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

**Estudo *in vivo* do extrato das glândulas salivares de carrapatos
Rhipicephalus sanguineus (Latreille, 1806) em ratos Wistar e citotoxicidade *in vitro* dos acaricidas timol e carvacrol em células da linhagem RML-15.**

NATALIA RUBIO CLARET PEREIRA

Orientadora: Profa. Dra. Maria Izabel Souza Camargo

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)

Rio Claro - SP
2019

NATALIA RUBIO CLARET PEREIRA

Estudo *in vivo* do extrato das glândulas salivares de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) em ratos Wistar e citotoxicidade *in vitro* dos acaricidas timol e carvacrol em células da linhagem RML-15.

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)

Orientadora: Dra. Maria Izabel Souza Camargo

**Rio Claro – SP
2019**

P436e Pereira, Natalia Rubio Claret

Estudo in vivo do extrato das glândulas salivares de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) em ratos Wistar e citotoxicidade in vitro dos acaricidas timol e carvacrol em células da linhagem RML-15. / Natalia Rubio Claret Pereira. -- Rio Claro, 2019 138 p.

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

Orientadora: Maria Izabel Souza Camargo

1. Carrapato do cão. 2. Lesão pré-neoplásica. 3. Hepatotoxicidade. 4. Cultura de células. 5. Acaricidas. 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

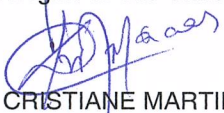
TÍTULO DA TESE: Estudo *in vivo* do extrato das glândulas salivares de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) em ratos Wistar e citotoxicidade *in vitro* dos acaricidas timol e carvacrol em células da linhagem RML-15

AUTORA: NATALIA RUBIO CLARET PEREIRA

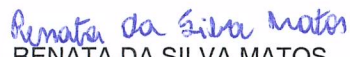
ORIENTADORA: MARIA IZABEL SOUZA CAMARGO

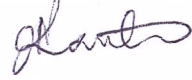
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR), pela Comissão Examinadora:


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


Profa. Dra. KAREN CRISTIANE MARTINEZ DE MORAES
Departamento de Biologia / IB Rio Claro


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


Profa. Dra. RENATA DA SILVA MATOS
Pós-Doutoranda do Instituto de Ciências Biológicas / Universidade Federal de Juiz de Fora


Profa. Dra. LORENA DO NASCIMENTO PANTALEÃO
x / Instituto Racine

Rio Claro, 18 de junho de 2019

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES).

À minha orientadora Profa. Dra. Maria Izabel Souza Camargo pela oportunidade, paciência, confiança, amizade, conselhos e, principalmente, pela ajuda a tornar esse trabalho possível. Serei eternamente grata e muito orgulhosa de poder trabalhar com essa mulher tão forte e determinada.

Aos meus pais, irmãos, amigos e amigas pelo apoio e confiança depositadas em mim.

À Dra. Lesley Bell-Sakyi, que me recebeu de braços abertos em seu laboratório. E aos membros do *Tick Cell Biobank* e do *Department of Infection Biology* da Universidade de Liverpool, Reino Unido, pelo acolhimento.

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 Renata, Marina, Elen, Luis Adriano, Melissa, Rusleyd e Ribamar

Ao técnico do Laboratório de Histologia, Gerson de Mello Souza por seu apoio e aos funcionários do Departamento de Biologia, da UNESP de Rio Claro.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito tóxico e terapêutico do extrato da glândula salivar (EGS) de fêmeas de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae), alimentadas por 2 dias em hospedeiros, em diferentes concentrações, por meio de injeções intraperitoneais em ratas Wistar. Os resultados clínicos mostraram que na concentração de 10 µg/µL houve aumento da frequência de neutrófilos e diminuição da de linfócitos. Na análise histológica do fígado, observou-se que o extrato nessa concentração causou alguns efeitos tóxicos como vacuolização citoplasmática nos hepatócitos e desorganização estrutural dos cordões celulares. Nas concentrações de 40 e 80 µg/µL, as ratas ganharam peso corporal e tiveram o peso relativo do fígado diminuído, evidenciando que essas concentrações causaram toxicidade sistêmica. Nesse trabalho foi também analisado o efeito do EGS apenas na concentração de 0,04µg/µL, sobre lesões pré-neoplásicas (LPN) no fígado de ratos Wistar e observou-se aumento no peso relativo apenas do fígado nos animais dos grupos LPN e LPN+EGS quando comparados ao controle. A histologia mostrou que os animais LPN, antes da injeção do extrato, foram os que tiveram o tecido hepático com maiores danos (desorganização dos cordões, aumento de tecido conjuntivo, vacuolização citoplasmática, células apoptóticas e aumento na frequência de células de Kupffer, células de defesa deste órgão) os quais foram reduzidos quando os ratos receberam o EGS. No presente estudo realizou-se ainda a avaliação *in vitro* do efeito dos acaricidas timol e carvacrol, sobre células RML-15, oriundas de carrapatos *R. sanguineus* s.l. e observou-se que o timol nas várias concentrações testadas não alterou a viabilidade das mesmas, ao contrário do carvacrol que na maior concentração (0,3 µL/mL) matou mais de 70% das células e na de 0,06µL/mL matou 23% delas. Morfologicamente as células expostas às menores concentrações de timol não apresentaram danos e as expostas as maiores concentrações sofreram: vacuolização citoplasmática, picnose e fragmentação nuclear. O carvacrol foi o composto que causou as maiores alterações morfológicas: perda dos limites celulares, picnose e fragmentação nuclear observadas já na exposição as menores concentrações. Na maior concentração houve 100% de morte das células e na de 0,012uL/mL as células entraram em apoptose, o que caracterizou o efeito citotóxico desse acaricida.

Palavras-chave: Carrapato do cão, Lesões pré-neoplásicas (LPN), hepatotoxicidade, cultura de células, carrapatos, acaricidas.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the toxic and pharmacological effect of salivary gland extract (SGE) of female ticks *Rhipicephalus sanguineus* in different concentrations through intraperitoneal injections in Wistar rats. Clinical results showed that at the concentration of 10 µg/µL there was an increase in neutrophil frequency and a decrease in lymphocytes. It was also observed that in the liver histological analysis, the extract at this concentration caused some toxic effects: cytoplasmic vacuolization in the hepatocytes and structural disorganization in the cellular cords. At concentrations of 40 and 80 µg/µL, rats body weight increased, and relative liver weight decreased, showing that these concentrations caused systemic toxicity. In this study, was analysed the effect of SGE in the concentration of 0.04 µg/µL on the pre-neoplastic lesions (PNL) in the liver of Wistar rats, and there was an increase in the relative weight of the liver in the groups PNL and PNL + SGE. The histology showed that the PNL animals had the hepatic tissue with the biggest damage (cord disorganization, increase of connective tissue, cytoplasmic vacuolization, apoptotic cells and increased Kupffer cell quantity, indicating immune response), those alterations were reduced when the mice received the SGE as treatment. In the study about the *in vitro* evaluation of the acaricides effect of thymol and carvacrol on RML-15 cells from *R. sanguineus* s.l. ticks were carried out. Thymol at all tested concentrations did not alter the cells viability, unlike carvacrol that at the highest concentration (0.3 µL/mL) killed more than 70% of the cells and at 0.06 µL/mL it killed 23% of the cells. Morphologically, the cells exposed to the lowest concentrations of thymol presented no damage and the ones exposed to the highest concentrations had cytoplasmic vacuolization, pyknose and nuclear fragmentation. Carvacrol was the compound that caused the highest morphological changes: loss of cell boundaries, pyknosis and nuclear fragmentation observed at the lowest concentrations. At the highest concentration there was 100% cell death, at 0.012 uL/mL the cells entered apoptosis, which characterized the cytotoxic effect of this acaricide.

Keywords: Dog tick, preneoplastic lesions (PNL), hepatotoxicity, cell culture, ticks, acaricides.

LISTA ABREVIATURAS E SIGLAS

2-AAF	2-acetilaminofluoreno
BCSTM	<i>Brazilian Central of Studies on Ticks Morphology</i>
CEUA	Comitê de Ética em Uso Animal
DEN	Dietilnitrosamina
DMSO	Dimetilsulfóxido
EGS	Extrato da Glândula Salivar
BOD	Biochemical Oxygen Demand
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
<i>R. sanguineus</i>	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>
s. l.	sensu lato
s. s.	sensu stricto
GC	Grupo Controle
HCC	Hepatocarcinoma
HE	Hematoxilina e Eosina
LPN	Lesão pré-neoplásica
MEM	<i>Minimal Essential Medium</i>
NaCl	Cloreto de Sódio
OECD	<i>Organization for Economic Co-Operation and Development</i>
OM	Óleo de Milho
PAS	Ácido Periódico- Schiff
PNL	<i>Pre neoplastic lesions</i>
HR	Hepatócito Resistente
RML-15	Linhagem celular <i>Rocky Mountain Lab</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
SGE	<i>Salivary Gland Extract</i>
TPB	<i>Tryptose phosphate broth</i>

SUMARIO

INTRODUÇÃO.....	7
Extrato de glândulas salivares de carrapatos <i>Rhipicephalus sanguineus</i> s. l.....	7
Hepatocarcinoma	7
Modelo experimental de lesões pré-neoplásicas (LPN).....	8
Efeito terapêutico do extrato de glândulas salivares de carrapatos.....	8
Cultura de células de carrapatos	9
OBJETIVOS GERAIS	11
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	11
MATERIAL E MÉTODOS.....	12
Carrapatos	12
Obtenção do Extrato da Glândula Salivar (EGS) de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> s. l. ...	12
Ensaio <i>in vivo</i>	12
Ensaio de Toxicidade: Aplicação dos Compostos	13
Avaliação do efeito do EGS em Lesões Pré-Neoplásicas (LPN)	13
Indução das LPN	13
Aplicação do EGS	14
Análise hematológica	15
Análises Histológicas.....	15
Coloração pela hematoxilina e eosina (HE).....	15
Técnica do PAS (Ácido Periódico- Schiff) (McMANUS, 1946)	16
Ensaio <i>in vitro</i>	16
Manutenção da linhagem de células de carrapatos: RML-15 (Rocky Mountain Lab).....	16
Exposição da linhagem celular RML-15 ao timol e ao carvacrol.....	17
Análise da viabilidade celular e da confluência das células.....	17
Análise morfológica das células RML-15.....	18

Quantificação de células apoptóticas	18
Análise estatística.....	18
RESULTADOS	19
ARTIGO 1	19
ARTIGO 2	47
ARTIGO 3	69
CAPÍTULOS DE LIVRO	95
DISCUSSÃO GERAL.....	19
CONCLUSÕES	132
REFERÊNCIAS	133

INTRODUÇÃO

Extrato de glândulas salivares de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* s. l.

Os carrapatos da espécie *R. sanguineus* s. l. tem como hospedeiro preferencial o cão doméstico e por isso são conhecidos popularmente como “carrapato marrom do cão”, podendo, no entanto, parasitar outros animais de estimação e até mesmo os seres humanos (DANTAS-TORRES; FIGUEREDO; BRANDÃO-FILHO, 2006; GRAY et al., 2013). Trata-se de um ectoparasita de grande importância médico-veterinária por ser também o principal vetor de bactérias, vírus e protozoários em animais domésticos, causando nestes doenças como a Erliquiose (*Ehrlichia canis*), Babesiose (*Babesia canis*) e Hemobartonelose (*Haemobartonella canis*) em cães, e ainda, em humanos transmitindo as *Rickettsia conorii* e *R. rickettsii*, causadoras da febre botonosa e maculosa, respectivamente (DANTAS-TORRES, 2008, 2010).

A alimentação nos carrapatos dá-se basicamente devido à ação combinada das suas estruturas bucais e da liberação da saliva produzida nas glândulas salivares, mistura complexa de vários bioativos capazes de modular o sistema imune dos hospedeiros (CAMARGO-MATHIAS, 2013). Nesses podem ser encontradas as moléculas: fosfatases ácidas, esterases, aminopeptidases, metaloproteases, prostaglandinas, lipocalinas e calreticulinas, além de outras com propriedades ainda desconhecidas (BINNINGTON, 1978; MULENGA; BLANDON; KHUMTHONG, 2007; OLIVEIRA et al., 2011). Aquelas já conhecidas tem papel importante nos processos de: vasodilatação, angiogênese, diminuição da coagulação, aumento da fibrinólise, inibição da agregação plaquetária, e imunomodulação (DREWES et al., 2012; HOVIUS; LEVI; FIKRIG, 2008; SAUER; ESSENBERG; BOWMAN, 2000).

Hepatocarcinoma

O fígado dos mamíferos é o órgão responsável pelos processos de metabolização e neutralização de compostos, regulação da homeostase sanguínea e desintoxicação do organismo, via células hepáticas (hepatócitos), as quais encontram-se dispostas em cordões nos lóbulos, estes permeados por vasos sanguíneos que possibilitam as trocas de macromoléculas entre o sangue e as células (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017). É no fígado que os agentes tóxicos como por exemplo os carcinógenos são processados (HASCHEK; ROUSSEAUX; WALLIG, 2010).

Segundo dados disponíveis, o câncer é considerado como um dos principais causadores de mortes em pessoas com menos de 70 anos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017).

Segundo a IARC (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER) em 2018 haveria 12 milhões de novos casos com 9,6 milhões de mortes. Ainda segundo os dados, os tipos de câncer que mais frequentemente acometem os humanos nos países em desenvolvimento são: o de fígado (hepatocarcinoma), o de pulmão (carcinoma espinocelular e adenocarcinoma) e o de estômago (adenocarcinoma) (SCHRAUF et al., 2009).

O hepatocarcinoma (HCC) é um tipo agressivo que ocorre no fígado e geralmente é: a) decorrente de inflamações crônicas causadas pelo desenvolvimento de cirrose hepática, b) devido a infecção por vírus das hepatites B ou C, c) devido ao consumo de álcool a longo prazo e d) pela exposição à toxinas carcinogênicas (TANNAPFEL; WITTEKIND, 2002; YU; YUAN, 2004). Na maioria dos casos é diagnosticado em estágio tardio, pois os sintomas clínicos são silenciosos e, sendo assim, os tratamentos disponíveis têm sido pouco eficazes (DÍAZ-GONZÁLEZ et al., 2016; LOPEZ; VILLANUEVA; LLOVET, 2006).

Modelo experimental de lesões pré-neoplásicas (LPN)

O desenvolvimento do HCC passa por diferentes estágios que envolvem múltiplas alterações induzidas por agentes físicos, químicos ou biológicos, capazes de gerar danos no DNA, comprometendo o sistema de reparo e ainda estimulando a proliferação celular pois, na formação da neoplasia, há a conversão do dano em alteração herdável (FARBER; SARMA, 1987; MARTINEZ et al., 2003; PITOT, 2001).

Um modelo que vem sendo utilizado para o estudo da hepatocarcinogênese em ratos é aquele do Hepatócito Resistente (HR) descrito em 1976 e modificado em 1987 o qual consiste na administração única do agente DEN (dietilnitrosamina), seguido da administração do 2-AAF (2-acetilanimofluoreno) (SEMPLE-ROBERTS et al., 1987; SOLT; FARBER, 1976). Esse modelo postula que o 2-AAF é capaz de inibir a proliferação dos hepatócitos normais, mas não dos “hepatócitos resistentes” os quais seriam resultados da aplicação do DEN e causariam lesões pré-neoplásicas (LPN) (SCOLASTICI et al., 2014), estas utilizadas na identificação de marcadores neoplásicos, no estudo da progressão tumoral e de estratégias preventivas (PÉREZ-CARREÓN et al., 2006).

Efeito terapêutico do extrato de glândulas salivares de carrapatos

Além das ações anti-hemostática, anticoagulante e anti-inflamatória da saliva dos carrapatos já serem bem conhecidas, novos estudos vêm buscando esclarecer os mecanismos envolvidos na síntese e na utilização do arsenal farmacológico das glândulas salivares dos carrapatos. Os resultados têm demonstrado que os bioativos sintetizados por esses animais

podem ser ótimos aliados em terapias alternativas de diversas doenças, bem como de neoplasias (ABREU, 2014; CHUDZINSKI-TAVASSI et al., 2010; SIMONS et al., 2011).

Segundo a literatura, a saliva de diferentes espécies de carrapatos teria também a capacidade de inibir a proliferação de células endoteliais (FRANCISCHETTI et al., 2009) e dados de Kazimírová e Stibraniova (2013) e Simons et al. (2011) mostraram que a substância Amblyomin-X, por exemplo, extraído da saliva bruta da espécie *Amblyomma cajennense*, teria efeitos tóxicos *in vitro* sobre células tumorais de melanoma, adenocarcinoma pancreático e em células murinas de adenocarcinoma renal levando-as à morte por apoptose, porém, sem afetar os fibroblastos saudáveis (AKAGI et al., 2012). Ainda, o extrato de glândulas salivares obtido de fêmeas de carrapatos *R. sanguineus* alimentados por 2 dias demonstrou potencial de inibir a invasão de células de tumor de Walker 256 instalado na musculatura da pata de ratas Wistar *in vivo*, sem, no entanto, provocar outros danos no organismo (ABREU et al., 2014).

Apesar de diversos pesquisadores já terem evidenciado a ação anti-tumoral da saliva/extrato de glândulas salivares de carrapatos, novos estudos com diferentes modelos tumorais devem ser realizados a fim de se ampliar o conhecimento sobre o possível efeito terapêutico destas substâncias. Além disso, no caso do extrato, a avaliação da sua toxicidade é de importância fundamental, uma vez que o mesmo é composto por substâncias com propriedades biológicas tanto conhecidas quanto ainda nem tão conhecidas e que podem, eventualmente desencadear reações sistêmicas no organismo.

Cultura de células de carrapatos

Estudos com a morfofisiologia de carrapatos vem sendo amplamente desenvolvidos por pesquisadores do grupo *Brazilian Central of Studies on Ticks Morphology* (BCSTM) através de bioensaios com os carrapatos (CAMARGO-MATHIAS, 2013). No entanto, trabalhos que abordem os efeitos desses bioativos sobre células obtidas dos próprios ectoparasitas, na condição *in vitro*, ainda são escassos. Diante disso, testar *in vitro* o potencial acaricida de dois bioativos: o timol extraído de plantas das famílias Lamiaceae e Verbanaceae e o carvacrol extraído de plantas das famílias Apiacea, Lamiacea e Verbenaceae (DE OLIVEIRA-CRUZ et al., 2013; KOC et al., 2013; LAGE et al., 2013) fazendo para tanto o uso de linhagens celulares ao invés de hospedeiros *in vivo*, seria uma estratégia muito interessante para se obter informações sobre a toxicidade dessas substâncias, que embora potentes acaricidas, não teriam ainda totalmente esclarecidos seus efeitos sobre os organismos a elas expostas. Nessa direção é que foi elaborada esta proposta, cujos resultados obtidos *in vitro* serão de extrema importância

no sentido de se propor estratégias de controle desses ectoparasitas sem fazer uso de animais (hospedeiros) *in vivo*.

