

---

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR)

---

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO FIPRONIL (ingrediente ativo do  
FRONTLINE®) NOS OVÁRIOS DE CARRAPATOS *Rhipicephalus  
sanguineus* (LATREILLE, 1806) (ACARI: IXODIDAE) E NO SANGUE  
PERIFÉRICO DE ROEDORES**

**Patrícia Rosa de Oliveira**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular).

Rio Claro  
Estado de São Paulo – Brasil  
Agosto - 2010

---

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR)

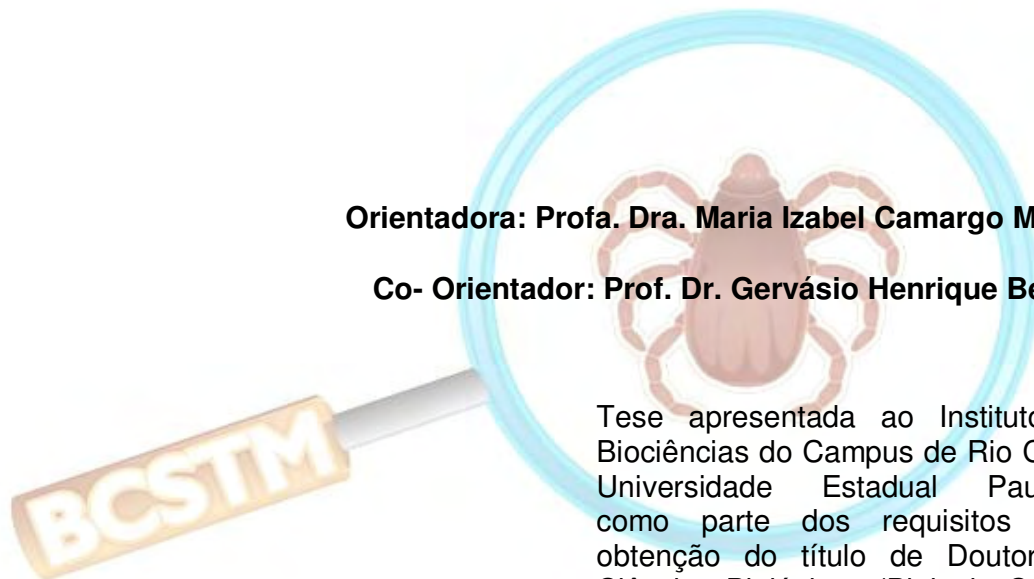
---

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO FIPRONIL (ingrediente ativo do FRONTLINE®) NOS OVÁRIOS DE CARRAPATOS *Rhipicephalus sanguineus* (LATREILLE, 1806) (ACARI: IXODIDAE) E NO SANGUE PERIFÉRICO DE ROEDORES**

**Patrícia Rosa de Oliveira**

**Orientadora: Profa. Dra. Maria Izabel Camargo Mathias**

**Co- Orientador: Prof. Dr. Gervásio Henrique Bechara**



Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular).

Rio Claro  
Estado de São Paulo – Brasil  
Agosto - 2010

595.42 Oliveira, Patrícia Rosa de  
O48aq Avaliação dos efeitos do fipronil (ingrediente ativo do FRONTLINE®) nos ovários de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) e no sangue periférico de roedores / Patrícia Rosa de Oliveira. – Rio Claro : [s.n.], 2010  
178 f. : il., figs., tabs.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro  
Orientador: Maria Izabel Camargo Mathias  
Co-orientador: Gervásio Henrique Bechara

1. Ácaro. 2. Acaricida. 3. Pesticida. 4. Citotóxico. 5. Toxicidade. 6. Organismos alvo. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI – Biblioteca da UNESP  
Campus de Rio Claro/SP

## DEDICATÓRIA

### À DEUS,

Pela oportunidade de finalizar mais uma etapa em meu caminho. Pelas inúmeras vezes que segurou em minha mão quando pensei que cairia, me levantando, guiando e fortalecendo. Obrigada por ter estado comigo quando me senti sozinha. Obrigada por ter me ensinado a crescer com os meus erros. Por suas bênçãos, pelo abrigo, proteção e pela luz em todos os momentos. Amo-te acima de tudo!!!!!!

Se o sol se pôr  
E a noite chegar,  
Tu és quem me guia.  
Se a tempestade me alcançar,  
Tu és meu abrigo.

Se o mar me submergir,  
A Tua mão  
Me traz a tona pra respirar.  
E me faz andar  
Sobre as águas.  
Tu és o Deus da minha salvação.  
És o meu dono minha paixão.  
Minha canção e o meu louvor!!!!  
Aleluia, aleluia....

**À minha mamys ODETE,**

Por sempre estar ao meu lado, torcer por mim como ninguém, me amparar e me ensinar a lutar muito por todos os meus sonhos. Você é uma benção em minha vida, é aquela que eu nunca esquecerei!

**Ao meu irmão e grande amigo GLAUBINHO,**

Pelo companheiro nas diversões, na profissão e nas dificuldades, que luta para encontrar o seu caminho e que conquista cada vez mais o seu espaço. Nosso companheirismo me faz muito feliz! Obrigada por existir!

**Ao meu pai REGINALDO,**

Por tudo o que a nossa relação é neste momento. Respeito mútuo, paciência e confiança são alguns dos responsáveis por tanta mudança! Você não conseguiria imaginar o quanto isso me faz feliz!!!

**NENHUM CAMINHO É TÃO LONGO QUANDO SE LEVA UM  
AMIGO...**

## AGRADECIMENTOS

À orientadora e amiga, Profa. Dra. MARIA IZABEL CAMARGO MATHIAS,  
Pelo apoio incondicional desde o início de tudo. A quem devo meu progresso científico e aprendizado de como se deve fazer ciência, de quem vou guardar os preciosos ensinamentos pelo resto da vida. Você conquistou toda minha estima, respeito e admiração. Agradeço de forma muito especial por me orientar e lutar comigo para conseguirmos realizar nossos objetivos.

Ao amigo e co-orientador, Prof. Dr. GERVÁSIO HENRIQUE BECHARA,  
Pelo apoio incondicional, carinho, gentileza e atenção. Como sempre, paciente e disposto a ensinar. Alguém especial que conquistou minha admiração, como pessoa e como profissional.

A minha grande amiga ALINE DA SILVA CRUZ (LI),  
Pela confiança, dedicação e atenção, pelo companheirismo e carinho, por dividir comigo suas alegrias e tristezas e por saber dar o verdadeiro significado à palavra amizade!!! Nada afeta nossa amizade, distância alguma diminuirá todo o carinho que tenho por você. Onde quer que esteja meu coração sempre estará contigo!!!!

À JAIRO BORGES de ASSUNÇÃO (Lindoooo),  
Por todos os momentos que passamos juntos até aqui!! Você chegou devagarzinho e conquistou um lugar especial em meu coração e em minha vida. É tão bom saber que tem alguém capaz de amar a dança tanto quanto eu. A dança nos uniu...isso é um ótimo início!!!!

Aos amigos, irmãos e agregados da Curva de Rio, ACEROLA,  
ARARAQUARA, CAPÃO, CHUCK, LESLEI, DANIEL, ERIKA,  
FRANGO, RAMBO, XUXINHA e OSWALDO,  
Pela acolhida, pelo companheirismo e por transformarem todo e qualquer momento em um grande acontecimento. É muito bom saber que a nossa convivência gerou uma amizade tão repleta de carinho e consideração.

Aos grandes amigos SANDRA, GABY, DEBBY, GISLAINE, NATÁLIA,  
PABLO, ALEX, LUIZ, ANDRÉ e KARIM,  
Pela convivência tão maravilhosa por tanto tempo. Por serem pessoas tão especiais e importantes em minha vida. Somos que nem vinho...melhoramos com o tempo!!!!!!

Aos grandes amigos e orientados, RICHARD, CAROLZINHA, TAMIRES,  
CAZUZA e VLAMIR,  
Por terem me dado a oportunidade de ensinar, pela confiança em meu trabalho, por tantas conversas e risadas. Vocês podem ter certeza que eu também aprendi muito com vocês. Vocês são o máximo!!!!

Aos grandes amigos ANDRÉIA, PAULINHA, BRUNO, ELLEN, EDMARA,  
IZABELA e LETÍCIA,  
Pela chegada arrasadora, vocês vieram para ficar!!!



Às amigas e irmãs fiéis da academia, TEREZA, SOLANGE, DÉBORA,  
Por tantas horas juntas, por tantas conversas e risadas...É tão bom pensar em treinar  
com vocês ali do lado. Sem preguiça e sem desânimo. Vocês são muito importantes  
em minha vida. Amo vocês!!!

Aos amigos da dança de salão, LÊEEE, LI, BIA, NATTY, MARCINHA,  
PAULINHO, DEISE e LUIZ,  
Pelos momentos maravilhosos que passei com vocês. Vocês me conheceram em uma  
etapa tão diferente da minha vida e fizeram com que cada minuto da nossa  
convivência fosse tão especial. Obrigada por me ajudarem a conhecer um mundo  
novo: a dança. Nem eu mesma tinha idéia do quanto isso poderia me fazer feliz!!!

Ao casal MARI e RODRIGO,  
Por toda a ajuda, por tanto carinho. Vocês são a prova que grandes amizades podem  
ser construídas a qualquer momento. E isso não diminui em nada a importância  
delas!!!! Saudades....

Ao meu ex-marido PAULO ARUANÃ CEZAR,  
Pelo amor mais intenso que um homem já me deu. Você se dedicou tanto a nossa  
relação...tanto carinho, atenção, segurança, companheirismo, proteção...Fomos  
felizes!!! Sinto por nossos caminhos terem seguido direções diferentes, sinto por  
talvez não ter conseguido demonstrar tanto quanto você, sinto por não ter superado  
as dificuldades. Não importa onde esteja, essa amiga aqui, estará sempre disposta a te  
ajudar! Se cuide!!

Aos irmãzinhos e irmãzinhas da Tomahawk, CUPIM, TIUZINHO,  
NANINHA, RATINHO, FERZOCA, MARCELA e GILDA,

Pela convivência harmoniosa, pelos inúmeros momentos de alegria e pela saudade deixada por aquele lar-doce-lar.

À minha ex-sogra CLEUZA COGHI e minha tia FANY ZUQUIM,

Por terem me recebido tão bem nessa família e por terem conquistado um sentimento tão puro e sincero que não será apagado e nem diminuído apesar de tantas mudanças...

Aos meus cachorrinhos (FRED, CAPITU e IARA),

Pelo companheirismo de todas as horas e por sempre me receberem com todo o seu carinho.

À Profa. Dra. CARMEM SÍLVIA FONTANETTI CHRISTOFOLETTI,

Profa. Dra. MARIA APARECIDA MARIN MORALES e ao

Prof. Dr. JOSÉ CHAUD NETO,

Pela dedicação e exemplo de como ser docente.

Ao amigo DOUGLAS PICCHI (DÚ),

Pela sua presença mesmo distante, por ter compartilhado comigo tantos momentos...

Aos FUNCIONÁRIOS DA BIBLIOTECA,

Por sempre serem atenciosos e educados, atendendo-nos da melhor forma possível.

A todos os FUNCIONÁRIOS DO DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA,

Por estarem disponível sempre que necessário e por sempre me tratarem tão bem ...

À FAPESP,

Pela bolsa de estudo e pelo financiamento do projeto de pesquisa.

Às pessoas fantásticas que passaram em meu caminho nestes anos, que deixaram muitas coisas e àquelas que passaram rápido, mas que não deixaram de ser importantes. Meu muito obrigado!

## ÍNDICE

RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	1
I. INTRODUÇÃO GERAL.....	8
II. OBJETIVOS .....	25
III. MATERIAL E MÉTODOS .....	28
<b>III. 1. SUBSTÂNCIA QUÍMICA .....</b>	<b>28</b>
<b>III. 2. ANIMAIS: CARRAPATOS <i>RHIPICEPHALUS SANGUINEUS</i>.....</b>	<b>28</b>
<b>III. 3. BIOENSAIO <i>IN VITRO</i> COM FIPRONIL.....</b>	<b>29</b>
III.3.1. Bioensaio 1 .....	29
III.3.2. Bioensaio 2 .....	30
III.3.3. Análise Estatística .....	31
III.3.4. Bioensaio Final .....	31
<b>III. 4. HISTOLOGIA DOS OVÁRIOS DOS CARRAPATOS.....</b>	<b>32</b>
<b>III. 5. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DOS</b>	
<b>CARRAPATOS.....</b>	<b>33</b>
<b>III. 6. ANIMAIS: CAMUNDONGOS .....</b>	<b>33</b>
<b>III. 7. DOSAGEM DO FIPRONIL PARA APLICAÇÃO NOS CAMUNDONGOS.....</b>	<b>34</b>
<b>III. 8. MODELO EXPERIMENTAL .....</b>	<b>34</b>
<b>III. 9. HISTOLOGIA DO FÍGADO DE CAMUNDONGOS .....</b>	<b>35</b>
<b>III. 10. HISTOQUÍMICA.....</b>	<b>35</b>
III.10.1. Técnica do Azul de Bromofenol para detecção de Proteínas (Segundo	
PEARSE, 1985):.....	36
III.10.2. Técnica de Baker para detecção de Lipídios (Modificada por	
GIOVANETTI, 2009):.....	36
III.10.3. Técnica do PAS para detecção de Polissacarídeos (Segundo	
JUNQUEIRA e JUNQUEIRA, 1983): .....	36
<b>III. 11. TESTE DO COMETA .....</b>	<b>37</b>
<b>III. 12. ENSAIO DO MICRONÚCLEO EM SANGUE PERIFÉRICO .....</b>	<b>38</b>
IV. RESULTADOS.....	41

<b>IV.1. CAPÍTULO 1.....</b>	<b>44</b>
<b>IV.2. CAPÍTULO 2.....</b>	<b>54</b>
<b>IV.3. CAPÍTULO 3.....</b>	<b>67</b>
<b>IV.4. CAPÍTULO 4.....</b>	<b>93</b>
<b>IV.5. CAPÍTULO 5.....</b>	<b>111</b>
V. DISCUSSÃO GERAL.....	131
VI. CONCLUSÕES .....	147
VII. REFERÊNCIAS.....	150

*Resumo*

---



## RESUMO

O presente estudo avaliou os efeitos do fipronil em fêmeas semi-ingurgitadas de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* por meio do desenvolvimento de protocolo adequado de bioensaio *in vitro* (AIT), monitorado diariamente, com determinação da  $CL_{50}$  (concentração 50% letal) e intervalo de confiança a 95%,  $g(95): CL_{50} = 9.647$  ppm (4.711 a 13.470), bem como analisou os efeitos histológicos e ultra estruturais deste produto nos ovários desses indivíduos, demonstrando quais são os mecanismos de defesa utilizados pelas células germinativas para eliminar o composto químico do sistema. Para o estudo morfológico, os carrapatos foram divididos em quatro grupos, onde o grupo I foi utilizado como controle e os grupos II, III e IV, foram submetidos às concentrações de 1, de 5 e de 10 ppm ( $CL_{50}$ ) de fipronil, respectivamente. As alterações variaram desde a presença de poucos e pequenos vacúolos até a interrupção da vitelogênese e morte celular. A concentração de 10 ppm de fipronil foi a que mais afetou o desenvolvimento dos ovócitos. Mecanismos de defesa celular como o aumento da quantidade e novo arranjo citoplasmático de elementos do citoesqueleto, bem como a grande quantidade de vacúolos digestivos e de figuras mielínicas foram observados. Simulando a ação do fipronil nos hospedeiros de carrapatos expostos aos acaricidas que tenham esse princípio ativo em sua composição, o presente estudo avaliou também o potencial citotóxico (danos causados nas células do fígado), genotóxico e mutagênico do fipronil utilizando camundongos submetidos a diferentes doses da droga. Os camundongos foram divididos em quatro grupos: grupo controle e grupos I, II e III, que foram expostos às doses de 15mg/Kg, 25 mg/Kg e 50 mg/Kg ( $DL_{50}$ ) de fipronil, respectivamente. Em seguida, o fígado dos indivíduos foi retirado, seccionado e analisado por meio de técnicas histológicas e histoquímicas. As alterações variaram desde a proliferação das células de Kupffer, hipertrofia dos hepatócitos, acúmulo e distribuição de proteínas, polissacarídeos, lipídios e presença de vacúolos no citoplasma dos hepatócitos, bem como a congestão dos vasos sanguíneos demonstrando principalmente a ocorrência de a) processos de autofagia, b) esteatose e c) morte celular por necrose. Para avaliação genotóxica e mutagênica, os camundongos foram divididos em 5 grupos de tratamento (5 indivíduos cada), onde o grupo I recebeu



30% da  $DL_{50}$  (15mg/Kg), o grupo II recebeu 50% da  $DL_{50}$  (25mg/Kg), o grupo III recebeu a própria  $DL_{50}$  (50mg/Kg) e os grupos IV e V, água destilada (controle negativo) e ciclofosfamida (controle positivo – 50mg/Kg), respectivamente. Em seguida, realizou-se a coleta de sangue periférico dos animais de todos os grupos para o ensaio do cometa e do teste do micronúcleo. Os resultados mostraram que as doses de 15 mg/Kg (Grupo I) e 25mg/Kg (Grupo II) de fipronil não possuem efeito genotóxico e mutagênico, exceto a dose mais alta (50mg/Kg), no tempo de 24 horas de exposição. Desta forma, este trabalho comprovou a ação tóxica do químico fipronil tanto nos carrapatos (ação deletéria - organismos alvo) quanto nos camundongos (ação citotóxica, genotóxica e mutagênica - organismos não alvo), principalmente na dose mais alta de fipronil aplicada (50mg/Kg).



*Abstract*

---



## ABSTRACT

The present study evaluated the effects of fipronil on semi-engorged females of the tick *Rhipicephalus sanguineus*. A protocol for an *in vitro* bioassay (AIT) was developed, and the  $LC_{50}$  (lethal concentration 50%) and 95% confidence interval were determined:  $LC_{50} = 9.647$  ppm (4.711 to 13.470). Histological and ultrastructural alterations in ovaries were also examined to describe the defense mechanisms of germ cells to eliminate the chemical compound from the system. For the morphological analysis, ticks were divided into four groups. Group I was used as the control group and groups II, III, and IV were exposed to concentrations of 1, 5, and 10 ppm ( $LC_{50}$ ) of fipronil, respectively. Alterations varied from the presence of few and small vacuoles to the interruption of vitellogenesis and cell death. The concentration of 10 ppm of fipronil had the strongest effect on oocyte development. Defense mechanisms of cells were observed such as increase in the amount and changes in the arrangement in the cytoskeleton elements in the cytoplasm, amount of digestive vacuoles and myelin figures. Simulating the action of fipronil in tick hosts exposed to fipronil, the present study also assessed the cytotoxic (damage caused in liver cells), genotoxic, and mutagenic potential of fipronil in mice treated with different doses. Mice were divided into four groups: control group and groups I, II, and III, which were exposed to doses of 15mg/Kg, 25 mg/Kg, and 50 mg/Kg ( $LD_{50}$ ) of fipronil, respectively. The liver of mice were dissected, sectioned, and analyzed with histological and histochemical techniques. Changes varied from proliferation of Kupffer cells, hypertrophy of hepatocytes, accumulation and distribution of proteins, polysaccharides, lipids, and presence of vacuoles in the cytoplasm of hepatocytes, as well as the obstruction of blood vessels, characterizing mainly a) autophagic processes, b) steatosis, and c) cell death by necrosis. To assess genotoxicity and mutagenicity, mice were divided into 5 groups (5 animals each): group I = 30% of  $DL_{50}$  (15mg/Kg), group II = 50% of the  $DL_{50}$  (25mg/Kg), group III =  $DL_{50}$  (50mg/Kg), group IV = negative control, and group V = positive control. Peripheral blood was collected from mice and used in the comet assay and the micronucleus test. The doses of 15 mg/Kg (Group I) and 25mg/Kg (Group II) of fipronil did not induce genotoxic or mutagenic effects, only the highest dose (50mg/Kg) 24 h after



treatment. This study demonstrated the action of fipronil at the highest dose examined (50mg/Kg) in ticks (target organisms) as well as mice (non-target organisms).

# *Introdução Geral*

---

---



## **I. INTRODUÇÃO GERAL**

Os Acari, subclasse dos aracnídeos onde se encontram os ácaros e os carrapatos (RUPPERT et al., 2005), constituem um grupo de indivíduos que variam de pequenos a microscópicos, apresentando cabeça, tórax e abdômen fundidos e não segmentados (STORER; USINGER, 1977; RUPPERT et al., 2005). Segundo Sonenshine (1991), apesar de não terem aparato para o vôo, estes indivíduos concorrem com os insetos em diversidade de espécies e de adaptações.

Carrapatos são classificados em duas famílias maiores: a Ixodidae e a Argasidae. Na primeira, os indivíduos apresentam peças bucais inseridas em uma depressão na borda anterior do corpo, o que lhes permite consumirem sangue vorazmente, bem como um escudo quitinoso, que nos machos recobre quase toda a superfície dorsal e, nas fêmeas, não vai além da metade ou de um terço da área dorsal daquelas não alimentadas. Já na segunda, o escudo está ausente e as peças bucais estão localizadas, nos adultos e nas ninfas, na face inferior do corpo, o que explica o fato desses carrapatos consumirem pouco sangue em contraste com os indivíduos da família Ixodidae (WALKER, 1994; WALL; SHEARER, 1997; REY, 2001). Há ainda uma terceira e menor família, Nutalliellidae, constituída por apenas uma espécie (SAUER et al., 1999).



O corpo dos carrapatos da família Ixodidae não é completamente esclerotizado sendo capaz de uma grande expansão quando ingurgitado com sangue e podendo ainda ter pêlos ou cerdas (RUPPERT et al., 2005).

Os carrapatos são considerados parasitas de animais vertebrados e podem ter vários hospedeiros dos quais irão se alimentar e localizam seus hospedeiros por meio da elevada eficiência de seu sistema sensorial, o qual detecta odor, vibração, mudanças de temperatura entre outros parâmetros (SONENSHINE, 1991).

Durante seu ciclo biológico, os carrapatos podem passar longos períodos fora dos hospedeiros, abrigados entre a vegetação e fendas no solo (WALKER, 1994). O fator principal que explica a habilidade dos carrapatos em sobreviver por longos períodos sem alimentação, é a capacidade de manter a quantidade de água em seu corpo e de absorvê-la do ar insaturado do ambiente (RUDOLPH; KNULLE, 1974; MCMULLEN et al., 1976; NEEDHAM et al., 1990; NEEDHAM; TEEL, 1991; SIGAL et al., 1999).

De acordo com os estudos realizados por Harwood e James (1979), os carrapatos de maneira geral possuem extraordinária capacidade de atuar como vetores de vírus, bactérias, rickettsias e protozoários, provocando doenças nos hospedeiros, os quais podem ser: animais domésticos, silvestres, aves e até mesmo o homem, devido ao fato de apresentarem as seguintes características biológicas:

- hematofagismo observado em todas as fases do desenvolvimento: o que aumenta a sua eficiência como vetor;
- fixação profunda do hipostômio nos hospedeiros: o que causa dificuldades na sua remoção e facilita a dispersão por aves e mamíferos;
- ingurgitamento lento: propiciando tempo necessário para aquisição e inoculação de patógenos;
- adaptação a diferentes hospedeiros: possibilitando a veiculação de patógenos entre as diferentes espécies;
- longevidade presente nos diversos estágios de vida: propiciando tempo para localização de seus hospedeiros ideais e para a multiplicação dos patógenos;



- transmissão transovariana de microrganismos, permitindo a geração sucessiva de indivíduos com potencial de transmití-los e funcionar como eficientes reservatórios;
- poucos inimigos naturais: pela eficiente adaptação ao ambiente;
- grande esclerotização da cutícula: propiciando resistência a adversidade climática;
- grande potencial biótico: possibilitando a perpetuação da espécie.

A fixação do carrapato no hospedeiro ocorre quando ele penetra o seu hipostômio na pele do mesmo, como consequência da ação combinada entre as quelíceras e a saliva. A digestão dos tecidos ao redor do canal de penetração do hipostômio causa ruptura dos capilares e dos vasos linfáticos do hospedeiro. O processo de alimentação ocorre por sucção do sangue do hospedeiro, alternada com a eliminação da saliva produzida pelas glândulas salivares. Grande volume de saliva é eliminado no final do processo de ingurgitamento (BALASHOV, 1972) causando o aumento da permeabilidade vascular do hospedeiro e, conseqüentemente aumentando o fluxo de sangue para o interior do carrapato (RIBEIRO, 1987).

Embora a extensão da lesão no hospedeiro e a capacidade de ingestão de sangue pelo carrapato variem independentemente da fase de desenvolvimento do indivíduo, as peças bucais das larvas, das ninfas e dos adultos de determinadas espécies penetram na pele do hospedeiro na mesma profundidade (TATCHELL; MOORHOUSE, 1970).

Os carrapatos argasídeos (ninfas e adultos) alimentam-se rapidamente de seus hospedeiros, aumentando de tamanho em minutos ou em poucas horas. Já os ixodídeos alimentam-se por longo tempo, variando de poucos dias a diversas semanas. Os ixodídeos têm a capacidade de concentrar o sangue que consomem do hospedeiro e para tanto, eliminam o excesso de água deste sangue, ou por transpiração corporal, ou pelos restos fecais, ou ainda através de suas glândulas salivares. A voracidade pela qual os carrapatos consomem o sangue do hospedeiro pode causar nestes muitos danos, principalmente quando há muitos carrapatos infestando um só indivíduo (SONENSHINE, 1991).



Moorhouse, Tatchell (1966) e Balashov (1972) descreveram as conseqüências das picadas de carrapatos nos hospedeiros: espoliação direta pelo hematofagismo; indireta pela compressão de células e de tecidos; ação mecânica pela dilaceração de células e de tecidos; ação tóxica pela saliva, além da depreciação do couro. Zumpt, Glajchen (1950) e Wall, Shearer (1997) ainda destacaram a ocorrência de paralisia de caráter motor e progressivo no hospedeiro. Além do que a ferida formada pode permitir a entrada de microrganismos, os quais poderiam causar infecções secundárias como miíases e abscessos (WALL; SHEARER, 1997).

Muitas investigações vêm sendo realizadas com carrapatos, principalmente enfocando aspectos bioeconômicos, ecológicos além de anatômicos (morfologia externa), com vistas à taxonomia (HOOGSTRAAL, 1956; TILL, 1961; OLIVEIRA et al., 2004). No que diz respeito à anatomia e morfologia interna, os estudos são mais escassos e a bibliografia muito antiga (ROBINSON; DAVIDSON, 1913; DOUGLAS, 1943; VITZTHUM, 1943). Recentemente, pesquisadores do grupo BCSTM (Brazilian Central of Studies on Ticks Morphology) têm se dedicado a realizar o estudo morfológico de vários sistemas dos carrapatos, incluindo o do sistema reprodutor e das glândulas salivares de várias espécies de importância médico-veterinária (DENARDI et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2005; SAITO et al., 2005; NUNES et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2006; SANCHES et al., 2009).

Nos carrapatos ixodídeos, o sistema reprodutor feminino consiste de um ovário tubular único e localizado na região posterior do corpo, um par de ovidutos, um útero, a vagina e um par de glândulas tubulares acessórias desembocando numa abertura genital. Na região posterior e muscular encontra-se a vagina cervical e na região anterior, a vagina vestibular que é revestida internamente por uma cutícula pregueada. Há também um receptáculo seminal que se conecta a vagina cervical e que armazena os espermatozóides introduzidos pelos machos durante a cópula (SONENSHINE, 1991).

Os ixodídeos apresentam o ovário disposto em forma de ferradura e um segundo par de glândulas acessórias, as glândulas acessórias lobulares, localizadas ao redor da vagina cervical (SONENSHINE, 1991).

Nos argasídeos, o ovário é menor do que nos ixodídeos, ocupando apenas uma secção transversal da região posterior do corpo. Os ovidutos são tão longos





quanto nos ixodídeos, porém, nos argasídeos aumenta muito de tamanho próximo de sua junção com o útero. Um par de glândulas tubulares acessórias é encontrado próximo à região de contato vagina cervical/vagina vestibular. No entanto, os carrapatos argasídeos não possuem glândulas lobulares acessórias (SONENSHINE, 1991).

O ovário dos carrapatos em geral possui algumas diferenças morfológicas e histológicas quando consideradas as famílias Argasidae e Ixodidae e até mesmo dentro dos ixodídeos (TILL, 1961; SAID, 1992; DENARDI et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2005; SAITO et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2006; SANCHES et al., 2009).

O ovário dos carrapatos é do tipo panoístico, como descrito para os insetos, não possuindo, portanto, células nutridoras (DENARDI et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2005; SAITO et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2006; SANCHES et al., 2009). Este é descrito como sendo constituído por uma parede de células epiteliais, pelos pedicelos, estruturas celulares que prendem os ovócitos à parede e por um grande número de ovócitos, os quais passam por vários estágios de desenvolvimento até estarem prontos para a oviposição (TILL, 1961; SAID, 1992; DENARDI et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2005; SAITO et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2006; SANCHES et al., 2009).

Em *Amblyomma cajennense* (Fabricius), foi descrita a ocorrência de ovócitos em cinco diferentes estágios de desenvolvimento (DENARDI et al., 2004) e, em *Amblyomma brasiliensis*, de cinco estágios de desenvolvimento (SANCHES et al., 2009). Nos ovários de *Rhipicephalus sanguineus* foram encontrados ovócitos em cinco estágios de desenvolvimento além de alguns ovócitos em processo de degeneração (OLIVEIRA et al., 2005), em *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, foram descritos seis estágios de desenvolvimento (SAITO et al., 2005).

Estudos com fêmeas de *Amblyomma triste* realizados por Ricardo et al. (2007), trouxeram novas informações a respeito da reprodução dos carrapatos, mostrando que as células do pedicelo além de prenderem os ovócitos à parede do ovário, também participariam do fornecimento de elementos que formariam o vitelo, provocando desta forma, o crescimento do ovócito. Uma vez que nos ovários panoísticos não existe a presença de células nutridoras, as células do pedicelo as substituiriam nesta função específica.



O processo de reprodução dos carrapatos, já foi descrito como sendo controlado por diversos fatores, sendo o processo de alimentação o estímulo para a reprodução, já que materiais nutritivos seriam necessários para o desenvolvimento de embriões. Dessa forma, a cópula e a alimentação seriam fatores imprescindíveis para o sucesso reprodutivo da maioria das espécies de carrapatos (SONENSHINE, 1991).

Dentro da família Ixodidae encontra-se a espécie *R. sanguineus*, conhecida popularmente como “carrapato do cão”. Seus indivíduos apresentam coloração marrom-avermelhada e são cosmopolitas (FLECHTMANN, 1973).

Todos os vertebrados superiores estão sujeitos ao ataque desse e de outros carrapatos. Entretanto, devido à endotermia os mamíferos são os hospedeiros principais. No caso do carrapato *R. sanguineus* o cão é o seu hospedeiro mais frequente (WALKER,1994), porém ele pode ser também encontrado em outros animais, como: gatos e coelhos. Dados da literatura têm demonstrado que, em diversas partes do mundo, ele pode atacar búfalos, camelos, bovinos em geral, cabras, cavalos, ovelhas, morcegos, répteis, além de várias aves que frequentam o solo (FLECHTMANN,1973) e até mesmo, em aves silvestres (SIMPSON *et al.*, 1991).

*Rhipicephalus sanguineus* é uma espécie de carrapato considerada de grande importância médico-veterinária, pois além de causar grandes perdas de sangue nos animais que ataca (hospedeiros), é também o agente transmissor de *Babesia canis*, que ataca um grande número de glóbulos vermelhos causando a babesiose ou "nambiuvu". Nesta doença, o cão doente apresenta como sinais clínicos: perda de apetite, desânimo, letargia, icterícia (amarelão) ou palidez nas mucosas (gengivas e conjuntiva) (FLECHTMANN,1973). Ainda é o vetor da *Hepatozoon canis* causando a hepatozoonose em cães na América do Sul (VICENT-JOHNSON *et al.*, 1997; O'DWYER; MASSARD, 2001). A transmissão para cães ocorre após a ingestão de carrapatos contendo oocistos maduros de *H. canis* (ALENCAR *et al.*, 1997). Este ixodídeo pode transmitir também a Ehrlichiose, que ataca as células de defesa (leucócitos) do organismo do cão, a partir de um carrapato que tenha sugado o sangue de um cão contaminado. Através de sua saliva, o carrapato infectado transmite a doença, injetando as ehrlichias para dentro da corrente sanguínea do cão (FLECHTMANN,1973; DAVOUST,1993; SIMPSON *et al.*, 1991) . Em humanos,



registros indicam que ele pode também transmitir a bactéria *Francisella tularensis* causando a tularemia. Os sintomas dessa patologia começam de 1 a 10 dias (geralmente 2 a 4 dias) após o contato com a bactéria e incluem a cefaléia, a náusea, o vômito, a febre de até 40 °C e o intenso esgotamento (WALKER, 1994).

A maioria das espécies de carrapatos do gênero *Rhipicephalus* exige climas úmidos como aqueles da região da África Tropical e dos trópicos de uma forma geral, mas *R. appendiculatus* e o *R. sanguineus* podem ser também encontradas nos climas frescos de altas altitudes do planalto africano (WALKER, 1994).

Segundo Freitas (1982), *R. sanguineus* necessita de três hospedeiros para completar o seu ciclo biológico. As fêmeas ingurgitadas destacam-se do hospedeiro e procuram abrigo para ovipositem podendo colocar até 5000 ovos. O número de ovos produzidos depende do volume de sangue ingerido e do tamanho das fêmeas. Em geral, fêmeas que consomem grande quantidade de sangue produzem mais ovos (SONENSHINE, 1991).

As larvas de *R. sanguineus* com seis pernas eclodem 20 a 60 dias após a postura dos ovos. Em seguida, estas se prendem ao primeiro hospedeiro do ciclo. Uma vez repletas de sangue elas o abandonam, mudam o exoesqueleto e passam para o estágio de ninfa com oito pernas. As ninfas logo se prendem ao segundo hospedeiro e nele se alimentam, transformando-se em adultos que procuram o terceiro hospedeiro para se fixar e se alimentar até a oviposição. O ciclo de vida pode completar-se em dois meses (FREITAS, 1982; WALKER, 1994).

