

**Escola Superior de Ensino do Instituto Butantan  
Programa de Pós-graduação Lato Sensu  
Especialização em Biotecnologia para Saúde - Vacinas e Biofármacos**

**Jessica de Azevedo Pissolato**

**Modulação do líquido coxal do carrapato *Ornithodoros brasiliensis*  
(Acari: Argasidae) sobre alguns microrganismos**

**São Paulo**

**2023**

**Jessica de Azevedo Pissolato**

**Modulação do Líquido Coxal do Carrapato *Ornithodoros brasiliensis*  
(Acari: Argasidae) sobre alguns microrganismos**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Especialização em Biotecnologia para a Saúde em Vacinas e Biofármacos do Programa de Pós-graduação *Lato Sensu* da Escola Superior do Instituto Butantan como requisito básico para a obtenção do título de Especialista em Biotecnologia.

Orientador (a): Dr.<sup>a</sup> Simone Michaela Simons

**São Paulo**

**2023**

**Catálogo na Publicação  
Instituto Butantan  
Dados inseridos pelo(a) aluno(a)**

Pissolato, Jessica de Azevedo

Modulação do líquido coxal do carrapato *Ornithodoros brasiliensis* (Acari: Argasidae) sobre alguns microrganismos / Jessica de Azevedo Pissolato ; orientador(a) Simone Michaela Simons - São Paulo, 2023.

49 p. : il.

Monografia (Especialização) - Escola Superior do Instituto Butantan, Especialização na Área da Saúde - Biotecnologia Para a Saúde - Vacinas e Biofármacos.

1. Líquido coxal 2. Microrganismos . 3. Bactérias. 4. fungos I. Simons , Simone Michaela. II. Escola Superior do Instituto Butantan. III. Especialização na Área da Saúde - Biotecnologia Para a Saúde - Vacinas e Biofármacos. IV. Título.

## AUTORIZAÇÃO PARA ACESSO E REPRODUÇÃO DE TRABALHO

Eu, Jessica de Azevedo Pinheiro, aluno(a) do curso Especialização em Biotecnologia para a Saúde - Vacinas e Biofármacos, autorizo a divulgação do meu trabalho de conclusão de curso por mídia impressa, eletrônica ou qualquer outra, assim como a reprodução total deste trabalho de conclusão de curso após publicação, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

Prazo de liberação da divulgação do trabalho de conclusão de curso após a data da avaliação:

Imediato

06 meses

12 meses

Outro prazo \_\_\_\_\_ Justifique:

São Paulo, 31 de janeiro de 2023.

Jessica de Azevedo Pinheiro

aluno(a)

De acordo: Simone Michaela Simons

Orientador(a): Simone M. Simons

## **AGRADECIMENTOS**

A minha orientadora Dr.<sup>a</sup> Simone Michaela Simons por todo apoio e ensinamento.

À Dr.<sup>a</sup> Márcia Franzolin pelos ensaios microbianos.

À Coordenadora do curso de Especialização em Biotecnologia, Dr.<sup>a</sup> Maria da Graça Salomão, por toda dedicação e delicadeza dispensada aos alunos.

Aos amigos que adquiri neste curso e por todas as risadas que demos juntos.

Ao Marcelo Francisco dos Santos por toda ajuda e ensinamento.

Ao Instituto Butantan pela oportunidade de realizar o meu trabalho.

Ao programa da Secretaria da Saúde pelo apoio financeiro e oportunidade de aprimoramento na área da saúde.

A todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

E por fim, mas não menos importante, aos meus pais, irmãos, amigo e à minha sobrinha que me apoiaram com muito amor.

A lei da mente é implacável.  
O que você pensa, você cria;  
O que você sente, você atrai;  
O que você acredita  
Torna-se realidade.

Buda

## RESUMO

PISSOLATO, Jessica de Azevedo. **Modulação do Líquido Coxal do Carrapato *Ornithodoros brasiliensis* (Acari: Argasidae) sobre alguns microrganismos.** 2022. 49 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Biotecnologia para a Saúde- Vacinas e Biofármacos) - Escola Superior do Instituto Butantan, São Paulo, 2023.

*Ornithodoros brasiliensis* (Aragão) é um carrapato argasídeo, ectoparasita hematófago encontrado no Brasil, com distribuição restrita ao RS. Uma das características dos argasídeos é sua rápida ingurgitação, o que levou ao desenvolvimento de estratégias para manter a osmorregulação e o equilíbrio hidrostático, através da secreção do líquido coxal. O líquido coxal (LC) é o excesso de fluido corpóreo filtrado e secretado pelas glândulas coxais durante e após a alimentação. São eliminados compostos orgânicos, sais e água. O intuito deste estudo foi verificar a capacidade moduladora do LC do *O. brasiliensis* sobre o crescimento microbiano. Sabe-se que os carrapatos são excelentes vetores de microrganismos patogênicos ou não, e essa ação pode estar envolvida diretamente com determinadas moléculas presentes no LC. Neste contexto, testamos duas bactérias Gram (+) a *Staphylococcus aureus* e *Micrococcus luteus* e três Gram (-) *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa* e a levedura *Candida albicans*. O LC foi coletado durante e após a alimentação dos carrapatos em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*). Obteve-se um pool do LC de fêmeas e ninfas N4 alimentadas totalmente, que foi esterilizado em fluxo laminar com filtros de 0,22 µm (MilliPore), aliquoteado e a dosagem protéica realizada em espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo) em A 280 nm. Para o fracionamento do LC utilizou-se filtros Vivaspín 6 (GE) com diferentes cortes 10, 30 e 50 kDa, e também Centrifugal Filter Units (Milli Pore), ambos centrifugados a 3.000 rpm, por até 15 min, a 4 °C. O ensaio de atividade antimicrobiana foi realizado através de diluição em caldo Mueller-Hinton (bactérias) ou caldo Sabouraud Dextrose (*C. albicans*), sendo realizada a leitura a 595 nm em Espectrofotômetro Multiskan EX (Thermo Fisher) após 20 horas de incubação a 37 °C. Os resultados demonstraram a capacidade do LC (0,14 µg/poço) modular o crescimento celular, sendo observada a variação da proliferação em todos os

microrganismos. A maior proliferação foi apresentada pela bactéria *M. luteus* com 35,25 % e a menor atividade proliferativa foi para a levedura *C. albicans* com 2,57 %. A partir dos testes com as frações do líquido coxal observou-se que a *C. albicans* repetiu o padrão de inibição do crescimento celular e que provavelmente a principal atividade esteja na fração entre 10 e 30 kDa com 77 % de inibição. Já as bactérias apresentaram menor porcentagem de inibição, entretanto é possível observar uma variação de atividade relacionada às massas moleculares das amostras. Esses resultados sugerem que a *E. coli* talvez não seja patogênica ao carrapato, entretanto, já foi observado que os fungos podem ser usados no controle ambiental de carrapatos, isso explicaria a inibição da *C. albicans*, como uma defesa do carrapato. É necessário obter mais conhecimento sobre as moléculas que possam ser facilitadoras ou não para esses microrganismos, conhecer suas características e se são as mesmas que permitem que patógenos fiquem latentes dentro dos carrapatos.

**Palavras-chave:** Líquido coxal. Microrganismos. Bactérias. Fungos.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01 - Ciclo biológico representado pela Família Ixodidae.....	15
Figura 02 - Exemplo do ciclo biológico de um carrapato argasídeo.....	17
Figura 03 - Glândula coxal de um argasídeo macho.....	19
Figura 04 - Efeito do LC sobre a atividade microbiana (%).....	32
Figura 05 Teste da atividade das frações do LC de $\leq 10$ , $\leq 30$ e $\geq 50$ kDa sobre o crescimento microbiano.....	33
Figura 06 -Teste da atividade das frações do LC de $\leq 10$ , 10-30 e $\geq 30$ kDa sobre a atividade antimicrobiana.....	35
Figura 07 - Análise eletroforética (SDS-PAGE 12,5%) do líquido coxal bruto e as frações 10, 10-30 e 30 kDa.....	36

## LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - Obtenção da amostra do líquido coxal.....	31
Tabela 02 - Efeito do LC sobre a atividade microbiana.....	32
Tabela 03 - Fracionamento do líquido coxal, utilizando membranas com corte de 10, 30 e 50 kDa.....	33
Tabela 04 - Efeito das frações de $\leq 10$ , $\leq 30$ e $\leq 50$ kDa sobre o crescimento microbiano.....	34
Tabela 05 - Fracionamento do líquido coxal, e obtenção das frações de $\leq 10$ , 10-30 e $\geq 30$ kDa.....	34
Tabela 06 - Tabela Atividade antimicrobiana do líquido coxal fracionado $\leq 10$ , 10-30 e $\geq 30$ kDa.....	35

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>1.1 Carrapatos</b> .....	13
1.1.1 Ixodídeos.....	14
1.1.2 Nuttalliella.....	15
1.1.3 Argasídeos .....	16
1.1.3.1 Gênero <i>Ornithodoros</i> .....	17
<b>1.1.3.1.1 <i>Ornithodoros brasiliensis</i></b> .....	17
1.2 Glândulas coxais.....	19
1.3 Imunidade inata nos carrapatos.....	20
1.4 Microrganismos.....	21
1.4.1 Bactérias .....	21
1.4.1.1. <i>Bactérias Gram-positivas</i> .....	22
<b>1.4.1.1.1 <i>Staphylococcus aureus</i></b> .....	22
<b>1.4.1.1.2 <i>Micrococcus luteus</i></b> .....	23
1.4.1.2 <i>Bactérias Gram-negativas</i> .....	23
1.4.1.2.1 <i>Escherichia coli</i> .....	23
<b>1.4.1.2.2 <i>Salmonella typhimurium</i></b> .....	24
<b>1.4.1.2.3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i></b> .....	25
1.4.2 Fungo.....	25
1.4.2.1 <i>Candida albicans</i> .....	25
<b>2 OBJETIVO</b> .....	27
2.1 Geral.....	27
2.2 Específicos.....	27

<b>3 METODOLOGIA</b> .....	28
3.1 Colônia de carrapatos <i>O. brasiliensis</i> (Acari: Argasidae) .....	28
3.2 Obtenção do Líquido Coxal (LC) .....	28
3.3 Dosagem de proteínas .....	29
3.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida .....	29
3.5 Fracionamento do líquido coxal.....	29
3.6 Aquisição dos microrganismos.....	29
3.7 Determinação da atividade moduladora das amostras do Líquido coxal sobre os microrganismos.....	30
<b>4 RESULTADOS</b> .....	30
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	37
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	41
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	42

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Carrapatos

Os carrapatos são artrópodes ectoparasitas hematofagos pertencentes à Subclasse Acari (ácaros), a Superordem Parasitiformes, a Ordem Ixodida (Andreotti, 2019; Cupp, 1991), estão distribuídos em três famílias Argasidae, Nuttalliellidae e Ixodidae.

A família Ixodidae apresenta cerca de 720 espécies (Gugliemone *et al.*, 2003; 2010; Nava *et al.*, 2010; Dantas-Torres *et al.*, 2012; Nava *et al.*, 2013; Barros-Battesti *et al.*, 2015; Nava *et al.*, 2017). Argasidae conta com aproximadamente 210 espécies (Gugliemone *et al.*, 2003; 2010; Nava *et al.*, 2010; Dantas-Torres *et al.*, 2012; Nava *et al.*, 2013; Barros-Battesti *et al.*, 2015; Labruna *et al.*, 2016, Muñoz-Leal *et al.*, 2020) e Nuttalliellidae, é representada apenas uma espécie *Nuttalliella namaqua* (Bedford, 1934; Keirans *et al.*, 1976; Mans *et al.*, 2011).

A fauna brasileira conta com 74 espécies de carrapatos pertencendo a duas famílias: Ixodidae, os carrapatos de corpo duro, com 47 espécies reconhecidas, e os Argasidae carrapatos de corpo mole, com 27 espécies (Muñoz-Leal *et al.*, 2020).

