

## **Avaliação do efeito da saliva do carrapato *Rhipicephalus microplus* sobre a formação de corpúsculos lipídicos em hepatócitos bovinos<sup>1</sup>**

Giuliana Xavier de Medeiros<sup>2</sup>, Felipe Vieira<sup>3</sup>, Thiago Oliveira<sup>3</sup>, Raquel Paiva<sup>4</sup>, Marco Antônio Machado<sup>5</sup>, Marta Martins<sup>5</sup>, Humberto Brandão<sup>5</sup>, Wanessa Araújo Carvalho<sup>5,6</sup>

<sup>1</sup>Agradecimento à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG

<sup>2</sup>Graduanda em Ciências Biológicas – UFJF, Juiz de Fora, MG. Bolsista PIBIC FAPEMIG. E-mail: giulianaxm@gmail.com

<sup>3</sup>Mestrando em Genética – Universidade Federal de Juiz de Fora

<sup>4</sup>Doutoranda em Genética – Universidade Federal de Juiz de Fora

<sup>5</sup>Pesquisador – Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG

<sup>6</sup>Orientador – E-mail: wanessa.carvalho@embrapa.br

**Resumo:** O carrapato bovino *R. microplus* está associado a grandes perdas econômicas na pecuária brasileira. A saliva deste parasito transmite patógenos e contém inúmeras moléculas protéicas e lipídicas capazes de modular a resposta imune do hospedeiro afim de facilitar o engurgitamento. Estudos têm associado a atividade do sistema complemento e do metabolismo lipídico à resistência a carrapatos na espécie bovina. Corpúsculos lipídicos são inclusões citoplasmáticas responsáveis pela síntese de mediadores inflamatórios. Uma vez que o fígado é o principal órgão responsável pela produção de fatores do complemento e metabolismo de lipídeos, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito da saliva de carrapato na formação de corpúsculos lipídicos de hepatócitos bovinos, *in vitro*. Para tal, foi padronizada uma metodologia para isolamento de hepatócitos a partir de fígado bovino obtido em abatedouro. Após padronização essas células foram estimuladas com saliva de carrapato e coradas com *oil red O* (ORO) para visualização de corpúsculos lipídicos. Resultados preliminares sugerem que a saliva afeta a formação dessas organelas culminando na morte de hepatócitos *in vitro*.

**Palavras-chave:** corpúsculos lipídicos, hepatócitos, saliva de carrapato

### **Effect of *Rhipicephalus microplus* tick saliva on the formation of lipid bodies in bovine hepatocytes**

**Abstract:** The cattle tick *R. microplus* is associated with great economic losses in the Brazilian cattle industry. The tick's saliva transmits pathogens and contains proteins and non proteic molecules that are able to modulate the host's immune defense and facilitate feeding. Studies have associated the activity of the complement system and the lipid metabolism to resistance to ticks in the bovine species. Lipid corpuscles are cytoplasmic inclusions responsible for the synthesis of inflammatory mediators. Since the liver is the main organ responsible for the production of complement factors and lipid metabolism, the objective of this work was to evaluate the effect of tick saliva on the formation of bovine hepatocyte lipid bodies *in vitro*. For this, a methodology was standardized for the isolation of hepatocytes from bovine liver obtained from slaughterhouse. After standardization, these cells were stimulated with tick saliva and stained with oil red O (ORO) for visualization of lipidic corpuscles. Preliminary results suggests that saliva affects formation of these organelles culminating in the death of hepatocytes *in vitro*.