Métodos para o controle de carrapatos estão sendo investigados e incluem o uso de vacinas, acaricidas sprays e de uso tópico (PETER; BROSSARD, 1998; BECHARA, 2003), o uso de predadores naturais (como a garça vaqueira *Egretta ibis* (ALVES-BRANCO et al., 1983), de parasitas como bactérias (*Escherichia coli*, *Cedecea lapagei* e *Enterobacter agglomerans*), já normalmente encontradas no aparelho reprodutor feminino do carrapato (LIPA, 1971; BRUM, 1988) e de fungos (como o *Metarhizium anisopliae*) (DA COSTA et al., 2002), o uso de feromônios (DEBRUYNE; GUERIN, 1994) e no caso do combate aos carrapatos presentes em bovinos, utiliza-se a rotação de pastagens (LIPA, 1971). Também estão sendo utilizados o controle climático, através de temperaturas abaixo de 17.5°C, precipitações pluviométricas anuais abaixo de 400mm e umidade relativa abaixo de



70% (LIPA, 1971), e o cruzamento genético de diferentes raças de gado (hospedeiro) visando aumentar naturalmente a resistência do animal (PETER; BROSSARD, 1998).

Estudos mais avançados têm aberto a perspectiva para o controle imunológico por meio da identificação, isolamento e síntese de antígenos que possam causar resposta imune protetora (produção de anticorpos), permitindo assim o desenvolvimento de vacinas contra os carrapatos (TELLAM et al., 1992; WILLADSEN, 1997).

A esse respeito, cabe salientar que para o desenvolvimento de vacinas anticarrapato, não é suficiente apenas o conhecimento da biologia do ácaro, da relação parasito-hospedeiro e dos mecanismos de resistência do carrapato. Pesquisas sobre aspectos morfo-funcionais de tecidos e de órgãos isolados de carrapatos são cruciais para a descoberta de sítios produtores de potenciais antígenos para a produção de vacinas contra esse problema nacional.

O método mais eficaz de controle para populações de carrapato ainda é o químico, por meio da aplicação de acaricidas, visto que os controles imunológico e biológico ainda possuem função complementar. No entanto, o controle químico é dispendioso, devido ao alto custo com a aquisição de produtos, de instalações e de mão-de-obra adequada para a sua aplicação (NOLAN, 1985; PRUETT, 1999).

A contaminação da carne e do leite com resíduos químicos e a contaminação do ambiente, através do solo e dos rios têm sido atualmente uma das maiores preocupações quanto ao uso de produtos químicos em geral (NOLAN, 1985; PRUETT, 1999). Ainda que seja resolvido o problema da contaminação ambiental, outro problema ainda persiste: a seleção de linhagens de carrapato resistentes aos diferentes princípios ativos utilizados (CRAMPTON et al., 1999). Isto gera um ciclo vicioso: pois uma vez que estão sendo selecionadas populações resistentes a determinados princípios ativos, há uma necessidade de se utilizar seqüencialmente acaricidas com diferentes composições; o que muitas vezes, em um curto período de tempo ou concomitantemente, acaba por selecionar populações mais resistentes ou resistentes a mais de um princípio ativo. Como ao longo destas últimas cinco décadas têm-se utilizado acaricidas com diferentes princípios químicos (arsenicais, organoclorados, organofosforados, carbamatos, nitroguanidinas, fenilpirazoles,



formamidinas, piretróides, avermectinas, lactonas macrocíclicas e fenil uréias) (HÄUSERMAN et al., 1992; COSSIO-BAYUGAR et al., 2002), diversos mecanismos de resistência foram sendo desenvolvidos como estratégia de sobrevivência pelo carrapato (HÄUSERMAN et al., 1992). É importante dizer que, uma vez que tenha sido comprovada resistência a um determinado acaricida, ela é irreversível e o emprego dessa mesma base química não terá qualquer sucesso para o controle futuro (GRILLO, 1976).

Sendo assim, novos acaricidas estão sendo testados no mercado, entre eles estão as lactonas macrocíclicas (ingrediente ativo da Ivermectina® e da Moxidectina®) e o fipronil (ingrediente ativo do Frontline®), que agem como bloqueadores da estimulação neural e o inibidor de desenvolvimento de carrapato, o fluazuron (ingrediente ativo do Acatak®) (TAYLOR, 2001). Como são relativamente novos no mercado, somente poucos casos de resistência foram detectados (SABATINI et al., 2001), entretanto ainda não se conhece bem todas as suas conseqüências, as quais são úteis para o diagnóstico das intoxicações e para a instituição de tratamento específicos (BAHIA, 1995).

O fipronil é um pesticida pertencente ao grupo químico fenil pirazol, que combate os ácaros e os carrapatos e que foi formulado pela transnacional Rhône-Poulenc Agro, em 1987. Nos EUA, sua apresentação é bastante variada com amplo espectro de aplicação, indo desde iscas atrativas para o controle de formigas e baratas até sprays de uso veterinário para controle de carrapatos, pulgas (Frontline®) e ácaros (KIDD, JAMES, 1991; POSTAL et al., 1995; PENALIGGON, 1997; HUGNET et al., 1999; HIGGINS et al. 2001).

Fipronil é uma molécula extremamente ativa e afeta o SNC (Sistema Nervoso Central) de animais invertebrados devido principalmente à interferência da passagem de íons de cloreto através do GABA, importante transmissor de impulsos nervosos (neurotransmissor) nos animais vertebrados e invertebrados, causando neste último, o descontrole do SNC, superexcitação e conseqüente morte (RHÔNE-POULENC, 1995).

As pesquisas sobre a toxicidade do fipronil apresentam resultados contraditórios. Pesquisas realizadas por Tillman e Mulrooney (1997) concluíram que o fipronil é pouco tóxico para organismos não alvo. Em contrapartida, Soares e



Busoli (2000) descreveram que este inseticida apresenta alta toxicidade para parasitóides úteis em agroecossistemas e invertebrados aquáticos.

Em animais vertebrados ainda é pouco o que se sabe a respeito de como o fipronil é metabolizado (DAS et al., 2006). Alguns experimentos utilizando ratos levaram a concluir que o fipronil seria metabolizado rapidamente e que os resíduos distribuir-se-iam amplamente nos tecidos, particularmente, no adiposo, onde permaneceriam resíduos significativos mesmo após uma semana depois de administração oral (HUGNET et al., 1999). Já Lyons (2000) observou, em seus experimentos com o fipronil, um aumento estatisticamente significativo das células da tireóide de ratos, o que provocou o aparecimento de tumores nos indivíduos de ambos os sexos. Ficou claro, portanto, que existe a possibilidade do fipronil apresentar alto potencial carcinogênico, também em humanos, apesar de ter sido enquadrado pela EPA no Grupo C (possivelmente carcinogênico para humanos). O referido autor explica ainda que a exposição por um pequeno intervalo de tempo pode causar sérios efeitos sobre o desenvolvimento de fetos e, após o nascimento, seqüelas como dificuldade de aprender, diminuição dos reflexos, esterilidade, além do aumento da suscetibilidade para câncer e para outras doenças.

Embora o fipronil seja amplamente utilizado em alguns países, inclusive no Brasil (apesar de ser proibido nas lavouras de soja), ele tem seu uso proibido na Europa, pelo alto grau de toxicidade, comprovado pelos problemas sérios registrados em organismos expostos (STEVENS et al., 1998).

Tanto o fipronil quanto outras substâncias químicas contém moléculas tóxicas que podem interferir nas células de vários organismos não alvo, dependendo da sua concentração e do tempo de exposição (RAND; PETROCELLI, 1985). No entanto, a maioria das ações tóxicas sobre os animais foi, até agora, pouco investigada (KIM; FEAGLEY, 1998; ABDEL-RAMHAN et al., 1999; VENTURA, 2004; FERNANDES, 2005). Como consequência do pouco conhecimento sobre a ação das substâncias tóxicas no meio biológico em geral, esses agentes químicos também acabam representando danos à flora e à fauna além de problemas à saúde humana.

A preocupação com a proliferação do uso de agentes químicos, como pesticidas, que quando introduzidos no ambiente levam a alterações nos organismos, foi um dos principais motivos que levou ao desenvolvimento de diversas



metodologias para avaliar a citotoxicidade e a genotoxicidade dos mesmos (BRUSHICK, 1987; VENTURA, 2004; FERNANDES, 2005).

Para se identificar a toxicidade de substâncias químicas e tentar reproduzir com maior semelhança o que aconteceria nos humanos, têm se realizados sistemas-teste *in vivo* (KURODA et al., 1992). Há dois tipos básicos de estudo: a) os co-epidemiológicos, que enfocam populações humanas e b) os experimentais, que se utilizam particularmente de roedores (IARC, 1986; IARC, 1987; HUFF et al., 1991; CAMARGO, 1994). No entanto, quando o primeiro identifica um agente perigoso, o pior já aconteceu, ou seja, os grupos humanos estudados já foram atingidos pelo efeito nocivo do químico. Assim, os estudos experimentais com roedores são os verdadeiros testes prospectivos, aos quais os agentes químicos devem ser submetidos antes de serem utilizados em qualquer atividade humana (IARC, 1986; IARC, 1987; HUFF et al., 1991; CAMARGO, 1994).

O fígado é um dos maiores órgãos do corpo dos vertebrados e encontra-se situado na cavidade abdominal, abaixo do diafragma e protegido pelo arcabouço costal (KIERSZENBAUM, 2004). É recoberto por uma cápsula de tecido conjuntivo fibroso, um revestimento seroso (peritônio visceral) que circunda a cápsula, exceto onde o fígado se adere diretamente ao diafragma ou a outros órgãos (ROSS; PAWLINA, 2008). É anatomicamente dividido em dois grandes lobos (o direito e o esquerdo) e em dois lobos menores (o quadrado e o caudado) (ROSS; PAWLINA, 2008).

Este órgão recebe sangue: (1) da veia porta (75% do volume aferente sanguíneo), que transporta o todo o sangue do trato digestório, do baço e do pâncreas; (2) da artéria hepática, que fornece 25% do sangue oxigenado para o fígado através das artérias interlobar e interlobular antes de atingir o espaço porta (KIERSZENBAUM, 2004). Graças a esta característica, de duplo suprimento sanguíneo, o fígado está em posição privilegiada para executar suas funções, recebendo grande variedade de substâncias: endobióticas, tóxicas e nutrientes (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). Além disso, por estar diretamente no caminho dos vasos sanguíneos que transportam substâncias absorvidas, ele é o primeiro órgão tanto a receber substratos metabólicos e nutrientes, como também a ser exposto às



substâncias tóxicas que foram absorvidas pelo organismo (ROSS; PAWLINA, 2008; SREELATHA et al., 2009 )

O fígado é um órgão vital, funcionando tanto como glândula exócrina quanto endócrina. A função exócrina é realizada por meio da produção da secreção biliar, que contém sais biliares, fosfolipídios e colesterol, importante para emulsificação dos lipídeos provenientes da dieta (ROSS; PAWLINA, 2008). Já a função endócrina, é representada pela capacidade de modificar a estrutura e a função de muitos hormônios (ROSS; PAWLINA, 2008). O fígado mantém o nível de glicose no sangue e regula os níveis circulantes das lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), as quais participam do transporte de triglicerídeos do fígado para outros órgãos. É capaz também de produzir a maioria das proteínas plasmáticas (ROSS; PAWLINA, 2008). Ainda é importante na captação, no armazenamento e na distribuição de nutrientes e de vitaminas da corrente sanguínea (CARVALHO; COLARES-BUZATO, 2005). Além disso, metaboliza, detoxifica e inativa substâncias tóxicas e medicamentos (HINTON; LAUREN, 1990), porém pode sofrer lesão quando sobrecarregado por estas substâncias (ROSS; PAWLINA, 2008)

Embora as mudanças decorrentes de patologias no fígado sejam geralmente descritas em relação ao lóbulo clássico, o conceito de hepatócito é apropriado para o entendimento de padrões de degeneração, alterações das atividades metabólicas e desenvolvimento de cirroses (KIERSZENBAUM, 2004).

Já a genotoxicidade avalia os danos causados por uma determinada substância no material genético das células. Desta forma, as substâncias genotóxicas podem causar anomalias reprodutivas, defeitos congênitos e, até mesmo, o câncer (HOULK, 1992).

Segundo Houlk (1992), três grandes classes de danos no DNA podem ser descritas: mutagênicos (ou de ponto), referentes às mutações no gene, que são alterações do DNA dentro de seqüências gênicas; clastogênicos, referentes às alterações da estrutura cromossômica, usualmente resultando em ganho ou perda ou rearranjo de peças cromossômicas; e aneugências, referentes ao ganho ou perda de cromossomos inteiros no complemento cromossômico.

Para se detectar a genotoxicidade de determinada substância, de acordo com Rabello-Gay et al. (1991), podem ser realizados testes em microrganismos. Estes





resultados apresentam boa correlação com o potencial carcinogênico em animais superiores e oferecem vantagens quanto ao custo e rapidez. No entanto, essa associação falha em muitos casos. Há várias explicações para esses resultados, tais como a simplicidade da estrutura e da capacidade metabólica do sistema. Assim, em geral, são mais relevantes os ensaios feitos *in vivo*, utilizando plantas, invertebrados e vertebrados.

Os micronúcleos são frequentemente usados para quantificar a exposição aos agentes químicos ou físicos (TUCKER; PRESTON, 1996). Eles são massas de cromatina semelhantes a um pequeno núcleo, resultante da condensação de fragmentos cromossômicos acêntricos (formados pela ação de agentes clastogênicos) ou cromossomos inteiros que atrasaram sua migração para os pólos na anáfase (formados pela ação de agentes aneugênicos) (SCHMIDT, 1976; MACGREGOR et al., 1980; HAYASHI et al., 1994; AL-SABTI; METCALFE, 1995). Durante a telófase, um envelope nuclear se forma ao redor do cromossomo ou do fragmento cromossômico perdido, (WALKER et al., 1996) que então se descondensa e, gradualmente, assume a forma de um núcleo interfásico, exceto pelo tamanho, visto que o micronúcleo é bem menor do que o núcleo da célula (FENECH, 2000).

Fenech (2000) afirmou que para uma estrutura ser considerada um micronúcleo, ela deveria ser morfológicamente semelhante ao núcleo principal, porém com tamanho menor, com diâmetro entre 1/16 até 1/3 do núcleo principal; além de não ser refringente, não estar ligado ou conectado ao núcleo principal e possuir a mesma intensidade de coloração do núcleo principal, embora possa, às vezes, apresentar coloração um pouco mais intensa.

Embora o micronúcleo possa se originar espontaneamente nas células filhas, a sua indução é, comumente, usada para se detectar danos genotóxicos não reparados ou reparados erroneamente induzidos nas células parentais por um agente mutagênico (HEDDLE et al., 1983; RIBEIRO, 2003).

Segundo Landolt e Kocan (1983) e Heddle et al. (1983), o teste de micronúcleo é umas das mais promissoras, baratas e rápidas técnicas de avaliação genotoxicológica.

Hayashi et al. (1998) descreveram o teste do micronúcleo como uma técnica vantajosa, pelo fato de poder ser usada em qualquer população celular em



proliferação, sem que fosse necessário o conhecimento prévio do cariótipo do organismo teste utilizado.

O teste do micronúcleo é amplamente aceito pelas agências internacionais e instituições governamentais, como parte da bateria de testes recomendada para o estabelecimento da avaliação e do registro de novos produtos químicos e farmacêuticos que entram anualmente no mercado mundial (CHOY, 2001).

Este teste ainda tem sido aplicado em estudos de antimutagenicidade (RIBEIRO, 2003), de biomonitoramento em humanos (BENNER et al., 1993; FENESH, 1993) e ecotoxicológicos (TOMA et al., 1994; MINISSI et al., 1996; GRISOLIA; STARLING, 2001), detectando e identificando agentes presentes no ar, na água e no solo que alteram o DNA dos organismos (GRISOLIA ; CORDEIRO, 2000).

O teste do micronúcleo foi, inicialmente, desenvolvido como um teste que utilizava eritrócitos policromáticos de medula óssea de roedores (SCHMIDT, 1976), e mais tarde foi estendido também a eritrócitos circulantes (MACGREGOR et al., 1980).

A técnica do micronúcleo, a partir da medula óssea, é amplamente utilizada. Segundo Schmidt (1975), nessa técnica os micronúcleos devem ser avaliados em hemáceas jovens, pois quando os eritroblastos expelem seus núcleos e se transformam em eritrócitos, os micronúcleos permanecem no citoplasma, onde são facilmente identificados devido à sua morfologia arredondada e coloração característica.

No entanto, Hayashi et al. (1990) descreveram a técnica de micronúcleo em sangue periférico pela coloração com Laranja de Acridina. Este “corante” ao se intercalar com moléculas de DNA e após ser submetido à radiação ultra-violeta emite uma fluorescência de cor amarela. Já quando se liga ao RNA, sem a capacidade de se intercalar, a fluorescência emitida é vermelha. Essas propriedades permitem a identificação dos reticulócitos, eritrócitos jovens ricos em RNA em nível citoplasmático, que se coram em vermelho pela presença desse ácido nucléico. Os micronúcleos que, por sua vez, possuem DNA em sua constituição, coram-se em amarelo e se encontram no meio ou nas bordas das regiões coradas em vermelho.



De acordo com Kishi et al. (1992), estudos comparativos entre a técnica convencional, em medula óssea e corada por Giemsa, e, a técnica que utiliza pré-coloração com Laranja de Acridina, demonstraram que ambas seriam adequadas para este tipo de avaliação. Porém, a técnica de sangue periférico apresentaria uma vantagem: um mesmo animal poder fornecer várias amostras de material, sem a necessidade de sacrifício do mesmo (CSGMT, 1992). Este fato permitiria que o perfil da frequência de micronúcleos fosse avaliado num mesmo animal ao longo de um tratamento agudo, subcrônico e crônico, além de possibilitar o estudo da recuperação deste mesmo indivíduo após a suspensão das administrações das drogas-teste.

Outro teste amplamente utilizado é o teste do cometa que visa evidenciar a corrida de fragmentos de DNA em relação ao núcleo principal, quando este é submetido a uma corrente eletroforética, produzindo figuras semelhantes a cometas. Os primeiros pesquisadores que utilizaram a quantificação direta do DNA em células individuais foram Rydenberg e Johanson em 1978 (TICE, 1995). Östling e Johanson em 1984 incluíram neste mesmo teste a eletroforese em pH semineutro (pH 9,5), o que permitiu um aumento quanto à sensibilidade do teste (TICE, 1995). A eletroforese em pH alcalino (pH > 13) foi introduzida por Singh et al. (1988) e transformou o ensaio do cometa em uma técnica de grande importância, adaptando outras metodologias já utilizadas, para desenvolver uma técnica de eletroforese de célula única (SCGE-single cell gel electrophoresis), sob condições alcalinas. Essa técnica evidencia a ocorrência de quebras em cadeia simples do DNA e de danos em sítios álcali-lábies, *in vivo* e *in vitro*. A visualização subsequente da mobilidade dos fragmentos de DNA nuclear tornou-se um meio bastante adequado para se detectar danos no DNA de células únicas. Os protocolos para o ensaio do cometa variam entre laboratórios, porém Macnamee et al. (2000) propuseram modificações nos métodos ortodoxos de célula única, fazendo com que várias células fossem processadas de uma só vez, aumentando a eficiência da técnica, sem comprometer a sua confiabilidade. Os resultados por eles obtidos foram similares àqueles previamente relatados, quando utilizaram o ensaio do cometa convencional.

Os cometas gerados pela técnica podem ser analisados visualmente (KOBAYASHI, 1995), utilizando-se coloração com um agente intercalante



fluorescente: o Brometo de Etídio, e um microscópio de fluorescência. Desta forma os cometas são classificados em: **classe 0** – nucleóides não danificados e que não apresentam cauda; **classe 1** – nucleóides com cauda menor que o diâmetro do nucleóide; **classe 2** – nucleóides com cauda de tamanho ente 1 a 2 vezes o diâmetro do nucleóide; **classe 3** – nucleóides com cauda 2 vezes maior que o diâmetro do nucleóide. Nucleóides de células apoptóticas, que se apresentam totalmente fragmentados geralmente não são contabilizados (SPEIT et al., 1996).

A técnica do cometa é um método rápido, simples e sensível para quantificar danos genéticos em um pequeno número de células, sendo particularmente importante na detecção de diferenças intercelulares, quanto aos danos ao DNA e no reparo, em praticamente qualquer célula eucariótica onde seja possível obter uma suspensão celular, mesmo com uma amostragem bastante pequena. Além disso, os resultados podem ser obtidos em um único dia e o custo para a realização da técnica é relativamente baixo. A sensibilidade do teste do ensaio cometa em detectar danos em células individuais é comparável a outros métodos de avaliação, sendo usado na investigação da genotoxicidade de vários agentes (OLIVE et al., 1992; FAIRBAIRN et al., 1995; RIBAS, 1995; ROSS et al., 1995; TICE, 1995; KLAUDE et al., 1996; ANDERSON et al., 1998; TICE et al., 2000; FRIEAUFF et al., 2001).

Frenzilli et al. (2000) utilizaram o ensaio do cometa para a validação dos efeitos genotóxicos de 18 compostos químicos, revelando sua eficiência na identificação de agentes genotóxicos. Os mesmos pesquisadores também demonstraram que a produção de quebras nas fitas do DNA poderia ser correlacionada com as propriedades mutagênicas e carcinogênicas de determinados químicos.

Devido a todos estes motivos o teste do cometa é empregado na avaliação de danos no DNA promovidos por agentes físicos e químicos, no monitoramento ambiental e até mesmo na área clínica (ANDERSON & PLEWA, 1998).

*Objetivos*

---



## II. OBJETIVOS

Diante das informações expostas e considerando: a) a grande utilização do fipronil (ingrediente ativo do acaricida Frontline®) na clínica veterinária, b) o pouco conhecimento de sua atuação nos organismos (alvo e não alvo) e c) as suas potencialidades toxicológicas e genotoxicológicas, o presente estudo teve por objetivos:

a) Avaliar a eficácia do acaricida fipronil em fêmeas semi-ingurgitadas de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* por meio do desenvolvimento de protocolo adequado de bioensaio *in vitro* (AIT), monitorado diariamente, com determinação da **CL<sub>50</sub>** (concentração 50% letal) e intervalo de confiança a 95%;

b) Analisar os efeitos do fipronil nos ovários de fêmeas semi-ingurgitadas de carrapatos *R. sanguineus* submetidas às concentrações de 1, 5 e 10 ppm de fipronil baseadas na **CL<sub>50</sub>** de 10ppm obtida em estudo piloto, por meio da utilização de técnicas histológicas e ultra estruturais;

c) Estimar os possíveis comprometimentos que este acaricida poderia causar em seus hospedeiros (organismos não-alvo), avaliando o seu potencial citotóxico no fígado de camundongos adultos, saudáveis e com pesos semelhantes tratados com doses de 15 mg/Kg, 25 mg/Kg e 50 mg/Kg de fipronil baseadas na



DL<sub>50</sub> de 50 mg/Kg obtida em estudo piloto, por meio de técnicas histológicas e histoquímicas;

d) Avaliar a genotoxicidade do composto químico fipronil (após 24h) através do teste do cometa em camundongos expostos às doses de 15 mg/Kg, 25 mg/Kg e 50 mg/Kg de fipronil baseadas na DL<sub>50</sub> de 50 mg/Kg;

e) Verificar o potencial genotóxico e mutagênico (após 24, 48 e 72h) e, a recuperação dos indivíduos, após a suspensão da administração da droga, por meio do teste do micronúcleo em sangue periférico de camundongos expostos às doses de 15 mg/Kg, 25 mg/Kg e 50 mg/Kg de fipronil baseadas na DL<sub>50</sub> de 50 mg/Kg.

## *Material e Métodos*

---





### III. MATERIAL E MÉTODOS

#### III. 1. Substância Química

O fipronil, composto do grupo químico fenil pirazol, CAS nº: 120068-37-3 e nome químico (RS)-5-amino-1-(2,6-dichloro- $\alpha,\alpha,\alpha$ -trifluoro-p-tolyl)-4-trifluoro methylsulfinylpyrazole-3-carbonitrile, foi obtido a partir do Regent 800 WG, produto comercial fabricado pela BASF com grau de pureza de 80% (os outros 20% são inertes).

#### III. 2. Animais: Carrapatos *Rhipicephalus sanguineus*

Para o presente estudo utilizou-se, para cada concentração de fipronil (100 ppm, 50 ppm, 25 ppm, 20 ppm, 17.5 ppm, 15 ppm, 12.5 ppm, 10 ppm, 7.5 ppm, 5 ppm e 1 ppm) bem como para controle, fêmeas semi-ingurgitadas de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus*, coletadas a partir de colônia mantida em condições controladas (29° C, 80% de umidade e fotoperíodo de 12 h) em estufa BOD, em sala de Biotério do Departamento de Biologia (IB) – UNESP, campus de Rio Claro/SP, Brasil. Antes do experimento, as fêmeas foram analisadas em estereomicroscópio e



somente aquelas capazes de locomoção e que não apresentavam mutilações foram utilizadas.

As fêmeas, na situação semi-ingurgitada, foram obtidas a partir de casais de *R. sanguineus* em jejum depositados em coelhos New Zealand White (25 casais/infestação), virgens de infestação, mantidos em gaiolas e recebendo água e ração comercial *ad libitum*. Todo o procedimento de infestação foi realizado segundo metodologia descrita por Bechara et al. (1995).

Foram utilizados os equipamentos disponíveis nas dependências dos Laboratórios de Histologia e de Microscopia Eletrônica do Departamento de Biologia do I.B.- UNESP- Campus de Rio Claro, SP.

O trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UNIARARAS/SP/Brasil sob o protocolo n° 09/2009.

### **III. 3. Bioensaio *in vitro* com Fipronil**

#### **III.3.1. Bioensaio 1**

Essa etapa do teste foi conduzida tendo como base a concentração de fipronil recomendada pelo fabricante do Frontline® (2500 ppm). A partir dessa concentração inicial foram realizadas várias diluições acrescentando-se água destilada por meio de pipetas, daí obtendo-se as concentrações de 100 ppm, 50 ppm, 25 ppm, 15 ppm, 10 ppm, 5 ppm e 1 ppm de fipronil.

Todas as concentrações de fipronil obtidas foram colocadas em placas de Petri previamente identificadas bem a água destilada (do grupo controle). Em seguida, foi realizada a duplicata de cada uma das concentrações (duas repetições).

Para cada concentração de fipronil, bem como para o controle foram utilizadas 20 fêmeas semi-ingurgitadas de *R. sanguineus* (10 carrapatos em cada placa de Petri, no total de 160 fêmeas). Antes do início do bioensaio, todos os carrapatos foram lavados em peneira com água corrente e secos com papel absorvente macio.

Após a lavagem, os indivíduos (20 fêmeas) foram imersos na concentração de 100 ppm de fipronil e acondicionados em placa de Petri por 2 minutos. O mesmo



procedimento foi repetido em todas as concentrações de fipronil. No grupo controle, os carrapatos foram mergulhados em água destilada pelo mesmo período. Na seqüência, os carrapatos foram secos em papel absorvente e armazenados em placas de Petri, as quais foram posteriormente colocadas na estufa BOD por 7 dias, período necessário uma vez que os acaricidas geralmente atuam de forma lenta na fisiologia dos carrapatos, tornando-se seus efeitos visíveis apenas após esse período (ROMA et al, 2009).

A mortalidade dos carrapatos e a ação do acaricida foram monitoradas diariamente. Então, foi determinado o intervalo de mortalidade observando-se o comportamento dos indivíduos até serem completados os 7 dias de tratamento. O critério de mortalidade foi baseado no toque de cada carrapato com o auxílio de um pincel. Os indivíduos que não responderam com movimentos dos apêndices, foram considerados mortos.

### III.3.2. Bioensaio 2

Após a determinação do intervalo de mortalidade (5ppm – 25ppm), foram então realizadas novas diluições dentro desse intervalo de mortalidade. As concentrações (diluições) obtidas foram: 20 ppm, 17.5 ppm, 15 ppm, 12.5 ppm, 10 ppm, 7.5 ppm e 5 ppm de fipronil. Nesta etapa do bioensaio também foi estabelecido um grupo controle, o qual foi exposto apenas à água destilada.

O número de fêmeas semi-ingurgitadas de *R. sanguineus* tratadas (em cada concentração de fipronil e no grupo controle) totalizou também 160 indivíduos (10 indivíduos em cada placa de Petri, realizado em duplicatas).

Para essa etapa todas as fêmeas de *R. sanguineus* também foram lavadas e secas antes do experimento.

O procedimento de imersão foi o mesmo daquele descrito no bioensaio 1, onde os carrapatos permaneceram imersos em placas de Petri contendo as diferentes concentrações de fipronil ou água destilada, durante 2 minutos e depois foram secos e colocados em estufa BOD durante 7 dias.

Posteriormente, foi analisada a mortalidade diária dos carrapatos em cada concentração testada.



Os dados obtidos no bioensaio 2 foram, então, submetidos a análise estatística de Probit.

### III.3.3. Análise Estatística

Os dados coletados no bioensaio 2 referentes à mortalidade das fêmeas semi-ingurgitadas de *R. sanguineus* foram submetidos à análise de Probit utilizando o programa POLO-PC (LeOra SOFTWARE, 1987) e por meio da relação concentração de fipronil/mortalidade dos carrapatos foram estimados os valores da  $CL_{50}$ , intervalo de confiança a 95% e a inclinação (“slope”) da linha de regressão. Essa análise foi escolhida uma vez que o resultado do bioensaio foi uma resposta quantitativa binária: representada pela sobrevivência ou morte dos indivíduos expostos.

### III.3.4. Bioensaio Final

Para esta etapa utilizou-se, para cada concentração final de fipronil bem como para controle, 15 fêmeas semi-ingurgitadas de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* (totalizando 60 indivíduos), coletadas a partir de colônia mantida em condições controladas (29° C, 80% de umidade e fotoperíodo de 12 h) em estufa BOD, em sala de Biotério do Departamento de Biologia (IB) – UNESP, campus de Rio Claro/SP, Brasil.

As concentrações finais de fipronil que foram utilizadas basearam-se na  $CL_{50}$  de 10ppm, ou seja, corresponderam a 10% da  $CL_{50}$  (1ppm), 50% da  $CL_{50}$  (5ppm) e a própria  $CL_{50}$  (10ppm). As concentrações sub-letais (1, 5 e 10 ppm) foram utilizadas a fim de se acompanhar a ação do fipronil no ovário dos carrapatos, evitando assim a mortalidade imediata dos espécimens. Um grupo controle foi exposto apenas ao placebo (água destilada).

As 60 fêmeas de *R. sanguineus*, após lavadas em peneira com água corrente, foram secas em papel absorvente macio.

Em seguida, 45 fêmeas (três grupos com 15 fêmeas cada), permaneceram imersas em placas de Petri contendo as diferentes concentrações de fipronil, durante 2 minutos. O grupo controle foi composto também por 15 fêmeas, que foram imersas



em água destilada por 2 minutos. Logo após, os carrapatos foram secos em papel absorvente e colocados em estufa BOD durante 7 dias, para posterior análise morfológica.

### III. 4. Histologia dos ovários dos carrapatos

Os carrapatos submetidos ao tratamento foram anestesiados a frio (choque térmico) para a dissecação em placas de Petri contendo solução fisiológica tamponada com fosfato-PBS ( $\text{NaCl}$  7.5 g/L,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  2.38 g/L e  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2.72 g/L). Sob lupa, os ovários foram retirados com auxílio de pinças e micro-tesouras e, fixados por 24 horas em paraformaldeído 4%. Logo após, o material foi transferido para solução tampão fosfato de sódio onde permaneceu por mais 24 horas.

Procedeu-se então a desidratação em série crescente de álcool etílico a 70%, 80%, 90% e 95%. Cada banho teve duração de 30 minutos. Em seguida, o material foi embebido em resina Leica por 24 horas e incluído em moldes plásticos contendo resina Leica mais polimerizador. Posteriormente, os blocos foram seccionados em micrótomo de onde foram obtidos cortes com espessura de 5  $\mu\text{m}$  que foram recolhidos em lâminas de vidro previamente limpas.

As lâminas contendo as secções dos ovários dos grupos de tratamento e do controle foram coradas pela Hematoxilina durante 5 minutos. Depois de lavadas por 5 minutos em água corrente, foram coradas com Eosina aquosa durante 5 minutos e lavadas em água corrente novamente.

Após secagem ao ar livre, em suportes de madeira, as lâminas foram mergulhadas rapidamente em xilol e, em seguida, montadas com bálsamo do Canadá e recobertas com lamínula.

As lâminas obtidas foram examinadas e analisadas em microscópio de luz MOTIC BA300.



### III. 5. Microscopia Eletrônica de Transmissão dos ovários dos carrapatos

Os carrapatos de todos os grupos de tratamento e do grupo controle foram colocados em placas de Petri contendo glutaraldeído 0.5%. Sob lupa, os ovários foram retirados com auxílio de pinças e micro-tesouras e, fixados em glutaraldeído 2.5% à temperatura ambiente, por 2 horas. Em seguida, todo o material passou por 2 lavagens de 15 minutos cada, em solução tampão de cacodilato de sódio à 0.1M, e na sequência, foi pós-fixado em tetróxido de ósmio 1% por 2 horas. Novamente foram realizadas 2 lavagens com cacodilato de sódio 0.1M por 15 minutos cada.

A seguir, os ovários passaram por um banho de álcool 10% durante 15 minutos sendo, posteriormente, contrastados em acetado de uranila a 2% mais etanol a 10% durante 2 horas. Posteriormente foi realizada a desidratação em série crescente de banhos em acetona 50%, 70%, 90%, 95% e 100%, 2 vezes, com duração de 10 minutos cada e acetona pura por 15 minutos. Logo após, o material foi submetido à mistura de acetona e resina na proporção de 1:1 onde permaneceu por 4 a 12 horas.

Finalmente, os ovários foram incluídos em resina Epon Araldite pura com catalisador e colocados em estufa à 60°C por 24 horas.

Todo o material foi seccionado em ultra micrótomo e as secções ultrafinas foram coletadas em grades de cobre. A seguir, as mesmas foram contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo durante 45 e 10 minutos, respectivamente.

As grades contendo as secções foram examinadas e fotografadas em Microscópio Eletrônico de Transmissão Philips CM 100.

### III. 6. Animais: Camundongos

Foram utilizados cinco camundongos fêmeas Swiss (*Mus musculus*), com idade entre 5-6 semanas, saudáveis e com peso semelhante (20 grs  $\pm$  20 %), por grupo de tratamento (expostos a diferentes doses de fipronil).

Os espécimens foram obtidos a partir do biotério de criação CEMIB/UNICAMP e mantidos em condições controladas (22°C  $\pm$  2°C, 50% de umidade, e fotoperíodo de 12h) em laboratório durante 7 dias, para aclimação, antes da realização do experimento.



Os camundongos foram identificados individualmente e dentro do seu grupo de tratamento. Cada grupo de cinco indivíduos foi mantido em caixas apropriadas de polipropileno, com água filtrada e ração comercial *ad libitum*.

Para a realização desses estudos, foram utilizados os laboratório de Histologia e de Mutagênese do Departamento de Biologia do I.B.- UNESP- Campus de Rio Claro, SP.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Fundação Hermínio Ometto – UNIARARAS, protocolo nº 09/2009.