Durante o período de hematofagia os carrapatos secretam saliva que contém moléculas farmacologicamente ativas dirigidas contra o sistema imune e hemostático do hospedeiro (Ribeiro *et al.*, 1985; Maritz-Olivier *et al.*, 2007). As glândulas salivares são vitais para o sucesso biológico dos carrapatos sendo uma das principais rotas de transmissão dos microrganismos para o hospedeiro (Márquez-Jiménez *et al.*, 2005; Bowman *et al.*, 2004). Estes animais se alimentam por sucção, alternando com a eliminação de sua saliva. Nesse processo, os carrapatos causam no hospedeiro a dilaceração de células e tecidos, compressão de células, espoliação direta pela hematofagia, ação tóxica pela inoculação de diversas substâncias, além da depreciação da epiderme e predisposição à miíases e abscessos (Massard, 2004; Fonseca, 2004).

Os carrapatos têm grande importância médica, veterinária e econômica, pois são vetores de doenças em animais domésticos e em seres humanos, causando lesões decorrentes de sua alimentação. Durante o repasto sanguíneo acaba ocorrendo a circulação de patógenos entre o vetor e o hospedeiro, interferindo na

epidemiologia das doenças que têm os carrapatos como vetores. As doenças mais importantes transmitidas pelo carrapato são a febre maculosa, a febre macular das Montanhas Rochosas, a febre recorrente, a doença de Lyme, tularemia, babesiose bovina, anaplasma canina e febre do carrapato do Colorado, entre outras (Garcia *et al.*, 2012; Triplehorn; Johnson, 2016; Costa, 2003).

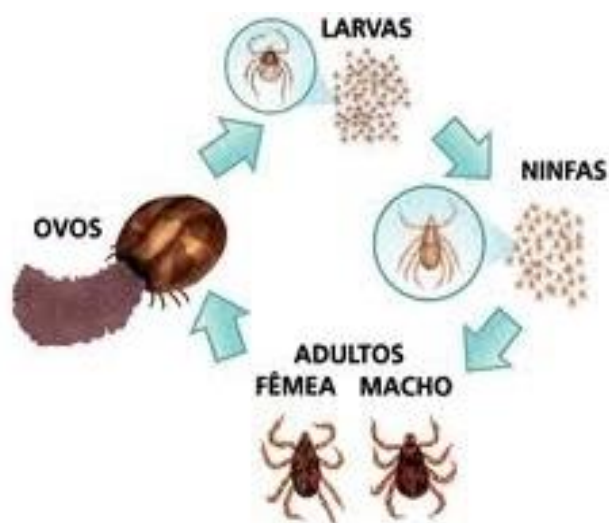
### 1.1.1 Ixodídeos

São o grupo de carrapatos mais numerosos que existe, apresentando 720 espécies no mundo, composta por 14 gêneros. Na região Neotropical são encontrados 5 gêneros: *Amblyomma*, *Ixodes*, *Dermacentor*, *Rhipicephalus* e *Haemaphysalis* (Cenbam, 2017, Barros-Battesti, 2006). Os carrapatos da família Ixodidae, quando comparados aos Argasídeos apresentam diferenças evidentes quanto à estrutura, morfologia e hábitos de vida.

Os *Ixodidae* são popularmente conhecidos como carrapatos duros em razão da presença de escudo dorsal esclerotizado, que atua também como dimorfismo sexual. Os carrapatos Ixodidae têm ampla distribuição como parasitas de vertebrados, e quando em fase não parasitária (entre mudas), são encontrados nos mais variados ambientes. Seu ciclo de vida inclui ovo, larva, apenas um estágio ninfal e adulto (**Figura 01**). Cada estágio requer vários dias sobre o hospedeiro e longos repastos sanguíneos, sendo que há uma alimentação em cada fase antes da muda. As fêmeas sugam grande quantidade de sangue para a produção de milhares de ovos, postos numa única oviposição e morrem em seguida. Geralmente os machos alimentam-se intermitentemente, permanecendo no hospedeiro por semanas ou meses (Oliver, 1989).

O equilíbrio osmótico e iônico dos ixodídeos é regulado pelas glândulas salivares (Barros-Battesti, 2006). Ao se alimentar o excesso de água é liberado de volta ao hospedeiro através das glândulas salivares (Mans *et al.*, 2012). Estudos mostram a presença de aquaporinas, moléculas que facilitam a secreção de água, formando poros na membrana celular, são expressas nas glândulas salivares e no intestino médio, com o papel de eliminar água e concentrar o sangue durante a hematofagia (Sonenshine, 2014).

**Figura 01** - Ciclo biológico representado pela Família Ixodidae.



**Fonte:** BICHO DO MATO, 2013

**Legenda:** A fêmea faz a oviposição dando origem à larvas com três pares de pernas, evoluindo para ninfas com quatro pares de pernas, chegando à fase adulta aptos para a reprodução.

### 1.1.2 Nuttalliella

São representados por apenas uma família, *Nuttalliella* e gênero *Nuttalliella namaqua*. O *Nuttalliella namaqua*, é um carrapato existente no sudeste e sul do continente Africano, da Tanzânia à Namíbia e África do Sul. Exibem características intermediárias entre as duas famílias Ixodidae e Argasidae, como por exemplo a presença de um escudo vestigial esclerotizado nas larvas, já as ninfas e adultos possuem um pseudoescudo semi esclerotizado e suas peças bucais estão localizadas apicalmente a fase ninfal e adulto apresenta uma cutícula coriácea e o ingurgitamento é rápido, como nos argasídeos (Ben J. Mans *et al*, 2012; Barros-Battesti *et al.*, 2006).

### 1.1.3 Argasídeos

A fauna mundial de argasídeos está distribuída em cinco gêneros, Antricola, Argas, Otobius, Nothoaspis e Ornithodoros. Filogeneticamente são considerados mais antigos. Os carrapatos argasídeos apresentam desenvolvimento característico multi-hospedeiros (Landulfo *et al.*, 2012; Ramirez, 2012), alimentando-se no mesmo animal várias vezes ou em vários animais, da mesma espécie ou não, durante seu ciclo de vida. Seu habitat pode estar intimamente associado ao homem e animais domésticos, sendo encontrados em porões, estábulos, galinheiros e camas rústicas. Todavia, vivem também em ambientes como tocas, buracos, cavernas, ninhos de aves silvestres e marinhas, solo solto, casca de árvores, entre outros substratos.

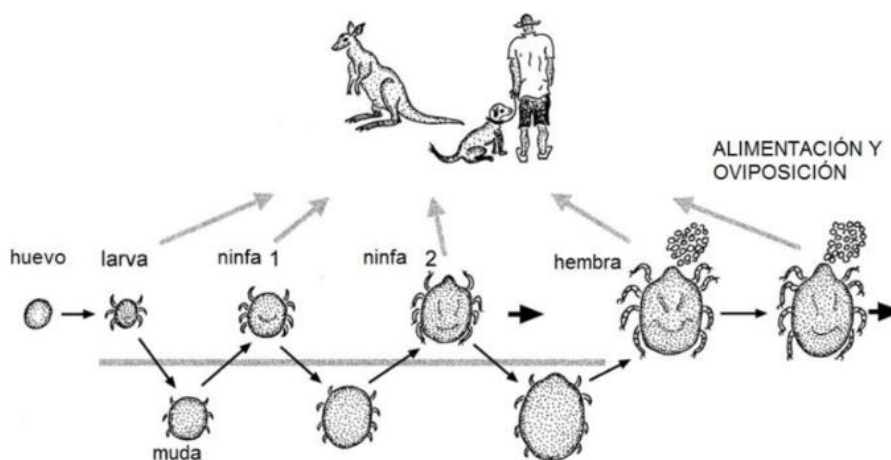
Morfologicamente, exibem gnatosoma subterminal (geralmente não visível dorsalmente), possuem um tegumento coriáceo que pode se expandir rapidamente, e ausência de escudo esclerotizado, existindo apenas escudo vestigial na fase larval de algumas espécies e presença de glândula coxal, responsável por realizar o equilíbrio hídrico e osmótico desses aracnídeos (Ben J. Mans *et al.*, 2012; Sonenshine, 2014).

O ciclo de vida compreende ovos, larva, vários instares ninfais e adultos (**Figura 02**). Na maioria das espécies, as ninfas e os adultos alimentam-se rapidamente (cerca de 30 a 40 minutos em média) enquanto que as larvas podem variar o tempo de fixação sobre o hospedeiro. Para cada estágio imaturo há uma refeição antes de cada ecdise, salvo raras exceções, com dois repastos sanguíneos em ninfas antes da muda, ou ainda pode haver muda sem alimentação para algumas espécies de Ornithodoros. Em geral os adultos alimentam-se múltiplas vezes, antes das cópulas e oviposição (Hoogstraal, 1985). Adultos de Antricola e Otobius não se alimentam (Estrada-Peña *et al.*, 2008).

Com relação à transmissão de patógenos, diferentes características biológicas e fisiológicas, assim como a interação entre elas, permitem aos argasídeos agirem como reservatórios de uma variedade de agentes infecciosos. Esses microrganismos podem ser transmitidos aos hospedeiros suscetíveis semanas ou meses após o contato com o carrapato originalmente infectado. Porém, o confinamento em ambientes restritos pode variar drasticamente o comportamento parasito-hospedeiro, modificando a capacidade vetorial em manter e transmitir tais agentes (Cupp, 1991; Hoogstraal, 1985).



**Figura 02** - Exemplo do ciclo biológico de um carrapato argasídeo.



**Fonte:** Adaptador de BARKER & WALKER, 2014.

**Legenda:** O ciclo biológico consiste em ovo, larva com três pernas, estágio ninfal com quatro pernas, ocorrendo mudas em cada fase do seu crescimento, ao aparecer os órgãos genitais o carrapato chega a fase adulta (fêmeas e machos) aptos para a reprodução.

### 1.1.3.1 Gênero *Ornithodoros*

O gênero *Ornithodoros* é representado por 115 espécies no mundo, sendo que 17 delas ocorrem no Brasil (Dantas-Torres et al. 2012; Barros-Battesti et al. 2013; Muñoz-Leal et al., 2020). As espécies deste gênero são agrupadas em três classes, de acordo com o padrão de alimentação (Ribeiro et al., 2013): 1) São as larvas que fazem muda para o primeiro instar ninfal sem alimentação, neste grupo encontram-se *Ornithodoros brasiliensis* (Aragão, 1923) e *O. savignyi* (Audouin, 1827) (Khan & Srivastava 1988); 2) Larvas que se alimentam em poucos minutos, *O. rostratus* Aragão, 1911 (Ribeiro et al., 2013) e *O. turicata* (Dugès, 1876) (Beck et al.1986) e 3) Larvas que levam vários dias para se alimentarem, principalmente aquelas que parasitam morcegos e pássaros (Landulfo et al., 2012).

#### 1.1.3.1.1 *Ornithodoros brasiliensis*

O *Ornithodoros brasiliensis* é um carrapato argasídeo, endêmico do Brasil, restrito às regiões serranas e frias do Estado do Rio Grande do Sul.

Foi descrito por Henrique Beaufreire Aragão em 1923 pela primeira vez. Esses carrapatos parasitam vários tipos de animais, por exemplo, cães, porcos, coelhos e até humanos. São popularmente conhecidos como “carrapatos de chão” ou “ground tick”, por terem o hábito de se enterrarem em areia ou terra macia e viverem assim enterrados perto do local de repouso do seu hospedeiro (Martins *et al.*, 2011; Evans *et al.*, 2000). O (Reck, 2013; Martins, 2011; Ramirez, 2012; Garcia, 2012).

No seu ciclo biológico a eclosão dos ovos ocorre depois de duas ou três semanas após a postura, as larvas realizam a muda para ninfas bem rápido e sem se alimentar. Apresentam até quatro estágios ninfais. Essa espécie se alimenta de forma rápida e o acasalamento ocorre sempre após o ingurgitamento (Ramirez *et al.*, 2016)

Trata-se de um carrapato bastante agressivo aos humanos por causar muita dor, febre e intensa resposta inflamatória formando feridas profundas no local da picada, em alguns casos também pode ocorrer mal estar, dor de cabeça e até uma síndrome tóxica, se tornando um problema de saúde pública no Sul do Brasil (Martins *et al.*, 2011; Ramirez, 2012), e em cães foi relatado paralisia nos membros inferiores e óbito (Reck *et al.*, 2011)

Por mais de cinquenta anos, após a descrição por Aragão em 1923, ninguém mais ouviu falar do *O. brasiliensis*, o que gerou dúvidas sobre sua existência, foi em 2007 que alguns espécimes de carrapatos foram enviados ao Instituto Butantan para serem identificados. Os carrapatos eram provenientes de uma residência da área rural de São Francisco de Paula (RS), local de origem da espécie. As pessoas que foram picadas queixaram-se de muita febre e feridas na pele de difícil cicatrização. Foi constatado então um lote de *O. brasilienses* (Martins *et al.*, 2008). Isso possibilitou a redescricao dos adultos e a primeira descrição das larvas (Barros-Batesttiet *al.*, 2012). Nesta época foi estabelecida uma colônia aqui no Instituto Butantan, possibilitando o conhecimento do ciclo biológico da espécie (Ramirez *et al.*, 2016).