OBJETIVOS GERAIS

O presente estudo teve como objetivo avaliar *in vivo* o efeito tóxico do extrato da glândula salivar (EGS) de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* s. l. sobre o fígado de ratas Wistar saudáveis e o efeito terapêutico do EGS sobre fígados de ratos Wistar com lesões pré-neoplásicas (LPN) hepáticas. Além disso avaliou, *in vitro*, o efeito acaricida do timol e do carvacrol em cultura de células de carrapatos *R. sanguineus* s. l. da linhagem RML-15, visto serem estes acaricidas de origem natural cujos efeitos tóxicos nessas células de carrapatos não tinham sido ainda estudados.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

-Avaliar a toxicidade sistêmica do EGS em ratos saudáveis expostos às concentrações de 10, 40 e 80µg/µL de proteína do extrato a partir de ensaios clínicos (peso corporal, peso relativo e leucograma) e das análises morfológicas do fígado.

-Avaliar a eficácia terapêutica do EGS obtido de fêmeas de carrapatos *R. sanguineus* s. l. alimentadas por 2 dias em coelhos hospedeiros na concentração de 0,04µg/µL sobre o modelo experimental rato Wistar com LPN induzida.

-Comparar a ação dos acaricidas timol e carvacrol sobre células RML-15 *in vitro* (obtidas de carrapatos *R. sanguineus* s. l.), por meio de técnicas de viabilidade celular, morfologia e de quantificação da caspase-3/7.

MATERIAL E MÉTODOS

Carrapatos

Para a realização deste trabalho foram utilizadas fêmeas adultas de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* s. l. alimentadas em coelhas hospedeiras do Grupo Genético Botucatu, obtidas do Biotério Central da UNESP de Botucatu, São Paulo. Os carrapatos adultos foram obtidos de colônia mantida em estufa BOD em condições controladas (29°C, 80% de umidade e fotoperíodo de 12 horas) em sala do Biotério do Departamento de Biologia da UNESP de Rio Claro, São Paulo.

Obtenção do Extrato da Glândula Salivar (EGS) de *Rhipicephalus sanguineus* s. l.

Foram utilizadas glândulas salivares retiradas das fêmeas de carrapatos *R. sanguineus* s. l. alimentadas por 2 dias em coelhas hospedeiras. As glândulas foram maceradas em microtubos contendo tampão fosfato de sódio, pH 7.4 e, posteriormente, procedeu-se a centrifugação do material por 30 minutos a 10.000xg. O sobrenadante foi coletado em tubos estéreis e em fluxo laminar, o extrato obtido foi esterilizado com filtro de 0,22 µm e armazenado em freezer -80°C até o momento da utilização (CAMARGO-MATHIAS; FURQUIM; NUNES, 2011).

A quantificação das proteínas foi realizada segundo o protocolo de Bradford (BRADFORD, 1976) e fazendo uso de albumina bovina (BSA) como padrão. As leituras das absorvâncias foram realizadas em espectrofotômetro ThermoBioMate 3 (Madison, EUA).

Ensaio *in vivo*

Foram utilizados ratos Wistar machos, com 3 a 4 semanas de idade (ensaio terapêutico) e ratas Wistar fêmeas, com 6 a 8 semanas de idade (ensaio de toxicidade) com pesos médios semelhantes, obtidos do Biotério Central da UNESP de Botucatu, SP e mantidos em sala no Biotério do Departamento de Biologia do IB da UNESP de Rio Claro, SP em caixas retangulares de propileno (30 X 20 X 13cm), forradas com cama de maravalha e sob condições controladas (22°C ±2°, 50% de umidade, ventilação e fotoperíodo de 12 horas). Os animais foram alimentados com ração *ad libidum* e tiveram livre acesso ao bebedouro contendo água filtrada.

Todos os procedimentos com os animais utilizados nesse estudo foram previamente aprovados pelo CEUA (Comitê de Ética em Uso Animal) da UNESP de Rio Claro, SP, protocolo nº 25/2015.

Ensaio de Toxicidade: Aplicação dos Compostos

Para o ensaio de toxicidade aguda foram determinados os seguintes grupos (sendo 3 ratas/grupo):

Grupo Controle: exposição a solução salina (GC);

Grupos EGS: exposição a concentrações de 10 µg/µL (**EGS 10µg/µL**); 40 µg/µL (**EGS 40µg/µL**) e 80 µg/µL (**EGS 80µg/µL**) do extrato da glândula salivar.

Todos os ensaios de toxicidade foram conduzidos de acordo com as recomendações do protocolo da “Organization for Economic Co-Operation and Development” (OECD).

A administração dos compostos, tanto dos extratos quanto da solução salina, foi realizada através de injeção intraperitoneal, com o volume ajustado para cada peso corporal dos animais para obtenção de uma dose final padronizada, seguido de acompanhamento diário dos animais até o 14º dia de exposição para avaliação do peso corpóreo. Ao final dos 14 dias, as ratas foram anestesiadas para coleta do sangue da artéria aorta abdominal e eutanasiadas para retirada do fígado. A eutanásia deu-se pelo excesso de administração dos anestésicos Quetamina/Xilasina, (300mg/kg e 30mg/kg) e foi acompanhada pela médica-veterinária Leticia Maria Graballos Ferraz Hebling CRMV-SP 5412.

O fígado foi processado para histologia e para a quantificação da porcentagem de leucócitos (esfregaço do sangue corado por Giemsa) (LINDSTROM et al., 2015).

Além do fígado, foram retirados também o baço e os rins e pesados separadamente para a análise do peso relativo destes órgãos como ferramenta para identificar toxicidade nestes órgãos (MICHAEL et al., 2007).

Avaliação do efeito do EGS em Lesões Pré-Neoplásicas (LPN)

Indução das LPN

As lesões pré-neoplásicas (LPN) foram induzidas seguindo o protocolo do modelo do “hepatócito resistente” (HR) descrito por Solt e Farber (1976), modificado por Semple-Roberts e colaboradores (1987) e adaptado para ratos Wistar machos por Moreno e colaboradores (1991), através da administração intraperitoneal em ratos Wistar de dose única do agente iniciante dietilnitrosamina (DEN 20mg/100g de peso corpóreo/animal), dissolvido em solução de NaCl a 0,9%. Após 2 semanas, foram administradas oralmente com auxílio de cânula para gavagem, doses únicas de 2-acetilaminofluoreno (2-AAF, 2,5mg/100g de peso corpóreo), diluído em solução de dimetilsulfóxido (DMSO) e óleo de milho (OM), por quatro dias

consecutivos e dois reforços da dose foram aplicados sete e nove dias após a última administração de 2-AAF, onde os animais receberam também por via oral uma dose de 2-AAF (2mg/100g de peso corpóreo).

Aplicação do EGS

Para o desenvolvimento do ensaio terapêutico, os animais foram alocados em grupos (4 ratos/grupo):

Grupo Controle: Animais não passaram pelo protocolo de indução das LPN e não receberam EGS;

Grupo EGS: Receberam 8 injeções intraperitoneais do EGS 0,04µg/µL com volume final (aproximadamente 200µL) ajustado para cada peso dos animais, em dias alternados, durante 16 dias.

Grupo LPN: Receberam DEN e 2-AAF, para indução da LPN.

Grupo LPN + EGS: Receberam DEN e 2-AAF, para indução da LPN e posteriormente cada rato recebeu 8 injeções intraperitoneais do EGS a 0,04µg/µL com volume final (aproximadamente 200µL) ajustado para cada peso dos animais, em dias alternados, durante 16 dias.

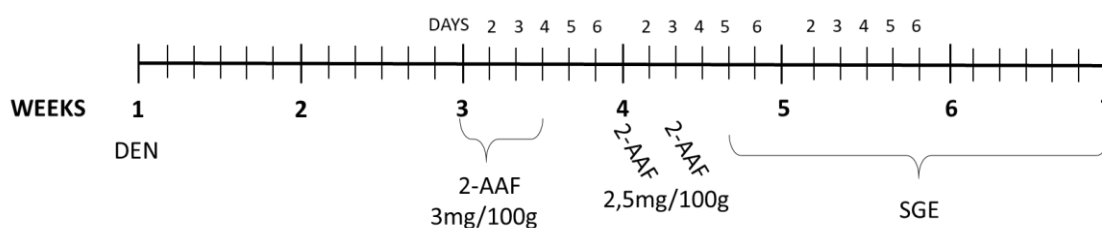


Figura 1: Representação esquemática do protocolo experimental para indução das lesões pré-neoplásicas (LPN) durante as 7 semanas de exposição aos compostos: dietilnitrosamina (DEN) e 2-acetilaminofluoreno (2-AAF) e ao tratamento com o extrato da glândula salivar (EGS).

Foi realizada observação dos animais semanalmente para avaliação do peso corpóreo, realizada com balança eletrônica de precisão (Marte LC1 V3.0).

Depois de terminados os bioensaios, os ratos foram anestesiados e eutanasiados, sob a supervisão da médica-veterinária Leticia Maria Graballos Ferraz Hebling CRMV-SP 5412 com injeção dos anestésicos Quetamina/Xilasina (300mg/kg e 30mg/kg). O sangue da artéria aorta abdominal foi retirado para análise hematológica e os órgãos (fígado, rins e baço) foram

pesados para análise de peso relativo. Fragmentos apenas do fígado foram fixados para a rotina histológica.

Análise hematológica

Os leucogramas foram obtidos no analisador multiparamétrico de quantificação celular para hematologia, Pentra 80 (ABX Diagnostics, Montpellier, France). O colesterol foi dosado a partir do soro obtido do sangue dos ratos após eutanásia, por meio do aparelho BIOPLUS (analisador multiparamétrico semi-automático de ensaios colorimétricos e enzimáticos para bioquímica) e dos “kits” BIOLAB (seguindo instruções do fabricante). Ambas análises foram realizadas nas dependências do Laboratório de Análises Clínicas das Faculdades Integradas Einstein de Limeira-SP, sob responsabilidade técnica do biomédico Luís Fernando Sodelli (CRBM nº 4.099).

Análises Histológicas

As análises histológicas dos fígados obtidos tanto dos animais submetidos ao ensaio terapêutico quanto dos animais submetidos ao ensaio de toxicidade foram realizadas no Laboratório de Histologia do Departamento de Biologia da UNESP, campus de Rio Claro, SP. Para tanto fragmentos do fígado (aproximadamente 3mm) foram fixados em paraformaldeído 4% e em mistura aquosa de Bouin por 14 dias.

Após fixação, procedeu-se a desidratação em concentrações crescentes de álcool (70%, 80%, 90% e 95%), com banhos de 60 minutos cada, transferência para resina de embebição por 14 dias, inclusão em historesina Leica e secção (3 µm) em micrótomo. As secções foram recolhidas em lâminas de vidro e submetidas à: a) coloração pela hematoxilina e eosina (HE), para detecção de estruturas ácidas e básicas, respectivamente e b) reação pelo PAS (Ácido Periódico- Schiff, segundo McManus, 1946), para detecção de polissacarídeos totais, em especial o glicogênio.

Coloração pela hematoxilina e eosina (HE)

As secções obtidas foram reidratadas por 1 minuto em água destilada, coradas com hematoxilina por 7 minutos e em seguida colocadas em água corrente durante 5 minutos para que a reação ocorresse. Depois foram novamente lavadas em água corrente para remoção do excesso do corante, e então submersas em eosina por 5 minutos e novamente lavadas em água corrente. Após a secagem, foram mergulhadas em xilol e montadas com bálsamo de Canadá e lamínula de vidro para posterior observação e fotodocumentação em microscópio de luz de campo claro Leica DM750.

Para a quantificação das células de Kupffer, uma grade de teste de 100 pontos foi sobreposta às imagens das secções histológicas. Dez campos/animal de ampliação de 400x foram contados aleatoriamente.

Técnica do PAS (Ácido Periódico- Schiff) (McMANUS, 1946)

As secções foram reidratadas por 1 minuto em água destilada e transferidas para solução de ácido periódico 4% por 10 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água destilada por 1 minuto e colocadas no reagente de Schiff por 1 hora, sendo posteriormente lavadas por 15 minutos em água corrente. Após secagem as lâminas foram montadas em bálsamo do Canadá para posterior análise quantitativa da área total ocupada pelo polissacarídeo nos hepatócitos.

Para a análise do glicogênio, duas secções PAS positivas de cada indivíduo foram analisadas e tiveram cinco campos fotografados/seção (distantes de grandes vasos, para que o maior número de hepatócitos possíveis fosse analisado). As fotos foram analisadas em software ImageJ (National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA) para quantificar a intensidade de glicogênio marcado pelo PAS e os valores da área marcada foram obtidos utilizando Threshould entre 0 e 145 para cada imagem, de acordo com Karami et al. (2016).

Ensaio *in vitro*

Os ensaios *in vitro* foram realizados nos laboratórios do Departamento de Biologia da Infecção, no Instituto de Infecção e Saúde Global, na Universidade de Liverpool em Liverpool, Reino Unido e nos laboratórios do Departamento de Biologia, no Instituto de Biociências, na UNESP Campus de Rio Claro – SP, Brasil.

Manutenção da linhagem de células de carrapatos: RML-15 (Rocky Mountain Lab)

A linhagem RML-15 derivada de embriões de carrapatos da espécie *R. sanguineus* foi inicialmente desenvolvida por Yunker e colaboradores (1981) no laboratório *Rocky Mountain* em Hamilton, Montana, EUA. Essa linhagem foi gentilmente cedida pela Dra. Lesley Bell-Sakyi do Departamento de Biologia da Infecção, no Instituto de Infecção e Saúde Global, na Universidade de Liverpool em Liverpool, Reino Unido.

As células foram mantidas, no Brasil, em incubadoras à 28°C, em tubos acrílicos de lado plano (Nunc, produto n.º 156758). O meio de cultura utilizado foi o L-15/MEM (meio de cultura L-15 (Leibovitz)/ meio de cultura MEM (Minimal Essential Medium), Tryptose phosphate broth (TPB), L-Glutamina 200mM e Penicilina (10,000u)/ Streptomomicina (10,000µg)

suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB). As trocas do meio foram realizadas uma vez por semana, removendo-se cerca de 50% a 80% do volume do meio consumido e substituindo-o por um meio novo e preparado no dia. Ressalte-se que as células de carrapatos podem sobreviver por períodos de até 3 semanas sem que haja necessidade de manutenção, e por vários meses sem repique celular.

Exposição da linhagem celular RML-15 ao timol e ao carvacrol

Para a exposição das células aos compostos acaricidas, utilizou-se timol e carvacrol, comprados da empresa Sigma (Timol T0501 e Carvacrol 282197). As diluições dos produtos foram feitas em soluções hidroetanólicas.

As células da linhagem RML-15 foram cultivadas em 11 tubos acrílicos de lado plano e foram expostas a:

T1: Timol na concentração de 0,07 mg/mL;

T2: Timol a 0,014 mg/mL;

T3: Timol a 0,0028 mg/mL;

T4: Timol a 0,00056 mg/mL;

TC: Controle do timol (etanol a 1,3% usado para solubilizar a maior concentração de timol aqui testada- 0,07mg/mL); e ao carvacrol:

C1: Carvacrol na concentração de 0,3 µL/mL;

C2: Carvacrol a 0,06 µL/mL;

C3: Carvacrol a 0,012 µL/mL;

C4: Carvacrol a 0,0025 µL/mL;

C5: Carvacrol a 0,0005 µL/mL;

CC: Controle do carvacrol (etanol a 2,2% usado para solubilizar a maior concentração de carvacrol aqui testada- 0,3 µL/mL).

Todas as concentrações utilizadas foram previamente selecionadas em piloto com a própria linhagem celular.

Análise da viabilidade celular e da confluência das células

Após decorridas 24, 48 e 72 horas das exposições ao timol e ao carvacrol, realizou-se a contagem do número de células viáveis em câmara de Neubauer e no próprio tubo evidenciadas pelo azul de Trypan. As imagens foram obtidas em microscópio invertido (Axiovert 25; Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha) para observação da confluência.

Análise morfológica das células RML-15

Após os períodos de exposição (24, 48 e 72h) aos compostos, foi realizado o esfregão das células em lâminas de vidro e coloração pelo Giemsa para serem posteriormente fotodocumentadas em microscópio de luz de campo claro Leica DM750.

Quantificação de células apoptóticas

As células foram destacadas dos tubos com o auxílio de pipeta automática através de movimentos de “flush”, centrifugadas e o sobrenadante foi descartado. Em seguida, as células foram ressuspensas em meio de cultura e o número total de células (células/mL) foi obtido por meio do analisador de células MUSE (MERK Millipore Corporation, USA). Na sequência, foi realizada a diluição das células com tampão de ensaio proveniente do kit MUSE™ Caspase-3/7 para adequação de 1 a 5×10^6 células/mL e aplicou-se o protocolo de marcação celular via kit MUSE™ Caspase-3/7 (Merk Millipore Corporation, USA). A porcentagem de células marcadas com caspase-3/7 (apoptóticas) ou com o corante 7-AAD (necróticas) foi determinada por meio de software próprio do equipamento, cujos resultados, expressos em histogramas, mostraram o número de eventos em função da fluorescência.

Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média $\pm$ erro padrão da média e submetidos estatisticamente a análise de variância com comparações múltiplas (ANOVA), seguido do teste de Tukey-Kramer (uma via) para o peso corpóreo, o colesterol, as células de Kupffer e a quantificação do glicogênio, ou pelo teste Bonferroni (duas vidas) para: o peso relativo dos órgãos e o leucograma, utilizando o programa GraphPad Prisma (GraphPad Prism Software Inc, 2007). Para determinar a significância dos resultados, valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

RESULTADOS

ARTIGO 1

Toxicidade aguda decorrente da exposição de ratas Wistar ao extrato das glândulas salivares do carrapato do cão *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae). Avaliação histopatológica do fígado.

Natalia Rubio Claret Pereira^a, Rusleyd Maria Magalhães de Abreu^b, Maria Izabel Camargo-Mathias^a

^a Department of Biology, Bioscience Institute, São Paulo State University (UNESP), Rio Claro, SP, Brazil

^b Center of Biological Sciences and Nature, Federal University of Acre (UFAC), Rio Branco, AC, Brazil

Corresponding author: Tel.: +55-19-3526 4135, Fax: +55-19-3534 0009.

E-mail address: maria.izabel@unesp.br

ORCID Maria Izabel Camargo-Mathias: 0000-0002-9418-8934

RESUMO

Estudos com enfoque toxicológico tem papel fundamental para se compreender os efeitos nocivos de substâncias, principalmente naqueles que abordam o desenvolvimento de compostos terapêuticos naturais, como é o caso do extrato da glândula salivar (EGS) obtido de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* s. l. (carrapato do cão). Visto esta saliva já ter comprovadamente caracterizada a presença de inúmeros bioativos de onde se poderia extrair proteínas de importante efeito terapêutico, fica-se uma lacuna no que diz respeito a obtenção de informações que demonstrem se esses mesmos bioativos potencialmente inibidores de patologias, teriam outros efeitos, incluindo a toxicidade sobre o organismo a ele exposto. Assim, o presente estudo avaliou o efeito de EGS de fêmeas de carrapatos *R. sanguineus* s. l. alimentadas por 2 dias, em coelhas hospedeiras, nas concentrações de 10, 40 e 80 µg/µL de proteína, injetado por via intraperitoneal em ratas Wistar analisando os parâmetros: peso corpóreo, peso relativo dos

órgãos e leucograma, além da avaliação morfohistológica do fígado destes indivíduos, para se detectar possíveis efeitos tóxicos. Os resultados mostraram que a concentração de 10 µg/µL o EGS causou aumento de neutrófilos e diminuição de linfócitos e alterações histológicas como vacuolização citoplasmática e desorganização nos cordões de hepatócitos. Já nas concentrações de 40 e 80 µg/µL, as maiores aqui analisadas, ocorreu alteração no ganho de peso das ratas, diminuição no peso relativo do fígado, seguida de alterações nos hepatócitos como: vacuolização citoplasmática, alterações nucleares (forma irregular e picnose) e aumento no número de células de Kupffer no órgão como um todo. Esses resultados demonstraram que a menor concentração aqui testada (10 µg/µL) não causou toxicidade sistêmica, apenas alguns sinais de hepatotoxicidade. As maiores concentrações (40 e 80 µg/µL) causaram toxicidade sistêmica, comprovada pelo aumento do peso relativo do órgão, bem como pelas alterações morfohistológicas e histoquímicas (vacuolização citoplasmática, acúmulo de vesículas lipídicas e picnose nuclear).