### III. 7. Dosagem do fipronil para aplicação nos camundongos

As doses de fipronil utilizadas foram baseadas na  $DL_{50}$  de 50mg/Kg determinada em estudo piloto desenvolvido no Departamento de Biologia, UNESP – RC, em outubro de 2008. Através da diluição da dose estabelecida, obteve-se as doses finais administradas, as quais corresponderam a 30% da  $DL_{50}$  (15mg/Kg), 50% da  $DL_{50}$  (25mg/Kg) e a própria  $DL_{50}$  (50mg/Kg). Um grupo controle negativo foi exposto apenas à água destilada.

Todas as doses de fipronil testadas foram preparadas e acondicionadas em recipientes, devidamente identificados para imediata utilização.

### III. 8. Modelo Experimental

Os camundongos foram divididos em 4 grupos de tratamento: grupo I = 30% da  $DL_{50}$  (15mg/Kg), grupo II = 50% da  $DL_{50}$  (25mg/Kg), grupo III = a própria  $DL_{50}$  (50mg/Kg) e grupo IV = controle negativo, todos contendo cinco camundongos cada.

Logo após o preparo, os animais receberam 0.2 mL da dose de fipronil determinada para cada grupo de tratamento. No grupo controle negativo foi administrado somente à água destilada.

A rota de administração foi intraperitoneal para todos os grupos de tratamento, uma vez que maximiza a exposição ao químico.

Após 7 dias, os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical.



### III. 9. Histologia do Fígado de camundongos

Os camundongos dos grupos de tratamento e do grupo controle foram sacrificados por deslocamento cervical e, em seguida, foram colocados em placas de cera para dissecação. O excesso de tecido foi retirado com o auxílio de tesoura e pinça de dissecação, e papel toalha absorvente áspero. O fígado dos animais de todos os grupos (I, II, III, IV) foram retirados, seccionados com estilete e imediatamente fixados por 24 horas em paraformaldeído 4%. Logo após, o material foi transferido para solução tampão fosfato de sódio onde permaneceu por mais 24 horas.

Procedeu-se então a desidratação em série crescente de álcool etílico a 70%, 80%, 90% e 95%. Cada banho teve duração de 30 minutos. Em seguida, o material foi embebido em resina Leica por 24 horas e incluído em moldes plásticos contendo resina Leica mais polimerizador. Posteriormente, os blocos foram seccionados em micrótomo de onde foram obtidas secções com espessura de 3  $\mu\text{m}$  que foram recolhidas em lâminas de vidro previamente limpas.

As lâminas contendo as secções foram coradas pela hematoxilina durante 5 minutos. Depois de lavadas por 5 minutos em água corrente, foram coradas com eosina aquosa durante 5 minutos e lavadas em água corrente novamente.

Após secagem ao ar livre, em suportes de madeira, as lâminas foram mergulhadas rapidamente em xilol e, em seguida, foram montadas com bálsamo do Canadá e recobertas com lamínula.

As lâminas obtidas foram examinadas, analisadas e fotografadas em fotomicroscópio de luz MOTIC BA 300.

### III. 10. Histoquímica

Visando detectar alterações, tais como: a presença ou não, a frequência e a distribuição de componentes protéicos, polissacarídicos e lipídicos, no fígado dos camundongos do grupo controle e dos grupos tratados com fipronil, submeteu-se as secções histológicas às seguintes técnicas histoquímicas:





### III.10.1. Técnica do Azul de Bromofenol para detecção de Proteínas (Segundo PEARSE, 1985):

Os fragmentos de fígado foram fixados por 48 horas em paraformaldeído 4%. As secções foram coradas com Azul de Bromofenol por 2 horas em temperatura ambiente. Após serem lavadas com ácido acético 0.5% por 5 minutos e com água corrente por 15 minutos, as mesmas passaram rapidamente por uma solução de álcool butílico terciário.

A seguir, foram secas ao ar livre, diafanizadas e montadas em bálsamo do Canadá.

### III.10.2. Técnica de Baker para detecção de Lipídios (Modificada por GIOVANETTI, 2009):

Os fragmentos do fígado dos grupos I, II, III e IV foram fixados em Formol Cálcio por 15 horas.

As lâminas contendo as secções do fígado foram tratadas por 18 horas com bicromato de cálcio. Após lavadas em água destilada, permaneceram durante 5 horas em solução de hemateína. Logo depois, procedeu-se a última lavagem com água destilada. Após a secagem, as lâminas foram montadas com glicerina e recobertas com lamínula.

### III.10.3. Técnica do PAS para detecção de Polissacarídeos (Segundo JUNQUEIRA e JUNQUEIRA, 1983):

Os fragmentos do fígado de todos os animais foram fixados em Bouin por 48 horas. A seguir as secções foram colocadas por 10 minutos em solução de ácido periódico 0.4%. Em seguida, foram lavadas rapidamente em água destilada e submetidas ao reagente de Schiff durante 1h, no escuro. Posteriormente, procedeu-se três lavagens em água sulfurosa por 3 minutos cada e, a seguir, as lâminas foram lavadas em água corrente por 30 minutos.



Após secagem, as lâminas contendo as secções foram colocadas em xilol para diafanizar e montadas com Bálsamo do Canadá.

### III. 11. Teste do Cometa

Nesse método, foram utilizados também 5 camundongos fêmeas Swiss (*Mus musculus*) com idade entre 5-6 semanas para cada grupo. No entanto, para desenvolver essa técnica foi necessário acrescentar um grupo de tratamento: o controle positivo (ciclofosfamida – 50mg/Kg). Dessa forma, foram formados 5 grupos de tratamento: grupo I = 30% da DL<sub>50</sub> (15mg/Kg), grupo II = 50% da DL<sub>50</sub> (25mg/Kg), grupo III = a própria DL<sub>50</sub> (50mg/Kg), grupo IV = controle negativo e grupo V = controle positivo.

Os camundongos do grupo I, II, III receberam, via intraperitoneal, 0.2 mL da dose de fipronil indicada para cada grupo de tratamento, o controle negativo recebeu 0.2 mL do placebo (água destilada) e o controle positivo recebeu 0.2 mL de ciclofosfamida.

Para a realização deste ensaio, após 24 horas de tratamento, uma amostra de 40µL de sangue foi coletada de cada indivíduo de cada grupo de tratamento e colocada em ependorf identificado e heparinizado.

Para a montagem das lâminas depositou-se 40µL de sangue de cada indivíduo com 120µL de agarose LPM (1.5%), a 37°C, em lâmina pré-coberta com agarose normal (5%). Estas foram recobertas com lamínulas de vidro e resfriadas a 4°C por 20 minutos. Após a remoção das lamínulas, as lâminas foram imersas em solução de lise, recém preparada, composta por 89mL de estoque de lise (2.5M NaCl, 100mM EDTA, 10mM Tris, pH 10 corrigido com NaOH sólido, 89mL de água destilada e 1% de laurilsarcosinato de sódio), 1mL de Triton X -100 (Merck) e 10mL de DMSO. A lise se deu por 1 hora, à temperatura de 4°C, protegida da luz. Em seguida, as lâminas foram encaminhadas para a cuba de eletroforese com tampão pH>13 (300mM NaOH e 1mM EDTA, preparado a partir de solução estoque de NaOH 10N e EDTA 200mM com pH10) a 4°C por 20 minutos para a denaturação do DNA. A eletroforese foi realizada à 25V e 300mA (1.25V/cm). Posteriormente, as lâminas foram neutralizadas com tampão pH 7.5 (0.4M Tris-HCl) durante 3 ciclos



de 5 minutos, secas ao ar livre, fixadas em álcool etílico absoluto por 10 minutos e guardadas para leitura a posteriori. Para coloração, as lâminas foram cobertas com 100µL de Brometo de Etídeo (20µg/mL) e lamínula. O material foi avaliado em microscópio de fluorescência no aumento de 40x, com filtro de excitação 420-490nm e filtro de barreira 520nm.

Foram analisadas visualmente 100 células/indivíduo (2 lâminas por animal de cada grupo de tratamento), as quais foram classificadas em cometas em: (classe 0) células não danificadas que não apresentaram cauda; (classe 1) células com cauda menor que o diâmetro do nucleóide; (classe 2) células com cauda de tamanho entre 1 e 2 vezes o diâmetro do nucleóide; (classe 3) células com cauda maior do que 2 vezes o diâmetro do nucleóide. Células apoptóticas, que apresentaram nucleóide totalmente fragmentado, não foram contabilizadas. O escore total foi calculado pela somatória dos valores resultantes da multiplicação do total de células observadas em cada classe de lesão a qual pertenciam pelo valor da classe. A análise estatística foi realizada usando o teste ANOVA/Tukey ( $p < 0.05$ ).

### III. 12. Ensaio do Micronúcleo em Sangue Periférico

Nesse método foram utilizados 5 grupos de tratamento: grupo I = 30% da  $DL_{50}$  (15mg/Kg), grupo II = 50% da  $DL_{50}$  (25mg/Kg), grupo III = a própria  $DL_{50}$  (50mg/Kg), grupo IV = controle negativo e grupo V = controle positivo (ciclofosfamida – 50mg/Kg), todos com 5 camundongos cada.

O ensaio do micronúcleo em sangue periférico aplicado foi realizado de acordo com o protocolo descrito por Hayashi et al. (1990).

A coleta de sangue periférico ocorreu por meio da punção da veia caudal em 3 momentos diferentes, em 24, 48 e 72 horas.

As lâminas de todos os grupos foram previamente identificadas e preparadas com 20µm de alaranjado de acridina (1mg/mL). Em seguida, foram coletados 20 µL de sangue periférico, o qual foi depositado no centro da lâmina preparada. Logo depois, as lâminas foram recobertas com lamínula e permanecem em *freezer* (-20°C).

A análise das lâminas foi realizada em microscópio de fluorescência, combinando luz azul (488nm) e filtro alaranjado, em objetiva de 100 vezes.



Foram analisadas 2000 células/animal (2 lâminas por animal de cada grupo de tratamento) para se observar o número de células micronucleadas nos grupos tratados com o fipronil e a estatística foi realizada por meio do teste ANOVA/Tukey ( $p < 0,0001$ ). Os três momentos (24h, 48h e 72 horas de experimento) permitiram verificar a frequência de micronúcleos ao longo dos dias de tratamento.

## *Resultados*

---



#### IV. RESULTADOS

Os resultados aqui obtidos estão sendo apresentados sob a forma de capítulos, os quais contém artigos já publicados e/ou submetidos à publicação em periódicos internacionais especializados na área, contemplando assim os diferentes aspectos da ação do fipronil nos ovários de fêmeas semi-ingurgitadas de *Rhipicephalus sanguineus*, bem como nos camundongos, mostrando os comprometimentos (citotóxico e genotóxico) que este acaricida causou em seus hospedeiros (organismos não alvo).

Desta forma, a tese está composta por cinco capítulos, onde:

##### **Capítulo 1:**

**Situação:** Publicado (2008)

**Título do artigo:** Evaluation of cytotoxic effects of fipronil on ovaries of semi-engorged *Rhipicephalus sanguineus*\_(Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) tick female.

**Autores:** Patrícia Rosa de Oliveira; Gervásio Henrique Bechara e Maria Izabel Camargo Mathias.

**Periódico:** Food and Chemical Toxicology, v. 46, p. 2459–2465.

**Capítulo 2:**

**Situação:** Publicado (2009)

**Título do artigo:** Action of the chemical agent fipronil on the reproductive process of semi-engorged females of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). Ultrastructural evaluation of ovary cells.

**Autores:** Patrícia Rosa de Oliveira; Gervásio Henrique Bechara; Maria Aparecida Marin Morales e Maria Izabel Camargo Mathias.

**Periódico:** Food and Chemical Toxicology, v. 47, p. 1255–1264.

**Capítulo 3:**

**Situação:** Submetido.

**Título do artigo:** Cytotoxicity of fipronil in mouse liver cells.

**Autores:** Patrícia Rosa de Oliveira; Gervásio Henrique Bechara; Sandra Eloisi Denardi; Rodrigo Juliano Oliveira e Maria Izabel Camargo Mathias.

**Periódico:** Experimental and Toxicology Pathology.

**Capítulo 4:**

**Situação:** Submetido.

**Título do artigo:** Test to assess the toxicity of the acaricide fipronil in semi-engorged females of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). Determination of the LC<sub>50</sub>.

**Autores:** Patrícia Rosa de Oliveira; Gervásio Henrique Bechara, Sandra Eloisi Denardi, Marcos Aparecido Pizano e Maria Izabel Camargo Mathias.

**Periódico:** Experimental Parasitology

**Capítulo 5:**

**Situação:** Submetido.

**Título do artigo:** Genotoxic and mutagenic effects of fipronil on mice.

**Autores:** Patrícia Rosa de Oliveira; Gervásio Henrique Bechara e Maria Izabel Camargo Mathias.

**Periódico:** Research in Veterinary Science

# *Capítulo 1*

---





## IV.1. Capítulo 1

### **Evaluation of cytotoxic effects of fipronil on ovaries of semi-engorged *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) tick female**

Patrícia Rosa de Oliveira<sup>1</sup>; Gervásio Henrique Bechara<sup>2</sup> & Maria Izabel Camargo Mathias<sup>1\*</sup>.

1. Departamento de Biologia – I.B. – UNESP, Avenida 24 A, nº 1515 – Fone:55 19 35264135 – Cx. Postal 199 – CEP: 13506-900 – Rio Claro – SP – Brazil.

2. Departamento de Patologia Veterinária – FCAV – UNESP, Via de Acesso Prof. Paulo Castellane, s/n - CEP: 14884-900 - Jaboticabal – SP – Brazil.

Artigo publicado no periódico: Food and Chemical Toxicology, v. 46, p. 2459-2465, 2008.



## RESUMO

O presente estudo analisa os efeitos do produto químico Fipronil, ingrediente ativo do Frontline® e utilizado como acaricida, no ovário de *Rhipicephalus sanguineus*, o qual é constituído por ovócitos em cinco estágios de desenvolvimento (de I a V) presos à parede do ovário através do pedicelo. Os indivíduos foram submetidos a três grupos de tratamento (II, III e IV), submetidos às doses de 1, 5 e 10 ppm de Fipronil, respectivamente. Os resultados revelaram a ação deste composto, exibindo alterações morfo-histológicas nos ovócitos dos indivíduos dos diferentes grupos, os quais foram comparados com àqueles do grupo I (controle). As alterações variaram desde a presença de poucos e pequenos vacúolos até a morte celular, mostrando que as células germinativas de *R. sanguineus* são afetadas em níveis variados pelo Fipronil, demonstrando, conseqüentemente, redução da fertilidade desses carrapatos quando expostos a este produto.

**Palavras-Chave:** *Rhipicephalus sanguineus*; Fipronil; carrapato, acaricida, citotóxico.

## *Capítulo 2*

---



## IV.2. Capítulo 2

### **Action of the chemical agent fipronil on the reproductive process of semi-engorged females of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). Ultrastructural evaluation of ovary cells.**

Patrícia Rosa de Oliveira<sup>1</sup>; Gervásio Henrique Bechara<sup>2</sup>; Maria Aparecida Marin Morales<sup>1</sup> & Maria Izabel Camargo Mathias<sup>1\*</sup>.

1. Departamento de Biologia – I.B. – UNESP, Avenida 24 A, nº 1515 – Fone:55 19 35264135 – Cx. Postal 199 – CEP: 13506-900 – Rio Claro – SP – Brazil.

2. Departamento de Patologia Veterinária – FCAV – UNESP, Via de Acesso Prof. Paulo Castellane, s/n - CEP: 14884-900 - Jaboticabal – SP – Brazil.

Artigo publicado no periódico: Food and Chemical Toxicology, v. 47, p. 1255–1264.



## RESUMO

O ovário do carrapato *Rhipicephalus sanguineus* é constituído por uma parede de células epiteliais e por um grande número de ovócitos em cinco diferentes estágios de desenvolvimento (I, II, III, IV, V), os quais estão presos por meio do pedicelo à sua parede. O presente estudo traz informações ultra-estruturais sobre os efeitos do acaricida fipronil (Frontline®) nos ovários de fêmeas semi-ingurgitadas de *R. sanguineus*, bem como demonstra quais são os mecanismos de defesa por elas utilizados. Os indivíduos estudados foram divididos em quatro grupos, onde o grupo I foi utilizado como controle e os grupos II, III e IV, foram submetidos às doses de 1, de 5 e de 10 ppm de Fipronil, respectivamente. O fipronil na dosagem de 10 ppm foi o que mais afetou o desenvolvimento dos ovócitos. Neste caso, até mesmo aqueles ovócitos que conseguiram chegar ao estágio final de desenvolvimento tiveram estruturas celulares danificadas pelo agente químico. Mecanismos de defesa celular como o aumento da quantidade de microtúbulos citoplasmáticos e a grande quantidade de vacúolos digestivos e de figuras mielínicas foram observados nos ovócitos dos indivíduos de *R. sanguineus* tratados, na tentativa de minimizar os danos e preservar as células germinativas, matrizes para o desenvolvimento de novos indivíduos.

**Palavras-Chave:** *Rhipicephalus sanguineus*; fipronil; ovario; acaricida; ultra-estrutura, reprodução.

## *Capítulo 3*

---



### IV.3. Capítulo 3

#### Cytotoxicity of fipronil in mouse liver cells

Patrícia Rosa de Oliveira<sup>a</sup>; Gervásio Henrique Bechara<sup>b</sup>; Sandra Eloisi Denardi<sup>a</sup>;  
Rodrigo Juliano Oliveira<sup>c</sup> & Maria Izabel Camargo Mathias<sup>a\*</sup>.

<sup>a</sup>. Departamento de Biologia – I.B. – UNESP, Avenida 24 A, nº 1515 – Fone:55 19  
35264135 – Cx. Postal 199 – CEP: 13506-900 – Rio Claro – SP – Brazil.

<sup>b</sup>. Departamento de Patologia Veterinária – FCAV – UNESP, Via de Acesso Prof.  
Paulo Castellane, s/n - CEP: 14884-900 - Jaboticabal – SP – Brazil.

<sup>c</sup>. Departamento de Biologia Geral – Centro de Ciências Biológicas – Universidade  
Estadual de Londrina - UEL, PR– Brazil.

Artigo submetido ao periódico: Experimental and Toxicology Pathology.



## RESUMO

O presente estudo analisou o fígado de camundongos expostos a diferentes doses de fipronil (15mg/Kg, 25 mg/Kg e 50 mg/Kg) através de técnicas histológicas e histoquímicas, para se detectar o potencial citotóxico dessa substância e os danos causados no referido órgão dos animais. Os indivíduos foram divididos em quatro grupos: grupo controle e grupos I, II e III, foram expostos às doses de 15mg/Kg, 25 mg/Kg e 50 mg/Kg de fipronil, respectivamente. Os resultados revelaram a ação deste composto, por meio de alterações citológicas, morfo-histológicas e histoquímicas nas células hepáticas dos indivíduos dos diferentes grupos (I, II e III), que foram comparados com o grupo controle. As alterações variaram desde a proliferação das células de Kupffer, hipertrofia dos hepatócitos, o acúmulo e distribuição de proteínas, polissacarídeos, lipídios e vacúolos no citoplasma dos hepatócitos, bem como a congestão de vasos sanguíneos, demonstrando principalmente a ocorrência de: a) processos de autofagia, b) esteatose e c) morte celular por necrose, comprovando na simulação a ação do fipronil nos hospedeiros de carrapatos.

**Palavras-chave:** fipronil; citotoxicidade; fígado; histopatologia; autofagia; acaricida.





## ABSTRACT

In the present study, mouse livers were examined following exposure to different doses of fipronil (15 mg/Kg, 25 mg/Kg, and 50 mg/Kg). Histological and histochemical techniques were used to determine the cytotoxic potential of this compound and to assess the damage it caused to livers. Mice were divided into four groups: control group and groups I, II, and III were exposed to 15 mg/Kg, 25 mg/Kg, and 50 mg/Kg fipronil, respectively. Our findings revealed cytological, morpho-histological, and histochemical alterations in liver cells of animals from groups I, II, and III compared to group control animals. These changes included Kupffer cell proliferation, hepatocyte hypertrophy, accumulation and distribution of proteins, polysaccharides, lipids, and vacuoles in the cytoplasm of hepatocytes, and congestion of blood vessels. These phenotypes mainly characterize the following: a) autophagic processes, b) steatosis, and c) cell death by necrosis, which demonstrate the damage caused by fipronil in the hosts of ticks.

**Keywords:** fipronil; cytotoxicity; liver; histopathology; autophagy; acaricide.



## 1. INTRODUCTION

Fipronil is a phenylpyrazole pesticide developed by the transnational company Rhône-Poulenc Agro in 1987. In the US, fipronil is available in a range of formulations, from attractive baits for ant and cockroach control to sprays used in veterinary products for the control of ticks, fleas (Frontline®), and mites (HUGNET et al., 1999).

Fipronil is a molecule that disrupts the binding of the neurotransmitter GABA to its receptor, consequently blocking chloride ion uptake into the cells of invertebrates and leading to uncontrolled CNS hyperexcitation, convulsion, and death (DAS et al., 2006).

Relatively little is known about how fipronil is metabolized in vertebrates (DAS et al., 2006). Experiments using both male and female rats have demonstrated a significant increase in thyroid cells, leading to tumor formation (LYONS, 2000).

The liver is one of the largest organs in the body, with a blood supply from two vessels: (1) the portal vein (75% of the afferent blood volume) and (2) the hepatic artery, which provides the remaining 25% of (oxygen-rich) blood (KIERSZENBAUM, 2004). As a result of this rich blood supply, the liver has a privileged position to perform its functions, receiving a large variety of substances such as endobiotics, toxic compounds, and nutrients (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). In addition, because the liver is directly along the path of blood vessels containing large amounts of absorbed substances, the liver is the first organ to receive metabolites and nutrients, as well the first organ as to be exposed to toxic compounds (ROSS; PAWLINA, 2008; SREELATHA et al., 2009).

Thus, the present study described the cytological, histological, and histochemical aspects of the livers of mice exposed to different doses of fipronil to determine its cytotoxic potential and possible compromises in the hosts of ectoparasites treated with acaricides containing this active compound.



## 2. MATERIAL AND METHODS

### 2.1. Animals

Twenty female Swiss mice (*Mus musculus*) were used. The mice were 5-6 weeks old, healthy, and had similar weights (20 g  $\pm$ 20%). Five animals were used for each treatment.

Animals were obtained from the animal resource center of CEMIB/UNICAMP and maintained under controlled conditions (22°C  $\pm$ 2°C, 50% humidity, 12-hour photoperiod) in the laboratory for 7 days to allow acclimation prior to experiments.

All mice were individually identified, and each group was housed in polypropylene cages with filtered water and commercial food provided *ad libitum*.

Experiments were conducted at the Laboratory of Histology of the Department of Biology of the Biosciences Institute, UNESP, Rio Claro campus in São Paulo, Brazil.

This study was approved by the Ethical Committee of the Foundation Hermínio Ometto –UNIARARAS (SP- Brazil), protocol # 09/2009.

### 2.2. Chemical Compound

The substance tested was fipronil, a compound of the phenylpyrazole chemical class, CAS # 20068-37-3 and chemical name (RS)-5-amino-1-(2,6-dichloro- $\alpha,\alpha,\alpha$ -trifluoro-p-tolyl)-4-trifluoro methylsulfanylpyrazole-3-carbonitrile. Fipronil was obtained from Regent 800 WG, a commercial product produced by BASF with purity level of 80%.

### 2.3. Doses

Fipronil dosages used were based on an LD<sub>50</sub> of 50 mg/Kg, determined in a preliminary study conducted at the Department of Biology, UNESP – Rio Claro, in October 2008. Final doses of fipronil administered in the experiments were obtained



by dilution to 30% of LD<sub>50</sub> (15 mg/Kg), 50% of LD<sub>50</sub> (25 mg/Kg) and 100% of LD<sub>50</sub> (50 mg/Kg). Control animals were exposed only to placebo (distilled water).

All doses of fipronil tested were prepared and stored in labeled containers.

## 2.4. Experimental Model

Mice were divided into four groups: control group, group I = 30% of LD<sub>50</sub> (15 mg/Kg), group II = 50% of LD<sub>50</sub> (25 mg/Kg) and group III = LD<sub>50</sub> (50 mg/Kg). Five female Swiss mice were used for each treatment.

Animals received 0.2 mL of the fipronil dose determined for each treatment. For the control group, only placebo (distilled water) was administered. The intraperitoneal route was used for all animals, maximizing chemical exposure. After 7 days, the mice were sacrificed by cervical dislocation.

## 2.5. Methods

### 2.5.1. Histology

All mice were sacrificed by cervical dislocation and dissected on wax pads. Excess tissue was removed with the aid of scissors, dissection tweezers, and paper towels.

The livers were removed, cut into pieces 4-5 mm in size, fixed for 24 hours in 4% paraformaldehyde, dehydrated in ethanol, embedded in Leica resin for 24 hours, and transferred to plastic molds previously filled with polymerized Leica resin. After resin polymerization, all blocks were sectioned at 3- $\mu$ m thickness slices and stained with hematoxylin and eosin. The glass slides with the livers were examined using a Motic BA300 photomicroscope.

### 2.5.2. Histochemistry

To detect changes such as presence or absence, frequency, and distribution of proteins, polysaccharides, and lipids in the livers of mice of control and fipronil-



treated groups, histological sections were prepared for the histochemical techniques listed below.

**Bromophenol Blue Staining for Protein Detection (According to PEARSE, 1985):**

All slides were stained with bromophenol blue for two hours at room temperature. After they were washed with 0.5% acetic acid for 5 minutes and tap water for 15 minutes, slides were quickly immersed in tertiary butyl alcohol, allowed to dry at room temperature, clarified, and mounted in Canada balsam.

**Baker's Method for Lipid Detection (Modified by GIOVANETTI, 2009):**

The livers of group control, I, II, and III animals were fixed with formal-calcium for 15 hours and transferred to dichromate calcium for 18 hours. After they were washed with distilled water, slides were immersed in hematein for 5 hours. After washing with distilled water and drying, slides were mounted with glycerin and covered with cover slips.

**PAS technique for Polysaccharide Detection (According to JUNQUEIRA & JUNQUEIRA, 1983):**

Samples of livers of animals from all groups were fixed with aqueous Bouin. Slides with sections were immersed for 10 minutes in 0.4% periodic acid, washed with distilled water, and stained with Schiff's reagent for 1 h in the dark. The material was washed three times with sulfur water for 3 minutes each and rinsed with tap water for 30 minutes. After drying, slides were clarified with xylol and mounted in Canada balsam.



### 3. RESULTS

#### 3.1. Liver Histology

##### - Control Group

The histological results revealed that the livers of control group animals, as described in the literature, present polygonal hepatocytes that form extensive anastomosed plates (Fig. 1A). The cytoplasm is acidophilic, as a result of large amounts of basic components (Fig. 1A). Hepatocytes exhibit one or two large central round-shaped nuclei strongly stained with hematoxylin. In some hepatocytes, one or more nucleoli are also observed (Fig. 1A). The plates of hepatocytes and the walls of hepatic capillaries (sinusoids) delimit the Disse's space. The walls of hepatic capillaries are lined with Kupffer cells (Fig. 1A) and are characterized mainly by elongated and strongly stained nuclei. An abundance of blood vessels is evident (Fig. 1A).

##### - Group I (15 mg/Kg)

The livers of group I animals, which were treated with 15 mg/Kg fipronil, have few histological alterations compared to the control group (Fig. 1B).

The hepatocytes have infrequent and small cytoplasmic vacuoles, as well as less acidophilic cytoplasm. Nuclei are less intensely stained (Fig. 1B).

The lumen of capillaries that run between plates of hepatocytes is apparently wider compared to the control group (Fig. 1B).

##### - Group II (25 mg/Kg)

The livers of group II animals exhibit early stages of disorganization and histological alterations (Fig. 1C).



The alterations are characterized by the presence of swollen, round-shaped hepatocytes, increased cytoplasmic vacuolation, and/or the presence of lipid droplets in cells as well as in intercellular spaces (Fig. 1C).

Hepatocytes with smaller pyknotic and partially degraded nuclei are clearly observed, as is an increase in the number of vacuoles (Fig. 1C).

The number and activity of Kupffer cells seems to be increased (Fig. 1C).

The lumen of hepatic capillaries is wider than that of the control group (Fig. 1C).

### **- Group III (50 mg/Kg)**

The livers of group III animals exhibit significant histological alterations compared to the control group (Fig. 1D).

Hepatocytes became round due to swelling, and there was an increase in lipid droplets and/or extensive vacuolation, which is more evident around nuclei (Fig. 1D).

The nuclei of hepatocytes are partially degraded or pyknotic (Fig. 1D).

At this concentration of fipronil, a prominent increase in the number of Kupffer cells is observed, detected by the increased number of strongly stained, flattened nuclei between the plates of hepatocytes.

Between the plates of hepatocytes, large quantities of red blood cells (erythrocytes) are observed (Fig. 1D).

## **3.2. Liver Histochemistry**

### **3.2.1. Bromophenol Blue Staining for Protein Detection**

#### **- Control Group**

Bromophenol blue staining revealed large amounts of proteins in the livers of control group animals (Fig. 1E), characterized by a strong positive reaction in the cytoplasm of hepatocytes as well as other cells of the liver parenchyma (Fig. 1E).



The nuclei of hepatocytes and Kupffer cells are strongly stained (Fig. 1E).

The lumen of hepatic capillaries located between plates of hepatocytes is stained due to large quantities of erythrocytes (Fig. 1E).

#### **- Group I (15 mg/Kg)**

The livers of group I individuals are strongly positive for proteins, although early stages of vacuolation are observed (Fig. 1F).

#### **- Group II (25 mg/Kg)**

Liver cells of group II individuals exhibit smaller amounts of proteins compared to the control group (Fig. 1G), as indicated by large unstained areas in hepatocytes as well as in other cells (Fig. 1G).

#### **- Group III (50 mg/Kg)**

The livers of group III individuals exhibit a prominent decrease in the amount of proteins compared to the control group (Fig. 1H).

An increase in unstained vacuolated areas is observed (Fig. 1H).

### **3.2.2. PAS Staining for Neutral Polysaccharide Detection**

#### **- Control Group**

The cytoplasm of hepatocytes of control group animals is positive for polysaccharides, characterized by coarse, evenly distributed granules, especially in peripheral regions of nuclei (Figs. 1I, J).

As this technique is not specific for demonstrating the nucleus, Kupffer cells (identified based on their nuclei under a light microscope) and the nuclei of hepatocytes are not observed (Figs. 1I, J).





The lumen of hepatic capillaries, as well as the lumen of large blood vessels of the liver, are either unstained or weakly stained (Fig. 1J). In the lumen of some capillaries, moderately positive granules are observed (Fig. 1I).

#### **- Group I (15 mg/Kg)**

Different staining patterns were observed depending on the region of the liver. Areas near blood vessels and/or distant from the periphery are weakly stained, while regions distant from blood vessels and/or near the liver periphery have strongly positive coarse granules distributed through the cytoplasm of hepatocytes (Figs. 2A, B).

#### **- Group II (25 mg/Kg)**

Hepatocytes of group II individuals present more granules of polysaccharides compared to both the control group and group I (Figs. 2C, D).

Hepatocytes present PAS-positive coarse granules that are more intensely stained near the peripheral regions of the liver (Fig. 2C). Some weakly positive vacuoles occupying the entire cytoplasm are also observed (Fig. 2D).

#### **- Group III (50 mg/Kg)**

Group III individuals present polysaccharides that are distributed in the cytoplasm of hepatocytes as well as in different regions of the liver, unlike the control group observations. Hepatocytes, which occupy areas near blood vessels, are weakly positive or negative to the test, while those distant from blood vessels exhibit strongly positive fine granules in the cytoplasm (Figs. 2E, F). Hepatocytes of both regions present many unstained vacuoles distributed throughout the cytoplasm (Fig. 2F).



### **3.2.3. Baker's Technique for Lipid Detection (Modified by Giovanetti, 2009)**

#### **- Control Group**

This technique revealed the presence of lipids in the cytoplasm of hepatocytes of control group animals (Fig. 2G).

The nuclei of all cells, including those of hepatocytes and Kupffer cells, and nucleoli of hepatocytes are stained with hematein, a compound obtained through the oxidation of hematoxylin (Fig. 2G).

The lumen of blood vessels, including hepatic capillaries, is also stained (Fig. 2G).

#### **- Group I (15 mg/kg)**

The hepatocytes of group I individuals exhibit some small unstained areas in the cytoplasm, probably due the presence of few vacuoles (Fig. 2H). However, most of the liver parenchyma is stained (Fig. 2H).

#### **- Group II (25 mg/Kg)**

The livers of individuals treated with 25 mg/Kg of fipronil are more intensely stained, suggesting an increase in the amount of lipids compared to group I and the control group (Fig. 2I).

Most hepatocyte cytoplasm is strongly positive for staining, except for unstained vacuoles (Fig. 2I).

The lumen of hepatic capillaries is also strongly stained (Fig. 2I).

#### **- Group III (50 mg/Kg)**

A significant increase in staining intensity is observed in the livers of group III individuals, indicating larger amounts of lipids in cells and in liver tissue as a



whole. Around the extensive vacuolar areas, a strongly positive lipid halo is observed (Fig. 2J).

The lumen of hepatic capillaries is still strongly positive, causing difficulties in distinguishing between them and strongly stained hepatocytes (Fig. 2J).

*Figures*

---

## LEGENDS

**Figure 1.** Histological sections of the liver of fipronil-treated mice. **A-D.** Hematoxylin and eosin (HE) staining. **A.** Control Group, **B.** Group I (15mg/Kg), **C.** Group II (25mg/Kg), **D.** Group III (50mg/Kg).