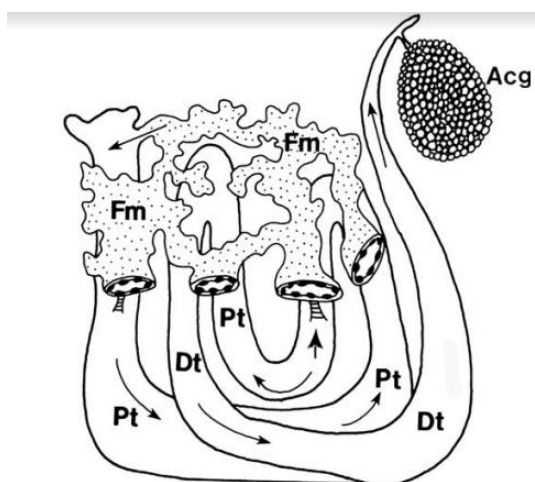
Nos anos 50 descobriu-se uma bactéria espiroqueta, denominada *Borrelia brasiliense*, em espécimes oriundos do seu local original de ocorrência (São Francisco de Paula, RS), que infectou cobaias causando febre nos animais (Gordon, 1952). As borrelíias foram mantidas em várias passagens nos hospedeiros, mas não puderam ser cultivadas, e acabaram desaparecendo. O *O. rostratus* muito próximo

ao *O. brasiliensis* foi encontrado infectado com bactérias do gênero *Coxiella*, sendo provavelmente uma simbiote (Almeida *et al.*, 2012).

## 1.2 Glândulas coxais

As glândulas coxais são comumente encontradas em muitos aracnídeos, bem como em ácaros e carrapatos que se localizam dorsalmente entre as coxas das patas I e II. (Little, 1983). Nos argasídeos as glândulas coxais possuem atividade diferente dos ixodídeos. Durante ou após a alimentação, um líquido claro e úmido é secretado pelo carrapato argasídeo, servindo para concentrar o sangue e eliminar o excesso de água e íons. A glândula coxal funciona como um sistema de ultrafiltração retendo a maioria das proteínas da hemolinfa e outros compostos orgânicos, permitindo a remoção de sais e água (SONENSHINE, D.E, 2014; Kaufman, S. E, 1982; Kaufman,W. R, 1982), realizando o equilíbrio osmótico, visto que uma das características desta família de carrapatos é o rápido ingurgitamento. A glândula anexa só é encontrada nos machos e está ligada à cópula pois observou-se a presença de feromônios sexuais (Sonenshine, 201; Kaufman,W. R, 1982; ; Kaufman, S. E, 1982mo). Também foi relatado a presença de microrganismos como as riquetsias em amostras de líquido coxal (Weyer et al, 1975).

**Figura 03** - Glândula coxal de um argasídeo macho.



**Fonte:** Livro do SONENSHINE, 2014.

**Legenda:** Morfologia da membrana filtrante (fm) da glândula coxal, glândula acessória (Acg), túbulo distal (Dt) e túbulo proximal (Pt) dos túbulos coletores. Adaptado de Hecker *et al.*, 1969.

### 1.3 Imunidade inata nos carrapatos

Os carrapatos contam com sua imunidade inata para conseguirem sucesso na transmissão de patógenos na hora do repasto. Ao se alimentar de um hospedeiro contaminado, o patógeno por meio da hemolinfa chega ao intestino do carrapato, se alojando nas glândulas epiteliais intestinais ou passa pelo epitélio intestinal e entrar na hemocele, uma cavidade corporal onde se encontra a hemolinfa, sendo fluido que circula por todo o tecido e órgãos dos artrópodes. O patógeno neutraliza os fatores imunológicos do carrapato para uma boa transmissão através da saliva. O patógeno se aloja nas glândulas salivares, servindo de reservatório, o agente pode ser passado por via transovariana, dando origem a gerações infectadas. O sistema imunológico do carrapato é mais simples, apresentando somente resposta imune inata, mesmo assim é muito eficaz, pois cada fator atua em cada órgão interagindo com o patógeno, desenvolvendo novas táticas para a transmissão de doenças (Fogaça *et al*, 2021).

Para evitar a perda de sangue por lesão, o carrapato realiza a vasoconstrição, um mecanismo de agregação de plaquetas e coagulação sanguínea. o processo é ativado por vários agonistas: ADP liberado de células lisadas, plaquetas, colágeno exposto dos vasos lesados, trombina produzida após a ativação da cascata de coagulação e PAF liberado por leucócitos. Esse processo causa o aumento de cálcio citoplasmático, ativando as plaquetas (Ciprandi, 2004), e usam a hemoglobina do hospedeiro como produtora de fragmentos antimicrobianos. A hemoglobina também é referida como hemocianinas, até o momento não se sabe se atuam intracelularmente ou se são liberadas para o lúmen do intestino do carrapato, podendo combater microrganismos (Fogaça *et al*, 2021).

Em carrapatos a expressão mais importante são os hemócitos, corpo gorduroso, intestino, ovários e glândulas salivares. Os hemócitos podem ser células sésseis ou circulares da hemolinfa, são muito consideráveis em várias respostas imunes, sendo mais importante em artrópodes à fagocitose, encapsulamento, nodulação, coagulação e produção de moléculas relacionadas ao sistema imunológico (Fogaça *et al*, 2021).

## 1.4 Microrganismos

Os microrganismos estão presentes em todos os nichos do nosso planeta, são seres cuja estrutura só é identificada com a utilização de um microscópio. Os microrganismos, como bactérias, vírus, fungos e protozoários, diferem especialmente em termos de forma, tamanho, aparência e em suas características genéticas e metabólicas (Mcdermott *et al.*, 2003). Os microrganismos apresentam diferentes graus de relações biológicas como o parasitismo, o mutualismo e o comensalismo (Jawetz, 2014).

### 1.4.1 Bactérias

As bactérias são organismos unicelulares procariontes que estão presentes nos mais variados ambientes. São classificadas de acordo com sua morfologia e características de suas paredes celulares que lhes permitem ser coradas ou não pelo corante de Gram em laboratório. As bactérias gram-positivas apresentam na parede celular uma camada espessa de peptidoglicano, ácido teicóico e ácido lipoteicóico, enquanto as bactérias gram-negativas apresentam uma parede celular fina de peptidoglicano, onde a sua membrana externa formada por lipopolissacarídeos, são responsáveis pela sua alta toxigenicidade e antigenicidade (Rothschild *et al.*, 2001; Magro, 2014; Badari, 2018).

As paredes celulares das bactérias são rígidas o que lhes conferem suas formas características e lhes permitem viver em ambientes hipotônicos. As paredes celulares bacterianas são de considerável importância médica, pois são responsáveis pela virulência bacteriana que pode causar doenças (Tortora *et al.*, 2016)

A síntese da parede celular da bactéria é o alvo de algumas drogas antimicrobianas, pois as substâncias químicas que danificam a parede celular bacteriana ou interferem em sua síntese não danificam as células de um hospedeiro. Consequentemente, várias vacinas baseadas em polissacarídeos bacterianos purificados foram disponibilizadas recentemente, incluindo as contra *Streptococcus pneumoniae*, a maior causa de pneumonia, e *Neisseria meningitidis*, a maior causa da meningite (Tortora *et al.*, 2016; Voet, 2002).

#### 1.4.1.1. Bactérias Gram-positivas

Na maioria das bactérias gram-positivas, a parede celular consiste em muitas camadas de peptidoglicano, formando uma estrutura rígida e espessa, as paredes contêm ácidos teicóico que fornecem uma boa parte da especialidade antigênica da parede e, portanto, tornam possível identificar bactérias gram-positivas utilizando determinados testes laboratoriais (Tortora *et al.*, 2016). Assim o ácido teicóico na bactéria Gram-positiva funciona como antígeno de superfície, quando colorada com violeta, sua cor apresenta um tom de azul, confirmando ser Gram-positivo. Sendo assim algumas bactérias como, *Micrococcus luteus* e *Staphylococcus aureus*, são consideradas Gram-positivas (Nogueira & Miguel, 2013).

##### 1.4.1.1.1 *Staphylococcus aureus*

O *Staphylococcus aureus* é uma bactéria do grupo dos cocos gram-positivos que faz parte da microbiota humana, sendo um dos patógenos bacterianos mais importantes na prática clínica. Ele coloniza locais de fissuras na pele, como úlceras e feridas, causando infecções superficiais e profundas da pele, nos tecidos moles e também em tecidos ósseos. Normalmente ele é inofensivo na nossa pele e membranas nasais quando intactos, sendo transportado por um terço da população (Bagnoli *et al.*, 2018). Está associada a infecções muito comuns em ambientes hospitalares. Algumas infecções causadas por *S. aureus* são: bacteremia, pneumonia, osteomielite, endocardite, miocardite, pericardite, meningite e infecções em feridas, todas podem apresentar estado grave (Bush, 2021). Seu tratamento é usado antibiótico via oral ou em casos de infecções mais sérias, o medicamento é por veia. O *S. aureus*, mostra uma resistência à metilina, sendo resistente a maioria dos antibióticos que são relacionados com a penicilina (Bush, 2021).

A temperatura ideal para o seu desenvolvimento é entre 35 e 37 °C, mas pode crescer em ambientes que apresentem temperaturas entre 7 a 46 °C. Para a produção de enterotoxina ocorre em temperaturas entre 10 e 45 °C. Sobrevive em pH entre 4,5 e 9,3, apresentando um período específico com crescimento máximo entre pH 6,0 e 7,0 (asae.gov.pt).

#### **1.4.1.1.2 *Micrococcus luteus***

A bactéria *Micrococcus luteus*, é encontrada frequentemente na pele humana por ser aeróbia obrigatória e halotolerantes, o que contribui para sua capacidade de sobreviver na pele, ela apresenta cepas que produz proteases e queratinases, utilizando esses polímeros da pele como fontes de nutrientes. Mesmo sendo encontrados na pele humana, os *Micrococcus* raramente causam infecções, devido a sua baixa patogenicidade, existem poucos estudos focados em infecção de *M. luteus*, principalmente em infecções de corrente sanguínea (Zhu *et al.*, 2021). Entretanto, podem ser considerado um patógeno oportunista por causarem infecções em pacientes imunossuprimidos, como bacteremia, endocardite, ventriculite, peritonite, pneumonia, endoftalmite, ceratólise e artrite séptica (Zhu *et al* 2021; Oliveira, 2017).

#### **1.4.1.2 Bactérias Gram-negativas**

As paredes celulares das bactérias gram-negativas consistem em uma ou poucas camadas de peptidoglicano e uma membrana externa. O peptidoglicano está ligado a lipoproteínas na membrana externa e está localizado no periplasma, que contém uma alta concentração de enzimas de degradação e proteínas de transporte. A membrana externa é formada por lipopolissacarídeos, responsáveis pela toxigenicidade e antigenicidade dessas bactérias, ela apresenta uma forte carga negativa, sendo um dos fatores importante na evasão da fagocitose e nas ações do complemento que causa lise de células e promove a fagocitose das células do hospedeiro. A membrana externa também fornece uma barreira contra a ação de detergentes, metais pesados, sais biliares, determinados corantes, antibióticos (p. ex., penicilina) e enzimas digestivas como a lisozima. Diferente das gram-positivas as suas paredes celulares não contêm ácidos teicóicos (Tortora,2016; Badari, 2018).