Palavras-chave: Carrapatos, histologia, toxicidade sistêmica, Peso relativo do órgão, hepatócito.

Introdução

Estudos com enfoque toxicológico se baseiam na observação de sinais de toxicidade que visam compreender os efeitos da combinação de substâncias potencialmente nocivas em determinados órgãos e sistemas dos vertebrados (OGA et al., 2008). Sob essa perspectiva, o fígado é considerado um importante órgão por desempenhar funções que envolvem a biotransformação de substâncias endógenas, bem como pela produção de certas enzimas, sendo portanto, o primeiro a ser exposto às substâncias tóxicas via sistema circulatório (HAYES, 2008).

A definição de substância tóxica, envolve vários conhecimentos, inclusive saber qual é a dose a ser administrada, que método de administração utilizar e qual o tempo de exposição, fatores esses que conjuntamente podem levar ao estado de toxicidade (MURPHY, 1979).

A literatura tem mostrado que especificamente nos ensaios de toxicidade aguda devem ser avaliados os efeitos adversos que surgem após a administração única de uma dose consideravelmente alta de determinada substância, sendo este método frequentemente utilizado tanto para avaliar o potencial tóxico da substância em casos de exposições únicas, quanto o mecanismo de ação, identificando órgãos ou sistemas afetados e determinando se esses efeitos poderiam ser revertidos (OECD 420, 2001; OGA et al., 2008).

A busca por compostos naturais com propriedades diversas, inclusive aquelas terapêuticas têm sido uma constante, principalmente os já popularizados por já terem sido estudados sob diversos aspectos. Além das plantas, os animais também podem ser considerados fontes destes compostos (KAZIMÍROVÁ, 2012), incluindo-se aqui os carrapatos, importantes pragas da agropecuária e das zonas urbanas, uma vez que parasitam animais domésticos, muitos dos quais coabitam com o homem o interior das residências, caso dos cães e gatos (CUNHA et al., 2009; MOERBECK et al., 2016; SILVA et al., 2017).

Estudos com esses ectoparasitas tem demonstrado que os mesmos estão adquirindo também um novo status, uma vez que possuem capacidade de produzir bioativos que tem potencial para serem utilizados em diversas áreas. Pode-se citar aqui as glândulas salivares, importantes órgãos dos carrapatos, por sintetizarem e liberarem substâncias que serão fundamentais para que os mesmos consigam ter sucesso no seu repasto sanguíneo (KOTÁL, et. al., 2015; CAMARGO-MATHIAS, 2018). Dentre os bioativos que são sintetizados nas glândulas salivares podem ser encontradas moléculas como esterases, prostaglandinas, glicoproteínas e lipoproteínas (BINNINGTON, 1978; WALKER et al., 1985; BOWMAN et al., 1996) fundamentais para os processos de fixação do carrapato no hospedeiro (vasodilatação, angiogênese, diminuição da coagulação, aumento da fibrinólise, inibição da agregação plaquetária; alteração do processo inflamatório) (DREWES et al., 2012; HOVIUS; LEVI; FIKRIG, 2008; SAUER; ESSENBERG; BOWMAN, 2000).

Estudos que vem sendo desenvolvidos tem mostrado o potencial terapêutico do conjunto desses bioativos (SIMONS et al., 2011), os quais podem ser obtidos a partir de extratos das glândulas salivares (EGS) de carrapatos. Alguns trabalhos já foram desenvolvidos com a espécie *Amblyomma cajennense* cujo extrato mostrou-se tóxico para células de melanoma em cultura, bem como para células de adenocarcinoma do pâncreas, não sendo tóxico, no entanto, para fibroblastos também em cultura (CHUDZINSKI-TAVASSI et al., 2016). Abreu et al. (2014) desenvolveram estudo que mostraram os efeitos anti-tumorais do EGS de carrapatos *R. sanguineus* s.l. *in vivo* sobre o tumor de Walker 256 na pata de ratos Wistar.

Embora esses estudos anteriormente mencionados tenham mostrado a ação dos bioativos produzidos pelas glândulas salivares de carrapatos, para que os mesmos possam futuramente ter algum dos seus componentes utilizados em terapias, sejam estas contra o câncer ou contra qualquer outro tipo de doença, faz-se imprescindível estudos toxicológicos desses extratos e, sendo assim, o presente estudo teve como objetivo inocular por via intraperitoneal ratos Wistar fêmeas com diferentes quantidades de EGS obtidos a partir de fêmeas de carrapatos *R.*

sanguineus s.l., com dois dias de alimentação, com a finalidade de se investigar possíveis efeitos de toxicidade sistêmica nos animais por meio da avaliação morfológica do fígado destes indivíduos.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados ratas Wistar fêmeas, com 6 a 8 semanas de idade e pesando entre 350 e 400 gramas, obtidas do Biotério Central da UNESP de Botucatu, SP e que foram mantidas em sala do Biotério, do Departamento de Biologia do IB da UNESP/Rio Claro, SP em caixas retangulares de propileno com dimensões de 30 X 20 X 13cm. Estas foram forradas com cama de maravalha a qual foi trocada 2 vezes por semana, e mantidas em sala sob condições controladas ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$, 50% de umidade, ventilação apropriada e fotoperíodo de 12 horas). Os animais foram alimentados com ração *ad libidum* e tiveram livre acesso ao bebedouro contendo água filtrada.

O extrato glandular utilizado neste estudo foi obtido a partir da remoção das glândulas salivares de fêmeas de carrapatos *R. sanguineus* s. l., alimentadas por 2 dias em coelhas hospedeiras. Depois de retiradas, as glândulas salivares foram maceradas em microtubos contendo tampão fosfato de sódio, pH 7.4. Na sequência o tubo foi centrifugado por 30 minutos a $10.000\times g$ e o sobrenadante foi coletado em tubos estéreis. Em fluxo laminar, o extrato foi esterilizado com filtro de $0,22\text{ }\mu\text{m}$ para ser armazenado em freezer -80°C até a utilização.

A quantificação das proteínas foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), utilizando albumina bovina (BSA) como padrão. As leituras das absorbâncias foram realizadas em espectrofotômetro ThermoBioMate 3 (Madison, EUA) e a quantidade de proteína obtida foi dada na unidade de $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

O presente estudo foi submetido ao CEUA (Comitê de Ética em Uso Animal) da UNESP de Rio Claro, SP, protocolo nº 25/2015.

Ensaio de Toxicidade do Extrato da Glândula Salivar

Para o ensaio de toxicidade aguda, foram expostas 3 ratas/grupo:

Grupo Controle: Com tampão fosfato de sódio (GC);

Grupos EGS: nas concentrações de $10\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (EGS $10\mu\text{g}/\mu\text{L}$); $40\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (EGS $40\mu\text{g}/\mu\text{L}$) e $80\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (EGS $80\mu\text{g}/\mu\text{L}$). A exposição aguda ao EGS foi realizada em ratas Wistar, com 6 a 8 semanas de idade, via intraperitoneal.

Todos os ensaios de toxicidade foram conduzidos de acordo com as recomendações do protocolo da “Organization for Economic Co-Operation and Development” (OECD).

Após as injeções, os animais foram observados diariamente até o 14º dia de exposição para avaliação do seu peso corpóreo. No final dos 14 dias, as ratas foram anestesiadas para coleta: do sangue da artéria aorta abdominal e após eutanásia a coleta dos órgãos (fígado, rins e baço). Para a eutanásia administrou-se Quetamina/Xilasina (300mg/kg e 30mg/kg). O peso relativo dos órgãos (fígado, rins e baço) foi avaliado, o fígado foi processado para histologia e foi realizada a quantificação da porcentagem de leucócitos a partir do esfregaço do sangue corado pelo Giemsa (LINDSTROM et al., 2015).

Análises Histológicas

Foram realizadas no Laboratório de Histologia do Departamento de Biologia da UNESP, campus de Rio Claro, SP. Para tanto, fragmentos de fígado (aproximadamente 3mm) foram fixados em paraformaldeído 4% e em mistura aquosa de Bouin por 14 dias.

Após a fixação os fragmentos foram desidratados em concentrações crescentes de álcool (70%, 80%, 90% e 95%), banhos de 60 minutos cada, transferidos para resina de embebição por 14 dias, incluídos em historesina Leica e seccionados (3 µm) em micrótomo. Na sequência, as secções foram recolhidas em lâminas de vidro e submetidas à: a) coloração pela hematoxilina e eosina (HE), para detecção de estruturas ácidas e básicas, respectivamente e b) reação pelo PAS (Ácido Periódico- Schiff, segundo McManus, 1946), para detecção de polissacarídeos totais, em especial o glicogênio.

Coloração pela hematoxilina e eosina (HE)

As secções obtidas foram reidratadas por 1 minuto em água destilada, coradas com hematoxilina por 7 minutos e lavadas por 5 minutos em água corrente para que a reação ocorresse. Na sequência, foram lavadas novamente em água corrente para remoção do excesso do corante, coradas com eosina por 5 minutos e lavadas em água corrente. Após a secagem das lâminas, estas foram montadas em bálsamo de Canadá para posterior observação e fotodocumentação em microscópio de luz de campo claro Leica DM750.

Para a quantificação das células de Kupffer, uma grade de teste de 100 pontos/animal foi sobreposta às imagens das secções histológicas. Dez campos/animal (ampliação de 400x) foram contados aleatoriamente.

Técnica do PAS (Ácido Periódico- Schiff) (McMANUS, 1946)

Esta técnica foi utilizada para detecção de polissacarídeos. As secções foram reidratadas por 1 minuto em água destilada para então serem transferidas para solução de ácido periódico 4% por 10 minutos. Novamente foram lavadas em água destilada por 1 minuto e na sequência colocadas, por 1 hora, no reagente de Schiff. A seguir foram lavadas, por 15 minutos, em água corrente. Após a secagem foram montadas em bálsamo do Canadá para posterior quantificação da área total ocupada pelo polissacarídeo nos hepatócitos. Para a análise do glicogênio, duas secções/indivíduo PAS positivas foram analisadas, nos quais cinco campos foram fotografados e analisados em cada secção, sempre distantes de grandes vasos, para que o maior número de hepatócitos fosse analisado. A fim de quantificar a quantidade de glicogênio marcado pelo PAS, as fotos foram analisadas em software ImageJ (National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA) e os valores de área marcada foram obtidos utilizando Threshold entre 0 e 145 para cada imagem, de acordo com Karami et al. (2016).

Análise estatística

Para quantificação do glicogênio, as fotos dos hepatócitos foram analisadas pelo software ImageJ (National Institutes of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA). Os dados de área gerados pelo programa foram tabelados e analisados estatisticamente pelo programa GraphPad Prisma (GraphPad Prism Software Inc, 2007).

Os resultados obtidos foram apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (e.p.m.) e submetidos estatisticamente a análise de variância com comparações múltiplas (ANOVA), seguido do teste de Tukey-Kramer (uma via), ou pelo teste Bonferroni (duas vidas) quando necessário utilizando o programa GraphPad Prisma (GraphPad Prism Software Inc, 2007) para determinar a significância dos resultados.

RESULTADOS

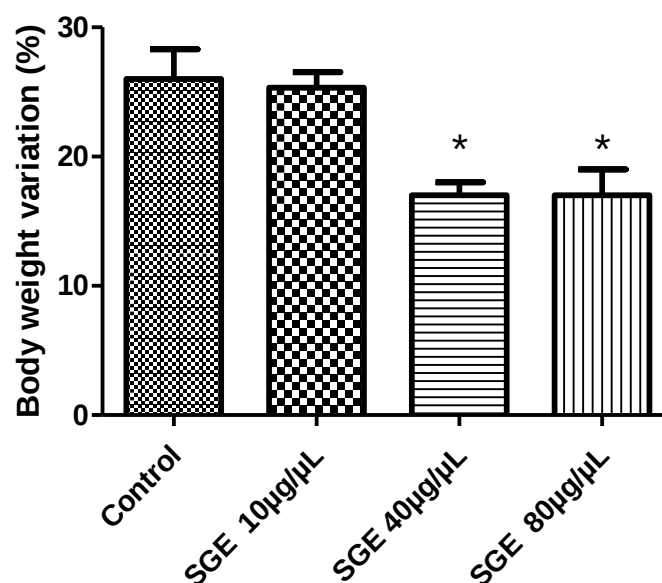
Pesos corporal e relativo dos órgãos

O peso corporal de todos os animais aqui analisados foi obtido antes da injeção dos extratos, bem como 14 dias após a aplicação única. A variação da massa corporal foi calculada por meio do valor do peso inicial do animal, subtraído do seu peso obtido ao final dos 14 dias. A análise do Gráfico 1 permitiu observar que os animais expostos às concentrações de 40 e 80 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ do extrato da glândula salivar de carrapatos deixaram de ganhar massa corpórea, ao contrário dos animais dos grupos controle e exposto ao extrato na concentração de 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ que apresentaram diferença significativa nesse parâmetro.

A análise do gráfico 2 que compila os dados obtidos do peso relativo dos órgãos, a saber: rim, baço e fígado, mostrou que houve diminuição significativa apenas no peso do fígado daqueles animais expostos às concentrações de 40 e 80µg/µL do extrato em relação ao controle e ao EGS 10µg/µL. Não foram detectadas alterações nos pesos do rim e do baço em nenhum dos grupos analisados.

Análises clínicas

Os resultados mostrados no leucograma dos animais do grupo controle e dos grupos expostos ao EGS nas diferentes concentrações, estão resumidos no Gráfico 3, EGS 40 µg/µL e EGS 80 µg/µL.



* $P > 0.05$ vs Control, SGE 10µg/µL

Gráfico 1: Variação do peso corpóreo (gramas) das ratas do grupo controle e das expostas ao EGS nas concentrações 10, 40 e 80 µg/µL (n=3).

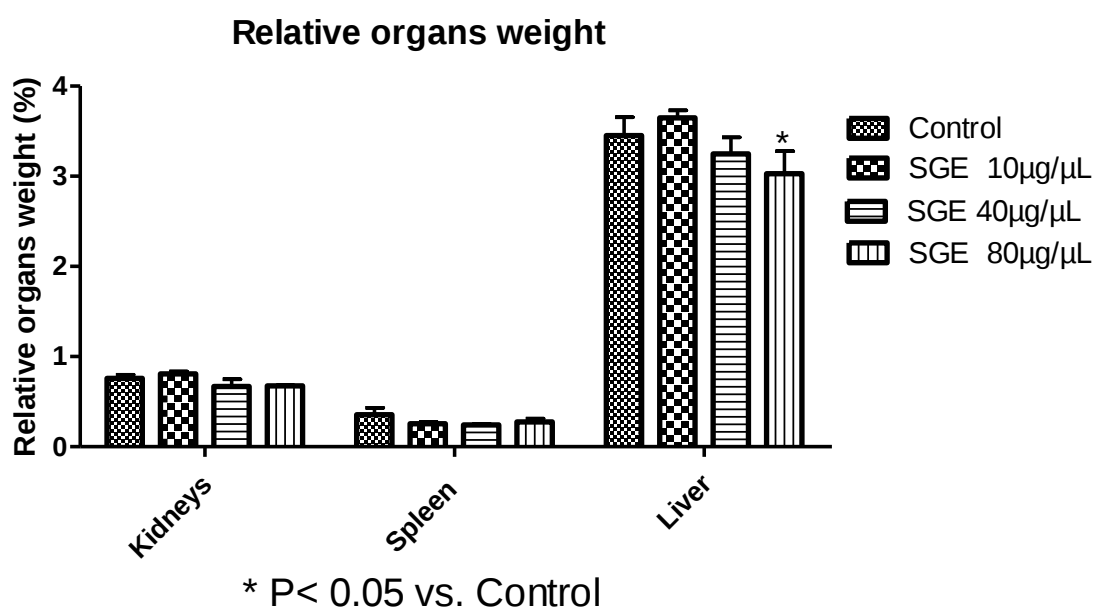


Gráfico 2: Peso relativo (gramas) dos órgãos das ratas do grupo controle e das expostas ao EGS nas concentrações de 10, 40 e 80 µg/µL (n=3). 2

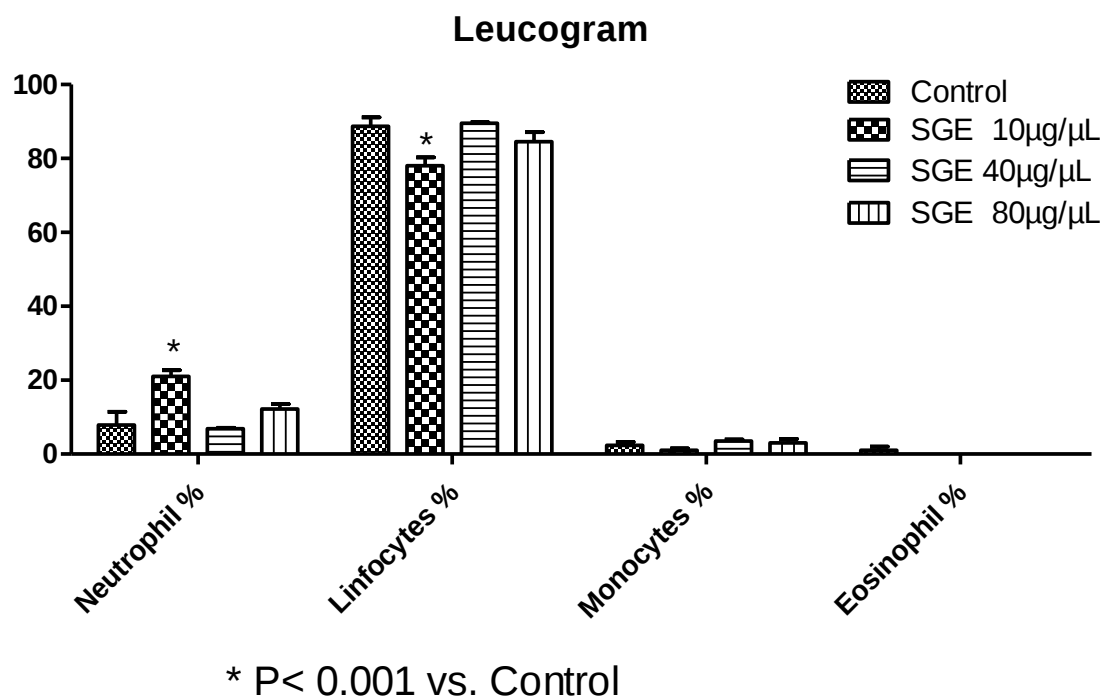


Gráfico 3: Leucograma obtido a partir do sangue coletado das ratas do grupo controle e das expostas ao EGS nas concentrações de 10, 40 e 80 µg/µL (n=3).3

Análises Histológica e Histoquímica

Grupo Controle

Os resultados da análise histológica dos fígados dos animais do grupo controle demonstraram que, assim como era esperado e segundo descrição de Junqueira & Carneiro (2018), o tecido hepático apresentou-se íntegro (Fig. 1B), ou seja, os hepatócitos dispostos em cordões mantiveram sua forma poliédrica com citoplasma eosinofílico (Fig 1B) e com a presença de polissacarídeo (glicogênio) no citoplasma, elemento este que foi aqui evidenciado pela técnica de PAS (Fig 1F). Ainda com esta técnica, foi quantificada a porcentagem de área marcada pela cor púrpura nas secções histológicas, através do software ImageJ a qual foi posteriormente comparada entre os grupos (Gráfico 4), deixando claro que não houve alteração significativa na quantidade da marcação de PAS nos hepatócitos dos animais alocados em todos os grupos de exposição ao extrato quando comparados ao grupo controle. Os hepatócitos, de maneira geral, apresentaram-se mono ou binucleados, com núcleos arredondados, corados pela hematoxilina e com presença de cromatina descondensada no seu interior, indicando fase de atividade dos mesmos. Pode-se também observar no núcleo a presença de um ou mais nucléolos (Fig. 1B). Por meio da observação da presença de núcleos alongados e fortemente eosinofílicos, evidenciou-se a presença das células de Kupffer (Fig 1B), macrófagos típicos do fígado. Estas células foram também quantificadas (contagem de células/área do fígado) cujos resultados encontram-se resumidos no gráfico 5, e que mostraram que houve um aumento significativo dessas células apenas nos fígados dos animais do grupo exposto ao EGS 80 µg/µL.