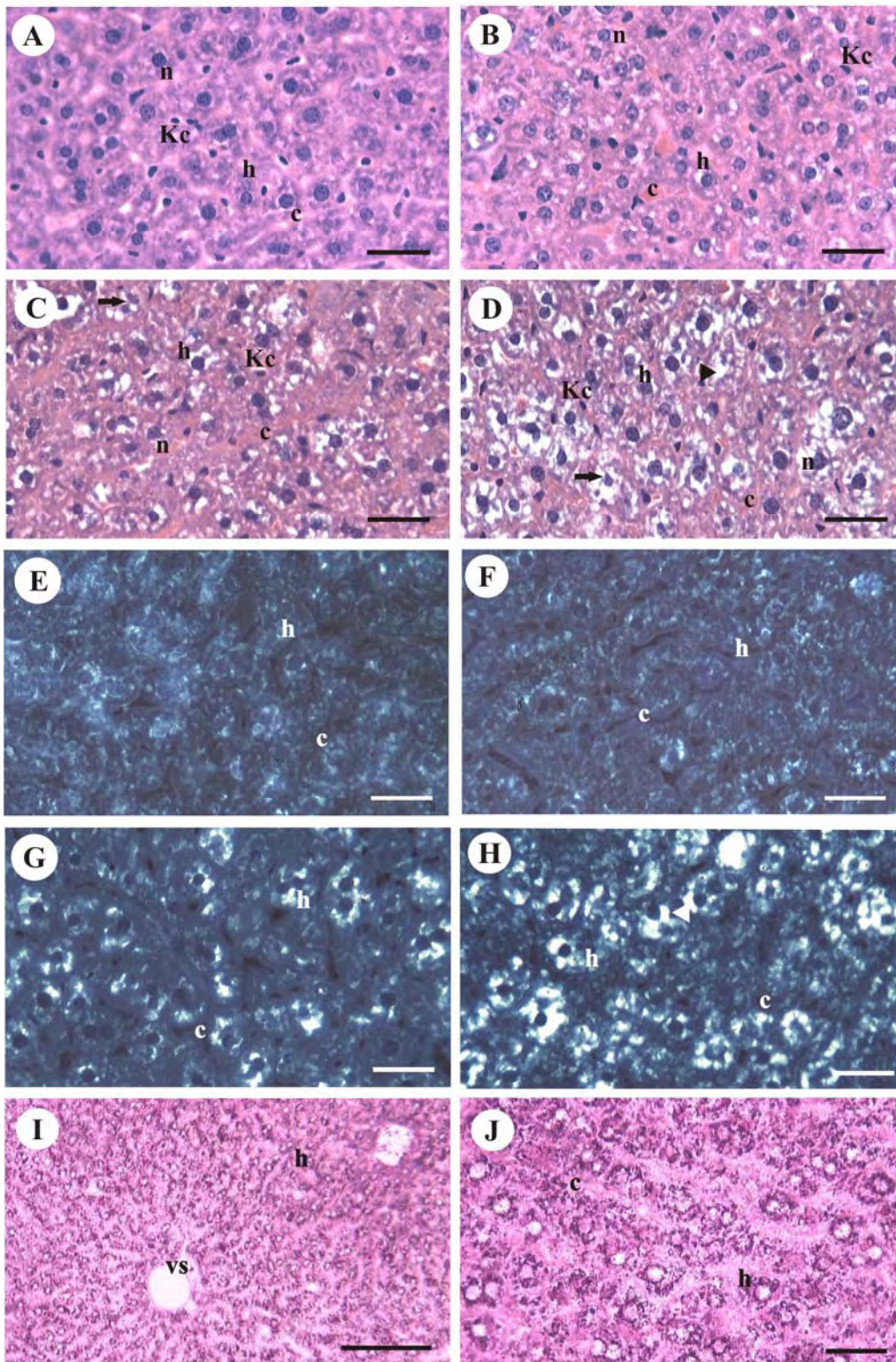
**E-H.** Bromophenol blue staining to detect proteins. **E.** Control Group, **F.** Group I (15mg/Kg), **G.** Group II (25mg/Kg), **H.** Group III (50mg/Kg).

**I-J.** PAS staining to detect polysaccharides. Control Group.

c= blood capillaries, h=hepatocytes, Kc= Kupffer cells, n= nucleus of hepatocytes;  
vs= blood vessels, arrow= pyknotic or partially fragmented nucleus, arrowhead=  
vacuoles.

**Scale bars:** A-H=0.02 mm; I=0.1 mm; J= 0.02 mm.

1



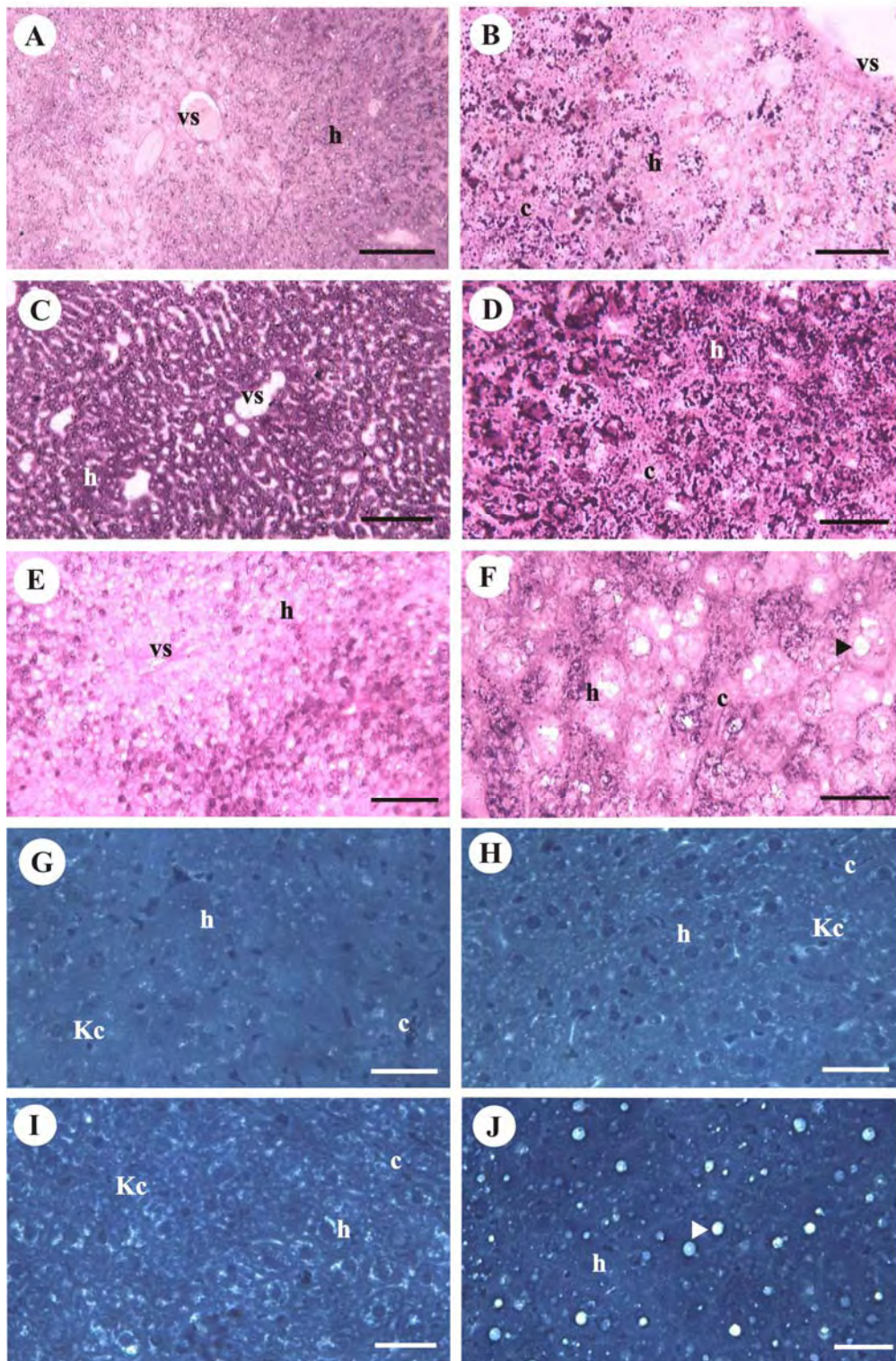
**Figure 2.** Histological sections of the liver of fipronil-treated mice. **A-F.** PAS staining to detect polysaccharides. **A.-B.** Group I (15mg/Kg), **C-D.** Group II (25mg/Kg), **E-F.** Group III (50mg/Kg).

**G-J.** Baker (Giovanetti, 2009) staining to detect lipids. **G.** Control Group, **H.** Group I (15mg/Kg), **I.** Group II (25mg/Kg), **J.** Group III (50mg/Kg).

c= blood capillaries, h=hepatocytes, Kc= Kupffer cells, vs= blood vessels, arrowhead= vacuoles.

**Scale bars :** A=0.1 mm; B= 0.02 mm; C=0.1 mm; D= 0.02 mm; E=0.1 mm; F= 0.02 mm; G= 0.02 mm; H= 0.02 mm; I= 0.02 mm; J= 0.02 mm.

2







#### 4. DISCUSSION

The liver is a central organ that is responsible for several vital functions of basic vertebrate metabolism (ARIAS et al., 1998), among them the capacity to accumulate, biotransform, and inactivate many toxic compounds (BRAUNBECK, 1998; GONZALEZ, 1993). Hepatocytes may be considered the first targets of toxic compounds, making the liver an important organ in toxicological studies (BRAUNBECK, 1998; ZELIKOFF, 1998).

Schwaiger et al. (1997) and Teh et al. (1997) pointed out that histopathological analysis has proven to be a sensitive tool for directly detecting the toxic effects of chemical compounds on target organs such as the liver.

In the present study, mice from treatment groups I, II, and III were exposed to doses of 15 mg/Kg, 25 mg/Kg, and 50 mg/kg, respectively. The techniques used revealed the damage caused by this compound in the livers of individuals of different groups compared with those of control group. The observed alterations were as follows: (1) proliferation of Kupffer cells, (2) hepatocyte hypertrophy, (3) presence, quantity, and distribution of proteins, polysaccharides, lipids, and vacuoles in the cytoplasm of these hepatocytes, and (4) blood vessel congestion.

In control group animals, the livers exhibited normal morphology and typical histology, as is widely reported in the literature (CARVALHO; COLARES-BUZATO, 2005; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; ROSS; PAWLINA, 2008); liver parenchyma consisted of anastomosed plates of hepatocytes separated by blood capillaries (sinusoids) and the Disse's space, in addition to other structures.

In the livers of individuals exposed to 15 mg/Kg fipronil (group I), some hepatocytes exhibited small hyaline vacuoles in the cytoplasm, suggesting an attempt by the cells to block the action of or to eliminate the toxic compound from the system, containing it in small compartments to be degraded later, as observed by Ferreira (1992) and Lopes-Flores and Malabarba (1997) in fish exposed to petrochemical effluents.

In individuals of group II (25 mg/Kg fipronil), the number of hepatocytes with morphological alterations increased, resulting in early stages of liver disorganization. Changes such as loss of original hepatocyte shape, mainly due to



swelling and cellular hypertrophy, increase in cytoplasmic vacuolation and/or presence of lipid droplets, and the presence of cells with pyknotic nuclei, confirmed the damage caused by fipronil.

Studies have demonstrated that cytoplasmic vacuolation in the hepatocytes of individuals exposed to toxic agents occurs due to hydropic degeneration or excessive lipid accumulation (steatosis). According to Rhodes et al. (1987) and Teh (1997), cell hypertrophy (gradual increase of the cytoplasmic area of hepatocytes) may be caused by several factors, including an increase in the smooth endoplasmic reticulum as a result of metabolic overload. This might have been the case in the present study, which would explain the changes observed in the shape of the livers and cells of fipronil-treated individuals. Simultaneously, hydropic, hyaline, and digestive vacuoles, as well as lipid droplets, might contribute to these changes.

In the literature, increases in liver size ranging from 10% to 50% have been reported, as confirmed by Larrey et al. (1983) and Schulte-Hermann (1974). According to these studies, this increase might be associated with stimulation of hepatic metabolism in an attempt to inactivate toxic agents.

The animals in this study that were treated with 50 mg/Kg (group III) of fipronil, had round-shaped hepatocytes (as a result of swelling) and extensive areas with cytoplasmic vacuoles and/or the presence of lipid droplets. This clearly indicates that as the concentration of fipronil increased, so did the number and type of histological alterations in the mouse livers. Similar results were obtained by Ferreira (1992) and Gül et al. (2004) in studies of fish exposed to polluted waters and by Rodrigues and Fanta (1995) in studies of fish exposed to organophosphorus compounds.

Carvalho and Colares-Buzato (2005) stated that round and empty hepatocytes vacuoles normally indicate sites that were previously filled with lipids, corroborating most of the results obtained in our study. Other studies by Gül et al. (2004) of fish exposed to polluted water also reported the presence of vacuoles of this nature in the livers of tested organisms.

On the other hand, some studies have suggested that irregularly shaped vacuoles do not contain lipids, but rather are autophagic vacuoles, which are mainly found during the recycling of cell components or in degenerating cells (Carvalho;



Pimentel, 2007; Junqueira; Carneiro, 2008; Roy; Bhattacharya, 2006). This may occur to eliminate damaged cell structures and recycle some useful components, explaining the increase in the number of vacuoles in the liver cells of fipronil-treated individuals as the doses increased and caused further damage.

The massive presence of vacuoles occupying extensive areas of the cytoplasm of hepatocytes may result in displacement of nuclei to the periphery and pressure that could lead to nuclear atrophy, preventing them from performing their activities, as suggested by the presence of pyknotic nuclei and prominent vacuolation in group III individuals. These data corroborate those obtained by Ram and Singh (1998) in fish exposed to the pesticide carbofuran and by Gül et al. (2004) in fish exposed to polluted waters.

The concentration levels of proteins in the livers of control group individuals were high and were seen in the form of coarse granules in hepatocyte cytoplasm. In fipronil-treated individuals (group I, II, and III), a progressive decrease in protein level was observed as the dose of fipronil increased, indicated by an increase in unstained, vacuolated areas. These data suggested that synthesis of structural proteins as well as exported proteins (albumins, prothrombin, fibrinogen, among others) might be compromised in hepatocytes, decreasing the efficiency of the cell to perform these functions and consequently compromising the general metabolism of the organ as well as the individual.

Polysaccharides also play an important role in hepatocyte function. In this study, liver cells of control group individuals exhibited coarse PAS-positive granules. Since the function of the liver is to modulate the energy from food to extra-hepatic tissues, the liver absorbs glucose from digested food and transforms it into glycogen to be stored in hepatocytes. When glucose levels in the blood drop (hypoglycemia), the liver converts glycogen back to glucose through glycogenolysis and releases it into bloodstream (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

A significant increase in the amount of polysaccharides in the form of PAS-positive granules was observed in the livers of individuals of groups I and II compared to those of control animals, indicating the storage of glycogen. These results suggest that glycogenolysis was not occurring or was inefficient in hepatocytes, probably due to the action of fipronil on the regulatory mechanisms of



the synthesis of enzymes involved in glycogenolysis. These characteristics were not observed by Schwaiger et al. (1997) in fish livers. Instead, this study showed that there were lower amounts of glycogen in hepatocytes of copper-intoxicated animals than in the livers of control group animals.

According to Junqueira and Carneiro (2008), because the blood runs in blood capillaries (sinusoids) from the periphery to the center of the hepatic lobule, liver cells might also be exposed to a gradient of blood components. Peripheral cells are the first to receive nutrients and oxygen as well as toxic substances and are thus the first to be affected. In the present study, peripheral hepatocytes of groups I and II animals had larger amounts of stored glycogen, indicating greater accumulation of polysaccharides in the peripheral regions of the liver lobule, which were the first to be damaged by fipronil.

The livers of animals treated with 50 mg/Kg fipronil (group III) had different polysaccharide staining patterns depending on the proximity to centrolobular veins. Weaker PAS-positive reactions were detected in hepatocytes surrounding the centrolobular veins, suggesting that these hepatocytes might be the first to have decreased capacity to convert glucose into glycogen. Similar results were also found in rats by Ferranini (1990).

Hepatocytes of group III animals also exhibited prominent PAS-negative cytoplasmic vacuolation, confirming the absence of polysaccharides.

Lipids were also found in control group animals. According to Carvalho and Pimentel (2007), the liver plays a central role in lipid and lipoprotein metabolism, mainly in the absorption, oxidation and/or metabolic conversion of free fatty acids, synthesis of cholesterol and phospholipids, and production and secretion of specific classes of lipoproteins.

In group I individuals, no significant changes were observed regarding hepatic lipids. However, in group II animals, an increase in lipids was observed, which might be due to a decrease in the capacity to produce and/or metabolize proteins that participate in the formation of lipoprotein complexes, which is required for the secretion of lipids into the extracellular space. Thus, a decrease in protein level might cause an accumulation of lipids in the cytoplasm of hepatocytes (steatosis), as described by Carvalho and Pimentel (2007).



In the livers of individuals exposed to 50 mg/Kg fipronil, steatosis was even more prominent. Ross and Pawlina (2008) suggested that metabolization, inactivation, and detoxification of many compounds occur at the smooth endoplasmic reticulum. The administration of drugs to individuals may cause hypertrophy of this organelle, which consequently increases the activity of enzymes involved in the breakdown of the drug as well as in lipid synthesis. The process described above may explain the large lipid deposits observed in the livers of mice exposed to fipronil at higher concentrations. Steatosis was also observed by Akashima and Hibiya (1995). According to Danton et al. (2009), this is observed in the liver in the early stages of apoptosis, necrosis, and fibrosis (due to alcohol abuse), and in the final stages of cirrhosis. On the other hand, the large amount of lipids observed in the present study may also be due to a halt in metabolic processes.

Vacuolated areas that were negative for lipids were also observed in the livers of group III individuals, although they were smaller and less frequent than those detected by histochemical tests to assay proteins and polysaccharides. This suggests that some vacuoles contained lipids while others were autophagic vacuoles. These results also confirmed that in individuals exposed to higher dose of fipronil (50 mg/Kg), autophagy is taking place, possibly in an attempt of eliminate as many damaged elements as possible while preserving the cell and minimizing damage.

In the present study, the effects of fipronil on the hepatic capillaries were also examined. Significant increases in the caliber (distention) of blood capillaries in animals of groups I, II, and III suggests that more blood cells are reaching the liver more quickly, a process described as “vessel congestion.” According to Booth (1992), this process facilitates white cell migration; neutrophils, monocytes, and lymphocytes, among other cells, participate in the inflammatory process and/or the removal of foreign substances. Although prominent congested blood vessels were observed in the present study, inflammatory processes were absent.

Another significant change was the increase in the number of Kupffer cells in the livers of animals of groups I, II, and III. These are hepatic macrophages that are part of the mononuclear phagocyte system. Similar results were reported by Sreelatha et al. (2009) in the livers of CCl<sub>4</sub> (carbon tetrachloride)-treated mice.



Kupffer cells have several functions, including phagocytosis of old erythrocytes, digestion of hemoglobin, production of bilirubin as well as secretion of enzymes needed for intracellular digestion (immunological processes). Therefore, as doses of fipronil increase, macrophage activity would also be expected to increase in an attempt to remove remnants of damaged structures and fipronil itself.

The analysis of the livers of mice exposed to different doses of fipronil, a chemical compound widely used in insecticides and acaricides, revealed damage in liver cells and tissues as well as in the liver as a whole, characterized by a) autophagic processes, b) steatosis, and c) cell death by necrosis. The liver has a remarkable capacity to regenerate; however, when the damage is continuous or frequent, simultaneous with regeneration, a considerable increase in the amount of connective tissue is observed. When produced in excess, this connective tissue causes hepatic circulation disorganization, leading to serious pathological liver disorders.

This study demonstrates the effect of fipronil on animals that are simulated hosts of ticks, which are ectoparasites that are often treated with products containing this chemical compound.

## 5. ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank FAPESP (Grant n° 2006/52599-0 and 2008/59020-0) and CNPQ (Grant n° 308733/2006-1) for financial support.

## 6. REFERENCES

Arias, I. M., Jakoby, W.B., Popper, H, Schachter, D., Schafritz, D. A., 1998. The liver: biology and pathobiology. Raven, New York, 393pp.

Booth, N.H., Mcdonald, L.E., 1992. Farmacologia e Terapêutica em Veterinária. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 496pp.

Braunbeck, T., 1998. Cytological alterations in fish hepatocytes following in vivo and in vitro sublethal exposure to xenobiotics – structural biomarkers of



environmental contamination. In: Braunbeck, T., Hinton, D.E., Streit, B. (Eds.), *Fish Ecotoxicology*. Birkhäuser, Berlin, pp. 61-140.

Carvalho, H.F., Colares-Buzato, C.B., 2005. *Células: Uma abordagem multidisciplinar*. Manole, São Paulo, pp.146-155.

Carvalho, H. F., Recco-Pimentel, S. M., 2007. *A célula*. Manole, São Paulo, pp. 200-210.

Dalton, S. R., Lee, S. M.L., King, R. N., Nanji, A. A., Kharbanda, K. K., Casey, C.A., Mcvicker, B. L., 2009. Carbon tetrachloride-induced liver damage in asialoglycoprotein receptor-deficient mice. *Biochem. Pharmacol.* 77, 1283– 1290.

Das, P. C., Cao, Y., Cherrington, N., Hodgson, E., Rose, R.L., 2006. Fipronil induces CYP isoforms and cytotoxicity in human hepatocytes. *Chem.-Biol. Interact.* 164, 200–214.

Ferranini, E., 1990. Influence of long-term diabetes on liver glycogen metabolism in the rat. *Metabolism.* 39, 1082-1089.

Ferreira, M. F. N., 1992. Avaliação da toxicidade dos efluentes líquidos do sistema integrado de tratamento do Pólo Petroquímico do Sul sobre a morfogênese de larvas de *Pimephales promelas* (Rafinesque, 1820). Dissertação de Mestrado da Pós-graduação em Oceanografia Biológica, FURG, Rio Grande, 107pp.

Gonzalez, G., Crespo, S., Bruske, J., 1993. Histo-cytological study of the liver of the cabrilla sea bass, *Serranus cabrilla* (Teleostei, Serranidae), an available model for marine fish experimental studies. *Jour. of Fish Biol.* 43, 363-373.

Gül, S., Belge-Kurutas, E., Yildiz, E., Sahan, A., Doran, F., 2004. Pollution correlated modifications of liver antioxidant systems and histopathology of fish (Cyprinidae) living in Seyhan Dam Lake, Turkey. *Environ. Int.* 30, 605– 609.

Hugnet, C., Cadore, J.L, Bourdoiseau, G., 1999. Use of fipronil spray (0.25%) for the treatment of *Damalinia equi* [(Wereckiella equi) infestation]. *Prat. Vet. Equine* 31, 65-68.

Junqueira, L.C.U., Junqueira, L.M.M.S., 1983. *Técnicas básicas de citologia e histologia*. Livraria Editora Santos, São Paulo, pp. 48-81.

Junqueira, L. C., Carneiro, J., 2008. *Histologia Básica*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, pp. 230-290.



Kierszbaum, A.L., 2004. Histologia e Biologia Celular: uma introdução à patologia. Elsevier, Rio de Janeiro, pp. 310-501.

Larrey, D., Tinel, M., Pessayre, D., 1983. Formation of inactive cytochrome P-450 Fe(II)-metabolite complexes with several erythromycin derivatives but not with josamycin and midecamycin in rats. *Biochem. Pharmacol.* 32, 1487-1493.

Lopes-Flores, F., Malabarba, L.R., 1997. Alterações histopatológicas observadas no fígado do lambari *Astyanax jacuhiensis* (Cope, 1894) (Teleostei, Characidae) sob a influência de efluentes petroquímicos. *Biociências* 15, 166-172.

Lyons, G., 2000. Mixed messages: pesticides that confuse hormones. *Pest. Science* 23, 4-6.

Pearse, A.G.E., 1985. Histochemistry theoretical and applied. Livingstone, Churchill, pp. 123-214.

Ram, R.N.; Singh, S. K. Carbofuran-induced histopathological and biochemical changes in liver of the teleost fish, *Channa punctatus* (Bloch). *Ecotoxicol Environ Saf*, v. 16, p. 194-201, 1998.

Rhodes, L.D., Myers, M.S., Gronlund, W.D., McCain, B.B., 1987. Epizootic characteristics of hepatic and renal lesions in English sole, *Parophrys vetulus*, from Puget Sound. *J. Fish. Biol.* 38, 395-407.

Rodrigues, E. L., Fanta, E., 1998. Liver histopathological of the fish *Brachydanio rerio* Hamilton-Buchman after acute exposure to sublethal levels of the organophosphate Dimethoate 500. *Revta. Braz.. Zool.* 15, 441-450.

Ross, M. H., Pawlina, W., 2008. Histologia em correlação com biologia celular e molecular. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, pp.427-594.

Roy, S., Bhattacharya, S., 2006. Arsenic-induced histopathology and synthesis of stress proteins in liver and kidney of *Channa punctatus*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 65, 218-229.

Schulte-Hermann, R., 1974. Induction of liver growth by xenobiotic compounds and other stimuli. *CRC Crit. Rev. Toxicol.* 3, 97-158.

Schwaiger, J., Wanke, R., Adam, S., Pawert, M., Honnen, W., Triebkorn, R., 1997. The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. *J. Aquat. Ecosyst. Stress Recovery* 6, 75-86.





Sreelatha, S., Padma, P. R., Umadevi, M., 2009. Protective effects of *Coriandrum sativum* extracts on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. *Food Chem. Toxicol.* 47, 702–708.

Takashima, F., Hibiya, T., 1995. An atlas of fish histology: normal and pathological features. Kodansha/Stuttgart: Fischer Verlag, Tokyo, 195pp.

Teh, S.J., Adams, S.M., Hinton, D. E., 1997. Histopathological biomarkers in feral freshwater fish populations exposed to different types of contaminant stress. *Aquat. Toxicol.* 37, 51-70.

Zelikoff, J. T., 1998. Biomarkers of immunotoxicity in fish and other non-mammalian sentinel species: predictive value for mammals? *Toxicol.* 129, 63-71.

## *Capítulo 4*

---



#### IV.4. Capítulo 4

**Test to assess the toxicity of the acaricide fipronil in semi-engorged females of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). Determination of the LC<sub>50</sub>.**

Patrícia Rosa de Oliveira<sup>a</sup>; Gervásio Henrique Bechara<sup>b</sup>; Sandra Eloisi Denardi<sup>a</sup>; Marcos Aparecido Pizano<sup>a</sup> & Maria Izabel Camargo Mathias<sup>a\*</sup>.

<sup>a</sup> Department of Biology, Institute of Biosciences, São Paulo State University-UNESP, Av. 24 A, nº 1515, Phone: 55 19 35264135, Postal Code 199, Zip Code: 13506-900, Rio Claro– SP, Brazil.

<sup>b</sup> Department of Animal Pathology, Faculty of Agronomic and Veterinary Sciences, São Paulo State University-UNESP, Via de Acesso Prof. Paulo Castellane, s/n, Zip Code: 14884-900, Jaboticabal–SP, Brazil.

Artigo submetido ao periódico: Experimental Parasitology.



## RESUMO

O método de controle mais eficaz das populações de carrapatos ainda é o químico, por meio do uso de acaricidas, especialmente o fipronil (ingrediente ativo do Frontline®), que age como bloqueador da estimulação neural. O presente estudo avaliou a eficácia do acaricida fipronil em fêmeas semi-ingurgitadas de carrapatos *R. sanguineus* por meio do desenvolvimento de protocolo adequado de bioensaio *in vitro* (AIT), monitorado diariamente, com determinação da  $CL_{50}$  (concentração letal 50%) e intervalo de confiança a 95%. Os carrapatos foram imersos em placas de Petri contendo as diferentes concentrações de fipronil ou água destilada, durante 2 minutos e depois foram secos e colocados em incubadora durante 7 dias. Os resultados mostraram o número de fêmeas de *R. sanguineus* mortas diariamente após o tratamento com 14 concentrações de fipronil. Os dados de mortalidade foram submetidos à análise de Probit, onde se obteve a  $CL_{50}$  a intervalo de confiança (95%),  $g(95)$ :  $CL_{50} = 9.647$  (4.711 a 13.470). Este trabalho contribuirá fornecendo protocolo de bioensaio *in vitro* (AIT - testes de imersão de adultos) mais adequado e atualizado, informações sobre o potencial tóxico do acaricida fipronil (eliminação dos ectoparasitas já nas menores concentrações) e a sensibilidade dos carrapatos, principalmente o *R. sanguineus*, importante praga urbana e de grande interesse da sociedade, uma vez que ocupa também ambientes urbanos.

**Palavras-Chave:** fipronil; *Rhipicephalus sanguineus*; carrapato,  $CL_{50}$ ; acaricida.



## ABSTRACT

Chemical acaricides, especially fipronil (active ingredient of Frontline®), are still the most effective method to control tick populations. In this study, the effectiveness of fipronil was assessed in semi-engorged females of the tick *R. sanguineus*. A protocol for an *in vitro* bioassay (AIT) was developed, and the  $LC_{50}$  (lethal concentration 50%) and 95% confidence interval were determined. Ticks were immersed in Petri dishes with different concentrations of fipronil or distilled water for 2 minutes, dried, and placed in an incubator for 7 days. Dead *R. sanguineus* females treated with the 14 concentrations of fipronil were counted daily. Mortality results were compared with the Probit analysis, and the  $LC_{50}$  and 95% confidence interval were calculated, g (95):  $LC_{50} = 9.647$  (4.711 to 13.470). This study was aimed at developing a more appropriate and updated protocol for an *in vitro* bioassay (AIT – adult immersion test), and providing information on the toxic potential of fipronil (elimination of ectoparasites with lower concentrations) and sensitivity of ticks, especially *R. sanguineus*, a pest of great interest, due to its occurrence in urban environments.

**Keywords:** fipronil; *Rhipicephalus sanguineus*; tick;  $LC_{50}$ ; acaricide.



## 1. INTRODUCTION

*Rhipicephalus sanguineus* is a tick of great medical and veterinary interest (LINARDI; NAGEM, 1973; LABRUNA; PEREIRA, 2001; SZABÓ et al., 2001; GONZÁLEZ et al., 2004; SOARES et al., 2006). This arthropod is the main vector and reservoir of *Ehrlichia canis* and is responsible for the transmission of other pathogens such as *Babesia canis*, *B. caballi*, *B. equi* (SEXTON et al., 1976), and *Hepatozoon canis* (CRAIG, 1990). Some studies have also suggested the participation of *R. sanguineus* in the transmission of canine visceral leishmaniasis (COUTINHO et al., 2005), and may be vector of *Coxiella burnetii*, agent of the human Q fever (STEPHEN; ACHYUTHARAO, 1980); rickettsiae, agent of the Rocky Mountain spotted fever; *Rickettsia conori*, agent of the Mediterranean spotted fever (MERLE et al., 1998); the causative agent of Lyme-simile disease (YOSHINARI et al., 1997); and the bacteria *Francisella tularensis*, agent of the tularemia (WALKER, 2000).

In addition to being the responsible for the transmission of pathogens, *R. sanguineus* also causes direct damage to their hosts characterized by blood loss, skin lesions and secondary infections, such as myiasis and abscess (BALASHOV, 1972; WALL, SHEARER, 1997).

Chemical acaricides still are the most efficient method to control tick populations, while immunological and biological controls play a supplemental role. New acaricides are being tested in the market, such as macrocyclic lactones (active components of Ivermectin® and Moxidectin®) and fipronil (active component of Frontline®), which blocks transmission of neural signals, as well as fluzuron (active compound of Acatak®), which inhibits tick development or growth (TAYLOR, 2001).

Fipronil is a phenylpyrazole pesticide developed by the transnational company Rhône-Poulenc Agro in 1987. In the US, fipronil is available in a range of formulations, from attractive baits for ant and cockroach control to sprays used in veterinary products for the control of ticks, fleas (Frontline®), and mites (PENALIGGON, 1997; HUGNET et al., 1999; HIGGINS et al. 2001).



The efficacy of a chemical can be assessed by *in vitro* bioassays, which are relatively simple to be performed, inexpensive, and require little specialized equipment (SCOTT, 1995).

The toxicity of a chemical is defined as its capacity to kill or cause damage to an organism. Many natural or synthetic compounds are potentially toxic, thus causing adverse effects in certain conditions. The concentration and conditions of the exposure are the main factors determining the toxic effect of a given compound (OTTOBONI, 1991). In toxicity studies, the **LD<sub>50</sub>** (Lethal Dose 50%) is defined as the single dose of a chemical compound capable of statistically causing the death of 50% of exposed animals. Another commonly used parameter is **LC<sub>50</sub>** (Lethal Concentration 50%), which is defined as the concentration of a chemical compound that when applied in the environment where the target population is present, causes the death of 50% of organisms (OTTOBONI, 1991).

Because of the wide use of fipronil to control several pests, including ticks, its toxic potential, the importance and the interest on *R. sanguineus* as an urban pest, and the few and old protocols available for *in vitro* bioassays (AIT – adult immersion tests) (Drummond *et al.*, 1973), the present study was aimed at assessing the effectiveness of fipronil in semi-engorged females of the tick *R. sanguineus* and developing an appropriate protocol for an *in vitro* bioassay (AIT), monitored daily. The **LC<sub>50</sub>** and the 95% confidence interval were also determined.

## 2. MATERIAL AND METHODS

### 2.1. Chemical Compound

Fipronil is phenylpyrazole compound, chemical name (RS)-5-amino-1-(2,6-dichloro- $\alpha,\alpha,\alpha$ -trifluoro-p-tolyl)-4-trifluoro methylsulfinylpyrazole-3-carbonitrile and CAS #: 120068-37-3. Fipronil was obtained from Regent 800 WG, a commercial product produced by BASF with purity level of 80%.



## 2.2. *Rhipicephalus sanguineus* Ticks (Latreille, 1806)

Female *R. sanguineus* ticks were exposed to fipronil at the concentrations of 100 ppm, 50 ppm, 25 ppm, 20 ppm, 17.5 ppm, 15 ppm, 12.5 ppm, 10 ppm, 7.5 ppm, 5 ppm, and 1 ppm, and distilled water (control group). Semi-engorged *Rhipicephalus sanguineus* females were obtained from a colony maintained under controlled conditions (28° C  $\pm$ 1 ° C, 80% humidity and 12-hour photoperiod for 24 hours) in BOD incubator in the Animal Facility of the Department of Biology (IB) – UNESP, campus de Rio Claro/SP, Brazil. Before the experiment, females were examined under stereomicroscope and only intact females capable of moving were selected.

Semi-engorged females were obtained after unfed *R. sanguineus* couples (25 couple/infestation) were allowed to feed on naive New Zealand white rabbits maintained in cages with *ad libitum* water and commercial rabbit food, following Bechara et al. (1995).

This study was approved by the Committee of Ethics in Animal Research of the UNIARARAS/SP/Brazil, protocol # 09/2009.

## 2.3. *In vitro* bioassay using Fipronil

### 2.3.1. Bioassay 1

In this bioassay, the concentration of fipronil recommended by the makers of Frontline® was used (2500 ppm). Based on this initial concentration, the concentrations of 100 ppm, 50 ppm, 25 ppm, 15 ppm, 10 ppm, 5 ppm and 1 ppm of fipronil were obtained by diluting the initial concentration with distilled water.

Petri dishes with one duplicate each were filled with fipronil in these concentrations and with distilled water (control group).

Twenty semi-engorged *R. sanguineus* females (10 ticks per Petri dish, total of 160 females) were used for each concentration of fipronil and for the control group. Before starting the bioassay, all ticks were rinsed in a colander under tap water and dried with soft paper towel.