**Keywords:** hepatocytes, lipid droplets, tick saliva

### **Introdução**

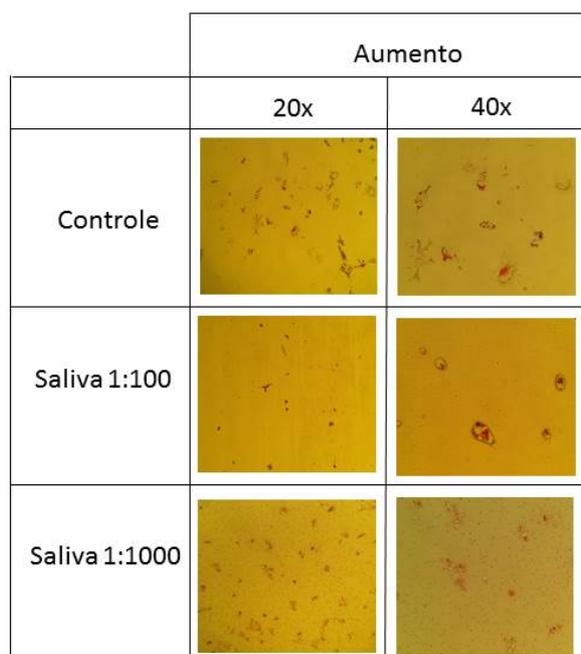
O carrapato bovino *R. microplus* está associado a perdas econômicas da pecuária brasileira, pois transmite patógenos ao seu hospedeiro e promove danos ao animal relacionados a hematofagia. Para que tenham sucesso durante a alimentação, esses parasitos devem modular o sistema imune do hospedeiro, o que acontece pela secreção de compostos imunomoduladores na cavidade hemorrágica de alimentação. A saliva do *R. microplus* é composta por importantes moléculas biologicamente ativas com atividades anticoagulatórias, antiplaquetárias, vasodilatadoras, antiinflamatórias e imunomoduladoras (WIKEL, 1996; KAZIMÍROVÁ; STIBRANIOVA, 2013) que interferem na atividade de complemento (VALENZUELA, 2000) e modulam a produção de proteínas de fase aguda em bovinos (FRANCISCHETTI; MATHER; RIBEIRO, 2005), feita, principalmente, pelo fígado. Essas moléculas modulam também a formação de corpúsculos lipídicos, que são inclusões citoplasmáticas responsáveis pela formação mediadores inflamatórios (MELO; WELLER, 2016). Conhecimentos acerca da resposta imune desenvolvida por bovinos são menos frequentes em medicina veterinária, porém essenciais para desenvolvimento de estratégias sustentáveis para controle de doenças parasitárias e infecciosas que afetam a produção e constituem ameaça a saúde pública e ambiental. Desse modo, o objetivo desse trabalho foi padronizar uma metodologia para isolamento de hepatócitos bovinos e avaliar o efeito da saliva de carrapato sobre a formação de corpúsculos lipídicos, *in vitro*, para futura prospecção de biomoléculas de interesse farmacêutico e imunomodulador.

## Material e Métodos

Para verificar o efeito imunomodulador da saliva do carrapato *R. microplus* sobre corpúsculos lipídicos, foi padronizado o isolamento e cultivo de hepatócitos bovinos. Basicamente, o lobo caudal foi excisado do fígado bovino em abatedouro local (Fripai, Juiz de Fora – MG) e armazenado em gelo até o regresso à Embrapa Gado de Leite (Juiz de Fora – MG). Para o isolamento de hepatócitos, foram utilizadas aproximadamente 5 gramas de tecido que foi fragmentado com uma tesoura e incubado em uma solução de colagenase tipo II 0,2% (Worthington Industries, OH, EUA), a 37° por 15 minutos. Após incubação a colagenase foi inativada com soro fetal bovino (SFB 10%), as células filtradas com auxílio de um *cell strainer* de 70 µm (Corning, New York, USA) e centrifugadas a 50 g por 5 minutos a 20 °C com posterior descarte do sobrenadante. As células foram submetidas a um gradiente de Percoll (densidade 1,124 g/ml; GE Health Care, Little Chalfont, UK). O pellet formado foi ressuspenso em 12,5 mL de PBS 1x, transferido para um tubo contendo e 1,2 de DMEM (4,5 g/L glicose; ThermoFisher, MA, EUA) e centrifugado a 500g por 15 min. O anel de hepatócitos foi lavado em 30 mL de meio HBSS+SFB 10% e as células ressuspenso em meio DMEM/F12+SFB 10% para análise do rendimento e viabilidade por Azul de Tripán 0,85% em Câmara de Neubauer com auxílio de microscópio invertido. Foram plaqueadas  $2,5 \times 10^6$  células por poço contendo lamínulas recobertas por uma camada de gelatina 2%. Os hepatócitos foram mantidos por 4 dias à 37°C em estufa com umidade controlada e 5% de CO<sub>2</sub>. Com 48h de cultivo, foi realizada uma troca de meio e foram adicionados os estímulos experimentais a saliva (1:100 e 1:1000). Após 48h, o meio foi retirado e as células foram cobertas com formalina 3,7% para fixação. A lamínula contendo as células foi, então, colocada sobre uma lâmina de vidro e corada com *Oil Red O* (ORO) para visualização dos corpúsculos lipídicos por microscopia.