Grupo EGS 1: 10µg/µL

Os fígados dos indivíduos que receberam injeção com essa concentração de extrato, mostraram leves alterações nas células e no tecido em geral. Os hepatócitos ao contrário do observado no grupo controle, estavam desorganizados, ou seja, sem a disposição original no órgão (sob a forma de cordões hepáticos) (Fig 1C). A morfologia dos hepatócitos não sofreu alterações após a exposição à essa concentração do extrato, porém pode-se observar que no citoplasma de algumas células já havia regiões com indícios de vacuolização (Fig 1C). Os núcleos dos hepatócitos permaneceram com a cromatina descondensada, significando que estavam ainda em atividade, inclusive com nucléolos evidentes (Fig 1C).

Histoquimicamente pode-se observar que o glicogênio citoplasmático dos hepatócitos manteve a mesma distribuição daquela observada no grupo controle (Fig 1G) e, a quantificação desse polissacarídeo não se alterou em relação ao grupo controle (Gráfico 4). A presença e características morfológicas das células de Kupffer foram semelhantes ao observado no fígado

dos indivíduos do grupo controle, dados estes que se encontram resumidos na Figura 1C e quantificadas no Gráfico 5, mostrando que não ocorreram alterações na quantidade dessas células.

Grupo EGS 2: 40µg/µL

Ao analisar-se o tecido hepático dos animais expostos ao EGS na concentração de 40µg/µL, pode-se notar que os cordões de hepatócitos se mantiveram preservados (Fig 1D), assim como no grupo controle e ao contrário daqueles dos animais expostos à 10µg/µL (Fig 1C). Os hepatócitos de forma geral, mantiveram sua forma original, no entanto, o citoplasma destas células foi marcado com menor intensidade eosinofílica do que aqueles dos fígados dos animais do grupo controle (Fig. 1B). Ainda no citoplasma dos hepatócitos observou-se a presença de regiões que não foram marcadas pela eosina, o que poderia sugerir o início de um processo de esteatose (presença de gotículas lipídicas) (Fig. 1D). Os núcleos dos hepatócitos apresentaram alterações tanto na forma, que passou de arredondada para irregular quanto na condensação da cromatina, a qual foi bem mais evidente nestas células, caracterizando assim início de picnose e consequente diminuição da atividade nuclear (Fig 1D).

Os dados histoquímicos mostraram que a marcação para o glicogênio (Fig 1H) foi semelhante àquela observada nos animais do grupo controle (Fig 1F), ou seja, quando se realizou a quantificação esta mostrou resultados semelhantes aos obtidos no grupo controle (Gráfico 4). As características morfológicas das células de Kupffer foram aqui também observadas (Fig. 1D) e constatou-se que não houve alterações, assim como não se observou mudança de valores nas quantificações quando comparadas ao grupo controle (Gráfico 5).

Grupo EGS 3: 80µg/µL

A exposição das ratas à concentração de 80µg/µL do extrato provocou alterações no tecido hepático, no entanto não alterou a disposição das células na forma de cordões (Fig 1E), resultado que permaneceu semelhante ao observado nos grupos controle (Fig 1B) e EGS 40µg/µL (Fig 1D) e, diferente do observado no grupo EGS 10 µg/µL (Fig 1C). Os hepatócitos mostraram aumento da vacuolização citoplasmática, evidenciando regiões que estariam abrigando gotículas lipídicas, as quais não puderam ser demonstradas pela especificidade da técnica histoquímica utilizada (Fig 1E). Esses dados corroboraram aqueles anteriormente observados nos indivíduos expostos à concentração de 40µg/µL de EGS (Fig. 1D).

A técnica para detecção de glicogênio mostrou no citoplasma dos hepatócitos duas regiões distintas: uma negativa à marcação e outra onde a marcação foi fortemente positiva

(provavelmente aglomerados deste elemento) (Fig 1I). A análise quantitativa demonstrou que não houve alteração na quantidade marcada pelo PAS (Gráfico 4). Os núcleos dos hepatócitos apresentaram as mesmas alterações observadas no fígado dos animais do grupo exposto ao EGS 40 μ g/ μ L (Fig 1 D), ou seja, irregulares e com aspecto picnótico (Fig 1E). A contagem das células de Kupffer revelou aumento destas quando se comparou o tecido hepático dos animais do grupo exposto ao EGS a 80 μ g/ μ L com aquele dos outros grupos aqui analisados (Gráfico 5).

Figura 1: A: Esquema do corpo de um rato mostrando a localização do fígado.

B-E: Secções histológicas do fígado de ratas Wistar expostas ao tampão sódio fosfato (Controle) e ao EGS nas concentrações de 10, 40 e 80µg/µL, coradas pela hematoxilina e eosina.

B: Grupo Controle;

C: Grupo exposto ao EGS 10µg/µL;

D: Grupo exposto ao EGS 40µg/µL;

E: Grupo exposto ao EGS 80µg/µL.

F-I: Secções histológicas do fígado de ratas Wistar expostas ao tampão sódio fosfato (Controle) e ao EGS nas concentrações de 10, 40, 80 e 500µg/µL. Reação pelo PAS

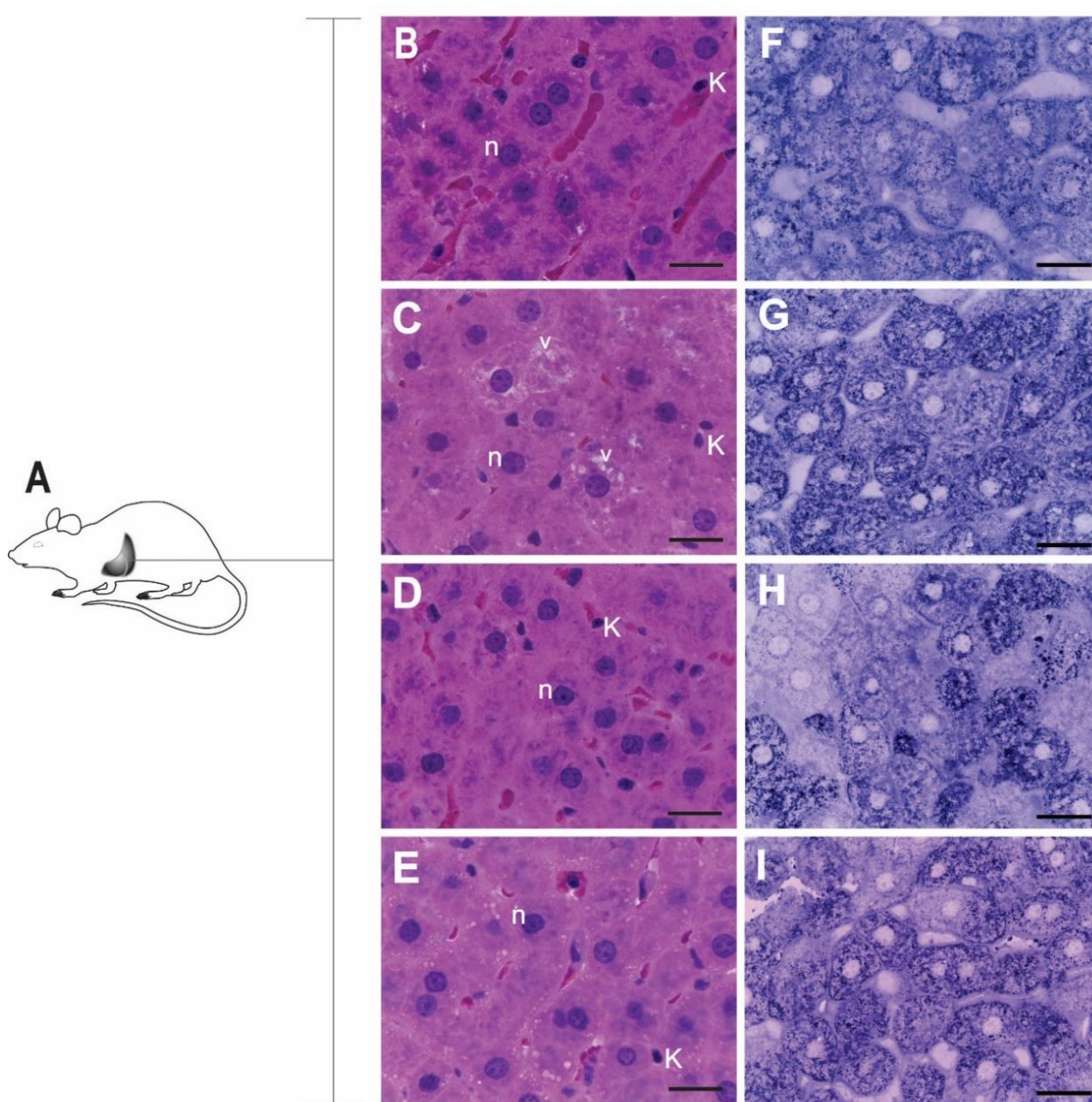
F: Grupo Controle;

G: Grupo exposto ao EGS 10µg/µL;

H: Grupo expostos ao EGS 40µg/µL;

I: Grupo exposto ao EGS80µg/µL.

v= vacuolização n= núcleo do hepatócito; K= célula de Kupffer. Barras: 20µm.



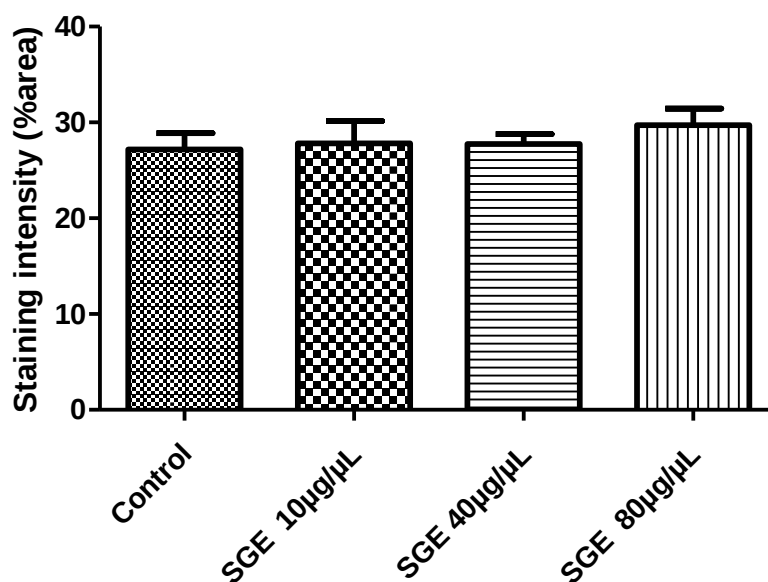
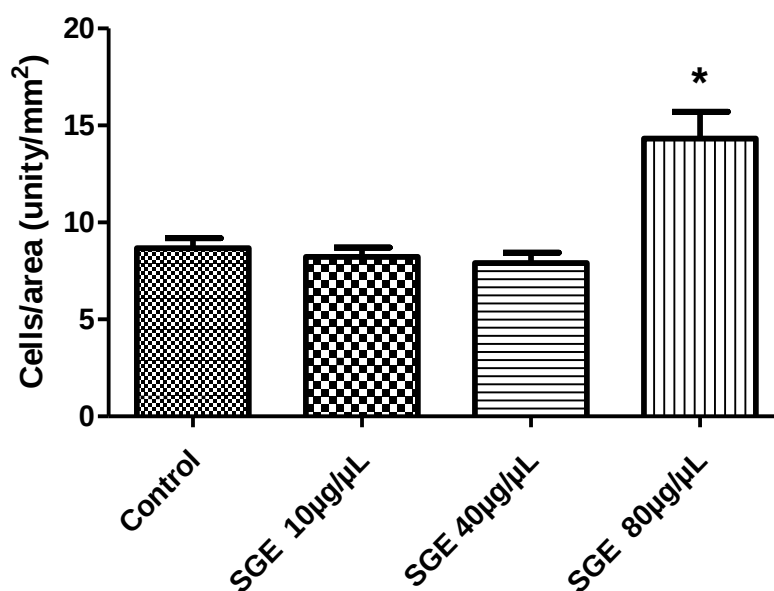


Gráfico 4. Quantificação da marcação do glicogênio após reação pelo PAS dos fígados dos animais dos grupos controle e dos EGS expostos às concentrações de 10, 40 e 80µg/µL, obtida por meio do software ImageJ.



* $P > 0.05$ vs Control, SGE 10µg/µL and SGE 40µg/µL

Gráfico 5. Contagem das células de Kupffer por unidade de área do fígado das ratas do grupo controle e expostas ao EGS nas concentrações de 10, 40 e 80µg/µL.

DISCUSSÃO

O presente estudo teve como principal objetivo trazer à luz informações que pudessem mostrar quais seriam os efeitos tóxicos decorrentes da injeção intraperitoneal, em ratas Wistar, do extrato da glândula salivar de carrapatos *R. sanguineus* s. l. obtido de fêmeas com dois dias de alimentação em coelhas hospedeiras. Essa proposta surgiu, uma vez que já é de conhecimento que bioativos presentes na saliva de algumas espécies de carrapatos poderiam ser utilizados com fins terapêuticos e mesmo antitumorais (DREWES et al., 2012; SOUZA et al., 2015).

Nessa perspectiva, Abreu e colaboradores em 2014 desenvolveram um estudo no qual demonstraram que o extrato da glândula salivar de fêmeas de carrapatos *R. sanguineus* s. l., com dois dias de alimentação, na concentração de 0,04µg/µL teria potencial para inibir o crescimento de tumor de Walker 256 implantado na pata de ratas Wistar. Outros estudos posteriores demonstraram também que a Amblyomin-X, proteína isolada do extrato de carrapatos *Amblyomma cajennense*, seria eficaz no combate de células de melanoma (CHUDZINSKI-TAVASSI et al., 2016).

No entanto, apesar de resultados animadores dentro desta temática terapêutica, para que a saliva do carrapato se torne uma alternativa segura para utilização, essa mistura de bioativos cuja potencialidade de cada um deles não foi ainda completamente elucidada necessita-se investigar mais profundamente, ou seja, necessita-se da realização de estudos que tenham como objetivo avaliar se, além do seu potencial terapêutico, esses bioativos (em decorrência de eventual efeito tóxico) provocariam danos nos indivíduos a eles expostos e, em caso de se constatar toxicidade, quais seriam os efeitos morfológicos (sobre células e tecidos) e fisiológicos nos animais a eles expostos.

Desta forma, no presente estudo através da realização de testes de toxicidade aguda em ratas Wistar pode-se obter resultados interessantes, por meio da exposição das mesmas aos extratos nas concentrações de 10, 40 e 80 µg/µL dos extratos obtidos das glândulas salivares de fêmeas de *R. sanguineus* s. l., uma vez que os resultados de Abreu et al. (2014) já haviam indicado que em concentrações 1000 vezes menores esses extratos teriam potencial de regredir um tumor já instalado.

Assim, os resultados aqui apresentados e que compreenderam as análises: clínica e histológica/histoquímica, mostraram que as ratas expostas a todas as concentrações do extrato (10, 40 e 80 µg/µL) por via intraperitoneal não apresentaram alterações de comportamento, um

dos fatores que poderia, segundo a literatura, indicar toxicidade sistêmica (WALLIG et al., 2017). Os resultados mostraram também que não houve alterações macroscópicas nos órgãos dos animais, resultado confirmado logo após a eutanásia e retirada dos mesmos (OECD 420, 2001), indicando que, independente da concentração utilizada o extrato não causaria toxicidade sistêmica nos indivíduos a ele expostos. No entanto, outros estudos que focaram a toxicidade do etil-carbamato em ratos Wistar, mostraram que o mesmo provocaria estresse nos indivíduos, o que alteraria o comportamento dos mesmos e alteraria macroscopicamente alguns órgãos, inclusive o fígado verificado quando da retirada dos mesmos ao final dos experimentos (PRADO-OCHOA, et al., 2014).

No presente estudo quando realizou-se a avaliação dos parâmetros hematológicos, dados estes que forneceram informações importantes com respeito ao efeito direto do EGS no sistema imunológico dos animais expostos, ficou claro que houve um aumento significativo no número de neutrófilos, bem como uma diminuição da população de linfócitos, porém, apenas nos animais expostos ao EGS na concentração de 10 µg/µL (a menor aqui utilizada). Estudos que foram anteriormente realizados fazendo a exposição de células do sistema imune à saliva das espécies de carrapatos *Ixodes dammini* (RIBEIRO et al., 1990) e *I. scapularis* (GUO et al., 2009) demonstraram que proteínas presentes nestas salivas teriam potencial inibidor da função dos neutrófilos, alterando a cinética da inflamação, muito provavelmente em decorrência do efeito imunomodulador dessas proteínas (CAMARGO-MATHIAS et al., 2011; KOTÁL et al., 2015).