After being washed, 20 female ticks were immersed in a solution of 100 ppm of fipronil in Petri dishes for 2 minutes. The same procedure was repeated for all





concentrations of fipronil. For the control group, ticks were immersed in distilled water for 2 minutes. After this time, ticks were dried with paper towel and placed in Petri dishes in an incubator for 7 days, since acaricides usually act slowly in the physiology of ticks, and their effects are only visible after this period (ROMA et al, 2009).

The mortality of ticks and the effects of fipronil were monitored daily. The mortality interval was determined by observing the behavior of ticks until the 7<sup>th</sup> day of treatment. Ticks were considered dead when they did not respond by moving their legs when touched with a paintbrush.

### 2.3.2. Bioassay 2

After determining the mortality interval (5ppm – 25ppm), fipronil was diluted within this interval. The final concentrations (dilutions) were: 20 ppm, 17.5 ppm, 15 ppm, 12.5 ppm, 10 ppm, 7.5 ppm, and 5 ppm of fipronil. The control group was only exposed to distilled water.

The number of semi-engorged *R. sanguineus* females treated with the concentrations of fipronil and the control group totaled 160 ticks (10 ticks per Petri dish, with one duplicate for each concentration).

All *R. sanguineus* females were rinsed and dried before the experiment.

The procedure for immersing the ticks was the same as that described in bioassay 1. Ticks were immersed in Petri dishes containing different concentrations of fipronil or distilled water for 2 minutes, dried, and placed in incubator for 7 days.

The mortality of ticks was monitored daily for each concentration tested and was later compared with the Probit analysis.

### 2.4. Statistical Analysis

The results obtained in bioassay 2 on the mortality of semi-engorged *R. sanguineus* females were compared with the Probit analysis using the software POLO-PC (LeOra SOFTWARE, 1987). Based on the relationship between the concentration of fipronil/tick mortality, the  $LC_{50}$ , the 95% confidence interval, and



the slope of the regression were calculated. This analysis was chosen, since the result of the bioassay was a binomial response (survivor or death of exposed ticks).

### 3. RESULTS

The total mortality of semi-engorged *R. sanguineus* females treated with fipronil was calculated using the 14 concentrations tested (Tables 1 and 2).

The results of the bioassays revealed that *R. sanguineus* females are sensitive to fipronil in all concentrations tested. However, the number of dead ticks for each concentration of fipronil was significantly different (Tables 1 and 2)

In bioassay 1, the mortality rate of females (0 - 100%) increased with higher concentrations of fipronil (1ppm, 5ppm, 10ppm, 15ppm, 25ppm, 50ppm, and 100ppm). Also, the effects of fipronil (in all concentrations) progressively increased with the duration of the experiment. Peak mortality was observed in the fourth and fifth day of treatment (Table 1).

At lower concentrations of fipronil (1ppm and 5ppm), no immediate responses were observed in treated ticks. At the concentrations of 10 ppm, 15 ppm, 25 ppm, 50 ppm, and 100 ppm, ticks exhibited hyperexcitation, convulsion, and paralysis.

In the control group, dead ticks or behavioral changes were not observed during the observation period.

The mortality interval was obtained based on the number of dead ticks for each concentration of fipronil tested in bioassay 1 (Table 1).

Bioassay 2 was conducted with ticks treated with concentrations of fipronil based on the mortality interval. In this bioassay, the responses for all concentrations tested (7.5 ppm, 10 ppm, 12.5 ppm, 15 ppm, 17.5 ppm, and 20 ppm) were the same as those observed in the higher concentrations tested in bioassay 1, except at the concentration of 5ppm, in which no behavioral changes were observed in treated ticks (Table 2)

In bioassay 2, tick mortality progressively increased (15% - 70%) during the 7 days of observation as the concentration of fipronil increased (5ppm, 7.5 ppm, 10



ppm, 12.5 ppm, 15 ppm, 17.5 ppm, and 20 ppm). Peak mortality was observed in the fourth and fifth day of experiment (Table 2).

The mortality rates obtained in bioassay 2 were compared with the Probit analysis to estimate the  $LC_{50}$  and the 95% confidence interval,  $g(95)$ :  $LC_{50} = 9.647$  (4.711 a 13.470), the slope  $\pm$  standard deviation was found to be  $1.76235 \pm 0.417$ , and  $\chi^2 = 1.9377$  (Table 3).

#### 4. DISCUSSION

Seeking to increase the success rates of pest control with different chemical agents (arsenicals, organochlorines, organophosphates, carbamates, nitroguanidines, phenylpyrazoles, formamidines, pyrethroids, avermectins, macrocyclic lactones, and phenyl ureas) (HÄUSERMAN et al., 1992; COSSIO-BAYUGAR et al., 2002), new drugs, like fipronil, are being developed (PARADIS, 1999).

Fipronil is a broad-spectrum chemical agent available in the market in a range of formulations, from attractive baits for ant and cockroach control to sprays used in veterinary products for the control of ticks, fleas (Frontline®), and mites (PENALIGGON, 1997; HUGNET et al., 1999; HIGGINS et al. 2001). Since this product is relatively new in the market, no cases of resistance have been reported (SABATINI et al., 2001). However, its effects are not fully known, as well as the direct and indirect consequences of its use. This information is useful for diagnosing intoxication and for specific treatments (BAHIA, 1995).

The tick *Rhipicephalus sanguineus* is an arthropod of great medical and veterinary importance. This species is the vector of several pathogens to their hosts, including man, and causes direct damage, such as high volume of blood loss, in infested animals (WALKER, 2000).

Because of the wide use of fipronil, the importance of knowing its lethal concentration to ticks, and the need to have information on the potency and sensitivity of target animals, the present study was aimed at developing a bioassay protocol to assess the effectiveness of fipronil, and determining the  $LC_{50}$  in semi-engorged *R. sanguineus* females.



The commercial product used was Regent 800 WG (produced by BASF with purity level of 80%). This product was chosen after several tests conducted in the attempt to solve problems of solubility and avoid a commercial product with other components in its formulation, which could compromise the interpretation of results.

To examine the susceptibility of a given tick species to an acaricide, our study was aimed at developing a practical, fast, inexpensive, and reliable test, such as the “*in vitro*” bioassay (SCOTT, 1995). This technique was termed AIT (adult immersion test) (WHITNALL; BRADFORD, 1947; HITCHCOCK, 1953, DRUMMOND et al., 1973) and consisted in the immersion of semi-engorged tick females in the tested acaricide.

Currently, few AIT protocols are available in the literature and the most frequently used for laboratory tests still is the one developed by Drummond et al. (1973).

AIT is influenced by several factors, especially immersion time. In the case of fipronil, this was also a critical point in this study. Because of its high toxicity, the maximum immersion time of semi-engorged *R. sanguineus* females was two minutes.

Previous studies have reported various immersion times to test different concentrations and doses of some acaricides. Oliveira et al. (2000) used 10 minutes for amitraz, Mendez et al. (2000), 15 min for cypermethrin, and Roma et al. (2009), 5 min for permethrin. Sabatini et al. (2001), however, had difficulties to obtain commercial products with high concentration of the active ingredient, and used the same concentration of macrocyclic lactones, but altered the immersion time. This increased the mortality of ectoparasites, as the immersion time increased.

The results of bioassays 1 and 2 obtained in our study revealed that the increase in the concentration of fipronil (1ppm – 100ppm) caused a progressive increase in the mortality of semi-engorged *R. sanguineus* females.

The lethal time (time needed to kill test organisms in a bioassay) decreased inversely to the increase in the concentration of fipronil, indicating the relatively fast action of fipronil. The mortality of 50% of ticks was observed with the concentration of 20 ppm de fipronil after 4 days of treatment (Table 2). At the concentration of 10 ppm, the same mortality rate was observed in 7 days of treatment (Table 2),



indicating that fipronil can be used in lower concentrations than the one recommended, consequently decreasing the chances of contamination of non-target organism and the environment.

An increase in the number of dead ticks caused by fipronil (in all concentrations) was observed in the fourth and fifth day of treatment, indicating that although the acaricide is already affecting ticks, its effects are significantly increased during these days .

Morphological, physiological, and behavioral alterations were not observed in ticks treated with fipronil at lower concentrations (1ppm and 5ppm). However, at higher concentrations (7.5 ppm – 100 ppm), ticks exhibited hyperexcitation and paralysis. These reactions are the result of the effects of fipronil in the central nervous system, disrupting the binding of the neurotransmitter GABA to its receptors, and consequently preventing chloride ion uptake into the cells (RAUH et al., 1990; SATTELLE, 1990; COLE et al., 1993). These data are in agreement with those obtained by other authors for different invertebrates exposed to fipronil (RAUH et al., 1990; SATTELLE, 1990; COLE et al., 1993).

In the control group, immersed only in distilled water, no dead ticks, ticks exhibiting uncoordinated movements, paralysis or morphological and/or behavioral changes were not observed during the experiment.

The effects of fipronil in semi-engorged *R. sanguineus* females were compared with the Probit analysis using the software POLO-PC (LeOra SOFTWARE, 1987). The slope  $\pm$  standard deviation was found to be  $1.76235 \pm 0.417$ , demonstrating a wide variation in the response of ticks to the different concentrations of fipronil. The chi-square value was not significant (1.9377), indicating that the results of Bioassay 2 fit the Probit model. After assessing the goodness-of-fit of the Probit model, the estimated  $LC_{50}$  of fipronil of semi-engorged *R. sanguineus* females and the 95% confidence interval was  $LC_{50} = 9.647$  (4.711 to 13.470). Compared with other pesticides, such as permethrin ( $LC_{50} = 2062$ ppm) (ROMA et al., 2009), the  $LC_{50}$  of fipronil was extremely low, demonstrating its high potential for pest control.

Our findings are a contribution for the understanding of the sensitivity of ticks (target organisms) and the toxic potential of fipronil in semi-engorged *R.*



*sanguineus* females. Tick mortality was observed in concentrations even lower than those suggested in the directions of use of existing commercial products. This indicates that lower concentrations could efficiently eliminate ectoparasites and decrease the risks of contamination of the environment and non-target organisms, including man, since *R. sanguineus* occurs in urban environments as a result of the interaction between dogs and humans.

## 5. ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank to FAPESP (Grant n° 2006/52599-0 and 2008/59020-0) and CNPQ (Grant n° 308733/2006-1) for financial support and academic career research fellowship to G.H. Bechara and M.I. Camargo-Mathias.

## 6. REFERENCES

BAHIA. 1995. Manual de normas e procedimentos técnicos para vigilância da saúde do trabalhador. Bahia: Secretaria da Saúde do Estado da Bahia. Departamento de Vigilância da Saúde. Centro de Estudos da Saúde do Trabalhador, p.20-31.

BALASHOV, Y.S. 1972. A translation of bloodsucking ticks (Ixodidae) vectors of diseases of man and animals. Miscellaneous Publications of the Entomological Society of America 8, p. 159-376.

BECHARA, G. H.; SZABO, M. P. J.; FERREIRA, B. R.; GARCIA, M. V. 1995. *Rhipicephalus sanguineus* tick in Brazil: feeding and reproductive aspects under laboratorial conditions. Brazilian Journal of Veterinary Parasitology 4 (2), p. 61-66.

COLE, L.M.; NICHOLSO, R.A.; CASIDA, J.E. 1993. Action of phenylpyrazole insecticides at the GABA-gated chloride channel. Pestic. Biochem. Physiol. 46, p. 47-54.



COSSIO-BAYUGAR, R.; WAGNER, G.G.; HOLMAN, P.J. 2002. *In vitro* generation of organophosphate resistant *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) cell lines. *Journal of Medical Entomology* 39, 278-284.

COUTINHO, M.T.Z.; BUENO, L.L.; STERZIK, A.;FUJIWARA, R.T.; BOTELHO, J.R.; DE MARIA, M.; GENARO, O.; LINARDI, P.M. 2005. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniosis. *Veterinary Parasitology* 128, p. 149-155.

DRUMMOND, R.O., CRUST, S.F., TREVINO, J.L., GLADNEY, W.J., GRAHAM, O.H. 1973. *B. annulatus* and *B. decoloratus*: laboratory tests of insecticides. *J. Econ. Entomol.* 66, 130–133.

CRAIG, T. M. 1990. *Infectious Diseases of the Dog and Cat* (Greene, C. E., Ed.). Philadelphia: W.B. Saunders Co., p. 778-785.

GONZÁLEZ, A.; CASTRO DDEL, C.; GONZÁLEZ, S. 2004. Ectoparasitic species from *Canis familiaris* (Linné) in Buenos Aires province, Argentina. *Veterinary Parasitology* 120, p.123-129.

HÄUSERMAN, W.; FRIEDEL, T.; HESS, E.A.;STRONG, M.B. 1992. A new active ingredient for a new approach to protect cattle against ticks. In: *Proceedings of XIX International Congress of Entomology* (Beijing, China), p.138.

HITCHCOCK, L.F., 1953. Resistance of cattle tick (*Boophilus microplus*, Canestrini) to benzene hexachloride. *Aust. J. Agric. Res.* 4, 360–364.

HUGNET, C.; CADORE, J.L; BOURDOISEAU, G. 1999. Use of fipronil spray (0.25%) for the treatment of *Damalinia equi* [(*Wereckiella equi*) infestation]. *Pratique Veterinaire Equine* 31 (12), p.65-68.



LABRUNA, M.B. 2004. Biologica-ecologia de *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária 13, p. 123-124.

LINARDI, P.M.; NAGEM, R.L. 1973. Pulicídeos e outros ectoparasitos de cães de Belo Horizonte e municípios vizinhos. Revista Brasileira de Biologia 33 (4), p. 529-538.

MENDES, M.C., OLIVEIRA, R.O., VIEIRA-BRESSAN, M.C.R., 2000. Determination of minimal immersion times for use in in vitro resistance test with *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) engorged females and pyrethroid acaricides. Rev. Brasileira Parasitol. Vet. 9, 33–39.

MERLE, C.; SOTTO, A.; BARBUAT, C.; JOURDAN, J. 1998. Disease course of Mediterranean Spotted Fever: remark on 16 cases. 7e Colloque sur le Controle Epidemiologique des Maladies Infectieuses 21, p. 400-4001.

OLIVEIRA, R.O., MENDES, M.C., JENSEN, J.R., VIEIRA-BRESSAN, M.C.R., 2000. Determination of the minimal immersion time of *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) engorged females for in vitro resistance tests with amitraz at 50% effective concentration (EC50). Rev. Brasileira Parasitol. Vet. 9, 41–43.

OTTOBONI, M.A. 1991. The dose makes the poison. New York: Van Nostrand Reinhold, 244pp

PARADIS, M. 1999. New approaches to the treatment of canine demodicosis. The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice, Philadelphia 29 (6), p. 1425-1436.

PENALIGGON, J. 1997. Getting to grips with fleas on pet dogs and cats. Pesticide Outlook 8 (4), p.19-23.





RAUH, J.J.; LUMMIS, S.C.; SATTELLE, D.B. 1990. Pharmacological and biochemical properties of insect GABA receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 8, p. 325–9.

ROMA, G. C.; OLIVEIRA, P. R.; PIZANO, M.A.; CAMARGO-MATHIAS, M.I. 2009. Determination of LC<sub>50</sub> of permethrin acaricide in semi-engorged females of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). *Experimental Parasitology* 123, 269-272

SABATINI, G.A., KEMP, D.H., HUGHES, S., NARI, A., HANSEN, J., 2001. Test to determine LC<sub>50</sub> and discriminating doses for macrocyclic lactones against the cattle tick *Boophilus microplus*. *Vet. Parasitol.* 95, 53–62.

SATTELLE, D.B. GABA receptors of insects. 1990. *Adv. Insect Physiol.* 22, p. 1–113.

SCOTT, J.A., 1995. The molecular genetics of resistance: resistance as a response to stress. *Fla. Entomol.* 78, 399–414.

SEXTON, D.J.; BURGDORFER, W.; THOMAS, L. 1976. Rocky mountain spotted fever in Mississippi: survey for spotted fever antibodies in dogs and for spotted fever group Rickettsiae in dog ticks. *American Journal of Epidemiology* 103, p. 192 – 197.

SHAW, R.D., 1966. Culture of an organophosphorus resistant strain of *Boophilus microplus* (Canestrini) and assessment of its resistance spectrum. *Bull. Entomol. Res.* 56 (4), 398–405

SOARES, A.O.; SOUZA, A.D.; FELICIANO, E.A.; RODRIGUES, A.F.; D'AGOSTO, M.; DAEMON, E. 2006. Evaluation of ectoparasites and hemoparasites in dogs kept in apartments and houses with yards in the city of Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 15 (1), p.13-6.



STEPHEN, I. C., ACHYUTHARAO, K. M. 1980. Natural occurrence of *Coxiella burnetii* in the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus*. Indian J. Med. Res. 71, p. 865-869.

SZABÓ, M.P.; CUNHA, T.M; PINTER, A.; VICENTINI, F. 2001. Ticks (Acari: Ixodidae) associated with domestic dogs in Franca region, São Paulo, Brazil. Experimental and Applied Acarology 25 (10), p.909-916.

TAYLOR, M.A. 2001. Recent developments in ectoparasiticides. The Veterinary Journal 161, p.253-268.

WALKER, J.B.; KEIRANS, J.E.; HORAK, I.G. 2000. The genus *Rhipicephalus* (Acari: Ixodidae). A guide to the brown ticks of the world. London:Cambridge University Press, 643p.

WALL, R.; SHEARER, D. 1997. Veterinary Entomology. London: Chapman & Hall, p. 43-139.

WHITNALL, A.B., BRADFORD, B., 1947. An arsenic resistant tick and its control with gammexane dips. Bull. Entomol. Res. 38, 353–372.

YOSHINARI, N.H.; BARROS, P.J.L.; BONOLDI, V.L.N.; ISHIKAWA, M.; BATTESTI, D.M.B.; PIRANA, S.; FONSECA, A.H.; SCHUMAKER, T.T. 1997. Perfil da borreliose de Lyme no Brasil. Revista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo 52, p. 111-117.



**Table 1 – Percentage of dead semi-engorged *Rhipicephalus sanguineus* females exposed to different concentrations of the acaricide fipronil – Bioassay 1**

		Percentage of dead ticks/ days of treatment						
		1 <sup>st</sup> day	2 <sup>nd</sup> day	3 <sup>rd</sup> day	4 <sup>th</sup> day	5 <sup>th</sup> day	6 <sup>th</sup> day	7 <sup>th</sup> day
Concentration of fipronil (ppm)	control	0	0	0	0	0	0	0
	1 ppm	0	0	0	5	5	5	5
	5 ppm	0	5	15	25	25	30	30
	10 ppm	5	10	15	30	40	45	55
	15 ppm	15	20	25	40	55	60	60
	25 ppm	20	30	35	50	65	70	75
	50 ppm	30	40	45	65	85	90	95
	100 ppm	100	100	100	100	100	100	100

**Table 2 - Percentage of dead semi-engorged *Rhipicephalus sanguineus* females exposed to different concentrations of the acaricide fipronil – Bioassay 2**

		Percentage of dead ticks/ days of treatment						
		1 <sup>st</sup> day	2 <sup>nd</sup> day	3 <sup>rd</sup> day	4 <sup>th</sup> day	5 <sup>th</sup> day	6 <sup>th</sup> day	7 <sup>th</sup> day
Concentration of fipronil (ppm)	control	0	0	0	0	0	0	0
	5 ppm	0	5	5	10	15	15	15
	7.5 ppm	5	5	15	30	40	40	40
	10 ppm	5	15	20	30	40	45	50
	12.5 ppm	10	15	25	40	55	60	60
	15 ppm	15	20	20	35	50	55	60
	17.5 ppm	15	25	30	40	60	60	65
	20 ppm	20	30	30	50	60	65	70

**Table 3- Results of the Probit analysis based on the mortality of semi-engorged *R. sanguineus* females exposed to the acaricide fipronil in Bioassay 2.**

LC50	9.647. limits: 4.711 a 13.470
Regression equation	$y=3.3489412+ 1.7623510 \log x$
t ratio (slope)	4.2244976
Slope	$1.76235 \pm 0.417$
Chi-square	1.9377
Degrees of freedom	5
Heterogeneity	0.39
Estimation of the confidence interval g (0.95)	0.215

## *Capítulo 5*

---



## IV.5. Capítulo 5

### Genotoxic and mutagenic effects of fipronil on mice

Patrícia Rosa de Oliveira<sup>a</sup>; Gervásio Henrique Bechara<sup>b</sup> & Maria Izabel Camargo Mathias<sup>a\*</sup>.

<sup>a</sup> Department of Biology, Institute of Biosciences, São Paulo State University-UNESP, Av. 24 A, nº 1515, Phone: 55 19 35264135, Postal Code 199, Zip Code: 13506-900, Rio Claro– SP, Brazil.

<sup>b</sup> Department of Animal Pathology, Faculty of Agronomic and Veterinary Sciences, São Paulo State University-UNESP, Via de Acesso Prof. Paulo Castellane, s/n, Zip Code: 14884-900, Jaboticabal–SP, Brazil.

Artigo submetido ao periódico: Research in Veterinary Science.



## RESUMO

Os efeitos tóxicos de diversas substâncias nos ecossistemas não se restringem apenas aos desequilíbrios bioecológicos, mas podem afetar, a longo prazo, também a saúde humana. O fipronil é uma substância eficaz, que tem sido regularmente utilizada no controle de pragas, inclusive daquelas resistentes aos pesticidas piretróides, organofosforados e carbamatos. A ação do fipronil nos vertebrados ainda é pouco conhecida. O presente estudo avaliou o potencial genotóxico e mutagênico dessa substância utilizando camundongos submetidos a diferentes doses da droga, com intuito de simular a ação deste químico nos hospedeiros de carrapatos expostos a acaricidas que tenham esse princípio ativo em sua composição. Os camundongos foram divididos em 5 grupos de tratamento, contendo 5 camundongos cada, onde o grupo I recebeu 30% da  $DL_{50}$  (15mg/Kg), o grupo II recebeu 50% da  $DL_{50}$  (25mg/Kg), o grupo III recebeu a própria  $DL_{50}$  (50mg/Kg) e os grupos IV e V, água destilada (controle negativo) e ciclofosfamida (controle positivo), respectivamente. Em seguida, foi realizada a coleta de sangue periférico dos animais de todos os grupos para o ensaio do cometa (após 24 horas de tratamento) e o teste do micronúcleo (após 24, 48 e 72 horas de tratamento). Os resultados obtidos mostraram que as doses de 15 mg/Kg (Grupo I) e 25mg/Kg (Grupo II) de fipronil não possuem efeito genotóxico (menores índices de nucleóides com danos) e mutagênico (índices baixos de eritrócitos portadores de micronúcleo), somente a dose mais alta (50mg/Kg) induziu o aparecimento de características genotóxicas e mutagênicas no tempo de 24 horas de exposição, indicando o conseqüente potencial mutagênico do fipronil e excluindo o uso desta dosagem ou de outras mais altas por sugerir que sejam tóxicas para os organismos não-alvos.

**Palavras-Chave:** fipronil; pesticida; carrapato; micronúcleo; cometa; camundongo.



## ABSTRACT

The toxic effects of several compounds on ecosystems are not restricted to ecological disturbances, and may also affect long-term human health. Fipronil is highly efficient in the control of pests, including those resistant to pyrethroid, organophosphate, and carbamate insecticides. Relatively little is known about the action of fipronil in vertebrates. This study was aimed at evaluating the genotoxic and mutagenic potential of this compound in mice exposed to different doses, simulating the action of this chemical in hosts of ectoparasites treated with acaricides containing this active ingredient. Mice were divided into five groups: group I = 30% of  $DL_{50}$  (15mg/Kg), group II = 50% of the  $DL_{50}$  (25mg/Kg), group III =  $DL_{50}$  (50mg/Kg), group IV = negative control, and group V = positive control. Peripheral blood was collected for the comet assay (24 h after exposure) and the micronucleus test (24, 48 and 72h after exposure). Our findings revealed that doses of 15 mg/Kg (Group I) and 25mg/Kg (Group II) of fipronil did not have genotoxic or mutagenic effects. Only the highest dose tested (50mg/Kg) induced DNA damage 24 h after exposure, indicating the mutagenic potential of fipronil. Therefore, this or higher doses are not recommended, as they may be toxic to non-target organisms.

**Keywords:** fipronil; pesticide; tick; micronucleus; comet; mice.



## INTRODUCTION

The toxic effects of several compounds on ecosystems are not restricted to ecological disturbances, and may also affect long-term human health, due to the persistence and bioaccumulation of toxic pollutants in the food chain (ALVES, 1990; HOUK, 1992).

Fipronil is a phenylpyrazole pesticide developed by the transnational company Rhône-Poulenc Agro in 1987. In the US, fipronil is available in a range of formulations, from attractive baits for ant and cockroach control to sprays used in veterinary products for the control of ticks, fleas (Frontline®), and mites (PENALIGGON, 1997; HUGNET et al., 1999; HIGGINS et al. 2001). Fipronil is highly efficient in the control of these pests, including those resistant to pyrethroid, organophosphate, and carbamate insecticides (KIDD; JAMES 1991).

Fipronil is an extremely active molecule and a potent disruptor of the central nervous system (CNS) of invertebrates, as interferes with the binding of the neurotransmitter gamma-aminobutyric acid (GABA) to its receptor, blocking chloride ion uptake into the cells, and leading to uncontrolled CNS, hyperexcitation, and death (RHÔNE-POULENC, 1995).

Relatively little is known about the action of fipronil in vertebrates (DAS et al., 2006). Studies have reported that in rats fipronil is quickly metabolized and residues are distributed in tissues, especially in fatty tissues under the skin and hair follicles. Fipronil is then constantly discharged along with the sebaceous secretion on the skin and hairs, where residues may still be present in significant amounts a week after the application of the product (HUGNET et al., 1999).

Lyons (2000) conducted studies on male and female rats exposed to fipronil and demonstrated a significant increase in thyroid cells, leading to tumor formation. This suggests that fipronil is highly carcinogenic to humans, despite being classified as class C - possible carcinogen (Environmental Protection Agency). This author also reported that short-term exposure to fipronil can have serious effects on the development of fetus and after birth, such as learning disability, reflex reduction, sterility, in addition to increased susceptibility to cancer and other diseases.





The comet assay and the micronucleus test have been used to assess the toxicity of fipronil. The advantages of the comet assay over other genotoxicity tests are simplicity and sensitivity with rapid results to quantify and detect DNA strand breaks and damage in alkali-labile sites *in vivo* and *in vitro*, using a small number of cells (ANDERSON; PLEWA, 1998). This assay has also been used to evaluate DNA damage caused by physical and chemical agents in environmental monitoring, genetic toxicology, ecotoxicology, and clinical studies (ANDERSON; PLEWA, 1998; GONTIJO; TICE, 2003).

The presence of micronuclei is frequently used to quantify the exposure to chemical or physical agents (TRUCKER; PRESTON, 1996). The micronucleus test is an important method used by international and governmental agencies as part of the tests recommended to evaluate and release new chemicals and pharmaceutical products into the market (CHOY, 2001).

Hayashi et al. (1990) described the micronucleus test with peripheral blood using acridine orange staining. This technique has advantages over the micronucleus test with bone marrow, such as the possibility to obtain samples from the same animal without killing it (CSGMT, 1992). Therefore, it is possible to examine the frequency of micronuclei in the same animal during an acute, sub-chronic, and chronic treatment, in addition to the recovery of the same individual after treatment.

Given that fipronil is an important ingredient of several acaricides widely used to control the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus*, this study was aimed at assessing the genotoxic and mutagenic potential of this compound in mice exposed to different doses.

## MATERIAL AND METHODS

### 1. Animals

Twenty-five female Swiss mice (*Mus musculus*) were used. The mice were 5-6 weeks old, healthy and had similar weights ( $20 \text{ g} \pm 20 \%$ ). Five animals were used for each treatment.



Animals were obtained from the animal resource center of CEMIB/UNICAMP and maintained under controlled conditions ( $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , 50% humidity, 12-h photoperiod) in the laboratory for 7 days to allow acclimation prior to experiments.

Mice were individually identified, and each group was housed in polypropylene cages with filtered water and commercial food *ad libitum*.

Experiments were conducted at the Laboratory of Histology and Mutagenesis of the Department of Biology of the Biosciences Institute, UNESP, Rio Claro campus in São Paulo, Brazil.

This study was approved by the Ethical Committee of the Foundation Hermínio Ometto –UNIARARAS (SP- Brazil), protocol # 09/2009.

## 2. Chemical Compound

Fipronil, a compound of the phenylpyrazole chemical class, CAS # 20068-37-3 and chemical name (RS)-5-amino-1-(2,6-dichloro- $\alpha,\alpha,\alpha$ -trifluoro-p-tolyl)-4-trifluoro methylsulfinylpyrazole-3-carbonitrile was obtained from Regent 800 WG, a commercial product produced by BASF with purity level of 80%.

## 3. Doses

Fipronil dosages used were based on an  $\text{LD}_{50}$  of 50 mg/Kg, determined in a preliminary study conducted at the Department of Biology, UNESP – Rio Claro, in October 2008. Final doses of fipronil administered in the experiments were obtained by dilution to 30% of  $\text{LD}_{50}$  (15 mg/Kg), 50% of  $\text{LD}_{50}$  (25 mg/Kg) and 100% of  $\text{LD}_{50}$  (50 mg/Kg). Negative control animals were exposed only to distilled water. Positive control animals were treated with cyclophosphamide (50mg/Kg).

All doses of fipronil tested were prepared and stored in labeled containers for immediate use.



#### 4. Experimental Model

Mice were divided into five groups: group I = 30% of  $DL_{50}$  (15mg/Kg), group II = 50% of the  $DL_{50}$  (25mg/Kg), group III =  $DL_{50}$  (50mg/Kg), group IV = negative control, and group V = positive control. Five female Swiss mice were used for each treatment.

Animals received 0.2 mL of the fipronil dose determined for each treatment. The negative control group received 0.2 mL of distilled water and the positive control animals, 0.2 mL of cyclophosphamide.

The intraperitoneal route was used for all animal to maximize chemical exposure.

#### 5. Methods

##### 5.1. Comet Assay

Approximately 40 $\mu$ L of blood were collected from each animal of each treatment (24h after exposure) in a heparinized eppendorf tube.

Slides were pre-coated with 5% agarose, and 40 $\mu$ L of blood of each individual with 120 $\mu$ L of agarose LPM (1.5%) at 37°C were placed on the slide. Slides were slipcovered and refrigerated at 4°C for 20 minutes. Coverslips were removed and slides were immersed in lysis solution freshly prepared with 89mL of lysis stock solution (2.5M NaCl, 100mM EDTA, 10mM Tris, pH 10 adjusted with NaOH, 89mL of distilled water and 1% of sodium lauroylsarcosine), 1mL of Triton X -100 (Merck) and 10mL of DMSO, for 1 hour at 4°C in the dark. Slides were placed on an electrophoresis chamber filled with buffer pH>13 (300mM NaOH and 1mM EDTA, prepared with a stock solution of 10N NaOH and EDTA 200mM, pH10) at 4°C for 20 minutes for DNA denaturation. Electrophoresis was performed at 25V and 300mA (1.25V/cm). Slides were then neutralized with buffer pH 7.5 (0.4M Tris-HCl) during 3 cycles of 5 minutes, air dried, fixed with 100% ethanol for 10 minutes and stored for later examination. Slides were stained with 100 $\mu$ L of ethidium bromide (20 $\mu$ g/mL) and slipcovered. The material was examined with a



fluorescence microscope, equipped with an excitation filter of 420-490nm and a barrier filter of 520nm at 40x magnification.

One hundred cells per animal were examined. Comets were classified as: class 0 – no damage; class 1 – tail of comet shorter than the diameter of nucleoid; class 2 – tail of comet once or twice the diameter of nucleoid; class 3 – tail of comet more than twice the diameter of nucleoid. Apoptotic cells with completely fragmented nucleoids were not included. A total damage score was determined by multiplying the number of cells assigned to each class of damage by the numeric value of the class and summing all resulting values. The results were compared with an ANOVA/Tukey test ( $p < 0.05$ ).

## 5.2. Micronucleus Test with Peripheral Blood

The micronucleus test with peripheral blood was conducted according to Hayashi et al. (1990).

Blood was collected from the tail of animals from all groups at 24, 48, and 72 hours after treatment.

Slides were previously prepared with 20 $\mu$ L of acridine orange (1mg/mL), and 20 $\mu$ L of peripheral blood was added in the center of prepared slides. Slides were slipcovered and stored in a freezer at -20°C.

Examination of slides was conducted with a fluorescence microscope under blue light (488nm), an orange barrier filter, and magnification of 100x.

Two thousand cells per animal (two slides per animal of each treatment) were examined and cells containing micronuclei were counted. The results were compared with an ANOVA/Tukey test ( $p < 0.0001$ ). The frequency of micronuclei was examined at 24h, 48h, and 72 h after treatment.



## RESULTS

### 1. Comet Assay

The results obtained with the comet assay are presented in Table 1, summarizing the average frequency of damaged cells, distribution among classes of damage, and the total damage scores.

In the negative control group, the average frequency of nucleoids with no damage and with some damage was  $95.20 \pm 1.06$  and  $4.80 \pm 1.06$ , respectively. All damaged nucleoids were classified as class 1 (Table 1).

In group I, the average frequency of nucleoids with no damage and with some damage was  $93.40 \pm 1.28$  and  $6.60 \pm 1.28$  respectively. All damaged nucleoids were classified as class 1 (Table 1).

In group II, the average frequency of nucleoids with no damage and with some damage was  $92.00 \pm 0.70$  and  $8.00 \pm 0.70$ , respectively. All damaged nucleoids were classified as class 1 (Table 1).

In group III, the average frequency of class 1 nucleoids ( $23.20 \pm 2.97$ ) was higher than those observed in the negative control, and groups II and III. The average frequency of nucleoids with no damage was  $76.80 \pm 2.97$  (Table 1).

In the positive control (cyclophosphamide), a higher average frequency of damaged nucleoids  $97.20 \pm 0.73$  was observed. Class 1 and 2 nucleoids were the most frequently observed. The average frequency of nucleoids with no damage was  $2.80 \pm 0.73$  (Table 1).

The statistical analysis revealed a dose-dependent genotoxic activity of fipronil. Animals treated with the doses of 15 mg/Kg and 25mg/Kg did not induce genotoxic effects. Only animals treated with 50mg/kg of fipronil (Group III) had significantly higher frequencies of nucleoids ( $23.40 \pm 3.14$  - Table 1) indicating a genotoxic potential.

### 2. Micronucleus Test with Peripheral Blood

The results obtained with the micronucleus test are presented in Table 2.



The micronucleus test with peripheral blood was conducted with mice treated with different doses of fipronil. In addition, the effects of fipronil were monitored 24h, 48h, and 72 h after treatment.

