

RESSALVA

Atendendo solicitação do autor, o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 27/05/2021.

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

O JAMBU (*Acmella oleracea*) E SUA AÇÃO ACARICIDA: ESTUDO DOS EFEITOS SOBRE A MORFOFISIOLOGIA DOS SISTEMAS REPRODUTORES MASCULINO E FEMININO DE *Amblyomma cajennense* (FABRICIUS, 1787) (ACARI: IXODIDAE) A ELE EXPOSTOS

LUÍS ADRIANO ANHOLETO

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

O Jambu (*Acmella oleracea*) e sua ação acaricida: Estudo dos efeitos sobre a morfofisiologia dos sistemas reprodutores masculino e feminino de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) a ele expostos

LUÍS ADRIANO ANHOLETO

Orientadora: Profa. Dra. Maria Izabel Souza Camargo

Coorientadora: Dra. Patrícia Rosa de Oliveira

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

Rio Claro – SP

2019

A596j

Anholeto, Luís Adriano

O Jambu (*Acmella oleracea*) e sua ação acaricida: Estudo dos efeitos sobre a morfofisiologia dos sistemas reprodutores masculino e feminino de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) a ele expostos / Luís Adriano Anholeto.

-- Rio Claro, 2019

236 p. : fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro

Orientadora: Maria Izabel Souza Camargo

Coorientadora: Patrícia Rosa de Oliveira

1. Morfologia. 2. Carrapato. 3. Toxicologia. 4. Histologia. 5. Técnicas de cultura de células. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO


TÍTULO DA TESE: O JAMBU (*Acmella oleracea*) E SUA AÇÃO ACARICIDA: ESTUDO DOS EFEITOS SOBRE A MORFOFISIOLOGIA DOS SISTEMAS REPRODUTORES MASCULINO E FEMININO DE *Amblyomma cajennense* (FABRICIUS, 1787) (ACARI: IXODIDAE) A ELE EXPOSTOS

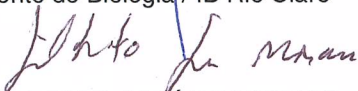
AUTOR: LUÍS ADRIANO ANHOLETO

ORIENTADORA: MARIA IZABEL SOUZA CAMARGO

COORIENTADORA: PATRICIA ROSA DE OLIVEIRA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR), pela Comissão Examinadora:


Prof. Dra. MARIA IZABEL SOUZA CAMARGO
Departamento de Biologia / IB Rio Claro


Prof. Dr. GILBERTO JOSÉ DE MORAES
Departamento de Entomologia e Acarologia / ESALQ/USP

Prof. Dr. PABLO HENRIQUE NUNES
Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza / UNILA


Prof. Dra. ELEN FERNANDA NODARI DRAGONI
x / x


Prof. Dra. CECÍLIA JOSÉ VERÍSSIMO
Laboratório de Referência em Biotecnologia da Produção Animal / Instituto de Zootecnia

Rio Claro, 27 de maio de 2019

Dedico esse trabalho a todos que, direta ou indiretamente, estiveram envolvidos com ele e/ou contribuíram para minha formação acadêmica e profissional.

AGRADECIMENTOS

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) processo nº 2015/01496-5 e processo nº 2018/08166-9 pelo apoio financeiro e institucional cedido para o desenvolvimento do projeto.

Aos meus pais, avós, tios e primos por todo apoio e confiança que depositaram em mim.

Ao meu companheiro Daniel Filho pela compreensão, apoio e amor sem limites, por compartilhar dos meus sonhos, conquistas, frustrações, crises de ansiedade e, principalmente, por ser meu parceiro de vida.

Aos meus amigos Ana, Marcelo, Mariana, Fabiano, Dete, Sandro, Alessandra, Gabriela, Rodrigo, Renan, Emerson, Cleiton, Carol e Raphael pelos bons momentos.

À minha orientadora Profa. Dra. Maria Izabel Souza Camargo pela oportunidade, confiança, paciência, amizade, conselhos e, principalmente, por acreditar no meu potencial e tornar esse trabalho possível. Serei eternamente grato.

À minha coorientadora Profa. Dra. Patrícia Rosa de Oliveira por ter me acompanhado ao longo desse trabalho, pelos ensinamentos, discussões, esclarecimentos e por ser um exemplo de ser humano. Obrigado por estar na minha vida.

Ao Prof. Dr. Pablo Henrique Nunes que me acompanhou nos meus primeiros passos como pesquisador.

À Dra. Lesley Bell-Sakyi, uma mulher apaixonada por células de carrapatos, que me recebeu de braços abertos em seu laboratório. Obrigado pelas discussões e colaboração. *Thank you!*

A todos os membros do *Tick Cell Biobank* e do *Department of Infection Biology* da Universidade de Liverpool, Reino Unido, pelo acolhimento.

Ao Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna, Dra. Karina Neob de Carvalho Castro, Dr. Rodney Alexandre Rodrigues, Dr. Júlio Cezar Pastre, Msc. Guilherme Andrade Brancaglion e Msc. Laís Thiemi Yamane pela parceria e colaboração.

Aos membros da *Brazilian Central of Studies on Ticks Morphology* – BCSTM, UNESP – Rio Claro, SP, Brasil, pelo acolhimento e apoio, especialmente aos meus amigos do coração Profa. Rusleyd, Prof. Ribamar, Elen, Natália, Renata, Marina e Melissa.

Ao técnico do Laboratório de Histologia, Gerson de Mello Souza por seu apoio e momentos de descontração.

Aos técnicos do Laboratório de Microscopia Eletrônica, Monika lamonte, Antônio Teruyoshi Yabuki e Dra. Priscila Cintra Socolowski pelo apoio.

À secretária do Departamento de Biologia, Cristiane Marcia Mileo e a todos os funcionários da Seção Técnica de Pós-graduação pelo apoio administrativo.

A todos os meus professores e colegas do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas – Biologia Celular e Molecular.

A todos os professores da UNESP que estiveram envolvidos direta ou indiretamente com a minha vida acadêmica e compartilharam seus conhecimentos, os quais com certeza foram essenciais para a minha formação pessoal e profissional.

A todos do Departamento de Biologia do Instituto de Biociências da UNESP de Rio Claro - SP pelo acolhimento e amizade.

Finalmente agradeço a todos que participaram direta ou indiretamente da minha formação profissional e pessoal e que, porventura, possa ter esquecido de citar. Muito obrigado.

"Quem come do fruto do conhecimento é sempre expulso de algum paraíso"

Melanie Klein

RESUMO

Os resultados obtidos no presente estudo tanto para as fêmeas, quanto para os machos de carrapatos *Amblyomma cajennense* confirmaram que o extrato etanólico bruto obtido a partir das flores, folhas e caule de *Acmella oleracea* tem potencial acaricida, informação esta que poderá futuramente ser utilizada na estratégia de controle desses ectoparasitas. Ficou aqui estabelecido a concentração letal de 50% (CL₅₀) de 17,6335 mg/mL para as fêmeas semi-ingurgitadas, enquanto para os machos alimentados da mesma espécie esta foi de 29,4534 mg/mL. Quando expostos às concentrações de 6,2; 12,5 e 25 mg/mL do extrato etanólico de *A. oleracea*, os machos apresentaram danos morfológicos e ultraestruturais no seu sistema reprodutor, sobretudo nas células secretoras do complexo de glândulas acessórias. Para as fêmeas, quando estas foram expostas às concentrações de 3,1; 6,2 e 12,5 mg/mL, também foram observadas alterações no sistema reprodutor, que ocorreram principalmente nos ovócitos em estágios iniciais de desenvolvimento (I e II). Além disso, foram obtidos dados sobre a ação do análogo alcino do espilantol, que demonstraram que o mesmo foi capaz de reduzir a viabilidade e alterar a morfologia de duas linhagens celulares obtidas de embriões de *Rhipicephalus microplus*: BME/CTVM6, derivadas de carrapatos resistentes a organofosforados, organoclorados e amitraz, e BME/CTVM2, derivadas de carrapatos susceptíveis a acaricidas. Quando se estudou a ação da mesma molécula nas células BME/CTVM6 infectadas com *Ehrlichia minasensis*, verificou-se que houve redução de quase dois terços na porcentagem de células infectadas após a exposição ao produto. Os dados obtidos no presente estudo, sinalizaram que o uso do análogo alcino do espilantol também poderá ser uma estratégia promissora para uso no controle de carrapatos, bem como do controle de patógenos por eles transmitidos.

Palavras-chave: carrapatos; controle químico natural; toxicidade; espilantol; linhagens celulares de carrapatos.

ABSTRACT

The results obtained in the present study confirmed that the crude ethanolic extract obtained from the flowers, leaves and stem of *Acmella oleracea* has acaricidal potential against males and females of *Amblyomma cajennense* ticks. The lethal concentration of 50% (LC₅₀) was established: 17.6335 mg/mL for semi-engorged females and 29.4534 mg/mL for males. The males of *A. cajennense* ticks when exposed to concentrations of 6.2; 12.5 and 25 mg/mL of the *A. oleracea* ethanolic extract presented severe morphological and ultrastructural damages in reproductive system, especially in the secretory cells of the accessory gland complex. In the case of females, when they were exposed to concentrations of 3.1; 6.2 and 12.5 mg/mL alterations in their reproductive system was observed. The alterations were mainly in oocytes in the early stages of development (I and II). The data obtained with the use of the alkyne analogue of spilanthal showed that it was able to reduce the viability and change the morphology of two tick cell lines obtained from *Rhipicephalus microplus*: BME/CTVM6 derived from ticks resistant to organophosphates, organochlorines and amitraz, and BME/CTVM2, derived from acaricide-susceptible ticks. When studying the action of the same product on BME/CTVM6 cells infected with *Ehrlichia minasensis*, there was a clear reduction in percentage of infected cells of nearly two-thirds following spilanthal analogue treatment. In conclusion, the results clearly demonstrated that the use of the spilanthal alkyne analogue could be a promising strategy to control ticks.

Keywords: ticks; natural chemical control; toxicity; spilanthal; tick cell lines.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Distribuição geográfica de *Amblyomma cajennense* sensu stricto, *A. sculptum* e *A. cajennense* sensu lato no Brasil. Elipses de linhas tracejadas incluem as localidades que foram amostradas durante três expedições de campo para coletas de carrapatos, sendo a primeira expedição em verde, a segunda em marrom e a terceira em amarelo. Adaptado de Martins et al. (2016).23
- Figura 2.** Carrapatos *Amblyomma cajennense* sensu lato. **A.** Macho adulto. **B.** Fêmea adulta. Adaptado de Brites-Neto, Duarte e Martins (2015).....24
- Figura 3.** Carrapatos *Rhipicephalus microplus*. **A.** Macho adulto. **B.** Fêmea adulta. Adaptado de Brites-Neto; Duarte e Martins (2015).26
- Figura 4.** Micrografia eletrônica de varredura dos testículos de *Amblyomma cajennense* sensu lato em jejum. **A.** Visão geral dos testículos (**t**) no opistossoma e ductos deferentes (**dd**). **B.** Detalhe da região proximal dos testículos (**t**) mostrando os ductos deferentes (**dd**). **C.** Visão geral do complexo de glândulas acessórias do aparelho genital (**gl**) e vesícula seminal (**vs**). **D.** Detalhe da superfície rugosa dos testículos, evidenciando os espermatocistos (**ec**) em seu interior. Tracejado = complexo de glândulas acessórias. **Barras:** A= 2mm; B-C= 1mm; D= 100µm. Adaptado de Anholeto et al. (2015).....27
- Figura 5.** Secções histológicas do sistema reprodutor de *Amblyomma cajennense* sensu lato após 10 dias de alimentação, coradas pela hematoxilina-eosina. **A.** Complexo multilobulado de glândulas acessórias (**gl**) e vesícula seminal (**vs**). **B.** Região proximal do testículo. **C.** Detalhe da região proximal, mostrando pontes citoplasmáticas entre as células germinativas (**seta**). **D.** Região mediana. **E.** Região distal. **F.** Detalhe da região distal evidenciando a presença das espermatídes alongadas (**ea**). **cl** = células somáticas ao redor do lúmen; **ea** = espermatídes alongadas; **ec** = espermatocistos; **l** = lúmen; **n** = núcleo; **tc** = tecido conjuntivo. Adaptado de Anholeto et al. (2015).....29
- Figura 6. A-B.** Microscopia eletrônica de varredura de ovário de fêmeas semi-ingurgitadas de carrapatos *Amblyomma cajennense* sensu lato mostrando ovócitos (**ov**) em vários estágios de desenvolvimento. Adaptado de Camargo-Mathias (2013).32

Figura 7. Secções histológicas do ovário do carrapato *Rhipicephalus sanguineus* coradas pela H-E. **A.** Detalhe do ovócito I (I), mostrando nucléolo (**nu**), vesícula germinal (**gv**) e limite celular (**pm**). **B.** Detalhe do ovócito II (II), mostrando nucléolo (**nu**), vesícula germinal (**gv**) e limite celular (**pm**). **C.** Detalhe do ovócito III (III), onde pode ser observada a vesícula germinal (**gv**), o limite celular (**pm**) e o pedicelo (**p**). **D.** Detalhe do ovócito IV (IV), mostrando nucléolo (**nu**), vesícula germinal (**gv**), limite celular (**pm**) e o pedicelo (**p**). **E.** Detalhe do ovócito V (V), onde podem ser observados o epitélio ovariano (**ep**) e o cório (**ch**). **Barras:** **A-D**= 0,02 mm; **E**= 0,1 mm. Adaptado de Camargo-Mathias (2013).....34

Figura 8. A-B. Flores, folhas e caules de Jambu (*Spilanthus acmella* L. Murray). **C.** Detalhe da flor. Adaptado de Camargo-Mathias (2018).37

Figura 9. Obtenção do extrato etanólico bruto das partes aéreas de *Acmella oleracea*. **A.** Flores, folhas e caules de *A. oleracea* secos. **B.** Moagem do material. **C-D.** Extração em etanol 96° GL sob agitação mecânica, realizada em planta química. **E.** Separação de resíduos por filtração. **F.** Concentração do extrato sob vácuo em sistema de evaporação rotativo. **G.** Liofilização do extrato.....46

Figura 10. Ultraestrutura do sistema reprodutor masculino de *Amblyomma cajennense* (Grupos Controles I e II). **A-B.** Células secretoras do complexo de glândulas acessórias multilobuladas. **cr**= cromatina; **en**= envoltório nuclear; **gs**= grânulos de secreção; **mp** = membrana plasmática; **n**= núcleo; **r**= ribossomos livres; **rer**: retículo endoplasmático rugoso. **Barras:** A-B= 1µm..... 122

Figura 11. Ultraestrutura do sistema reprodutor masculino de *Amblyomma cajennense* (Grupo Tratamento 1: exposição a 6,2 mg/mL do extrato etanólico de *Acmella oleracea*). **A-C.** Células secretoras do complexo de glândulas acessórias multilobuladas. **cr**= cromatina; **gs**= grânulos de secreção; **m**= mitocôndria; **en**= envoltório nuclear; **n**= núcleo; **r**= ribossomos livres; **rer**: retículo endoplasmático rugoso; **va**= vacúolo; * = marginalização cromatínica. **Barras:** A-C= 1µm 124

Figura 12. Ultraestrutura do sistema reprodutor masculino de *Amblyomma cajennense* (Grupo Tratamento 2: exposição a 12,5 mg/mL do extrato etanólico de *Acmella oleracea*). **A-D.** Células secretoras do complexo de glândulas acessórias multilobuladas. **cr**= cromatina; **fm**= figura mielínica; **gs**= grânulos de secreção; **m**= mitocôndria; **n**= núcleo; **r**= ribossomos livres; **rer**: retículo

endoplasmático rugoso; **va**= vacúolo autofágico; * = marginalização cromatínica.