Quando realizou-se aqui a avaliação do peso corporal das ratas ao longo do ensaio (14 dias), verificou-se que apenas aquelas que receberam as injeções do extrato nas concentrações de 40 e 80 µg/µL deixaram de ganhar massa corpórea e, além disso, apresentaram diminuição no peso relativo dos fígados quando comparados aos grupos controle e ao exposto a concentração de 10 µg/µL. Estes resultados poderiam sinalizar a ocorrência de intoxicação nas ratas expostas às maiores concentrações, uma vez que sinais de toxicidade também podem ser definidos pela alteração na massa corporal e no peso relativo dos órgãos dos animais expostos (WALLIG et al., 2017). Em específico para a diminuição no peso relativo do fígado, os dados sugeriram que poderia haver uma correlação desta perda com o estabelecimento de um processo de necrose, corroborando dados que foram anteriormente obtidos em outros estudos que demonstraram que em fígados de ratos após exposição ao composto hepatotóxico dimetilnitrosamina, este apresentaria sérias injúrias (CHOI et al., 2016).

Assim, no presente trabalho e a partir da obtenção das informações anteriormente expostas com relação ao peso relativo do fígado (Gráfico 2), deu-se continuidade a investigação da toxicidade do extrato, porém agora, com o objetivo de se demonstrar como os bioativos nele presentes alterariam a histologia deste importante órgão detoxicador.

Segundo a literatura pertinente sabe-se que o arranjo dos hepatócitos em cordões é o padrão de disposição celular encontrado no fígado dos vertebrados (ROSS, PAWLINA, 2014; JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2018). Essa disposição possibilita que no interior do órgão a circulação sanguínea siga rotas que permitam que suas funções na desintoxicação do organismo sejam realizadas com eficiência. Assim, sabe-se que qualquer alteração que fosse detectada nesse padrão de organização dos hepatócitos traria prejuízos não só para o órgão, mas para o organismo como todo (GUYTON, HALL, 2017). Os resultados que foram obtidos no presente estudo mostraram que houve uma desorganização no arranjo dos hepatócitos em cordões, apenas nos animais que foram expostos ao extrato na concentração de 10 µg/µL. Essa alteração poderia estar relacionada ao efeito Hormesis, ou seja, fenômeno que é caracterizado como efeito anômalo produzido por baixas doses de determinado composto, neste caso do EGS, e que já teria potencial para causar danos os quais não seriam observados quando se administrasse doses maiores da substância (CALABRESE, 2007; MATTSON, 2008).

Outra alteração morfohistológica observada foi a ocorrência de vacuolização citoplasmática nos hepatócitos dos animais expostos ao extrato em todas as concentrações (10, 40 e 80 µg/µL). Essa vacuolização poderia estar representando, dentre outras possibilidades, a ausência de marcação de elementos os quais as técnicas aqui aplicadas não foram específicas para marcá-los, tais como os lipídios. Muitas das regiões que mostraram ausência de marcação poderia corresponder a regiões que estivesse abrigando gotículas de lipídio, uma vez que é sabido que organismos que estão passando por algum tipo de intoxicação poderiam apresentar uma esteatose, distúrbio caracterizado pelo acúmulo de gordura no fígado (RUBIN, GORSTEIN, 2006). Esses dados estariam corroborando aqueles obtidos por Abreu e colaboradores (2018) quando expuseram ratas Wistar ao mesmo extrato de glândulas salivares de carrapatos *R. sanguineus* s. l. na concentração de 0,04µg/µL. Os autores constataram ao analisarem a histologia do fígado destes animais que houve um aumento no número de placas lipídicas intercordonais, porém, não foram identificadas maiores alterações morfológicas, sugerindo que, naquela concentração, o EGS poderia ser uma alternativa terapêutica. Ainda, Cunha et al. (2007) observaram alterações semelhantes na morfofisiologia de fígados de

camundongos expostos ao fipronil, potente acaricida químico sintético, também traduzidas na forma de aumento de gotículas lipídicas no órgão.

Outros dados importantes para avaliação da toxicidade dos extratos aqui estudados foi a observação dos núcleos dos hepatócitos, os quais nas maiores concentrações do EGS (40 e 80 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) apresentaram alterações na forma e marcação dos corantes. Quanto à forma os mesmos passaram de arredondados e ativos (cromatina descondensada) a irregulares e picnóticos (cromatina condensada), alterações estas que poderiam estar sinalizando que um processo de apoptose poderia estar se iniciando. Outros trabalhos como aqueles desenvolvidos por Roma et al. (2012) que expuseram camundongos Swiss à várias concentrações de permetrina mostraram que haveria uma degeneração dos núcleos dos hepatócitos, em função da toxicidade do composto, a qual foi evidenciada pela grande frequência de núcleos picnóticos.

Ainda por meio das análises histológicas foi possível se observar a presença e comportamento morfológico das células de Kupffer, macrófagos típicos do fígado responsáveis pelo sistema de defesa do órgão, metabolização de hemácias, digestão de hemoglobina, produção de proteínas relacionadas ao processo imunológico e destruição de bactérias que eventualmente chegassem ao fígado através do sistema porta (KOLIOS, 2006). No presente estudo observou-se aumento na quantidade dessas células nos fígados das ratas que receberam o extrato na concentração de 80 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, resultado que poderia indicar que o extrato seria potencialmente tóxico e causaria danos no órgão, podendo-se inferir que estes provavelmente seriam estímulos para a ativação e recrutamento das células de defesa. Corroborando esses dados, outros semelhantes foram obtidos em estudos desenvolvidos por outros autores, quando em modelo experimental de sepse em camundongos expostos ao lipopolissacarídeo (LPS), uma endotoxina, causou o aumento do número de células de Kupffer no fígado desses animais (LEHNER, 2001).

Finalmente, pode-se concluir que a exposição aguda das ratas aos extratos obtidos a partir de glândulas salivares de fêmeas de carrapatos *R. sanguineus* s. l., nas concentrações de 10, 40 e 80 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ mostrou que a menor concentração (10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) não causou toxicidade sistêmica, apenas alguns sinais de hepatotoxicidade. As maiores concentrações (40 e 80 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) causaram toxicidade sistêmica, comprovada pelo aumento do peso relativo do órgão, bem como pelas alterações morfohistológicas e histoquímicas (vacuolização citoplasmática, acúmulo de vesículas lipídicas e picnose nuclear) aqui observadas.

AGRADECIMENTOS

Este estudo foi financiado em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001. Agradecimentos ao técnico de laboratório Gerson Mello de Souza pelo apoio técnico.

REFERÊNCIAS

- ABREU, M. R. DE. Salivary Glands of Female Ticks *Rhipicephalus sanguineus* Like a Potential Source of Molecules with Inhibitory Action: In vivo study with Walker 256 Tumor Cells. **Journal of Pharmaceutical Care & Health Systems**, v. 01, n. 04, p. 1–8, 2014.
- ABREU, M. R. DE; ROCHA, F. A.; FURQUIM, K. C. S.; ANHOLETO, L. A.; NOVAES, F. C. F.; MORSOLETO, M. J.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Salivary Glands of Female Ticks *Rhipicephalus sanguineus* Like a Potential Source of Molecules with Inhibitory Action: In vivo study with Walker 256 Tumor Cells. **Journal of Pharmaceutical Care & Health Systems**, v. 01, n. 04, p. 1–8, 2014a.
- ABREU, M. R. DE; ROCHA, F. A.; FURQUIM, K. C. S.; ANHOLETO, L. A.; NOVAES, F. C. F.; MORSOLETO, M. J.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Salivary Glands of Female Ticks *Rhipicephalus sanguineus* Like a Potential Source of Molecules with Inhibitory Action: In vivo study with Walker 256 Tumor Cells. **Journal of Pharmaceutical Care & Health Systems**, v. 01, n. 04, p. 1–8, 2014b.
- ABREU, R. M. M.; DE ABREU, M. R.; SANTOS, J. P.; HEBLING, L. M. G. F.; ANHOLETO, L. A.; DE SOUZA, J. R. L.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Morphological evaluation of the liver in Wistar rats inoculated with *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) salivary gland extracts. **Microscopy Research and Technique**, v. 81, n. 11, p. 1332–1338, 2018.
- AKAGI, E. M.; JÚNIOR, P. L. DE S.; SIMONS, S. M.; BELLINI, M. H.; BARRETO, S. A.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M. Pro-apoptotic effects of Amblyomin-X in murine renal cell carcinoma “in vitro”. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 66, p. 64–69, 2012.
- ALVES, P. R. L.; BANDEIRA, F. O.; GIRALDI, M.; PRESOTTO, R.; SEGAT, J. C.; CARDOSO, E. J. B. N.; BARETTA, D. Ecotoxicological assessment of Fluazuron: effects on *Folsomia candida* and *Eisenia andrei*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 6, p. 5842–5850, 6 fev. 2019.
- 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*, 2007a.
- 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, 1 set. 2007b.
- BINNINGTON, K. C. Sequential changes in salivary gland structure during attachment and feeding of the cattle tick, *Boophilus microplus*. **International Journal for Parasitology**, v. 8, n. 2, p. 97–115, 1978.
- BLACK IV, W. C.; PIESMANT, J. Phylogeny of hard-and soft-tick taxa (Acari: Ixodida) based on mitochondrial 16S rDNA sequences. **Evolution**, v. 91, p. 10034–10038, 1994.
- BOWMAN, A. S.; DILLWITH, J. W.; SAUER, J. R. Tick salivary prostaglandins: Presence,

origin and significance. **Parasitology Today**, v. 12, n. 10, p. 388–396, 1996.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.

BRASIL. **Resolução Normativa N 33, de 18 de novembro de 2016** Brasília, DF CONCEA Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicação., , 2016. Disponível em: <http://www.mctic.gov.br/mctic/export/sites/institucional/institucional/concea/arquivos/legislacao/resolucoes_normativas/Resolucao-Normativa-CONCEA-n-33-de-18.11.2016-D.O.U.-de-21.11.2016-Secao-I-Pag.-05.pdf>. Acesso em: 20 maio. 2019

CACCIATORE, I.; DI GIULIO, M.; FORNASARI, E.; DI STEFANO, A.; CERASA, L. S.; MARINELLI, L.; TURKEZ, H.; DI CAMPLI, E.; DI BARTOLOMEO, S.; ROBUFFO, I.; CELLINI, L. Carvacrol codrugs: A new approach in the antimicrobial plan. **PLoS ONE**, v. 10, n. 4, p. 1–20, 2015.

CAMARGO-MATHIAS, M. I. **Guia básico de morfologia interna de carrapatos ixodídeos**. [s.l: s.n.].

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

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

CAMARGO-MATHIAS, M. I. **Inside ticks. Morphophysiology, toxicology and therapeutic perspectives**. São Paulo: Editora Unesp, 2018b.

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

CAPERUCCI, D.; CAMARGO-MATHIAS, M. I.; BECHARA, G. H. Histopathology and Ultrastructure Features of the Midgut of Adult Females of the Tick *Amblyomma cajennense* Fabricius, 1787 (Acari: Ixodidae) in Various Feeding Stages and Submitted to Three Infestations. **Ultrastructural Pathology**, v. 33, n. 6, p. 249–259, 20 jan. 2009.

CARRASCO-TORRES, G.; MONROY-RAMÍREZ, H. C.; MARTÍNEZ-GUERRA, A. A.; BALTIÉRREZ-HOYOS, R.; ROMERO-TLALOLINI, M. DE LOS Á.; VILLA-TREVIÑO, S.; SÁNCHEZ-CHINO, X.; VÁSQUEZ-GARZÓN, V. R. Quercetin Reverses Rat Liver Preneoplastic Lesions Induced by Chemical Carcinogenesis. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, p. 1–8, 27 jun. 2017.

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, out. 2014.

CHAGAS, A. C. DE S.; GEORGETTI, C. S.; CARVALHO, C. O. DE; OLIVEIRA, M. C. DE S.; RODRIGUES, R. A.; FOGLIO, M. A.; MAGALHÃES, P. M. DE. 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, mar. 2011.

CHE, L.; CHI, W.; QIAO, Y.; ZHANG, J.; SONG, X.; LIU, Y.; LI, L.; JIA, J.; PILO, M. G.; WANG, J.; CIGLIANO, A.; MA, Z.; KUANG, W.; TANG, Z.; ZHANG, Z.; SHUI, G.; RIBBACK, S.; DOMBROWSKI, F.; EVERT, M.; PASCALE, R. M.; COSSU, C.; PES, G. M.; OSBORNE, T. F.; CALVISI, D. F.; CHEN, X.; CHEN, L. Cholesterol biosynthesis

supports the growth of hepatocarcinoma lesions depleted of fatty acid synthase in mice and humans. **Gut**, p. gutjnl-2018-317581, 6 abr. 2019.

CHOI, M.-J.; ZHENG, H.-M.; KIM, J. M.; LEE, K. W.; PARK, Y. H.; LEE, D. H. Protective effects of *Centella asiatica* leaf extract on dimethylnitrosamine-induced liver injury in rats. **Molecular Medicine Reports**, v. 14, n. 5, p. 4521–4528, 1 nov. 2016.

CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M.; DE-SÁ-JÚNIOR, P. L.; SIMONS, S. M.; MARIA, D. A.; DE SOUZA VENTURA, J.; DE FÁTIMA CORREIA BATISTA, I.; FARIA, F.; DURÃES, E.; REIS, E. M.; DEMASI, M. A new tick Kunitz type inhibitor, Amblyomin-X, induces tumor cell death by modulating genes related to the cell cycle and targeting the ubiquitin-proteasome system. **Toxicon**, v. 56, p. 1145–1154, 2010.

CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M.; MORAIS, K. L. P.; PACHECO, M. T. F.; PASQUALOTO, K. F. M.; DE SOUZA, J. G. Tick salivary gland as potential natural source for the discovery of promising antitumor drug candidates. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 77, p. 14–19, 2016.

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, mar. 2002.

CUNHA, N. C.; FONSECA, A. H.; REZENDE, J.; ROZENTAL, T.; FAVACHO, A. R. M.; BARREIRA, J. D.; MASSARD, C. L.; LEMOS, E. R. S. First identification of natural infection of *Rickettsia rickettsii* in the *Rhipicephalus sanguineus* tick, in the State of Rio de Janeiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 2, p. 105–108, fev. 2009.

DANTAS-TORRES, F. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): From taxonomy to control. **Veterinary Parasitology**, v. 152, n. 3, p. 173–185, 2008.

DANTAS-TORRES, F. Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. **Parasites & vectors**, v. 3, n. 26, p. 1–11, 2010.

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

DAVEY, R. B.; AHRENS, E. H.; GEORGE, J. E.; HUNTER, J. S.; JEANNIN, P. Therapeutic and persistent efficacy of fipronil against *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) on cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 74, n. 2, p. 261–276, 1998.

DE MINICIS, S.; KISSELEVA, T.; FRANCIS, H.; BARONI, G. S.; BENEDETTI, A.; BRENNER, D.; ALVARO, D.; ALPINI, G.; MARZIONI, M. Liver carcinogenesis: Rodent models of hepatocarcinoma and cholangiocarcinoma. **Digestive and Liver Disease**, v. 45, n. 6, p. 450–459, 2013.

DE OLIVEIRA-CRUZ, E. M.; COSTA-JUNIOR, L. M.; PINTO, J. A. O.; SANTOS, D. DE A.; ARAÚJO, S. A.; FÁTIMA, A.-B. M. DE; BACCI, L.; ALVES, P. B.; CAVALCANTI, S. C. DE H.; BLANK, A. F. Acaricidal activity of *Lippia gracilis* essential oil and its major constituents on the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 195, n. 1–2, p. 198–202, 2013.

DENARDI, S. E.; BECHARA, G. H.; OLIVEIRA, P. R. DE; 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, dez. 2010.

DÍAZ-GONZÁLEZ, Á.; FORNER, A.; RODRÍGUEZ-DE-LOPE, C.; VARELA, M. New challenges in clinical research on hepatocellular carcinoma. **Rev esp enfeRm dig**, v. 108, p. 485–493, 2016.

DREWES, C. C.; DIAS, R. Y. S.; HEBEDA, C. B.; SIMONS, S. M.; BARRETO, S. A.; FERREIRA, J. M.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M.; FARSKY, S. H. P. Actions of the Kunitz-type serine protease inhibitor Amblyomin-X on VEGF-A-induced angiogenesis. **Toxicon**, 2012.

ERHIRHIE, E. O.; IHEKWEREME, C. P.; ILODIGWE, E. E. Advances in acute toxicity testing: strengths, weaknesses and regulatory acceptance. **Interdisciplinary toxicology**, v. 11, n. 1, p. 5–12, maio 2018.

ERKEKOGLU, P.; KOCER GIRAY, B.; BAŞARAN, N. **3R Principle and Alternative Toxicity Testing Methods**. **J. Pharm. Sci.** [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://dergi.fabad.org.tr/pdf/volum36/issue2/101-117.pdf>>. Acesso em: 20 maio. 2019.

FACHINI-QUEIROZ, F. C.; KUMMER, R.; ESTEVÃO-SILVA, C. F.; CARVALHO, M. D. DE B.; CUNHA, J. M.; GRESPAN, R.; BERSANI-AMADO, C. A.; CUMAN, R. K. N. Effects of Thymol and Carvacrol, Constituents of *Thymus vulgaris* L. Essential Oil, on the Inflammatory Response. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, p. 1–10, 5 jul. 2012.

FARBER, E.; SARMA, D. S. Hepatocarcinogenesis: a dynamic cellular perspective. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, v. 56, n. 1, p. 4–22, jan. 1987.

FLECHTMANN, C. H. W. **Ácaros de Importância Médico-Veterinária**. São Paulo: Ed. Livraria Nobel S.A., 1973.

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.

FURTADO, K. S.; PIRES, P. W.; JUSTULIN, L. A.; RODRIGUES, M. A. M.; FELISBINO, S. L.; BARBISAN, L. F. Metalloproteinases 2 and -9 activity during promotion and progression stages of rat liver carcinogenesis. **Journal of Molecular Histology**, 2009.

GOMES, G. A.; MONTEIRO, C. M. O.; JULIÃO, L. DE S.; MATURANO, R.; SENRA, T. O. S.; ZERINGÓTA, V.; CALMON, F.; MATOS, R. DA S.; DAEMON, E.; CARVALHO, M. G. DE. Acaricidal activity of essential oil from *Lippia sidoides* on unengorged larvae and nymphs of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) and *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). **Experimental Parasitology**, v. 137, p. 41–45, 1 fev. 2014.

GRAY, J.; DANTAS-TORRES, F.; ESTRADA-PENÑA, A.; LEVIN, M. **Systematics and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*** *Ticks and Tick-borne Diseases*, 2013.

GROOS, J.; BANNASCH, P.; SCHWARZ, M.; KOPP-SCHNEIDER, A. Comparison of mode of action of four hepatocarcinogens: A model-based approach. **Toxicological Sciences**, v. 99, n. 2, p. 446–454, 2007.

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

HASCHEK, W. M.; ROUSSEAU, C. G.; WALLIG, M. A. **Fundamentals of toxicologic pathology**. 2nd. ed. Boston: Elsevier Inc., 2010.

HAYES, A. W. (ANDREW W. **Principles and methods of toxicology**. 5th ed ed. New York: CRC Press/Taylor & Francis Group, 2008.

HOVIUS, J. W. R.; LEVI, M.; FIKRIG, E. Salivating for Knowledge: Potential Pharmacological Agents in Tick Saliva. **Plos Medicine**, v. 5, n. 2, p. 202–208, 2008a.

HOVIUS, J. W. R.; LEVI, M.; FIKRIG, E. Salivating for Knowledge: Potential Pharmacological Agents in Tick Saliva. **PLoS Medicine**, v. 5, n. 2, p. e43, fev. 2008b.