Twenty-four hours after treatment, the average frequency of cells containing micronuclei in the negative control group was  $1.20 \pm 1.30$  and in the positive control group (cyclophosphamide),  $27.80 \pm 2.59$ . In the fipronil-treated groups (I, II, and III), higher frequencies of micronucleus were observed. The average frequencies of micronuclei were higher as doses increased. The average frequency of cells containing micronuclei was  $3.90 \pm 1.48$  in group I,  $4.90 \pm 1.30$  in group II and  $12.00 \pm 2.74$  in group III and (Table 2).

Forty-eight hours after treatment, the average frequency of micronuclei did not vary significantly in the negative control ( $1.60 \pm 1.14$ ) (Table 2). In the positive control, the average frequency of micronuclei was much higher than that observed at 24 h after treatment ( $56.20 \pm 6.72$ ). The average frequency of cells containing micronuclei in fipronil-treated mice was lower than that observed at 24 h after treatment. The average frequency of micronuclei was  $3.80 \pm 0.84$  in group I,  $4.80 \pm 0.84$  in group II, and  $6.00 \pm 1.00$  in group III (Table 2).

Seventy-two hours after treatment, the average frequency of micronucleus of the negative control remained low ( $1.40 \pm 1.14$ ), while in the positive control (cyclophosphamide), the frequency of micronuclei was high, although much lower than that observed 48 h after treatment ( $17.20 \pm 1.92$ ). In all fipronil-treated groups, the average frequency of cells containing micronuclei was the lowest compared to those observed 24 h and 48 h after treatment. The average frequency of cells containing micronuclei was  $2.40 \pm 1.14$  in group I,  $2.60 \pm 0.54$  in group II, and  $3.20 \pm 0.83$  in group III (Table 2).

## DISCUSSION

According to available estimates, millions of liters of pesticides are applied every year worldwide (USEPA, 2001). The World Health Organization (WHO, 1992) reported approximately 3 million cases of intoxication by pesticides annually, resulting in 220 thousand deaths throughout the world. Many of these chemicals are



mutagenic (GALLOWAY et al., 1987; GARAJ-VRHOVAC, ZELJEZIC, 2000), and have been associated with the development of cancers (LEISS, SAVITZ, 1995), and developmental problems (ARBUCKEL, SERVER, 1998). Several studies have demonstrated that pesticides can have genotoxic effects in directly and indirectly exposed non-target organisms (including humans) (BORZSOJNI et al., 1984; DULOT et al., 1985; NEHE'Z et al., 1988), and therefore the assessment of the genotoxicity of pesticides is currently of great importance.

In general, cells exhibit similarities, especially between humans and other animals, regarding structure and biochemical processes, which allow the use of mice in experimental studies to investigate the possible effects of chemicals on humans (MEYER, 1993). In addition, *in vitro* assays are useful tools to examine the mechanisms of action, standardize experimental stages, and manipulate and/or introduce variables, such as duration of treatment, and types of association, among others (BRUSICK, 1987).

The genotoxic effects of fipronil (active ingredient of Frontline®) were assessed using the comet assay with peripheral blood of mice exposed to different doses of this chemical.

The comet assay has been considered an efficient tool in the field of genetic toxicology (TICE et al., 1990; BETTI et al., 1993), as it detects damaged DNA by differential migration of the nuclear material when subjected to electrophoresis (ANDERSON et al., 1998; MITCHELMORE; CHIPMAN, 1998; NANTHAWAN et al., 2002; LEE; STEINERT, 2003).

In our study, the comet assay revealed that fipronil at the doses of 15mg/Kg and 25mg/Kg did not induce DNA damage in mice. The total damage score and the average frequency of damaged cells were  $6.60 \pm 1.28$  and  $8.80 \pm 0.70$ , respectively. These results are very similar to those obtained for the negative control ( $4.80 \pm 1.06$ ).

On the other hand, significant genotoxic effects were observed in the treatment with 50mg/kg of fipronil. Mice treated with this dose exhibited a higher average frequency of damaged nucleoids (damaged cells:  $23.20 \pm 2.97$ ) and genotoxicity index (total damage score:  $23.40 \pm 3.14$ ) with most comets classified as class 1. Based on these results, this concentration of fipronil can induce DNA damage, which may or may not be repaired in exposed organisms.



The mutagenic effects of fipronil was examined with the micronucleus test with peripheral blood of mice. Chemicals can induce the formation of micronuclei in dividing cells, due to clastogenic or aneugenic action, resulting in chromosome fragments from chromosome breaks and/or entire chromosomes lost during the cell division process, respectively. During the telophase, these fragments or entire chromosomes are enclosed in a smaller nucleus separated from the main nucleus, thus being named “micronucleus” (SCHMID, 1976; AL-SABTI, METACALFE, 1995; KIRSCH-VOLDERS, 2002).

Twenty-four hours after treatment, a low frequency of micronuclei was observed in the negative control group, while the positive control group exhibited changes in the genetic material. Group I and II did not exhibit mutagenic effects. In the treatment with fipronil 50mg/Kg, mutagenic effects were observed, characterized by the presence of micronuclei.

Forty-eight hours after treatment, a low frequency of micronuclei was observed in the negative control group, while the DNA damage observed in the positive control group was much intense than that of the negative control. This indicates that cyclophosphamide can be considered a positive control, as the frequency of micronuclei must be at least twice as much as that of the negative control. The peak of micronucleus frequency induced by cyclophosphamide occurred 48 h after treatment. According to ROGERS (1994), cyclophosphamide does not act directly on DNA, as it needs to be metabolized in order to induce DNA damage. This may explain the higher frequency of micronuclei found 48 h after treatment rather than 24 h.

The indices of micronuclei observed in fipronil-treated groups decreased, mainly in group III, in which fipronil no longer had a mutagenic potential. This decrease 48 h after treatment suggests that the metabolization of fipronil decreases its capacity to induce DNA damage.

Seventy-two hours after the treatment, low frequencies of micronucleus were observed in the negative control, as expected. In the positive control, cyclophosphamide still induced damage to exposed animals, as indicated by the high frequency of micronuclei. A significant decrease in the frequency of micronuclei in





all fipronil-treated groups was also found. This probably occurs due to the metabolization of fipronil and elimination of toxic products.

Although the comet assay and the micronucleus test with peripheral blood detected the toxic effects of fipronil at the dose of 50mg/Kg (24 h treatment), differences were observed in the number of lesioned cells. These differences are probably a result of the higher sensitivity of the comet assay and the detection of genotoxic damage, which may or may not become mutations, while the micronucleus test quantify cytogenetic damage, mutations already fixed in the cell genome that cannot be repaired (ANTUNES et al., 2000; GONTIJO, TICE, 2003).

The effects of fipronil have also been reported by Tingle et al. (2003). These authors reported that mice exposed to oral doses above 30ppm developed cancer. Jennings et al. (2002) found large amounts of fipronil in dogs treated with Frontline® *pour on*, even after 24 h of application, indicating risks to human health if exposure is repeated.

The evaluation of the toxic effects of fipronil in three different doses indicated that only the highest dose (50mg/Kg) had a significant mutagenic potential in mice. Therefore, this or higher doses may be toxic to non-target organisms and are not recommended, as specific treatment to the toxic effects of fipronil are not yet available.

## ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank to FAPESP (Grant n° 2006/52599-0 and 2008/59020-0) and CNPQ (Grant n° 308733/2006-1) for financial support and academic career research fellowship to G.H. Bechara and M.I. Camargo-Mathias.

## REFERENCES

ALVES, M.N. Aplicação de bioensaios bacterianos para determinação da toxicidade aguda de efluentes industriais e corpos de água receptores. 1990. [s.n.]. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade de São Paulo, São Paulo.



AL-SABTI, K.; METCALFE, C. D. 1995. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutation Research* 343, 121-135.

ANDERSON, D.; PLEWA, M. J. 1998. The international comet assay workshop. *Mutagenesis* 13, 67-73.

ANDERSON, D.; YU, T-W; MCGREGOR, D.B. 1998. Comet assay responses as indicators of carcinogenic exposure. *Mutagenesis* 13, 539-555.

ANTUNES, L.M.G.; FRANCESCATO, H.D.C.; DARIN, J.D.C.; BIANCHI, M.L.P. 2000. Effects of selenium pretreatment on cisplatin-induced chromosome aberrations in Wistar rats. *Teratog Carcinog Mutagen* 20,341- 348.

ARBUCKEL, T.E.; SERVER, L.E. 1998. Pesticides exposures and fetal death: a review of the epidemiologic literature. *Crit. Rev. Toxicol.* 28, 229–270.

BETTI, C.; BARALE, R.; POOL-ZOBEL, B.V.L. 1993. Comparative studies on cytotoxic and genotoxic effects of two organic mercury compounds in lymphocytes and gastric mucosa cells of Sprague-Dawley rats. *Environment and Molecular Mutagenesis* 22, 173-180.

BORZSONYI, M., TOROK, G., PINTER, A., SURJAN, A. 1984. Agriculturally related carcinogenic risk. In: *Models, Mechanism and Etiology of Tumor Promotion*. IARC Sci. Publ. 56, pp. 465–486.

BRUSICK, D.J. 1987. *Principles of genetic toxicology*. New York: Plenum Press, 284 pp.

CHOY, W. N. Regulatory Genetic Toxicology tests. 2001. In: CHOY, W. N. (Ed.). *Genetic Toxicology and Cancer Risk Assessment*, New York: Marcel Dekker, pp. 93-113.



CSGMT (Collaborative Study Group for the Micronucleus Test). 1992. Micronucleus test with mouse peripheral blood erythrocytes by acridine orange supravital staining: the summary report of the 5th collaborative study by CSGMT/JEMS.MMS. *Mutation Res.* 278, 83- 98.

DAS, P. C.; CAO, Y.; CHERRINGTON, N.; HODGSON, E.; ROSE, R.L. 2006. Fipronil induces CYP isoforms and cytotoxicity in human hepatocytes. *Chemico-Biological Interactions* 164, 200–214.

DULOT, F.N., PASTORI, M.C., OLIVERO, O.A., GONZALEZ CID, M., LORIA, D., MATOS, E., SOBEL, N., DE BUJAN, E.C., ALBIANO, N., 1985. Sister chromatid exchanges and chromosomal aberrations in a population exposed to pesticides. *Mutat. Res.* 143, 237–244.

GALLOWAY, S.M., ARMSTRONG, M.J., REUBEN, C., COLMAN BROWN, S.B., CANNON, C., BLOOM, A.D., NAKAMURA, F., AHMED, M., DUK, S., RIMPO, J., MARGOLIN, B.H., RESNICK, M.A., ANDERSON, B., ZEIGER, E., 1987. Chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells, evaluation of 108 chemicals. *Environ. Mol. Mutagen.* 10, 1–175.

GARAJ-VRHOVAC, V., ZELJEZIC, D., 2000. Evaluation of DNA damage in workers occupationally exposed to pesticides using single-cell gel electrophoresis (SCGE) assay: pesticide genotoxicity revealed by comet assay. *Mutat. Res.* 469, 279–285.

GONTIJO, A.M.M.C.; TICE, R. 2003. Teste do cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. In: Ribeiro, LR, Salvadori, EK, Marques, EK (Eds). *Mutagênese Ambiental*. Canoas:ULBRA, pp. 247- 75.

HAYASHI, M.; MORITA, T.; KODAMA, Y., SOFUNI, T.; ISHIDATE Jr., M. 1990. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. *Mutation Res.* 245, 245-249.



HIGGINS, R.A.; SLODERBECK, P.E.; BROOKS, H.L. 2001. Field corn insect management for 2001. Kansas: State University, 24pp.

HOUK, V.S. 1992. The genotoxicity of industrial wastes and effluents – a review. *Mutation Research* 277, 91-138.

HUGNET, C.; CADORE, J.L; BOURDOISEAU, G. 1999. Use of fipronil spray (0.25%) for the treatment of *Damalinia equi* [(*Wereckiella equi*) infestation]. *Pratique Veterinaire Equine* 31 (12), 65-68.

JENNINGS, J.A.; CANERDY, T.D.; KELLER, R.J.; ATIEH, B.H.; DOSS, R.B.; GUPTA, R.C. 2002. Human exposure to fipronil from dogs treated with Frontline. *Vet Human Toxicol* 44, 301-303.

KIDD, H.; JAMES, D.R. 1991. *The Agrochemicals Handbook*. Cambridge: Royal Society of Chemistry Information Services, pp. 3-11.

KIRSCH-VOLDERS, M.; VANHAUWAERT, A.; DE BOECK, M.; DECORDIER, I. 2002. Importance of detecting numerical versus structural chromosome aberrations. *Mutation Research* 504, 137-148.

KRISHNA, G; HAYASHI, M. 2000. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Mutation Res.* 455, 155-166.

LEISS, J.K.; SAVITZ, D.A., 1995. Home pesticide use and childhood cancer: a case control study. *Am. J. Public Health* 85, 249–253.

LEE, R.F.; STEINERT, S. 2003. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutation Research* 544, 43-64.



LYONS, G. 2000. Mixed messages: pesticides that confuse hormones. Pesticide Action Network UK, p.1-6.

MCNAMEE, J. P.; MCLEAN, J. R. N.; FERRAROTTO, C. L.; BELLIER, P. V. 2000. Comet assay: rapid processing of multiple samples. Mutation Research. 466, 63-69.

MEYER, O. 1993. Implications of animal welfare on toxicity testing. Hum. Exp. Toxicol. 12, 516–521.

MITCHELMORE, C. L.; CHIPMAN, J. K. 1998. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potencial value of the comet assay in environmental monitoring. Mutation Research 399(2), 135-147.

NANTHAWAN, A.; RAINOWITS, C.; MOISEEVA, E.; RINKEVICH, B. 2002. Genotoxicity of Kishon River, Israel: the application of an *in vitro* cellular assay. Mutation Research 518, 21-37.

NEHEZ, M., BOROS, P., FERKE, A., MOHOS, J., PATOLAS, P., VETRO, G., ZIMANYI, M., DESI, I. 1988. Cytogenetic examination of people working with agrochemicals in the southern region of Hungary. Regul. Toxicol. Pharmacol. 8, 37–44.

PENALIGGON, J. 1997. Getting to grips with fleas on pet dogs and cats. Pesticide Outlook 8 (4), 19-23.

RHÔNE-POULENC, 1995. 'Fipronil' Worldwide Technical Bulletin. Lyon: Rhône-Poulenc Agrochimie, pp.19.

ROGERS, A.S. 1994. The role of cytochrome P450 in developmental pharmacology. J. Adolescent Health. 15, 635-40.



SCHMID, W. 1976. The micronucleus test for cytogenetics analysis. In: HOLLANDER, A. Chemical Mutagens: Principles and methods for their detection. New York: Plenum Press, pp. 31-53.

SNUSTAD, D. P.; SIMMONS, M. J. 2001, Fundamentos de Genética. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 756pp.

TICE, R.R.; ANDREWS, P.W.; SINGH, N.P. 1990. The single cell gel assay. A sensitive technique for evaluating intercellular differences in DNA damage and repair. In: B.M. Suntherland and A.D. Wordhead (Eds), DNA damage and repair in human tissues. New York: Plenum.

TINGLE, C.C.; ROTHER, J.A.; DEWHURS, C.F.; LAUER, S. KING, W.J. 2003. Fipronil: Environmental fate, ecotoxicology, and human health concerns. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology 176, 1-66.

TRUCKER, J.D.; PRESTON, R.J. 1996. Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges and cancer risk assessment. Mutation Res. 365, 147-159.

USEPA, 2001. Pesticide industry sales and usage: 1996 and 1997 market estimates, available at: [www.epa.gov/oppbead1/pestsales/97pestsales/table1.htm](http://www.epa.gov/oppbead1/pestsales/97pestsales/table1.htm).2001

WHO, 1992. Our Planet, Our Health: Report of the WHO Commission on Health and Environment. Geneva: World Health Organization.

**Table 1 – Average frequency of lesioned cells (DNA migration in the comet assay) ± standard deviation, distribution among the different classes of damage and score in reference to the genotoxicity test.**

Treatments	Damaged cells	Damage classes			Score	
		Class 0	Class 1	Class 2		Class 3
Negative Control	4.80 ± 1.06 <sup>b</sup>	95.20 ± 1.06	4.80 ± 1.06	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	4.80 ± 1.06 <sup>b</sup>
Fipronil 15mg/Kg (GI)	6.60 ± 1.28 <sup>b</sup>	93.40 ± 1.28	6.60 ± 1.28	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	6.60 ± 1.28 <sup>b</sup>
Fipronil 25mg/Kg (GII)	8.00 ± 0.70 <sup>b</sup>	92.00 ± 0.70	8.00 ± 0.70	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	8.80 ± 0.70 <sup>b</sup>
Fipronil 50mg/Kg (GIII)	23.20 ± 2.97 <sup>c</sup>	76.80 ± 2.97	23.00 ± 2.81	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	23.40 ± 3.14 <sup>c</sup>
Cyclophosphamide	97.20 ± 0.73 <sup>a</sup>	2.80 ± 0.73	66.20 ± 3.16	30.00 ± 2.14	1.00 ± 0.54	129.20 ± 2.57 <sup>a</sup>

Legend : Different letters indicate statistically significant differences (p<0.05; ANOVA/Tukey).

**Table 2 – Average frequency of micronuclei ± standard deviation**

	Negative Control	Cyclophosphamide	Fipronil 15mg/Kg (GI)	Fipronil 25mg/Kg (GII)	Fipronil 50mg/Kg (GIII)
<b>24h</b>	1.20±1.30 <sup>a</sup>	27.80±2.59 <sup>c</sup>	3.90±1.48 <sup>a</sup>	4.90±1.30 <sup>a</sup>	12.00±2.74 <sup>b</sup>
<b>48h</b>	1.60±1.14 <sup>a</sup>	56.20±6.72 <sup>b</sup>	3.80±0.84 <sup>a</sup>	4.80±0.84 <sup>a</sup>	6.00±1.00 <sup>a</sup>
<b>72h</b>	1.40±1.14 <sup>a</sup>	17.20±1.92 <sup>b</sup>	2.40±1.14 <sup>a</sup>	2.60±0.54 <sup>a</sup>	3.20±0.83 <sup>a</sup>

Frequency of Micronuclei per 2000 cells. ANOVA/Tukey test (p<0.0001).

Different letters indicate statistically significant differences

## *Discussão Geral*

---





## V. DISCUSSÃO GERAL

O controle de pragas com diversos compostos que tem como bases moleculares diferentes princípios químicos (arsenicais, organoclorados, organofosforados, carbamatos, nitroguanidinas, fenilpirazoles, formamidinas, piretróides, avermectinas, lactonas macrocíclicas e fenil uréias) (HÄUSERMAN et al., 1992; COSSIO-BAYUGAR et al., 2002) tem estimulado a pesquisa de novas drogas, tais como o composto químico fipronil (PARADIS, 1999).

Estudos avaliando os efeitos de acaricidas sobre organismos alvos, bem como aqueles não alvos tem sido pouco desenvolvidos e, por isso o presente estudo foi realizado. Inicialmente, analisou-se a eficácia do fipronil sobre carrapatos *R. sanguineus*, bem como estabeleceu-se o protocolo dos procedimentos laboratoriais e o cálculo da  $CL_{50}$  (concentração 50% letal) deste químico utilizando, para tanto fêmeas semi-ingurgitadas do carrapato do cão *R. sanguineus*.

Neste trabalho foi apresentada a metodologia para testar a ação do fipronil em carrapatos, onde estabelecer o tempo de imersão dos indivíduos foi o ponto mais crítico, uma vez que este acaricida é altamente tóxico e, dessa forma, o tempo máximo não poderia ser superior a 2 minutos. Vale ressaltar que estudos anteriores registraram diferentes tempos de imersão ao testarem as diferentes concentrações e



doses de outros acaricidas. No caso do amitraz, por exemplo, foram necessários 10 minutos (OLIVEIRA et al., 2000), para cipermetrina de 15 min (MENDES et al., 2000) e para permetrina, 5 min (ROMA et al., 2009).

No presente estudo, os resultados dos bioensaios 1 e 2 revelaram principalmente que o aumento da concentração de fipronil (1ppm – 100ppm) causou um aumento progressivo da percentagem de mortalidade das fêmeas semi-ingurgitadas de *R. sanguineus* e que, o tempo letal (tempo necessário para que os organismos testados, em um bioensaio, morram) diminuiu numa relação inversa ao aumento das concentrações de fipronil, evidenciando a ação rápida deste produto.

Mortalidade de 50% dos indivíduos foi observada na concentração de 20 ppm de fipronil após 4 dias de tratamento. Já a concentração de 10 ppm provocou a mesma taxa de mortalidade em 7 dias de tratamento, indicando que o fipronil poderia ser utilizado em concentrações menores do que aquelas recomendadas pelos fabricantes de produtos veterinários, evitando conseqüentemente, intoxicação dos organismos não alvos, bem como a contaminação do ambiente.

A ação do fipronil ficou também confirmada por meio dos resultados obtidos pela análise estatística, onde estimou-se a concentração letal 50% (CL<sub>50</sub>) de fipronil em fêmeas semi-ingurgitadas de carrapatos *R. sanguineus*, bem como os intervalos de confiança (limite superior e inferior) nos níveis de 95 % de probabilidade, sendo de CL<sub>50</sub> = 9.647 ppm (4.711 a 13.470). Em relação a outros pesticidas, como a permetrina com CL<sub>50</sub> de 2062 ppm (ROMA et al., 2009), o fipronil apresentou CL<sub>50</sub> extremamente baixa, comprovando seu elevado potencial tóxico.

A ação de acaricidas, como o fipronil, por exemplo, além de interferir na transmissão dos impulsos nervosos, pode ainda atuar como inibidor do desenvolvimento e da reprodução dos carrapatos, o que permite por meio da sua utilização, o controle e/ou a eliminação de ectoparasitas. Estes parâmetros também foram aqui avaliados, histológica e ultraestruturalmente, por meio da análise dos ovários das fêmeas semi-ingurgitadas de *R. sanguineus* expostas a diversas concentrações de fipronil.

A histologia do ovário, bem como a vitelogênese do carrapato *R. sanguineus* já foram anteriormente descritas por Oliveira et al. (2005) que mostraram que o ovário é do tipo panoístico e constituído por uma parede de células epiteliais e por



um grande número de ovócitos em cinco estágios de desenvolvimento, os quais encontram-se fixos à parede por meio de um pedicelo celular, o que corroborou os dados encontrados por Till (1961) em *R. appendiculatus*, por Balashov (1983) em *Hyalomma asiaticum*, por Denardi et al. (2004) em *A. cajennense* e por Saito et al. (2005) em *B. microplus*.

Nos indivíduos do grupo controle (I) do presente estudo, verificou-se que os ovócitos em todos os estágios de desenvolvimento possuem características morfológicas típicas dos ovócitos de carrapatos e já descritas também para outras espécies (Denardi et al., 2004; Saito et al., 2005; Oliveira et al., 2006). Dessa forma, no presente estudo as características dos ovócitos do grupo controle não foram discutidas, tendo sido apenas utilizadas para comparação dos resultados obtidos a partir dos indivíduos expostos ao fipronil.

Nos ovócitos I de *R. sanguineus* submetidos à 1 ppm de fipronil (grupo II), as alterações foram na sua forma, devido ao surgimento de uma constrição mediana, bem como pela presença de poucos vacúolos no citoplasma, pelo menor número e tamanho dos microvilos na membrana plasmática e pela lâmina basal subdividida em duas regiões, indicando que o fipronil, embora fracamente, já estaria atuando nestas células, modificando-as estruturalmente.

Nas fêmeas expostas à 5 ppm (grupo III), o número de ovócitos I alterados e as modificações celulares aumentaram, isto é, a vesícula germinal (núcleo) exibiu dobras em seu envoltório e o citoplasma apresentou grande quantidade de vacúolos, inclusive alguns rompidos, próximos a uma membrana plasmática sem microvilos. A ausência destas especializações de membrana (ou mesmo a redução de seu número) dar-se-ia, uma vez que a célula estaria fisiologicamente minimizando os danos internos, isto é, essa modificação estrutural diminuiria a superfície de contato ovócito/hemolinfa, diminuindo conseqüentemente, a entrada do acaricida no interior da célula.

Nas fêmeas do grupo IV expostas à 10 ppm, os ovócitos I não foram mais observados, sugerindo que o fipronil conseguiu causar total destruição destas células, deixando apenas uma massa amorfa. A vulnerabilidade destas células, neste estágio de desenvolvimento, provavelmente estaria ocorrendo também pelo fato das mesmas, não terem ainda o cório (membrana protetora dos ovos) depositado, o que permitiria



mais fácil penetração do acaricida, visto que esta barreira a ser transposta pela substância estaria ausente.

Segundo estudos anteriores de Oliveira et al. (2005) e também como observado no grupo controle (grupo I), nos ovócitos II de *R. sanguineus* o processo de vitelogênese têm início por meio da síntese endógena de elementos vitelogênicos, bem como pela incorporação de elementos produzidos por outros tecidos (incorporação exógena ou extra-ovariana) os quais são posteriormente, enviados para o interior do ovócito tanto via células do pedicelo quanto via captação pela própria membrana plasmática do ovócito, diretamente da hemolinfa.

Os ovócitos II dos indivíduos expostos a 1 ppm de fipronil, exibiram dobras no envoltório da vesícula germinal, figuras mielínicas e vacúolos, inclusive aqueles autofágicos distribuídos pelo citoplasma, além de menor quantidade de microvilos na membrana plasmática quando comparados aos ovócitos do grupo controle, sugerindo que, nesta concentração de fipronil, as organelas celulares que eventualmente tivessem sido danificadas, estariam sendo acondicionadas em vacúolos para posterior digestão, uma vez que o número destes aumentou consideravelmente quando comparado ao observado no grupo controle.

Segundo Junqueira, Carneiro (2008) e Carvalho, Pimentel (2007), os vacúolos autofágicos seriam encontrados principalmente em células onde estivesse ocorrendo a degradação e a reciclagem de porções e de organelas citoplasmáticas danificadas, com a finalidade de reabsorver a massa e/ou os restos celulares e, de reaproveitar outros componentes, justificando a presença destas estruturas no citoplasma dos ovócitos II em questão.

Nas fêmeas expostas a 5 ppm (grupo III) encontrou-se maior quantidade de ovócitos II alterados quando comparados aos do grupo II e, na concentração de 10 ppm (grupo IV) de fipronil, cerca de 75% dos ovócitos II sofreram a ação do agente químico. Essas alterações envolveram maior vacuolização, presença de numerosas figuras mielínicas e de retículo endoplasmático rugoso nas formas lamelar e vesicular.

Especificamente, a exposição a 10 ppm de fipronil foi a que acarretou maiores danos aos ovócitos II, inclusive com a redução da incorporação exógena de elementos do vitelo via membrana plasmática, uma vez que foi observada redução



drástica do número de microvilos. Quanto ao retículo endoplasmático rugoso, sua permanência poderia sugerir que, apesar da interrupção da incorporação exógena de elementos do vitelo e dos danos sofridos pela célula, esta ainda estaria tentando promover a síntese protéica, embora em menor escala, o que desta forma, preservaria e daria continuidade ao desenvolvimento da mesma. Simultaneamente, a presença de retículo endoplasmático ainda poderia sugerir uma alta atividade na síntese de enzimas, capazes de neutralizar o produto tóxico.

Por outro lado, a vesiculação das cisternas do retículo endoplasmático rugoso nos ovócitos II poderia ser o início do processo de morte celular, visto que durante a morte celular, esta organela é a que apresenta as maiores alterações, corroborando Silva de Moraes e Bowen (2000), durante a observação da morte celular em insetos.

Nos ovócitos III dos indivíduos expostos a 1 ppm, as alterações indicaram que, assim como nos ovócitos I e II do mesmo grupo de tratamento, os III também seriam danificados pela ação do fipronil. Estes exibiram, além da vacuolização, figuras mielínicas entre a lâmina basal e a membrana plasmática, reação celular no sentido de eliminar organelas e restos de citoplasma danificados.

Um número maior de ovócitos III expostos a 5 ppm foi alterado e, na concentração de 10 ppm, cerca de 75% dos ovócitos III foram afetados pela ação do fipronil. Nestas duas concentrações, os ovócitos mostraram grandes áreas vacuolizadas, bem como o rearranjo de elementos do citoesqueleto, além de alterações nos grânulos protéicos, os quais apresentaram forma irregular e áreas internas desorganizadas.

Segundo Chapman (1998), em estudos com ovócitos de insetos, essa desorganização ocorreria quando o ovócito estivesse em processo de morte celular, uma vez que os grânulos de vitelo sofreriam digestão autofágica com conseqüente liberação da proteína vitelogenina, a qual, no entanto, não seria descartada, mas seria devolvida à hemolinfa, já que a permeabilidade da membrana plasmática destes ovócitos aumentaria, permitindo sua saída. Este processo possivelmente tenha ocorrido nos ovócitos III aqui estudados, uma vez que uma longa faixa de material eletrondenso foi observada imediatamente abaixo da membrana plasmática, indicando ser constituída pelas mesmas proteínas oriundas da quebra dos grânulos protéicos do vitelo pelo fipronil.



Por outro lado, o rearranjo dos elementos do citoesqueleto no citoplasma dos ovócitos III dos grupos expostos a 5 e 10 ppm de fipronil, poderia estar relacionado à necessidade da célula em isolar áreas de seu citoplasma (que ainda poderiam estar funcionais) do restante do conteúdo celular danificado, evitando assim que os danos se propagassem. A presença de elementos do citoesqueleto realizando esta função em ovócitos de outros Arthropoda, já foi anteriormente sugerida por Jedrzejowska e Kubrakiewicz (2007).

Analisando especificamente, os ovócitos III dos indivíduos expostos a 10 ppm de fipronil, ficou clara a ausência de retículo endoplasmático rugoso na forma lamelar. Hacker (2000) registrou que esse fato dever-se-ia a dilatação e fragmentação dessas organelas, as quais poderiam originar o tipo vesicular do retículo, dados que justificariam a elevada quantidade de retículo endoplasmático rugoso vesicular observada nos ovócitos III deste grupo de tratamento.

Além disso, detectou-se também, nos ovócitos III expostos a 10 ppm, o inchaço das mitocôndrias e o desarranjo e/ou a perda de suas cristas. Segundo Proskuryakov (2002), essas alterações ocorreriam ou devido ao rápido aumento na quantidade de íons cálcio, ou ao estresse celular, fatores que alterariam a estrutura da membrana interna das mitocôndrias, tornando-as permeáveis. Esse processo poderia levar a mitocôndria à morte, afetando diretamente os níveis de ATP na célula e, conseqüentemente, seu metabolismo respiratório, o que provavelmente tenha ocorrido nos ovócitos de *R. sanguineus*.

Ainda, nos ovócitos III expostos a 10 ppm, ocorreu a interrupção total da tomada de elementos vitelogênicos oriundos da hemolinfa, uma vez que, neles detectou-se a retração completa dos microvilos da membrana plasmática.

Nos ovócitos IV dos indivíduos expostos as concentrações de 1, de 5 e de 10 ppm de fipronil, encontrou-se áreas vacuolizadas, bem como cório mais fino do que aquele normalmente encontrado no grupo controle. O aumento progressivo do número de ovócitos alterados, das modificações citoplasmáticas e das áreas de vacuolização celular quando se comparou os ovócitos IV dos grupos II, III e IV, indicou que os processos autofágicos foram muito mais intensos nos ovócitos dos indivíduos tratados com as maiores concentrações de fipronil, provavelmente devido ao fato da célula estar eliminando maior quantidade de elementos danificados.



Os ovócitos V de *R. sanguineus*, segundo Oliveira et al. (2005) e observado no grupo controle, foram caracterizados por possuírem os maiores grânulos protéicos de vitelo, poucas e pequenas gotículas lipídicas em seu citoplasma, bem como cório completamente depositado e subdividido em endo e exocório. Essa morfologia não foi observada nos ovócitos V dos indivíduos expostos à 1 ppm de fipronil, onde os grânulos de vitelo deram lugar a extensas áreas vacuolizadas e onde o envoltório do ovócito, não apresentou características de cório devido a sua espessura extremamente fina, o que mostrou que mesmo se o ovócito conseguisse chegar intacto ao estágio IV, ele ainda poderia sofrer a ação do fipronil na fase V do desenvolvimento.

Nos indivíduos expostos a 5 ppm, observou-se dois tipos de ovócitos V, caracterizados por alterações morfológicas diferenciadas. Num deles, os grânulos de vitelo mostraram eletrondensidade variada, figuras mielínicas, vacúolos citoplasmáticos e cório fino apoiado numa lâmina basal rompida. O outro tipo, ao contrário, possuía grânulos de vitelo ainda preservados, muitos vacúolos e cório mais espesso do que aquele descrito no primeiro tipo, apoiado numa lâmina basal íntegra. Estes resultados deixaram evidente que os ovócitos V poderiam reagir diferentemente à ação do agente químico em questão, pela própria presença de um cório mais espesso e com todas as camadas depositadas, uma vez que ter-se-ia menor permeabilidade à entrada de agentes externos para o interior da célula, o que não implicaria na formação de uma barreira total contra o acaricida, visto que o citoplasma destas células apresentou características de desorganização provavelmente causada pela ação do agente químico aplicado.

Naqueles indivíduos expostos a 10 ppm, observou-se muitos ovócitos V com grandes alterações, confirmando, mais uma vez, que essa dose é a que causaria os maiores danos nas células germinativas de *R. sanguineus*.

Os dados obtidos no presente estudo corroboraram outros desenvolvidos com diferentes agentes químicos, como aqueles de Friesen et al. (2003), que analisando carrapatos *A. hebraeum* registraram que o agente químico avermectina induziria a interrupção da captação de vitelo e a sua degeneração nos ovócitos. Já Friesen e Kaufman (2003) detectaram a inibição da captação da vitelogenina, principal proteína do vitelo, pelos ovócitos do carrapato *A. hebraeum* após a exposição à cipermetrina.



Outros dados que confirmariam a atuação do fipronil no desenvolvimento do ovário de *R. sanguineus* seria a mudança no tamanho dos ovócitos, quando comparado o grupo controle aos três grupos de tratamento (II, III e IV), onde no grupo II, os ovócitos não apresentaram diferenças significativas em relação ao diâmetro; no grupo III, houve a redução do tamanho dos ovócitos IV e V e no grupo IV, os ovócitos II e III se tornaram um pouco menores e os IV e V muito menores, como resultado da ação do fipronil. Estes dados corroboraram os de Friesen e Kaufman (2003) e Friesen et al. (2003), que registraram a redução do comprimento do ovário e do tamanho dos ovócitos do carrapato *A. hebraeum*, em virtude da exposição à cipermetrina e à avermectina, respectivamente.

O presente estudo ainda avaliou o potencial tóxico (citotóxico, genotóxico e mutagênico) do fipronil em camundongos (organismos não alvo) submetidos a diferentes doses desta droga, em condições artificiais.