Barras: A= 2µm; B-D= 0,5 µm. 126

Figura 13. Ultraestrutura do sistema reprodutor masculino de *Amblyomma cajennense* (Grupo Tratamento 3: exposição a 25 mg/mL do extrato etanólico de *Acmella oleracea*). **A-F.** Células secretoras do complexo de glândulas acessórias multilobuladas. **cr**= cromatina; **gs**= grânulos de secreção; **m**= mitocôndria; **en**= envoltório nuclear; **mp** = membrana plasmática; **n**= núcleo; **r**= ribossomos livres; **rer**: retículo endoplasmático rugoso; **va**= vacúolo. **Barras:** **A, B, D**= 2 µm; **C**= 5µm; **E-F**= 0,5 µm. 128

Figura 14. Ultraestrutura do sistema reprodutor masculino de *Amblyomma cajennense*, evidenciando os espermióforos no interior do testículo **A-B**. Grupo Controles I e II: **C-D**. Grupo Tratamento 1: exposição a 6,2 mg/mL do extrato etanólico de *Acmella oleracea*. **E-F**. Grupo Tratamento 2: exposição a 12,5 mg/mL do extrato etanólico de *Acmella oleracea*. **G-H**. Grupo Tratamento 3: exposição a 25 mg/mL do extrato etanólico de *Acmella oleracea*. **ce**= citoesqueleto; **es**= espermióforo; **mp**= membrana plasmática; **n**= núcleo. **Barras:** A-H= 1µm. 130

Figura 15. Ultraestrutura do ovário de fêmeas semi-ingurgitadas de *Amblyomma cajennense* (Grupos Controles I e II). **A-D.** Ovócitos imaturos (I e II). **A.** Detalhe da vesícula germinal. **B.** Detalhe do citoplasma dos ovócitos. **C.** Membrana plasmática e lâmina basal dos ovócitos. **D.** Detalhe da membrana plasmática e lâmina basal. **E-F.** Ovócitos III. **E.** Detalhe do citoplasma, evidenciado os grânulos de vitelo. **F.** Detalhe do cório. **G.** Ovócitos IV, mostrando a vesícula germinal e grânulos de vitelo no citoplasma. **H-I.** Ovócitos V. **H.** Grânulos de vitelo no citoplasma. **I.** Detalhe do cório. **bl**= lâmina basal **ch**= cório **cr**= cromatina **gv**= vesícula germinal **m**= mitocôndria **mv**= microvilos **n**= nucléolo **ne**= envoltório nuclear **pm**= membrana plasmática **r**= ribossomo livre **yg**= grânulos de vitelo. **Barras:** **A; E; F; G-I**= 2 µm. **B**= 0,5 µm; **C-D**= 0,2 µm 154

Figura 16. Ultraestrutura do ovário de fêmeas semi-ingurgitadas de *Amblyomma cajennense* (Grupo Tratamento: exposição a 3,1 mg/mL do extrato etanólico de *Acmella oleracea*). **A-E.** Ovócitos imaturos (I e II). **A-B.** Detalhe do nucléolo da vesícula germinal. **C.** Detalhe da vesícula germinal e envoltório nuclear. **D-E.** Citoplasma, evidenciando a presença de vacúolos heterogêneos e autofágicos. **F-I.** Ovócitos III. **F.** Detalhe da vesícula germinal. **G.** Citoplasma. **H-I.** Detalhe do

citoplasma, evidenciando a presença de vacúolos autofágicos. **J-M.** Ovócitos IV, mostrando o citoplasma repleto de vacúolos autofágicos e grânulos de vitelo com morfologia irregular. **N-P.** Ovócitos V. **N-O.** Citoplasma com grânulos de vitelo e vacúolos heterogêneos. **P.** Detalhe da região periférica do ovócito, evidenciando o cório. ***yg**= grânulos de vitelo com constituição granular **aer**= reticulo endoplasmático agranular **av**= vacúolo autofágico **ch**= cório **cr**= cromatina **g**= Golgi **gv**= vesícula germinal **l**= lipídio **m**= mitocôndria **mb**= figura mielínica **n**= nucléolo **ne**= envoltório nuclear **r**= ribossomo livre **v**= vacúolo **yg**= grânulos de vitelo. **Barras: A-C; E; H; J; L-M; O= 1 µm. D; I; K; N= 0,5 µm; F; P= 5 µm. G= 2 µm.**..... 156

Figura 17. Ultraestrutura do ovário de fêmeas semi-ingurgitadas de *Amblyomma cajennense* (Grupo Tratamento: exposição a 6,2 mg/mL do extrato etanólico de *Acmella oleracea*). **A-C.** Ovócitos imaturos (I e II). **A.** Detalhe da vesícula germinal. **B.** Citoplasma, evidenciando a presença de vacúolos heterogêneos, autofágicos e figuras mielínicas. **C.** Detalhe da membrana citoplasmática. **D-F.** Ovócitos III. **D.** Citoplasma, evidenciando a presença de grânulos de vitelo. **E.** Citoplasma vacuolizado. **F.** Detalhe do cório. **G-H.** Ovócitos IV, evidenciado a região periférica e o cório. **I-J.** Ovócitos V, destacando a região periférica do ovócito e o cório. **aer**= reticulo endoplasmático agranular **av**= vacúolo autofágico **bl**= lâmina basal **ch**= cório **cr**= cromatina **gv**= vesícula germinal **m**= mitocôndria **mb**= figura mielínica **mv**= microvilos **ne**= envoltório nuclear **pm**= membrana plasmática **r**= ribossomo livre **v**= vacúolo **yg**= grânulos de vitelo. **Barras: A; C; E; F; I-J= 2 µm. B= 1 µm; D; G= 5 µm. H= 10 µm.**..... 158

Figura 18. Ultraestrutura do ovário de fêmeas semi-ingurgitadas de *Amblyomma cajennense* (Grupo Tratamento: exposição a 12,5 mg/mL do extrato etanólico de *Acmella oleracea*). **A-B.** Ovócitos em fase inicial de desenvolvimento (I e II), evidenciando citoplasma vacuolizado. **C-H.** Ovócitos III. **C.** Detalhe da vesícula germinal. **D-G.** Detalhe do citoplasma vacuolizado. **H.** Detalhe da região periférica do ovócito, destacando os microvilos. **I.** Ovócitos IV. **I.** Vesícula germinal. **J-K.** Ovócitos V, destacando a região periférica do ovócito (**J**) e o cório. **K.** Região periférica do ovócito, evidenciado a deposição do cório. **aer**= reticulo endoplasmático agranular **av**= vacúolo autofágico **bl**= lâmina basal **ch**= cório **cr**= cromatina **g**= Golgi **gv**= vesícula germinal **l**= lipídio **m**= mitocôndria **mb**= figura mielínica **mv**= microvilos **ne**= envoltório

nuclear **pm**= membrana plasmática **r**= ribossomo livre **v**= vacúolo **yg**= grânulos de vitelo. **Barras: A-B; E-H; J= 1 µm. C; I; K= 5 µm; D= 2 µm.** 160

Figure 19. BME/CTVM6 cell viability determined by trypan blue exclusion assay following 72 hours of treatment with spilanthol analogue at concentration of 0.8; 0.4; 0.3 and 0.2 mg/mL. 182

Figure 20. BME/CTVM2 cell viability determined by trypan blue exclusion assay following 72 hours of treatment with spilanthol analogue at concentration of 0.8; 0.7; 0.6 and 0.5 mg/mL. 182

Figure 21. Cytocentrifuge smears of BME/CTVM6 cells stained with Giemsa. **A.** Control group I. **B.** Control group II. **C.** Cells exposed to 0.2 mg/mL of spilanthol analogue. **D.** Cells exposed to 0.3 mg/mL of spilanthol analogue. **E.** Cells exposed to 0.4 mg/mL of spilanthol analogue. **F.** Cells exposed to 0.8 mg/mL of spilanthol analogue. **c**= cytoplasm; **cl**= cell limit; **n**= nucleus; **nd**= division of cell nucleus; **v**= vacuoles. **Bars**= 20 µm. 185

Figure 22. Cytocentrifuge smears of BME/CTVM2 cells stained with Giemsa. **A.** Control group I. **B.** Control group II. **C.** Cells exposed to 0.5 mg/mL of spilanthol analogue. **D.** Cells exposed to 0.6 mg/mL of spilanthol analogue. **E.** Cells exposed to 0.7 mg/mL of spilanthol analogue. **F.** Cells exposed to 0.8 mg/mL of spilanthol analogue. **c**= cytoplasm; **cl**= cell limit; **n**= nucleus; **nd**= division of cell nucleus; **v**= vacuoles. **Bars**= 20 µm. 187

Figure 23. Cytocentrifuge smears of BME/CTVM6 cells stained with Giemsa with or without *Ehrlichia minasensis* infection. **A-C.** Uninfected cells. **A.** Control group I. **B.** Control group II. **C.** Cells exposed to 0.2 mg/mL of spilanthol analogue. **D-F.** Cells infected with *E. minasensis*. **D.** Control group I. **E.** Control group II. **F.** Cells exposed to 0.2 mg/mL of spilanthol analogue. **c**= cytoplasm; **cl**= cell limit; **n**= nucleus; **nd**= division of cell nucleus; **v**= vacuoles; **arrow**= bacterial colonies. **Bars**= 20 µm. 189

Figure 24. Percentage of *Ehrlichia minasensis*-infected BME/CTVM6 cells in cultures with (treated) or without (control) exposure to concentration of 0.2 mg/mL of the spilanthol analogue. 191

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A. aureolatum = *Amblyomma aureolatum*

A. cajennense = *Amblyomma cajennense*

A. hebraeum = *Amblyomma hebraeum*

A. oleracea = *Acmella oleracea*

A. sculptum = *Amblyomma sculptum*

A. triste = *Amblyomma triste*

Agc = *accessory gland complex*

BCSTM = *Brazilian Central of Studies on Ticks Morphology*

BME/CTVM2 = linhagens celulares obtidas de embriões de *Rhipicephalus microplus*, derivadas de carrapatos susceptíveis a acaricidas

BME/CTVM6 = linhagens celulares obtidas de embriões de *Rhipicephalus microplus*, derivadas de carrapatos resistentes a organofosforados, organoclorados e amitraz

BOD = *Biochemical Oxygen Demand*

CAPES = Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CGEN = Conselho de Gestão do Patrimônio Genético

CL₅₀ = Concentração letal de 50%

CPQBA = Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas

DMSO = Dimetilsulfóxido

E. canis = *Ehrlichia canis*

E. chaffeensis = *Ehrlichia chaffeensis*

E. ewingii = *Ehrlichia ewingii*

E. muris = *Ehrlichia muris*

E. risticii = *Ehrlichia risticii*

E. ruminantium = *Ehrlichia ruminantium*

EEAO = Ethanolic extract of *Acmella oleracea*

FAPESP = Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

FMB = Febre Maculosa Brasileira

HE = Hematoxilina - Eosina

I.B. = Instituto de Biociências

MET = Microscopia Eletrônica de Transmissão

O. moubata = *Ornithodoros moubata*

O. rostratus = *Ornithodoros rostratus*

PAS = ácido periódico - Schiff

R. appendiculatus = *Rhipicephalus appendiculatus*

R. evertsi evertsi = *Rhipicephalus evertsi evertsi*

R. microplus = *Rhipicephalus microplus*

R. sanguineus = *Rhipicephalus sanguineus*

R. simus = *Rhipicephalus simus*

s.l. = *sensu lato*

s.s. = *sensu stricto*

SisGen = Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado

UNESP = Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

UNICAMP = Universidade Estadual de Campinas

USA = *United States of America*

USP = Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	19
1.1 Carrapatos.....	19
1.2 Carrapatos <i>Amblyomma cajennense</i>	21
1.3 Carrapatos <i>Rhipicephalus microplus</i>	25
1.4 Sistema reprodutor masculino dos carrapatos	26
1.5 Sistema reprodutor feminino dos carrapatos.....	30
1.6 Métodos de controle de carrapatos	34
1.7 <i>Acmella oleracea</i> (L.) R. K. Jansen.....	35
1.8 Linhagens de células de carrapatos.....	39
2 OBJETIVOS	41
2.1 Objetivo geral	41
2.2 Objetivos específicos	41
3 MATERIAL E MÉTODOS	43
3.1 Locais e equipamentos utilizados para a realização dos estudos:.....	43
3.2 Avaliação da ação do extrato de <i>Acmella oleracea</i> sobre o sistema reprodutor masculino e feminino de carrapatos <i>Amblyomma cajennense</i>	44
3.2.1 Extrato de <i>Acmella oleracea</i>	44
3.2.1.1 Obtenção do material vegetal.....	44
3.2.1.2 Secagem e moagem do material vegetal	44
3.2.1.3 Preparação do extrato etanólico bruto de <i>Acmella oleracea</i>	45
3.2.1.4 Monitoramento analítico do extrato	45
3.2.2 Hospedeiros	47
3.2.3 Manutenção da colônia de carrapatos <i>Amblyomma cajennense</i> (Fabricius, 1787)	47
3.2.4 Determinação da concentração letal de 50% (CL ₅₀)	48
3.2.4.1 Bioensaio 1: Determinação do intervalo de morte dos carrapatos expostos ao extrato de <i>Acmella oleracea</i>	48
3.2.4.2 Bioensaio 2: Determinação da concentração letal de 50% (CL ₅₀).....	49
3.2.5 Análises estatísticas	50
3.3 Avaliação morfofisiológica e ultraestrutural dos sistemas reprodutores masculino e feminino de <i>Amblyomma cajennense</i> após a exposição ao extrato etanólico bruto de <i>Acmella oleracea</i> em concentrações subletais.....	50
3.3.1 Delineamento experimental.....	51
3.3.2 Histologia e histoquímica.....	52

3.3.2.1 Histologia: Técnica de coloração pela hematoxilina de Harris e eosina aquosa (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983).....	52
3.3.2.2 Detecção de polissacarídeos neutros: Técnica do PAS (ácido periódico-Schiff) (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983).....	53
3.3.2.3 Detecção de proteínas totais: Técnica do azul de bromofenol (PEARSE, 1985)	54
3.3.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão	54
3.4 Atividade acaricida do análogo alcino do espilantol sobre linhagens celulares derivadas de carrapatos <i>Rhipicephalus microplus</i> resistentes e suscetíveis a acaricidas e infectados ou não por <i>Ehrlichia minasensis</i>	55
3.4.1 Análogo alcino do espilantol.....	55
3.4.2 Linhagens celulares de carrapatos.....	55
3.4.3 Avaliação da ação do análogo alcino do espilantol sobre células BME/CTVM6 e BME/CTVM2	56
3.4.3.1 Viabilidade, densidade e determinação da concentração letal de 50%.....	56
3.4.3.2 Morfologia celular	56
3.4.4 Avaliação da ação do análogo alcino do espilantol sobre células BME/CTVM6 infectadas com <i>Ehrlichia minasensis</i>	57
4 RESULTADOS.....	59
CAPÍTULO 1	60
CAPÍTULO 2	74
CAPÍTULO 3	79
CAPÍTULO 4	88
CAPÍTULO 5	97
CAPÍTULO 6	109
CAPÍTULO 7	112
CAPÍTULO 8	141
CAPÍTULO 9	172
5 DISCUSSÃO GERAL	202
6 CONCLUSÕES	213
REFERÊNCIAS.....	215
GLOSSÁRIO	229
ANEXOS	231
ÍNDICE	235

INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Carrapatos

A subclasse Acari, em que se encontram os ácaros e os carrapatos, está formada por um grupo de indivíduos que variam de pequenos a microscópicos, apresentando cabeça, tórax e abdômen fundidos e não segmentados (RUPPERT; FOX; BARNES, 2005). Segundo Sonenshine e Roe (2014), apesar de não terem estruturas para o voo, esses indivíduos concorrem com os insetos em termos de diversidade de espécies e de adaptações. Classificados em três famílias (Ixodidae, Argasidae e Nuttalliellidae), os carrapatos apresentam ampla distribuição geográfica e podem parasitar grande variedade de vertebrados silvestres e domésticos, tais como aves, répteis, anfíbios e mamíferos (inclusive o homem) (CRAMPTON; MCKAY; BARKER, 1996; NAVA et al., 2015; NAVA; GUGLIELMONE; MANGOLD, 2009; SAUER et al., 2000).

Morfologicamente o corpo dos carrapatos da família Ixodidae está recoberto, no caso dos machos, por uma grande placa quitinosa dorsal denominada escudo, que pode ter sua superfície ornamentada por manchas, depressões e desenhos (CAMARGO-MATHIAS; FURQUIM, 2013; SONENSHINE; ROE, 2014; WALKER;

KEIRANS; HORAK, 2000; WALL; SHEARER, 1997). As peças bucais encontram-se localizadas na região frontal, enquanto que, naqueles da família Argasidae essa placa dura está ausente e as peças bucais localizam-se ventralmente (CAMARGO-MATHIAS; FURQUIM, 2013; SONENSHINE; ROE, 2014; WALKER; KEIRANS; HORAK, 2000; WALL; SHEARER, 1997). Já a família Nuttalliellidae abriga apenas a espécie *Nuttalliella namaqua*, que reúne características das duas outras famílias, como integumento corrugado e pequena placa na região dorsal anterior (ANDERSON, 2002; SAUER et al., 2000; SONENSHINE; ROE, 2014).

Para se alimentarem, os carrapatos inserem seu especializado aparelho bucal na pele do hospedeiro e, no caso dos ixodídeos (exceto alguns indivíduos do gênero *Ixodes*), utilizam-se do cimento, composto por substâncias produzidas pelas suas glândulas salivares para ancorá-los (KOTÁL et al., 2015; SONENSHINE; ROE, 2014). A penetração do aparelho bucal no hospedeiro provoca danos nos capilares e nos pequenos vasos sanguíneos na região da lesão, com consequente formação do local ideal para a sua alimentação (CAMARGO-MATHIAS; FURQUIM; NUNES, 2011; FRANCISCHETTI et al., 2009; SAUER et al., 2000).

Os danos causados na pele do hospedeiro, além da própria presença do carrapato em alimentação, leva-os a reagir com a formação de um tampão hemostático, ativação da cascata de coagulação, vasoconstrição, respostas imuno-inflamatórias, entre outras, que tem como objetivo reparar o tecido lesionado (KAZIMÍROVÁ; ŠTIBRÁNIOVÁ, 2013; KOTÁL et al., 2015; PEKÁRIKOVÁ et al., 2015). Tais processos diminuem a eficácia do processo de alimentação e trazem efeitos negativos no rendimento reprodutivo dos carrapatos. Contudo, esses artrópodes são hábeis em driblar as respostas biológicas de seus hospedeiros, por meio da produção pelas suas glândulas salivares de um grande, diversificado e eficaz arsenal de moléculas biologicamente ativas, com ações anticoagulante, antiplaquetária, vasodilatadora, anti-inflamatória e imunomoduladora (FRANCISCHETTI et al., 2009; RIBEIRO et al., 2008; STEEN; BARKER; ALEWOOD, 2006; WIKEL; BERGMAN, 1997). Sugere-se que essas moléculas tenham co-evoluído ao longo da relação parasita-hospedeiro e que elas seriam cruciais para superar as barreiras biológicas do hospedeiro, permitindo que o carrapato tivesse garantida sua completa alimentação e desenvolvimento (KAZIMÍROVÁ; ŠTIBRÁNIOVÁ, 2013).

