

---

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

---

**ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS NO INTESTINO DE FÊMEAS DE  
CARRAPATOS *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari:  
Ixodidae) EXPOSTAS A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE  
SELAMECTINA**

**ANDREA MENDEZ ARAUJO**

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

**Março – 2012**

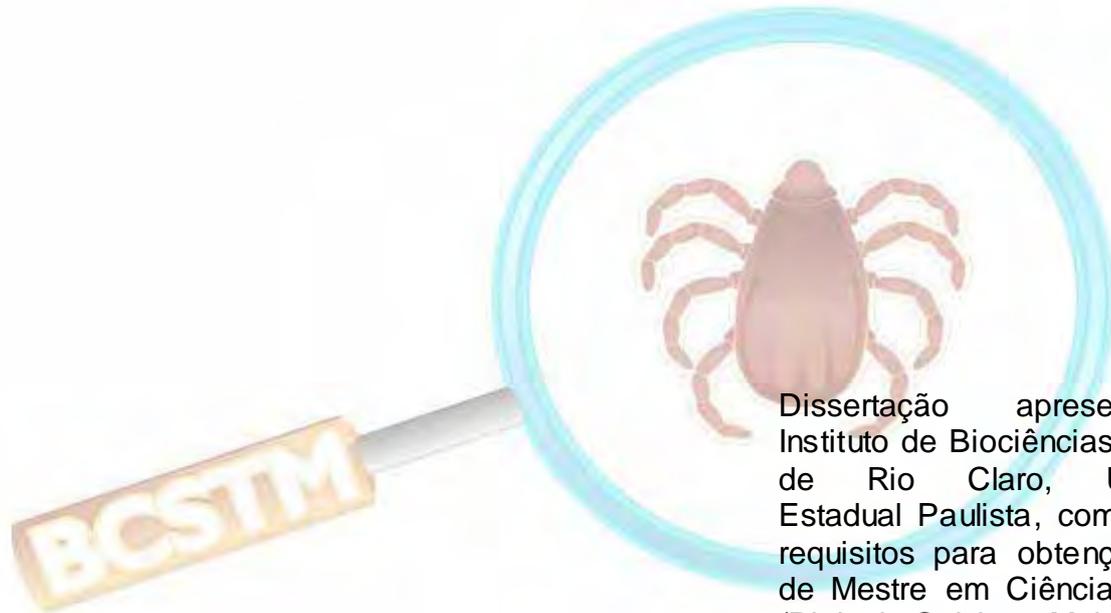
---

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

---

**ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS NO INTESTINO DE FÊMEAS DE  
CARRAPATOS *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari:  
Ixodidae) EXPOSTAS A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE  
SELAMECTINA**

**ANDREA MENDEZ ARAUJO**



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

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

**Co- Orientadora: Dra. Karim Christina Scopinho Furquim**

595.42 Araujo, Andrea Mendez  
A662a Alterações histológicas no intestino de fêmeas de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) expostas a diferentes concentrações de selamectina. / Andrea Mendez Araujo. - Rio Claro : [s.n.], 2012  
69 f. : il., tabs., fots.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,  
Instituto de Biociências de Rio Claro  
Orientador: Maria Izabel Souza Camargo  
Co-Orientador: Karim Christina Scopinho Furquim

1. Ácaro. 2. Controle de carrapatos. 3. Digestão. 4. CL50.  
5. Acaricidas. 6. Diluição. 7. Células intestinais. I. Título.

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

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

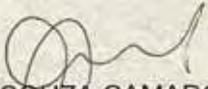
**TÍTULO:** ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS NO INTESTINO DE FÊMEAS DE CARRAPATOS  
*Rhipicephalus sanguineus* (LATREILLE, 1806) (ACARI: IXODIDAE) EXPOSTAS A  
DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SELAMECTINA

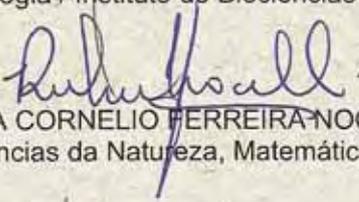
**AUTORA:** ANDREA MENDEZ ARAUJO

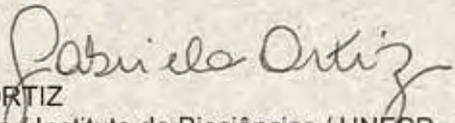
**ORIENTADORA:** Profa. Dra. MARIA IZABEL SOUZA CAMARGO

**CO-ORIENTADORA:** Profa. Dra. KARIM CHRISTINA SCOPINHO FURQUIM

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM CIÊNCIAS  
BIOLÓGICAS (BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR), pela Comissão Examinadora:

  
Profa. Dra. MARIA IZABEL SOUZA CAMARGO  
Departamento de Biologia / Instituto de Biociências / UNESP - Rio Claro

  
Profa. Dra. ROBERTA CORNELIO FERREIRA NOCELLI  
Departamento de Ciências da Natureza, Matemática e Educação / Universidade Federal de São  
Carlos

  
Profa. Dra. GABRIELA ORTIZ  
Departamento de Biologia / Instituto de Biociências / UNESP - Rio Claro

Data da realização: 23 de fevereiro de 2012.

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho aos meus pais Fernando e Cristina,  
às minhas irmãs Raquel e Marina e à minha querida avó Chiquita.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a **DEUS**, por todas as oportunidades, por toda a proteção, por todo o auxílio colocado em meu caminho, por todo crescimento e fortalecimento interior, me mostrando os verdadeiros valores da vida.

Ao meu querido pai **Fernando**, por toda força e apoio, me auxiliando, sempre, nos momentos difíceis, nas tomadas de decisões e por compartilhar comigo cada vitória alcançada. Amo você!

À minha mãe **Cristina**, por todo o amor, todo apoio espiritual e por vibrar por cada conquista dos meus dias. Deus não podia ter sido mais generoso ao permitir que você continuasse em nossas vidas, participando de mais uma etapa tão importante para mim. Obrigada.

À vovó **Chiquita**, pelo enorme suporte espiritual, pelas preces, pelas emanações de amor e otimismo, pelas conversas revigorantes e pelo chazinho mate especial que só você sabe fazer.

Às minhas irmãs **Raquel** e **Marina** por todo o carinho, toda a força e pelos momentos divertidos só “das irmãs”. Obrigada meninas.

À minha orientadora **Profa. Dra. Maria Izabel**, pelo apoio durante todo esse trabalho e por ter confiado nos meus potenciais me dando a oportunidade de crescer como pesquisadora e como pessoa.

À minha co-orientadora **Dra. Karim**, pela paciência e suporte durante todo o meu aprendizado.

Ao meu grande amigo e irmão **Adriano**, pelas horas de conversas, por ouvir e compreender os meus anseios, por me ensinar muito e me ajudar a progredir. Você é uma pessoa muito especial em minha vida e guardo nossa amizade com muito carinho.

Ao meu amigo **Bruno Sampieri**, pelo imenso apoio durante os trabalhos, pela amizade sincera, pelos papos filosóficos e pelos momentos cheios de humor ácido.

Aos meus amigos queridos **Franco, Vlamir, Edmara e Larissa**, que fizeram meus dias mais divertidos, mais alegres. Cada um de vocês tem um espacinho especial em meu coração. Jamais esquecerei as nossas reuniões da AVON e os nossos “Bons Drink”. Arrasaram!

Ao meu amigo **André Arnosti** por todo companheirismo e suporte, mesmo à distância.

À querida **Patrícia Rosa**, pela sutileza e delicadeza ao ensinar e pela prontidão em ajudar.

Aos amigos **Emygdio e Rafael Remédio**, pelos momentos hilários e descontraídos.

Ao técnico **Gerson** por toda ajuda laboratorial, que foi extremamente importante para que esse trabalho fosse concluído.

Aos amigos do **Brazilian Central of Studies on Ticks Morphology (BCSTM)** por todo o conhecimento e crescimento.

À **CAPES** pelo apoio financeiro.

E a todos que passaram pela minha vida, deixando sua marca e colaborando com o meu progresso, aprendizagem e evolução. Obrigada a todos!

Não tenha medo de viver, correr atrás dos sonhos.

Tenha medo de ficar parado.

Anita Garibaldi

# SUMÁRIO

	<b>Página</b>
<b>RESUMO</b> .....	9
<b>ABSTRACT</b> .....	11
<b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	13
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	21
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	23
<b>3.1 Material</b>	
3.1.1 Selamectina.....	23
3.1.2 Carrapatos.....	23
3.1.3 Hospedeiros.....	23
<b>3.2 Métodos</b>	
<b>3.2.1 Teste de Imersão de Adultos (TIA) em Selamectina</b> .....	24
3.2.1.1 Bioensaio 1.....	24
3.2.1.2 Bioensaio 2.....	25
3.2.1.3 Bioensaio 3.....	25
3.2.1.4 Teste Estatístico.....	25
<b>3.2.2 Intestino de carrapatos</b> .....	25
<b>3.2.3 Histologia</b> .....	26
<b>3.2.4 Histoquímica</b> .....	26
3.2.4.1 Técnica do Azul de Bromofenol para Detecção de Proteínas (PEARSE, 1985).....	26
3.2.4.2 Técnica do PAS para detecção de Polissacarídeos (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983).....	27
<b>4. RESULTADOS</b> .....	29
Capítulo 1.....	31
Capítulo 2.....	39
<b>5. DISCUSSÃO GERAL</b> .....	60
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	63
<b>7. REFERÊNCIAS</b> .....	65

*Resumo*

---

**RESUMO**

O presente estudo avaliou o potencial tóxico da selamectina (princípio ativo do antiparasitário Revolution®, Pfizer) sobre fêmeas ingurgitadas de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus*, por meio da elaboração de um protocolo em que a  $CL_{50}$  do composto foi determinada ( $CL_{50} = 452.221\text{ppm}$ ). Além disso, analisou-se por meio de técnicas histológicas os efeitos das concentrações de 50% e 80% do produto comercial sobre o intestino de fêmeas de *R. sanguineus* com 48 horas de alimentação, fixadas em coelhos New Zealand White nos quais aplicou-se topicamente o produto. Os resultados demonstraram que a selamectina provocou a estratificação e posterior desorganização do epitélio intestinal, alterando a morfofisiologia das células generativas e digestivas dos carrapatos, induzindo-as à morte. No grupo exposto a 50% as células generativas apresentaram atividade mitótica acelerada em função da necessidade da reposição celular como resposta à agressão do produto. Ao contrário, nos indivíduos expostos a 80% os processos de divisão celular não foram observados. Nas células digestivas, no entanto, verificou-se citoplasma contendo granulações escuras, possivelmente resultantes do processo de oxidação que ocorreu no lúmen do intestino. A taxa de desprendimento das células em direção ao lúmen do intestino foi maior no grupo exposto a 80%, provavelmente para retirar o composto químico do sistema do carrapato. O comprometimento das células generativas (morte celular) afetou a reposição celular do epitélio (formação de novas células digestivas), prejudicando a digestão do sangue, o que pode afetar tanto o processo de alimentação como o desenvolvimento do carrapato. Além disso, este estudo mostrou que concentrações menores que aquelas indicadas pelo fabricante já foram suficientes para provocar alterações celulares que inviabilizaram a alimentação dos carrapatos.

**Palavras chave:** histologia,  $CL_{50}$ , Revolution®, ixodídeos, digestão

# *Abstract*

---

**ABSTRACT**

This study has evaluated the toxicity potential of selamectin (active principle of the antiparasitic Revolution®, Pfizer) in engorged female ticks, *Rhipicephalus sanguineus*, by elaborating a protocol to determinate the LC<sub>50</sub> of this compound, which was 452,221 ppm. Moreover, the effects of 50% and 80% of selamectin concentration on intestine of females were analyzed by histological techniques. The ticks were removed from their hosts (New Zealand White rabbits) which the product was applied topically after 48 hours of feeding. The results have demonstrated that selamectin caused stratification and subsequent disruption in the intestinal epithelium, changing the morphophysiology of generative and digestive cells, inducing them to death. In the group treated with 50% the generative cells showed accelerated mitotic activity due to the need of cell replacement in response to the product aggression. Instead, individuals in the group treated with 80% the process of cell division were not observed. In the digestive cells of this group, there were dark granules in cytoplasm, which probably occurred due to an oxidation process in the intestine lumen. The detachment of the cells into the lumen was higher in the group treated with 50%, probably to remove the chemical from the tick organism. The damage that occurred in the generative cells (cell death) affected the epithelial cell replacement (new digestive cells formation), which impaired the blood digestion, the feeding process as well the tick development. Furthermore, this study has showed that lower concentrations than the indicated by the manufacturer were enough to cause cellular changes which made the tick feeding process unfeasible.

**Keywords:** histology, LC<sub>50</sub>, Revolution®, hard ticks, digestion

# *Introdução Geral*

---

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

Os carrapatos são artrópodes ectoparasitas hematófagos obrigatórios que não apresentam divisões no corpo, tendo a cabeça, o tórax e o abdômen fundidos (STORER; USINGER, 2000).

O grupo dos carrapatos possui indivíduos de tamanho pequeno ou médio com corpo achatado e ovalado. Algumas espécies chegam a medir cerca de 3 cm de comprimento. Apesar de apresentarem um tegumento fortemente esclerotizado, suas dimensões corporais aumentam durante o repasto sanguíneo no hospedeiro. A região anterior (cabeça) se diferencia do resto do corpo por possuir um conjunto de peças bucais quitinizadas (gnatossoma) (REY, 1973).

Dentre os artrópodes, os carrapatos constituem um dos mais importantes grupos do ponto de vista médico e veterinário, visto que o seu comportamento de parasitismo provoca lesões nos hospedeiros, seja pelo processo de repasto sanguíneo, seja pela transmissão de agentes patogênicos, ou mesmo pelas infecções secundárias, como miíases cutâneas ou paralisia, devido, principalmente a ação tóxica da saliva. Isto influencia negativamente na produção e na consequente comercialização de alguns derivados como a carne, o couro e o leite (WALL; SHEARER, 1997). Estes indivíduos são ainda vetores de arboviroses, rickettsioses, espiroquetoses e protozoários tanto para o homem quanto para animais domésticos ou silvestres (KAUFMAN, 1989)

A espécie *Rhipicephalus sanguineus* está distribuída em todos os continentes do planeta, parasitando principalmente o cão doméstico. Embora tenha se originado na região Afrotropical, sua distribuição quase que cosmopolita se deve às migrações humanas pelo mundo acompanhadas pelo cão (WALKER et al., 2000).

Por pertencer a família Ixodidae, o *R. sanguineus* apresenta três formas parasitárias dentro de seu ciclo de vida: larva, ninfa e adulto, sendo esta última a única com dimorfismo sexual. Cada estágio parasita o hospedeiro por alguns dias, se alimentando de sangue (principalmente), de linfa e de restos tissulares da epiderme e/ou da derme lesada. No final do período parasitário, as larvas e ninfas ingurgitadas se desprendem do hospedeiro e realizam a ecdise (muda) no solo, processo necessário para que o animal passe para os próximos estágios de vida. As fêmeas adultas completamente ingurgitadas, após realizarem o processo de repasto sanguíneo num período de 7 a 8 dias no hospedeiro, se desprendem para fazerem a postura dos ovos no ambiente (1000 a 3000 ovos) os quais, depois de incubados (algumas semanas), originam as larvas. Os machos permanecem ainda no hospedeiro por vários dias ou

semanas, não ingurgitam completamente impedidos pela presença de um escudo que recobre seu corpo por completo e podem ainda fecundar várias fêmeas neste período (LABRUNA, 2004).