HUANG, K.-W.; HUANG, Y.-C.; TAI, K.-F.; CHEN, B.-H.; LEE, P.-H.; HWANG, L.-H. Dual Therapeutic Effects of Interferon- α Gene Therapy in a Rat Hepatocellular Carcinoma Model With Liver Cirrhosis. **Molecular Therapy**, v. 16, n. 10, p. 1681–1687, out. 2008.

IKEDA, M.; MORIZANE, C.; UENO, M.; OKUSAKA, T.; ISHII, H.; FURUSE, J. Chemotherapy for hepatocellular carcinoma: current status and future perspectives. **Japanese Journal of Clinical Oncology**, v. 48, n. 2, p. 103–114, 1 fev. 2018.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK294452/>>. Acesso em: 21 maio. 2019.

ITO, T.; SHIRAKI, K.; SUGIMOTO, K.; YAMANAKA, T.; FUJIKAWA, K.; ITO, M.; TAKASE, K.; MORIYAMA, M.; KAWANO, H.; HAYASHIDA, M.; NAKANO, T.; SUZUKI, A. Survivin promotes cell proliferation in human hepatocellular carcinoma. **Hepatology**, v. 31, n. 5, p. 1080–1085, maio 2000.

JULIEN, O.; WELLS, J. A. Caspases and their substrates. **Cell Death & Differentiation**, v. 24, n. 8, p. 1380–1389, 12 ago. 2017.

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

KARAMI, A.; ROMANO, N.; HAMZAH, H.; SIMPSON, S. L.; YAP, C. K. Acute phenanthrene toxicity to juvenile diploid and triploid African catfish (*Clarias gariepinus*): Molecular, biochemical, and histopathological alterations. **Environmental Pollution**, v. 212, p. 155–165, 1 maio 2016.

KAUFMAN, W. R. Organ culture of ixodid-tick salivary glands. **Experimental and Applied Acarology**, 1990.

KAZIMIROVA, M.; STIBRANIOVA, I. Tick salivary compounds their role in modulation of host defences and pathogen transmission. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 3, n. 43, 2013.

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, 31 mar. 2013.

LAGE, T. C. D. A.; MONTANARI, R. M.; FERNANDES, S. A.; DE OLIVEIRA MONTEIRO, C. M.; DE OLIVEIRA SOUZA SENRA, T.; ZERINGOTA, V.; CALMON, F.; DA SILVA MATOS, R.; DAEMON, E. Activity of essential oil of *Lippia triplinervis* Gardner (Verbenaceae) on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v. 112, n. 2, p. 863–9, fev. 2013.

LECOEUR, H.; DE OLIVEIRA-PINTO, L. M.; GOUGEON, M.-L. Multiparametric flow cytometric analysis of biochemical and functional events associated with apoptosis and oncosis using the 7-aminoactinomycin D assay. **Journal of immunological methods**, v. 265,

n. 1–2, p. 81–96, 1 jul. 2002.

LIAO, W.; WANG, Y.; LIAO, Y.; HE, S.; JIN, J. Preoperative Aspartate Aminotransferase to White Blood Cell Count Ratio Predicting Postoperative Outcomes of Hepatocellular Carcinoma. **Medicine**, v. 95, n. 14, p. e3345, abr. 2016.

LIMA DE SOUZA, J. R.; OLIVEIRA, P. R. DE; ANHOLETO, L. A.; ARNOSTI, A.; DAEMON, E.; REMEDIO, R. N.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Effects of carvacrol on oocyte development in semi-engorged *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* females ticks (Acari: Ixodidae). **Micron**, v. 116, n. June 2018, p. 66–72, 2019a.

LIMA DE SOUZA, J. R.; OLIVEIRA, P. R. DE; ANHOLETO, L. A.; ARNOSTI, A.; DAEMON, E.; REMEDIO, R. N.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Effects of carvacrol on oocyte development in semi-engorged *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* females ticks (Acari: Ixodidae). **Micron**, v. 116, p. 66–72, 1 jan. 2019b.

LINDSTROM, N. M.; MOORE, D. M.; ZIMMERMAN, K.; SMITH, S. A. **Hematologic Assessment in Pet Rabbits** *Clinics in Laboratory Medicine*, 2015.

LOPEZ, P. M.; VILLANUEVA, A.; LLOVET, J. M. Systematic review: evidence-based management of hepatocellular carcinoma – an updated analysis of randomized controlled trials. **Aliment Pharmacol Ther Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 23, p. 1535–1547, 2006.

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, 31 dez. 2018a.

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, 31 dez. 2018b.

MARTINEZ, G. R.; LOUREIRO, A. P. M.; MARQUES, S. A.; MIYAMOTO, S.; YAMAGUCHI, L. F.; ONUKI, J.; ALMEIDA, E. A.; GARCIA, C. C. M.; BARBOSA, L. F.; MEDEIROS, M. H. G.; DI MASCIO, P. Oxidative and alkylating damage in DNA. **Mutation research**, v. 544, n. 2–3, p. 115–27, nov. 2003.

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, dez. 2014.

MATOS, R. S.; DAEMON, E.; DE OLIVEIRA MONTEIRO, C. M.; SAMPIERI, B. R.; MARCHESINI, P. B. C.; DELMONTE, C.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Thymol action on cells and tissues of the synganglia and salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* females (Acari: Ixodidae). **Ticks and Tick-borne Diseases**, 2018.

MAUER, K.; O’KELLEY, R.; PODDA, N.; FLANAGAN, S.; GADANI, S. New Treatment Modalities for Hepatocellular Cancer. **Current Gastroenterology Reports**, v. 17, n. 5, p. 19, 14 maio 2015.

MAUND, S. J.; CAMPBELL, P. J.; GIDDINGS, J. M.; HAMER, M. J.; HENRY, K.; PILLING, E. D.; WARINTON, J. S.; WHEELER, J. R. Ecotoxicology of Synthetic Pyrethroids. In: [s.l.] Springer, Berlin, Heidelberg, 2011. p. 137–165.

MAZZANTINI, R. PIETRO; DE CONTI, A.; MORENO, F. S. Persistent and remodeling

hepatic preneoplastic lesions present differences in cell proliferation and apoptosis, as well as in p53, Bcl-2 and NF- κ B pathways. **Journal of Cellular Biochemistry**, 2008.

MCMANUS, J. F. A. **Histological demonstration of mucin after Periodic Acid** Nature, 1946.

MENDES, A. DA S.; DAEMON, E.; DE OLIVEIRA MONTEIRO, C. M.; MATURANO, R.; BRITO, F. C.; MASSONI, T. Acaricidal activity of thymol on larvae and nymphs of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 183, n. 1–2, p. 136–139, 29 dez. 2011.

MICHAEL, B.; YANO, B.; SELLERS, R. S.; PERRY, R.; MORTON, D.; ROOME, N.; JOHNSON, J. K.; SCHAFER, K. Evaluation of Organ Weights for Rodent and Non-Rodent Toxicity Studies: A Review of Regulatory Guidelines and a Survey of Current Practices. **Toxicologic Pathology**, v. 35, n. 5, p. 742–750, 6 ago. 2007.

MOERBECK, L.; VIZZONI, V. F.; MACHADO-FERREIRA, E.; CAVALCANTE, R. C.; OLIVEIRA, S. V.; SOARES, C. A. G.; AMORIM, M.; GAZÊTA, G. S. *Rickettsia* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) Vector Biodiversity in High Altitude Atlantic Forest Fragments Within a Semiarid Climate: A New Endemic Area of Spotted-Fever in Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 53, n. 6, p. 1458–1466, 1 nov. 2016.

MORENO, F. S.; RIZZI, M. B. S. L.; DAGLI, M. L. Z.; PENTEADO, M. V. C. Inhibitory effects of β -carotene on preneoplastic lesions induced in Wistar rats by the resistant hepatocyte model. **Carcinogenesis**, v. 12, n. 10, p. 1817–1822, 1 out. 1991.

MORRIS, G.; WALKER, A. J.; BERK, M.; MAES, M.; PURI, B. K. Cell Death Pathways: a Novel Therapeutic Approach for Neuroscientists. **Molecular Neurobiology**, v. 55, n. 7, p. 5767–5786, 19 jul. 2018.

MULENGA, A.; BLANDON, M.; KHUMTHONG, R. The molecular basis of the *Amblyomma americanum* tick attachment phase. **Experimental and Applied Acarology**, v. 41, n. 4, p. 267–287, 2 maio 2007.

MURPHY, S. D. Some Concepts in Toxicology. v. 32, n. October, p. 261–266, 1979.

OECD. OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method INTRODUCTION. 2001.

OLIVEIRA, C. J. F.; SÁ-NUNES, A.; FRANCISCHETTI, I. M. B.; CARREGARO, V.; ANATRIELLO, E.; SILVA, J. S.; SANTOS, I. K. F. M.; RIBEIRO, J. M. C.; FERREIRA, B. R. Deconstructing tick saliva: Non-protein molecules with potent immunomodulatory properties. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, p. 10960–10969, 2011.

OLIVEIRA, P. R.; REMÉDIO, R. N.; BECHARA, G. H.; ANHOLETO, L. A.; 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. 829–49, 28 fev. 2016.

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, jul. 2008.

PAZ, G. F.; LABRUNA, M. B.; LEITE, R. C. Ritmo de queda de *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) de cães artificialmente infestados. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, n. 3, p. 139–144, 2008.

PÉREZ-CARREÓN, J. I.; LÓPEZ-GARCÍA, C.; FATTEL-FAZENDA, S.; ARCE-POPOCA, E.; ALEMÁN-LAZARINI, L.; HERNÁNDEZ-GARCÍA, S.; LE BERRE, V.; SOKOL, S.; FRANCOIS, J. M.; VILLA-TREVIÑO, S. Gene expression profile related to the progression of preneoplastic nodules toward hepatocellular carcinoma in rats. **Neoplasia (New York, N.Y.)**, v. 8, n. 5, p. 373–83, maio 2006.

PESAPANE, F.; NEZAMI, N.; PATELLA, F.; GESCHWIND, J. F. New concepts in embolotherapy of HCC. **Medical Oncology**, v. 34, n. 4, p. 58, 16 abr. 2017.

PITOT, H. C. Animal models of neoplastic development. **Developments in biologicals**, v. 106, p. 53–7; discussion 57–9, 143–60, 2001.

PRUETT, J. H. Immunological control of arthropod ectoparasites - A review. **International Journal for Parasitology**, v. 29, n. 1, p. 25–32, 1999.

REMEDIO, R. N.; NUNES, P. H.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. The extensible integument of *Rhipicephalus sanguineus* female ticks in different feeding stages: a morphological approach. **Acta Zoologica**, v. 96, n. 3, p. 319–327, jul. 2015.

REY, L. **Parasitologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2008.

ROMA, G. C.; DE 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, nov. 2009.

SAUER, J. R.; ESSENBERG, R. C.; BOWMAN, A. S. **Salivary glands in ixodid ticks: Control and mechanism of secretion** *Journal of Insect Physiology*, 2000.

SCHRAUF, S.; MANDL, C. W.; BELL-SAKYI, L.; SKERN, T. Extension of Flavivirus Protein C Differentially Affects Early RNA Synthesis and Growth in Mammalian and Arthropod Host Cells. **Journal of Virology**, v. 83, n. 21, p. 11201–11210, 2009.

SCOLASTICI, C.; DE CONTI, A.; TESTONI CARDOZO, M.; PRATES ONG, T.; PURGATTO, E.; ADERUZA HORST, M.; HEIDOR, R.; SILVA FURTADO, K.; KEMPFER BASSOLI, B.; SALVADOR MORENO, F. β -Ionone Inhibits Persistent Preneoplastic Lesions During the Early Promotion Phase of Rat Hepatocarcinogenesis: TGF- α , NF- κ B, and p53 as Cellular Targets. **Nutrition and Cancer**, v. 66, n. 2, p. 234–241, 2014.

SCORALIK, M. G.; DAEMON, E.; MONTEIRO, C. M. DE O.; MATURANO, R. Enhancing the acaricide effect of thymol on larvae of the cattle tick *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) by solubilization in ethanol. **Parasitology Research**, v. 110, n. 2, p. 645–648, 2017.

SEMPLE-ROBERTS, E.; HAYES, M. A.; ARMSTRONG, D.; BECKER, R. A.; RACZ, W. J.; FARBER, E. Alternative methods of selecting rat hepatocellular nodules resistant to 2-acetylaminofluorene. **International journal of cancer**, v. 40, n. 5, p. 643–5, 15 nov. 1987.

SHARIFI-RAD, M.; VARONI, E. M.; IRITI, M.; MARTORELL, M.; SETZER, W. N.; DEL MAR CONTRERAS, M.; SALEHI, B.; SOLTANI-NEJAD, A.; RAJABI, S.; TAJBAKHSH, M.; SHARIFI-RAD, J. Carvacrol and human health: A comprehensive review. **Phytotherapy Research**, v. 32, n. 9, p. 1675–1687, 1 set. 2018.

SILVA, A. B.; DUARTE, M. M.; DA COSTA CAVALCANTE, R.; DE OLIVEIRA, S. V.; VIZZONI, V. F.; DE LIMA DURÉ, A. Í.; DE MELO IANI, F. C.; MACHADO-FERREIRA, E.; GAZÊTA, G. S. *Rickettsia rickettsii* infecting *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Latreille 1806), in high altitude atlantic forest fragments, Ceara State, Brazil. **Acta Tropica**, v. 173, p. 30–33, 1 set. 2017.

- SIMONS, S. M.; JUNIOR, P. L. DE S.; FARIA, F.; BATISTA, I. DE F. C.; BARROS-BATTESTI, D. M.; LABRUNA, M. B.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M. The action of *Amblyomma cajennense* tick saliva in compounds of the hemostatic system and cytotoxicity in tumor cell lines- ClinicalKey. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 65, n. 6, p. 443–450, 2011a.
- SIMONS, S. M.; JÚNIOR, P. L. DE S.; FARIA, F.; BATISTA, I. DE F. C.; BARROS-BATTESTI, D. M.; LABRUNA, M. B.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M. The action of *Amblyomma cajennense* tick saliva in compounds of the hemostatic system and cytotoxicity in tumor cell lines. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 65, n. 6, p. 443–450, 2011b.
- SOLT, D.; FARBER, E. New principle for the analysis of chemical carcinogenesis. **Nature**, v. 263, p. 701–703, 1976.
- SONESHINE, D. E.; ROE, M. R. **Biology of Ticks Vol. 1**. 2nd. ed. New York: Oxford University Press, 2014.
- SOUZA, A. C. P.; SZABÓ, M. P. J.; OLIVEIRA, C. J. F.; SILVA, M. J. B. Exploring the anti-tumoral effects of tick saliva and derived components. **Toxicon**, v. 102, p. 69–73, 2015.
- SUNTRES, Z. E.; COCCIMIGLIO, J.; ALIPOUR, M. The Bioactivity and Toxicological Actions of Carvacrol. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 55, n. 3, p. 304–318, 23 fev. 2015.
- TANNAPFEL, A.; WITTEKIND, C. Genes involved in hepatocellular carcinoma: deregulation in cell cycling and apoptosis. **Virchows Archiv**, v. 440, n. 4, p. 345–352, 6 abr. 2002.
- TSUCHIYA, N.; SAWADA, Y.; ENDO, I.; SAITO, K.; UEMURA, Y.; NAKATSURA, T. Biomarkers for the early diagnosis of hepatocellular carcinoma. **World Journal of Gastroenterology**, v. 21, n. 37, p. 10573, 7 out. 2015.
- VENDRAMINI, M. C. R.; MATHIAS, M. I. C.; DE FARIA, A. U.; FURQUIM, K. C. S.; DE SOUZA, L. P.; BECHARA, G. H.; ROMA, G. C. Action of andiroba oil (*Carapa guianensis*) on *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) semi-engorged females: morphophysiological evaluation of reproductive system. **Microscopy Research and Technique**, v. 75, n. 12, p. 1745–54, dez. 2012.
- WALKER, A. R.; FLETCHER, J. D.; GILL, H. S. Structural and histochemical changes in the salivary glands of *Rhipicephalus appendiculatus* during feeding. **International Journal for Parasitology**, 1985a.
- WALKER, A. R.; FLETCHER, J. D.; GILL, H. S. Structural and histochemical changes in the salivary glands of *Rhipicephalus appendiculatus* during feeding. **International journal for parasitology**, v. 15, n. 1, p. 81–100, fev. 1985b.
- WALLIG, M. A.; HASCHEK, W. M.; ROUSSEAUX, C. G.; BOLON, B. **Fundamentals of Toxicologic Pathology**. 3rd. ed. London: Elsevier, 2017.
- WILLIAMS, G. M.; IATROPOULOS, M. J.; WANG, C. X.; JEFFREY, A. M.; THOMPSON, S.; PITTMAN, B.; PALASCH, M.; GEBHARDT, R. Nonlinearities in 2-Acetylaminofluorene Exposure Responses for Genotoxic and Epigenetic Effects Leading to Initiation of Carcinogenesis in Rat Liver. **Toxicological Sciences**, v. 45, n. 2, p. 152–161, out. 1998.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guide to early cancer diagnosis**. [s.l: s.n.].
- YIN, Q.-H.; YAN, F.-X.; ZU, X.-Y.; WU, Y.-H.; WU, X.-P.; LIAO, M.-C.; DENG, S.-W.;

YIN, L.-L.; ZHUANG, Y.-Z. Anti-proliferative and pro-apoptotic effect of carvacrol on human hepatocellular carcinoma cell line HepG-2. **Cytotechnology**, v. 64, n. 1, p. 43–51, jan. 2012.

YU, M. C.; YUAN, J.-M. Environmental factors and risk for hepatocellular carcinoma. **Gastroenterology**, v. 127, n. 5 Suppl 1, p. S72-8, nov. 2004.

YUNKER, C. E.; CORY, J.; MEIBOS, H. Continuous cell lines from embryonic tissues of ticks (Acari: Ixodidae). **In Vitro**, v. 17, n. 2, p. 139–142, fev. 1981.

ARTIGO 2

Terapêutica do extrato das glândulas salivares de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* senso lato (Acari: Ixodidae) em modelo experimental de lesões pré-neoplásicas.

Natalia Rubio Claret Pereira^a; Marina Rodrigues de Abreu^a; Solange Aparecida Rossini Oliveira^a; Luis Fernando Sodelli^a; Maria Izabel Camargo-Mathias^a.

^a Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual de São Paulo (UNESP), Rio Claro, SP, Brasil.

Corresponding author: Tel.: +55-19-3526 4135, Fax: +55-19-3534 0009.