## Resultados e Discussão

A saliva de carrapato apresenta importantes moléculas com atividade sistêmica que modulam atividade de complemento e a resposta de fase aguda (WIKEL, 1996; RIBEIRO; SPIELMAN, 1986). Estudos relacionam a atividade de complemento e do metabolismo lipídico à resistência de bovinos a carrapatos (CARVALHO et al., 2014), sendo o fígado principal órgão associado a estas atividades. Nesse sentido, foi avaliado o efeito da saliva do carrapato *R. microplus* sobre a formação de corpúsculos lipídicos em hepatócitos bovinos. Resultados preliminares sugerem que a saliva afeta a formação dessas organelas culminando na morte de hepatócitos *in vitro* (Figura 1). Conforme pode ser observado, apesar do número constante de células plaqueadas ( $2,5 \times 10^6$  células/poço), concentrações maiores de saliva parecem afetar a formação de corpúsculos lipídicos, confluência e morfologia celular em relação ao grupo controle. No entanto, serão necessárias maiores investigações acerca dessa resposta em bovinos resistentes e susceptíveis para futura prospecção de biomoléculas de interesse farmacêutico e imunomodulador.



**Figura 1. Hepatócitos bovinos estimulados com saliva do carrapato *R. microplus*.** Hepatócitos bovinos foram estimulados por 48h com saliva nas diluições de 1:100 e 1:1000 e coradas com ORO (em vermelho). Fotografias feitas em microscópio de luz branca nos aumentos de 20x e 40x.

## Conclusões

A saliva do carrapato *R. microplus* parece afetar a formação de corpúsculos lipídicos culminando na morte de hepatócitos *in vitro*.

## Agradecimentos

Esse trabalho foi realizado graças ao apoio da Embrapa Gado de Leite, do MCTI/INCT – Ciência Animal e das equipes dos laboratórios de Biologia Celular e Genética/DIP da Universidade Federal de Juiz de Fora.

## Referências

ARAÚJO-SANTOS, T.; PRATES, D.B.; ANDRADE, B. B.; NASCIMENTO D. O., CLARÊNCIO J., et al. Lutzomyia longipalpis Saliva Triggers Lipid Body Formation and Prostaglandin E2 Production in Murine Macrophages. **PLoS Negl Trop Dis** 4(11): e873, 2010.

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

FRANCISCHETTI, I.; MATHER, T.; RIBEIRO, J. Tick saliva is a potent inhibitor of endothelial cell proliferation and angiogenesis. **Thrombosis and Haemostasis**, 2005.

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

MELO, R.; WELLER, P. Lipid droplets in leukocytes: Organelles linked to inflammatory responses. **Experimental Cell Research**, v. 340, n. 2, p. 193-197, 2016.

MOSHAGE, H. Cytokines and the hepatic acute phase response. **The Journal of Pathology**, v. 181, n. 3, p. 257-266, 1997.

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.

VALENZUELA, J. G.; CHARLAB, R.; MATHER, T. N.; RIBEIRO, J. M. Purification, cloning, and expression of a novel salivary anticomplement protein from the tick, *Ixodes scapularis*. **J. Biol. Chem.** v.275, p.18717–18723, 2000.

WIKEL S. Host immunity to ticks **Annu Rev. Entomol.** 41:1-22, 1996.