Muitas espécies, incluindo, a do *R. sanguineus*, podem viver até mais de um ano sem se alimentar, além do que resistem à desidratação por possuírem o tegumento recoberto por cera (WALKER, 1994; RUPPERT; BARNES, 1996).

O *R. sanguineus* tem cada vez mais um papel relevante entre as espécies de carrapatos de importância mundial. Nos cães, além dos danos diretos, como a anemia (JERNIGAN et al., 2000), ele é responsável pela transmissão de *Ehrlichia canis*, *Babesia canis*, *Haemobartonella canis* e *Hapatozoon canis*. Nos humanos esta espécie ainda é vetora de *Rickettsia conorii* na Europa e de *R. rickettsii* no Arizona – EUA (BORGES et al., 2007). No Brasil é também considerada transmissora em potencial deste último agente, o que vem confirmar a importância médico veterinária destes ectoparasitas. Existem muitos relatos no Brasil de parasitismo humano por esta espécie (DANTAS-TORRES et al., 2006).

O intestino dos carrapatos é o órgão responsável por realizar a digestão do sangue ingerido, que nesses animais é preferencialmente intracelular. Neste órgão ocorre o primeiro contato entre as células do carrapato e os componentes do sangue do hospedeiro, bem como é onde se alojam e se desenvolvem diversos patógenos que serão transmitidos aos hospedeiros (AGBEDE; KEMP, 1985; AGYEI; RUNHAM, 1995). Ele é ainda responsável pela digestão da hemoglobina com consequente liberação do seu grupo prostético (heme) que se acumula em organelas denominadas hemossomos, as quais já foram anteriormente chamadas de hematina ou corpos residuais (LARA et al., 2003). Esses grupos heme são necessários para a sobrevivência dos carrapatos, assim como para outros artrópodes hematófagos, pois, além de participarem de diversas reações bioquímicas essenciais, são também enviados aos ovócitos para participar da vitelogênese constituindo-se, assim, fonte de aminoácidos e de energia para o desenvolvimento do embrião (O'HAGAN, 1974; LARA et al., 2003; GRAÇA-SOUZA et al., 2006; ESTRELA et al., 2010).

A digestão intracelular e o processo de absorção gradual de sangue permitem que o carrapato armazene grande quantidade de alimento, o que lhe garante sobrevivência durante um longo período de tempo (1 ano aproximadamente) sem se alimentar, uma vez que o sangue é rico em aminoácidos, carboidratos, colesterol e nutrientes, possibilitando um longo jejum (SONENSHINE, 1991).

Morfohistologicamente o sistema digestório dos carrapatos está dividido em três regiões: intestino anterior (estomodeu), médio (mesenteron), e posterior (proctodeu), sendo que o anterior e o posterior são derivados da ectoderme e o médio, da endoderme (COONS; ALBERTI, 1999). A maioria dos estudos está relacionada ao intestino médio por ser a região onde ocorre toda a digestão do sangue (CAPERUCCI et al., 2009).

Durante o processo de digestão, as células intestinais passam por modificações que variam de acordo com o tempo que o carrapato passa se alimentando no hospedeiro, bem como com os estágios do ciclo biológico do ectoparasita, ou seja, larva, ninfa e adulto (AGBEDE; KEMP, 1985; COONS et al., 1986; WALKER; FLETCHER, 1987; SONENSHINE, 1991; AGYEI; RUNHAM, 1995; COONS; ALBERTI, 1999; CAPERUCCI et al., 2009). Estudos comparativos entre espécies de carrapatos ixodídeos não mostraram grandes diferenças na morfologia do intestino dos indivíduos pertencentes a essa família, porém, na literatura, muitas nomenclaturas diferentes podem ser encontradas para as células intestinais (BALASHOV, 1972; AGBEDE; KEMP, 1985; WALKER; FLETCHER, 1987; AGYEI; RUNHAM, 1995).

De forma geral, o intestino dos carrapatos apresenta 3 tipos de células diferentes: a) generativas; b) digestivas e c) secretoras (BALASHOV, 1972; AGBEDE; KEMP, 1985; WALKER; FLETCHER, 1987; SONENSHINE, 1991; AGYEI; RUNHAM, 1995; CAPERUCCI et al., 2009). Além dos tipos celulares mencionados anteriormente, Agbede, Kemp, (1985, 1987) afirmaram que no epitélio intestinal encontrar-se-iam as células basofílicas e, segundo diversos outros autores, células endócrinas e vitelogênicas também poderiam ser observadas (COONS; ALBERTI, 1999). Agyei et al. (1991, 1992) sugeriram que as células secretoras descritas por outros autores ainda seriam as células digestivas.

As células generativas são células indiferenciadas que possuem forma de cúpula e tem como função dar origem às digestivas e secretoras. (AGBEDE; KEMP, 1985; WALKER; FLETCHER, 1987). Não participam da digestão propriamente dita, porém, acumulam lipídeo em seu citoplasma. São observadas nos estágios iniciais de cada instar e na fase de alimentação lenta do carrapato, tendo sua ocorrência diminuída nos estágios de pós ingurgitamento (AGBEDE; KEMP, 1985; WALKER; FLETCHER, 1987). Não possuem heterolisossomos e apresentam pequenas áreas com microvilosidades voltadas para o lúmen do intestino (AGBEDE; KEMP, 1985; WALKER; FLETCHER, 1987). Formam um epitélio simples ou pseudoestratificado que se encontra apoiado numa membrana basal (CAPERUCCI et al., 2010).

As células digestivas existem em maior número no intestino e sofrem modificações ao longo do processo digestivo, caracterizando momentos fisiológicos diferentes de um mesmo tipo celular, sendo que esses vários estágios são classificados diferentemente dependendo do autor. Segundo Agyei e Runham (1995), que utilizaram carrapatos *R. (Boophilus) microplus* e *R. apenndiculatus* como modelo de estudo, as células digestivas seriam subdivididas em: prodigestiva, digestiva sésil, digestiva sésil residual, digestiva destacada e digestiva esgotada/vazia, sendo que cada um desses tipos celulares corresponderia a um estágio fisiológico diferente. Baseando-se, portanto, na classificação e descrição adotadas por Agyei e Runham (1995), as células prodigestivas seriam mais alongadas do que as generativas e apresentariam núcleo arredondado e bem corado. Teriam um citoplasma intensamente basofílico com extenso retículo endoplasmático rugoso (RER) e muitas cisternas de Golgi. A região apical teria grande quantidade de microvilosidades e a basal da membrana formaria invaginações abrigando grande número de mitocôndrias. As células prodigestivas quando em contato com o sangue começariam o processo de absorção, transformando-se assim, no estágio seguinte, o das células digestivas sésseis. Estas são descritas como colunares, maiores que as prodigestivas, e com citoplasma apical se projetando em direção ao lúmen, contudo ainda mantendo contato com a membrana basal (AGYEI; RUNHAM, 1995). As digestivas sésseis residuais têm o citoplasma apical projetado em direção ao lúmen do intestino e pouco contato com a membrana basal. Também apresentam vacuolização citoplasmática (AGYEI; RUNHAM, 1995). As digestivas destacadas, já se desprenderam da membrana basal e encontram-se livres no lúmen do intestino. Geralmente são arredondadas e possuem vacúolos marcados positivamente para proteínas. Possuem hemossomos corados de amarelo quando possuem menos grupos heme e de castanho escuro, quando este acúmulo é maior. Elas também apresentam no citoplasma grânulos amorfos e heterogêneos e microvilosidades por toda a superfície livre (AGYEI; RUNHAM, 1995). As digestivas esgotadas/vazias entram em processo de lise e liberam grupos heme e outros produtos resultantes da digestão no lúmen do intestino.

Agbede e Kemp (1985), estudando carrapatos da espécie *R. (Boophilus) microplus* adotaram outra classificação para as células digestivas: a) jovens com poucos vacúolos que reagem positivamente aos lipídeos; b) maduras, com vacúolos de diversos tamanhos, c) esgotadas, com muitos hemossomos e gotas lipídicas, que se desprendem da membrana basal e são eliminadas no lúmen ou ainda se rompem e liberam seu conteúdo (os hemossomos). Ainda os mesmo autores afirmaram que existe dois tipos especializados de células digestivas:

aquelas que realizam a digestão de leucócitos e de constituintes solúveis e as que digerem apenas hemoglobina.

Caperucci et al., (2009), no entanto, estudando carrapatos da espécie *Amblyomma cajenense*, não classificaram as células digestivas de acordo com seus estágios morfofisiológicos, mas sim afirmaram que as mesmas liberariam suas secreções de forma apócrina, as quais auxiliariam na digestão do sangue. Assim, de acordo com estes autores haveria no epitélio intestinal células generativas, digestivas e secretoras.

Segundo Agbede e Kemp (1985, 1987), as células secretoras, especificamente, seriam uma outra classe de células polêmicas entre os diversos autores. As mesmas seriam classificadas em dois tipos: 1 e 2. As do tipo 1 localizar-se-iam próximas às digestivas, com forma variando de colunar a cúbica e apresentando microvilosidades no ápice em menor quantidade do que as do tipo 2 e as digestivas. Não seriam observadas nas fêmeas ingurgitadas. Não teriam hemossomos e nem invaginações na membrana basal da célula. Nas células secretoras do tipo 1 distinguir-se-ia uma fase jovem e outra madura, sendo que a liberação dos grânulos (hemolisinas) no lúmen do intestino dar-se-ia na fase madura. O fato destas células liberarem esta secreção para o lúmen permitiria inferir que a digestão nos carrapatos também poderia ocorrer extracelularmente (SONENSHINE, 1991).

As células secretoras do tipo 2 seriam observadas somente nas fêmeas, e teriam citoplasma fortemente basófilo, com gotas lipídicas e depósitos de glicogênio (AGBEDE; KEMP, 1985, 1987).

Apesar de, segundo a literatura, as células secretoras serem diferentes das digestivas, alguns autores ainda assumem que elas, na verdade, corresponderiam a um estágio das células digestivas, que neste momento de observação estariam exercendo função secretora (COONS et al., 1986; SONENSHINE, 1991; AGYEI et al., 1991, 1992)

As células basofílicas são descritas como tendo forma piramidal, originárias das secretoras do tipo 2 depois destas últimas terem liberado seus grânulos, e com função na síntese de vitelogenina (AGBEDE e KEMP, 1985).

Finalmente, as vitelogênicas, descritas por Coons; Alberti (1999) seriam observadas a partir da fase de rápido ingurgitamento tendo maior desenvolvimento quando o carrapato se desprendesse do hospedeiro.

Com base nas descrições acima, fica claro que o epitélio que reveste o intestino dos carrapatos sofre modificações ao longo do processo de alimentação destes ectoparasitas, abrindo a possibilidade de classificar as células segundo o olhar de cada autor. Sonenshine (1991), por exemplo, separou os períodos de alimentação nas seguintes fases: a) jejum; b) preparatória; c) alimentação lenta (fase de crescimento); d) alimentação rápida (rápido ingurgitamento) e e) pós alimentação. Já Coons et al. (1986) não mencionaram a fase preparatória e dividiram o período de pós alimentação em duas fases: de pré oviposição e de oviposição.

Diante da diversidade de classificações dos tipos celulares, no presente estudo os autores tomaram como base aquelas realizadas por Caperucci et al. (2010).

Embora haja muita controvérsia com relação à morfologia, o intestino dos carrapatos tem sido foco de estudos nas pesquisas relacionadas com controle, principalmente referente ao desenvolvimento de vacinas, já que estas são obtidas a partir de proteínas intestinais específicas, como a Bm86 (LIYOU et al., 1996; KONGSUWAN et al., 2010).

A prática de se realizar o controle de carrapatos com acaricidas teve início na década de 50 e de lá até os dias atuais foram utilizados seqüencialmente produtos com bases químicas em compostos arsenicais, organoclorados, organofosforados, carbamatos, formamidinas e piretróides. Atualmente, os três grupos químicos de acaricidas disponíveis no mercado são as formamidinas, os piretróides e as avermectinas (LEAL et al., 2003; FREITAS et al., 2007). A troca dos princípios ativos tem sido uma necessidade constante e uma alternativa, devido ao surgimento de diversos mecanismos de resistência desenvolvidos pelos carrapatos como estratégia de sobrevivência (NOLAN, 1985).

Encontram-se na literatura estudos relacionados à ação desses compostos químicos sintéticos em diferentes órgãos de carrapatos, como a permetrina e o fipronil em ovários e glândulas salivares (OLIVEIRA et al., 2008b; PEREIRA et al., 2009; ROMA et al., 2011), bem como da ivermectina no tegumento e na musculatura dorsoventral (MONTASSER; AMIN, 2010). Entretanto trabalhos relacionados à ação dos diferentes agentes químicos no intestino ainda são escassos.

As avermectinas são importantes anti-parasitários devido ao seu amplo espectro de atividade, à alta eficiência, à margem de segurança favorável e ao único mecanismo de ação, provocando a paralisia muscular (NOVOTNY et al., 2000). Essa paralisia ocorre por meio da

interação das avermectinas com os receptores de GABA (ácido gama-amino butírico) e glicina, o que provoca a abertura dos canais de íons cloreto da membrana celular do sistema nervoso periférico, aumentando a permeabilidade do mesmo, o que provoca uma desestruturação no potencial de ação de toda membrana celular, inibindo, portanto, o impulso nervoso (DANAHER et al., 2006).

A selamectina, uma subclasse das avermectinas, é uma lactona macrocíclica muito utilizada nos acaricidas para cães e gatos domésticos, mostrando-se eficiente quanto ao resultado desejado (KRAUTMANN e al., 2000; NOVOTNY et al., 2000).

Porém, apesar de se conhecer a ação bioquímica no sistema nervoso dos carrapatos, e de haver muitos trabalhos relacionados à efetividade do medicamento quanto à morte do ectoparasita, pesquisas referentes à atuação da selamectina no intestino destes indivíduos e às alterações morfológicas que este provoca nas células são inexistentes na literatura.

# *Objetivos*

---

## 2. OBJETIVOS

Desta forma, com base nas informações anteriormente apresentadas sobre a grande utilização da selamectina como acaricida para cães e gatos domésticos, o presente estudo teve por objetivos:

a) Avaliar a eficácia da selamectina (princípio ativo do acaricida Revolution<sup>®</sup>, Pfizer) em fêmeas ingurgitadas de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* por meio do desenvolvimento de um protocolo para determinação da **CL<sub>50</sub>** (concentração 50% letal) e intervalo de confiança a 95%;

b) Descrever as alterações morfofisiológicas (histologia e histoquímica) no epitélio intestinal de fêmeas de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* alimentadas por 48 horas em hospedeiros expostos às concentrações de 50% e 80% do produto comercial, por meio da aplicação tópica do produto.