Dentre os elementos presentes na saliva dos carrapatos destacam-se os de origem glicoprotéica, lipoprotéica e lipídica, como calreticulina, fosfatase ácida,

esterases, aminopeptidases, metaloproteinases, lipocalinas e prostaglandinas (BROSSARD; WIKEL, 2004; CAMARGO-MATHIAS; FURQUIM; NUNES, 2011; MULENGA; BLANDON; KHUMTHONG, 2007; OLIVEIRA et al., 2011; STEEN; BARKER; ALEWOOD, 2006), entre muitas outras, com propriedades farmacológicas, atuando numa variedade de funções durante os períodos de parasitismo e de não parasitismo (CAMARGO-MATHIAS; FURQUIM; NUNES, 2011; FRANCISCHETTI et al., 2009; KOTÁL et al., 2015; WIKEL; BERGMAN, 1997).

Além de provocarem lesões nos seus hospedeiros, os carrapatos são também eficientes vetores de patógenos. Segundo Harwood e James (1979), o sucesso biológico dos carrapatos como vetores deve-se principalmente às suas características biológicas como o hematofagismo em todas as fases do seu desenvolvimento; fixação profunda nos hospedeiros, dificultando sua remoção; ingurgitamento lento, havendo tempo para inoculação de patógenos; parasitismo em diferentes espécies de hospedeiros; resistência à adversidade climática devido à grande esclerotização e também longevidade nos diferentes ambientes.

1.2 Carrapatos *Amblyomma cajennense*

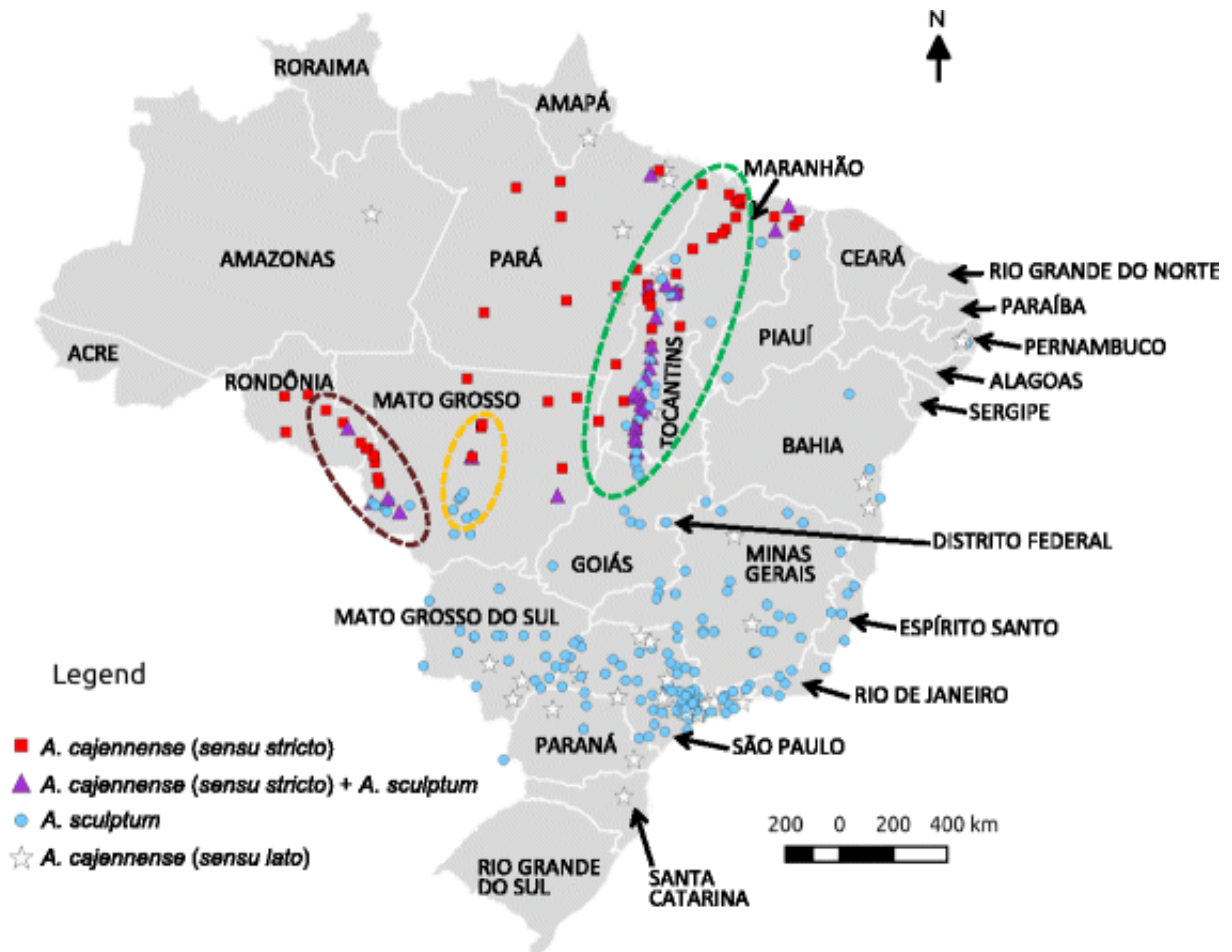
Os carrapatos do “complexo *A. cajennense*”, popularmente conhecidos como carrapatos-estrela, carrapatos do cavalo ou rodoleiros, têm grande importância médica, principalmente por serem encontrados parasitando humanos no Brasil, sobretudo nas fases larvais e ninfais. Além disso, podem ser vetores da bactéria *Rickettsia rickettsii*, causadora da Febre Maculosa Brasileira (FMB), também conhecida como febre das Montanhas Rochosas ou Febre do Carrapato, que pode levar o hospedeiro a óbito (MARTINS et al., 2010; SOARES et al., 2015). Ademais, esses carrapatos podem ser vetores da *Theileria equi*, um dos agentes etiológicos da piroplasmose equina (SCOLES et al., 2011).

Nas últimas décadas, a taxonomia e filogenia de carrapatos da família Ixodidae vem sendo revista, fazendo uso de caracteres morfológicos, comportamentais e, ainda mais recentemente, de técnicas moleculares como a do genoma mitocondrial (BLACK; PIESMAN, 1994; BURGER et al., 2012; CRAMPTON; MCKAY; BARKER, 1996; HORAK; CAMICAS; KEIRANS, 2002; SAMPIERI et al., 2014).

Até recentemente, o táxon *A. cajennense* (Fabricius, 1787) representava um grupo de espécies que ocorria em determinadas regiões das Américas do Norte,

Central e do Sul, com exceção do Chile e Uruguai (MARTINS et al., 2016). Entretanto, estudos recentes dividiram esse táxon em seis espécies válidas: *A. cajennense* sensu stricto (s.s) (restrito apenas à região da Amazônia), *A. mixtum* Kock, 1844 (do Texas ao Equador ocidental), *A. sculptum* Berlese, 1888 (norte da Argentina, Bolívia, Paraguai e Brasil), *A. interandinum* Beati, Nava e Cáceres, 2014 (vale interandino do Peru), *A. tonelliae* Nava, Beati e Labruna, 2014 (áreas secas do norte da Argentina, Bolívia e Paraguai), e *A. patinoi* Labruna, Nava e Beati, 2014 (Cordilheira oriental na Colômbia) (MARTINS et al., 2016). Diante dessa nova classificação, no Brasil o “complexo *A. cajennense*” ou *A. cajennense* sensu lato está atualmente representado por duas espécies: *A. cajennense* s.s, distribuída na zona Norte ocidental da Bacia Amazônica, enquanto que *A. sculptum* nos estados do Nordeste (Pernambuco e Piauí), Centro-Oeste (Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul), Sudeste (Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo) e o Sul do Estado do Paraná (**Figura 1**) (ESTRADA-PEÑA et al., 2014; MARTINS et al., 2016).

Figura 1. Distribuição geográfica de *Amblyomma cajennense* sensu stricto, *A. sculptum* e *A. cajennense* sensu lato no Brasil. Elipses de linhas tracejadas incluem as localidades que foram amostradas durante três expedições de campo para coletas de carrapatos, sendo a primeira expedição em verde, a segunda em marrom e a terceira em amarelo. Adaptado de Martins et al. (2016).



O *A. cajennense* sensu lato (**Figura 2**) tem o seu ciclo de vida dividido nos seguintes estágios: ovo, larva, ninfa e adulto, sendo este último o único com dimorfismo sexual. Ele necessita de três hospedeiros (trioxeno) para se alimentar de sangue, de linfa e de restos tissulares da epiderme e/ou da derme lesadas do hospedeiro (BEATI et al., 2013). As fêmeas iniciam a oviposição com cerca de 12 dias após terem completado seu processo de alimentação (ingurgitada), podendo ovipositar até oito mil ovos em um período de 15 dias após o processo de alimentação, os quais eclodirão em cerca de cinco semanas. Em oito ou dez dias as larvas estarão aptas a infestarem seu primeiro hospedeiro e o ciclo de vida se completará em três ou quatro meses, podendo esse período ser diferente em regiões temperadas, onde pode haver hibernação das fases ninfal e/ou adulta (BEATI et al., 2013). No final de cada

período parasitário, as larvas e ninfas ingurgitadas se desprenderão do hospedeiro e sofrerão ecdise (muda) (BEATI et al., 2013).

Dada sua importância como vetores de patógenos, ressalta-se que esses artrópodes podem ser encontrados em todas as fases do ciclo de vida, parasitando aves domésticas (galinhas, perus) e silvestres (seriemas), além de mamíferos (cavalo, boi, carneiro, cabra, cão, porco, capivara) (SOARES et al., 2015). O homem também é frequentemente parasitado por *A. cajennense* s.l., sobretudo pelas larvas e ninfas (SOARES et al., 2015).

Figura 2. Carrapatos *Amblyomma cajennense* sensu lato. **A.** Macho adulto. **B.** Fêmea adulta. Adaptado de Brites-Neto, Duarte e Martins (2015).



1.3 Carrapatos *Rhipicephalus microplus*

A espécie *Rhipicephalus microplus* (**Figura 3**), anteriormente chamada de *Boophilus microplus* ou *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, é popularmente conhecida como o carrapato do boi. Essa espécie é endêmica de áreas tropicais e subtropicais do mundo (ESTRADA-PEÑA et al., 2006) e, apesar de ter o gado como hospedeiro preferencial, pode ser encontrado parasitando búfalos, cavalos, cabras, ovelhas, cães e animais silvestres (FRANQUE et al., 2007).

No Brasil, é o mais importante ectoparasita dos bovinos que quando parasitados, perdem sua qualidade, bem como a de seus produtos e isso provoca prejuízos que incluem a mortalidade e a redução das taxas de natalidade dos mesmos (GHOSH; AZHAHIANAMBI; FUENTE, 2006; HIGA et al., 2015). Essa espécie é responsável pela transmissão de babesias (*Babesia bovis* e *B. bigemina*) e anaplasmas (*Anaplasma marginale*), que causam doenças responsáveis por perdas econômicas que em 2015 chegaram a três bilhões de dólares (HIGA et al., 2015).

Além destas, transmitem também a erliquiose que compreende um grupo emergente de zoonoses infecciosas causada por bactérias gram-negativas do gênero *Ehrlichia* (família Anaplasmataceae, Ordem Rickettsiales) (KHAMESIPOUR et al., 2018; VIEIRA et al., 2011). Diversas espécies como *E. chaffeensis*, *E. muris*, *E. ewingii*, *E. canis*, *E. ruminantium* e *E. risticii* são conhecidas por infectar humanos e diversos outros animais como bois, ovelhas, cabras, cavalos, cães, veados e pequenos roedores (KHAMESIPOUR et al., 2018; VIEIRA et al., 2011).

No caso dos humanos, a erliquiose monocítica causada pela *E. chaffeensis* tem sido ainda uma doença negligenciada, visto que seus sintomas são semelhantes ao de uma gripe, como febre, dor de cabeça, fadiga e dores musculares (BUZZARD; BISSELL; THOMPSON BASTIN, 2018). Em casos mais extremos, pode ocasionar choques séptico, meningoencefalite e síndrome da insuficiência respiratória aguda; e caso o diagnóstico seja incorreto ou tardio, pode levar o hospedeiro à morte (BUZZARD; BISSELL; THOMPSON BASTIN, 2018).

Já nos bovinos, a erliquiose está relacionada às bactérias da espécie *E. ruminantium* (PETER; BURRIDGE; MAHAN, 2002) encontrada no continente africano e em algumas ilhas do Caribe provocando altos índices de mortalidade nos animais infectados (acima de 80%) (MATOS et al., 2016).

No Brasil, até recentemente apenas três espécies do gênero *Ehrlichia* haviam sido reportadas: *E. canis*, *E. ewingii* e *E. chaffeensis* (VIEIRA et al., 2011). Contudo, Cabezas-Cruz et al. (2012) descreveram uma nova espécie, a *E. minasensis*, originalmente isolada da hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de carrapatos *R. microplus*. A cultura e manutenção desta pode ser realizada em células de carrapatos de diversas espécies, contudo, seu potencial de infecção e de patogenicidade para os bovinos ainda é desconhecida (AGUIAR et al., 2014; CARVALHO et al., 2016).

Figura 3. Carrapatos *Rhipicephalus microplus*. **A.** Macho adulto. **B.** Fêmea adulta. Adaptado de Brites-Neto; Duarte e Martins (2015).



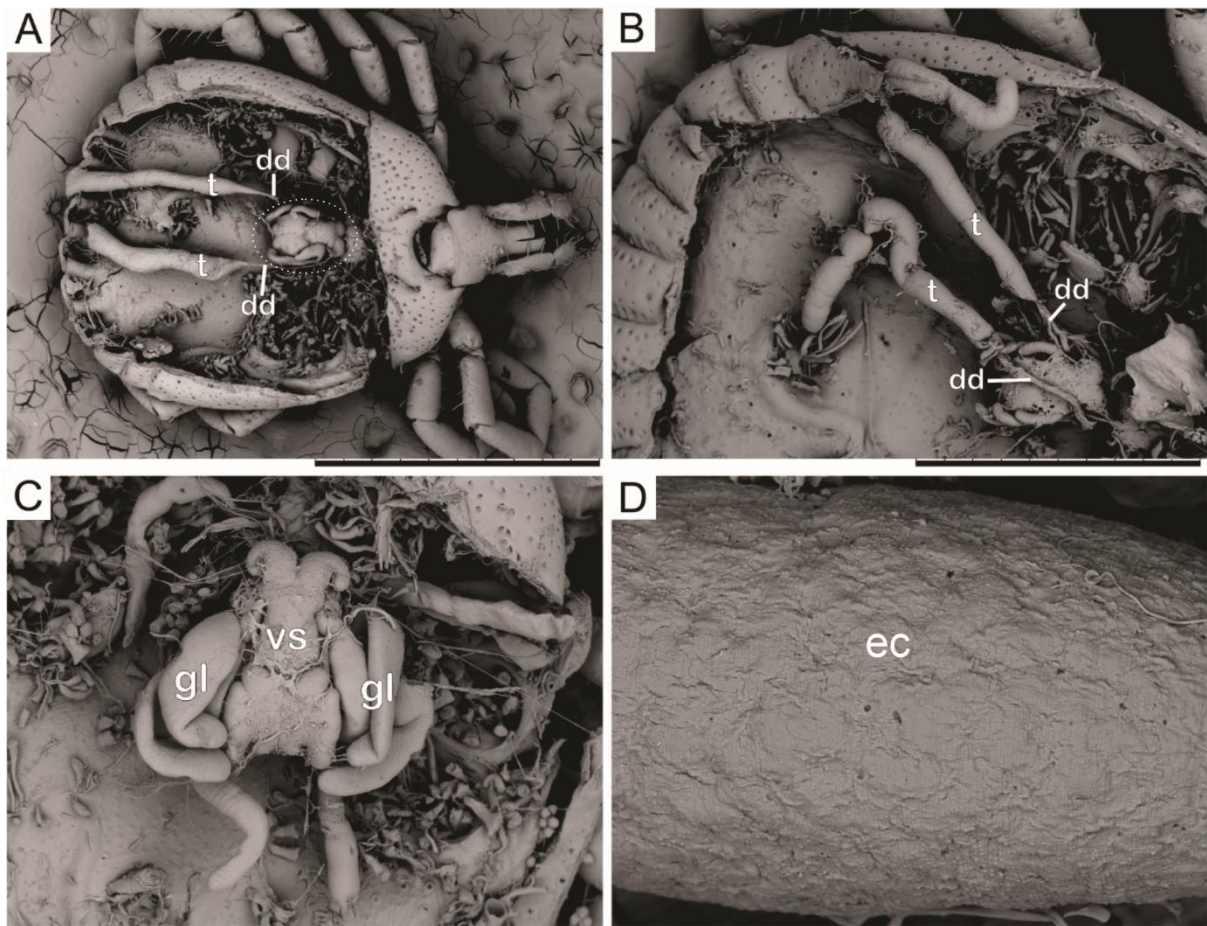
1.4 Sistema reprodutor masculino dos carrapatos

O sistema reprodutor masculino dos carrapatos das famílias Argasidae e Ixodidae apresentam morfologia semelhante, porém, são relatadas diferenças acentuadas entre os dois grupos, as quais podem ser consideradas um importante carácter para os estudos taxonômicos e filogenéticos (SAMPIERI et al., 2014).