#### **1.4.1.2.1 *Escherichia coli***

A *E. coli* pertence à Família Enterobacteriaceae, possui formato de bacilo sendo móvel com flagelo e frequentemente com fímbrias, não é esporada, sendo anaeróbio facultativo com capacidade de fermentação para carboidratos. Sua sobrevivência varia entre temperaturas de 7 a 46 °C, portanto entre 35 e 40 °C são as temperaturas onde chegam ao crescimento máximo. A *E. coli* é um dos membros patogênicos mais versáteis e mortais da microbiota intestinal de mamíferos, tendo vários mecanismos diferentes de patogênese, principalmente no intestino humano, entre elas estão a diarreia do viajante (*E. coli* enterotoxigênica), Colite Hemorrágica e síndrome hemolítico-urêmica (*E. coli* enterohemorrágica), diarreia persistente (*E. coli* enteroagregativa) e diarreia aquosa de lactentes (*E. coli* enteropatogênica). Ela é utilizada na biotecnologia como hospedeira de clonagem na tecnologia do DNA recombinante (Sussman, 1997; Kaper & Nataro, 2004).

#### **1.4.1.2.2 *Salmonella typhimurium***

A *S. typhimurium* é uma bactéria Gram-negativa patogênica para o homem, podendo causar infecção séria, a febre tifoide. É uma bactéria que atinge o trato digestivo, causando vômitos, diarreia, enjoos e febre. Algumas espécies de *Salmonella* residem somente em humanos, outras podem residir em animais, podendo infectar pessoas através de suas fezes. A contaminação geralmente ocorre por alimentos contaminados que são ingeridos, como ovos ou frango mal cozido, algumas vezes podem ser transmitidos por verduras contaminadas, porco mal cozido, laticínios não pasteurizados (Bush, 2022).

Sobrevive a temperaturas entre 7 e 48 °C, mas a temperatura ideal para a multiplicação é entre 35 e 37 °C. Não se multiplicam quando estão em lugares de refrigeração, mas são resistentes, sua destruição é através de pasteurização.

Crescem em pH de valores entre 4,5 e 9,3, dando preferência a ambientes de pH entre 6,5 e 7,5 (Asae.gov).



### 1.4.1.2.3 *Pseudomonas aeruginosa*

A *Pseudomonas aeruginosa* é um bacilo Gram-negativo não fermentativo, causador de contaminação principalmente em ambientes hospitalares, sendo bem perigosa, essa bactéria para pacientes com fibrose cística. Sua característica específica é a liberação de odor doce de uva, e produz uma pigmentação verde, são resistentes a múltiplos fármacos, contendo um resistente sistema de mecanismo. Dificilmente a *Pseudomonas aeruginosa* começará um quadro de infecção sem alguma lesão ou comprometimento do hospedeiro (Sanar, 2021).

As *Pseudomonas* possuem ampla diversidade em termos de temperatura e condições ambientais, sendo abundante em solos e água (neoprosecta, 2019).

## 1.4.2 Fungos

O ramo dos fungos no reino eucariótico inclui tanto as leveduras unicelulares quanto os fungos filamentosos pluricelulares. (Alberts *et al.*, 2010)

Os fungos são organismos heterotróficos e eucarióticos uni ou multicelulares pertencentes ao Reino Fungi, sendo constituídos pelos cogumelos, bolores, orelhas-de-pau e leveduras. São compostos por parede celular de quitina, um polímero de N-acetilglicosamina derivado da glicose, tem baixa exigência nutricional o que facilita sua sobrevivência em diversos ambientes (Lacaz *et al.*, 2002). O seu aparecimento se origina de hifas ou cenocíticas, elas crescem por alongamento das extremidades, dando origem a novos filamentos. As hifas crescem em formato de ramificação, se originando em uma massa compacta chamada de micélio, a partir do micélio, podem surgir estruturas aéreas chamados de conídios correspondendo aos esporos assexuados (Oliveira *et al.*, 2014).

### 1.4.2.1 *Candida albicans*

A *Candida albicans* é um fungo com a estrutura de levedura, sendo diploide com dois pares de oito cromossomos, consegue se multiplicar por brotamento, e em algumas situações pode formar um tubo germinativo e então crescer como pseudo-

hifa e hifa verdadeira. Sua célula é composta basicamente por quitina e membrana plasmática fosfolipídica, sua nutrição é feita através de carboidratos absorvidos do ambiente, sua parede celular é rígida não permitindo a realização de fagocitose.

É altamente distribuída na natureza, podendo ser encontrada em tratos gastrointestinais, pele humana e mucosa. Vive como comensal nos lugares onde reside e podendo se tornar oportunista e causar doenças. Consegue se adaptar facilmente nos locais devido ao seu pH peculiar, níveis de O<sub>2</sub>, temperatura e disponibilidade de nutrientes, conseguindo se adaptar tanto ao pH neutro do sangue ou tecidos quanto ao pH da vagina que pode variar de 2 a 4. A temperatura que mais favorece o seu crescimento é entre 20 °C a 38 °C. (Vieira & Santos, 2015; Cardoso, 2013; Calderone *et al.*, 2001; Diet *et al.*, 2013).

Dentro do gênero *Candida*, algumas espécies são de maior importância médica e odontológica, sendo a *C. albicans* a mais frequentemente isolada (Spolidoro *et al.*, 2009). É estimado que cerca de 20 a 50 % da população apresente *Candida spp* em sua cavidade bucal e 60 a 90 % dos isolados são causados pela *C. albicans* (Santana *et al.*, 2013). Pode ser manifestada em dois tipos de densidade, sendo elas a candidíase cutâneo-mucosa e invasiva ou sistêmica. A candidíase cutâneo-mucosa se apresenta das seguintes formas: Candidíase intertriginosa, onicomicose, candidíase oral, vulvovaginite, balanopostite e cutâneo-mucosa crônica. A candidíase invasiva são infecções invasivas e profundas, localizando-se em órgãos ou vias sanguíneas (candidemia) (Vieira & Santos, 2015).

As pessoas com sistema imunológico comprometido são as mais afetadas pela *C. albicans*, ao ocorrer um desequilíbrio biológico, pode ocorrer o aumento na multiplicação do fungo causando uma invasão nos tecidos no hospedeiro (Santana, *et al* 2013; Vieira & Santos, 2015).

Sua morfologia é composta por uma colônia úmida, cremosa com odor específico, aspecto liso ou rugoso e coloração branco-amarelado, formação de tubo germinativo, assimilação de carbono e capacidade de fermentação por ser uma levedura (Santana *et al.*, 2013). São formadores de biofilme, resultando em uma aderência do fungo nos tecidos, auxiliando na aderência e dificultando o antifúngico a ação do antifúngico (Santana *et al.*, 2013; Vieira & Santos, 2015).

## 2 OBJETIVO

### 2.1 Geral

Avaliar a atividade moduladora (inibidora ou proliferativa) do líquido coxal do carrapato *O. brasiliensis* (Acari: Argasidae), em bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e levedura.

### 2.2 Específicos

- a) Obter amostras padronizadas e esterilizadas através da dosagem proteica, gel de eletroforese e esterilização por membrana.
  
- b) Avaliar a atividade biológica do líquido coxal sobre os microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus* (Gram-positivas), *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa* (Gram-negativas); e *Candida albicans* (levedura).

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Colônia de carrapatos *O. brasiliensis* (Acari: Argasidae)

As colônias de carrapatos são mantidas em estufas B.O.D (demanda bioquímica e oxigênio) do Laboratório de Parasitologia e Entomologia do Instituto Butantan em temperatura (21 +/- 1° C) e umidade controladas, sob responsabilidade da Dra. Simone M. Simons.

#### 3.2 Obtenção do Líquido Coxal (LC)

O líquido coxal estava armazenado no freezer -80 °C, sendo obtido durante a alimentação dos *O. brasiliensis* em projetos anteriores, pois sabe-se que o LC é naturalmente secretado pelos carrapatos argasídeos durante o ingurgitamento. Para obtenção do líquido coxal foram utilizados pipetadores manuais de 200 µl, que foi colocado em tubos cônicos de 1,5 ml em gelo seco e depois armazenados em freezer.

Para obtenção do LC é necessária a alimentação dos carrapatos, já que estes liberam o líquido somente durante e/ou após o ingurgitamento. São utilizados coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) da raça Nova Zelândia adultos de ambos os sexos para alimentação, estes animais são anestesiados utilizando xilazina e cetamina. Os carrapatos se alimentam durante vinte a quarenta minutos. Para obtenção do líquido foram utilizados pipetadores manuais de 200 µL para aspiração, em seguida foi depositado em um tubo do tipo “Eppendorf” de 2 ml em gelo seco.

**Obs.:** É importante salientar que o LC já estava estocado no Laboratório (freezer -20 °C). Este material foi coletado durante a alimentação dos carrapatos em projetos anteriores aprovados pela CEUAIB (Nº 4487090320 e Nº 9098310818). Portanto, para o desenvolvimento deste trabalho não foi necessário obter mais amostras, conseqüentemente, nem infestar mais coelhos.

### 3.3 Dosagem de proteínas

Para medir a concentração proteica das amostras foi utilizado a dosagem em absorbância no comprimento de onda 280 nm no espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo).

### 3.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida

O LC e as amostras fracionadas, foram submetidas à eletroforese em SDS-PAGE 12,5 % segundo o método descrito por Laemmli (1970). Os géis foram corados pela metodologia do Nitrato de Prata (Morrissette, 1981).

### 3.5 Fracionamento do líquido coxal

Para essa etapa foram utilizados filtros Vivaspin 6 ml e 500 µl (GE) com diferentes tamanhos de cortes dos poros. Os primeiros fracionamentos foram utilizados filtros de 6 mL de 10, 30 e 50 kDa, já no segundo fracionamento, foram utilizados filtros de 500 µl de 10 e 30 kDa. Para ambos os fracionamentos as amostras foram centrifugadas a 3.000 rpm, por 20 minutos, a 4 °C.

### 3.6 Aquisição dos microrganismos

Para esta etapa contou-se com a colaboração da pesquisadora Dr.<sup>a</sup> Márcia Regina Franzolin do Laboratório de Bacteriologia deste Instituto, onde foram realizados os testes biológicos das amostras sobre os microrganismos (bactérias e levedura).

As bactérias utilizadas foram as *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Micrococcus luteus* (ATCC 10240) (Gram-positivas); *Escherichia coli* (ATCC 25922),

*Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) (Gram-negativas); e a *Candida albicans* (ATCC 10231) (levedura).

### **3.7 Determinação da atividade moduladora das amostras do Líquido coxal sobre os microrganismos**

Para verificar a atividade moduladora das amostras do líquido coxal foi utilizado o ensaio de atividade antimicrobiana de acordo com o NCCLS (2003) e CLSI (2015), empregando Caldo Mueller-Hinton (bactérias) ou Caldo Sabouraud Dextrose (*C. albicans*), num volume total de 100 µL em microplacas de titulação de 96 poços de fundo chato. A densidade das suspensões microbianas testadas foi ajustada em solução salina estéril 0,85 % para aproximadamente  $1-2 \times 10^8$  UFC/mL (escala 0,5 de MacFarland), a partir de colônias isoladas em TSA. Esse inóculo foi diluído ( $1,5 \times 10^6$  UFC/mL) e foram adicionados 50 µL em cada poço contendo 50 µL da solução teste, ficando a concentração bacteriana final a  $1,5 \times 10^5$  UFC/mL ou  $1,5 \times 10^4$  UFC / poço (NCCLS, 2003). Após 24 horas de incubação a 37 °C, foi realizada a leitura das densidades ópticas em um comprimento de onda de 595 nm em leitor de ELISA Multiskan®EX (Thermo Fisher Scientific, EUA), para observação da atividade antimicrobiana. O percentual de inibição de crescimento microbiano pela solução de nanopartículas foi calculado através da fórmula:

$$\% \text{ de inibição} = 100 - \frac{(\text{Absorbância do microrganismo tratado} \times 100)}{(\text{Absorbância do microrganismo não tratado})}$$

## 4 RESULTADOS

A partir de 185 carrapatos, sendo 130 ninfas do estágio N4 e 55 adultos (item 3.2), foram coletados 13 ml de líquido coxal durante o ano 2021. Dessa forma, foram obtidos aproximadamente 80 mg de material inicial, o qual foi utilizado para os estudos da atividade moduladora do LC sobre os microrganismos.