# *Material e Métodos*

---

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAL

##### 3.1.1 Selamectina

Para a realização deste estudo utilizou-se o princípio ativo do antiparasitário Revolution® 12%, produzido pela Pfizer Saúde Animal (Guarulhos, São Paulo, Brazil), como fonte de selamectina (C<sub>43</sub>H<sub>63</sub>NO<sub>11</sub>, CAS n°: 220119-17-5).

##### 3.1.2 Carrapatos

As fêmeas de *R. sanguineus*, utilizadas nesse estudo foram provenientes da colônia mantida pelo Brazilian Central of Studies on Ticks Morphology (BCSTM), da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), *campus* de Rio Claro, SP, Brasil, mantidas sob condições controladas (80% de umidade, à 28°C e fotoperíodo de 12h) em estufa BOD.

##### 3.1.3 Hospedeiros

Neste trabalho foram utilizados coelhos New Zealand White provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), *campus* de Botucatu, SP, Brasil, com peso médio de 3,0 Kg cada indivíduo. A confecção e fixação das câmaras alimentadoras nos hospedeiros, bem como a liberação dos carrapatos nas mesmas ocorreram de acordo com os procedimentos descritos por Bechara et al. (1995).

Para os testes para determinação da CL<sub>50</sub>, foram utilizados um total de 12 coelhos dos quais foram coletadas fêmeas ingurgitadas para realização do teste de imersão de adultos (TIA), descrito no item a seguir.

Para realização das análises histológica e histoquímica do intestino das fêmeas de *R. sanguineus* foram utilizados 3 coelhos separados em 3 grupos (1 indivíduo/grupo). No Grupo Controle (GC) aplicou-se no dorso do hospedeiro apenas água destilada; no Grupo Tratamento I (TI) e no Grupo Tratamento II (TII), aplicou-se a selamectina diluída a 50% e a

80%, respectivamente. Tais concentrações foram aplicadas 14h após a fixação dos carrapatos nos hospedeiros.

Esse projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética No Uso de Animal (CEUA), UNESP, campus Rio Claro, protocolo nº 3727, Decisão CEUA nº012/2010.

## **3.2 MÉTODOS**

### **3.2.1 Teste de Imersão de Adultos (TIA) em Selamectina**

Para determinação da CL<sub>50</sub> da selamectina em fêmeas ingurgitadas de *R. sanguineus* realizou-se o Teste de Imersão de Adultos através dos bioensaios descritos a seguir, com posterior análise estatística.

#### **3.2.1.1 Bioensaio 1**

Para determinação do intervalo de mortalidade, um primeiro teste foi realizado com as concentrações de 89 e 448 ppm. Os valores iniciais de concentração foram obtidos diluindo-se uma ampola de 0.25mL (30mg de selamectina/mL) do antiparasitário em água destilada. Foram utilizados dois grupos com 12 fêmeas ingurgitadas em cada concentração, totalizando 24 indivíduos/concentração. O total utilizado nesse bioensaio foi de 48 fêmeas.

Antes da imersão no produto químico, os carrapatos foram lavados em água destilada e secos em papel macio absorvente. Em seguida, cada grupo de 12 fêmeas foi imerso na concentração a ser testada, por 5 minutos. O mesmo procedimento foi realizado no grupo controle, onde a imersão ocorreu apenas em água destilada. Após os 5 minutos, os carrapatos foram secos em papel macio, colocados em placas de Petri que foram identificadas e cobertas com filme plástico com pequenos orifícios para ventilação, onde os carrapatos permaneceram por um período de 7 dias em estufa BOD (28 ±1°C, 80% de umidade e fotoperíodo de 12h), período este estabelecido por Oliveira et al. (2008b) uma vez que o efeito do acaricida não é imediato, levando um tempo maior para começar a interferir na fisiologia do carrapato. A ação deste acaricida, bem como a mortalidade dos ectoparasitas, foi calculada considerando-se vivas apenas as fêmeas que mantiveram a capacidade de locomoção.

### **3.2.1.2 Bioensaio 2**

Com base nos resultados obtidos no bioensaio 1, um segundo teste de imersão foi realizado com as concentrações de 526, 341.9, 179.9, 85.4, 42.7 e 21.4 ppm, seguindo os mesmos procedimentos do bioensaio 1. Neste segundo teste foram utilizados dois grupos com 10 fêmeas ingurgitadas em cada concentração, totalizando 20 indivíduos/concentração. O total de indivíduos utilizados nesse bioensaio foi de 140 fêmeas.

### **3.2.1.3 Bioensaio 3**

De acordo com os dados obtidos no bioensaio 2, novas concentrações foram estabelecidas para a realização do bioensaio 3 (800, 400, 200, 100 e 50 ppm), que seguiram os mesmos procedimentos anteriormente descritos. Para cada concentração foram utilizados dois grupos com 7 carrapatos, totalizando 14 indivíduos /concentração. O total utilizado nesse bioensaio foi de 84 fêmeas.

### **3.2.1.4 Teste Estatístico**

Na análise de Probit utilizada para determinação  $CL_{50}$ , a resposta deve ser binária, e o estímulo é uma variável explanatória. No presente estudo, a resposta binária foi a morte ou a sobrevivência das fêmeas ingurgitadas de *R. sanguineus* e a variável, as diferentes concentrações de selamectina.

Para a análise de Probit utilizou-se o software Polo-PC (LeOra software, 1987) para o cálculo da  $CL_{50}$ , da selamectina em fêmeas ingurgitadas de *R. sanguineus* baseado no intervalo de mortalidade obtido através da realização do bioensaio 3.

## **3.2.2 Intestino de Carrapatos**

Os carrapatos alimentados por 48 horas nos hospedeiros dos grupos (GC, TI e TII) foram removidos, anestesiados a frio (choque térmico) e dissecados em placas de Petri contendo solução fisiológica tamponada com fosfato-PBS (NaCl 7.5 g/L,  $Na_2HPO_4$  2.38 g/L e  $KH_2PO_4$  2.72 g/L) para coleta dos intestinos.

Os intestinos foram fixados por 24 horas em paraformaldeído 4%, para coloração com hematoxilina e eosina (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983) e para técnica do azul de bromofenol (PEARSE, 1985), foram fixados em mistura aquosa de Bouin para técnica do PAS (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983). Logo após, o material foi transferido para o 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 com espessura de 3  $\mu$ m.

### **3.2.3 Histologia**

As lâminas contendo as secções do intestino dos grupos de tratamento e do controle foram coradas pela hematoxilina durante 10 minutos. Depois de reagir com água por 5 minutos, foram lavadas em água corrente. Em seguida foram coradas com eosina aquosa durante 10 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 Entellan e recobertas com lamínula.

As lâminas permanentes foram examinadas, analisadas e fotografadas em microscópio de luz Leica DME/DFC280.

### **3.2.4 Histoquímica**

As técnicas histoquímicas foram realizadas para detecção de proteínas (técnica do azul de bromofenol) e polissacarídeos (técnica do PAS).

#### **3.2.4.1 Técnica do azul de bromofenol (PEARSE, 1985)**

As lâminas foram coradas com azul de bromofenol por uma hora e meia em temperatura ambiente. Posteriormente foram lavadas com ácido acético 0.5% por 5 minutos e em água corrente por 15 minutos e, depois de secas, foram montadas com Entellan.

### **3.2.4.3 Técnica do PAS (Ácido Periódico Schiff) (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983)**

As lâminas foram imersas em ácido periódico 0.4% por 10 minutos, lavadas em água destilada e coradas com reagente de Schiff por 1 hora no escuro. Em seguida, foram lavadas 3 vezes em água sulfurosa por 1 minuto cada banho. Após lavagem por 30 minutos em água corrente, as lâminas foram secas em temperatura ambiente e depois foram montadas com Entellan.

# *Resultados*

---

#### 4. RESULTADOS

Os resultados obtidos na presente dissertação estão sendo apresentados sob a forma de dois capítulos, sendo o primeiro composto por um artigo aceito para publicação em periódico internacional especializado na área e o segundo, por um artigo que encontra-se em fase de preparação para submissão.

##### Capítulo 1:

**Situação:** Aceito para publicação

**Título do artigo:** Determination of the LC<sub>50</sub> of selamectin (active principle of the antiparasitic Revolution®, Pfizer) applied on engorged female of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae)

**Autores:** ANDREA MENDEZ ARAUJO, Gislane Cristina Roma, Marcos Aparecido Pizano, Patrícia Rosa de Oliveira, Karim Christina Scopinho Furquim, Maria Izabel Camargo-Mathias.

**Periódico:** International Journal of Acarology

##### Capítulo 2:

**Situação:** Em preparação para submissão

**Título do artigo:** Alterações morfológicas no intestino de fêmeas de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) submetidas à ação da selamectina (princípio ativo do antiparasitário Revolution®, Pfizer).

**Autores:** ANDREA MENDEZ ARAUJO, Patrícia Rosa de Oliveira, Bruno Rodrigues Sampieri, Karim Christina Scopinho Furquim, Maria Izabel Camargo-Mathias.

# *Capítulo 1*

---

**Determination of the LC50 of selamectin (active principle of the antiparasitic Revolution®, Pfizer) applied on engorged female of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae)**

Andrea Mendez Araujo<sup>1</sup>, Gislaine Cristina Roma<sup>1</sup>, Marcos Aparecido Pizano<sup>1</sup>, Karim Christina Scopinho Furquim<sup>1</sup>, Patrícia Rosa de Oliveira<sup>1</sup>, Maria Izabel Camargo - Mathias<sup>1</sup>

<sup>1</sup>UNESP, Av. 24 A, n1515, Caixa Postal 199, CEP: 13506-900, Rio Claro – SP, Brasil.

Artigo publicado no Periódico: International Journal of Acarology

**RESUMO**

Os carrapatos possuem grande importância médico-veterinária por transmitirem diversos patógenos a seus hospedeiros, inclusive ao homem, além de provocarem neles lesões cutâneas, infecções secundárias e perda de sangue. A selamectina, uma lactona macrocíclica, vem sendo utilizada como um potente antiparasitário e é comercializada no Brasil na forma do produto Revolution®, Pfizer. Devido a escassez de informações sobre a forma de atuação deste composto químico na fisiologia de carrapatos, este estudo traz uma análise do potencial tóxico da selamectina em fêmeas ingurgitadas de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus*. Para o estudo da toxicidade da selamectina realizou-se o teste de imersão de adultos (TIA), no qual os indivíduos foram expostos a diferentes concentrações do composto químico. A porcentagem de fêmeas mortas foi analisada pelo Probit para determinação da CL<sub>50</sub> (concentração letal 50%) da selamectina. Os bioensaios mostraram que carrapatos *R. sanguineus* são sensíveis ao composto químico selamectina e a CL<sub>50</sub> foi determinada no valor de 451.221 ppm. Este estudo propôs um protocolo para determinação da CL<sub>50</sub> da selamectina que poderá contribuir para futuras pesquisas relacionadas a toxicidade de outros produtos químicos utilizados no controle de carrapatos

**Palavras chave:** acaricida, tempo de exposição, teste de imersão, toxicidade, selamectina

## Determination of the LC<sub>50</sub> of selamectin (active principle of the antiparasitic Revolution<sup>®</sup>, Pfizer) applied on engorged female of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae)

Andrea Mendez Araujo<sup>a</sup>, Gislaïne Cristina Roma<sup>a</sup>, Marcos Aparecido Pizano<sup>b</sup>, Karim Christina Scopinho Furquim<sup>c</sup>, Patrícia Rosa de Oliveira<sup>a</sup> and Maria Izabel Camargo-Mathias<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Rio Claro, SP, Brazil (emails: deamend@terra.com.br; gislaineroma@hotmail.com; patyroaoliv@yahoo.com.br and micm@rc.unesp.br); <sup>b</sup>Departamento de Ecologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Rio Claro, SP, Brazil (email: mapizano@rc.unesp.br); <sup>c</sup>Departamento de Patologia Veterinária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Joticabal, Brazil (email: karimfurquim@yahoo.com.br)

(Received 11 July 2011; accepted 31 October 2011)

Ticks have great medical and veterinary importance because they transmit several pathogens to their hosts, including humans; moreover, they cause skin lesions and favour secondary infections and blood loss. Selamectin, a macrocyclic lactone, has been used as a potent antiparasitic and is commercialized in Brazil as a product called Revolution<sup>®</sup> manufactured by Pfizer Animal Health (Guarulhos, São Paulo, Brazil). There is little information on the method of action of this chemical compound on tick physiology so this study presents an analysis of the toxic potential of selamectin on engorged females of the tick *Rhipicephalus sanguineus*. For the toxicity study of selamectin, the adult immersion test was performed, in which individual ticks were exposed to different concentrations of the chemical compound. The percentage of dead females was submitted to probit analysis to determine the median lethal concentration (LC<sub>50</sub>) of selamectin. Bioassays showed that *R. sanguineus* females are sensitive to the chemical compound and the LC<sub>50</sub> was 451.221 ppm. This study proposes a protocol for determining the LC<sub>50</sub>, which will contribute to future research related to the toxicity of other chemical products that are used for tick control, as well the chemical compounds' effect on these parasites, showing that lower concentrations than those originally traded is sufficient to kill these ectoparasites, providing a better conservation to the environment and to non-target organisms.

**Keywords:** acaricide; exposure time; immersion test; toxicity; selamectin

### Introduction

Ticks are obligatory arthropod ectoparasites and have great medical and veterinary importance because they transmit several pathogenic agents to their hosts, including humans (Dantas-Torres 2010). The dog tick *Rhipicephalus sanguineus*, commonly known as brown or red tick, has a worldwide distribution and is responsible for the transmission of *Hepatozoon canis*, *Ehrlichia canis*, *Babesia vogeli*, *Rickettsia conorii* and *Rickettsia rickettsii* (Dantas-Torres and Otranto 2011), besides causing blood losses (Dantas-Torres et al. 2006) and favouring secondary infections and skin lesions (Oliveira et al. 2011).

Currently, the most widely used method to control these ectoparasites, as well as other invertebrate vectors of diseases, is by using chemical compounds (Roma et al. 2009), which have demonstrated high efficiency, especially when linked with the knowledge of the life cycle and behaviour of the ectoparasites (Fisher and Shanks 2008); nevertheless, they have great consequences on non-target organisms.

Among the chemicals currently used in the control of these ectoparasites is selamectin, a macrocyclic lactone that belongs to the avermectin group, being structurally

similar to doramectin. This compound acts in the peripheral nervous tissue of the ectoparasite, causing paralysis by opening the chloride ion channels, which entails the disruption of the membrane potential system (Novotny et al. 2000; Birke et al. 2009).

The toxicity of a chemical substance is identified by acute toxicity tests, which determine the median lethal concentration (LC<sub>50</sub>) and median lethal dose (LD<sub>50</sub>) (Garcia et al. 2005; Seidle et al. 2010). The LC<sub>50</sub> is the concentration of a chemical substance that when applied to the environment of a target population causes the death of 50% of the exposed individuals whereas the LD<sub>50</sub> is the dose of a chemical compound that is also able to cause the death of 50% of the exposed organisms (Seidle et al. 2010; Oliveira et al. 2011).

Selamectin [the active principle of Revolution<sup>®</sup>, produced by Pfizer Animal Health (Guarulhos, São Paulo, Brazil)] is widely used as an antiparasitic and has high efficacy in the control of endoparasites and ectoparasites (Jernigan et al. 2000; Novotny et al. 2000; Birke et al. 2009; Farmaki et al. 2009). This study describes for the first time the protocol of laboratory procedures to determine the LC<sub>50</sub> of this chemical compound on engorged females of the tick

\*Corresponding author.