E-mail address: maria.izabel@unesp.br

ORCID Maria Izabel Camargo-Mathias: 0000-0002-9418-8934

RESUMO

O hepatocarcinoma (HCC) é uma doença com origem a partir de alterações estruturais nas células hepáticas que podem resultar em lesões pré-neoplásicas (LPN). Atualmente são poucos os tratamentos eficazes para este tipo de câncer. Os carrapatos têm a capacidade sintetizar potentes bioativos, nas glândulas salivares, que têm sido promissores no tratamento de algumas doenças. Em razão desse potencial, o presente trabalho teve como objetivo analisar os efeitos do extrato das glândulas salivares (EGS) de fêmeas de carrapatos *R. sanguineus* s.l. sobre o modelo experimental de LPN no fígado de ratos Wistar. O pesos dos ratos foi acompanhado durante o ensaio e não foram observadas alterações, mas o peso relativo do fígado teve um aumento significativo nos animais dos grupos LPN e LPN+EGS. As análises do sangue e plasma dos animais não indicaram alterações significativas (leucograma e análise colorimétrica de colesterol) e a análise morfológica, mostrou que os animais do grupo LPN tiveram o tecido hepático com maiores danos, como: desorganização dos cordões de hepatócitos, aumento de tecido conjuntivo, vacuolização nas células ao redor dos vasos, células em apoptose e aumento na quantidade de células de Kupffer. Os animais LPN+EGS tiveram essas alterações diminuídas, mas ainda presentes, além da redução na quantidade de células de Kupffer. Assim, pode-se concluir que ratos que passaram por processo de indução de LPN e que foram tratados com EGS, tiveram diminuição nos danos hepáticos.

Palavras chaves: fígado, ratos, câncer, morfologia, hematoxilina e eosina, LPN.

INTRODUÇÃO

O fígado nos mamíferos é o principal órgão envolvido nos processos de metabolização e neutralização de compostos, de regulação da homeostase sanguínea e de detoxicação do organismo, por meio das células hepáticas, (hepatócitos) as quais encontram-se dispostas no órgão formando lóbulos que são permeados por vasos sanguíneos e que facilitam as trocas de macromoléculas entre o sangue e as células (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017). Dessa forma, é no fígado que os agentes tóxicos, incluindo os carcinogênicos aos quais o organismo está exposto, são processados (HASCHEK; ROUSSEAUX; WALLIG, 2010).

O câncer hepático é uma doença que tem origem a partir de infecções persistentes, tais como as hepatites, que provocam alterações estruturais tanto no tecido quanto nas células. Essas alterações podem resultar em lesões pré-neoplásicas (LPN) e ainda estas podem evoluir para um hepatocarcinoma (HCC), ou seja, um tipo de tumor que é agressivo, e no Brasil é causador de aproximadamente 780 mil mortes/ano (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017) além de ter baixa expectativa de cura. Na maioria dos casos ele é diagnosticado em estágio tardio isso porque os sintomas clínicos estão ausentes. Ressalta-se ainda que neste estágio da doença os tratamentos que ora estão disponíveis têm sido pouco eficazes (DÍAZ-GONZÁLEZ et al., 2016; LOPEZ; VILLANUEVA; LLOVET, 2006).

Assim, a busca por compostos que tenham propriedades terapêuticas, tem sido uma constante nas investigações que abrangem desde bioativos extraídos de plantas até aqueles produzidos por outros animais. Nessa perspectiva os carrapatos tem recebido atenção especial, visto terem esses ectoparasitas um complexo mecanismo de produção de potentes bioativos, sintetizados pelas células das suas glândulas salivares, como: esterases, prostaglandinas, glicoproteínas e lipoproteínas que, dependendo do estágio de alimentação em que o carrapato se encontre, atuarão facilitando a fixação e a alimentação dos mesmos nos hospedeiros, garantindo assim o seu sucesso biológico (BINNINGTON, 1978; BOWMAN; DILLWITH; SAUER, 1996; WALKER; FLETCHER; GILL, 1985b). Nos carrapatos a mistura desses bioativos irá compor a saliva final a qual será injetada no hospedeiro no momento da fixação do mesmo à sua pele, o que permitirá inclusive a liberação de anticoagulantes que irão permitir a alimentação. Além disso essa saliva terá papel na vasodilatação, angiogênese, aumento da fibrinólise, imunomodulação, inibição da agregação plaquetária (DREWES et al., 2012; HOVIUS; LEVI; FIKRIG, 2008b; SAUER; ESSENBERG; BOWMAN, 2000) e ainda dados recentes registaram a inibição da proliferação de células tumorais (ABREU et al., 2014b; CHUDZINSKI-TAVASSI et al., 2010; SOUZA et al., 2015). Esses últimos autores relataram

o efeito antitumoral dos bioativos presentes no extrato de glândulas salivares (EGS) de diversas espécies de carrapatos, incluindo *Rhipicephalus sanguineus*. Extratos obtidos destas últimas agiram sobre células tumorais Walker 256 implantadas no músculo da pata de ratas Wistar, e mostraram ter potencial de interromper a invasão tumoral sem, contudo, causar danos às células do tecido muscular (ABREU et al., 2014).

Em razão do potencial, bem como da complexidade estrutural e funcional dos componentes bioativos da saliva desses ectoparasitas, ainda poucos estudos sob o ponto de vista terapêutico foram realizados, o que estimulou o desenvolvimento do presente trabalho que teve como objetivo analisar os efeitos do extrato obtido a partir das glândulas salivares de fêmeas de carrapatos *R. sanguineus* s.l., alimentadas por dois dias em coelhas hospedeiras, sobre lesões pré-neoplásicas no fígado de ratos Wistar machos, utilizando para tanto técnicas histológica (HE) e histoquímica (PAS), além de avaliações hematológicas.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Para a realização do presente estudo foram utilizados ratos Wistar machos, com 3 a 4 semanas de idade, obtidos do Biotério Central da UNESP de Botucatu, SP e que foram mantidos em sala no Biotério do Departamento de Biologia do IB da UNESP/Rio Claro, SP em caixas retangulares de propileno (30 X 20 X 13cm), forradas com cama de maravalha que foi trocada 2 vezes por semana. As mesmas foram mantidas em condições controladas (22°C $\pm$ 2°, 50% de umidade, ventilação e fotoperíodo de 12 horas). Os animais foram alimentados com ração *ad libidum* e tiveram livre acesso ao bebedouro contendo água filtrada.

Indução das Lesões Pré-Neoplásicas (LPN)

Neste estudo, os animais que foram alocados no grupo LPN, tiveram indução de lesões pré-neoplásicas realizadas seguindo o protocolo do modelo do “hepatócito resistente” (HR) descrito por Solt e Farber (1976), modificado por Semple-Roberts et al. (1987) e adaptado para ratos Wistar por Moreno et al. (1991).

As LPN deram-se pela administração intraperitoneal de dose única do agente iniciante dietilnitrosamina (DEN 20mg/100g de peso corpóreo/animal), o qual foi dissolvido em solução de NaCl a 0,9% e injetado no peritônio com seringa de 1mL acoplada a agulha 26G. Após 2 semanas, foram administradas oralmente com auxílio de cânula para gavagem, doses únicas de 2-acetilaminofluoreno (2-AAF, 2,5mg/100g de peso corpóreo), diluído em solução de dimetilsulfóxido (DMSO) e óleo de milho (OM), por 4 dias consecutivos. Sete e nove dias após

a última administração de 2-AAF os mesmos animais receberam também por via oral uma dose de 2-AAF (2mg/100g de peso corpóreo) também dissolvido em DMSO e OM. A cronologia do protocolo de indução e do posterior tratamento foi representado na Figura 1.

Obtenção do Extrato da Glândula Salivar (EGS) de *Rhipicephalus sanguineus* s.l..

O extrato foi obtido a partir das glândulas salivares retiradas das fêmeas destes carrapatos as quais foram alimentadas por dois dias em coelhas hospedeiras. As glândulas foram na sequência maceradas em microtubos contendo tampão fosfato de sódio (1mL), pH 7.4 e, posteriormente, procedeu-se a centrifugação do material por 30 minutos a 10.000xg. O sobrenadante foi coletado em tubos estéreis e em fluxo laminar, o extrato obtido foi esterilizado com filtro de 0,22µm e armazenado em freezer -80°C até o momento da utilização.

Foi realizada a quantificação das proteínas seguindo o protocolo de Bradford (BRADFORD, 1976) e fazendo uso de albumina bovina (BSA) como padrão. As leituras das absorbâncias foram realizadas em espectrofotômetro ThermoBioMate 3 (Madison, EUA) e a quantidade de proteína foi dada na unidade de µg/µL.

O presente estudo foi aprovado pelo CEUA (Comitê de Ética em Uso Animal) da UNESP de Rio Claro, SP, protocolo nº 25/2015.

Para a realização de todos os ensaios aqui descritos, os animais foram alocados em grupos, sendo 4 ratos/grupo de estudo como segue:

Grupo Controle: Animais que não passaram pelo protocolo de indução das LPN e não receberam EGS;

Grupo EGS: Receberam 8 injeções intraperitoneais do EGS 0,04µg/µL em dias alternados, durante 16 dias, sendo este um grupo comparativo para demonstrar os efeitos do tratamento com o EGS.

Grupo LPN: Receberam DEN e 2-AAF, para indução da LPN

Grupo LPN + EGS: Receberam DEN e 2-AAF, para indução da LPN e posteriormente cada rato recebeu 8 injeções intraperitoneal do EGS 0,04µg/µL, em dias alternados, durante 16 dias.

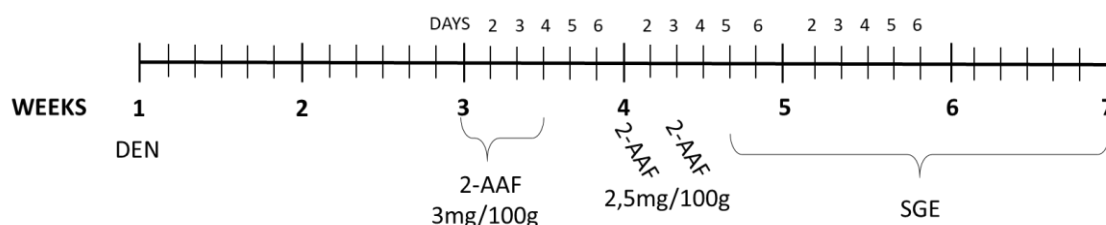


Figura 2: Representação esquemática do protocolo experimental para indução das lesões pré-neoplásicas (LPN) durante as 7 semanas de exposição aos compostos: dietilnitrosamina (DEN) e 2-acetilaminofluoreno (2-AAF) e ao tratamento com o extrato da glândula salivar (EGS).

Ao longo das 7 semanas de exposição aos compostos, os animais foram observados semanalmente para avaliação do peso corpóreo, utilizando balança eletrônica de precisão (Marte LC1 V3.0). Após encerrados os experimentos, os ratos foram anestesiados e posteriormente eutanasiados, para coleta do sangue da artéria aorta abdominal e dos órgãos (fígado, rins e baço). O procedimento de eutanásia foi supervisionado pela médica-veterinária Leticia Maria Graballos Ferraz Hebling CRMV-SP 5.412. A eutanásia foi realizada por meio da injeção dos anestésicos Quetamina/Xilasina (300mg/kg e 30mg/kg). Depois de retirados, os órgãos (fígado, rins e baço) foram pesados e seus pesos registrados. Fragmentos do fígado foram fixados para a rotina histológica. O sangue coletado da aorta abdominal seguiu para análise (leucograma e quantificação do colesterol).

Análise hematológica

Deu-se em analisador multiparamétrico de quantificação celular para hematologia, Pentra 80 (ABX Diagnostics, Montpellier, France). A dosagem do colesterol deu-se a partir do soro obtido do sangue dos ratos após eutanásia, por meio do aparelho BIOPLUS (analisador multiparamétrico semi-automático de ensaios colorimétricos e enzimáticos para bioquímica) e dos “kits” BIOLAB (segundo instruções do fabricante). Ambas as análises foram realizadas nas dependências do Laboratório de Análises Clínicas, das Faculdades Integradas Einstein de Limeira-SP, sob responsabilidade técnica do biomédico Luís Fernando Sodelli (CRBM nº 4.099).

Análise histológica do fígado

Foram realizadas no Laboratório de Histologia do Departamento de Biologia do IB da UNESP, campus de Rio Claro, SP. Para tanto, fragmentos de fígado (aproximadamente 3mm)

foram fixados em paraformaldeído 4% para histologia e em mistura aquosa de Bouin por 14 dias para quantificação de polissacarídeos.

Após a fixação procedeu-se a desidratação do material em concentrações crescentes de álcool (70%, 80%, 90% e 95%) com banhos de 60 minutos cada e posterior transferência para a resina de embebição onde permaneceu por 14 dias. Após, os fragmentos foram incluídos em historesina Leica e seccionados com 3 µm de espessura em micrótomo Leica RM 2145. As secções foram recolhidas em lâminas de vidro e submetidas à: a) coloração pela hematoxilina e eosina (HE), para detecção de estruturas ácidas e básicas, respectivamente e b) à reação pelo PAS (Ácido Periódico- Schiff, segundo McManus (1946), para detecção de polissacarídeos totais.

Coloração pela hematoxilina e eosina (HE)

As secções obtidas foram reidratadas por 1 minuto em água destilada, coradas pela hematoxilina por 7 minutos, e lavadas 5 minutos em água corrente. Na sequência, procedeu-se a coloração pela eosina (5 minutos) e posterior lavagem em água corrente. Após a secagem as lâminas foram montadas em bálsamo de Canadá para observação e fotodocumentação em microscópio de luz de campo claro Leica DM750.

Para a quantificação das células de Kupffer, através do software LAS (Leica Application Suite), uma grade de teste de 100 pontos foi sobreposta às fotos das secções histológicas e 10 campos/animal (ampliação de 400x) foram contados aleatoriamente.

Técnica do PAS (Ácido Periódico- Schiff) (McMANUS, 1946)

Esta técnica foi utilizada para detecção de polissacarídeos. As secções foram reidratadas por 1 minuto em água destilada para então serem transferidas para solução de ácido periódico 4% por 10 minutos. Novamente foram lavadas em água destilada por 1 minuto e na sequência colocadas, por 1 hora, no reagente de Schiff. A seguir foram lavadas, por 15 minutos, em água corrente. Após a secagem foram montadas em bálsamo do Canadá para posterior quantificação (nos hepatócitos) da área total ocupada pelo polissacarídeo. Para a quantificação, duas secções/indivíduo tiveram cinco campos/secção fotografados, sempre distantes de grandes vasos, para que o maior número de hepatócitos estivesse visível. Afim de se quantificar a quantidade de área marcada de glicogênio, as fotos foram submetidas ao software ImageJ (National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA) para obtenção dos valores da área marcada pela técnica de PAS após usar o mesmo limiar (Threshold) para cada imagem, de acordo com o protocolo descrito por Karami et al. (2016).

Análise estatística

Todos os resultados dos gráficos foram apresentados como média $\pm$ erro padrão da média e submetidos estatisticamente a análise de variância com comparações múltiplas (ANOVA), seguido do teste de Tukey-Kramer (uma via) para os testes de peso corpóreo, análise do colesterol, das células de Kupffer e da quantificação do glicogênio, ou pelo teste Bonferroni (duas vidas) para a análise do peso relativo dos órgãos e para o leucograma, utilizando o programa GraphPad Prisma (GraphPad Prism Software Inc, 2007) para determinar a significância dos resultados.

RESULTADOS

Pesos corporal e relativo dos órgãos

No presente estudo observou-se que os ratos no dia em que se deu início ao protocolo de indução das LPN, estavam com peso médio de aproximadamente 350g. Após 7 semanas, período esse que representou o final do protocolo de indução das lesões e do tratamento com o EGS, a média de peso foi de 430g.

O resultado do peso corpóreo dos animais de todos os grupos foi tabulado e aos valores aplicou-se a fórmula de variação de peso, a qual mostrou, assim como pode ser observado no gráfico 1, que não houve alteração significativa dos pesos nos ratos de todos os grupos quando comparados entre si ou quando comparados aos do grupo controle.

O peso relativo dos órgãos retirados no momento da eutanásia está representado no gráfico 2, ressaltando-se que a relação da porcentagem foi obtida dividindo-se o valor do peso do órgão do animal no momento da dissecação pelo valor do peso corpóreo do dia da eutanásia. Os resultados mostraram a ocorrência de aumento significativo do peso relativo apenas do fígado e ainda apenas naqueles animais que passaram pelo protocolo de LPN, ou seja, grupos LPN e LPN + EGS.

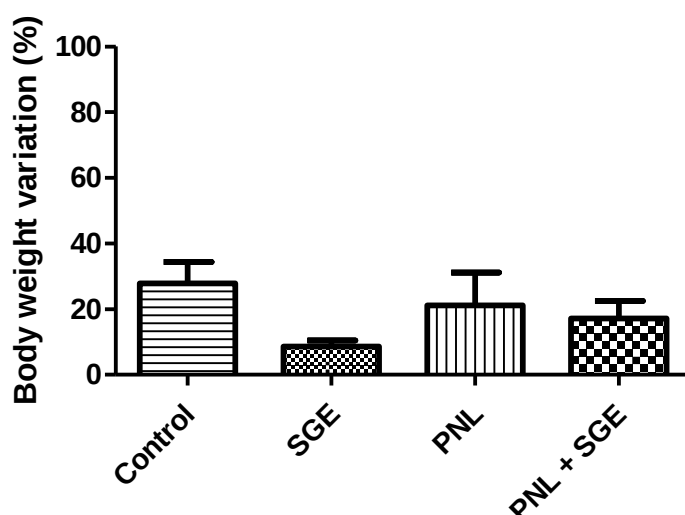
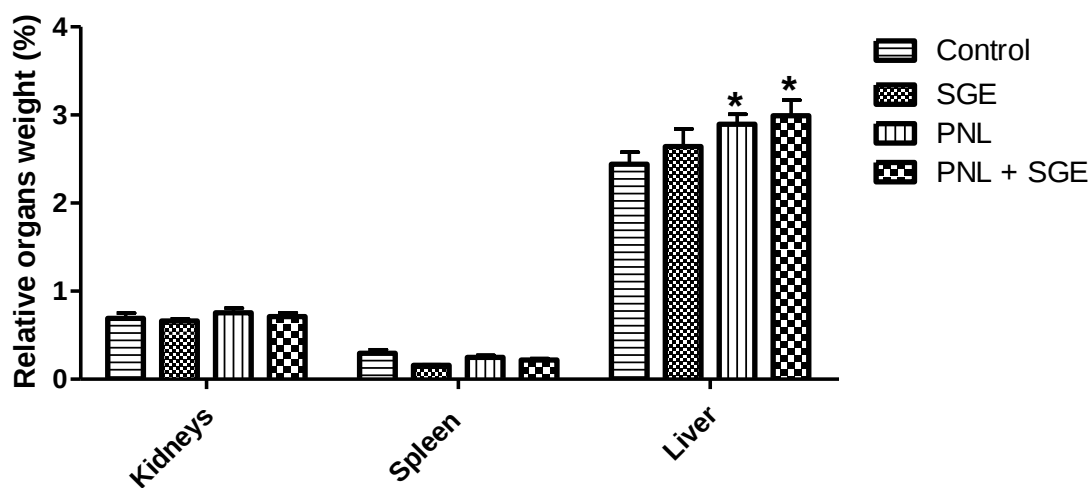


Gráfico 1: Porcentagem da variação do peso corpóreo dos ratos dos grupos Controle, EGS, LPN e LPN+EGS (n=4).



* $P > 0.05$ vs Control

Gráfico 2: Porcentagem do peso relativo dos órgãos dos ratos dos grupos Controle, EGS, LPN e LPN+EGS (n=4).