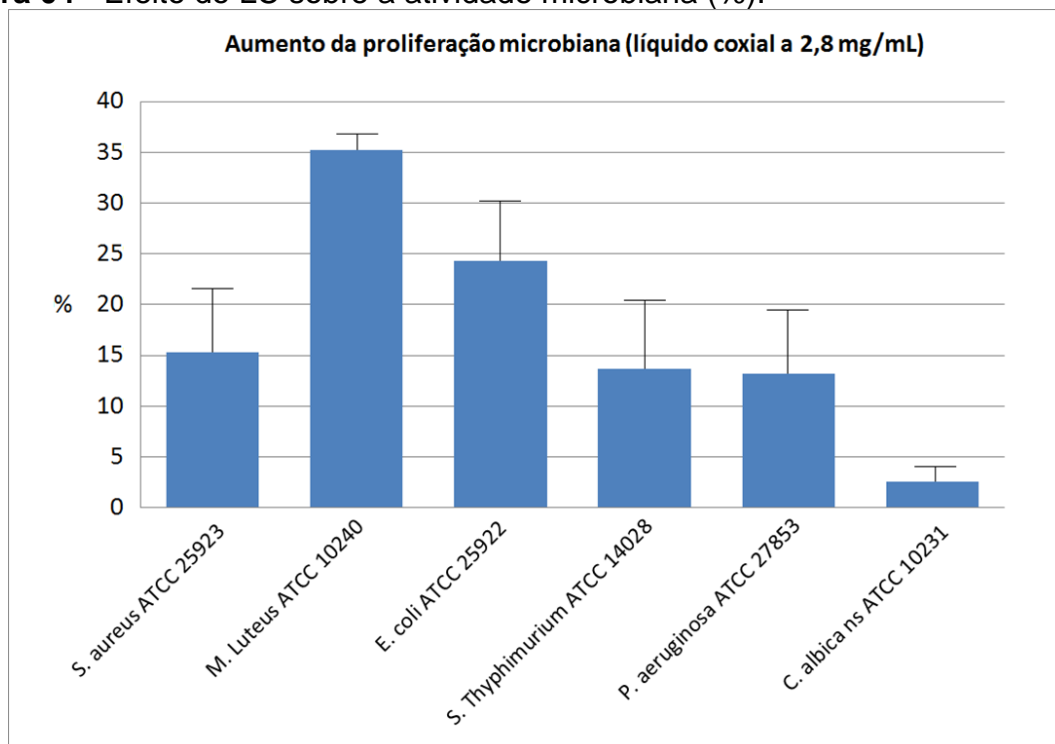
Foi realizado um “pool” com as amostras de LC armazenadas no freezer -20 °C. Esse material foi esterilizado com filtros 0,22 µm de corte e aliqotado em fluxo laminar. Este material foi utilizado em todos os experimentos. Os resultados estão demonstrados na **tabela 1**.

**Tabela 01** - Obtenção da amostra do líquido coxal

	Vol (ml)	[mg/ml]	Total de proteínas (mg)
Antes de filtrar	13	6,24	81,12
Após filtrar	12,7	5,6	71,12

**Fonte:** Próprio autor, 2023.

A princípio foi realizado um teste do LC (0,14 µg/poço) sobre a atividade de proliferação microbiana. Na **Figura 04** pode-se perceber que as bactérias *S. aureus*, a *S. Typhimurium* e a *P. aeruginosa* apresentaram valores aproximados na proliferação celular entre 13 e 15 %, já a bactéria *M. luteus* promoveu cerca de 35 % de proliferação, e em segundo lugar foi a *E. coli* com 24,30 %, ao passo que a *C. albicans* apresentou a menor atividade proliferativa com 2,57 % (Tabela 01). Então o próximo passo foi testar atividade microbiana com o LC fracionado (**Tabela 02**).

**Figura 04** - Efeito do LC sobre a atividade microbiana (%).

O teste foi realizado em caldo Mueller-Hinton (bactérias) e Sabouraud Dextrose (levedura). Amostra 50 µl/ poço (0,14µg/poço) em placa de 96 poços de fundo chato. Incubação por 24 horas a 37 °C, leitura a 595 nm no Espectrômetro. Teste em triplicata. Cálculo do porcentual de inibição do crescimento microbiano:

% de inibição = 100 – [Abs do microrganismo tratado x 100 / Abs do microrganismo não tratado].

**Fonte:** Marcia Regina Franzolin.

**Tabela 02** - Efeito do líquido coxal sobre a atividade microbiana.

	<i>S. aureus</i>	<i>M. luteus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
Média Aumento (%)	15,29	35,25	24,3	13,68	13,19	2,57
D.P *	6,33	1,62	5,89	6,83	6,27	1,5

Desvio Padrão\*

**Fonte:** Próprio autor, 2023.

Nesta etapa a atividade microbiana foi testada com as frações do LC, obtidas a partir do fracionamento com os filtros de 10, 30 e 50 kDa (Vivaspin, GE). E os resultados do fracionamento estão apresentados na **tabela 03**.



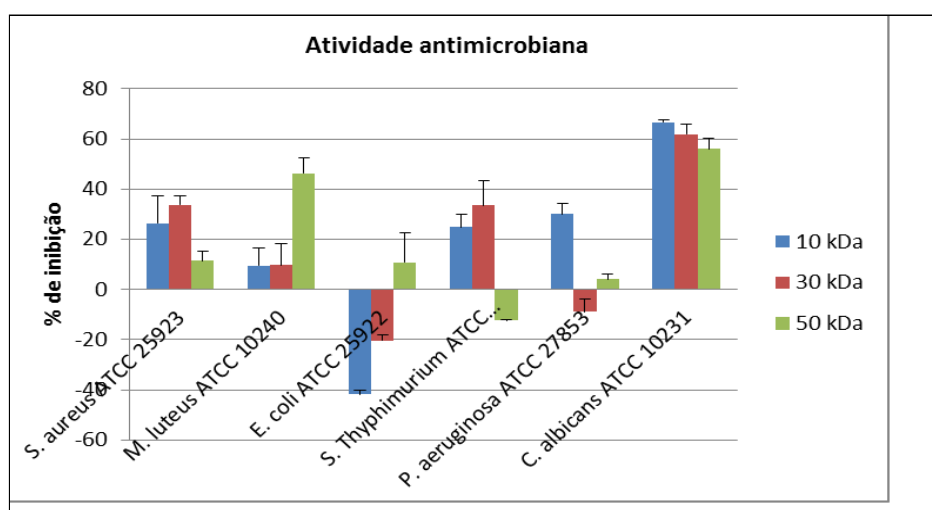
**Tabela 03** - Fracionamento do líquido coxal, utilizando membranas com corte de 10, 30 e 50 kDa.

	Vol (mL)	[mg/mL]	Total de proteínas (mg)
Amostra inicial	8,5	5,6	47,6
10 kDa	1,9	2,952	5,608
30 kDa	5	3,139	15,695
50 kDa	2	0,524	1,048

Fonte: Próprio autor, 2023.

Nesta etapa a atividade microbiana foi testada com as frações de 10, 30 e 50 kDa. E podemos observar na **Figura 05** que as três frações do LC apresentaram importante atividade inibitória sobre o crescimento celular da *C. albicans*. Quando observamos a atividade das frações sobre a *M. luteus*, podemos ver que a fração de  $\geq 50$ kDa apresentou 46,23 % de inibição. *E.coli* apresentou proliferação com as frações de 10 e 20 kDa. As frações de 50 kDa e de 30 kDa das bactérias *S. typhimurium* e *P. aeruginosa*, respectivamente, promoveram pequena proliferação (**Tabela 04**).

**Figura 05** - Teste da atividade das frações do LC de  $\leq 10$ ,  $\leq 30$  e  $\geq 50$  kDa sobre o crescimento microbiano.



Teste realizado em caldo Mueller-Hinton (bactérias) e Sabouraud Dextrose (levedura). Amostra 50 µl/poço, em placa de 96 poços. Incubação por 24 horas a 37 °C, leitura a 595 nm. Teste em triplicata. Concentração bacteriana ( $1,5 \times 10^5$  UFC/ml). Cálculo do percentual de inibição do crescimento microbiano: % de inibição =  $100 - [\text{Abs do microrganismo tratado} \times 100 / \text{Abs do microrganismo não tratado}]$ . **Fonte:** Marcia Regina Franzolin.

**Tabela 04** - Efeito das frações de  $\leq 10$ ,  $\leq 30$  e  $\leq 50$  kDa sobre o crescimento microbiano.

Amostras/ Média Inibição (%)	<i>M. luteus</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
10 kDa	9,42	24,77	29,97	66,59
D.P*	6,9	5,17	4,37	1,13
30 kDa	9,75	33,55	8,87	61,9
D.P*	8,36	9,69	5,16	3,96
50 kDa	46,23	12,38	4,08	55,0
D.P*	6,36	0,57	1,99	4,2

**Fonte:** Próprio autor, 2023.

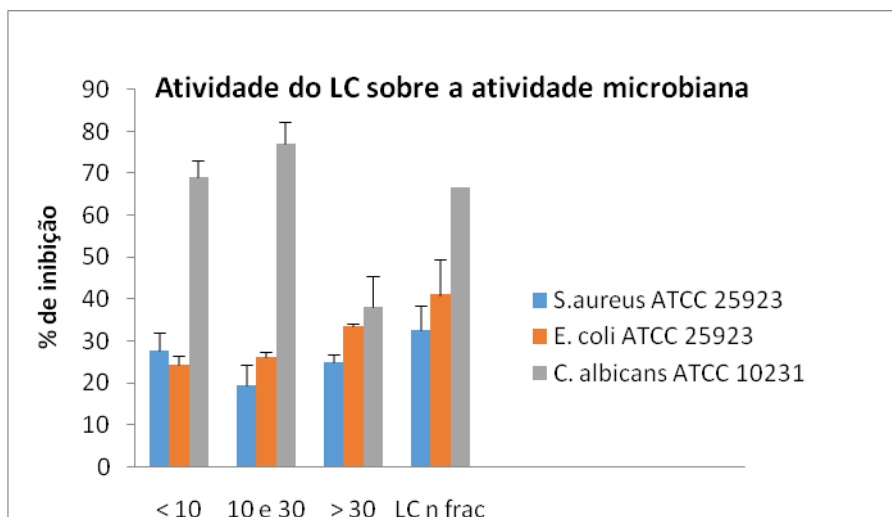
No teste seguinte fracionamos o LC e obtivemos três amostras de  $\leq 10$ , 10-30 e  $\geq 30$  kDa (**Tabela 05**), e se averiguou a atividade antimicrobiana do LC. Através da **figura 06** nota-se que a *C. albicans* repetiu o padrão de inibição do crescimento celular e que provavelmente a principal ação está na fração entre 10 e 30 kDa com 77 % de inibição. Já as bactérias apresentaram menor porcentagem de inibição, entretanto é possível observar uma variação de atividade relacionada às massas moleculares das amostras (**Tabela 06**).

**Tabela 05** - Fracionamento do líquido coxal, e obtenção das frações de  $\leq 10$ , 10-30 e  $\geq 30$  kDa.

Amostra (kDa)	Vol. filtrado (ml)	A280 nm [mg/ml]	Proteína total (mg)
$\leq 10$	02,8	1,581	4,43
10-30	3	2,211	5,53
$\geq 30$	0,5	0,249	0,125

**Fonte:** Próprio autor, 2023.

**Figura 06** - Teste da atividade das frações do LC de  $\leq 10$ , 10-30 e  $\geq 30$  kDa sobre a atividade antimicrobiana.



**Fonte:** Dra. Marcia Regina Franzolin.

Teste realizado em caldo Mueller-Hinton (bactérias) e Sabouraud Dextrose (levedura). Amostra 50  $\mu$ l/ poço, em placa de 96 poços. Incubação por 24 horas a 37 °C, leitura a 595 nm. Teste em triplicata. Concentração bacteriana ( $1,5 \times 10^5$  UFC/ml). Cálculo do percentual de inibição do crescimento microbiano: % de inibição =  $100 - [\text{Abs do microrganismo tratado} \times 100 / \text{Abs do microrganismo não tratado}]$ .