*R. sanguineus*, using immersion tests (Roma et al. 2009; Oliveira et al. 2011).

Moreover, this study may serve as the basis for future research with other chemical products and other biological models, because it will help in the establishment of the potency of the chemical substances, contributing, therefore, to the improvement of methods of controlling pests such as ticks.

## Materials and methods

### Ticks

Engorged females of *R. sanguineus* from the colony maintained by the Brazilian Central of Studies on Ticks Morphology (BCSTM), at the Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), Campus of Rio Claro, SP, Brazil, were used in this study. The females were selected with the help of a stereomicroscope (Motic SMZ 168 TL, Hong Kong, China), and only ticks with no visible malformations or damage were considered viable. These individuals did not have previous contact with any acaricide or with the hosts used. The infestation process for the feeding of the ticks was performed in New Zealand white rabbits, according to the procedures previously described (Bechara et al. 1995).

This project was approved by the Comitê de Ética no Uso de Animal (CEUA), UNESP, Campus of Rio Claro, protocol no. 3727, Decision CEUA no.012/2010.

### Selamectin

The selamectin (C<sub>43</sub>H<sub>63</sub>NO<sub>11</sub>, CAS no.: 220119-17-5) used in the immersion tests was the compound contained in the antiparasitic Revolution<sup>®</sup> 12%, produced by Pfizer Animal Health.

### Adult immersion test

#### Bioassay 1

For determination of the mortality interval, the first test was performed with the concentrations of 89 and 448 ppm. The initial concentration values were obtained by diluting an ampoule of 0.25 mL (30 mg of selamectin/mL) of the antiparasitic in distilled water. Two groups of 12 engorged females each were used in each concentration, totalling 24 individuals per concentration. A total of 48 females were used in this bioassay.

Before immersion in the chemical product, the ticks were washed in distilled water and dried on soft paper towels. Then, each group of 12 females was immersed in the concentration to be tested for 5 minutes. The same procedure was performed for the control group, where the immersion occurred only in distilled water. After 5 minutes, the ticks were removed, dried on soft paper and placed in Petri dishes covered with plastic film with small holes for ventilation. The ticks remained in the dishes for a period of 7 days in a BOD incubator (Eletrolab EL

202, São Paulo, SP, Brazil) (28 ± 1°C, 80% humidity and photoperiod of 12 hours). This period was previously established by Oliveira et al. (2008) because the effect of the acaricides cannot be detected immediately as a longer period is required to interfere or not in the physiology of the tick.

The results of this bioassay are shown in Table 1. The action of this acaricide, as well as the mortality of these ectoparasites, was calculated considering as alive only those females that maintained locomotive ability.

#### Bioassay 2

Based on the results obtained in bioassay 1, the second immersion test was carried out with the concentrations 526, 341.9, 179.9, 85.4, 42.7 and 21.4 ppm, following the same procedures of bioassay 1. In this second test, two groups with 10 engorged females were used in each concentration, totalling 20 individuals per concentration. A total of 140 females were used.

After 7 days in the BOD incubator and based on the previously used criteria, the number of dead engorged females was counted and is given in Table 2.

Table 1. Bioassay 1.

Concentration	Total no. of individuals	No. of dead	% of dead <sup>a</sup>
448 ppm	24	17	70.8
89 ppm	24	7	29.1
Control (distilled water)	24	0	0

Notes: AIT, adult immersion test.

<sup>a</sup>Percentage of dead engorged females of *Rhipicephalus sanguineus* exposed to different concentrations of selamectin (test group) by the AIT. The individuals of the control group were immersed only in distilled water by the same procedures (AIT). Different concentrations of selamectin were obtained by diluting an ampoule of 0.25 mL (30 mg of selamectin/mL) of the antiparasitic Revolution<sup>®</sup> 12%, Pfizer, in distilled water.

Table 2. Bioassay 2.

Concentration	Total no. of individuals	No. of dead	% of dead <sup>a</sup>
526 ppm	20	15	75
341.9 ppm	20	4	20
179.9 ppm	20	4	20
85.4 ppm	20	2	10
42.7 ppm	20	1	5
21.4 ppm	20	0	0
Control (distilled water)	20	0	0

Notes: AIT, adult immersion test.

<sup>a</sup>Percentage of dead engorged females of *Rhipicephalus sanguineus* exposed to different concentrations of selamectin (test group) by the AIT. The individuals of the control group were immersed only in distilled water by the same procedures (AIT). Different concentrations of selamectin were obtained by diluting an ampoule of 0.25 mL (30 mg of selamectin/mL) of the antiparasitic Revolution<sup>®</sup> 12%, Pfizer, in distilled water.

### Bioassay 3

According to the data derived from bioassay 2, new concentrations were established for the completion of bioassay 3 (800, 400, 200, 100 and 50 ppm), which followed the same procedures previously described for the other bioassays (Table 3). For each concentration, two groups of seven individuals were used, totalling 14 individuals per concentration. A total of 84 females were used in this bioassay.

The performance of several bioassays with concentrations within a wide concentration interval was necessary to establish precise results of the LC<sub>50</sub>, because the determination of this concentration is indispensable for the establishment of a mortality interval that can vary between 0% and 100%. In this study, this interval varied between 0% and 75%. Based on these data, the probit analysis was performed.

### Probit analysis

The probit analysis was used to quantify the response of a living organism to an applied stimulus. In this analysis, the response must be binary, and the stimulus is a single explanatory variable (Haddad 1998). In this study, the binary response was the death or survival of the engorged females of *R. sanguineus* and the variable was the different concentrations of selamectin.

For the probit analysis the software POLO-PC (LeOra Software 1987) was used to calculate the LC<sub>50</sub> of selamectin on engorged females of *R. sanguineus* based on the mortality interval obtained by the performance of bioassay 3 (Table 4).

### Results

Analysing the data obtained in bioassays 1, 2 and 3, it was clearly observed that *R. sanguineus* ticks are sensitive to the chemical compound selamectin; however, the percentage of death did not assume an increasing pattern with increasing concentrations of the acaricide.

In the tests, 75% tick death was obtained at the 526 ppm concentration and mortality was 0% at the 21.4 ppm dosage

Table 3. Bioassay 3.

Concentration	Total no. of individuals	No. of dead	% of dead <sup>a</sup>
800 ppm	14	9	64
400 ppm	14	6	43
200 ppm	14	5	36
100 ppm	14	3	21
50 ppm	14	2	14
Control (distilled water)	14	0	0

Notes: AIT, adult immersion test.

<sup>a</sup>Percentage of dead engorged females of *Rhipicephalus sanguineus* exposed to different concentrations of selamectin (test group) by the AIT. The individuals of the control group were immersed only in distilled water by the same procedures (AIT). Different concentrations of selamectin were obtained by diluting an ampoule of 0.25 mL (30 mg of selamectin/mL) of the antiparasitic Revolution<sup>®</sup> 12%, Pfizer, in distilled water.

Table 4. Results of the probit analysis of bioassay 3.

Median lethal concentration (LC <sub>50</sub> )	451.2 ppm; limits 241.488–2430.426
Regression equation	$y = (-3.08 + 5) + 1.16 \log x$
<i>t</i> -Ratio (slope)	2.9606426
Slope	1.162 ± 0.392
$\chi^2$	0.2096
Estimation of the confidence interval <i>g</i> (0.95)	0.43825
Degrees of freedom	3
Heterogeneity	0.07

Notes: LC<sub>50</sub>, median lethal concentration.

The software POLO-PC was used to calculate the LC<sub>50</sub> of selamectin on engorged females of *R. sanguineus* based on the mortality interval obtained from bioassay 3.

as well as in the control group, as expected. The bioassays did not reach 100% mortality, but this does not make the results impracticable because for the establishment of LC<sub>50</sub> it is only necessary to have a mortality level in which 50% of the individuals tested are dead.

The individuals unable to move (considered dead) presented only reflexes in the legs when stimulated by the touch of a brush or tweezers; these events caused the detachment of the ectoparasite from the host and, consequently, its death. The females that remained alive, and capable of movement, roamed in the Petri dish in a slower and disoriented way in relation to those of the control group during the period of observation.

Data obtained from bioassay 3 were submitted to the probit analysis by the software POLO-PC, where an LC<sub>50</sub> of 451.221 ppm (limits 241.488–2430.426 ppm) was obtained with the regression equation  $y = (-3.08 + 5) + 1.16 \log x$  (Table 4).

### Discussion

This study presents the first results concerning the action of different concentrations of the antiparasitic Revolution<sup>®</sup> 12%, Pfizer, the active principle of which is selamectin, on engorged females of the tick *R. sanguineus*, as well as the description of laboratory procedures to determine the LC<sub>50</sub> of this chemical compound to establish its toxic potential.

Selamectin is a product that is highly effective in the control of endoparasites and ectoparasites because it has a broad action spectrum, high potency and known mechanism of action (Novotny et al. 2000). This compound causes the chloride ion channels in the cells (post-synaptic neurons) of the target organism to open; this permeability causes a significant change in the membrane potency, decreasing the transmission of the nerve impulses, which, progressively, leads to the death of the ectoparasite (Danaher et al. 2006). This information corroborates the study of Danaher et al. (2006) because many individuals exposed by them to selamectin presented only slow reflexes when stimulated by touch and had impairment of

locomotion, which began to occur in a slower and more disoriented way.

In this study the performance of different bioassays allowed us to show discrepancies in the percentages of mortality when the results were compared. These results explain the physicochemical characteristics of the active principle, which are not well established in the available literature.

One of the factors that could be interfering in the proportion of deaths of the ectoparasites would be the exposure period of the individuals to selamectin. In this sense, Roma et al. (2009) established that time would be the critical parameter in an immersion bioassay. Sabatini et al. (2001) tested ticks exposed to different periods in macrocyclic lactones and obtained increasing percentages of mortality in relation to the increasing exposure time. However, the authors verified that there were no differences when the individuals were exposed for 30 and 60 minutes. Still according to Roma et al. (2009), the exposure time would vary based on the type of chemical compound tested and its respective toxic classification. Hence, the more toxic the chemical compound, the shorter the exposure time required. Roma et al. (2009) established, for permethrin, that the immersion time for a tick should be 5 minutes because of the moderately toxic classification of this product. Oliveira et al. (2011) in another study determined the period of 2 minutes for immersion of ticks in fipronil, because this product is classified as highly toxic. In this sense, selamectin presented a toxic potential similar to permethrin and it was established here that the ideal time of immersion of ticks would be 5 minutes.

Based on the results obtained, it was inferred that the solubility of the chemical compound may also have interfered in the results of this study. According to the literature, macrocyclic lactones are not soluble in water and because of this many studies using lactones are performed diluted in ethanol + Triton X-100 and then in distilled water (Sabatini et al. 2001; Klafke et al. 2006; Perez-Cogollo et al. 2010). On the other hand, Sabatini et al. (2001) showed that for cydectin and commercial avomec (lactones) the dilution medium would not interfere in the efficacy of the chemical product, that is, the results would be practically the same for dilution in water and in ethanol + Triton X-100. For this reason and because other authors (Silva et al. 2009) found dead individuals in the control group (immersed in ethanol, hexane and ethyl acetate), the solvent used in this study was distilled water.

The data derived from bioassay 3 were submitted to the probit analysis and it was verified that the value of  $\chi^2$  (0.2096) was not significant, showing that the data had adjusted to the probit model. Hence, based on these findings, it was possible to establish the  $LC_{50}$  of selamectin on engorged females of *R. sanguineus* – 451.221 ppm.

Comparing the results with other compounds used in previous studies performed by other authors, selamectin presented a value of  $LC_{50}$  lower than that of permethrin ( $LC_{50}$  = 2062) (Roma et al. 2009), but higher than that of fipronil ( $LC_{50}$  = 9.647) (Oliveira et al. 2011), avomec

( $LC_{50}$  = 1.3 ppm) (Sabatini et al. 2001) and cydectin ( $LC_{50}$  = 0.2 ppm) (Sabatini et al. 2001), showing that this product has toxic potential slightly lower than the other two mentioned macrocyclic lactones.

This higher value of  $LC_{50}$  in comparison with other macrocyclic lactones showed that selamectin, although it should be applied in the highest concentrations to obtain a more effective control of ticks, is effective against these ectoparasites and also has the advantage of being less toxic to the host (Novotny et al. 2000) and to the environment when compared with other acaricides, because the lower the value of  $LC_{50}$  the more toxic the chemical product; besides this article shows that lower concentrations than originally traded are also lethal to the ticks.

## Conclusion

This study brought information that contributed to a better understanding of the vulnerability of engorged females of *R. sanguineus* when exposed to selamectin, as well as showed the toxic potential of this chemical compound when ticks were exposed to it by the establishment of the  $LC_{50}$ , which was 451.221 ppm. This article also shows that lower concentrations than the originally produced are enough to kill the ticks, which means less damage to the hosts and the environment. The protocol suggested is easy to perform, cheap and very efficient in toxicity study, being an important tool for the study of tick control.

## Acknowledgements

This research has been supported by CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior) and CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), where M. I. Camargo-Mathias is financially supported through research fellowships. The authors thank Bruno Rodrigues Sampiere, Paula Desjardins Brienza and Gerson Mello Souza for their technical support.

