dos mínimos quadrados com a mesma letra não se diferem significativamente		
Tratamento	Estimativa	
Saliva 1:100	1,6239	A
		A
Citocinas 1X	1,3283	A
		A
Citocinas 4X	1,2925	A
		A
SALIVA 1:1000	1,2692	A
		A
DMSO	1,24	A
		A
GW6471 + Saliva 1:100	1,1878	A
		A
Citocinas 2X	1,1405	A
		A
GW6471 + Saliva 1:1000	1,1055	A
		A
GW6471	1,0365	A

GL: graus de liberdade; num: numerador; den: denominador

$2^{-\Delta\Delta Ct}$ gene SAA

Estimativas de parâmetro de covariância		
Param cov	Estimativa	Erro padrão
Animal (raça)	4,8274	5,7699
Resíduo	51,9517	9,818

Testes tipo III de efeitos fixados				
Efeito	GL num	GL den	Valor F	Pr > F
Tratamento	8	56	14,53	< 0,0001

Agrupamento Tukey-Kramer para média dos mínimos quadrados dos tratamentos (Alpha=0,05)		
Média dos mínimos quadrados com a mesma letra não se diferem significativamente		
Tratamento	Estimativa	
Citocinas 4X	24,6372	A
		A
Citocinas 1X	19,4572	A
		A
Citocinas 2X	18,097	A
SALIVA 1:100	2,2541	B
		B
SALIVA 1:1000	1,8007	B
		B
DMSO	1,537	B
		B
GW6471 + Saliva 1:1000	1,3984	B
		B
GW6471	1,3831	B
		B
GW6471 + Saliva 1:100	1,3515	B