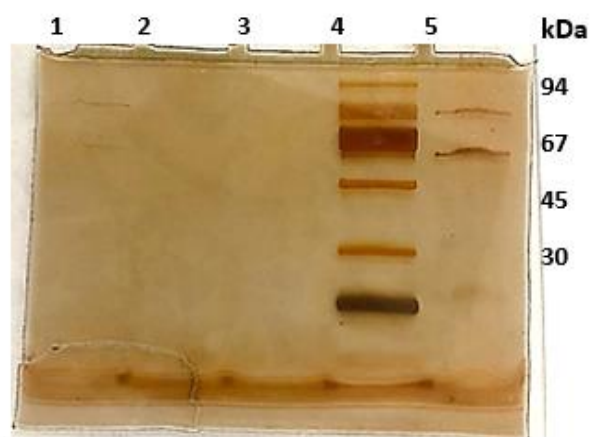
**Tabela 06-** Tabela Atividade antimicrobiana do líquido coxal fracionado  $\leq 10$ , 10-30 e  $\geq 30$  kDa

Inibição (%)	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>
<10	27,583	24,266	69,1
10 e 30	19,486	26,063	77,04
>30	24,92	33,58	38,08

**Fonte:** Próprio autor, 2023.

As amostras provenientes do fracionamento foram submetidas à eletroforese SDS-PAGE 12,5 a fim de confirmar o fracionamento. Entretanto não foram observadas as bandas nitidamente (**Figura 07**).

**Figura 07** - Análise eletroforética (SDS-PAGE 12,5%) do líquido coxal bruto e as frações de 10, 10-30 e 30 kDa.



**Fonte:** Próprio autor, 2022.

Análise do líquido coxal fracionado e bruto. **1.**  $\geq 30$  kDa (4  $\mu$ g); **2.**  $\leq 10$  kDa (3  $\mu$ g); **3.** 10-30 kDa (3  $\mu$ g); **4.** Padrão de Massa molecular (GE), **5.** LC bruto (7  $\mu$ g). Sem redução por  $\beta$ -mercaptoetanol. Coloração do gel por Nitrato de Prata (Morrisey, 1981).

## 5 DISCUSSÃO

Durante a execução deste trabalho foi realizado um extenso levantamento bibliográfico, mas não foram encontrados artigos relacionados à atividade moduladora do líquido coxal (LC) sobre o crescimento/inibição da proliferação microbiana, sendo assim nos parece ser inédito os resultados aqui expostos, e sujeitos a serem discutidos.

Durante o período de hematofagia, os carrapatos secretam saliva que contém moléculas farmacologicamente ativas dirigidas contra o sistema imune e hemostático do hospedeiro (Ribeiro *et al.*, 1985; Maritz-Olivier *et al.*, 2007). As glândulas salivares são vitais para o sucesso biológico dos carrapatos, sendo uma das principais rotas de transmissão dos microrganismos (Madison-Antenucci *et al.*, 2020; Márquez-Jiménez *et al.*, 2005; Bowman; Sauer, 2004). Sendo por isso, os carrapatos, considerados o segundo grupo que maior número de patógenos transmitem, sendo superados apenas pelos culicídeos, transmitindo uma diversidade de vírus, bactérias, protozoários, fungos e nematódeos (Sonenshine *et al.*, 2014). Também foi relatado a presença de microrganismos como as riquetsias em amostras de líquido coxal (Weyer *et al.*, 1975), podendo também ser considerada como uma rota de microrganismos em carrapatos (Márquez-Jiménez *et al.*, 2007).

Diante dessas informações, neste estudo, nossa hipótese é que no líquido coxal do *O. brasiliensis*, contenha moléculas capazes de promover a proliferação ou inibição de determinados microrganismos, modulando a atividade e capacidade de infectividade dos microrganismos, visto que o líquido coxal permanece no local da picada do carrapato. Dessa forma, todo o líquido liberado pelos *O. brasiliensis* durante o ingurgitamento, foi coletado em gelo seco e armazenado a -20 °C até o uso.

Optamos em trabalhar com um “pool” de amostras de LC coletadas durante alguns meses, para que pudéssemos prosseguir com os experimentos sem as alterações normais que amostras de origem animal podem sofrer, assim após a esterilização do LC ainda tínhamos uma boa quantidade de material (~70 mg de proteína) o que pode ser visto na tabela 01, mas não foi suficiente para terminar todos os testes.

O primeiro teste foi realizado com o LC bruto (Figura 04, tabela 02), e interessante, observamos que as bactérias *S. aureus*, *S. typhimurium* e a *P. aeruginosa* apresentaram respectivamente 15,29, 13,68 e 13,19 % aumento da

proliferação microbiana, sugerindo que a distinção entre bactérias Gram-positivas ou negativas não interfira nos resultados com o LC, diferentemente visto em um estudo realizado na Hungria sobre a microbiota de carrapatos, encontrou majoritariamente bactérias Gram-positivas, sendo os gêneros mais frequentes *Staphylococcus* e *Bacillus*, onde a sua proporção numérica aumentava conforme os estágios biológicos dos carrapatos (Egyed, 2013), sugerindo que a ação do líquido coxal seja externa ao carrapato. Com relação à bactéria *M. luteus* observou-se a maior porcentagem de proliferação com 35,25 %, interessante, foi relatado em estudos anteriores a presença de um peptídeo antimicrobiano que fica na região entre o ovário e o órgão genital dos carrapatos fêmeas, denominada microplusina, que possui uma reação contra cepas de Gram-positivas, tendo uma atividade anti-*Micrococcus luteus*, que acarreta uma deficiência respiratória na bactéria (Esteves, 2009; Silva, 2009), embora nos nossos testes a *M. luteus* tenha apresentado a maior porcentagem proliferativa quando comparada aos outros microrganismos, que foi na ordem de 35,25 % pode ser considerada modesta, visto que a micropulsina é um peptídeo de 10.204 kDa, e que poderia ter passado pelo sistema de membranas das glândulas coxais.

Com relação à *Escherichia coli* tivemos como resultado um aumento não muito significativo da proliferação em 24,30 %, foi documentado que para controle do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae), a bactéria *E. coli* é utilizada como controle biológico para evitar prejuízos na pecuária bovina pois eles acabam dificultando a manutenção populacional do carrapato (Junior, 2012).

O que nos chamou a atenção foi a pequena porcentagem de proliferação da levedura *C. albicans*, com 2,57 %, sugerindo que o carrapato *O. brasiliensis* possua algum mecanismo contra o crescimento dessa levedura, relacionado a resposta imune inata, pois demonstram em estudos anteriores, que carrapatos da espécie *Ornithodoros moubata* possuem um sistema de defesa eficiente para combater infecção na hemocele pelo fungo *Candida haemulonii*, através de fagocitose (Loosová et al., 2001) e o carrapato *O. savignyi* secreta proteínas na hemolinfa capazes de combater a *C. albicans* (Stopforth; Neitz; Gaspar, 2010).

No primeiro fracionamento do LC (10, 30 e 50 kDa) pudemos observar que as frações promoveram diferentes atividades nos microrganismos, como por exemplo sobre a *M. luteus*, podemos ver que a fração de  $\geq 50$  kDa apresentou 46,23 % de inibição. *E. coli* apresentou proliferação com as frações de 10 e 20 kDa. As frações

de 50 kDa e de 30 kDa das bactérias *S. typhimurium* e *P. aeruginosa*, respectivamente, promoveram pequena proliferação, mas as três frações do LC apresentaram importante atividade inibitória sobre o crescimento celular da *C. albicans*, entretanto a fração de 10 kDa apresentou maior inibição microbiana. O que sugere que no LC possa conter diversas moléculas (Tabela 04).

Seguindo essa possibilidade da existência de um arsenal de moléculas pode proporcionar uma relação ecológica de mutualismo. Soares *et al* 2000, fala em seu artigo que as bactérias vivem em simbiose com os carrapatos. As bactérias podem morrer em cada estágio de muda ou o excesso de bactérias em seu corpo pode lesionar seus órgãos levando o carrapato à morte, esse sistema pode ser um mecanismo de defesa do corpo do carrapato para diminuir a carga de bactérias de seu corpo. Em nossos testes notamos que as bactérias proliferam em líquido coxal, umas mais que outras. Poderíamos considerar que as bactérias ao passarem pelas glândulas salivares e hemolinfa pode ocorrer adaptação desses microrganismos para então ambos viverem em simbiose, fortalecendo o sistema imunológico do carrapato contra esses patógenos, assim podendo se proliferar sem matar o carrapato e o mesmo servindo como transmissor.

No segundo fracionamento, procuramos separar as frações em menor faixa  $\leq 10$ , 10-30 e  $\geq 30$  kDa. E mais uma vez notou-se que a *C. albicans* repetiu o padrão de inibição do crescimento celular e que provavelmente a principal ação está na fração entre 10 e 30 kDa com 77 % de inibição. Já as bactérias apresentaram menor porcentagem de inibição, entretanto foi possível observar que na fração de  $\leq 10$  kDa a inibição foi maior para a *S. aureus* e a fração entre 10 e 30 kDa promoveu maior inibição para a *E. Coli* (Tabela 06).

Muitos medicamentos de uso no combate contra fungos causam efeitos colaterais como nefrotoxicidade, febre com calafrios, desconforto gastrointestinal, exantema, hepatotoxicidade, enterocolite em alguns casos supressão da medula óssea. A anfotericina B e os azóis (cetoconazol, fluconazol e itraconazol) são considerados de primeira linha, sendo os primeiros a serem escolhidos para o tratamento contra infecções fúngicas (Revankar, 2021).

Acredita-se que fármacos de origem natural pode ser uma opção para resultados mais satisfatórios com menor chance de acarretar efeitos colaterais graves. Em nosso estudo quando testamos o LC sobre a levedura *C. albicans*, foi

demonstrado uma importante atividade inibitória, e essa atividade deverá ser melhor explorada nas próximas etapas.



## 6 CONCLUSÕES

- a) O líquido coxal possui atividade moduladora sobre os microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus* (Gram-positivas), *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa* (Gram-negativas); e *Candida albicans* (levedura).
- b) O líquido coxal foi capaz de promover a inibição da proliferação celular da levedura *Candida albicans*, e que a principal atividade está na faixa entre 10 e 30 kDa.

## REFERÊNCIAS<sup>1</sup>

- ALBERTS, Bruce. **Biologia Molecular: Célula**. 5 ed. Porto Alegre; Artmed, 2010. p.1489 -1494.
- ALMEIDA A.P, MARCILI, A.; LEITE RC, et al. **Coxiella symbiont in the tick *Ornithodoros rostratus* (Acari: Argasidae)**. **Ticks Tick Borne Dis**. 2012 Sep;3(4):203-6. doi: 10.1016/j.ttbdis.2012.02.003.
- ANDREOTTI, R.; GARCIA, M. V.; KOLLER, W. W. (Ed.). **Carrapatos na cadeia produtiva de bovinos**. Brasília, DF: Embrapa, 2019. 240 p. il. color. Disponível em: < <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/1107093>>. Acesso em: 11 ago. 2022.
- ASAE - Autoridade de Segurança Alimentar e Económica. **Staphylococcus aureus**. Lisboa. Disponível em:<<https://www.asae.gov.pt/seguranca-alimentar/riscos-biologicos/staphylococcus-aureus.aspx#:~:text=45%C2%B0C.-,S.,a%20temperaturas%20inferiores%20a%20%E2%80%9320%C2%BAC>>. Acesso em: 5 dez. 2022.
- ASEAE, Autoridade de Segurança Alimentar e Económica. **Salmonella**. Portugal. Disponível em:< <https://www.asae.gov.pt/seguranca-alimentar/riscos-biologicos/salmonella.aspx>> Acesso em: 11 ago. 2022.
- BAGNOLI, Fabio; RAPPUOLI, Rino; GRANDI, Guido (Ed.). **Staphylococcus aureus: microbiology, pathology, immunology, therapy and prophylaxis**. Springer, p540. 2017.
- BARROS-BATTESTI, D.M. **Carrapatos de importância médico-veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies**. São Paulo: Instituto Butantan, 2006. 223 p. Disponível em: <<https://repositorio.butantan.gov.br/handle/butantan/3153>> Acesso em: 15 ago. 2022.
- BARROS-BATTESTI, D.M., Landulfo, G.A., Luz, H.R. et al. **Ornithodoros faccinii n. sp. (Acari: Ixodida: Argasidae) parasitizing the frog *Thoropa miliaris* (Amphibia: Anura: Cycloramphidae) in Brazil**. *Parasites Vectors* 8, 268 (2015). <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0877-3>.
- BARROS-BATTESTI, Darci Moraes. **Immature argasid ticks: diagnosis and keys for Neotropical region**. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria*. v. 22, n. 4, p. 443-456, 10 dez. 2013. doi: <https://doi.org/10.1590/S1984-29612013000400002>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbpv/a/dJdWbZBqqJtCzBwGccRqGvn/?format=pdf&lang=en>. Acesso em: 11 maio 2022.
- BATTESTI, D. M.; ONOFRIO, V. C.; NIERI-BASTO. et al. **Ornithodoros brasiliensis Aragao (Acari: Argasidae): description of the larva, redescription of male and**

<sup>1</sup> ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação - referências - elaboração. Rio de Janeiro: ABNT, 2018.