## References

- Bechara GH, Szabo MPJ, Ferreira BR, Garcia MV. 1995. *Rhipicephalus sanguineus* tick in Brazil: feeding and reproductive aspects under laboratorial conditions. Brazilian Journal of Veterinary Parasitology 4(2):61–66.
- Birke LL, Molina PE, Baker DG, Leonard ST, Marrero LJ, Johnson M, Simkin J. 2009. Comparison of selamectin and imidacloprid plus permethrin in eliminating *Leporacarus gibbus* infestation in laboratory rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). Journal of the American Association for Laboratory Animal Science 48(6):757–762.
- Danaher M, Howells LC, Crooks SRH, Cerkvenik-Flajs V, O’Keeffe M. 2006. Review of methodology for the determination of macrocyclic lactone residues in biological matrices. Journal of Chromatography B 844(2):175–203.
- Dantas-Torres F. 2010. Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. Parasites & Vectors 3(26):1–11.
- Dantas-Torres F, Figueredo LA, Brandão-Filho SP. 2006. *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae), the brown dog tick, parasitizing humans in Brazil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 39(1):64–67.
- Dantas-Torres F, Otranto D. 2011. *Rhipicephalus sanguineus* on dogs: relationships between attachment sites and tick

- developmental stages. *Experimental and Applied Acarology* 53(4):389–397.
- Farmaki R, Koutinas AF, Papazahariadou MG, Kasabalis D, Day MJ. 2009. Effectiveness of a selamectin spot-on formulation in rabbits with sarcoptic mange. *Veterinary Record* 164(14):431–432.
- Fisher MA, Shanks DJ. 2008. A review of the off-label use of selamectin (Stronghold®/Revolution®) in dogs and cats. *Acta Veterinaria Scandinavica* 50(1):46–51.
- Garcia EG, Bussacos MA, Fischer FM. 2005. Impacto da legislação no registro de agrotóxicos de maior toxicidade no Brasil. *Revista de Saúde Pública* 39(5):832–839.
- Haddad ML. 1998. Utilização do Polo-PC para análise de Probit. In: Alves SB, editor. *Controle microbiano de insetos*. Piracicaba (Brazil): Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz – FEALQ. p. 999–1013.
- Jernigan AD, McTier DL, Chieffo C, Thomas CA, Krautmann MJ, Hair JA, Young DR, Wang C, Rowan TG. 2000. Efficacy of selamectin against experimentally induced tick (*Rhipicephalus sanguineus* and *Dermacentor variabilis*) infestations on dogs. *Veterinary Parasitology* 91(3–4):359–375.
- Klafke GM, Sabatini GA, Albuquerque TA, Martins JR, Kemp DH, Miller RJ, Schumaker TTS. 2006. Larval immersion tests with ivermectin in populations of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) from State of Sao Paulo, Brazil. *Veterinary Parasitology* 142(3–4):386–390.
- LeOra Software. 1987. POLO-PC: a user's guide to probit or logit analysis. Berkeley (CA): LeOra Software.
- Novotny MJ, Krautmann MJ, Ehrhart JC, Godin CS, Evans EI, McCall JW, Sun F, Rowan TG, Jernigan AD. 2000. Safety selamectin in dogs. *Veterinary Parasitology* 91(3–4):377–391.
- Oliveira PR, Bechara GH, Camargo-Mathias MI. 2008. Evaluation of cytotoxic effects of fipronil on ovaries of semi-engorged *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) tick female. *Food and Chemical Toxicology* 46(7):2459–2465.
- Oliveira PR, Bechara GH, Denardi SE, Pizano MA, Camargo-Mathias MI. 2011. Toxicity effect of the acaricide fipronil in semi-engorged females of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): preliminary determination of the minimum lethal concentration and LC<sub>50</sub>. *Experimental Parasitology* 127(2):418–422.
- Perez-Cogollo LC, Rodriguez-Vivas RI, Ramirez-Cruz GT, Rosado-Aguilar JA. 2010. Survey of *Rhipicephalus microplus* resistance to ivermectin at cattle farms with history of macrocyclic lactones use in Yucatan, Mexico. *Veterinary Parasitology* 172(1–2):109–113.
- Roma GC, Oliveira PR, Pizano MA, Camargo-Mathias MI. 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(3):269–272.
- Sabatini GA, Kemp DH, Hughes S, Nari A, Hansen J. 2001. Tests to determine LC<sub>50</sub> and discriminating doses for macrocyclic lactones against the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Veterinary Parasitology* 95(1):53–62.
- Seidle T, Robinson S, Holmes T, Creton S, Prieto P, Scheel J, Chlebus M. 2010. Cross-sector review of drivers and available 3Rs approaches for acute systemic toxicity testing. *Toxicological Sciences* 116(2):382–396.
- Silva WC, Martins JRS, Souza HEM, Heinzen H, Cesio MV, Mato M, Albrecht F, Azevedo JL, Barros NM. 2009. Toxicity of Piper aduncum L. (Piperales: Piperaceae) from the Amazon forest for the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology* 164(2–4): 267–274.

## *Capítulo 2*

---

**Alterações morfológicas no intestino de fêmeas de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) expostas à selamectina.**

Andrea Mendez Araujo<sup>1</sup>, Patrícia Rosa de Oliveira<sup>1</sup>, Bruno Rodrigues Sampieri<sup>1</sup>, Karim Christina Scopinho Furquim<sup>1</sup>, Maria Izabel Camargo-Mathias<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>UNESP, Av. 24 A, n1515, Caixa Postal 199, CEP: 13506-900, Rio Claro – SP, Brasil.

\* Autor correspondente. Fax +55 19 35340009 E-mail: micm@rc.unesp.br (M.I.Camargo-Mathias) Tel: +55 19 35264151

**RESUMO**

Este estudo demonstrou a ação da selamectina em intestinos de fêmeas de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* com 48 horas de alimentação. Para tanto, diluiu-se o produto comercial em água destilada obtendo-se concentrações de 50% e 80%. Essas diluições foram aplicadas no dorso dos hospedeiros (“pour on”) dos grupos tratamento I e II (TI e TII), respectivamente. No grupo controle aplicou-se somente água destilada. A selamectina provocou estratificação e desorganização do epitélio intestinal, alterando a morfologia das células generativas e digestivas, induzindo-as à morte. No grupo TI (50%) as células generativas apresentaram aumento da atividade mitótica para provável reposição celular em resposta à agressão do produto. No grupo TII (80%) as mitoses não foram detectadas, porém observou-se um grande acúmulo de células digestivas no lúmen do intestino, contendo granulações amarronzadas, possivelmente resultantes do processo de oxidação das mesmas. Observou-se mais células digestivas no lúmen do intestino do grupo TII as quais se desprenderam da membrana basal, provavelmente para retirar o composto químico do sistema do carrapato (detoxificação). O comprometimento das células generativas (morte celular) afetou a reposição celular do epitélio (formação de novas células digestivas), o que prejudicou a digestão do sangue, o processo de alimentação e o conseqüente desenvolvimento do carrapato. Além disso, este estudo mostrou que concentrações menores que aquela indicada pelos fabricantes do produto comercial já foram suficientes para causar alterações celulares drásticas inibindo a viabilidade dos carrapatos expostos.

**Palavras chave:** ixodídeos, diluição, células intestinais, morte celular, digestão.

## **1. INTRODUÇÃO**

Dentre os artrópodes, os carrapatos constituem um dos mais importantes grupos do ponto de vista médico e veterinário, pois são responsáveis pela transmissão de agentes patogênicos a seus hospedeiros, inclusive para o homem (DANTAS-TORRES, 2010).

O intestino dos carrapatos é o órgão responsável por realizar a digestão do sangue, que nesses animais é preferencialmente intracelular. Este órgão digere a hemoglobina e libera o seu grupo prostético, o grupo heme, que se acumula em organelas denominadas hemossomos, ou anteriormente chamada de hematina ou ainda de corpos residuais (LARA et al., 2003). Esses grupos heme são necessários à sobrevivência dos carrapatos, assim como de outros artrópodes hematófagos, pois além de participarem de diversas reações bioquímicas essenciais, são também enviados aos ovócitos para participar da vitelogênese constituindo-se, assim, fonte de aminoácidos e de energia para o desenvolvimento do embrião (O'HAGAN, 1974; LARA et al., 2003; GRAÇA-SOUZA et al., 2006; ESTRELA et al., 2010).

Somando-se a isso, o intestino dos carrapatos é um local onde se alojam e se desenvolvem diversos patógenos os quais serão oportunamente transmitidos aos hospedeiros (AGBEDE; KEMP, 1985; AGYEI; RUNHAM, 1995).

Segundo a visão de diversos estudiosos a descrição morfológica do intestino dos carrapatos é controversa, visto que cada um tem um critério próprio para estabelecer quais são os tipos celulares encontrados, porém as descrições realizadas têm sugerido que, na verdade, a grande variação seria apenas na identificação de diferentes estágios fisiológicos de um mesmo tipo celular. Desta forma, três tipos celulares básicos (generativas, digestivas e secretoras) seriam encontrados no intestino. Nos indivíduos em jejum que se fixam no hospedeiro, e aí terão seu primeiro contato com o sangue, as células generativas, as quais formam um epitélio simples, ou pseudoestratificado (CAPERUCCI et al., 2009), se diferenciam em digestivas e secretoras. As células digestivas terão a função de absorção do sangue (por endocitose) que se acumulará em endossomos para posteriormente ser digerido via fusão destes com vesículas lisossomais. Conforme a digestão vai ocorrendo, resíduos do processo digestivo vão gradativamente se acumulando no citoplasma até que sejam liberados por meio de exocitose, lise da célula ou desprendimento da própria célula da membrana basal, permanecendo, depois disso, livres no lúmen (AGBEDE; KEMP, 1985; COONS et al., 1986; WALKER; FLETCHER, 1987; SONENSHINE, 1991; AGYEI; RUNHAM, 1995; COONS; ALBERTI, 1999; CAPERUCCI et al., 2009).

O uso de acaricidas sintéticos é atualmente muito empregado como método de controle da população de carrapatos e, por este motivo a troca dos seus princípios ativos torna-se uma necessidade constante devido ao surgimento de diversos mecanismos de resistência desenvolvidos pelos carrapatos como estratégia de sobrevivência (NOLAN, 1985).

A selamectina, uma lactona macrocíclica pertencente ao grupo das avermectinas, é utilizada no controle de endo e de ectoparasitas (DANAHER et al., 2006) sendo o Revolution®, produto produzido pela Pfizer, uma das formas comerciais deste composto químico. A literatura registra que a selamectina atua no sistema nervoso dos carrapatos impedindo a transmissão de impulsos nervosos, o que provoca paralisia muscular levando, portanto, o indivíduo à morte (PIPANO, 2003; DANAHER et al., 2006; DELAYTE et al., 2006), porém, estudos relacionados à ação da selamectina em outros órgãos vitais desses ectoparasitas são escassos na literatura. Desta forma, este trabalho teve por objetivo analisar as alterações que concentrações de 50% e 80% da selamectina contida no produto comercial provoca nas células do intestino de fêmeas de carrapatos *R. sanguineus*, com 48h de alimentação.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 MATERIAL**

#### **2.1.1 Carrapatos**

As fêmeas de *Rhipicephalus sanguineus* utilizadas nesse estudo foram provenientes da colônia mantida pelo grupo Brazilian Central of Studies on Ticks Morphology (BCSTM), da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), campus de Rio Claro, SP, Brasil, mantidas sob condições controladas (80% de umidade, à 28°C e fotoperíodo de 12h) em estufa BOD.

#### **2.1.2 Selamectina**

A selamectina (C<sub>43</sub>H<sub>63</sub>NO<sub>11</sub>, CAS nº: 220119-17-5) utilizada para realização deste estudo foi obtida a partir do antiparasitário Revolution® 12%, para animais pesando de 2.6 a 5.0 Kg. Assim, uma ampola de 0.25mL (120mg de selamectina/mL) do antiparasitário foi

adicionada em água destilada para obtenção das diluições de 50% e 80%. Essas diluições foram aplicadas no dorso dos hospedeiros virgens de infestação dos grupos tratamento I e II (TI eTII), respectivamente, na região anterodorsal (aplicação tópica).

### **2.1.3 Hospedeiros**

Para realização deste trabalho foram utilizados 3 coelhos New Zealand White provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), campus de Botucatu, SP, Brasil, pesando, em média, 3.0 Kg cada. Os coelhos foram separados em 3 grupos (1 indivíduo/grupo). No Grupo Controle (GC) aplicou-se no dorso do hospedeiro apenas água destilada, no Grupo Tratamento I (TI) e no Grupo Tratamento II (TII), aplicou-se a selamectina nas diluições de 50% e a 80%, respectivamente.

### **2.1.4 Infestação**

Em cada hospedeiro foram liberados 25 casais de carrapatos/câmara alimentadora, que foi confeccionada e fixada segundo a descrição de Bechara et al., (1995). Após a fixação dos ectoparasitas aplicou-se a água destilada e as diluições da selamectina conforme os procedimentos descritos anteriormente. Ao completar 48h de alimentação as fêmeas de carrapatos foram removidas, anestesiadas por choque térmico e dissecadas em solução fisiológica (NaCl 7.5 g/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.38 g/L e KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.72 g/L) para remoção do intestino.

Esse trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética No Uso de Animal (CEUA), UNESP, campus Rio Claro, protocolo nº 3727, Decisão CEUA nº012/2010.

## **2.2 MÉTODOS**

Os intestinos de 5 fêmeas de cada uma das situações de estudo foram removidos e fixados por 24 horas em paraformaldeído 4%, para coloração com hematoxilina e eosina (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983) e para técnica do azul de bromofenol (PEARSE, 1985). Para técnica do PAS, os mesmos foram fixados em mistura Bouin aquoso (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983). Logo após a fixação, o material foi transferido para o 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 com espessura de 3  $\mu\text{m}$ .

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Grupo Controle (GC)

Os resultados obtidos demonstraram que nos indivíduos do **GC** o intestino está revestido externamente por uma fina camada muscular e internamente por epitélio simples cúbico a colunar, o qual encontra-se apoiado em uma membrana basal (Fig. 1 A–C; 2 A, B). Neste epitélio são encontradas as células generativas, as quais darão origem às digestivas (Fig. 1 A–C). As células generativas apresentam núcleo arredondado, com cromatina condensada e citoplasma basófilo (Fig. 1 A), reagindo fortemente quando submetido ao azul de bromofenol (Fig. 2 A) e ainda apresentando granulações moderadamente positivas para o PAS (Fig. 2 B) (Tabela 1). São também observadas figuras mitóticas na camada de células generativas (Fig. 2 A).

As células digestivas, originárias das generativas, apresentam diferenças morfológicas à medida que a digestão ocorre (Fig. 1 C). Estas células irão se destacar do epitélio, aumentando de tamanho, projetando-se para o lúmen intestinal e posteriormente destacando-se da membrana basal (Figs. 1 C; 2 A). Na histologia, estas células apresentam o citoplasma repleto de grânulos basófilos e o seu limite celular torna-se mais evidente. A análise histoquímica detectou que o conteúdo citoplasmático destas células apresenta variação na intensidade de marcação pelo azul de bromofenol, a qual ocorre desde fortemente positiva até negativa à técnica (Fig. 2 A). É observada também escassa granulação que reage fraca ou moderadamente ao PAS (Fig. 2 B) (Tabela 1).

No lúmen do intestino, além de células digestivas destacadas da membrana basal, também encontram-se fragmentos de núcleos (Fig. 1 B, C).

### 3.2 Grupo Tratamento I (TI – 50%).

Neste grupo o epitélio intestinal começa a sofrer estratificação acompanhada de desorganização, antes não observadas nos indivíduos do grupo **GC** (Fig. 1 D-F). Nota-se também que a membrana basal que sustenta o epitélio destaca-se do mesmo formando um grande espaço vazio (Fig. 1 D, E).

As células generativas, na maioria cúbicas, apresentam vacuolização citoplasmática e núcleos variando de menos condensados a picnóticos (Fig. 1 D-F). Os limites celulares já não são tão evidentes, principalmente nas células generativas. O citoplasma destas células apresenta diminuição na intensidade de marcação para o azul de bromofenol em relação ao grupo **GC**, se tornando medianamente positivo a esta técnica (Fig. 2 C). No entanto, este teste deixa clara a presença de núcleos picnóticos. Também é observada maior marcação para o PAS na granulação citoplasmática (Fig. 2 D) (Tabela 1). Neste grupo são encontradas figuras mitóticas com maior frequência do que no grupo anterior (Fig. 2 C).

Nas células digestivas observa-se vacuolização citoplasmática e nota-se que as mesmas mantêm o padrão de marcação para proteínas descrito para o grupo **GC** (Fig. 2 C). Nestas células também são observados grânulos citoplasmáticos que reagem moderadamente ao PAS (Fig. 2 D) (Tabela 1). Além disso, observam-se células digestivas parcial ou totalmente preenchidas por granulação amarelada/amarronzada (Fig. 2 C).