Em ambas as famílias o sistema reprodutor masculino localiza-se dorsolateralmente no opistossoma e está composto por um par de testículos tubulares (ou testículo único em algumas espécies), um par de vasos deferentes, um par de vesículas seminais, um complexo glandular acessório multilobulado e um ducto ejaculatório (ANHOLETO et al., 2015; SAMPIERI et al., 2014; SONENSHINE; ROE, 2014).

Em espécies da família Ixodidae os testículos geralmente não estão conectados entre si, estando o direito e o esquerdo individualizados. Este padrão foi observado em *Dermacentor andersoni* (DOUGLAS, 1943), *A. cajennense* (**Figura 4**), *A. sculptum* e *A. aureolatum* (ANHOLETO et al., 2015; SAMPIERI et al., 2014), em *R. appendiculatus*, *R. evertsi evertsi* e *R. simus* (WYSOKI; BOLLAND, 1978).

Figura 4. Micrografia eletrônica de varredura dos testículos de *Amblyomma cajennense* sensu lato em jejum. **A.** Visão geral dos testículos (**t**) no opistossoma e ductos deferentes (**dd**). **B.** Detalhe da região proximal dos testículos (**t**) mostrando os ductos deferentes (**dd**). **C.** Visão geral do complexo de glândulas acessórias do aparelho genital (**gl**) e vesícula seminal (**vs**). **D.** Detalhe da superfície rugosa dos testículos, evidenciando os espermatocistos (**ec**) em seu interior. Tracejado = complexo de glândulas acessórias. **Barras:** A= 2mm; B-C= 1mm; D= 100µm. Adaptado de Anholeto et al. (2015).



Estudo recente desenvolvido por Sampieri et al. (2014) mostrou a presença de uma conexão na região distal dos testículos de *A. triste*, sob a forma de um fino tubo, situação essa também encontrada em *Ornithodoros moubata* (SONENSHINE; ROE,

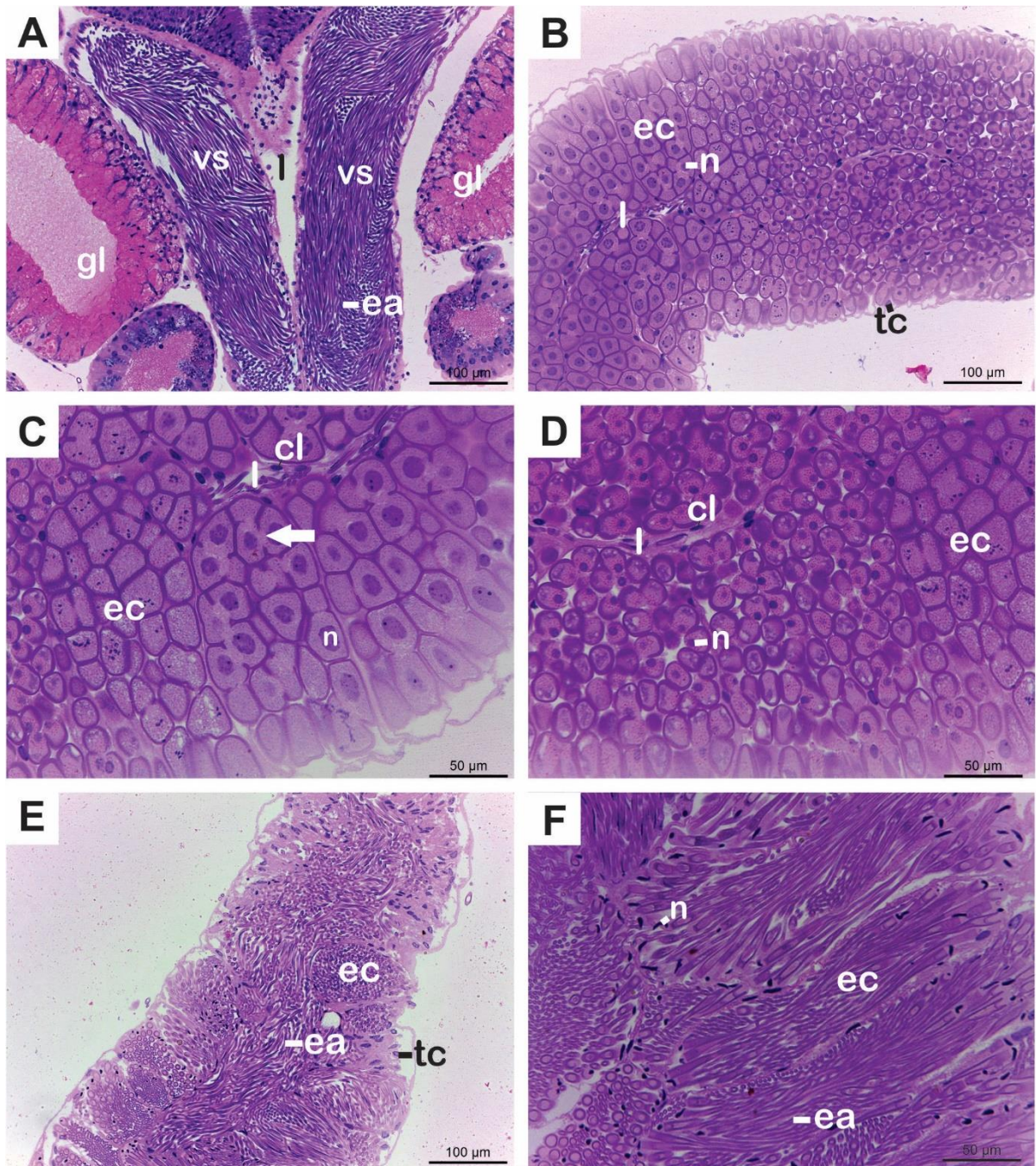
2014). Na família Argasidae, assim como na espécie *O. rostratus*, os testículos são fundidos posteriormente e tem a forma de “U” (HARRISON; FOELIX, 1999).

Funcionalmente, os testículos são responsáveis pela produção das células germinativas, as quais encontram-se agrupadas e envoltas por um epitélio pavimentoso simples constituindo o espermatocisto (ANHOLETO; SAMPIERI; CAMARGO-MATHIAS, 2018; SONENSHINE; ROE, 2014). Basicamente o desenvolvimento das células germinativas ocorre em duas etapas: a) espermatogênese, caracterizada pela sequência de divisões mitóticas e meióticas das espermatogônias e dos espermatócitos, originando as espermatídes e b) a espermiogênese, desenvolvimento final (diferenciação) das espermatídes que originarão os espermatozóides (SONENSHINE; ROE, 2014).

Para a maioria das espécies de carrapatos da família Ixodidae, a espermatogênese se inicia no final do estágio de ninfa, caso dos carrapatos *R. sanguineus* (OLIVEIRA et al., 2012) e é finalizada logo após a ecdise, porém, esta não é uma regra, visto que para algumas espécies, a espermatogênese só é concluída quando o macho atinge o estágio adulto e inicia o processo de alimentação (ANHOLETO et al., 2015; OLIVER; BRINTON, 1972; SONENSHINE; ROE, 2014). Para algumas espécies de argasídeos e as do extinto gênero *Aponomma*, no entanto, este processo ocorre independentemente do estágio alimentar em que o adulto se encontre (DUMSER; OLIVER, 1981; HARRISON; FOELIX, 1999).

Os primeiros estágios da espermatogênese nos testículos de machos adultos e alimentados de carrapatos ixodídeos, como os da espécie *A. cajennense*, ocorrem do sentido distal para o proximal (**Figura 5**) (ANHOLETO et al., 2015; HARRISON; FOELIX, 1999; SAMPIERI et al., 2014). Em cada testículo há um pequeno canal que, depois de deixarem os espermatocistos, as espermatídes percorrem até atingirem a região proximal dos testículos, início dos vasos deferentes conectados às vesículas seminais. Estas últimas, por sua vez estão conectadas a um complexo de glândulas acessórias multilobuladas (ANHOLETO et al., 2015; HARRISON; FOELIX, 1999; SONENSHINE; ROE, 2014).

Figura 5. Secções histológicas do sistema reprodutor de *Amblyomma cajennense* sensu lato após 10 dias de alimentação, coradas pela hematoxilina-eosina. **A.** Complexo multilobulado de glândulas acessórias (**gl**) e vesícula seminal (**vs**). **B.** Região proximal do testículo. **C.** Detalhe da região proximal, mostrando pontes citoplasmáticas entre as células germinativas (**seta**). **D.** Região mediana. **E.** Região distal. **F.** Detalhe da região distal evidenciando a presença das espermátides alongadas (**ea**). **cl** = células somáticas ao redor do lúmen; **ea** = espermátides alongadas; **ec** = espermatocistos; **l** = lúmen; **n** = núcleo; **tc** = tecido conjuntivo. Adaptado de Anholeto et al. (2015).



A etapa final da espermiogênese ocorre no trato genital da fêmea, onde os espermatozoides serão capacitados e fecundarão os óvulos (KISZEWSKI; MATUSCHKA; SPIELMAN, 2001).

O complexo de glândulas acessórias multilobuladas, associado às vesículas seminais, desempenham papel fundamental na reprodução dos carrapatos, visto as mesmas serem responsáveis pela secreção de glicoproteínas, mucoproteínas, lipoproteínas, glicosaminoglicanos, entre outras substâncias necessárias para a formação do espermatóforo e do fluido seminal, que possibilitará a transferência e capacitação dos espermatozoides no trato reprodutivo da fêmea (GARCIA-FERNANDEZ; GARCIA; GARCIA, 1998; SONENSHINE; ROE, 2014).

A transferência do esperma para a fêmea se dá durante a cópula, por meio de um espermatóforo, formado externamente no gonópodo do macho após a localização do gonópodo da fêmea (SONENSHINE; ROE, 2014). O macho libera, primeiramente, uma gota contendo glicosaminoglicanos e proteínas para fora da abertura genital. Posteriormente, uma massa de esperma e líquido espermático é ejaculada dentro dessa gota, que se expande como um “balão”. Em seguida, o endoespermatóforo é injetado fechando o espermatóforo (KISZEWSKI; MATUSCHKA; SPIELMAN, 2001; SAUER; HAIR, 1986). O espermatóforo possui formato de pera e está composto pelo ectoespermatóforo, que envolve o líquido espermático, espermátides, grânulos de proteínas, simbiontes e o endoespermatóforo (KISZEWSKI; MATUSCHKA; SPIELMAN, 2001; SAUER; HAIR, 1986). Hayes, Burgdorfer e Aeschlimann (1980) sugeriram que poderia ocorrer transmissão da *R. rickettsii* por machos infectados para as fêmeas saudáveis durante a cópula, o que representaria importância ecológica na manutenção dos patógenos causadores da Febre Maculosa na natureza.

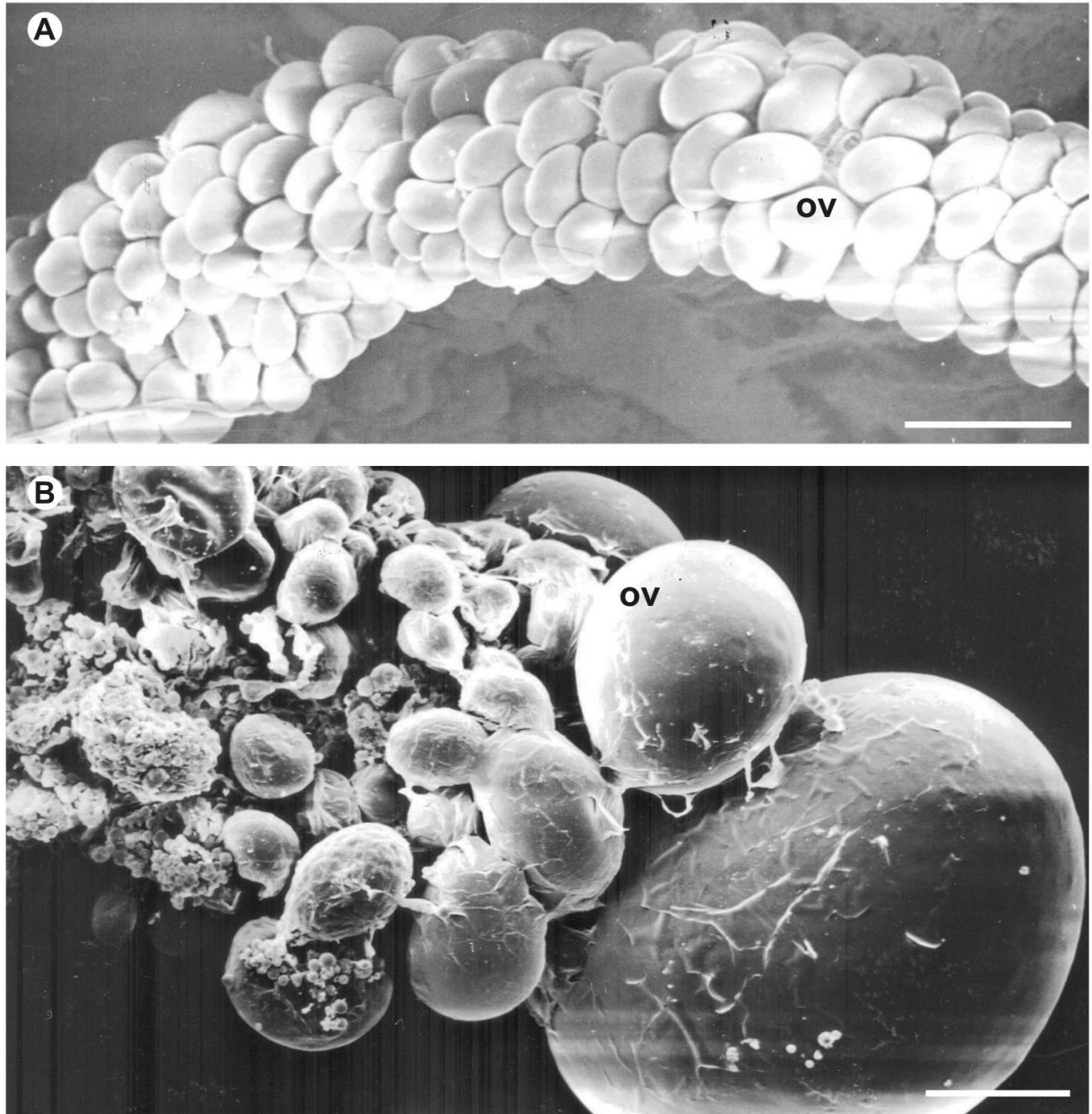
1.5 Sistema reprodutor feminino dos carrapatos

O sistema reprodutor feminino dos carrapatos está localizado no terço posterior do corpo e estende-se na direção póstero-lateral. Consiste em um ovário tubular em forma de ferradura, um par de ovidutos, um útero, uma vagina e um par de glândulas acessórias que desembocam na abertura genital (CAMARGO-MATHIAS, 2013, 2018; OLIVEIRA et al., 2005; SAITO et al., 2005).

Até o ano de 2003, estudos de Balashov (1983), Sonenshine (1991) e Till (1961) não haviam classificado os ovários segundo a sua morfologia, o que veio a ocorrer apenas em 2004 por meio de resultados que foram obtidos por Denardi et al. (2004), quando da realização de estudos morfológicos. Neles ficou estabelecido que os ovários destes ectoparasitas seriam do tipo panoístico, onde todas as células germinativas presentes corresponderiam às ovogônias (futuros ovócitos), não estando presentes, portanto, nem as células nutridoras e nem as foliculares.

O ovário desses ectoparasitas, em geral, é um órgão formado por uma parede de pequenas células epiteliais com núcleos esféricos e que delimitam um lúmen (CAMARGO-MATHIAS, 2018) onde os ovócitos nos vários estágios de desenvolvimento se fixarão para serem aí nutridos. A fixação dos ovócitos à parede do ovário é realizada pelas células do pedicelo (**Figura 6**) (CAMARGO-MATHIAS, 2018; DENARDI et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2005; OLIVEIRA; CAMARGO-MATHIAS; BECHARA, 2007; RICARDO et al., 2007; SAITO et al., 2005; SONENSHINE; ROE, 2014).