**female, and neotype designation.** Zootaxa. Brasil, 2012, p. 22-32. Disponível em: DOI: 10.11646/ZOOTAXA.3178.1.2.

BATTESTI, D.M. **Estudos de carrapatos e pequenos mamíferos silvestres naturalmente infectados com espiroquetas semelhantes à Borrelia, no município de Itapevi.** 1998. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998. Disponível em: doi.org/10.11606/T.6.2020.tde-07042020-125020. Acesso em: 29 nov. 2022.

BECK AF, HOLSCHER KH, BUTLER JF. **Life cycle of Ornithodoros turicata americanus (Acari: Argasidae) in the laboratory.** J Med Entomol. 1986 May 30;23(3):313-9. doi: 10.1093/jmedent/23.3.313. Acesso em: 11 Mai 2022.

BEDFORD, G.A.H. **South African ticks. Part I.** Onderstepoort Journal of Veterinary Science and Animal Industry 2:49-99, 1934. Acesso em: 12 Fev 2022.

Bicho do Mato: **BlogSpot.** São Paulo, 2013. 1 p.  
Disponível em: <<http://bichodomatosauade.blogspot.com/2013/04/o-carrapato-e-febre-maculosa.html>> Acesso em: 15 jul. 2022.

BOWMAN AS, SAUER JR. **Tick salivary glands: function, physiology and future.** Parasitology. 2004;129 Suppl:S67-81. doi: 10.1017/s0031182004006468. Acesso em: 15 July.2022.

BUSH, LARRY M. **Infecções estreptocócicas.** Manual MSD. Flórida, EUA, 2021. Disponível em: <https://www.msdmanuals.com/ptbr/casa/infec%C3%A7%C3%B5es/infec%C3%A7%C3%B5es-bacterianas-bact%C3%A9rias-gram-positivas/infec%C3%A7%C3%B5es-estreptoc%C3%B3cicas>. Acesso em: 21 nov.2022.

BUSH, LARRY M. **Infecções por Staphylococcus aureus.** Manual MSD. Florida, EUA, 2021. Disponível em: <https://www.msdmanuals.com/pt-br/casa/infec%C3%A7%C3%B5es/infec%C3%A7%C3%B5es-bacterianas-bact%C3%A9rias-gram-positivas/infec%C3%A7%C3%B5es-por-staphylococcus-aureus>. Acesso em: 8 jun. 2022.

BUSH, LARRY, M. **Infecções por Salmonella.** Manual MSD, Flórida, EUA, 2022. Disponível em: <https://www.msdmanuals.com/pt-br/casa/infec%C3%A7%C3%B5es/infec%C3%A7%C3%B5es-bacterianas-bact%C3%A9rias-gram-negativas/infec%C3%A7%C3%B5es-por-salmonella>. Acesso em: 10 an. 2022.

CALDERONE RA, FONZI WA. **Virulence factors of Candida albicans.** Trends Microbiol. 2001 Jul; v.9(7):327-335. doi: 10.1016/s0966-842x(01)02094-7. PMID: 11435107. Acesso em: 25 Out 2022.

CARDOSO, Tomé Silva. **Papel do ATP na infecção de Macrófagos por Candida albicans.** Coimbra Tese (Bioquímica) - Universidade de Coimbra, Portugal, 2013.

CENBAM-. **Carrapatos Ixodídeos.** CEBAM CENTRO DE ESTUDOS INTEGRADOS DA BIODIVERSIDADE AMAZÔNICA - PPBio. Manaus, 2017. Disponível em: [https://ppbio.inpa.gov.br/ixoditeca/Informacoes\\_Gerais#:~:text=A%20fam%C3%ADlia%20Ixodidae%20%C3%A9%20a,%2C%20Dermacentor%2C%20Rhipicephalus%20e%20Haemaphysalis](https://ppbio.inpa.gov.br/ixoditeca/Informacoes_Gerais#:~:text=A%20fam%C3%ADlia%20Ixodidae%20%C3%A9%20a,%2C%20Dermacentor%2C%20Rhipicephalus%20e%20Haemaphysalis). Acesso em: 1 mar. 2023.

CIPRANDI, A; HORN, F; TERMIGNONI, C. **Saliva de animais hematófagos: Fonte de novos anticoagulantes**. Rev. bras. hematol. Hemoterapia. Porto Alegre, 2003, p. 250-262. doi: <https://doi.org/10.1590/S1516-84842003000400012> Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbhh/a/vXssFyYrRSRWqz4qVwfgWgN/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 1 mar. 2023.

COSTA G, CA, RIBEIRO, IC.T, MELO-JUNIOR O, *et al.*(2021) **Amblyomma sculptum Salivary Protease Inhibitors as Potential Anti-Tick Vaccines**. Front. Immunol. 11:611104. doi: 10.3389/fimmu.2020.611104 acesso em :11 nov 2022.

CUPP E. W. **Biology of ticks**. Vet Clin North Am Small Anim Pract. 1991 Jan;21(1):1-26. doi: 10.1016/s0195-5616(91)50001-2. PMID: 2014614.

DANTAS-TORRES F, VENZAL JM, BERNARDI L, *et al.* **Description of a new species of bat-associated argasid tick (Acari: Argasidae) from Brazil**. J Parasitol. 2012 Feb;98(1):36-45. doi: 10.1645/GE-2840.1. Acesso em: 06 set 2022.

DAVIS GE. **Observations on the biology of the argasid tick, Ornithodoros brasiliensis Aragão with the recovery of a spirochete, Borrelia brasiliensis, n. sp.** J Parasitol. 1952 Oct;38(5):473-6. PMID: 12991141.

EGYED, L.; MAKRAI, L. **Cultivable internal bacterial flora of ticks isolated in Hungary**. *Experimental and Applied Acarology*, v. 63, n. 1, p. 107–122, 2014. doi: 10.1007/s10493-013-9762-y.

ESTEVEES, E.V.S. **Células embrionárias BME26: modelo para o estudo da interação Anaplasma marginale e o carrapato Rhipicephalus (Boophilus) microplus**. 2009. Tese (Doutor em Ciências). Universidade de São Paulo. Disponível em: doi: 10.11606/T.42.2010.tde-25032010-161130. Acesso em: 06 set 2022.

ESTRADA-PEÑA A, VENZAL JM, Kocan KM, *et al.* **Observations on Antricola ticks: small nymphs feed on mammalian hosts and have a salivary gland structure similar to ixodid ticks**. J Parasitol. 2008. v94 e(4):p953-5. doi: 10.1645/GE-1371.1.

EVANS, D.E; MARTINS J,R; GUGLIELMONE, AA.; **A Review of the Ticks (Acari, Ixodida) of Brazil, Their Hosts and Geographic Distribution - 1. The State of Rio Grande do Sul, Southern Brazil**. Mem. Inst Oswaldo Cruz. v. 95, n.4, p. 453 - 470. Rio de Janeiro. 2000.

FOGAÇA, A, C. SOUSA G. PAVANELO, D.B. *et al.* **Tick Immune System: What Is Known, the Interconnections, the Gaps, and the Challenges**. Front Immunol. 23 p, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.628054>. Acesso em: 10 out. 2022.

FONSECA, AH. **Patógenos dos Carrapatos nos Animais e nos Seres Humanos**. Rio de Janeiro Tese (Medicina veterinária) - UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO, 2000. Disponível em: <http://www.adivaldofonseca.vet.br/Artigos%20publicados/Revista%20CFMV%20Suplemento%20T%C3%A9cnico%2019%2034-38%202000.pdf>. Acesso em: 29 nov. 2022.

GARCIA, M V; MATIAS, J; ALMEIDA, R F C. **Espécies de carrapatos relatadas no Estado de Mato Grosso do Sul**. Embrapa, Campo Grande. 46 p, Nov 2012.

Embrapa Gado de Corte. Disponível em:  
<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/941830/1/DOC196.pdf>  
 . Acesso em: 1 mar. 2023.

GORDON E, Davis. **Observations on the Biology of the Argasid Tick, *Ornithodoros brasiliensis* Aragão, 1923, with the Recovery of a Spirochete, *Borrelia brasiliensis*, n. sp.** The Journal of Parasitology. v.38. p.473-476. 1952. Disponível em: <https://doi.org/10.2307/3273927>. Acesso em: 1 mar. 2023.

Hoogstraal H. Argasid and nuttalliellid ticks as parasites and vectors. Adv Parasitol. 1985;24:135-238. doi: 10.1016/s0065-308x(08)60563-1. PMID: 3904345.

JAWETZ; MELNICK; ADELBERG. **Microbiologia Médica: A Ciência da Microbiologia**. Porto Alegre, 26 ed. Artmed, f. 2, 2014. disponível em: < <https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=jHtZEAQAQBAJ&oi=fnd&pg=PT7&dq=JAWETZ%3B+MELNICK%3B+ADELBERG.+Microbiologia+M%C3%A9dica.+26+ed.+Artmed,+f.+2,+2014.+A+Ci%C3%A9ncia+da+Microbiologia&ots=G9GJuXetrm&sig=OzOen3XiDkPyS8M4V8oCFQ1BRuE#v=onepage&q&f=false>>.

JUNIOR, I.S.V.; SEIXAS, A.; MASUDA, A. **Pesquisa para uma vacina contra o Carrapato**. Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular. 2012.

KAPER JB, NATARO JP, MOBLEY HL. **Pathogenic Escherichia coli**. Nat Rev Microbiol. 2004 Feb;2(2):123-40. Disponível em: doi: 10.1038/nrmicro818.

KAUFMAN, S. E. et al. **Mechanism and Characteristics of Coxal Fluid Excretion in The Argasid Tick *Ornithodoros Moubata***. J. Exp. Biol. Disponível em: doi: 1982, v 98: p.343-352. Acesso em: 15 mai 2022.

KAUFMAN, W. R.; SAVER, J. R. **Ion and water balance in feeding ticks: mechanisms of tick excretion**, p. 213-244. In OBENCHAIN, F.D.; GALUN, R. (ed.), Physiology of ticks. Pergamon Press, Oxford. 1982.

KHAN, S. GUO, L; MAIMAITI, Y. et al. **Entomopathogenic fungi as microbial biocontrol agent**. Molecular Plant Breeding, v. 3, n. 7, 2012. doi: 10.5376/mpb.2012.03.0007.

LABRUNA, M. B.; NAVA, S.; MARCILI, A.; BARBIERI, A. R.; NUNES, P. H.; HORTA, M. C.; VENZAL, J. M. **A new argasid tick species (Acari: Argasidae) associated with the rock cavy, *Kerodon rupestris* Wied-Neuwied (Rodentia: Caviidae), in a semiarid region of Brazil**. Parasites & Vectors, v. 9, n. 1, 2016. 1-15 p.

LACAZ, C.S. et al, **Tratado de Micologia médica**: Prefácio: Bertrand Dupont. 9. ed. São Paulo, Sarvier, 2002. 1104p. ilus. ISBN 85-7378-123-8.

LANDULFO GA, PEVIDOR LV, Dos Santos Sampaio J, et al. **Life cycle of *Ornithodoros mimon* (Acari: Argasidae) under laboratory conditions**. Exp Appl Acarol. 2012 Sep;58(1):69-80. doi: 10.1007/s10493-012-9567-4.