### 3.3 Grupo Tratamento II (TII – 80%).

Neste grupo o epitélio intestinal é simples (Fig. 1 G-I), sendo que a membrana basal também encontra-se destacada, deixando espaços vazios (Fig. 1 I).

As células generativas com núcleos mais condensados são mais frequentes quando comparadas ao grupo **TI** (Fig. 1 H). Intensa vacuolização ao redor do núcleo fica aparente. O citoplasma reage fracamente à técnica do azul de bromofenol, ou seja, a marcação para proteínas é menos intensa do que aquelas dos grupos **GC** e **TI** (Fig. 2 E). Além disso, nestas células são observados grânulos fracamente positivos para o PAS, quando comparados com os dois grupos anteriores (**GC** e **TI**) (Fig. F) (Tabela 1). Figuras mitóticas não são observadas nesse grupo de tratamento.

As células digestivas apresentam vacuolizações citoplasmáticas (Fig. 1 I), granulações fracamente positivas para o bromofenol (Fig. 2 E) e fortemente positivas para o PAS (Fig. 2 F), o que não é observado no grupo **CG** (Fig. 2 F) (Tabela 1). As células já destacadas da membrana basal (ou presentes no lúmen do intestino) apresentam numerosos grânulos amorfos de cor amarronzada (Fig. 1 G; 2 E).

**Tabela 1:** Resultados da marcação histoquímica nas células do intestino de fêmeas de *Rhipicephalus sanguineus* alimentadas por 48 horas em hospedeiros tratados com selamectina.

Técnica	Grupos	Células generativas	Células digestivas
<b>Azul de Bromofenol</b>	GC	+++	-/+ /+++ /+++
	TI (50%)	++	-/+ /+++ /+++
	TII(80%)	+	+
<b>PAS</b>	GC	+++	+ /++
	TI(50%)	+++	++
	TII (80%)	+	+++

**GC** = Grupo Controle, **TI(50%)** = Grupo tratamento exposto à concentração de 50% de selamectina, **TII(80%)** = Grupo tratamento exposto à concentração de 80% de selamectina; (-) negativo; (+) fracamente positivo; (++) moderadamente positivo; (+++) fortemente positivo;

#### 4. DISCUSSÃO

O presente trabalho avaliou morfo-histoquimicamente o intestino de fêmeas de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* alimentadas por 48 horas em hospedeiros expostos a diferentes concentrações (50% e 80%) da selamectina presente no produto comercial, o antiparasitário Revolution®, Pfizer, e mostrou as alterações sofridas pelo órgão frente à exposição a um produto tóxico, deixando claro que, ao contrário do que é relatado na literatura, sua ação não é exclusivamente neurotóxica (DANAHER et al., 2006).

As diluições de 50% e de 80% foram assim determinadas a fim de se verificar a ação de uma concentração mediana e de uma mais elevada, porém esta menor que 100% (produto comercial), pois os carrapatos deveriam permanecer vivos para a análise dos efeitos do composto químico no intestino. Quanto ao período de alimentação aqui estudado (48 horas), este foi determinado para assegurar que o processo de digestão já estivesse ocorrendo, pois de

acordo com Sonenshine (1991), nos carrapatos, somente após 36 horas de alimentação é que dar-se-ia início à digestão.

A partir dos dados aqui obtidos verificou-se no grupo controle (**GC**) que o intestino das fêmeas com 48 horas de alimentação apresentou grande complexidade morfofuncional, corroborando as informações disponíveis na literatura a respeito deste órgão. De acordo com Agbede, Kemp, (1985); Walker, Fletcher, (1987); Sonenshine, (1991); Agyei, Runham, (1995), Caperucci et al. (2010), as células do intestino de carrapatos apresentam grandes modificações ao longo do processo de alimentação até o momento da postura dos ovos.

Segundo a literatura, e de modo geral, o intestino dos carrapatos é composto por três tipos de células: a) generativas; b) secretoras e c) digestivas (AGBEDE; KEMP, 1985; WALKER; FLETCHER, 1987; SONENSHINE, 1991; AGYEI; RUNHAM, 1995; COONS; ALBERTI, 1999; CAPERUCCI et al., 2010). Contudo, verificou-se neste estudo que o intestino das fêmeas de *R. sanguineus* com 48 horas de alimentação apresenta somente as células generativas e as digestivas, as quais de acordo com a literatura são comumente encontradas nesse período da alimentação (SONENSHINE, 1991; AGYEI; RUNHAM, 1995, COONS; ALBERTI, 1999).

Os dados histológicos aqui obtidos demonstraram que a exposição das fêmeas de *R. sanguineus* à ambas as concentrações de selamectina (50% e 80% do produto comercial) provocou alterações no epitélio intestinal, variações estas que compreenderam desde a mudança de um epitélio simples para um estratificado e incluiu, também, a desorganização do arranjo celular, passando pelo descolamento da membrana basal do epitélio, resultando no surgimento de um grande espaço vazio, o que provavelmente interferiu na fisiologia do órgão, uma vez que esta barreira protetora à entrada de produtos tóxicos deixou de existir no local.

Os resultados histoquímicos referentes à marcação de polissacarídeos mostraram que este aumentou nas células generativas dos indivíduos do grupo **TI** e diminuiu no grupo **III**. Isso provavelmente ocorreu no grupo **TI** devido à intensa atividade mitótica das células generativas, processo que requereu grande demanda energética, e que pode ser obtida a partir da utilização de pólissacarídeos. Ao contrário disso, nas células generativas no grupo **III** a atividade mitótica foi praticamente ausente, justificando a menor demanda de polissacarídeos (energia).

As alterações celulares aqui detectadas ocorreram tanto nas células generativas quanto nas digestivas e caracterizaram a ocorrência de processos de morte destas células, com sintomas como: a) intensa vacuolização citoplasmática, b) picnose e fragmentação nuclear, c) rompimento das células e d) desprendimento das células da membrana basal, bem como o desprendimento da membrana basal do próprio epitélio. Além disso, foi observado no lúmen do intestino acúmulo de estruturas esféricas envoltas por membranas, contendo material amorfo de coloração escura, sugerindo serem as próprias células digestivas ou, ainda, fragmentos destas. O acúmulo de material no seu interior provavelmente caracterizaria a presença de hemossomos, estruturas de coloração castanho-escuro (AGBEDE; KEMP, 1985; WALKER; FLETCHER, 1987; SONENSHINE, 1991; AGYEI; RUNHAM, 1995; COONS; ALBERTI, 1999) resultantes do processo da digestão do sangue.

Ainda quanto às alterações acima apresentadas, ficou claro que as mesmas caracterizaram a ocorrência de dois tipos de morte celular: a autofágica, com a ocorrência de vacuolizações citoplasmáticas (LOCKSHIN; ZAKERI, 1996), e a apoptótica, caracterizada pela presença de núcleos picnóticos, perda de especialização da membrana (descolamento da da célula da membrana basal do epitélio) e formação de fragmentos nuclear e celular (HÄCKER, 2000). Contudo, com base nas análises aqui realizadas não foi possível definir qual o exato tipo de morte ou qual a forma predominante desta pela qual passam essas células quando expostas ao produto químico em questão.

Os danos provocados pela selamectina nas células generativas provavelmente interferiram na produção de novas células digestivas necessárias para os processos de digestão do sangue. A redução das divisões mitóticas, com conseqüente inibição da produção das células digestivas, inibiram também os processos digestivos, o que impediu o armazenamento dos elementos nutritivos do sangue, necessários para a nutrição do ectoparasita, bem como para formação de elementos vitelínicos essenciais para o desenvolvimento das células germinativas (ovócitos) e, afetando finalmente a formação dos novos indivíduos (ESTRELA et al., 2010).

Os resultados observados nos indivíduos do grupo **TI** revelaram que a selamectina na concentração de 50% foi suficientemente tóxica para alterar a morfologia do intestino, contudo este ainda respondeu à agressão repondo com maior velocidade as células digestivas, por meio de um aumento das divisões mitóticas das células generativas, divisões estas que não foram observadas com muita freqüência no grupo controle (**GC**). Nestas células

generativas, ainda verificou-se intensa marcação para polissacarídeos, os quais provavelmente estariam sendo utilizados como fonte de energia para suprir a elevada demanda energética, em função da elevada atividade metabólica dos processos de divisão celular e de desintoxicação do produto.

Nas células do intestino dos indivíduos do grupo **III**, verificou-se que a selamectina na concentração de 80% foi extremamente tóxica, provocando no epitélio intestinal, a perda da capacidade de repor as células digestivas (que foram morrendo, ou desprendendo), uma vez que raramente foram observadas diferenciação de células generativas em digestivas, e divisões celulares no estrato generativo.

Ainda no grupo **III**, verificou-se maior acúmulo de células digestivas ou fragmentos delas no lúmen do intestino. Este acúmulo ocorreu com maior intensidade nos indivíduos do grupo **III**, menor nos **II** e pouco no **GC**. Isso poderia ser explicado pelos processos de oxidação dos resíduos da digestão do sangue (grupo heme), que neste caso teria sido mais intenso nas células digestivas do grupo **III** do que nos grupos **GC** e **II**, visto que as alterações morfológicas causadas pelo produto na concentração de 80% comprometeu os movimentos peristálticos do intestino dos indivíduos. Nesse sentido, a redução ou ausência de movimentos peristálticos paralisaria todo o conteúdo luminal rico em células digestivas/fragmentos de células digestivas contendo hemossomos citoplasmáticos, o que na histologia seria visto desta forma.

As células digestivas dos indivíduos do grupo **III** apresentaram no seu interior marcação fortemente positiva para os grânulos de natureza polissacarídica, o que foi observado com menor intensidade nos grupos **II** e **GC**. Isso poderia ser devido ao fato de que de acordo com a literatura as células digestivas do epitélio intestinal dos carrapatos apresentam grânulos citoplasmáticos de natureza polissacarídica no final do processo da digestão (AGYEI; RUNHAN, 1995), o que foi aqui também observado, porém no grupo **III** o aumento na quantidade de tais grânulos provavelmente deveu-se à exposição destas células ao produto tóxico, o qual modificou a sua fisiologia alterando seu comportamento secretor quanto aos polissacarídeos, estimulando as mesmas a sintetizarem maior quantidade deste composto.

Desta maneira pode-se inferir que a selamectina afetaria a morfofisiologia do intestino, atuando não somente sobre o sistema nervoso, dado amplamente descrito na literatura (DANAHER et al., 2006, mas também afetando o processo de digestão do alimento

prejudicando a nutrição e, conseqüentemente, a sobrevivência do ectoparasita, além de comprometer o processo de vitelogenese, inviabilizando a formação de novos indivíduos. Este estudo também permite inferir que concentrações de selamectina mais baixas do que aquelas comercialmente indicadas seriam suficientes para provocarem alterações que possivelmente comprometeriam o ciclo biológico dos carrapatos, podendo ser uma ferramenta eficiente no controle da população desses ectoparasitas, causando menor produção de resíduos que venham agredir o meio ambiente e os organismos não-alvos.

**Figura 1:** Secções histológicas do intestino de fêmeas de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* alimentadas por 48h em hospedeiros expostos ao antiparasitário Revolution®, Pfizer). Coloração pela hematoxilina e eosina (HE).

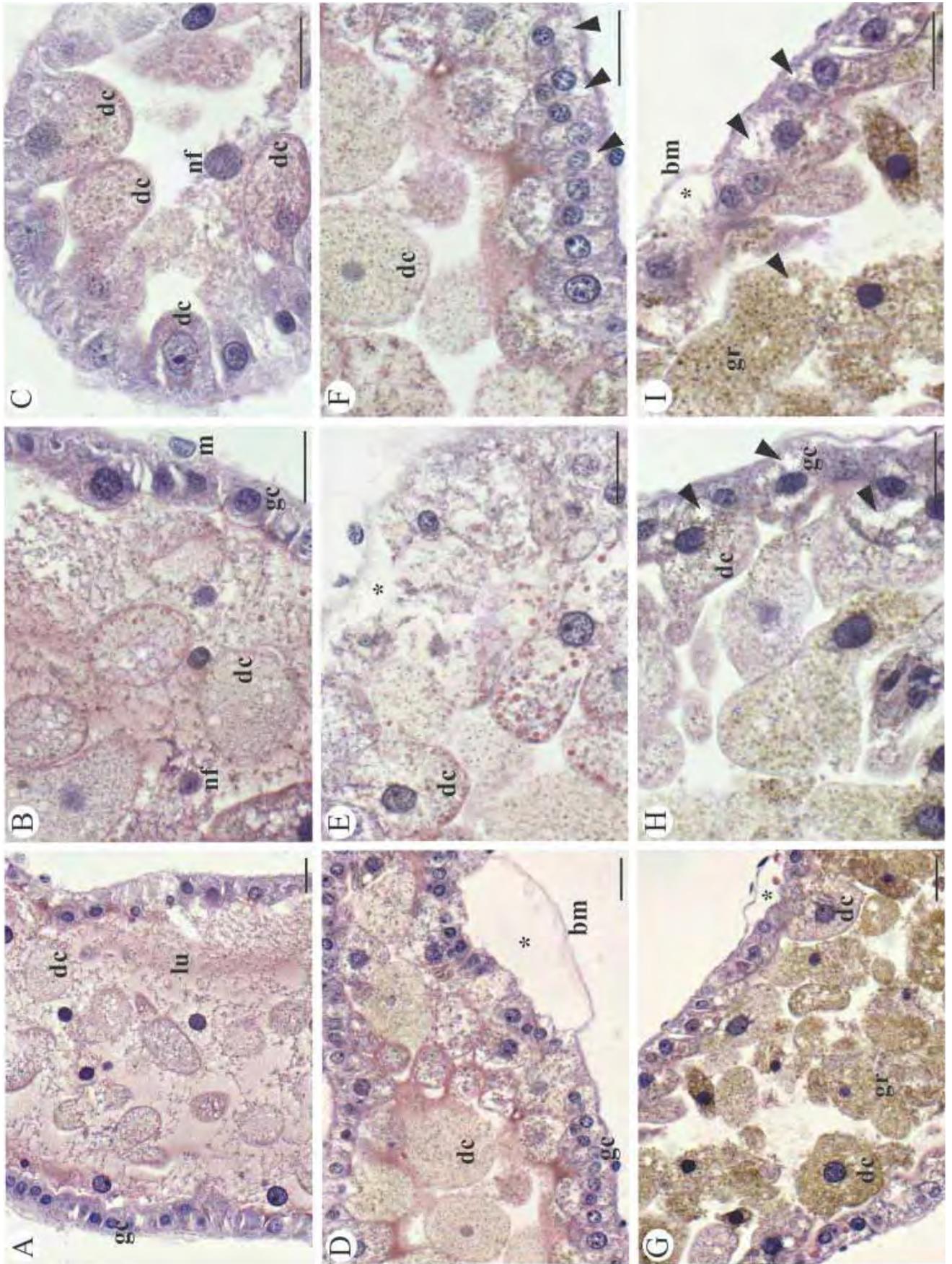
**A-C:** Grupo Controle.

**D-F:** Grupo TI (tratado com 50% da concentração comercial de selamectina).

**G-I:** Grupo TII (tratado com 80% da concentração comercial de selamectina).

**lu:** lúmen; **m:** músculo; **nf:** fragmento de núcleo; **dc:** célula digestiva; **gc:** célula generativa; **bm:** membrana basal; **gr:** granulação; **seta:** vacuolização; **\***: espaço resultante do desprendimento da membrana basal. Escala: **barra** = 20µm.