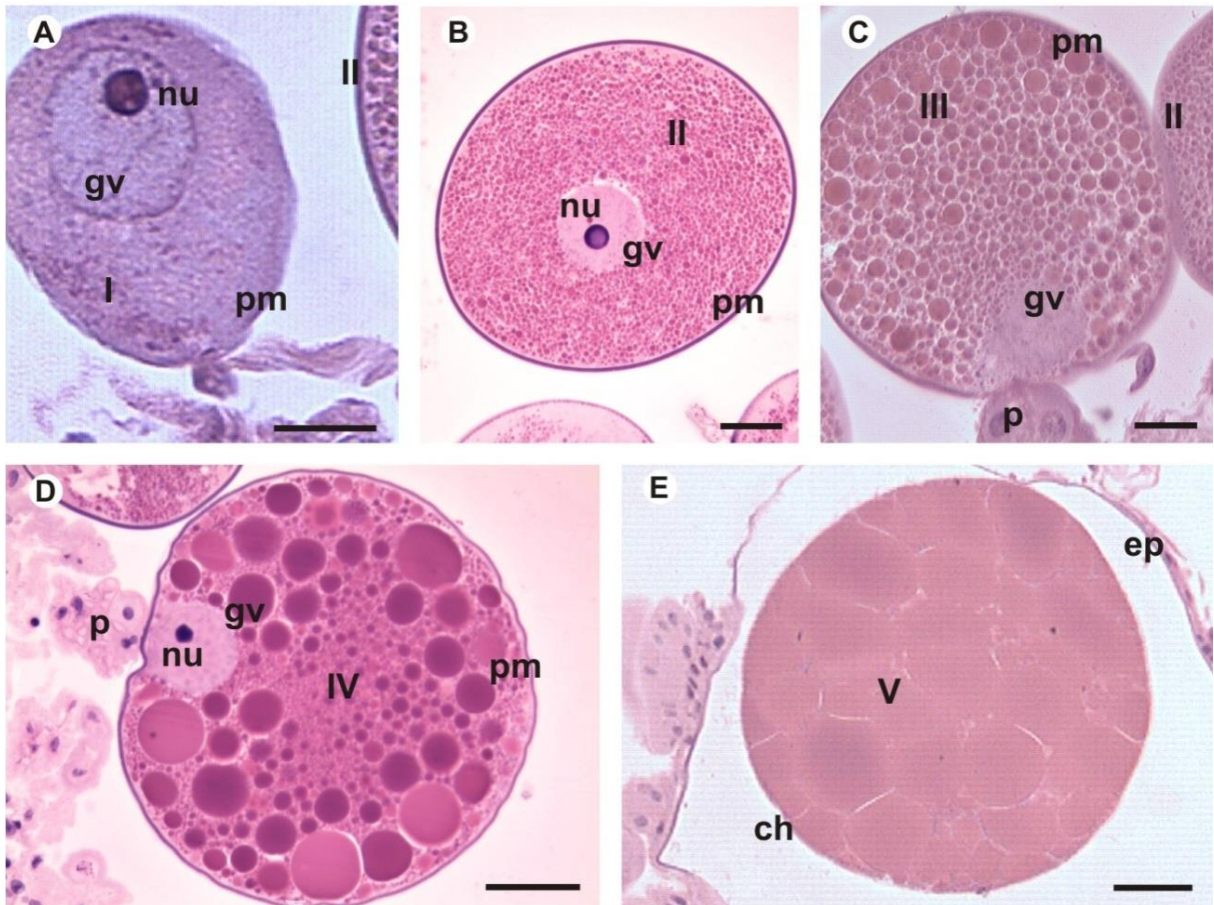
Figura 6. A-B. Microscopia eletrônica de varredura de ovário de fêmeas semi-ingurgitadas de carrapatos *Amblyomma cajennense* sensu lato mostrando ovócitos (ov) em vários estágios de desenvolvimento. Adaptado de Camargo-Mathias (2013).



Nos ovários dos ixodídeos, ovócitos em estágios iniciais de desenvolvimento (I e II) são encontrados na região distal do órgão, enquanto aqueles em estágios mais avançados de desenvolvimento (III, IV e V), estão localizados na região proximal (CAMARGO-MATHIAS, 2013, 2018). O desenvolvimento dos ovócitos é assincrônico, uma vez que a deposição do vitelo nos mesmos não acontece simultaneamente, o que garante que estas células possam ser fecundadas também em tempos diferentes (DENARDI et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2005).

Os ovócitos dos carrapatos ixodídeos são classificados em estágios de desenvolvimento segundo critérios morfológicos como: a) aspecto citoplasmático, b) localização da vesícula germinal, c) presença e constituição dos grânulos de vitelo e d) presença de cório (DENARDI et al., 2004). Em *A. cajennense* (DENARDI et al., 2004), *R. microplus* (SAITO et al., 2005), *R. sanguineus* (OLIVEIRA et al., 2005) e *A. brasiliensis* (SANCHES; BECHARA; CAMARGO-MATHIAS, 2010) os ovócitos são classificados em cinco estágios de desenvolvimento (I-V), enquanto que em *A. triste* (OLIVEIRA; CAMARGO-MATHIAS; BECHARA, 2006), em quatro estágios (I-IV) (**Figura 7**).

Figura 7. Secções histológicas do ovário do carrapato *Rhipicephalus sanguineus* coradas pela H-E. **A.** Detalhe do ovócito I (I), mostrando nucléolo (**nu**), vesícula germinal (**gv**) e limite celular (**pm**). **B.** Detalhe do ovócito II (II), mostrando nucléolo (**nu**), vesícula germinal (**gv**) e limite celular (**pm**). **C.** Detalhe do ovócito III (III), onde pode ser observada a vesícula germinal (**gv**), o limite celular (**pm**) e o pedicelo (**p**). **D.** Detalhe do ovócito IV (IV), mostrando nucléolo (**nu**), vesícula germinal (**gv**), limite celular (**pm**) e o pedicelo (**p**). **E.** Detalhe do ovócito V (V), onde podem ser observados o epitélio ovariano (**ep**) e o cório (**ch**). **Barras:** A-D= 0,02 mm; E= 0,1 mm. Adaptado de Camargo-Mathias (2013).



1.6 Métodos de controle de carrapatos

A importância médico-veterinária dos carrapatos vem se consolidando e os estudos avançam na busca por diferentes métodos de controle que sejam eficazes e ao mesmo tempo sustentáveis (ANHOLETO et al., 2017a; OLIVEIRA et al., 2018; OLIVEIRA; BECHARA; CAMARGO-MATHIAS, 2008; ROMA et al., 2009). Atualmente o método de controle mais utilizado é aquele químico que faz uso de compostos preferencialmente de natureza sintética os quais, apesar de serem eficazes, provocam sérios inconvenientes por: a) terem altos preços no mercado, b) necessitarem de equipamentos, instalações e treinamento de mão-de-obra adequados para a sua

aplicação e c) indução de resistência em curto espaço de tempo (NOLAN, 1985; PRUETT, 1999). Ademais, os resíduos deixados por esses produtos agridem o meio ambiente, levando à contaminação do solo, cursos d'água, além da fauna e da flora, o que vem comprometer inclusive a saúde humana (NOLAN, 1985; OLIVEIRA; BECHARA; CAMARGO-MATHIAS, 2008; PRUETT, 1999; ROMA et al., 2009).

Os acaricidas mais comercializados são aqueles com bases químicas que compreendem: organofosforados, carbamatos, nitroguanidinas, fenilpirazoles, formamidinas, piretróides, lactonas macrocíclicas e feniluréias (BLAIR et al., 2016; HÄUSERMAN et al., 1992; PÉREZ-GONZÁLEZ et al., 2014; WAKITA et al., 2003). A substituição periódica dos princípios ativos tem se tornado uma necessidade, uma vez que os ectoparasitas tem desenvolvido sistematicamente forte estratégia de sobrevivência, que inclui: redução na taxa de penetração do acaricida no carrapato, mudanças no metabolismo dos produtos, armazenamento e excreção dos produtos, parâmetros estes que podem levar o carrapato a uma menor sensibilidade aos efeitos dos tóxicos (NOLAN, 1985; VENDRAMINI et al., 2012). A seleção de novas linhagens de carrapatos resistentes aos químicos sintéticos reside também no uso incorreto e indiscriminado destes (HÄUSERMAN et al., 1992). Isso torna-se relevante a partir do conhecimento de que se comprovada a instalação da resistência a um determinado acaricida, o processo é irreversível e o emprego continuado dessa mesma base química não terá sucesso no controle (ABBAS et al., 2014; HÄUSERMAN et al., 1992).

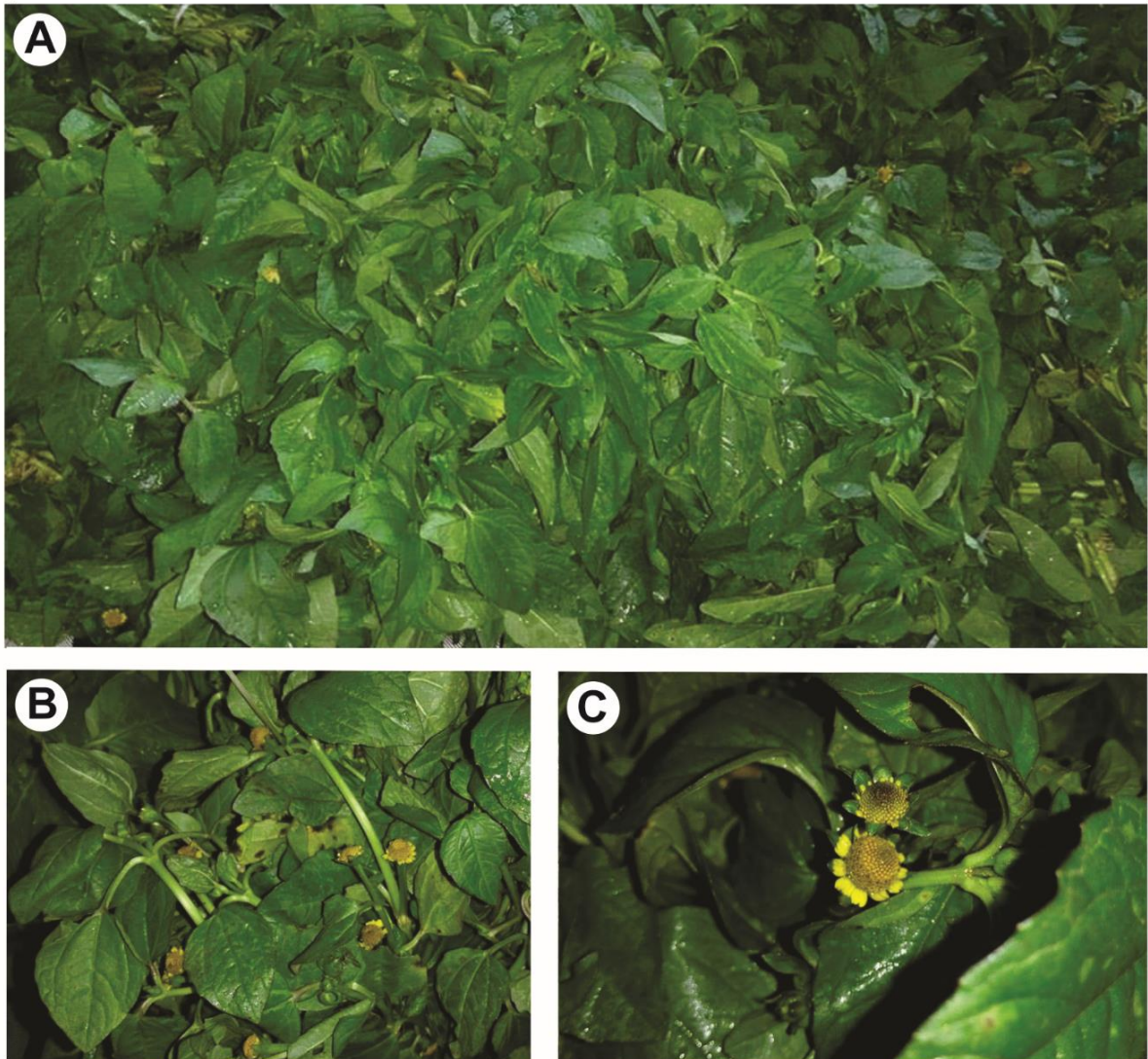
Assim, a busca por novos produtos acaricidas que sejam mais baratos, e ao mesmo tempo apresentem menor toxicidade e causem menor impacto tanto ao meio ambiente quanto aos organismos não alvos tem sido intensificada. Dentre elas pode ser citada a utilização de compostos de origem natural, como os de extratos de plantas, que possuiriam bioativos com potencial ação para controlar diferentes pragas (ANHOLETO, 2017a; CASTRO et al., 2014; DENARDI et al., 2010; REMEDIO et al., 2015; MATOS, 2014; VENDRAMINI et al., 2012).

1.7 *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen

Spilanthes acmella var *oleracea* ou *Spilanthes oleracea* ou *Acmella oleracea* (**Figura 8**) é uma planta introduzida no Brasil e que é encontrada em regiões tropicais próximas à linha do Equador na África, Ásia e América do Sul (FAVORETO; GILBERT, 2010). No Brasil, é popularmente conhecida como jambu, agrião-do-pará, agrião-do-

norte ou agrião-bravo, sendo um vegetal típico da região norte muito utilizado na culinária local em pratos como o Tacacá e o Pato no Tucupi (FAVORETO; GILBERT, 2010). É herbácea de até 40 cm de altura, quase rasteira, com flores pequenas, amarelas e dispostas em capítulos globosos (FAVORETO; GILBERT, 2010). A ingestão de suas partes aéreas (flores, folhas e caule) provoca leve formigamento na língua, resultado do efeito anestésico dos metabólitos secundários nelas presentes (DUBEY et al., 2013; FAVORETO; GILBERT, 2010; RAMSEWAK, 1999). Além da culinária, ela também é utilizada na medicina popular como potente analgésico e anestésico local, no tratamento de aftas, herpes, afecções da garganta, além de apresentar atividades fungistática, fungicida e inseticida (FABRY; OKEMO; ANSORG, 1996; NIGRINIS; CARO; OLARTE, 1986; RAMSEWAK, 1999; TORRES; CHÁVEZ, 2001).

Figura 8. A-B. Flores, folhas e caules de Jambu (*Spilanthes acmella* L. Murray). **C.** Detalhe da flor. Adaptado de Camargo-Mathias (2018).



A literatura disponível tem relatado que extratos de *A. oleracea* têm sido capazes de controlar a proliferação de artrópodes, atuando como um eficiente inseticida contra larvas de *Aedes aegypti* (Diptera), de adultos da *Plutella xylostella* (Lepidoptera) e da barata americana (*Periplaneta americana*) (Blattodea) (KADIR et al., 1989; RAMSEWAK, 1999; SHARMA et al., 2012). Estudos recentes realizados por Castro et al. (2014) e Oliveira et al. (2016) demonstraram que essa planta teria também atividade acaricida, por meio dos extratos produzidos de suas partes aéreas (flor, folha e caule), os quais quando utilizados contra carrapatos *R. microplus* teriam mostrado alta eficácia principalmente no controle de larvas e de fêmeas ingurgitadas (CASTRO et al., 2014).

Diversos compostos já foram identificados em extratos obtidos de diferentes regiões da planta (flores, folhas e caules), tais como óleos voláteis (beta cariofileno, limoneno e timol), fenólicos (ácido vanílico e ácido trans-ferulico), fitoesteróis (estigmasterol e β -sitosterol), polissacarídeos (ramnogalacturonana), cumarina (escopoletina) e alquilamidas (BARBOSA et al., 2016; CAVALCANTI, 2008; PRACHAYASITTIKUL et al., 2013; SARAF; DIXIT, 2002; SPELMAN et al., 2011).

De modo geral, os efeitos biológicos têm sido atribuídos ao espilantol ou afinina [N-2-Metilpropil-2,6,8-decatrienamida ou N-isobutil-2E,6Z,8E-decatrienamida], uma alcamida alifática de fórmula molecular $C_{14}H_{23}NO$ encontrada nas flores, folhas e caule de *A. oleracea* (MACEDO-RIBEIRO et al., 2008; RAMSEWAK, 1999). Esse composto também ocorre em plantas das famílias Asteracea, Solanacea e Piperacea (PRACHAYASITTIKUL et al., 2013).

A toxicidade do espilantol extraído de *A. oleracea* já foi investigada por autores como Cilia-López et al. (2010), que observaram que ele agiu como estimulante do sistema nervoso central de camundongos, aumentando a atividade motora e a irritabilidade, efeitos esses que perduraram por aproximadamente 180 minutos. Após esse período os animais retomaram o comportamento normal. Em um estudo realizado por Nomura et al. (2013) para se testar a atividade antinociceptiva do extrato etanólico das flores de *A. oleracea*, o mesmo se mostrou seguro nas doses de 5, 50 e 500 mg/kg quando administrado via intraperitoneal em camundongos, provocando efeito anestésico, sem apresentar sintomas de toxicidade e sem causar morte durante sete dias de observação.

Diante desse cenário, fazer uso do espilantol também como acaricida no controle de várias espécies de carrapatos tem-se tornado uma perspectiva positiva o que vem estimular o uso deste princípio ativo com fins comerciais, uma vez que o mesmo já é utilizado com frequência em formulações de várias naturezas que se destinam a: higiene oral, inseticida, produto cosmético para banho e ainda como agente terapêutico no tratamento de reumatismo e condicionamento da pele, além de fazer parte da composição de xampus, sabonetes e cremes, com o apelo de potencializar a sensação de refrescância (CAVALCANTI, 2008; PRACHAYASITTIKUL et al., 2013).