LOOSOVÁ G, JINDRÁK L, KOPÁČEK P. **Mortality caused by experimental infection with the yeast *Candida haemulonii* in the adults of *Ornithodoros moubata* (Acarina: Argasidae)**. Folia Parasitol. 2001;48(2):149-53 acesso em: 22 Mai 2022.

MADISON-ANTENUCCI S, KRAMER LD, GEBHARDT LL, et al. **Emerging Tick-Borne Diseases**. Clin Microbiol Rev. 2020 Jan 2;33(2). doi: 10.1128/CMR.00083-18. acesso em: 18 Mai 2022.

MAGRO, Cátia S. M. **Bioatividade de Líquidos Iônicos derivados do Ácido Valpróico em bactérias Gram-negativa**. Porto Alegre, 2014. 47 p Dissertação (Biotecnologia) - Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto Instituto Politécnico do Porto. Disponível em: <<https://docplayer.com.br/5267031-Bioatividade-de-liquidos-ionicos-derivados-do-acido-valproico-em-bacterias-gram-negativa.html>>.

MANS BJ, FEATHERSTON J, KVAS M, et al. **Argasid and ixodid systematics: Implications for soft tick evolution and systematics, with a new argasid species list**. Ticks Tick Borne Dis. 2019; v10(1):219-240. doi: 10.1016/j.ttbdis.2018.09.010.

MANS BJ, KLERK D, PIENAAR R. et al. **Correction: The Mitochondrial Genomes of Nuttalliella namaqua (Ixodoidea: Nuttalliellidae) and Argas africanus (Ixodoidea: Argasidae): Estimation of Divergence Dates for the Major Tick Lineages and Reconstruction of Ancestral Blood-Feeding Characters**. PLoS One 2013 Jul 31;8(7):10.1371/annotation/19fe1c45-57c3-4008-9733-ebdf39202075. doi: 10.1371/annotation/19fe1c45-57c3-4008-9733-ebdf39202075. Acesso em: 15 jul. 2022.

MARITZ-OLIVIER C, STUTZER C, JONGEJAN F, et al. **Tick anti-hemostatics: targets for future vaccines and therapeutics**. Trends Parasitol. 2007 Sep;23(9):397-407. doi: 10.1016/j.pt.2007.07.005. Acesso em: 08 Feb 2022.

MÁRQUEZ-JIMÉNEZ FJ, HIDALGO-PONTIVEROS A, CONTRERAS-CHOVA F. et al. **Las garrapatas (Acarina: Ixodida) como transmisores y reservorios de microorganismos patógenos en España [Ticks (Acarina: Ixodidae) as vectors and reservoirs of pathogen microorganisms in Spain]**. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2005 Feb;23(2):94-102. Spanish. doi: 10.1157/13071613.

MARTINS, Joao Ricardo et al. **Occurrence of Ornithodoros brasiliensis Aragão (Acari: Argasidae) in São Francisco de Paula, RS, Southern Brazil**. Neotropical entomology, v. 40, p. 143-144, 2011. doi: 10.1590/s1519-566x2011000100022.

MASSARD, C.L; FONSECA, A.H. **Carrapatos e doenças transmitidas comuns ao homem e aos animais**. Rio de Janeiro. 15 p. Revisão, Rio de Janeiro, 2004.

MCDERMOTT PF, WALKER RD, WHITE DG. **Antimicrobials: modes of action and mechanisms of resistance**. Int J Toxicol. 2003 Mar-Apr;22(2):135-43. doi: 10.1080/10915810305089.

MORRISSEY JH. Silver. **stain for proteins in polyacrylamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity**. Anal Biochem. 1981 Nov 1;117(2):307-10. doi: 10.1016/0003-2697(81)90783-1.

MUÑOZ-LEAL S, MARTINS MM, NAVA S, et al. **Ornithodoros cerradoensis n. sp. (Acari: Argasidae), a member of the Ornithodoros talaje (Guérin-Ménéville, 1849) group, parasite of rodents in the Brazilian Savannah**. Ticks Tick Borne Dis. 2020 Sep;11(5):101497. doi: 10.1016/j.ttbdis.2020.101497.

NATARO JP, KAPER JB. **Diarrheagenic Escherichia coli**. Clin Microbiol Rev. 1998 Jan;11(1):142-201. doi: 10.1128/CMR.11.1.142.

NAVA S, BEATI L, LABRUNA MB, et al. **Reassessment of the taxonomic status of *Amblyomma cajennense* () with the description of three new species, *Amblyomma tonelliae* n. sp., *Amblyomma interandinum* n. sp. and *Amblyomma patinoi* n. sp., and reinstatement of *Amblyomma mixtum*, and *Amblyomma sculptum* (Ixodida: Ixodidae).** Ticks Tick Borne Dis. 2014 Apr;5(3):252-76. doi: 10.1016/j.ttbdis.2013.11.004.

NOGUEIRA, Joseli Maria R., MIGUEL, Lucieny de Faria S. **Conceitos e Metodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde: Bacteriologia.** Vol 4. Rio de Janeiro; EPSJV, IOC 2013. P. 288 – 230.

OLIVEIRA, Jeferson Carvalhaes de. **Tópicos em Micologia Médica.** 3 ed. Rio de Janeiro; 2014. 230 p.

OLIVER, J.H. **Biology and systematics of ticks (Acari: Ixodida).** Annual Review Of Ecology and Systematics 20:397-430, 1989. doi: <https://doi.org/10.1146/annurev.es.20.110189.002145>.

RAMIREZ DG, LANDULFO GA, ONOFRIO VC, et al. **Laboratory life cycle of *Ornithodoros brasiliensis* (Acari: Argasidae): An endemic tick from southern Brazil.** Ticks Tick Borne Dis. 2016; v7(5):p730-733. doi: 10.1016/j.ttbdis.2016.03.001.

RAMIREZ, Diego Garcia. ***Ornithodoros brasilienses* (Acari: Argasidae): estudos morfológicos de larvas e adultos, ciclo biológico em condições laboratoriais e investigação e diagnóstico de *Rickettsia* spp.** Tese (Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012. doi:10.11606/D.10.2012.tde-03072013-113757.

RECK J, J. **Caracterização do parasitismo por *Ornithodoros brasiliensis* (Chelicerata: Argasidae) e da toxicose induzida em humanos e animais,** Tese (Universidade Federal do Rio Grande do Sul) Porto Alegre, 2011 Disponível em <https://lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/33237/000787826.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 7 nov. 2022.

RECK J, MARKS FS, GUIMARÃES JA, et al. **Epidemiology of *Ornithodoros brasiliensis* (mouro tick) in the southern Brazilian highlands and the description of human and animal retrospective cases of tick parasitism.** Ticks Tick Borne Dis. 2013 Feb;4(1-2):101-9. doi: 10.1016/j.ttbdis.2012.09.004.

RECK J, SOARES JF, TERMIGNONI C, et al. **Tick toxicosis in a dog bitten by *Ornithodoros brasiliensis*.** Vet Clin Pathol. 2011 Sep;40(3):p356-60. Disponível em: doi: 10.1111/j.1939-165X.2011.00338. x.

REVANKAR, SANJAY G. **Antifúngicos.** Manual MSD. Florida, EUA, 2021. Disponível em: <https://www.msdmanuals.com/pt-br/profissional/doen%C3%A7as-infecciosas/fungos/antif%C3%BAngicos>. Acesso em: 8 jun. 2022.

RIBEIRO CC, FACCINI JL, CANÇADO PH, et al. **Life cycle of *Ornithodoros rostratus* (Acari: Argasidae) under experimental conditions and comments on the host-parasite relationship in the Pantanal wetland region, Brazil.** Exp Appl Acarol. 2013 Sep;61(1):p139-46. doi: 10.1007/s10493-013-9669-7.

- RIBEIRO JM, MAKOUL GT, LEVINE J, et al. **Antihemostatic, antiinflammatory, and immunosuppressive properties of the saliva of a tick, Ixodes dammini.** J Exp Med. 1985 Feb 1;161(2):332-44. doi: 10.1084/jem.161.2.332.
- ROTHSCHILD LJ, MANCINELLI RL. **Life in extreme environments.** Nature. 2001 Feb 22;409(6823):1092-101. doi: 10.1038/35059215. Acesso em: 3 fev 2020.
- SANAR. **Resumo de Pseudomonas aeruginosa: epidemiologia, patogenia, resistência e tratamento.** 2021. Disponível em: <<https://www.sanarmed.com/resumo-de-pseudomonas-aeruginosa-epidemiologia-patogenia-resistencia-e-tratamento>> Acesso em: 11 mai. 2022.
- SANTANA, Diorgenes P., RIBEIRO EL, MENEZES ASC, et al. **Novas abordagens sobre os fatores de virulência de Candida albicans: New approaches on virulence factors of Candida albicans.** Salvador, 2013, p. 229-233(Unidade Universitária de Ciências Exatas e Tecnológicas) - Universidade Estadual de Goiás.
- SILVA, FRANCINALDO S.A **importância hematofágica e parasitológica da saliva dos insetos hematófagos**, v. 3, f. 3. 3 p. (Ciências Agrárias e do Ambiente) - UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO, Maranhão, 2009.
- SOARES, C.O, ISHIKAWA, MM. FONSECA A.H et al. **Borrelíoses, agentes e vetores: Borrelíoses, agents and vectors: Review article.** Pesq. Vet. Bras. 20(1): p1-19, Rio de Janeiro, 2000 Tese. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/pvb/a/krVbCNMtDpcLWDNGt5gg8VL/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 13 dez. 2022.
- SONENSHINE, Daniel E; ROE, R. **Michael.Biology of Ticks.** 2 ed. New York: Library of Congress Cataloging-in-Publication, v. 2, 2014.
- SPOLIDORIO D M P, BORIOLLO MFG, Estrela C, et al. **Diferentes métodos fenotípicos para isolamento e identificação de espécies de Candida.** Robrac, 18 (45) 2009.
- STOPFORTH E, NEITZ AW, GASPAR AR. **A proteomics approach for the analysis of hemolymph proteins involved in the immediate defense response of the soft tick, Ornithodoros savignyi, when challenged with Candida albicans.** Exp Appl Acarol. 2010 Aug;51(4):309-25. doi: 10.1007/s10493-010-9338-z.
- SUSSMAN, Max et al. (Ed.). **Escherichia coli: mechanisms of virulence.** Cambridge University Press, 1997. Disponível em: <[https://books.google.com.br/books?hl=ptBR&lr=&id=7vFpeDcjBH0C&oi=fnd&pg=PR11&ots=fPYe8vs87N&sig=NVIEFJq\\_kbq2d49VT32XSlTJ4mk&redir\\_esc=y#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.br/books?hl=ptBR&lr=&id=7vFpeDcjBH0C&oi=fnd&pg=PR11&ots=fPYe8vs87N&sig=NVIEFJq_kbq2d49VT32XSlTJ4mk&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false)>.
- TORTORA, G.J.; CASE, C.L.; FUNKE, B.R. **Microbiologia.** Editora Artmed. 12° ed. 964 p. 2016.
- VIEIRA, Adriana Maria L. et al. **Manual de Vigilância Acarológica - Estado de São Paulo.** SUCEN Secretaria de Estado da Saúde Superintendência de controle de Endemias São Paulo, 2002. Acesso em: 29 nov. 2022.
- VIEIRA, Ana Júlia H., SANTOS, Jairo I. **Mecanismos de resistência de Candida albicans aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol e caspofungina: Mechanisms of resistance of Candida albicans to the antifungals fluconazole,**



**amphotericin B and caspofungin.** Florianópolis, 2015 Trabalho de Conclusão de Curso - Universidade Federal de Santa Catarina – Ufs.

VOET, J.G.; VOET, D. **Bioquímica.** Editora Artmed. 4 ed. 1504 p. 2002.

WEYER, F.; **Beobachtungen uber das Verhalten des Q-Fieber-Erregers (Coxiella burneti) in der Lederzecke Ornithodoros moubata** -Tropenmed Parasitol, 219-231, 2013.

ZHU, MINGHUI; ZHU, QIANG; YANG, ZHEN. **Clinical Characteristics of Patients with Micrococcus luteus Bloodstream Infection in a Chinese Tertiary-Care Hospital.** China, 2021. Disponível em: doi: 10.33073/pjm-2021-030. Acesso em: 7 nov. 2022.