1



**Figura 2:** Secções histológicas do intestino de fêmeas de *Rhipicephalus sanguineus* alimentadas por 48h em hospedeiros expostos ao antiparasitário Revolution®, Pfizer). **A, C, E:** Técnica do azul de bromofenol; **B, D, F:** técnica do PAS.

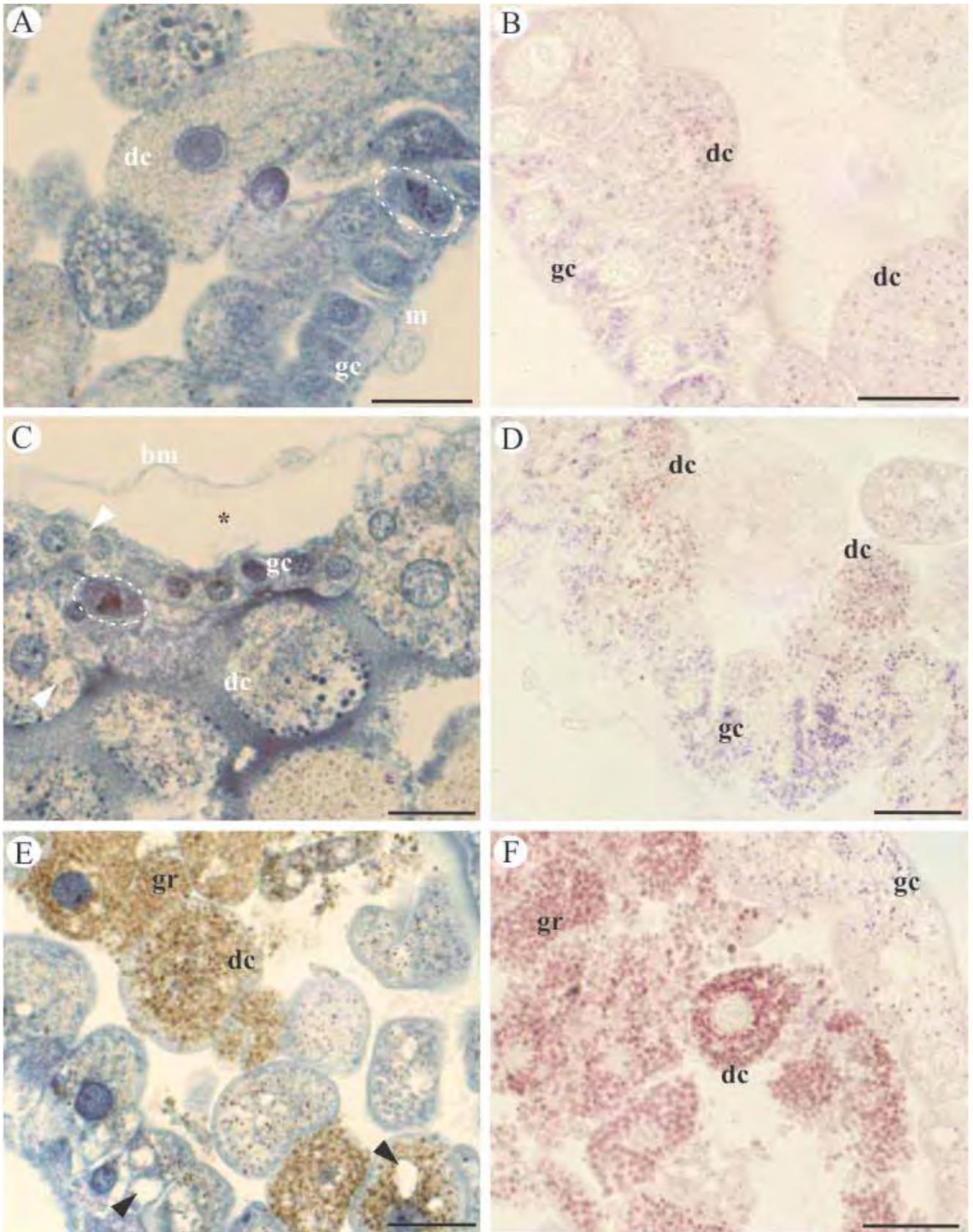
**A-B:** Grupo Controle.

**C-D:** Grupo TI (tratado com 50% da concentração comercial de selamectina).

**E-F:** Grupo TII (tratado com 80% da concentração comercial de selamectina).

**dc:** células digestivas; **gc:** células generativas; **bm:** membrana basal; **gr:** granulação citoplasmática; **seta:** vacuolização; **\***: espaço resultante do desprendimento da membrana basal; **círculo pontilhado:** divisão celular. Escala: **barra** = 20µm.

2



## 6. REFERÊNCIAS

AGBEDE, R. I.; KEMP, D. H.; Digestion in the cattle tick *Boophilus microplus*: light microscope study of the gut cells in nymphs and females. **International Journal of Parasitology**, v. 15, n. 2, p. 147-157, 1985.

AGYEI, A.D., HERBET, I.V., RUNHAM, N.W. Histochemical localisation of acid phosphatase and non-specific esterase in the midguts of two species of tick, *Boophilus microplus* and *Rhipicephalus appendiculatus*, as determined by light microscopy. **Parasitology Research**, v. 77, n. 7, p. 629-634, 1991.

AGYEI, A.D., RUNHAM, N.W., BLACKSTOCK, N. Histochemical changes in the midgut of two ixodid tick species *Boophilus microplus* and *Rhipicephalus appendiculatus* during digestion of the blood meal. **Experimental & Applied Acarology**, v. 13, n. 3, p. 187-212, 1992.

AGYEI, A.D.; RUNHAM, N.W. Studies on the morphological changes in the midgut of two ixodid tick species *Boophilus microplus* and *Rhipicephalus appendiculatus* during digestion of the blood meal. **International Journal for Parasitology**, v. 25, n. 1, p. 55-62, 1995.

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**, v. 4, n. 2, p. 61-66, 1995.

CAPERUCCI, D., CAMARGO-MATHIAS, M. I., BECHARA, G. H. Histopathology and ultrastructure features of the midgut of adult females of the tick *Amblyomma cajennense* Fabricius, 1787 (Acari: Ixodidae) in various feeding stages and submitted to three infestations. **Ultrastructural Pathology**, v. 33, n. 6, p. 249-259, 2009.

CAPERUCCI, D., CAMARGO-MATHIAS, M. I., BECHARA, G. H. Ultrastructure features of the midgut of the female adult *Amblyomma cajennense* ticks Fabricius, 1787 (Acari: Ixodidae) in several feeding stages and subjected to three infestations. *Micron*, v. 41, n. 7, p. 710-721, 2010.

Histopathology and ultrastructure features of the midgut of adult females of the tick *Amblyomma cajennense* Fabricius, 1787 (Acari: Ixodidae) in various feeding stages and submitted to three infestations. **Ultrastructural Pathology**, v. 33, n. 6, p. 249-259, 2009.

COONS, L.B., ALBERTI, G. Acari: Ticks. In: HARRISON, F.W., FOELIX, R.F. **Microscopic anatomy of invertebrates: chelicerate arthropoda**. New York: Wiley-Liss, 1999. p. 377-405.

COONS, L. B., ROSELL-DAVIS, R.; TARNOWSKI, B. I. Blood meal digestion in ticks. In: SAUER, J. R.; HAIR, A. J. (Ed.). **Morphology, physiology and behavioral biology of ticks**, Chichester: Ellis Horwood, 1986. p. 248 – 279.

DAHANER, M., HOWELLS, L.C., CROOKS, S.R.H., CERKVENIK-FLAJS V., O'KEEFFE M., Review of methodology for the determination of macrocyclic lactone residues in biological matrices. **Journal of Chromatography B**, v. 844, n. 2, 175-203, 2006.

DANTAS-TORRES, F. Biology and ecology of the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus*. **Parasites & Vectors**, v. 3, n. 26, p. 2 – 11, 2010.

DELAYTE, E.H., OTSUKA, M., LARSSON, C.E., CASTRO, R.C.C. Eficácia das lactonas macrocíclicas sistêmicas (ivermectina e moxidectina) na terapia da demodicidose canina generalizada. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 58, n. 1, p. 31-38, 2006.

ESTRELA, A.B., SEIXAS, A., TEIXEIRA, V.O.N., PINTO, A.F.M., TERMIGNONI, C. Vitellin- and hemoglobin-digesting enzymes in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* larvae and females. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**, doi:10.1016/j.cbpb.2010.08.002, 2010.

FRANTA, Z., FRANTOVÁ, H., KONVIČKOVÁ, J., HORN, M., SOJKA, D., MAREŠ, M. KOPÁČEK, P. Dynamics of digestive proteolytic system during blood feeding of the hard tick *Ixodes ricinus*. **Parasites & Vectors**, v. 3, n. 14, p. 119-130, 2010

GRAÇA-SOUZA, A.V., MAYA-MONTEIRO, C., PAIVA-SILVA, G.O., BRAZ, G.R.C., PAES, M.C., SORGINE, M.H.F., OLIVEIRA, M.F., OLIVEIRA, P.L. Adaptations against heme toxicity in blood-feeding arthropods. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.36, n. 4, p. 322 – 335, 2006.

HÄCKER, G. The morphology of apoptosis. **Cell Tissue Research**, v. 301, n. 1, p. 5-17, 2000.

JUNQUEIRA, L. C. U.; JUNQUEIRA, L. M. M. S. **Técnicas básicas de citologia e histologia**. São Paulo: Santos, 1983. 123p.

KONGSUWAN, K.; JOSH, P.; ZHU, Y.; PEARSON, R.; GOUGH, J.; COLGRAVE, M. L. Exploring the midgut proteome of partially fed cattle tick (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*). **Journal of Insect Physiology**, v. 56, n. 1, p. 212-226, 2010

LARA, F.A., LINS, U., PAIVA-SILVA, G., ALMEIDA, I.C., BRAGA, C.M., MIGUENS, F.C., OLIVEIRA, P.L., DANSA-PETRETSKI, M. A new intracellular pathway of haem detoxification in the midgut of the cattle tick *Boophilus microplus*: aggregation inside a specialized organelle, the hemosome. **The journal of Experimental Biology**, doi:10.1242/jeb.00334, p. 1707 – 1715, 2003.

LIYOU, N.; HAMILTON, S.; WATTER D. J.; TELLAM, R.; WILLADSEN, S. P. Endocytosis by Digest Cells of the Cattle Tick *Boophilus microplus*: Regulation by Protein Kinase C. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 26, n. 2, p. 147-154, 1996.

LOCKSHIN, A. R; ZAKERI, Z. **The biology of cell death and its relationship to aging**. In: HOLBROOK, N.; MARTIN, G. R.; LOCKSHIN, R. A. (Eds). Cellular Aging and Cell Death. New York: Wiley-Liss, 1996, 167-180 p.

MIZUSHIMA, N. Methods for monitoring autophagy. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 36, n. 12, p. 2491-2502. 2004.

NOLAN, J. Resistance mechanisms to chemical products in arthropods parasites of veterinarian importance. **Veterinary Parasitology**, v. 18, n. 2, p. 155-166, 1985.

O'HAGAN, J. E. *Boophilus microplus*: digestion of hemoglobins by the engorged female tick. **Experimental Parasitology**, v. 35, n. 1, p. 110-118, 1974.

OLIVEIRA, P.R.; BECHARA, G. H.; MORALES, M. A. M.; MATHIAS, M. I. C. 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. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 6, p. 1255-1264, 2008.

PEARSE, A. G. E. **Histochemistry: theoretical and applied**. 4. ed. London: Churchill, 1985. p. 530.

PIPANO, E. Recent Developments in the control of ectoparasites and endoparasites of dogs and cats with selamectin. **Israel Journal of Medicine Veterinary**. v. 58, n 2-3, 2003.

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, n. 3, p. 269-272, 2009.

SONESHINE, D. E. **Biology of Ticks**. 1. ed. New York: Oxford University Press, 1991. v. 1, p. 159–187.

STORER, T. I.; USINGER, R. L. **Zoologia Geral**. 6. ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 2000. 816p.

WALKER, A.R.; FLETCHER, J.F. Histology of digestion in nymphs of *Rhipicephalus appendiculatus* fed on rabbits and cattle naïve and resistant to the ticks. **International Journal for Parasitology**, v. 17, n. 8, p. 1393 – 1411, 1987.

# *Discussão Geral*

---

## 5. DISCUSSÃO GERAL

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram o potencial tóxico da selamectina, princípio ativo do antiparasitário Revolution®, Pfizer, sobre o intestino de fêmeas ingurgitadas de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus*, bem como as alterações morfohistoquímicas que concentrações de 50% e 80% desse composto provocaram neste órgão retirado de fêmeas alimentadas por 48 horas em hospedeiros expostos ao produto.

Neste sentido, aqui foi descrito, pela primeira vez, um protocolo para a avaliação do potencial tóxico da selamectina, bem como mostrou-se as alterações sofridas pelo intestino destes ectoparasitas quando expostos ao composto em questão, evidenciando que a ação da selamectina não é exclusivamente neurotóxica, como amplamente divulgado na literatura (DANAHER et al., 2006).

A avaliação do potencial tóxico (CL<sub>50</sub>) foi obtida por meio de bioensaios nos quais fêmeas ingurgitadas foram submersas em concentrações diferentes de selamectina (Teste de Imersão de Adultos), portanto, os efeitos provocados nos carrapatos pelo produto ocorreram devido ao contato direto deste com os ectoparasitas. Porém, esses bioensaios não simularam condições reais da utilização do antiparasitário, o qual se dá pela aplicação tópica do produto no dorso de cães e de gatos domésticos. Dessa forma, o carrapato entra em contato com o princípio ativo do produto somente quando este começa a se alimentar do sangue do hospedeiro. Por este motivo, para a análise dos efeitos da selamectina sobre o intestino de fêmeas de *R. sanguineus*, foram utilizados carrapatos alimentados em hospedeiros expostos a diferentes concentrações deste composto aplicadas via “pour on” na região anterodorsal, simulando uma situação mais próxima possível à que de fato ocorre no cotidiano.

Foram aqui estudados os efeitos das diluições de 50% e de 80% do produto comercial (Revolution® 12%) determinadas para verificar a ação de uma concentração mediana e de uma concentração mais elevada do produto sobre o intestino dos carrapatos, porém, ainda assim, menor do que aquela indicada pelo produto comercial. Quanto ao período de alimentação dos carrapatos (48 horas), este foi determinado para assegurar que a digestão já estivesse ocorrendo, pois segundo Sonenshine (1991), este processo iniciar-se-ia somente após 36 horas de alimentação.

A partir das análises realizadas neste estudo, verificou-se que o intestino das fêmeas com 48 horas de alimentação apresentaram grande complexidade morfofuncional, tendo sido

encontrando no epitélio dois tipos de células: as generativas e as digestivas, sendo que esta última tem origem a partir das primeiras e se modificam a medida que o processo de digestão avança (AGBEDE; KEMP, 1985; WALKER; FLETCHER, 1987; SONENSHINE, 1991; AGYEI; RUNHAM, 1995; COONS; ALBERTI, 1999; CAPERUCCI et al., 2010).