1.8 Linhagens de células de carrapatos

Para o estudo de novas moléculas com potencial acaricida ainda são utilizados animais de experimentação, visto que os testes disponíveis visam a exposição do carrapato ao produto. Diante do hábito hematófago, é necessário alimentar o ectoparasita em um animal vertebrado vivo (hospedeiro), como por exemplo coelhos, cães e bovinos, uma vez que as técnicas de alimentação artificial disponíveis não são totalmente eficazes e ainda dependem do sangue de hospedeiros (TAJERI; RAZMI; HAGHPARAST, 2016).

Entretanto, sistemas de cultura *in vitro*, particularmente linhagens celulares contínuas derivadas de carrapatos, têm tido um papel inestimável e insubstituível em muitos aspectos da pesquisa de patógenos e vetores, incluindo biologia básica de parasitas, relações hospedeiro-vetor-patógeno e controle de doenças (BELL-SAKYI et al., 2007).

Além disso, o uso da cultura de células de carrapatos é uma alternativa promissora ao uso de animais de experimentação, já que a redução do uso de animais hospedeiros (coelhos, por exemplo) é uma exigência dos órgãos reguladores da pesquisa com animais. Ressalte-se que ensaios *in vitro* para o escaneamento de novas substâncias acaricidas e o desenvolvimento de drogas tem sido considerados mais precisos e seguros, pois permitem que os parâmetros experimentais sejam rigorosamente controlados, reduzindo a variabilidade entre os experimentos. O custo destas técnicas também é menor, uma vez que não necessitam de instalações (biotérios) e insumos para a criação e manutenção dos hospedeiros de carrapatos (COSSIO-BAYUGAR; WAGNER; HOLMAN, 2002; GUZZIE, 1994).

Sistemas de cultivo *in vitro* podem ser utilizados em: análises morfológicas, isolamento, propagação e estudos de patógenos (bactérias e vírus) transmitidos por carrapatos, pesquisas de biologia e fisiologia desses vetores, imunidade inata, alérgenos, proteômica, genômica, microbioma, vacinas anti-carrapatos, entre outras (BELL-SAKYI et al., 2007).

De acordo com Bell-Sakyi et al. (2007), atualmente estão disponíveis mais de 40 linhagens celulares, obtidas até agora de 13 espécies de ixodídeos e de uma de argasídeos. Dois exemplos de linhagens celulares obtidas de ixodídeos são a BME/CTVM6, derivadas de embriões de carrapatos *R. microplus* resistentes a

organofosforados, organoclorados e amitraz, e BME/CTVM2, derivadas de carrapatos embriões de *R. microplus* susceptíveis a acaricidas (KOH-TAN et al., 2016).

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

a) O extrato etanólico bruto obtido a partir das flores, folhas e caules de *A. oleracea* tem potencial para controlar machos e fêmeas de carrapatos *A. cajennense*.

b) Para *A. cajennense*, a concentração letal de 50% (CL₅₀) obtida para as fêmeas semi-ingurgitadas é de 17.6335 mg/mL (limites: 5.2506 – 23.5335 mg/mL), enquanto que para os machos alimentados é de 29.4534 mg/mL (limites: 24.4467 – 41.3847 mg/mL).

c) As concentrações de 6,2; 12,5 e 25 mg/mL do extrato etanólico de *A. oleracea* ocasionam danos morfológicos e ultraestruturais principalmente nas células secretoras do complexo de glândulas acessórias de machos de *A. cajennense*, danos estes que são dose-dependentes.

d) Nas fêmeas de *A. cajennense*, o extrato etanólico bruto de *A. oleracea* nas concentrações 3,1; 6,2 e 12,5 mg/mL provoca alterações nos ovócitos, que são também dose-dependentes.

f) O análogo alcino do espilantol reduz a viabilidade e altera a morfologia das células das duas linhagens obtidas de embriões de *R. microplus*: BME/CTVM6 de carrapatos

resistentes a organofosforados, organoclorados e amitraz, e BME/CTVM2 de carrapatos susceptíveis a acaricidas.

g) O análogo alcino do espilantol reduz significativamente nas células BME/CTVM6 a taxa de infecção por *Ehrlichia minasensis*.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, R. Z.; ZAMAN, M. A.; COLWELL, D. D.; GILLEARD, J.; IQBAL, Z. Acaricide resistance in cattle ticks and approaches to its management: the state of play. **Veterinary Parasitology**, v. 203, n. 1–2, p. 6–20, 2014.
- AGNOLIN, C. A.; OLIVO, C. J.; LEAL, M. L. R.; BECK, R. C. R.; MEINERZ, G. R.; PARRA, C. L. C.; MACHADO, P. R.; FOLETTTO, V.; BEM, C. M.; NICOLODI, P. R. S. Eficácia do óleo de citronela [*Cymbopogon nardus* (L.) Rendle] no controle de ectoparasitas de bovinos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 4, p. 482–487, 2010.
- AGUIAR, D. M.; ZILIANI, T. F.; ZHANG, X.; MELO, A. L. T.; BRAGA, Í. A.; WITTER, R.; FREITAS, L. C.; RONDELLI, A. L. H.; LUIS, M. A.; SORTE, E. C. B.; JAUNE, F. W.; SANTARÉM, V. A.; HORTA, M. C.; PESCADOR, C. A.; COLODEL, E. M.; SOARES, H. S.; PACHECO, R. C.; ONUMA, S. S. M.; LABRUNA, M. B.; MCBRIDE, J. W. A novel *Ehrlichia* genotype strain distinguished by the TRP36 gene naturally infects cattle in Brazil and causes clinical manifestations associated with ehrlichiosis. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 5, n. 5, p. 537–544, 2014.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia molecular da célula**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.
- ALONSO, I. G.; YAMANE, L. T.; FREITAS-BLANCO, V. S.; NOVAES, L. F. T.; FRANZ-MONTAN, M.; PAULA, E.; RODRIGUES, M. V. N.; RODRIGUES, R. A. F.; PASTRE, J. C. A new approach for the total synthesis of spilanthol and analogue with improved anesthetic activity. **Tetrahedron**, v. 74, n. 38, p. 5192–5199, 2018.
- ANDERSON, J. F. The natural history of ticks. **The Medical Clinics of North America**, v. 86, n. 2, p. 205–18, 2002.
- ANHOLETO, L. A.; NUNES, P. H.; REMÉDIO, R. N.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Testes of fed and unfed *Amblyomma cajennense* ticks (Acari: Ixodidae). First morphological data. **Acta Zoologica**, v. 96, n. 3, p. 375–382, 2015.
- ANHOLETO, L. A.; OLIVEIRA, P. R.; RODRIGUES, R. A. F.; SPINDOLA, C. S.;

- LABRUNA, M. B.; PIZANO, M. A.; CASTRO, K. N. C.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Potential action of extract of *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen to control *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) ticks. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 8, n. 1, p. 65–72, 2017a.
- ANHOLETO, L. A.; OLIVEIRA, P. R.; RODRIGUES, R. A. F.; SPINDOLA, C. D. S.; LABRUNA, M. B.; PIZANO, M. A.; CASTRO, K. N. C.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Potential action of extract of *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen to control *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) ticks. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 8, n. 1, p. 65–72, 2017b.
- ANHOLETO, L. A.; OLIVEIRA, P. R.; RODRIGUES, R. A. F.; YAMANE, L. T.; CASTRO, K. N. C.; FERREIRA, A. R. F.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Toxic action of *Acmella oleracea* extract on the male reproductive system of *Amblyomma cajennense* ticks. **Veterinary Parasitology**, v. 244, p. 164–171, 2017c.
- ANHOLETO, L. A.; OLIVEIRA, P. R.; RODRIGUES, R. A. F.; YAMANE, L. T.; CASTRO, K. N. C.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Morphological alterations in the ovaries of *Amblyomma cajennense* semi-engorged ticks exposed to ethanolic extract of *Acmella oleracea*. **Microscopy Research and Technique**, v. 81, n. 11, p. 1347–1357, 2018.
- ANHOLETO, L. A.; SAMPIERI, B. R.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Generating new individuals II (male reproductive system). In: CAMARGO-MATHIAS, M. I. (Ed.). **Inside Ticks: Morphophysiology, toxicology and therapeutic perspectives**. São Paulo: Editora UNESP, 2018.
- BAE, S. S.; EHRMANN, B. M.; ETTEFAGH, K. A.; CECH, N. B. A validated liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry method for quantification of spilanthol in *Spilanthes acmella* (L.) Murr. **Phytochemical Analysis : PCA**, v. 21, n. 5, p. 438–443, 2010.
- BARBOSA, A. F.; CARVALHO, M. G.; SMITH, R. E.; SABAA-SRUR, A. U. O. Spilanthol: occurrence, extraction, chemistry and biological activities. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, n. 1, p. 128–133, 2016.
- BEATI, L.; NAVA, S.; BURKMAN, E. J.; BARROS-BATTESTI, D. M.; LABRUNA, M. B.; GUGLIELMONE, A. A.; CÁCERES, A. G.; GUZMÁN-CORNEJO, C. M.; LEÓN, R.; DURDEN, L. A.; FACCINI, J. L. H. *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae), the Cayenne tick: phylogeography and evidence for allopatric speciation. **BMC Evolutionary Biology**, v. 13, n. 1, p. 267, 2013.
- BECHARA, G. H. H.; SZABÓ, M. P. J.; FERREIRA, B. R.; GARCIA, M. V. 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.
- BELL-SAKYI, L. *Ehrlichia ruminantium* grows in cell lines from four ixodid tick genera. **Journal of comparative pathology**, v. 130, n. 4, p. 285–93, 2004.
- BELL-SAKYI, L.; ZWEYGARTH, E.; BLOUIN, E. F.; GOULD, E. A.; JONGEJAN, F. Tick cell lines: tools for tick and tick-borne disease research. **Trends in Parasitology**, v. 23, n. 9, p. 450–457, 2007.
- BLACK, W. C.; PIESMAN, J. Phylogeny of hard- and soft-tick taxa (Acari: Ixodida) based on mitochondrial 16S rDNA sequences. **Proceedings of the National**

Academy of Sciences of the United States of America, v. 91, n. 21, p. 10034–8, 1994.

BLAIR, J.; FOURIE, J. J.; VARLOUD, M.; HORAK, I. G. Efficacy and speed of kill of a topically applied formulation of dinotefuran-permethrin-pyriproxyfen against weekly tick infestations with *Rhipicephalus sanguineus* (sensu lato) on dogs. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p. 283, 2016.

BORGES, L. M. F.; SOUSA, L. A. D.; BARBOSA, C. S. Perspectives for the use of plant extracts to control the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 20, n. 2, p. 89–96, 2011.

BRITES-NETO, J.; DUARTE, K. M. R.; MARTINS, T. F. Tick-borne infections in human and animal population worldwide. **Veterinary World**, v. 8, n. 3, p. 301–15, 2015.

BROSSARD, M.; WIKEL, S. K. Tick immunobiology. **Parasitology**, v. 129 Suppl, p. S161-76, 2004.

BRUM, J. G. W. **Infecção em teleóginas de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) por *Cedecea lapagei* Grimont e cols., 1981: etiopatogenia e sazonalidade**. Tese (Doutorado em Ciências), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1988.

BURGER, T. D.; SHAO, R.; BEATI, L.; MILLER, H.; BARKER, S. C. Phylogenetic analysis of ticks (Acari: Ixodida) using mitochondrial genomes and nuclear rRNA genes indicates that the genus *Amblyomma* is polyphyletic. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 64, n. 1, p. 45–55, 2012.

BUZZARD, S. L.; BISSELL, B. D.; THOMPSON BASTIN, M. L. Ehrlichiosis presenting as severe sepsis and meningoencephalitis in an immunocompetent adult. **JMM Case Reports**, v. 5, n. 9, p. e005162, 2018.

CABEZAS-CRUZ, A.; ZWEYGARTH, E.; RIBEIRO, M. F. B.; SILVEIRA, J. A. G.; DE LA FUENTE, J.; GRUBHOFFER, L.; VALDÉS, J. J.; PASSOS, L. M. F. New species of *Ehrlichia* isolated from *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* shows an ortholog of the *E. canis* major immunogenic glycoprotein gp36 with a new sequence of tandem repeats. **Parasites & Vectors**, v. 5, p. 291, 2012.

CABEZAS-CRUZ, A.; ZWEYGARTH, E.; VANCOVÁ, M.; BRONISZEWSKA, M.; GRUBHOFFER, L.; PASSOS, L. M. F.; RIBEIRO, M. F. B.; ALBERDI, P.; FUENTE, J. *Ehrlichia minasensis* sp. nov., isolated from the tick *Rhipicephalus microplus*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 66, n. 3, p. 1426–1430, 2016.

CAMARGO-MATHIAS, M. I. **Guia básico de morfologia interna de carrapatos ixodídeos**. 1ª ed. São Paulo: Editora UNESP, 2013.

CAMARGO-MATHIAS, M. I. **Inside Ticks: Morphophysiology, toxicology and therapeutic perspectives**. 1ª ed. São Paulo: Editora UNESP, 2018.

CAMARGO-MATHIAS, M. I.; FURQUIM, K. C. S. The histology as a tool for the understanding of the morphophysiology of the brown dog tick (*Rhipicephalus sanguineus*). In: JENKINS, O. P. (Ed.). **Advances in Zoology Research**. 1. ed. USA: Nova Science Publishers, 2013. p. 167–191.

CAMARGO-MATHIAS, M. I.; FURQUIM, K. C. S.; NUNES, P. H. Immunomodulatory effects of tick saliva. **Invertebrate Survival Journal**, v. 8, p. 231–240, 2011.

- CAPERUCCI, D.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Lipids in oocytes of ants *Neoponera villosa* (Hymenoptera: Ponerinae). **Sociobiology**, v. 47, p. 531–541, 2006.
- CARVALHO, H. F.; RECCO-PIMENTEL, S. M. **A Célula**. 3ª ed. São Paulo: Editora Manole, 2012.
- CARVALHO, I. T. S.; MELO, A. L. T.; FREITAS, L. C.; VERÇOZA, R. V.; ALVES, A. S.; COSTA, J. S.; CHITARRA, C. S.; NAKAZATO, L.; DUTRA, V.; PACHECO, R. C.; AGUIAR, D. M. Minimum infection rate of *Ehrlichia minasensis* in *Rhipicephalus microplus* and *Amblyomma sculptum* ticks in Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 7, n. 5, p. 849–852, jul. 2016.
- CASTRO, K. N. C.; LIMA, D. F.; VASCONCELOS, L. C.; LEITE, J. R. S. A.; SANTOS, R. C.; PAZ NETO, A. A.; COSTA-JÚNIOR, L. M. Acaricide activity in vitro of *Acmella oleracea* against *Rhipicephalus microplus*. **Parasitology Research**, v. 113, n. 10, p. 3697–701, 2014.
- CAVALCANTI, V. M. S. **Extração de espilantol de *Spilanthus acmella* var *oleraceae* com dióxido de carbono supercrítico**. Tese (Doutorado em Engenharia de Processos), Universidade Estadual de Campinas, 2008.
- CHAGAS, A. C. S.; GEORGETTI, C. S.; CARVALHO, C. O.; OLIVEIRA, M. C. S.; RODRIGUES, R. A.; FOGGIO, M. A.; MAGALHÃES, P. M. *In vitro* activity of *Artemisia annua* L (Asteraceae) extracts against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 1, p. 31–35, 2011.
- CHENG, Y.-B.; LIU, R.; HO, M.-C.; WU, T.-Y.; CHEN, C.-Y.; LO, I.-W.; HOU, M.-F.; YUAN, S.-S.; WU, Y.-C.; CHANG, F.-R. Alkylamides of *Acmella oleracea*. **Molecules**, v. 20, n. 4, p. 6970–6977, 2015.
- CILIA-LÓPEZ, V. G.; JUÁREZ-FLORES, B. I.; AGUIRRE-RIVERA, J. R.; REYES-AGÜERO, J. A. Analgesic activity of *Heliopsis longipes* and its effect on the nervous system. **Pharmaceutical Biology**, v. 48, n. 2, p. 195–200, 2010.
- COSSIO-BAYUGAR, R.; WAGNER, G. G.; HOLMAN, P. J. *In vitro* generation of organophosphate resistant *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) cell lines. **Journal of Medical Entomology**, v. 39, n. 2, p. 278–84, 2002.
- COSTA, G. L.; SARQUIS, M. I. M.; MORAES, A. M. L.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Isolation of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* from *Boophilus microplus* tick (Canestrini, 1887), in Rio de Janeiro State, Brazil. **Mycopathologia**, v. 154, n. 4, p. 207–9, 2002.
- CRAMPTON, A.; BAXTER, G.; BARKER, S. Identification and characterisation of a cytochrome P450 gene and processed pseudogene from an arachnid: the cattle tick, *Boophilus microplus*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 29, n. 4, p. 377–384, 1999.
- CRAMPTON, A.; MCKAY, I.; BARKER, S. C. Phylogeny of ticks (Ixodida) inferred from nuclear ribosomal DNA. **International Journal for Parasitology**, v. 26, n. 5, p. 511–7, 1996.
- CRUZ, P. B.; BARBOSA, A. F.; ZERINGÓTA, V.; MELO, D.; NOVATO, T.; FIDELIS, Q. C.; FABRI, R. L.; CARVALHO, M. G.; OLIVEIRA SABAA-SRUR, A. U.; DAEMON, E.; MONTEIRO, C. M. O. Acaricidal activity of methanol extract of *Acmella oleracea* L. (Asteraceae) and spilanthol on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) and

- Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 228, p. 137–143, 2016.
- DAVEY, R. B.; AHRENS, E. H.; GEORGE, J. E.; HUNTER, J. S.; JEANNIN, P. Therapeutic and persistent efficacy of fipronil against *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) on cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 74, n. 2, p. 261–276, 1998.
- DENARDI, S. E.; BECHARA, G. H.; OLIVEIRA, P. R.; NUNES, E. T.; SAITO, K. C.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Morphological characterization of the ovary and vitellogenesis dynamics in the tick *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). **Veterinary parasitology**, v. 125, n. 3–4, p. 379–95, 2004.
- DENARDI, S. E.; BECHARA, G. H.; OLIVEIRA, P. R.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. *Azadirachta indica* A. Juss (neem) induced morphological changes on oocytes of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) tick females. **Experimental Parasitology**, v. 126, n. 4, p. 462–70, 2010.
- DENARDI, S. E.; BECHARA, G. H.; OLIVEIRA, P. R.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Ultrastructural analysis of the oocytes of female *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) ticks subjected to the action of *Azadirachta indica* A. Juss (Neem). **Ultrastructural Pathology**, v. 36, n. 1, p. 56–67, 2012.
- DENARDI, S. E.; CAMARGO MATHIAS, M. I.; BECHARA, G. H. *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae): Salivary gland cells of partially engorged females ticks and the production of lipid by their mitochondria. **Experimental Parasitology**, v. 113, n. 1, p. 30–35, 2006.
- DIAS, A. M. A.; SANTOS, P.; SEABRA, I. J.; JÚNIOR, R. N. C.; BRAGA, M. E. M.; SOUSA, H. C. Spilanthol from *Spilanthes acmella* flowers, leaves and stems obtained by selective supercritical carbon dioxide extraction. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 61, p. 62–70, 2012.
- DIETRICH, G.; DOLAN, M. C.; PERALTA-CRUZ, J.; SCHMIDT, J.; PIESMAN, J.; EISEN, R. J.; KARCHESY, J. J. Repellent activity of fractioned compounds from *Chamaecyparis nootkatensis* essential oil against nymphal *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 43, n. 5, p. 957–961, 2006.
- DOUGLAS, J. R. The internal anatomy of *Dermacentor andersoni* stiles. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 36, n. 4, p. 601–601, 1943.
- DRUMMOND, R. O.; ERNST, S. E.; TREVINO, J. L.; GLADNEY, W. J.; GRAHAM, O. H. *Boophilus annulatus* and *B. microplus*: laboratory tests of insecticides. **Journal of Economic Entomology**, v. 66, n. 1, p. 130–3, 1973.
- DUBEY, S.; MAITY, S.; SINGH, M.; SARAF, S. A.; SAHA, S. Phytochemistry, pharmacology and toxicology of *Spilanthes acmella*: A Review. **Advances in Pharmacological Sciences**, v. 2013, p. 423750, 2013.
- DUMSER, J. B.; OLIVER, J. H. Kinetics of spermatogenesis in the adult tick, *Dermacentor variabilis*. **Journal of Insect Physiology**, v. 27, n. 10, p. 681–688, 1981.
- ESTRADA-PEÑA, A.; BOUATTOUR, A.; CAMICAS, J.-L.; GUGLIELMONE, A.; HORAK, I.; JONGEJAN, F.; LATIF, A.; PEGRAM, R.; WALKER, A. R. The known distribution and ecological preferences of the tick subgenus *Boophilus* (Acari: Ixodidae) in Africa and Latin America. **Experimental & Applied Acarology**, v. 38, n. 2–3, p. 219–35, 2006.

- ESTRADA-PEÑA, A.; TARRAGONA, E. L.; VESCO, U.; MENEGHI, D.; MASTROPAOLO, M.; MANGOLD, A. J.; GUGLIELMONE, A. A.; NAVA, S. Divergent environmental preferences and areas of sympatry of tick species in the *Amblyomma cajennense* complex (Ixodidae). **International Journal for Parasitology**, v. 44, n. 14, p. 1081–9, 2014.
- FABRY, W.; OKEMO, P.; ANSORG, R. Fungistatic and fungicidal activity of east African medicinal plants. **Mycoses**, v. 39, n. 1–2, p. 67–70, 1996.
- FAVORETO, R.; GILBERT, B. Estado da Arte/State of the Art - *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen (Asteraceae) – Jambu. **Revista Fitos**, v. 5, n. 1, p. 83–91, 2010.
- FELDMAN-MUHSAM, B.; BORUT, S. Further observations on spermatophore formation in argasid ticks. **Journal of Insect Physiology**, v. 24, n. 10–11, p. 693–697, 1978.
- FELDMAN-MUHSAM, B.; BORUT, S. On the spermatophore of ixodid ticks. **Journal of Insect Physiology**, v. 29, n. 5, p. 449–457, 1983.
- FELDMAN-MUHSAM, B.; FILSHIE, B. K. Scanning and transmission electron microscopy of the spermiophores of *Ornithodoros ticks*: an attempt to explain their motility. **Tissue & Cell**, v. 8, n. 3, p. 411–9, 1976.
- FRANCISCHETTI, I. M. B.; SA-NUNES, A.; MANS, B. J.; SANTOS, I. M.; RIBEIRO, J. M. C. The role of saliva in tick feeding. **Frontiers in Bioscience (Landmark edition)**, v. 14, p. 2051–88, jan. 2009.
- FRANQUE, M. P.; SANTOS, H. A.; SILVA, G. V. O. DA; TAJIRI, J. T.; MASSARD, C. L. Características biológicas de *Boophilus microplus* (acari: ixodidae) a partir de infestação experimental em cão. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 16, n. 4, p. 238–242, 2007.
- FRIESEN, K. J.; KAUFMAN, W. R. Cypermethrin inhibits egg development in the ixodid tick, *Amblyomma hebraeum*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 76, n. 1, p. 25–35, 2003.
- FRIESEN, K. J.; SURI, R.; KAUFMAN, W. R. Effects of the avermectin, MK-243, on ovary development and salivary gland degeneration in the ixodid tick, *Amblyomma hebraeum*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 76, n. 3, p. 82–90, 2003.
- GARCIA-FERNANDEZ, C.; GARCIA, S. M. L.; GARCIA, R. N. The male genital accessory gland complex of the cattle tick *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 58, n. 3, p. 453–462, 1998.
- GHOSH, S.; AZHAHIANAMBI, P.; FUENTE, J. Control of ticks of ruminants, with special emphasis on livestock farming systems in India: present and future possibilities for integrated control - a review. **Experimental & Applied Acarology**, v. 40, n. 1, p. 49–66, 2006.
- GONZALES, J. C. **O Controle do Carrapato do Boi**. Porto Alegre: UPF, 1995.
- GUEDES, E.; LEITE, R. C.; PRATA, M. C.; PACHECO, R. C.; WALKER, D. H.; LABRUNA, M. B. Detection of *Rickettsia rickettsii* in the tick *Amblyomma cajennense* in a new Brazilian spotted fever-endemic area in the state of Minas Gerais. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 8, p. 841–845, 2005.
- GUERRA, A. T.; GADELHA, C. A. A.; REIS, C. M. M.; SILVA, H. S.; SANTOS, L. F. M.; BARBOSA, M. R. V.; VASCONCELLOS, M. L. A. A.; LINDEN, M. M. G. VAN

DER; SANTOS, P. R. P. **Biologia e Fisiologia Celular**. 1. ed. João Pessoa: Editora Universitária, 2011.

GUZZIE, P. J. Lethality testing. In: SHAYNE, C. G. (Ed.). **In vitro toxicology**. New York: Raven, 1994. p. 57–87.

HARRISON, F. W.; FOELIX, R. F. Microscopic anatomy of invertebrates. In: **Vol. 8A: Chelicerate arthropoda**. New York: Wiley-Liss, 1999. p. 508.

HARWOOD, R. F.; JAMES, M. T. **Entomology in human and animal health**. 7^a ed. New York: Macmillan Publishing Co, 1979.

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

HAYES, S. F.; BURGDORFER, W.; AESCHLIMANN, A. Sexual transmission of spotted fever group rickettsiae by infected male ticks: detection of rickettsiae in immature spermatozoa of *Ixodes ricinus*. **Infection and Immunity**, v. 27, n. 2, p. 638–42, fev. 1980.

HIGA, L. O. S.; GARCIA, M. V.; BARROS, J. C.; KOLLER, W. W.; ANDREOTTI, R. Acaricide Resistance Status of the *Rhipicephalus microplus* in Brazil: A Literature Overview. **Medicinal Chemistry**, v. 5, n. 7, 2015.

HORAK, I. G.; CAMICAS, J.-L.; KEIRANS, J. E. The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida): a world list of valid tick names. **Experimental & Applied Acarology**, v. 28, n. 1–4, p. 27–54, 2002.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 13^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

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

KADIR, H. A.; ZAKARIA, M. B.; KECHIL, A. A.; AZIRUN, M. D. S. Toxicity and electrophysiological effects of *Spilanthus amella* Murr. extracts on *Periplaneta americana* L. **Pesticide Science**, v. 25, n. 4, p. 329–335, 1989.

KAZIMÍROVÁ, M.; ŠTIBRÁNIOVÁ, I. Tick salivary compounds: their role in modulation of host defences and pathogen transmission. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 3, p. 3–43, 2013.

KHAMESIPOUR, F.; DIDA, G. O.; ANYONA, D. N.; RAZAVI, S. M.; RAKHSHANDEHROO, E. Tick-borne zoonoses in the Order Rickettsiales and Legionellales in Iran: A systematic review. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 9, p. e0006722, 2018.

KISZEWSKI, A. E.; MATUSCHKA, F. R.; SPIELMAN, A. Mating strategies and spermiogenesis in ixodid ticks. **Annual Review of Entomology**, v. 46, n. 1, p. 167–82, 2001.

KOC, S.; OZ, E.; CINBILGEL, I.; AYDIN, L.; CETIN, H. Acaricidal activity of *Origanum bilgeri* P.H. Davis (Lamiaceae) essential oil and its major component, carvacrol against adults *Rhipicephalus turanicus* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 193, n. 1–3, p. 316–9, 2013.

KOH-TAN, H. H. C.; STRACHAN, E.; COOPER, K.; BELL-SAKYI, L.; JONSSON, N. N. Identification of a novel β -adrenergic octopamine receptor-like gene (β AOR-like)

and increased ATP-binding cassette B10 (ABCB10) expression in a *Rhipicephalus microplus* cell line derived from acaricide-resistant ticks. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p. 425, 2016.

KOTÁL, J.; LANGHANSOVÁ, H.; LIESKOVSKÁ, J.; ANDERSEN, J. F.; FRANCISCHETTI, I. M. B.; CHAVAKIS, T.; KOPECKÝ, J.; PEDRA, J. H. F.; KOTSYFAKIS, M.; CHMELAŘ, J. Modulation of host immunity by tick saliva. **Journal of Proteomics**, v. 128, p. 58–68, 2015.

LABRUNA, M. B. Ecology of rickettsia in South America. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1166, p. 156–66, 2009.

LOMAS, L. O.; KAUFMAN, W. R. The influence of a factor from the male genital tract on salivary gland degeneration in the female ixodid tick, *Amblyomma hebraeum*. **Journal of Insect Physiology**, v. 38, n. 8, p. 595–601, 1992.

MACEDO-RIBEIRO, S.; ALMEIDA, C.; CALISTO, B. M.; FRIEDRICH, T.; MENTELE, R.; STÜRZEBECKER, J.; FUENTES-PRIOR, P.; PEREIRA, P. J. B. Isolation, cloning and structural characterisation of boophilin, a multifunctional Kunitz-type proteinase inhibitor from the cattle tick. **PloS One**, v. 3, n. 2, p. e1624, 2008.

MANGIA, C.; VISMARRA, A.; GENCHI, M.; EPIS, S.; BANDI, C.; GRANDI, G.; BELL-SAKYI, L.; OTRANTO, D.; PASSERI, B.; KRAMER, L. Exposure to amitraz, fipronil and permethrin affects cell viability and ABC transporter gene expression in an *Ixodes ricinus* cell line. **Parasites & Vectors**, v. 11, n. 1, p. 437, 2018.

MARTINEZ, S. S. **O Nim - *Azadirachta indica*: Natureza, usos múltiplos**. Londrina: IAPAR, 2002.

MARTINS, T. F.; ONOFRIO, V. C.; BARROS-BATTESTI, D. M.; LABRUNA, M. B. Nymphs of the genus *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) of Brazil: descriptions, redescriptions, and identification key. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 1, n. 2, p. 75–99, 2010.

MARTINS, T. F.; BARBIERI, A. R. M.; COSTA, F. B.; TERASSINI, F. A.; CAMARGO, L. M. A.; PETERKA, C. R. L.; PACHECO, R. C.; DIAS, R. A.; NUNES, P. H.; MARCILI, A.; SCOFIELD, A.; CAMPOS, A. K.; HORTA, M. C.; GUILLOUX, A. G. A.; BENATTI, H. R.; RAMIREZ, D. G.; BARROS-BATTESTI, D. M.; LABRUNA, M. B. Geographical distribution of *Amblyomma cajennense* (sensu lato) ticks (Parasitiformes: Ixodidae) in Brazil, with description of the nymph of *A. cajennense* (sensu stricto). **Parasites & vectors**, v. 9, n. 1, p. 186, 2016.

MATOS, C. A.; GONÇALVES, L. R.; RAMOS, I. A. S.; MENDES, N. S.; ANDRÉ, M. R.; MACHADO, R. Z. Detecção molecular de *Ehrlichia ruminantium* em bovinos na província de Maputo/Moçambique. **Ciência & Tecnologia Fatec-JB**, v. 8, n. 1, p. 1–5, 2016.

MATOS, R. S.; MELO, D. R.; MONTEIRO, C. M. O.; ZERINGÓTA, V.; SENRA, T. O. S.; CALMON, F.; MATURANO, R.; PRATA, M. C. A.; DAEMON, E. Determination of the susceptibility of unengorged larvae and engorged females of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) to different methods of dissolving thymol. **Parasitology Research**, v. 113, n. 2, p. 669–73, 2014a.

MATOS, R. DA S.; DAEMON, E.; CAMARGO-MATHIAS, M. I.; FURQUIM, K. C. S.; SAMPIERI, B. R.; REMÉDIO, R. N.; ARAÚJO, L. X.; NOVATO, T. P. L. Histopathological study of ovaries of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae)

exposed to different thymol concentrations. **Parasitology Research**, v. 113, n. 12, p. 4555–65, 2014b.

MONTASSER, 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.

MOROE, M.; HOSODA, F. **Bath preparations containing spilanthal**. Japan, 1985.

MULENGA, A.; BLANDON, M.; KHUMTHONG, R. The molecular basis of the *Amblyomma americanum* tick attachment phase. **Experimental & Applied Acarology**, v. 41, n. 4, p. 267–87, 2007.

NAVA, S.; ESTRADA-PEÑA, A.; PETNEY, T.; BEATI, L.; LABRUNA, M. B.; SZABÓ, M. P. J.; VENZAL, J. M.; MASTROPAOLO, M.; MANGOLD, A. J.; GUGLIELMONE, A. A. The taxonomic status of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806). **Veterinary Parasitology**, v. 208, n. 1–2, p. 2–8, 2015.

NAVA, S.; GUGLIELMONE, A. A.; MANGOLD, A. J. An overview of systematics and evolution of ticks. **Frontiers in Bioscience (Landmark edition)**, v. 14, p. 2857–77, 2009.

NIGRINIS, L. S. O.; CARO, J. O.; OLARTE, E. N. Estudio fitofarmacológico de la fracción liposoluble de las flores de la *Spilanthes americana* (Mutis) parte I: Estudio fitoquímico. **Revista Colombiana de Ciências Químico-Farmacêuticas**, v. 15, p. 37–47, 1986.

NOLAN, J. Mechanisms of resistance to chemicals in arthropod parasites of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**, v. 18, n. 2, p. 155–166, 1985.

NOMURA, E. C. O.; RODRIGUES, M. R. A.; DA SILVA, C. F.; HAMM, L. A.; NASCIMENTO, A. M.; SOUZA, L. M.; CIPRIANI, T. R.; BAGGIO, C. H.; WERNER, M. F. P. Antinociceptive effects of ethanolic extract from the flowers of *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 150, n. 2, p. 583–589, 2013.

OELRICHS, P. B.; HILL, M. W.; VALLELY, P. J.; MACLEOD, J. K.; MOLINSKI, T. F. Toxic tetranortriterpenes of the fruit of *Melia azedarach*. **Phytochemistry**, v. 22, n. 2, p. 531–534, 1983.

OLIVEIRA, P. R.; BECHARA, G. H.; MARIN-MORALES, M. A.; 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, 2009.

OLIVEIRA, P. R.; REMÉDIO, R. N.; BECHARA, G. H.; ANHOLETO, L. A.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. C. Dinotefuran-induced morphophysiological changes in the ovaries and midgut of semi-engorged females *Rhipicephalus sanguineus* Latreille, 1806 (Acari: Ixodidae) ticks. **Parasitology Research**, v. 115, n. 2, p. 829–849, 2016a.