No presente estudo, os camundongos foram divididos em grupos (I, II, III) e foram expostos às doses de 15mg/Kg (I), 25mg/Kg (II) e 50mg/kg (III) de fipronil. Após o tratamento, procedeu-se a análise dos fígados dos indivíduos. As alterações morfológicas observadas foram: (1) a proliferação das células de Kupffer, (2) a hipertrofia dos hepatócitos, (3) a presença, quantidade e distribuição de proteínas, polissacarídeos, lipídios e de vacúolos no citoplasma dos hepatócitos, bem como (4) a congestão dos vasos sanguíneos hepáticos.

Nos indivíduos do grupo controle, o fígado mostrou morfologia inalterada e histologia conhecida e amplamente relatada na literatura de mamíferos (CARVALHO; COLARES-BUZATO, 2005; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; ROSS; PAWLINA, 2008).

O fígado é um órgão que desempenha inúmeras funções vitais nos vertebrados (ARIAS et al., 1998), dentre as quais, a acumulação, biotransformação e inativação de inúmeras substâncias tóxicas (BRAUNBECK, 1998; GONZALEZ, 1993). Desta forma, os hepatócitos seriam o primeiro alvo da toxicidade de uma substância, o que habilitaria o fígado a ser um importante órgão para estudos toxicológicos (BRAUNBECK, 1998; ZELIKOFF, 1998).

No presente estudo, os fígados dos indivíduos expostos à 15mg/kg de fipronil (grupo I), apresentaram alguns hepatócitos com pequenos vacúolos em seu





citoplasma, sugerindo que a célula estivesse tentando bloquear ou mesmo eliminar o composto tóxico do sistema, acondicionando-o em compartimentos que posteriormente passariam por processos de degradação. Resultados semelhantes foram obtidos por Ferreira (1992) e Lopes-Flores e Malabarba (1997), em peixes submetidos à ação de efluentes petroquímicos.

Nos indivíduos do grupo II (25mg/Kg), o número de hepatócitos com alterações morfológicas aumentou, o que levou a desorganização original do tecido hepático. Alterações como perda da forma dos hepatócitos, principalmente devido ao inchaço (hipertrofia) dessas células, aumento da vacuolização citoplasmática e/ou das gotas lipídicas, bem como a presença em algumas células de núcleos picnóticos, confirmariam a ocorrência dos danos causados pelo acaricida.

Dados da literatura demonstraram que a vacuolização citoplasmática dos hepatócitos de indivíduos submetidos a agentes tóxicos ocorreria ou devido a presença de degeneração hidrópica ou devido ao acúmulo excessivo de lipídios (esteatose). Segundo Rhodes et al (1987) e Teh (1997), a hipertrofia celular poderia ocorrer devido a vários fatores, incluindo o aumento do retículo endoplasmático liso causado quando uma sobrecarga metabólica fosse imposta à célula. Essa situação poderia estar acontecendo nos indivíduos avaliados no presente estudo, o que justificaria as alterações observadas na forma dos hepatócitos dos indivíduos tratados com fipronil. Simultaneamente a presença de vacúolos hidrópicos, hialinos, digestivos, bem como de gotas lipídicas poderiam estar contribuindo para o surgimento dessas alterações.

Os indivíduos analisados neste estudo e tratados com 50mg/Kg de fipronil (grupo III), apresentaram hepatócitos arredondados devido ao grande inchaço, bem como extensas áreas citoplasmáticas vacuolizadas e/ou com a presença de gotas lipídicas, deixando claro que, à medida que as doses do fipronil aumentaram também se elevou o número e o tipo das alterações histológicas nos fígados destes camundongos. Dados semelhantes foram encontrados por Ferreira (1992) e Gül et al.(2004), em estudos com peixes expostos à águas poluídas, bem como por Rodrigues e Fanta (1995), em peixes expostos à organofosforados.

Carvalho e Colares-Buzato (2005) e Gül (2004) descreveram que a presença de vacúolos com aspecto vazio e arredondado nos hepatócitos, normalmente



indicariam sítios anteriormente ocupados por lipídio, corroborando assim muitos dados aqui obtidos. Por outro lado, alguns autores descreveram que vacúolos de formato irregular, não conteriam lipídios e seriam caracterizados como vacúolos autofágicos, estruturas encontradas principalmente em células em processo de reciclagem ou mesmo em processo de degeneração (CARVALHO; PIMENTEL, 2007; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; ROY; BHATTACHARYA, 2006). Isto ocorreria com a finalidade de se eliminar os restos celulares danificados, porém fazendo ainda o reaproveitamento de alguns componentes que poderiam ser reutilizados pela célula, o que justificaria o aumento do número de vacúolos no fígado dos indivíduos expostos ao fipronil, à medida que a dose do agente tóxico aumentou e causou maior dano à célula.

A presença de vacúolos ocupando extensas áreas do citoplasma dos hepatócitos traria como maior prejuízo à célula, o deslocamento do núcleo para a periferia, devido à pressão física exercida sobre o mesmo, o que ocasionaria sua atrofia, impedindo-o de realizar suas funções, como aqui registrado pela presença de núcleos picnóticos e pela intensa vacuolização nos hepatócitos dos indivíduos do grupo III. Esses dados corroboraram os encontrados por Ram e Singh (1998), em peixes expostos ao pesticida carbofuran e por Gül et al.(2004), em peixes expostos à águas poluídas.

A marcação para as proteínas no fígado dos indivíduos do grupo controle foi significativa e encontrada na forma de granulação grosseira no citoplasma dos hepatócitos. Nos indivíduos tratados (grupo I, II e III) ocorreu a diminuição progressiva na quantidade deste elemento à medida que a dose de fipronil aumentou, o que foi evidenciado pelo aumento de áreas vacuolizadas e negativas ao teste. Esse aumento do número de vacúolos poderia sugerir também que nestes estivessem contidas organelas citoplasmáticas danificadas (vacúolos autofágicos), incluindo retículo endoplasmático rugoso, que seria responsável pela síntese de proteínas. Estes dados permitiram inferir que a síntese protéica realizada pela célula hepática, tanto de proteínas estruturais (para uso da própria célula) como de proteínas para exportação (albuminas, protombina, fibrinogênio, entre outras), estaria sendo comprometida, o que viria a diminuir a eficiência da célula na realização desta



função de síntese, comprometendo, conseqüentemente, o metabolismo geral do órgão, bem como do próprio indivíduo.

O polissacarídeo foi outro elemento aqui analisado, que se apresentou como granulação grosseira e PAS positiva e, que é freqüente nos hepatócitos por intermediar a transformação da energia vinda do alimento e que supre tecidos extra-hepáticos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

O aumento da marcação para polissacarídeo no fígado dos indivíduos dos grupos I e II foi significativo quando se comparou ao controle, sugerindo um acúmulo de glicogênio nesses órgãos. Esses dados poderiam indicar que o processo de quebra do glicogênio pelos hepatócitos não estaria ocorrendo, ou estaria ocorrendo com deficiência, provavelmente devido a ação do agente tóxico sobre os mecanismos de regulação da síntese das enzimas envolvidas com a sua quebra. Esses dados, no entanto, não foram observados por Schwaiger et al. (1997), ao analisarem o fígado de peixes. Os referidos autores encontraram menores quantidades de glicogênio no interior dos hepatócitos dos indivíduos submetidos à intoxicação pelo cobre do que naqueles dos organismos controle.

O fígado de indivíduos tratados com 50mg/Kg de fipronil (grupo III), apresentou diferentes marcações para polissacarídeos dependendo da proximidade ou não com as veias centro lobulares. Menor positividade ao PAS foi detectada nos hepatócitos localizados ao redor das veias centro lobulares, sugerindo que esses hepatócitos seriam os primeiros a ter a sua capacidade de converter a glicose em glicogênio afetada. Resultados semelhantes também foram encontrados por Ferranini (1990) em ratos.

Os hepatócitos dos fígados dos indivíduos do grupo III ainda apresentaram grande vacuolização citoplasmática PAS negativa, o que confirmou que a natureza destes vacúolos não seria polissacarídica.

O lipídio foi outro elemento analisado no fígado. De acordo com Carvalho e Pimentel (2007), o fígado teria também função central no metabolismo dos lipídios e das lipoproteínas, principalmente na captação, na oxidação e/ou na conversão metabólica dos ácidos graxos livres, síntese de colesterol e de fosfolipídios, bem como na formação e na secreção de classes específicas de lipoproteínas.



No presente estudo, os indivíduos do grupo I não apresentaram grandes alterações hepáticas. No entanto, naqueles do grupo II, ocorreu um aumento na quantidade de lipídios, o que poderia ser justificado pela diminuição da capacidade de produzir e/ou metabolizar proteínas que teriam participação na formação dos complexos lipoprotéicos, necessários para a secreção dos lipídios para o meio extracelular. Dessa forma, a diminuição da quantidade das proteínas, causaria o acúmulo de lipídios no citoplasma dos hepatócitos (esteatose), processo este que também foi descrito por Carvalho e Pimentel (2007).

No fígado dos indivíduos expostos a 50mg/Kg, a esteatose foi ainda mais acentuada. Segundo Ross e Pawlina (2008), a administração de drogas aos organismos provoca a hipertrofia do retículo endoplasmático liso, uma vez que é nesta organela onde ocorrem os processos de metabolização, inativação e desintoxicação de vários compostos. Conseqüentemente, provoca também a elevação da atividade das enzimas que atuam na destruição da droga, bem como na síntese de lipídios. Este processo pode assim justificar a grande deposição de gordura observada nos fígados de camundongos submetidos à maior dose de fipronil. A ocorrência da esteatose também foi revelada por Takashima e Hibiya (1995) e, segundo Danton et al. (2009), ela seria observada nos hepatócitos em estágios iniciais de apoptose, necrose, fibrose (devido ao uso de álcool) e nos estágios finais da cirrose. Por outro lado, essa grande quantidade de lipídio nos indivíduos do presente estudo poderia também ser resultado da ausência de processos de metabolização.

Áreas vacuolizadas negativas ao teste para lipídios também foram encontradas no fígado dos indivíduos do grupo III, no entanto foram menores e menos freqüentes do que aquelas observadas nos testes para detecção de proteínas e de polissacarídeos, o que confirmou que a natureza de alguns vacúolos seria realmente lipídica, enquanto outros seriam vacúolos autofágicos. Esses resultados confirmaram também que, nos indivíduos tratados com a maior dose de fipronil, estariam ocorrendo intensos processos autofágicos na tentativa da célula de eliminar maior quantidade possível de elementos danificados, preservando-a.

No presente estudo também foram observados os comportamentos dos capilares sangüíneos do fígado dos indivíduos. O aumento significativo do calibre



(distensão e/ou dilatação) dos capilares sanguíneos quando se comparou os indivíduos dos grupos I, II e III ao controle negativo, poderia indicar a presença de maior quantidade de células sanguíneas chegando ao fígado, processo este descrito como “congestão dos vasos”. Segundo Booth (1992), esse processo facilitaria a migração de células também da linhagem branca: neutrófilos, monócitos, linfócitos, entre outras, para participarem, ou de um processo inflamatório e/ou da destruição da substância estranha. Embora no presente estudo tenha sido observada “congestão de vasos” em grande escala, não foram observadas ocorrências de processos inflamatórios.

Outra alteração significativa nos fígados aqui estudados foi o aumento crescente do número de células de Kupffer nos indivíduos dos grupos I, II e III. Essas células são macrófagos hepáticos, pertencentes ao sistema retículoendotelial. Tal característica também foi descrita por Sreelatha et al (2009) ocorrendo no fígado de ratos submetidos ao tetracloreto de carbono ( $\text{CCl}_4$ ).

Uma vez que as células de Kupffer são células que desempenham diversas funções, dentre elas, a de destruir hemácias inativas, digerir hemoglobina, produzir bilirrubina, bem como secretar enzimas necessárias para a digestão intracelular (processos imunológicos), poder-se-ia sugerir que à medida que a dose de fipronil aumentou, também aumentou a ação de macrófagos, e conseqüentemente, os processos de fagocitose na tentativa de se eliminar o próprio agente tóxico, bem como os restos celulares danificados.

No presente estudo foram também avaliados os efeitos genotóxicos do fipronil, por meio da realização de ensaio do cometa, utilizando o sangue periférico de camundongos expostos a diferentes doses deste químico.

Os resultados revelaram que doses de 15mg/Kg e 25mg/Kg de fipronil não foram potencialmente indutoras de danos genotóxicos nos camundongos analisados. Os valores dos índices de genotoxicidade (score) e o número de nucleóides com danos (células lesionadas) foram próximos aqueles obtidos para o controle negativo, não significativos estatisticamente e, portanto, sem efeitos danosos. Ao contrário, quando fez-se a aplicação de 50mg/kg de fipronil, os indivíduos expostos apresentaram elevado número de nucleóides com danos (células lesionadas) e alto índice de genotoxicidade (score), indicando que aqui os efeitos genotóxicos foram



significativos. No entanto, a maioria dos nucleóides observada foi classificada como pertencente à classe 1. Por estes resultados pode-se inferir que essa concentração de fipronil apresentaria capacidade de induzir alguns danos no DNA, que poderiam ou não ser ainda reparados.

Para a análise dos efeitos mutagênicos do fipronil (efeitos já fixados) foi realizado o teste de micronúcleo por meio da análise do sangue periférico de camundongos. Os resultados demonstraram que em 24 horas, o grupo controle negativo apresentou baixo índice de micronúcleos e os indivíduos submetidos ao controle positivo (ciclofosfamida) já começaram a apresentar alterações em seu material genético. Os indivíduos que receberam as doses de 15mg/Kg e 25mg/Kg de fipronil, não apresentaram potencial de mutagenicidade. No grupo exposto a dose mais alta (50mg/Kg), os indivíduos apresentaram características mutagênicas detectáveis via observação de micronúcleos, o que indicou, conseqüentemente o potencial mutagênico do fipronil.

No tempo de 48 horas, os indivíduos do grupo controle negativo continuaram a apresentar baixos índices de micronúcleos e o controle positivo (ciclofosfamida) foi eficiente em causar danos no DNA, uma vez que a freqüência de micronúcleos observada foi muito maior do que no controle negativo. Também, foi no tempo de 48h que ocorreu o pico de micronúcleos induzidos pela ciclofosfamida. Segundo Rogers (1994), esse agente mutagênico não age diretamente no DNA; há a necessidade do mesmo ser primeiro metabolizado para que seus metabólitos sejam efetivos para provocar estes danos, o que justifica a maior freqüência de micronúcleos no tempo de 48h e, não naquele de 24h.

Os índices de micronúcleos dos grupos expostos ao fipronil sofreram diminuição, principalmente nos indivíduos expostos a 50mg/Kg de fipronil, os quais não mais apresentaram potencial mutagênico, ou seja, houve a diminuição da indução de micronúcleos nos organismos expostos ao químico no tempo de 48h, sugerindo que a metabolização do produto diminuiria a capacidade de causar danos ao DNA.

No tempo de 72 horas de exposição, o controle negativo permaneceu com baixa taxa de micronúcleos. O controle positivo (ciclofosfamida) ainda foi capaz de promover danos nos organismos expostos, visto que elevada freqüência de



micronúcleo ainda foi detectada. Nesse tempo houve também a diminuição significativa da frequência de micronúcleos em todos os grupos de tratamento (I, II e III), provavelmente devido ao processo de metabolização da droga e da eliminação dos produtos tóxicos.

A avaliação dos efeitos tóxicos das três diferentes doses de fipronil em camundongos permitiu verificar que somente o tratamento com a dose mais alta (50mg/Kg) apresentaria potencial de mutagenicidade estatisticamente significativo.

Sendo assim, o presente estudo trouxe informações importantes que certamente contribuirão para o sucesso no controle e/ou eliminação de carrapatos *R. sanguineus* minimizando os danos em seus hospedeiros, visto que promoveu uma melhor compreensão da ação do fipronil, tanto nos carrapatos, quanto nos camundongos, organismos não-alvo, bem como demonstrou qual é a reação, principalmente das células dos sistemas biológicos dos carrapatos em resposta aos efeitos de um agente tóxico.

*Conclusões*

---





## VI. CONCLUSÕES

1. A eficácia do químico fipronil em fêmeas semi-ingurgitadas de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* foi determinada, estabelecendo a **CL<sub>50</sub>** (concentração 50% letal) e intervalo de confiança a 95%, g (95): **CL<sub>50</sub>** = 9.647 ppm (4.711 a 13.470).
2. A mortalidade dos carrapatos *R. sanguineus* ocorre em concentrações de fipronil bem menores do que àquelas indicadas nos rótulos dos produtos comerciais existentes no mercado.
3. As alterações histológicas causadas pelo fipronil sobre os ovócitos de *R. sanguineus* variaram desde a presença de poucos e pequenos vacúolos até a vitelogênese interrompida e a morte celular .
4. Num mesmo ovário de *R. sanguineus* exposto ao fipronil, são observados ovócitos com alterações morfológicas e vitelogênese interrompida que culminaram na morte celular, e outros que, mesmo que não completamente, ainda conseguem manter parte de suas estruturas celulares íntegras.



5. Os mecanismos de defesa celular observados nos ovócitos de *R. sanguineus* expostos ao fipronil são: o aumento e rearranjo dos elementos do citoesqueleto, bem como a grande quantidade de vacúolos autofágicos e de figuras mielínicas.
6. Fica comprovada a ação do fipronil em indivíduos não-alvo em condições artificiais.
7. As alterações encontradas no fígado dos camundongos expostos ao fipronil variaram desde a proliferação das células de Kupffer, hipertrofia dos hepatócitos, o acúmulo e distribuição de proteínas, polissacarídeos, lipídios e vacúolos no citoplasma dos hepatócitos, bem como a congestão de vasos sanguíneos.
8. Os danos causados pelo fipronil no fígado de camundongos demonstraram principalmente a ocorrência de a) processos de autofagia, b) esteatose e c) morte celular por necrose.
9. As doses 15 mg/Kg e 25mg/Kg de fipronil não têm ação genotóxica e mutagênica no sangue periférico de camundongos.
10. O potencial mutagênico do fipronil fica demonstrado na dose de 50mg/Kg, no tempo de 24 horas de exposição.
11. A utilização da dose de 50mg/Kg de fipronil ou de outras mais altas deve ser evitada, uma vez que podem causar danos aos organismos não-alvos.

## *Referências*

---



## VII. REFERÊNCIAS

ABDEL-RAHMAN, A.R; WAUCHOPE, R.D.; TRUMAN, C.C.; DOWLER, C.C. Runoff and leaching of atrazine and alachor on a sandy soil as affected by application in sprinkler irrigation. **Journal of Environmental Science and Health-B: Pesticides and Food Contaminants**, New York, v. 34, p. 381-396, 1999.

ANDERSON, D.; PLEWA, M. J. The international comet assay workshop. **Mutagenesis**, v. 13, p. 67-73, 1998.

ANDERSON, D.; YU, T-W; MCGREGOR, D.B. Comet assay responses as indicators of carcinogenic exposure. **Mutagenesis**, New York, v. 13, p. 539-555, 1998.

ANDERSSON, T.; FÖRLIN, L.; HÄRDIG, J.; LARSSON, A. Physiological disturbances in fish living in coastal water polluted with Bleached Kraft Pulp Mill effluents. **Can. Jor. Of Fish Aquat. Sci.**, v.45, p. 1535-1536, 1998.

ALENCAR, N.X.; KOHAYAGAWA, A.; SANTARÉM, V.A. *Hepatozoon canis* infections of wild carnivores in Brazil. **Vet. Parasitol.**, v.70, p.279-282, 1997.



AL-SABTI, K.; METCALFE, C. D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 343, n. 2-3, p. 121-135, 1995.

ALVES-BRANCO, F.P.; ECHEVARRIA, F.A.M.; SIQUEIRA, A.S. Garça vaqueira *Egretta ibis* e o controle biológico do carrapato *Boophilus microplus*. **Comunicado Técnico da EMBRAPA**, v. 1, p. 1-4, 1983.

ALVES, M.N. **Aplicação de bioensaios bacterianos para determinação da toxicidade aguda de efluentes industriais e corpos de água receptores**. 1990. [s.n.]. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade de São Paulo, São Paulo.

ANTUNES, L.M.G.; FRANCESCATO, H.D.C.; DARIN, J.D.C.; BIANCHI, M.L.P. Effects of selenium pretreatment on cisplatin-induced chromosome aberrations in Wistar rats. **Teratog Carcinog Mutagen**, v. 20, p.341- 348, 2000.

ARBUCKEL, T.E.; SERVER, L.E. Pesticides exposures and fetal death: a review of the epidemiologic literature. **Crit. Rev. Toxicol.**, v. 28, p. 229–270, 1998.

ARIAS, I. M.; JAKOBY, W.B.; POPPER, H; SCHACHTER, D.; SCHAFRITZ, D. A. **The liver: biology and pathobiology**. New York: Raven, 1998.

BAHIA. **Manual de normas e procedimentos técnicos para vigilância da saúde do trabalhador**. Secretaria da Saúde do Estado da Bahia. Departamento de Vigilância da Saúde. Centro de Estudos da Saúde do Trabalhador. Bahia, 1995. p.20-31.

BAKER, V.A. Endocrine disrupters–testing strategies to assess human hazard. **Toxicol. Vitro.**, v. 15, p. 413–419, 2001.

BALASHOV, Y.S. A translation of bloodsucking ticks (Ixodidae) vectors of diseases of man and animals. **Miscellaneous Publications of the Entomological Society of America** 8, p. 159-376, 1972.

BALASHOV, Y.S. The female reproductive system. In: Balashov, Y.S. (Ed.), **An atlas of ixodid tick ultrastructure**. Russian: Entomological Society of America, 1983. p. 98-128.



BARBOSA, J.V.; DAEMON, E.; BITTENCOURT, V.R.E.P., FACCINI, J.L.H.; Efeitos de dois isolados do fungo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., sobre a muda larval e sobrevivência de ninfas de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806)(Acari:Ixodidae). **Ver. Bras. Parasitol. Vet.**, v.6, p.53-56, 1997.

BECHARA, G. H.; SZABO, M. P. J.; FERREIRA, B. R.; GARCIA, M. V. *Rhipicephalus sanguineus* tick in Brazil: feeding and reproductive aspects under laboratorial conditions. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, São Paulo, v. 4, n. 2, p. 61-66, 1995.

BECHARA, G.H. Carrapatos prejudicam carne. **Jornal da UNESP**, São Paulo, nº.175, 2003. p. 5.

BENNER, E. S.; WARGOVICH, M. J.; LIPPMAN, S. M.; HONG, W. K. Micronuclei: a potential intermediate marker for chemoprevention of aerodigestive tract cancer. **Journal of Cellular Biochemistry**, New York, p. 250-254, 1993. Suppl. 17F.

BETTI, C.; BARALE, R.; POOL-ZOBEL, B.V.L. Comparative studies on cytotoxic and genotoxic effects of two organic mercury compounds in lymphocytes and gastric mucosa cells of Sprague-Dawley rats. **Environment and Molecular Mutagenesis**, New York, v. 22, p. 173-180, 1993.

BITTENCOURT, V.R.E.P.; MASSARD, C.L.; LIMA, A.F. Ação do fungo *Metarhizium anisopliae* em ovos e larvas do carrapato *Boophilus microplus*. **Rev. Univ. Rur., Sér. Ciên. Vida**, v.16, n.1-2, p.41-47, 1994.

BITTENCOURT, V.R.E.P.; PERALVA, S.L.F.S.; SOUZA, E.J.; MASCARENHAS, A.G.; ALVES, S.B. Efficacy of two isolates of *Beauveria bassiana* in engorged females of *Boophilus microplus* in the laboratory. **Rev. Univ. Rur, Sér. Ciên. Vida**, v.19, n.1-2, p.65-71, 1997.

BONHAG, P. F. Ovarian structure and vitellogenesis in insects. **Annual Review of Entomology**, v.3, p. 137-160, 1958.

BOISSAN, L. **Gametogenese au cours du development pos embryonnaire et biologie de la reproduction chez *Hysterochelifer meridianus* (L. Lock) Arachnidae: Pseudoscorpion.** 1970. [s.n.]. Doctorat These, Facultat de Sc. De Montpellier, France.



BOOTH, N.H.; MCDONALD, L.E. **Farmacologia e Terapêutica em Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992. 496p.

BORZSONYI, M., TOROK, G., PINTER, A., SURJAN, A. Agriculturally related carcinogenic risk. In: \_\_\_\_\_. **Models, Mechanism and Etiology of Tumor Promotion**. New York: IARC Sci. Publ., 1984. v. 56, pp. 465–486.

BRAUNBECK, T. Cytological alterations in fish hepatocytes following in vivo and in vitro sublethal exposure to xenobiotics – structural biomarkers of environmental contamination. In: BRAUNBECK, T.; HINTON, D.E.; STREIT, B. **Fish Ecotoxicology**. Berlin: Birkhäuser, 1998. p. 61-140.

BRAUNBECK, J.B.; STORCH, V.; BRESCH, H. Species-specific reaction of liver ultrastructure in zebrafish (*Brachydanio rerio*) and trout (*Salmo gairdneri*) after prolonged exposure to 4-chloroamine. **Arch. of Envir. Contam. and Toxic.**, v. 19, p. 405-418, 1990.

BRINTON, L.P.; OLIVER, J.H.JR. Fine structure of oogonal and oocyte development in *Dermacentor andersoni* Stiles (Acari: Ixodidae). **The Journal of Parasitology**, v. 57, n. 4, p. 720-747, 1971b.

BRUM, J.G.W. **Infecção em teleóginas de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) por *Cedecea lapagei***. 1988. 200f. Tese (Doutor em Ciências). Instituto de Biologia. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, R.J.

BRUSICK, D. General Toxicology. In: \_\_\_\_\_. **Principles of Genetic Toxicology**. New York, Estados Unidos, 1987. p. 421-432.

BUCKE, D.; WATERMANN, B.; FEIST, S. Histological variations of hepato-splenic organs from the North Sea dab, *Limanda limanda* (L.). **Jour. Of Fish Dis.**, v.7, p.255-289, 1984.

CAMARGO, J.L.V; OLIVEIRA, M.L.C.S.; ROCHA, N.S.; ITO, N.. A detecção de substâncias cancerígenas em estudos experimentais. **Rev. Bras. Cancerol.**, v.40, p. 21-30, 1994.

CAMARGO-MATHIAS, M.I. **Histoquímica e ultra-estrutura dos ovários de operárias e rainhas de formigas *Neoponera villosa* (Hymenoptera: Ponerinae)**.



1993. 156p. Tese de doutorado, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.

CARVALHO, H.F.; COLARES-BUZATO, C.B. **Células: Uma abordagem multidisciplinar**. São Paulo: Manole, 2005. p.146-155.

CARVALHO, H. F.; RECCO-PIMENTEL, S. M. **A célula**. São Paulo: Manole, 2007. p. 200-210.

CHAPMAN, F.R. **The Insects: Structure and Function**. 4<sup>a</sup>. edição. New York: Cambridge University, 1998. 770 p.

CHOY, W. N. Regulatory Genetic Toxicology tests. In: CHOY, W. N. (Ed.). **Genetic Toxicology and Cancer Risk Assessment**, New York: Marcel Dekker, 2001. p. 93-113.

COLBORN, T. Endocrine disruption from environmental toxicants. In: ROM, W.N. (Ed.). **Environmental and Occupational Medicine**. Philadelphia: Lippicott-Raven Publishers, 1998. p. 803–812.

COLE, L.M.; NICHOLSO, R.A.; CASIDA, J.E. Action of phenylpyrazole insecticides at the GABA-gated chloride channel. **Pestic. Biochem. Physiol.**, v. 46, p. 47-54, 1993.

COLLIOT, F.; KUKOROWSKY, K. Fipronil: a new soil and foliar broad spectrum insecticide. Brighton Crop Protection Conference, **Pests and Diseases**, v. 2, p. 29-34, 1992.

COSSIO-BAYUGAR, R.; WAGNER, G.G.; HOLMAN, P.J. *In vitro* generation of organophosphate resistant *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) cell lines. **Journal of Medical Entomology**, v. 39, p. 278-284, 2002.

COUTINHO, M.T.Z.; BUENO, L.L.; STERZIK, A.;FUJIWARA, R.T.; BOTELHO, J.R.; DE MARIA, M.; GENARO, O.; LINARDI, P.M. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 128, p. 149-155, 2005.





CRAIG, T. M. **Infectious Diseases of the Dog and Cat** (Greene, C. E., Ed.). Philadelphia: W.B. Saunders Co., p. 778-785, 1990.

CRAMPTON, A. L.; BAXTER, G.D.; BARKER, S.C. Identification and characterization of a cytochrome P450 gene and processed pseudogene from an arachnid: the cattle tick, *Boophilus microplus*. **Insect Biochemical and Molecular Biology**, v. 29, p.377-384, 1999.

CSGMT (Collaborative Study Group for the Micronucleus Test). Micronucleus test with mouse peripheral blood erythrocytes by acridine orange supravital staining: the summary report of the 5th collaborative study by CSGMT/JEMS.MMS. **Mutation Res.**, v. 278, p. 83- 98, 1992.

DA COSTA, G.L.; SARQUIS, M.I.; DE MORAES, A.M.; BITTENCOURT, V.R. Isolation of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* from *Boophilus microplus* tick (Canestrini, 1887), in Rio de Janeiro State, Brazil. **Mycopathologia**, v. 154, p. 207-209, 2002.

DALTON, S. R.; LEE, S. M.L.; KING, R. N.; NANJI, A. A.; KHARBANDA, K. K.; CASEY, C.A.; MCVICKER, B. L. Carbon tetrachloride-induced liver damage in asialoglycoprotein receptor-deficient mice. **Biochemical pharmacology**, v. 77, p.1283– 1290, 2009.

DAS, P. C.; CAO, Y.; CHERRINGTON, N.; HODGSON, E.; ROSE, R.L. Fipronil induces CYP isoforms and cytotoxicity in human hepatocytes. **Chemico-Biological Interactions**, v. 164, p. 200–214, 2006.

DAVEY, R.B.; AHRENS, E.H.; GEORGE, J. E.; HUNTER, J. S.; JEANNIN, P. Therapeutic and persistent efficacy of fipronil against *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) on cattle. **Vet. Parasitol.**, v. 74, p. 261-276, 1998.

DAVIS, A.M.; PENSCHUCK, S.; FRITSCHY, J.M.; MCCARTHY, M.M. Development swith in the expression of GABA receptor subunits 1 and 2 in the hypothalamus and limbic system of the rat. **Develop. Brain Res.**, v. 119, p. 127–138, 2000.

DAVOUST, B. Canine ehrlichioses . **Point Vet.**, v.25, n. 151, p. 45-51, 1993.



DEBRUYNE, M.; GUERIN, P.M. Isolation of 2,6-Dichlorophenol from the cattle tick *Boophilus microplus*. Receptor cell responses but no evidence for a behavioral response. **Journal Insect. Phys.**, v. 40, p. 143-154. 1994.

DENARDI, S.E.; BECHARA, G.H.; OLIVEIRA, P.R.; NUNES, E.T.; SAITO, K.C.; CAMARGO-MATHIAS, M.I. Morphological characterization of the ovary and vitellogenesis dynamics in the *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). **Veterinary. Parasitology**, v. 125, p.379-395, 2004.

DOI, T.; NAGAI, H.; TSUKUDA, R. SUZUKI, T. Dose-response relationships of cytotoxicity, PFC response and histology in the spleen in rats treated with alkylating agents. **Toxicology**, v. 107, p. 47-60, 1996.

DOUGLAS, J.R. The internal anatomy of *Dermacentor andersoni* Stiles. **Univ. Calif. Publ. Ent.**, v.7, p. 202-272, 1943.

DRUMMOND, R.O., CRUST, S.F., TREVINO, J.L., GLADNEY, W.J., GRAHAM, O.H. *B. annulatus* and *B. decoloratus*: laboratory tests of insecticides. **J. Econ. Entomol.**, v. 66, p.130-133, 1973.

DULOT, F.N., PASTORI, M.C., OLIVERO, O.A., GONZALEZ CID, M., LORIA, D., MATOS, E., SOBEL, N., DE BUJAN, E.C., ALBIANO, N. Sister chromatid exchanges and chromosomal aberrations in a population exposed to pesticides. **Mutat. Res.**, v. 143, p. 237-244, 1985.

FAIRBAIRN, D. W.; OLIVE, P.L.; O'NEILL, K. L.. The comet assay: a comprehensive review. **Mutation Res.**, v. 339, p. 37-59, 1995.

FENECH, M. The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 285, p. 35-44, 1993.

FENECH, M. The *in vitro* micronucleus technique. **Mutation Research**, Amsterdam, v.455, p.81-95, 2000.

FERNANDES, T.C.C. **Investigação dos efeitos tóxicos, mutagênicos e genotóxicos do herbicida trifluralina, utilizando *Allium cepa* e *Oreochromis niloticus* como**



**sistemas-testes.** 2005. 212 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro/SP.

FERRANINI, E. Influence of long-term diabetes on liver glycogen metabolism in the rat. *Metabolism.*, v.39, p. 1082-1089, 1990.

FERREIRA, M. F. N. **Avaliação da toxicidade dos efluentes líquidos do sistema integrado de tratamento do Pólo Petroquímico do Sul sobre a morfogênese de larvas de *Pimephales promelas* Rafinesque, 1820.** 1992. 107p. Dissertação de Mestrado, Pós-graduação em Oceanografia Biológica, FURG, Rio Grande do Sul.

FLECHTMANN, C. H. W. **Ácaros de importância médico-veterinária.** São Paulo: Livraria Nobel S.A., 1973. 180p.

FREITAS, M.G. **Entomologia e Acarologia Médica e Veterinária.** Belo Horizonte: Precisa, 1982. 253p.

FRENZILLI, G.; BOSCO, E.; BARALE, R. Validation of single gell assay in human leukocytes with 18 reference compounds. *Mutation Research*, Amsterdam, v. 35, p. 206-221, 2000.

FRIEAUFF, W.; HARTMANN, A.; SUTER, W.. Automatic analysis of slides processed in the Comet assay. *Mutagenesis*, v. 16, n. 2, p. 133-137, 2001.

FRIESEN, K. J.; KAUFMAN, W.R. Cypermethrin inhibits egg development in the ixodid tick, *Amblyomma hebraeum*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 76, p. 25-35, 2003.

FRIESEN, K. J.; SURI, R.; KAUFMAN, W.R. Effects of the avermectin, MK-243, on ovary development and salivary gland degeneration in the ixodid tick, *Amblyomma hebraeum*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 76, p. 82-90, 2003.