As análises morfohistoquímicas do epitélio intestinal demonstraram que ambas as concentrações de selamectina testadas neste estudo provocaram alterações em *R. sanguineus*, evidenciadas pela: a) vacuolização citoplasmática, b) picnose e fragmentação nuclear, c) rompimento das células, d) desprendimento das células da membrana basal e e) desprendimento da membrana basal do próprio epitélio, tendo sido tais alterações muito mais severas nos indivíduos do grupo **III**.

No grupo **II** observou-se que a concentração de 50% de selamectina já provocou as alterações anteriormente descritas, porém o epitélio intestinal, como defesa contra o produto tóxico se estratificou repondo as células digestivas por meio de um aumento da atividade de divisão celular das generativas, o que ficou evidenciado pela observação de figuras mitóticas nas células generativas e pela grande presença de grânulos polissacarídicos nas mesmas, provavelmente fonte de energia para o sucesso do processo.

Nos indivíduos do grupo **III**, observou-se que a selamectina na concentração de 80% foi extremamente tóxica ao tecido, prejudicando os processos de divisão celular devido a ocorrência de processos de morte. Nas células digestivas destes mesmos indivíduos, observou-se um acúmulo de granulações amarronzadas, provavelmente decorrentes de processos de oxidação dos hemossomos devido ao comprometimento dos movimentos peristálticos provocados pelo produto tóxico. Ainda no citoplasma das células digestivas do grupo **III**, verificou-se forte marcação polissacarídica, o que não foi observado nos grupos **II** e **GC**. Esse aumento de polissacarídeos ocorreu devido à exposição dessas células ao composto químico, o qual modificou sua fisiologia, alterando seu comportamento secretor.

Os danos provocados pela selamectina nas células generativas interferiram na produção de novas células digestivas essenciais na digestão do sangue. Assim, quando os processos digestivos são inibidos, também os de armazenamento dos elementos nutritivos do sangue, necessários para a nutrição do próprio ectoparasita e para formação de elementos vitelínicos não se completarão, o que interferirá diretamente sobre o desenvolvimento de suas células germinativas (ovócitos) e, portanto, na formação de novos indivíduos.

*Conclusão*

---

## 6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo permitiram concluir que:

1. A eficácia do acaricida selamectina em fêmeas ingurgitadas de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* foi determinada através da elaboração de um protocolo eficiente para se estabelecer a **CL<sub>50</sub>** (concentração 50% letal).
2. A selamectina provocou alterações no epitélio intestinal de fêmeas de carrapatos *R. sanguineus* submetidas a alimentação por 48 horas em hospedeiros expostos à diferentes concentrações deste produto (50% e 80% do produto comercial).
3. As alterações morfológicas nas células do epitélio intestinal das fêmeas dos grupos **TI** indicaram a ocorrência de processos de divisão, bem como de morte celular. O primeiro, ocorrendo exclusivamente nas generativas e o segundo, em ambos os tipos celulares (generativas/digestivas).
4. No grupo **III** não ocorreram divisões mitóticas das células generativas, no entanto, as demais alterações morfológicas observadas no grupo **TI** também foram detectadas em **III**, porém, de forma mais intensa.
5. Embora a concentração de 50% da selamectina presente no produto comercial tenha provocado alterações no epitélio intestinal, o processo de reposição celular ocorreu intensamente neste grupo.
6. A concentração de 80% de selamectina presente no produto comercial alterou de forma mais pronunciada a organização do epitélio intestinal quando comparado à de 50%.

## *Referências*

---

## 7. REFERÊNCIAS

AGBEDE, R. I.; KEMP, D. H.; Digestion in the cattle tick *Boophilus microplus*: light microscope study of the gut cells in nymphs and females. **International Journal of Parasitology**, v. 15, n. 2, p. 147-157, 1985.

AGBEDE, R. I.; KEMP, D. H. Ultrastructure of secretory cells in the gut of the cattle-tick *Boophilus microplus*. **International Journal for Parasitology**, v. 17, n. 6, p. 1089-1098, 1987.

AGYEI, A.D., HERBET, I.V., RUNHAM, N.W. Histochemical localisation of acid phosphatase and non-specific esterase in the midguts of two species of tick, *Boophilus microplus* and *Rhipicephalus appendiculatus*, as determined by light microscopy. **Parasitology Research**, v. 77, n. 7, p. 629-634, 1991.

AGYEI, A.D., RUNHAM, N.W., BLACKSTOCK, N. Histochemical changes in the midgut of two ixodid tick species *Boophilus microplus* and *Rhipicephalus appendiculatus* during digestion of the blood meal. **Experimental & Applied Acarology**, v. 13, n. 3, p. 187-212, 1992.

AGYEI, A.D.; RUNHAM, N.W. Studies on the morphological changes in the midgut of two ixodid tick species *Boophilus microplus* and *Rhipicephalus appendiculatus* during digestion of the blood meal. **International Journal for Parasitology**, v. 25, n. 1, p. 55-62, 1995.

BALASHOV, Yu. S. A translation of bloodsucking ticks (Ixodidae) vectors of diseases of man and animals. **Miscellaneous Publications of the Entomological Society of America**, v. 8, n. 5, p. 159 – 376, 1972.

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**, v. 4, n. 2, p. 61-66, 1995.

BORGES, L. M. F.; SOARES, S. F.; FONSECA, I. N.; CHAVES, V. V.; LOULY, C. C. B. Resistência acaricida em larvas de *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) de Goiânia-GO, Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, v. 36, n. 1, p. 87-95, 2007.

CAPERUCCI, D., CAMARGO-MATHIAS, M. I., BECHARA, G. H. Histopathology and ultrastructure features of the midgut of adult females of the tick *Amblyomma cajennense* Fabricius, 1787 (Acari: Ixodidae) in various feeding stages and submitted to three infestations. **Ultrastructural Pathology**, v. 33, n. 6, p. 249–259, 2009.

COONS, L.B., ALBERTI, G. Acari: Ticks. In: HARRISON, F.W., FOELIX, R.F. **Microscopic anatomy of invertebrates: chelicerate arthropoda**. New York: Wiley-Liss, 1999. p. 377-405.

COONS, L. B., ROSELL-DAVIS, R.; TARNOWSKI, B. I. Blood meal digestion in ticks. In: SAUER, J. R.; HAIR, A. J. (Ed.). **Morphology, physiology and behavioral biology of ticks**, Chichester: Ellis Horwood, 1986. p. 248 – 279.

DANAHER, M., HOWELLS, L.C., CROOKS, S.R.H., CERKVENIK-FLAJS V., O'KEEFFE M., Review of methodology for the determination of macrocyclic lactone residues in biological matrices. **Journal of Chromatography B**, v. 844, n. 2, 175-203, 2006.

DANTAS-TORRES, F.; FIGUEREDO, L. A.; BRANDÃO-FILHO, S. P. *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae), the brown dog tick, parasitizing humans in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 1, p. 64-67, 2006.

DANTAS-TORRES, F. Biology and ecology of the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus*. **Parasites & Vectors**, v. 3, n. 26, p. 2 – 11, 2010.

DELAYTE, E.H., OTSUKA, M., LARSSON, C.E., CASTRO, R.C.C. Eficácia das lactonas macrocíclicas sistêmicas (ivermectina e moxidectina) na terapia da demodicidose canina generalizada. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 58, n. 1, p. 31-38, 2006.

ESTRELA, A.B., SEIXAS, A., TEIXEIRA, V.O.N., PINTO, A.F.M., TERMIGNONI, C. Vitellin- and hemoglobin-digesting enzymes in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* larvae and females. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**, doi:10.1016/j.cbpb.2010.08.002, 2010.

FRANTA, Z., FRANTOVÁ, H., KONVIČKOVÁ, J., HORN, M., SOJKA, D., MAREŠ, M. KOPÁČEK, P. Dynamics of digestive proteolytic system during blood feeding of the hard tick *Ixodes ricinus*. **Parasites & Vectors**, v. 3, n. 14, p. 119-130, 2010.

FREITAS, D. R. J; ROSA, R. M.; MOURA, D. J.; SEITZ, A. L.; COLODEL, E. M.; DRIEMEIER, D.; DA SILVA VAZ JR., I.; MASUDA, A. Cell death during preoviposition period in *Boophilus microplus* tick. **Veterinary Parasitology**, v. 144, n. 3, p. 321-327, 2007.

GRAÇA-SOUZA, A.V., MAYA-MONTEIRO, C., PAIVA-SILVA, G.O., BRAZ, G.R.C., PAES, M.C., SORGINE, M.H.F., OLIVEIRA, M.F., OLIVEIRA, P.L. Adaptations against heme toxicity in blood-feeding arthropods. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.36, n. 4, p. 322 – 335, 2006.

HÄCKER, G. The morphology of apoptosis. **Cell Tissue Research**, v. 301, n. 1, p. 5-17, 2000.

JERNIGAN, A. D.; MCTIER, T. L.; CHIEFFO, C.; THOMAS, C. A.; KRAUTMANN, M. J.; HAIR, J. A.; YOUNG, D. R. Efficacy of selamectin against experimentally induced tick (*Rhipicephalus sanguineus* and *Dermacentor variabilis*) infestations on dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 91, n. 3, p. 359-375, 2000.

JUNQUEIRA, L. C. U.; JUNQUEIRA, L. M. M. S. **Técnicas básicas de citologia e histologia**. São Paulo: Santos, 1983. 123p.

KAUFMAN, W. R. Tick-host interaction: a synthesis of current concepts. **Parasitology Today**, v. 5, n. 2, p. 47-56, 1989.

KRAUTMANN, M. J.; NOVOTNY, M. J.; DE KEULENAER, K.; GODIN, C. S.; EVANS, E. I.; MCCALL, J. W.; WANG, C.; ROWAN, T. G.; JERNIGAN, A. D. Safety of selamectin in cats. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 91, n. 3, p. 393-403, 2000.

KONGSUWAN, K.; JOSH, P.; ZHU, Y.; PEARSON, R.; GOUGH, J.; COLGRAVE, M. L. Exploring the midgut proteome of partially fed cattle tick (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*). **Journal of Insect Physiology**, v. 56, n. 1, p. 212-226, 2010

LABRUNA, M. B. Biologia-ecologia de *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, n. 1, p. 123-124, 2004.

LARA, F.A., LINS, U., PAIVA-SILVA, G., ALMEIDA, I.C., BRAGA, C.M., MIGUENS, F.C., OLIVEIRA, P.L., DANSA-PETRETSKI, M. A new intracellular pathway of haem detoxification in the midgut of the cattle tick *Boophilus microplus*: aggregation inside a specialized organelle, the hemosome. **The journal of Experimental Biology**, doi:10.1242/jeb.00334, p. 1707 – 1715, 2003.

LEAL, A. T.; FREITAS, D. R. J.; VAZ, I. S. Perspectives for control of bovine tick. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 31, n. 1, p. 1-11, 2003.

LIYOU, N.; HAMILTON, S.; WATTER D. J.; TELLAM, R.; WILLADSEN, S. P. Endocytosis by Digest Cells of the Cattle Tick *Boophilus microplus*: Regulation by Protein Kinase C. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 26, n. 2, p. 147-154, 1996.

LOCKSHIN, A. R.; ZAKERI, Z. **The biology of cell death and its relationship to aging**. In: HOLBROOK, N.; MARTIN, G. R.; LOCKSHIN, R. A. (Eds). Cellular Aging and Cell Death. New York: Wiley-Liss, 1996, 167-180 p.

MIZUSHIMA, N. Methods for monitoring autophagy. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 36, n. 12, p. 2491-2502. 2004.

MONTASSER, A. A.; AMIN, A. Effect of ivermectin on the integument and dorsoventral muscles of the tick *Argas (Persicargas) persicus* (Oken) (Ixodoidea: Argasidae). *Parasitology Research*. v. 107, n. 4 p. 975-982, 2010.

NOLAN, J. Resistance mechanisms to chemical products in arthropods parasites of veterinarian importance. **Veterinary Parasitology**, v. 18, n. 2, p. 155-166, 1985.

NOVOTNY, M. J.; KRAUTMANN, M. J.; EHRHART, J. C.; GODIN, C. S.; EVANS, E. I., MCCALL, J. W.; SUN, F.; ROWAN, T. G.; JERNIGAN, A. D. Safety of selamectin in dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 91, n. 3, p. 377 – 391, 2000.

O'HAGAN, J. E. *Boophilus microplus*: digestion of hemoglobins by the engorged female tick. **Experimental Parasitology**, v. 35, n. 1, p. 110-118, 1974.

OLIVEIRA, P.R.; BECHARA, G. H.; MORALES, M. A. M.; CAMARGO-MATHIAS, M.I. 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. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 6, p. 1255-1264, 2008a.

OLIVEIRA, P. R.; BECHARA, G. H.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Evaluation of cytotoxic effects of fipronil on ovaries of semi-engorged *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) tick female. **Food and Chemical Toxicology**. v. 46, n. 7, p. 2459-2465. 2008b.

PEREIRA, C. P. M.; OLIVEIRA, P. R.; FURQUIM, K. C. S.; BECHARA, G. H.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Effects of fipronil (active ingredient of Frontline®) on salivary gland cells of *Rhipicephalus sanguineus* females (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 166, n. 1-2, p.124-130. 2009.

PEARSE, A. G. E. **Histochemistry: theoretical and applied**. 4. ed. London: Churchill, 1985. p. 530.

PIPANO, E. Recent Developments in the control of ectoparasites and endoparasites of dogs and cats with selamectin. **Israel Journal of Medicine Veterinary**. v. 58, n 2-3, 2003.

REY, L. **Parasitologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1973. 695p.

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, n. 3, p. 269-272, 2009.

ROMA, G. C.; FURQUIM, K. C. S.; BECHARA, G. H.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Cytotoxic effects of permethrin in oocytes of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) fully engorged females: I. Direct or indirect action of the acaricide in germ cells? **Experimental and Applied Acarology**. v. 53, n. 3, p. 287-299. 2011.

RUPPERT, E. E.; BARNES, R. D. **Zoologia dos Invertebrados**. 6. ed. São Paulo: Roca, 1996. 1029p.

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, n. 7, p. 1069-1078, 2000.

SONESHINE, D. E. **Biology of Ticks**. 1. ed. New York: Oxford University Press, 1991. v. 1, p. 159–187.

STORER, T. I.; USINGER, R. L. **Zoologia Geral**. 6. ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 2000. 816p.

WALKER, A. **The arthropods of humans and domestic animals. A guide to preliminary identification**. London: Chapman and Hall, 1994. 213p.

WALKER, A.R.; FLETCHER, J.F. Histology of digestion in nymphs of *Rhipicephalus appendiculatus* fed on rabbits and cattle naïve and resistant to the ticks. **International Journal for Parasitology**, v. 17, n. 8, p. 1393 – 1411, 1987.

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

WALL, R.; SHEARER, D. **Veterinary Entomology**. London: Chapman and Hall, 1997. 338p.

---

Mariaza Izabel Camargo Mathias  
(Orientadora)

---

Karim Christina Scopinho Furquim  
(Co-orientadora)

---

Andrea Mendez Araujo  
(aluna)