OLIVEIRA, P. R.; BECHARA, G. H.; DENARDI, S. E.; NUNES, E. T.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Morphological characterization of the ovary and oocytes vitellogenesis of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). **Experimental Parasitology**, v. 110, n. 2, p. 146–156, 2005.

OLIVEIRA, P. R.; BECHARA, G. H.; DENARDI, S. E.; PIZANO, M. A.; CAMARGO-

- MATHIAS, M. I. 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(50). **Experimental Parasitology**, v. 127, n. 2, p. 418–22, 2011.
- OLIVEIRA, P. R.; CALLIGARIS, I. B.; ROMA, G. C.; BECHARA, G. H.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Morphological characterization of the nymphs *Rhipicephalus sanguineus* ticks (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). Description of the testes, integument, Malpighian tubules, and midgut on the detachment day. **Microscopy Research and Technique**, v. 75, n. 6, p. 727–36, 2012.
- OLIVEIRA, P. R.; PIZANO, M. A.; REMÉDIO, R. N.; BECHARA, G. H.; ABREU, R. M. M.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Potential of the chemical dinotefuran in the control of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) semi-engorged female ticks. **Experimental Parasitology**, v. 155, p. 82–88, 2015.
- OLIVEIRA, P. R.; CASTRO, K. N. C.; ANHOLETO, L. A.; CAMARGO MATHIAS, M. I. Cytotoxic effects of extract of *Acmella oleraceae* (Jambú) in *Rhipicephalus microplus* females ticks. **Microscopy Research and Technique**, v. 79, n. 8, p. 744–753, 2016b.
- OLIVEIRA, P. R.; ANHOLETO, L. A.; RODRIGUES, R. A. F.; BECHARA, G. H.; CASTRO, K. N. C.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. The potential of *Acmella oleracea* (Jambu) extract in the control of semi-engorged *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) female ticks. **International Journal of Acarology**, v. 44, n. 4–5, p. 192–197, 2018.
- 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, 2008.
- OLIVEIRA, P. R.; CAMARGO-MATHIAS, M. I.; BECHARA, G. H. *Amblyomma triste* (Koch, 1844) (Acari: Ixodidae): morphological description of the ovary and of vitellogenesis. **Experimental Parasitology**, v. 113, n. 3, p. 179–185, 2006.
- OLIVEIRA, P. R.; CAMARGO-MATHIAS, M. I.; BECHARA, G. H. Vitellogenesis in the tick *Amblyomma triste* (Koch, 1844) (Acari: Ixodidae) Role for pedicel cells. **Veterinary Parasitology**, v. 143, n. 2, p. 134–139, 2007.
- OLIVER, J. H.; BRINTON, L. P. Cytogenetics of ticks (Acari: Ixodoidea). 7. Spermatogenesis in the Pacific Coast tick, *Dermacentor occidentalis* Marx (Ixodidae). **The Journal of Parasitology**, v. 58, n. 2, p. 365–79, 1972.
- PANELLA, N. A.; DOLAN, M. C.; KARCHESY, J. J.; XIONG, Y.; PERALTA-CRUZ, J.; KHASAWNEH, M.; MONTENIERI, J. A.; MAUPIN, G. O. Use of novel compounds for pest control: insecticidal and acaricidal activity of essential oil components from heartwood of Alaska yellow cedar. **Journal of Medical Entomology**, v. 42, n. 3, p. 352–8, 2005.
- PARVEEN, S.; GODARA, R.; KATOCH, R.; YADAV, A.; VERMA, P. K.; KATOCH, M.; SINGH, N. K. *In vitro* evaluation of ethanolic extracts of *Ageratum conyzoides* and *Artemisia absinthium* against cattle tick, *Rhipicephalus microplus*. **The Scientific World Journal**, v. 2014, p. 1–6, 2014.
- PEARSE, A. **Histochemistry theoretical and applied**. Churchill: Livingstone, 1985.

- PEKÁRIKOVÁ, D.; RAJSKÁ, P.; KAZIMÍROVÁ, M.; PECHÁŇOVÁ, O.; TAKÁČ, P.; NUTTALL, P. A. Vasoconstriction induced by salivary gland extracts from ixodid ticks. **International Journal for Parasitology**, v. 45, n. 14, p. 879–83, 2015.
- PÉREZ-GONZÁLEZ, I. E.; PRADO-OCHOA, M. G.; MUÑOZ-GUZMÁN, M. A.; VÁZQUEZ-VALADEZ, V. H.; VELÁZQUEZ-SÁNCHEZ, A. M.; AVILA-SUÁREZ, B. L.; CUENCA-VERDE, C.; ANGELES, E.; ALBA-HURTADO, F. Effect of new ethyl and methyl carbamates on *Rhipicephalus microplus* larvae and adult ticks resistant to conventional ixodicides. **Veterinary Parasitology**, v. 199, n. 3–4, p. 235–41, 2014.
- PETER, T. F.; BURRIDGE, M. J.; MAHAN, S. M. *Ehrlichia ruminantium* infection (heartwater) in wild animals. **Trends in Parasitology**, v. 18, n. 5, p. 214–218, 2002.
- PRACHAYASITTIKUL, V.; PRACHAYASITTIKUL, S.; RUCHIRAWAT, S.; PRACHAYASITTIKUL, V. High therapeutic potential of *Spilanthes acmella*: A review. **EXCLI Journal**, v. 12, p. 291–312, 2013.
- PRUETT, J. H. Immunological control of arthropod ectoparasites - A review. **International Journal for Parasitology**, v. 29, n. 1, p. 25–32, 1999.
- RAMSEWAK, R. Bioactive N-isobutylamides from the flower buds of *Spilanthes acmella*. **Phytochemistry**, v. 51, n. 6, p. 729–732, 1999.
- REGER, J. F. The fine structure of spermatids from the tick, *Amblyomma dissimili*. **Journal of Ultrastructure Research**, v. 5, n. 6, p. 584–599, 1961.
- REGER, J. F. The origin and fine structure of cellular processes in spermatozoa of the tick *Dermacentor andersoni*. **Journal of Ultrastructure Research**, v. 48, n. 3, p. 420–434, 1974.
- REMEDIO, R. N.; NUNES, P. H.; ANHOLETO, L. A.; OLIVEIRA, P. R.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Morphological effects of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) seed oil with known azadirachtin concentrations on the oocytes of semi-engorged *Rhipicephalus sanguineus* ticks (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v. 114, n. 2, p. 431–44, 2015.
- RESENDE, J. D. S. A.; DAEMON, E.; MONTEIRO, C. M. O.; MATURANO, R.; PRATA, M. C. A.; RODRIGUES, A. F. S. F. Toxicity of solvents and surfactants to *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) and *Dermacentor nitens* (Neumann, 1897) (Acari: Ixodidae) larvae. **Experimental Parasitology**, v. 131, n. 2, p. 139–42, 2012.
- REYNOLDS, E. S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. **The Journal of Cell Biology**, v. 17, n. 1, p. 208–12, 1963.
- RIBEIRO, V. L. S.; AVANCINI, C.; GONÇALVES, K.; TOIGO, E.; POSER, G. V. Acaricidal activity of *Calea serrata* (Asteraceae) on *Boophilus microplus* and *Rhipicephalus sanguineus*. **Veterinary Parasitology**, v. 151, n. 2–4, p. 351–4, 2008.
- RICARDO, A. J.; OLIVEIRA, P. R.; BECHARA, G. H.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Ultrastructural detection of proteins, lipids and carbohydrates in oocytes of *Amblyomma triste* (Koch, 1844) (Acari: Ixodidae) during the vitellogenesis process. **Tissue and Cell**, v. 39, n. 3, p. 203–215, 2007.
- RODRIGUES, R. A. F.; FOGGIO, M. A.; BOAVENTURA JÚNIOR, S.; SANTOS, A. S.; REHDER, V. L. G. Otimização do processo de extração e isolamento do antimalárico artemisinina a partir de *Artemisia annua* L. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 368–372, 2006.

- RODRÍGUEZ-MALLON, A. Developing anti-tick vaccines. **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, v. 1404, p. 243–59, 2016.
- ROMA, G. C.; OLIVEIRA, P. R.; PIZANO, M. A.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Determination of LC(50) of permethrin acaricide in semi-engorged females of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). **Experimental Parasitology**, v. 123, n. 3, p. 269–72, 2009.
- ROMA, G. C.; FURQUIM, K. C. S.; BECHARA, G. H.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Permethrin-induced morphological changes in oocytes of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) semi-engorged females. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 3, p. 825–830, 2010.
- ROSADO-AGUILAR, J. A.; AGUILAR-CABALLERO, A.; RODRIGUEZ-VIVAS, R. I.; BORGES-ARGAEZ, R.; GARCIA-VAZQUEZ, Z.; MENDEZ-GONZALEZ, M. Acaricidal activity of extracts from *Petiveria alliacea* (Phytolaccaceae) against the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 168, n. 3–4, p. 299–303, 2010.
- RUPPERT, E. E.; FOX, R. S.; BARNES, R. D. **Zoologia dos invertebrados: uma abordagem funcional-evolutiva**. 7ª ed. São Paulo: Roca, 2005.
- SAITO, K. C.; BECHARA, G. H.; NUNES, E. T.; OLIVEIRA, P. R.; DENARDI, S. E.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Morphological, histological, and ultrastructural studies of the ovary of the cattle-tick *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 129, n. 3–4, p. 299–311, 2005.
- SAMPIERI, B. R.; FURQUIM, K.; CARVALHO, P.; BUENO, O.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Ricinoleic acid esters from castor oil modifying male reproductive system of *Amblyomma cajennense* (Fabricius 1787). **Emergent Life Sciences Research**, v. 1, n. 1, p. 26–37, 2015a.
- SAMPIERI, B. R.; LABRUNA, M. B.; BUENO, O. C.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Dynamics of cell and tissue genesis in the male reproductive system of ticks (Acari: Ixodidae) *Amblyomma cajennense* [corrected] (Fabricius, 1787) and *Amblyomma aureolatum* (Pallas, 1772): a comparative analysis. **Parasitology Research**, v. 113, n. 4, p. 1511–9, 2014.
- SAMPIERI, B. R.; MOREIRA, J. C. S. C. S.; PÁEZ, F. A. R. A. R.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Comparative morphology of the reproductive system and germ cells of *Amblyomma* ticks (Acari: Ixodidae): A contribution to Ixodidae systematics. **Journal of Microscopy and Ultrastructure**, v. 4, n. 2, p. 95–107, 2015b.
- SANCHES, G. S.; BECHARA, G. H.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Ovary and oocyte maturation of the tick *Amblyomma brasiliense* Aragão, 1908 (Acari: Ixodidae). **Micron (Oxford, England : 1993)**, v. 41, n. 1, p. 84–9, 2010.
- SARAF, V. K.; DIXIT, V. K. *Spilanthes acmella* Murr.: study on its extract spilanthol as larvicidal compound. **Asian Journal of Experience Sciences**, v. 16, n. 1, p. 9–19, 2002.
- SAUER, J.; ESSENBERG, R.; BOWMAN, A. Salivary glands in ixodid ticks: control and mechanism of secretion. **Journal of Insect Physiology**, v. 46, n. 7, p. 1069–1078, 2000.
- SAUER, J.; HAIR, J. A. **Morphology, physiology and behavioural biology of ticks**. Chichester: Ellis Horwood, 1986.

- SCOLES, G. A.; HUTCHESON, H. J.; SCHLATER, J. L.; HENNAGER, S. G.; PELZEL, A. M.; KNOWLES, D. P. Equine piroplasmiasis associated with *Amblyomma cajennense* Ticks, Texas, USA. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 10, p. 1903–5, 2011.
- SHARMA, A.; KUMAR, V.; RATTAN, R. S.; KUMAR, N.; SINGH, B. Insecticidal Toxicity of Spilanthol from *Spilanthus acmella* Murr. against *Plutella xylostella* L. **American Journal of Plant Sciences**, v. 03, n. 11, p. 1568–1572, 2012.
- SOARES, H. S.; BARBIERI, A. R. M.; MARTINS, T. F.; MINERVINO, A. H. H.; LIMA, J. T. R.; MARCILI, A.; GENNARI, S. M.; LABRUNA, M. B. Ticks and rickettsial infection in the wildlife of two regions of the Brazilian Amazon. **Experimental & Applied Acarology**, v. 65, n. 1, p. 125–40, 2015.
- SONENSHINE, D. E.; ROE, R. M. **Biology of ticks**. 2^a ed. United States of America: Oxford University Press, 2014.
- SPELMAN, K.; DEPOIX, D.; MCCRAY, M.; MOURAY, E.; GRELLIER, P. The traditional medicine *Spilanthus acmella*, and the alkylamides spilanthol and undeca-2E-ene-8,10-dienoic acid isobutylamide, demonstrate *in vitro* and *in vivo* antimalarial activity. **Phytotherapy Research : PTR**, v. 25, n. 7, p. 1098–101, 2011.
- SRIVASTAVA, R.; GHOSH, S.; MANDAL, D. B.; AZHAHIANAMBI, P.; SINGHAL, P. S.; PANDEY, N. N.; SWARUP, D. Efficacy of *Azadirachta indica* extracts against *Boophilus microplus*. **Parasitology Research**, v. 104, n. 1, p. 149–53, 2008.
- STEEN, N. A.; BARKER, S. C.; ALEWOOD, P. F. Proteins in the saliva of the Ixodida (ticks): pharmacological features and biological significance. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 47, n. 1, p. 1–20, 2006.
- STROBER, W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. **Current Protocols in Immunology**, v. 21, n. 1, p. A.3B.1-A.3B.2, 2001.
- TAJERI, S.; RAZMI, G.; HAGHPARAST, A. Establishment of an Artificial Tick Feeding System to Study *Theileria lestoquardi* Infection. **PloS one**, v. 11, n. 12, p. e0169053, 2016.
- TARRAGONA, E. L.; CICUTTIN, G. L.; MANGOLD, A. J.; MASTROPAOLO, M.; SALVO, M. N.; NAVA, S. Rickettsia infection in *Amblyomma tonelliae*, a tick species from the *Amblyomma cajennense* complex. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 6, n. 2, p. 173–177, 2015.
- TILL, W. M. A contribution to the anatomy and histology of the brown ear tick *Rhipicephalus appendiculatus* Neumann. **Memoirs of the Entomological Society of Southern Africa**, v. 6, p. 1–124, 1961.
- TORRES, J. M.; CHÁVEZ, A. G. Alcamidas en plantas: distribución e importancia. **Avance y Perspectiva**, v. 20, n. Noviembre-Diciembre, p. 377–387, 2001.
- VENDRAMINI, M. C. R.; CAMARGO-MATHIAS, M. I.; FARIA, A. U.; BECHARA, G. H.; OLIVEIRA, P. R.; ROMA, G. C. Cytotoxic effects of andiroba oil (*Carapa guianensis*) in reproductive system of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) semi-engorged females. **Parasitology Research**, v. 111, n. 5, p. 1885–1894, 2012.
- VERYSER, L.; WYNENDAELE, E.; TAEVERNIER, L.; VERBEKE, F.; JOSHI, T.; TATKE, P.; DE SPIEGELEER, B. N-alkylamides: from plant to brain. **Functional Foods in Health and Disease**, v. 4, n. 46, p. 264–275, 2014.

- VIEIRA, R. F. C.; BIONDO, A. W.; GUIMARÃES, A. M. S.; SANTOS, A. P.; SANTOS, R. P.; DUTRA, L. H.; DINIZ, P. P. V. P.; MORAIS, H. A.; MESSICK, J. B.; LABRUNA, M. B.; VIDOTTO, O. Ehrlichiosis in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 1, p. 01–12, 2011.
- WAKITA, T.; KINOSHITA, K.; YAMADA, E.; YASUI, N.; KAWAHARA, N.; NAOI, A.; NAKAYA, M.; EBIHARA, K.; MATSUNO, H.; KODAKA, K. The discovery of dinotefuran: a novel neonicotinoid. **Pest Management Science**, v. 59, n. 9, p. 1016–1022, 2003.
- WALKER, J. B.; KEIRANS, J. E.; HORAK, I. G. **The genus *Rhipicephalus* (Acari: Ixodidae). A guide to the brown ticks of the world**. London: Cambridge University Press, 2000.
- WALL, R.; SHEARER, D. **Veterinary entomology**. London: Chapman and Hall, 1997.
- WIKEL, S. K.; BERGMAN, D. Tick-host immunology: Significant advances and challenging opportunities. **Parasitology Today (Personal ed.)**, v. 13, n. 10, p. 383–9, 1997.
- WYSOKI, M.; BOLLAND, H. R. Spermatogenesis, chromosomes and sex determination of four *Rhipicephalus* species (Acari: Ixodidae) from East Africa. **Genetica**, v. 48, n. 3, p. 233–238, 1978.
- YADAV, R.; YADAV, N.; KHARYA, M. D.; SAVADI, R. Preliminary studies on diuretic effect of *Spilanthes acmella* leaves extracts in rats. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 3, p. 245–247, 2011.
- YOU, M.; XUAN, X.; TSUJI, N.; KAMIO, T.; TAYLOR, D.; SUZUKI, N.; FUJISAKI, K. Identification and molecular characterization of a chitinase from the hard tick *Haemaphysalis longicornis*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 10, p. 8556–63, 2003.