GALLOWAY, S.M., ARMSTRONG, M.J., REUBEN, C., COLMAN BROWN, S.B., CANNON, C., BLOOM, A.D., NAKAMURA, F., AHMED, M., DUK, S., RIMPO, J., MARGOLIN, B.H., RESNICK, M.A., ANDERSON, B., ZEIGER, E. Chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells, evaluation of 108 chemicals. *Environ. Mol. Mutagen.*, v. 10, p. 1-175, 1987.



GARAJ-VRHOVAC, V., ZELJEZIC, D. Evaluation of DNA damage in workers occupationally exposed to pesticides using single-cell gel electrophoresis (SCGE) assay: pesticide genotoxicity revealed by comet assay. **Mutat. Res.**, v. 469, p. 279–285, 2000.

GARCIA, M.V.; MONTEIRO, A.C.; SZABÓ, M.P.J.; PRETTE, N.; BECHARA, G.H. Mechanism of infection and colonization of *Rhipicephalus sanguineus* eggs by *Metarhizium anisopliae* as revealed by scanning electron microscopy and histopathology. **Braz. J. Microbiol.**, v.36, p.368-372, 2005.

GINGERICH, W.H.; DALICH, G.M. An evaluation of liver toxicity in rainbow trout following treatment with monochlorobenzene. **Proc. West. Pharmacol. Soc.**, v.21, p. 475-480, 1982.

GOLDSCHNEIDER, I.; MCGREGOR, D.D. Anatomical distribution of T and B lymphocytes in rat. Development of lymphocyte-specific antisera. **J. Exp. Med.**, v. 138, p. 1443-1465, 1973.

GONTIJO, A.M.M.C.; TICE, R. Teste do cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. In: RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, E.K.; MARQUES, E.K. (Eds.). **Mutagênese Ambiental**. Canoas:ULBRA, 2003. p. 247-75.

GONZÁLEZ, A.; CASTRO DDEL, C.; GONZÁLEZ, S. Ectoparasitic species from *Canis familiaris* (Linné) in Buenos Aires province, Argentina. **Veterinary Parasitology**, v. 120, p.123-129, 2004.

GONZALEZ, G.; CRESPO, S.; BRUSKE, J. Histo-cytological study of the liver of the cabrilla sea bass, *Serranus cabrilla* (Teleostei, Serranidae), an available model for marine fish experimental studies. **Jour. Of Fish Biol.**, v. 43, p.363-373, 1993.

GRAY JR., L.E. Xenoendocrine disrupters: laboratory studies on male reproductive effects. **Toxicol. Lett.**, v. 33, p. 102–335, 1998.

GREAVES, P.; FACCINI, J.M. Haemopoietic and lymphatic systems. In: \_\_\_\_\_. **Rat Histopathology. A Glossary for Use in Toxicity and Carcinogenicity Studies**. Amsterdam: Elsevier, 1992. p. 43-66.



GRILLO, J.M. El problema de la resistencia a los acaricidas en los programas de control de la garrapata. **Bol. Ofic. Sanit. Panam.**, v.21, n. 3, p. 246-250, 1976.

GRISOLIA, C. K.; CORDEIRO, C. M. T. Variability in micronucleus induction with different mutagens applied to several species of fish. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 23, n. 1, p. 235-239, 2000.

GRISOLIA, C. K.; STARLING, F. L. R. M. Micronuclei monitoring of fishes from Lake Paranoá, under influence of sewage treatment plant discharges. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 491, p. 39-44, 2001.

GÜL, S.; BELGE-KURUTAS, E.; YILDIZ, E.; SAHAN, A.; DORAN, F. Pollution correlated modifications of liver antioxidant systems and histopathology of fish (Cyprinidae) living in Seyhan Dam Lake, Turkey. **Environment International**, v. 30, p. 605– 609, 2004.

HACKER, G. The morphology of apoptosis. **Cell Tissue Res.**, v. 301, p. 5-17, 2000.

HARWOOD, R.F.; JAMES, M.T. **Entomology in human and animal health**. 7 ° edição, New York: Macmillan Publishin Co., 1979. 548p.

HÄUSERMAN, W.; FRIEDEL, T.; HESS, E.A.;STRONG, M.B. **A new active ingredient for a new approach to protect cattle against ticks**. In: Proceedings of XIX International Congress of Entomology, 1992, Beijing (China), 1992. p.138.

HAYASHI, M.; MORITA, T.; KODAMA, Y., SOFUNI, T.; ISHIDATE Jr., M.. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. **Mutation Res.**, v. 245, p. 245-249, 1990.

HAYASHI, M.; TICE, R. R.; MacGREGOR, J. T.; ANDERSON, D.; BLAKEY, D. H.; KIRSCH-VOLDES, M; OLESON, F. B. Jr.; PACCHIEROTTI, F.; ROMAGNA, F.; SHIMADA, H.; SUTOU, S; VANNIER, B. *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 312, p. 293-304, 1994.

HAYASHI, M.; UEDA, T.; UYENO, K.; WADA, K.; KINAE, N.; SAOTOME, K.; TANAKA, N.; TAKAI, A.; SASAKI, Y. F.; ASANO, N.; SOFUNI, T.; OJIMA, Y. Development of genotoxicity assay systems that use aquatic organisms. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 399, n. 2, p. 125-133, 1998.



HIGGINS, R.A.; SLODERBECK, P.E.; BROOKS, H.L. **Field corn insect management for 2001**. Kansas: Kansas State University, 2001. 24p.

HINTON, D.E.; LAURÉN, D.J. Liver structural alterations accompanying chronic toxicity in fishes: potential biomarkers of exposure. In: \_\_\_\_\_. **Biom. Of Environ. Contaimin.** Boca Raton: Lewis Publishers, 1990. p. 17-57.

HINTON, H. E. **Biology of Insect Egg Shells**. Oxford: Pergamon, 1982. 212pp.

HITCHCOCK, L.F. Resistance of cattle tick (*Boophilus microplus*, Canestrini) to benzene hexachloride. **Aust. J. Agric. Res.**, v. 4, p. 360-364, 1953.

HOOGSTRAAL, H. African Ixodoidea I. Ticks of the Sudan. **Res. Rep. U. S. Naval Med. Res. Unit.**, v.3, p. 1000-1101, 1956.

HOUK, V.S. The genotoxicity of industrial wastes and effluents – a review. **Mutation Research**, v. 277, p. 91-138, 1992.

HUFF, J.; HASEMAN, J.; HALL, D.. Scientific concepts, value, and significance of chemical carcinogens studies. **Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 31, p. 621-652, 1991.

HUGNET, C.; CADORE, J.L; BOURDOISEAU, G. Use of fipronil spray (0.25%) for the treatment of *Damalinia equi* [(*Wereckiella equi*) infestation]. **Pratique Veterinaire Equine**, v.31, n.12, p.65-68, 1999.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Statistical Methods in Cancer Research. In: GART, J.J.; KREWSKI, D.; LEE, P.N.; WAHRENDORF, J. **The design and analysis of long-term animal experiments**. Lyon: IARC Scientific Publication, 1986. v. 79, p. 218-219.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Overall evaluations of carcinogenicity: an updating of IARC Monographs volume 1 to 42**. 1987. 440p. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Human, Supplement 7.



JEDRZEJOWSKA, I. A new insight into the spiders' Balbiani bodies. Cytochemical and ultrastructural studies of *Pardosa* sp. and *Clubiona* sp. oocytes. **Tissue and Cell**, v. 36, p. 317-326, 2008.

JENNINGS, J.A.; CANERDY, T.D.; KELLER, R.J.; ATIEH, B.H.; DOSS, R.B.; GUPTA, R.C. Human exposure to fipronil from dogs treated with Frontline. **Vet Human Toxicol.**, v. 44, p. 301-303, 2002.

JUNQUEIRA, L.C.U., JUNQUEIRA, L.M.M.S. **Técnicas básicas de citologia e histologia**. São Paulo: Livraria Editora Santos, 1983. p. 48-81.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Biologia Celular e Molecular**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p. 90-92.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p. 230-290.

KIDD, H.; JAMES, D.R. **The Agrochemicals Handbook**. Cambridge: Royal Society of Chemistry Information Services, 1991, p. 3-11.

KIERSZEMBAUM, A.L. **Histologia e Biologia Celular: uma introdução à patologia**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. p. 310-501.

KIM, J.H.; FEAGLEY, S.E. Adsorption and leaching of trifluralin, metachlor, and metribuzin in a commerce oil. **Journal of Environmental Science and Health-B: Pesticides and Food Contaminants**, New York, v. 33, p. 529-546, 1998.

KING, R.C. Oogenesis in adult *Drosophila melanogaster* IX. Studies on the cytochemistry and ultrastructure of developing oocytes. **Growth**, v. 24, p. 265-323, 1960.

KIRSCH-VOLDERS, M.; VANHAUWAERT, A.; DE BOECK, M.; DECORDIER, I. Importance of detecting numerical versus structural chromosome aberrations. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 504, p. 137-148, 2002.



KISHI, M.; HORIGUCHI, Y.; WATANABE, S.; HAYASHI, M.. Validation of the mouse peripheral blood micronucleus assay using acridine orange supravital staining with urethane. **Mutation Res.**, v. 278, p. 205-208, 1992.

KLAUDE, M.; ERIKSSON, S.; NYGREN, J.; AHNSTRÖM, G.. The comet assay: mechanisms and technical considerations. **Mutation Res.**, v. 363, p. 89-96, 1996.

KOBAYASHI, H.; SUGIYAMA, C.; MORIKAWA, Y.; HAYASHI, M.; SOFUNI, T. A. comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis assay. **MMS Commun.**, v. 3, p. 103-115, 1995.

KÖHLER, A.; DEISEMANN, H.; LAURITZEN, B. Histological and cytochemical indices of toxic injury in the liver of dab *Limanda limanda*. **Mar. Ecol. Prog.**, v. 91, p. 141-153, 1992.

KRISHNA, G; HAYASHI, M. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. **Mutation Res.**, v. 455, p. 155-166, 2000.

KUMARARATNE, D.S.; BAZIN, H.; MACLENNAN. I.C.M. Marginal zones: the major B cell compartment of rat spleens. **Eur. J. Immunol.**, v. 11, p. 858-864, 1981.

KURODA, Y.; JAIN, K. A.; TEZUKA, H.; KADA, T.. Animutagenicity in cultured mammalian cells. **Mutation Res.**, v.267, p. 201-209, 1992.

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

LANDOLT, M. L.; KOCAN, R. M. Fish cell cytogenetics: a measure of the genotoxic effects of environmental pollutants. In: NRIAGU, J. R. **Aquatic toxicology**. New York: J. Wiley, 1983. p. 336-353.

LARREY, D.; TINEL, M.; PESSAYRE, D. Formation of inactive cytochrome P-450 Fe(II)-metabolite complexes with several erythromycin derivatives but not with josamycin and midecamycin in rats. **Biochemical Pharmacology**, v.32, p.1487-1493, 1983.





LEE, R.F.; STEINERT, S. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 544, p. 43-64, 2003.

LEISS, J.K.; SAVITZ, D.A. Home pesticide use and childhood cancer: a case control study. **Am. J. Public Health**, v. 85, 249–253, 1995.

LINARDI, P.M.; NAGEM, R.L. Pulicídeos e outros ectoparasitos de cães de Belo Horizonte e municípios vizinhos. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 33, n. 4, p. 529-538, 1973.

LIPA, J.J. Microbial control of mites and ticks. In: BURGESS, H.D., HUSSEY, N.W. (Eds). **Microbial control of insects and mites**. 2ª edição. London: Academic, 1971. p. 357-374.

LOPES-FLORES, F.; MALABARBA, L.R. Alterações histopatológicas observadas no fígado do lambari *Astyanax jacuhiensis* (Cope, 1894) (Teleostei, Characidae) sob a influência de efluentes petroquímicos. **Biociências**, v. 15, p. 166-172, 1997.

LYONS, G. Mixed messages: pesticides that confuse hormones. **Pesticide Action Network UK**, v. 25, p.1-6, 2000.

MCCARTHY, M.M. Functional significance of steroid modulation of gabaergic neurotransmission: analysis at the behavioral, cellular and molecular levels. **Horm. Behav.**, v. 29, p. 131–140, 1995.

MCMULLEN, H.L.; SAUER, J.R.; BURTON, R.L. Possible role in uptake of water vapour by ixodid tick salivary glands. **Journal of Insect Physiology**, v.22, p. 1281-1285, 1976.

MCNAMEE, J. P.; MCLEAN, J. R. N.; FERRAROTTO, C. L; BELLIER, P. V. Comet assay: rapid processing of multiple samples. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 466, p.63-69, 2000.

MENDES, M.C., OLIVEIRA, R.O., VIEIRA-BRESSAN, M.C.R. Determination of minimal immersion times for use in in vitro resistance test with *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) engorged females and pyrethroid acaricides. **Rev. Brasileira Parasitol. Vet.**, v. 9, p. 33–39, 2000.



MERLE, C.; SOTTO, A.; BARBUAT, C.; JOURDAN, J. Disease course of Mediterranean Spotted Fever: remark on 16 cases. **7e Colloque sur le Controle Epidemiologique des Maladies Infectieuses**, v. 21, p. 400-4001, 1998.

MEYER, O. Implications of animal welfare on toxicity testing. **Hum. Exp. Toxicol.**, v. 12, p. 516-521, 1993

MEYERS, T.R.; HENDRICKS, J.D. Histopathology. In : RAND, G.M; PETROCELLI, S.R. (Ed.). **Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications**. Washington: Hemisphere Pub., p. 283-331, 1985.

MITCHELMORE, C. L.; CHIPMAN, J. K. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potencial value of the comet assay in environmental monitoring. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 399, n. 2, p. 135-147, 1998.

MOORHOUSE, D.E.; TATCHELL, R.J. The feeding process of the cattle tick *Boophilus microplus* (Canestrini). A study in host-parasite relations. Attachment to the host. **Parasitology**, v.56, p. 623-632, 1966.

NANTHAWAN, A.; RAINOWITS, C.; MOISEEVA, E.; RINKEVICH, B. Genotoxicity of Kishon River, Israel: the application of an *in vitro* cellular assay. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 518, p. 21-37, 2002.

NEEDHAM, G.R.; ROSELL, R.; GREENWALD, L.; COONS, L.B. Ultrastructure of type I salivary gland acini in four species of ticks and the influence of hydration states on type I acini of *Amblyomma americanum*. **Experimental and Applied Acarology**, v. 10, p.83-104, 1990.

NEEDHAM, G.R.; TEEL, P.D. Off host physiological ecology of Ixodid ticks. **Annual Review of Entomology**, v. 36, p. 659-681, 1991.

NEHEZ, M., BOROS, P., FERKE, A., MOHOS, J., PATOLAS, P., VETRO, G., ZIMANYI, M., DESI, I. Cytogenetic examination of people working with agrochemicals in the southern region of Hungary. **Regul. Toxicol. Pharmacol.**, v. 8, p. 37-44, 1988.

NOLAN, J. Mechanisms of resistance to chemicals in arthropod parasites of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**, v. 18, p.155-166, 1985.



ODWYER, L.H.; MASSARD, C.L. Aspectos gerais da hepatozoonose canina. **Clin. Vet.**, v.31, p.34-40, 2001.

OLIVE, P. L.; WLODEK, D.; DURAND, R. E.; BANÁTH, P.. Factors influencing DNA Migration from Individual Cells Subjected to Gel Electrophoresis. **Exper. Cell Res.**, v. 198, p. 259-267, 1992.

OLIVEIRA, P.R.; BECHARA, G.H.; DENARDI, S.E.; SAITO, K.C.; NUNES, E.T.; SZABÓ, M.P.J.; CAMARGO-MATHIAS, M.I. Comparison of the external morphology of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) ticks from Brazil and Argentina. **Veterinary Parasitology**, v.129, p. 139-147, 2005.

OLIVEIRA, P.R.; BECHARA, G.H.; DENARDI, S.E.; NUNES, E.T.; CAMARGO-MATHIAS, M.I. Morphological characterization of the ovary and oocytes vitellogenesis of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (LATREILLE, 1806) (Acari: Ixodidae). **Experimental Parasitology**, v. 110, p.146-156, 2005.

OLIVEIRA, P.R.; CAMARGO-MATHIAS, M.I.; BECHARA, G.H. *Amblyomma triste* (Koch, 1844) (Acari: Ixodidae): Morphological description of the ovary and of vitellogenesis. **Experimental Parasitology**, v. 113, p.179-185, 2006.

OLIVEIRA, P.R.; CAMARGO-MATHIAS, M.I.; BECHARA, G.H. *Amblyomma triste* (Koch, 1844) (Acari: Ixodidae). Ovaries: An ultrastructural analysis. **Experimental Parasitology**, v. 116, p.407-413, 2007.

OLIVEIRA, R.O., MENDES, M.C., JENSEN, J.R., VIEIRA-BRESSAN, M.C.R., 2000. Determination of the minimal immersion time of *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) engorged females for in vitro resistance tests with amitraz at 50% effective concentration (EC50). **Rev. Brasileira Parasitol. Vet.**, v. 9, p. 41-43, 2000.

OTTOBONI, M.A. **The dose makes the poison**. 2.ed. New York: Van Nostrand Reinhold, 1991. p. 230-244.

PARADIS, M. New approaches to the treatment of canine demodicosis. **The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 29, n. 6, p. 1425-1436, 1999.



PEARSE, A.G.E. **Histochemistry theoretical and applied**. Churchill: Livingstone, 1985. pp. 123-214.

PENALIGGON, J. Getting to grips with fleas on pet dogs and cats. **Pesticide Outlook**, v.8, n.4, p.19-23, 1997.

PETER, O.; BROSSARD, M. Tick control. **Medicine et maladies infectieuses**, v. 28, p. 383-386, 1998.

PROSKURYAKOV, S.Y. Necrosis: a specific form of programmed cell death. **Exp. Cell Res.**, v. 283, p. 1-16, 2002.

PRUETT, J.H. Immunological control of arthropods ectoparasites - a review. **International Journal for Parasitology**, v. 29, p. 25-32, 1999.

RABELLO-GAY, M. N.; RODRÍGUEZ, M. A. R.; MONTELEONE-NETO, R. Testes com organismos superiores. In: \_\_\_\_\_. **Mutagênese, Teratogênese e Carcinogênese: Métodos e Critérios de Avaliação**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética/ Revista Brasileira de Genética, 1991. p.59-75.

RAM, R.N.; SINGH, S. K. Carbofuran-induced histopathological and biochemical changes in liver of the teleost fish, *Channa punctatus* (bloch). **Ecotoxicol Environ Saf**, v. 16, p. 194-201, 1998.

RANADE, V. On the cytoplasmic inclusions in the oogenesis of *Periplaneta Americana* Linn. Allahad. **University Science Bulletin**, v. 9, p. 85-121, 1933.

RAND, G.M.; PETROCELLI, S.R. Introduction. In: RAND, G.M. & PETROCELLI, S.R., (Ed.). **Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications**. New York: Hemisphere, 1985. p.1-28.

RAUH, J.J.; LUMMIS, S.C.; SATTELLE, D.B. Pharmacological and biochemical properties of insect GABA receptors. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 8, p. 325-9, 1990.

REMEDIO, R.N. **Alterações estruturais no fígado e intestino grosso causadas pelo Diabetes Mellitus tipo I e os efeitos do treinamento físico na recuperação ou**



**estabilização destes danos.** 2007. 89f. Monografia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.

RHODES, L.D.; MYERS, M.S.; GRONLUND, W.D.; MCCAIN, B.B. Epizootic characteristics of hepatic and ranal lesions in English sole, *Parophrys vetulus*, from Puget Sound. **J. Fish. Biol.**, v.38, p.395-407, 1987.

RHÔNE-POULENC. '**Fipronil**' **Worldwide Technical Bulletin.** Lyon (France): Rhône-Poulenc Agrochimie, 1995. 19 pp.

RIBAS, G.; FRENZILLI, G.; BARALE, R.; MARCOS, R.. Herbicide-induced DNA damage in human lymphocytes evaluated by the single-cell electrophoresis (SCGE) assay. **Mutation Res.**, v. 344, p. 41-54, 1995.

RIBEIRO, J.M.C. Role of saliva in blood-feeding by arthropods. **Annals of Review Entomology**, v.32, p. 463-478, 1987.

RIBEIRO, L. R.; MARQUES, E. K. A importância da mutagênese ambiental na carcinogênese humana. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. (Org.). **Mutagênese Ambiental.** Canoas: Ulbra, 2003. p. 21-28.

RICARDO, A. J.; OLIVEIRA, P.R; BECHARA, G. H.; CAMARGO-MATHIAS, M.I. Ultrastructural detection of proteins, lipids and carbohydrates in oocytes of *Amblyomma triste* (Koch, 1844) (Acari; Ixodidae) during the vitellogenesis process. **Tissue and Cell**, v. 39, p. 203-215, 2007.

ROBINSON, L.E.; DAVIDSON, L.E. The anatomy of *Argas persicus* II. **Parasitology**, v. 6, p. 217-256, 1913.

RODRIGUES, E. L.; FANTA, E. Liver histopathological of the fish *Brachydanio rerio* Hamilton-Buchman after acute exposure to sublethal levels of the organophosphate Dimethoate 500. **Revta. Braz.. Zool.**, v. 15, p. 441-450, 1998.

ROGERS, A.S. The role of cytochrome P450 in developmental pharmacology. **J. Adolescent Health.**, v. 15, p. 635-640, 1994.

ROMA, G. C.; OLIVEIRA, P. R.; PIZANO, M.A.; CAMARGO-MATHIAS, M.I. Determination of LC<sub>50</sub> of permethrin acaricide in semi-engorged females of the tick



*Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). **Experimental Parasitology**, v. 123, p. 269-272, 2009.

ROSS, G. M.; MCMILLAN, T. J.; WILCOS, P.; COLLINS, A. R.. The single cell microgel electrophoresis assay (comet assay): technical aspects and applications – Report on the 5th LH Gray Trust Workshop, Institute of Cancer Research in 1994. **Mutation Res.**, v. 337, p. 57-60. 1995.

ROSS, M. H.; PAWLINA, W. **Histologia em correlação com biologia celular e molecular**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p.427-594.

ROY, S.; BHATTACHARYA, S. Arsenic-induced histopathology and synthesis of stress proteins in liver and kidney of *Channa punctatus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 65, p. 218–229, 2006.

RUDOLPH, D.; KNULLE, W. Site and mechanism of water vapour uptake from the atmosphere of ixodid ticks. **Nature**, v. 249, p. 84-85, 1974.

RUPPERT, E.E; FOX, R.S.; BARNES, R.D. **Zoologia dos Invertebrados**. 7ª edição. São Paulo: Ed. Roca Ltda, 2005. p. 642-651.

SABATINI, G.A.; KEMP, D.H.; HUGHES, S.; NARI, A.; HANSEN, J. Tests to determine LC50 and discriminating doses for macrocyclic lactones against the cattle tick, *Boophilus microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 95, p. 53-62, 2001.

SAID, E.A. A contribution to the anatomy and histology of the female reproductive system of *Amblyomma cajennense* (Acarina : Ixodidae). **J. Egypt. Soc. Parasitol.**, v. 22, p. 385-393, 1992.

SAITO, K. C.; BECHARA, G.H.; OLIVEIRA, P.R.; NUNES, E.T.; DENARDI, S.E.; CAMARGO-MATHIAS, M.I. Morphological, histological, and ultrastructural studies of the ovary of the tick *Boophilus microplus* (CANESTRINI, 1887) (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v.129, p. 299-311, 2005.

SALEH, H.H. Fish liver as indicator of aquatic environmental pollution. **Bull. Inst. Oceanogr. Fish**, v. 8, p.69-79, 1982.



SATTELLE, D.B. GABA receptors of insects. **Adv. Insect Physiol.**, v. 22, p. 1–113, 1990.

SAUER, J.R.; ESSENBERG, R.C.; BOWMAN, A.S. Salivary glands in ixodid ticks: control and mechanism of secretion. **Journal of Insect Physiology**, v. 46, p. 1069–1078, 1999.

SCHMIDT, W. The micronucleus test. **Mutation Res.**, v. 31, p. 9-15, 1975.

SCHMIDT, W. The micronucleus test for cytogenetics analysis. In: HOLLANDER, A. **Chemical Mutagens: Principles and methods for their detection**. New York: Plenum Press, 1976. p. 31-53.

SCHULTE-HERMANN, R. Induction of liver growth by xenobiotic compounds and other stimuli. **CRC Critical Reviews in Toxicology**, v. 3, p. 97-158, 1974.

SCHWAIGER, J.; WANKE, R.; ADAM, S.; PAWERT, M.; HONNEN, W.; TRIEBSKORN, R. The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. **J. Aquat. Ecosyst. Stress Recovery**, v. 6, p. 75-86, 1997.

SCHWARTZ, L.M.; OSBORNE, B.A. **Cell death**. San Diego: Academic Press, 1995. p. 1-20.

SCHUURMAN, H.-J.; KRAJNC-FRANKEN, M.A.M.; KUPER, C.F.; VANLOVEREN, H.; VOS, J.G. Immune system. In:\_\_\_\_\_. **Handbook of Toxicologic Pathology**. San Diego: Academic Press, 1991. p. 421-487.

SCOTT, J.A. The molecular genetics of resistance: resistance as a response to stress. **Fla. Entomol.**, v. 78, p. 399–414, 1995.

SEXTON, D.J.; BURGDORFER, W.; THOMAS, L. Rocky mountain spotted fever in Mississippi: survey for spotted fever antibodies in dogs and for spotted fever group Rickettsiae in dog ticks. **American Journal of Epidemiology**, v. 103, p. 192 – 197, 1976.



SHAW, R.D. Culture of an organophosphorus resistant strain of *Boophilus microplus* (Canestrini) and assessment of its resistance spectrum. **Bull. Entomol. Res.**, v. 56, p. 398-405, 1966.

SIGAL, M.D.; YODER, J.A.; NEEDHAM, G.R. Palp-splaying behavior and a specific mouthpart site associated with active water vapor uptake in *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 36, p. 365-369, 1999.

SILVA DE MORAES, R.L.M.; BOWEN, I.D. Modes of cell death in the hypopharyngeal gland of the honey bee (*Apis mellifera* L.). **Cell Biol. Int.**, v. 24, n. 10, p. 737-743, 2000.

SIMPSON, R.M.; GAUNT, S.D.; HAIR, J.A.; KOCAN, K.M.; HENK, W.G.; CASEY, H.W. Evaluation of *Rhipicephalus sanguineus* as a potential biologic vector of *Ehrlichia platys*. **American Journal of Veterinary Research**, v. 52, n° 9, p. 1537-1541, 1991.

SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L.. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Exper. Cell Res.**, v. 175, 184-191, 1988.

SNUSTAD, D. P.; SIMMONS, M. J. **Fundamentos de Genética**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 756pp.

SOARES, A.O.; SOUZA, A.D.; FELICIANO, E.A.; RODRIGUES, A.F.; D'AGOSTO, M.; DAEMON, E. Evaluation of ectoparasites and hemoparasites in dogs kept in apartments and houses with yards in the city of Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 15, n. 1, p.13-6, 2006.

SOARES, J.J.; BUSOLI, A.C. Efeito de inseticidas em insetos predadores em culturas de algodão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, n.9, p.1889-1894, 2000.

SONENSHINE, D. E. The female reproductive system. In: SONENSHINE, D. E. (Ed.). **Biology of ticks**. New York: Oxford University Press, 1991. pp. 280-304.





SONNENSCHNEIDER, C.; SOTO, A.M. An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists. **J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.**, v. 65, p.143–150, 1998.

SPEIT, G.; HANELT, S.; HELBIG, R.; SEIDEL, A.; HARTMANN, A. Detection of DNA effects in human cells with the comet assay and their relevance for mutagenesis. **Toxicol. Lett.**, v. 88, p. 91-98, 1996.

SREELATHA, S.; PADMA, P. R.; UMADEVI, M. Protective effects of *Coriandrum sativum* extracts on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, p. 702–708, 2009.

STEPHEN, I. C., ACHYUTHARAO, K. M. Natural occurrence of *Coxiella burnetii* in the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus*. **Indian J. Med. Res.**, v. 71, p. 865-869, 1980.

STEVENS, M.M.; HELLIWELL, S.; WARREN, G.N. Fipronil seed treatments for the control of chironomid larvae (Diptera: Chironomidae) in aerially-sown rice crops. **Field Crop. Res.**, v. 57, p.195-207, 1998.

STORER, T.I.; USINGER, R.L. **Zoologia Geral**. 3ª edição. São Paulo: Companhia ed. Nacional, 1984. p. 523-524.

SZABÓ, M.P.; CUNHA, T.M; PINTER, A.; VICENTINI, F. Ticks (Acari: Ixodidae) associated with domestic dogs in Franca region, São Paulo, Brazil. **Experimental and Applied Acarology**, v. 25, n. 10, p.909-916, 2001.

TAKASHIMA, F.; HIBIYA, T. **An atlas of fish histology: normal and pathological features**. 2ª. Edição. Tokyo: Kodanska/Stuttgart: Fischer Verlag, 1995. 195pp.

TATCHELL, R.J.; MOORHOUSE, D.E. The feeding process of the cattle tick *Boophilus microplus* (Canestrini). The sequence of host-tissue changes. **Parasitology**, v. 58, p. 441-459, 1970.

TAYLOR, M.A. Recent developments in ectoparasiticides. **The Veterinary Journal**, v. 161, p.253-268, 2001.



TEH, S.J.; ADAMS, S.M.; HINTON, D. E. Histopathological biomarkers in feral freshwater fish populations exposed to different types of contaminant stress. **Aquat. Toxicol.**, v.37, p. 51-70, 1997.

TELLAM, R.L.; SMITH, D.; KEMP, D. H. Vaccination against ticks. In: YONG, W. K. (Ed.). **Animal parasite control using biotechnology**. Boca Raton: CRC Press, 1992. p. 303-331.

TICE, R. R.. The single cell gel/ Comet assay: a microgel eletrophoretic technique for the detection of DNA damage and repair in individual cells. In: PHILLIPS, D.H. E VENITT, S. **Environmental Mutagenesis**, Oxford: Bios Scientific Publishers, 1995, p. 315-339.

TICE, R.R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J. C.; SASAKI, Y. F.. The single cell gel/ comet assay: guidelines for in vitro e in vivo genetic toxicology testing. **Mutation Res.**, v. 35, p. 206-221, 2000.

TICE, R.R.; ANDREWS, P.W.; SINGH, N.P. The single cell gel assay. A sensitive technique for evaluating intercelular differences in DNA damage and repair. In: SUNTHERLAND, B.M.; WORDHEAD, A.D. (Eds). **DNA damage and repair in human tissues**. New York: Plenum, 1990. p. 68-90.

TILL, W.M. A contribution to the anatomy and histology of the brown ear tick *Rhipicephalus appendiculatus*. **Mem. Entomol. Soc. Southern Africa**, v. 6, p.1-124, 1961.

TILLMAN, P.G.; MULROONEY, J.E. **Tolerance of natural enemies to selected insecticides applied at ultra low volumes**. In: HERZOG, G.A.; HARDEE (chairs), D.A.; OTTENS, R.J.; IRELAND, C.S.; NELMS, J.V.; OTTEA, J.A. (Eds.). Proceedings Beltwide Cotton Conferences USA. New Orleans: Memphis, 1997. p.1312-1313.

TINGLE, C.C.D.; ROTHER, C.F.; DEWHURST, C.F.; LAUER, S.; KING, W. J. Fipronil: Environmental Fate, Ecotoxicology and Human Health Concerns, **Rev. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 176, p. 1-66, 2003.



TRUCKER, J.D. & PRESTON, R.J.. Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges and cancer risk assessment. **Mutation Res.**, v. 365, p. 147-159, 1996.

USEPA. **Pesticide industry sales and usage: 1996 and 1997 market estimates.** 2001. Disponível em: [www.epa.gov/oppbead1/pestsales/97pestsales/table1.htm](http://www.epa.gov/oppbead1/pestsales/97pestsales/table1.htm). Acesso em maio/2010.

VENTURA, B.C. **Avaliação dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos do herbicida atrazina, utilizando *Allium cepa* e *Oreochromis niloticus* como sistemas-teste.** 2004. 125 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro/SP, 2004.

VICENT-JOHNSON, N.; MACINTIRE, D.K.; BANETH, G. Canine hepatozoonosis: pathophysiology, diagnosis, and treatment. **Comp. Cont. Educ. Pract. Vet.**, v.19, p.51-65, 1997.

VITZTHUM, H. G. Acarina. In: \_\_\_\_\_. (Org). **Brown's Klassen und Ordnungen des Tierreiches.** Leipzig: Becker u. Erler, 1943. p. 35-62.

WALKER, A. **Arthropods of domestic animals. A guide to preliminary identification.** London: Chapman & Hall, 1994. p. 5-60.

WALKER, J.B.; KEIRANS, J.E.; HORAK, I.G. **The genus *Rhipicephalus* (Acari: Ixodidae). A guide to the brown ticks of the world.** London:Cambridge University Press, 2000. 643pp.

WALKER, P.R.; PANDEY, S.; SIKORSKA, M. Degradation of chromatin in apoptotic cells. **Cell Death and Differentiation**, v. 2, p. 97, 1996.

WALL, R.; SHEARER, D. **Veterinary Entomology.** London: Chapman & Hall, 1997. p. 43-139.

WHITNALL, A.B., BRADFORD, B. An arsenic resistant tick and its control with gammexane dips. **Bull. Entomol. Res.**, v. 38, p. 353–372, 1947.



WHO. **Our Planet, Our Health: Report of the WHO Commission on Health and Environment**. Geneva: World Health Organization, 1992. p. 68-70.

WIGGLESWORTH, V. B. The hormonal regulation of growth and reproduction in insects. In: BEAMENT, J. W. L., THEHERNE, J. E., WIGGLESWORTH, V. B. (Eds). **Advances in Insect Physiology**. New York: Academic Press, 1964. p. 247-336.

WILLADSEN, P. Novel vaccines for ectoparasites. **Veterinary Parasitology**, v. 71, p. 209-222, 1997.

YOSHINARI, N.H.; BARROS, P.J.L.; BONOLDI, V.L.N.; ISHIKAWA, M.; BATTESTI, D.M.B.; PIRANA, S.; FONSECA, A.H.; SCHUMAKER, T.T. Perfil da borreliose de Lyme no Brasil. **Revista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo**, v. 52, p. 111-117, 1997.

ZELIKOFF, J. T. Biomarkers of immunotoxicity in fish and other non-mammalian sentinel species: predictive value for mammals? **Toxicology**, v. 129, p. 63-71, 1998.

ZUMPT,F.; GLAJCHEN,D. Tick paralysis in man. **S. Afr. Med. J.**, v.24, p. 1092-94, 1950



Rio Claro, 31 de agosto de 2010.

Orientada:

\_\_\_\_\_

Msc. Patrícia Rosa de Oliveira

Orientadora:

\_\_\_\_\_

Profa. Dra. Maria Izabel Camargo-Mathias