Análises clínicas

As análises hematológicas, realizadas para quantificar as células do sistema imune: linfócitos, monócitos, neutrófilos, eosinófilos e basófilos, mostraram (gráfico 3) que não houve alterações significativas nas suas porcentagens quando os grupos foram comparados entre si ou entre os mesmos e o controle. A análise colorimétrica para quantificação de colesterol

apresentada no gráfico 4 também indicou que nem o extrato e nem as LPN causaram alterações nos índices de colesterol circulante.

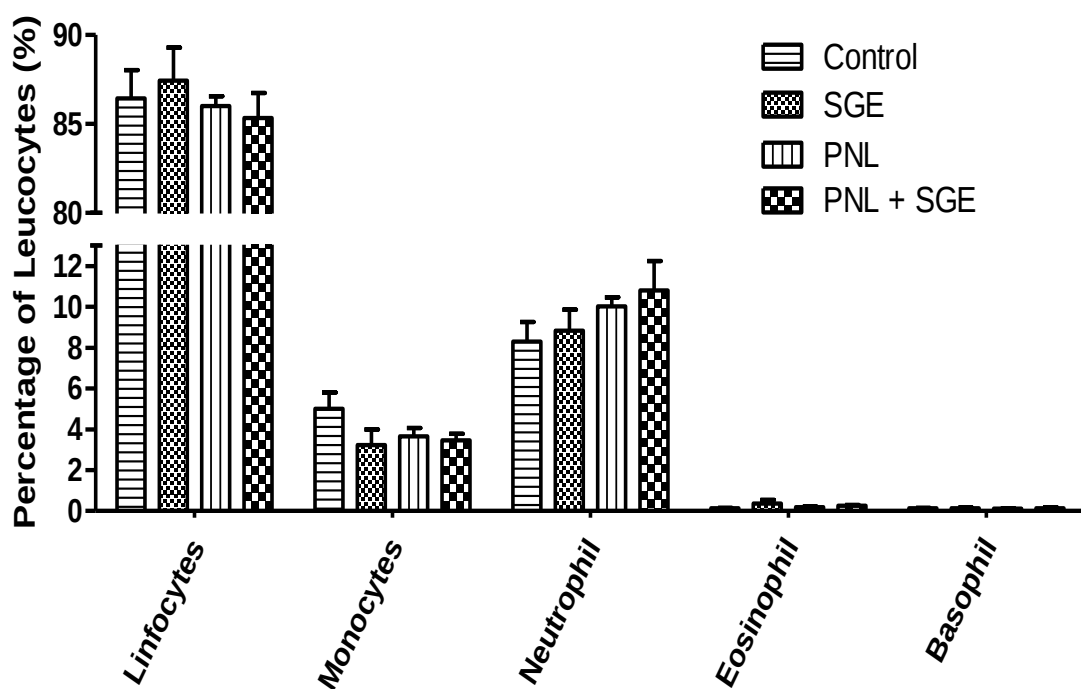


Gráfico 3: Leucograma obtido a partir do sangue coletado dos ratos dos grupos Controle, EGS, LPN e LPN+EGS (n=4).

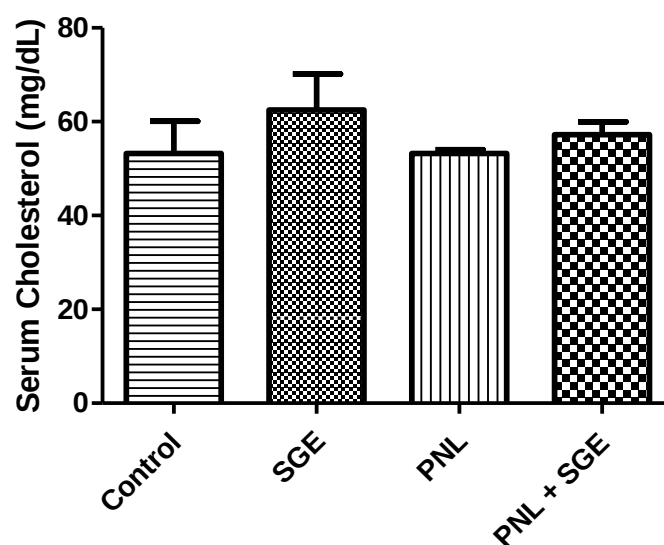


Gráfico 4: Quantificação colorimétrica de colesterol obtido a partir do soro do sangue coletado dos ratos dos grupos Controle, EGS, LPN e LPN+EGS (n=4).

Análises Histológica e Histoquímica do Fígado

Grupo Controle

Os resultados das análises histológica e histoquímica dos fígados dos animais do grupo controle, mostraram que esse órgão manteve a morfologia íntegra, conforme descrição de Junqueira e Carneiro (2017).

Segundo esses autores, os hepatócitos apresentaram-se com forma cúbica e mono ou binucleados, dispostos em cordões distribuídos pelo tecido hepático. Em relação ao citoplasma destas células, o mesmo foi marcado pela eosina (Fig 1F), além de ter sido observada a presença de granulação de cor púrpura, que no caso, seriam depósitos de glicogênio, elemento típico do tecido hepático, evidenciados pela técnica de PAS. As lâminas cujo material foi marcado pelo PAS também foram utilizadas para se realizar a quantificação de polissacarídeo, a qual foi realizada por meio do software ImageJ, cujos resultados encontram-se no gráfico 5.

As células de Kupffer, macrófagos típicos do fígado, foram observadas pela presença de núcleos alongados e fortemente eosinofílicos (Fig 1F). Estimou-se também qual seria o número dessas células no tecido, por meio da relação contagem de células/área via software LAS (Leica Application Suite). Os resultados estão mostrados no gráfico 6.

Ainda no fígado dos animais do grupo controle pode-se observar que os vasos sanguíneos estavam com sua morfologia original preservada, com endotélio íntegro, presença de hemácias no interior do lúmen e tecido conjuntivo homogeneamente distribuído (Fig 1G).

Grupo EGS

Ao analisar-se a morfologia do fígado dos animais do grupo EGS, também observou-se que o tecido manteve-se preservado, assim como o observado no grupo controle.

Os cordões de hepatócitos se mantiveram íntegros e os hepatócitos mantiveram sua forma original (Fig 1I).

Ao contrário do observado no grupo controle, os hepatócitos apresentaram citoplasma com regiões que não foram marcadas pela eosina, provavelmente ocupadas por vacúolos, principalmente naqueles hepatócitos dispostos ao redor dos vasos sanguíneos (Fig 1J).

Os dados histoquímicos mostraram que a marcação para o glicogênio (Fig 1K) foi semelhante à do grupo controle. Os núcleos dos hepatócitos não apresentaram alterações significativas e os nucléolos ficaram bem evidentes, caracterizando assim a presença de início da atividade de transcrição (Fig 1I).

Os dados da quantificação de células de Kupffer não se alteraram em relação aos do grupo controle (gráfico 6).

Também, ao contrário do observado no grupo controle, os vasos sanguíneos apresentaram-se com pequenas alterações, ou seja, com desorganização no endotélio e diminuição da presença de tecido conjuntivo ao seu redor (Fig 1J).

Grupo LPN

Nos fígados dos animais alocados nesse grupo de estudo foram observadas as maiores alterações morfológicas, ressaltando que este foi o grupo utilizado como comparação positiva.

Assim, foi observado que os hepatócitos ao contrário do grupo controle, estavam dispostos desorganizadamente, ou seja, perderam a disposição original que era sob a forma de cordões hepáticos (Fig 1L). Em algumas regiões observou-se o aumento de tecido conjuntivo, o que poderia estar representando a instalação de LPN (Fig 1L).

A morfologia dos hepatócitos foi alterada pois sofreram uma hipertrofia, além de terem apresentado regiões do citoplasma vacuolizadas, principalmente naquelas células localizadas mais próximas dos vasos (Fig 1M). Histoquimicamente pode-se observar nos hepatócitos que o glicogênio citoplasmático manteve a mesma distribuição daquela observada nos fígados do grupo controle (Fig 1N). A quantificação do glicogênio mostrou dados semelhantes àqueles obtidos no grupo controle (gráfico 5).

As alterações morfológicas também atingiram os núcleos dos hepatócitos os quais apresentaram: tamanhos variados, marginalização da cromatina e picnose, sugerindo que células poderiam estar morrendo por processos de apoptose (Fig 1L).

As células de Kupffer apresentaram os núcleos hipertróficos (Fig 1L), além das mesmas terem aumentado sua população quando comparadas com os grupos controle e EGS. Dados resumidos no gráfico 6.

Os vasos sanguíneos presentes no tecido hepático desse grupo mostraram um endotélio desorganizado (Fig 1M)

Grupo LPN + EGS

Os ratos desse grupo também apresentaram alterações no seu tecido hepático, representadas pela desorganização na disposição dos hepatócitos (não mais na forma de cordões), além de células onde o limite não pode ser bem estabelecido devido aos danos sofridos (Fig 1O), dados esses semelhantes àqueles obtidos nos animais alocados no grupo LPN.

Os hepatócitos de forma geral apresentaram citoplasmas menos vacuolizados (Fig. 1O) quando comparados aos indivíduos do grupo LPN. O glicogênio citoplasmático (Fig 1Q) não apresentou alteração na intensidade de marcação pelo PAS quando se comparou esses indivíduos com aqueles do grupo controle (gráfico 5).

Os núcleos dos hepatócitos (Fig 1O) apresentaram alterações semelhantes as observadas no grupo LPN.

A contagem das células de Kupffer não revelou alteração e a quantificação se manteve semelhante à dos grupos controle e EGS (gráfico 6).

Foi observado que o tecido conjuntivo ao redor dos vasos sanguíneos teve um espessamento, assim como observado no grupo LPN e o endotélio desses vasos apresentou-se ainda com alguma desorganização (Fig 1P).

Figura 1: A: Grupo controle: Esquema do corpo de um rato mostrando a localização do fígado. Representando o grupo controle (pelo próprio autor).

B: Grupo EGS: Esquema do corpo de um rato mostrando a localização do fígado e exposição ao EGS através de injeção intraperitoneal.

C: Grupo LPN: Esquema do corpo de um rato mostrando a localização do fígado e indução do protocolo das lesões pré-neoplásicas (LPN) por meio de injeções de DEN e 2-AAF

D: Grupo LPN + EGS: Esquema do corpo de um rato mostrando a localização do fígado e indução do protocolo da LPN por meio de injeções de DEN e 2-AAF e em seguida recebendo o EGS através de injeção intraperitoneal.

E: Foto de um fígado de rato Wistar: (Fonte: Coleção pessoal)

F-G: Secções histológicas do fígado de ratos expostos ao tampão sódio fosfato (Controle), coradas pela HE;

H: Secções do fígado de ratos expostos ao tampão sódio fosfato (Controle), submetidas a Técnica do PAS (Ácido Periódico- Schiff);

I-J: Secções do fígado de ratos expostos ao extrato da glândula salivar de carrapatos (EGS), coradas pela HE;

K: Secções do fígado de ratos expostos ao EGS, submetidas a Técnica do PAS (Ácido Periódico- Schiff);

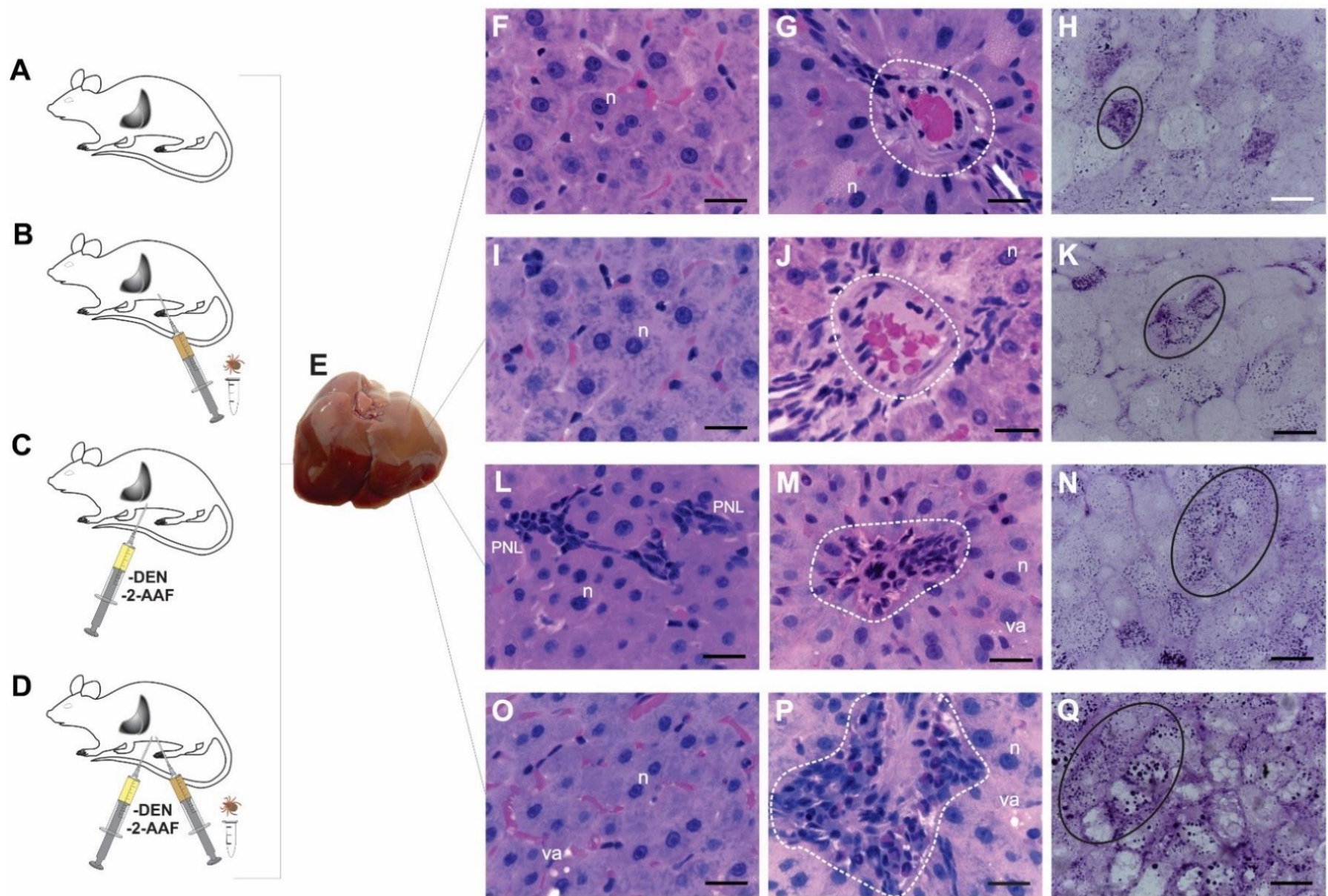
L-M: Secções do fígado de ratos expostos ao protocolo das LPN, coradas pela HE

N: Secções do fígado de ratos expostos ao protocolo das LPN, submetidas a Técnica do PAS (Ácido Periódico- Schiff);

O-P: Secções do fígado de ratos expostos ao protocolo das LPN e tratados com EGS, coradas pela HE

Q: Secções do fígado de ratos expostos ao protocolo das LPN e tratados com EGS, submetidas a Técnica do PAS (Ácido Periódico- Schiff);

Círculo pontilhado branco: vasos sanguíneos; círculo contínuo preto: hepatócitos marcados pelo PAS; v= vacuolização; n= núcleo do hepatócito; K= célula de Kupffer; LPN: lesão pré-neoplásica. Barras: 20µm.



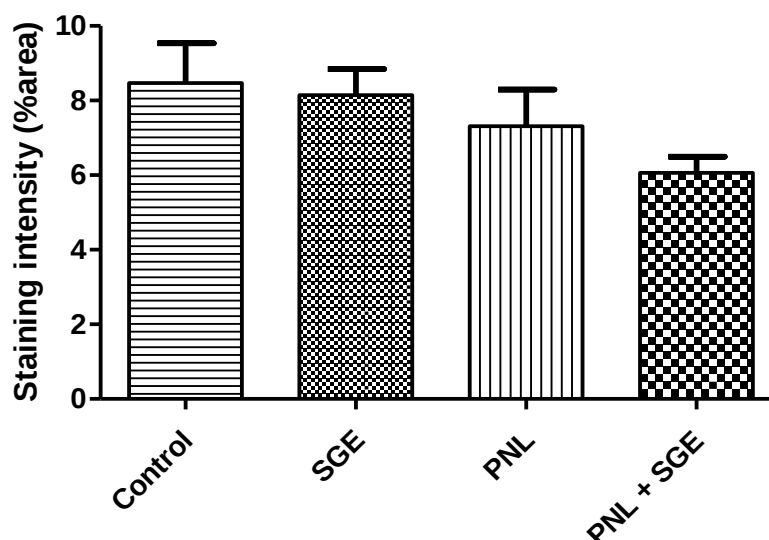
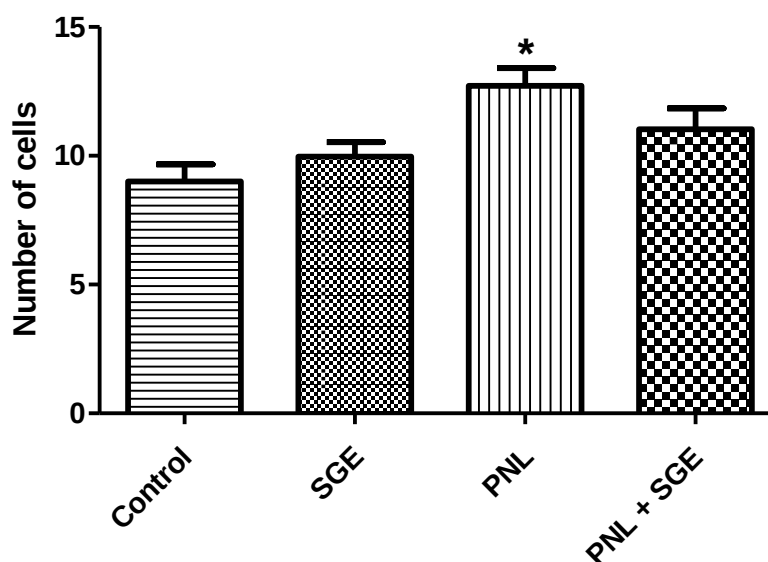


Gráfico 5. Quantificação da marcação do glicogênio após reação pelo PAS dos fígados dos animais dos grupos Controle, EGS, LPN e LPN+EGS (n=4), obtida por meio do software ImageJ.



* $P > 0.05$ vs Control and SGE

Gráfico 6. Contagem das células de Kupffer por unidade de área do fígado dos ratos dos grupos Controle, EGS, LPN e LPN+EGS (n=4).

DISCUSSÃO

A busca por novos tratamentos e estratégias para o combate ao câncer tem sido cada vez maior, por ser esta uma das doenças que mais acomete a população em geral e que tem

disponível tratamentos que ainda apresentam efeitos colaterais agressivos e muitas vezes pouco eficazes (IKEDA et al., 2018; MAUER et al., 2015; PESAPANE et al., 2017).

O hepatocarcinoma (HCC) é um tipo de câncer que compromete o fígado trazendo ao seu portador sérias complicações. Além disso, as chances de cura são ainda pequenas, principalmente devido a rápida progressão da doença e a difícil detecção da mesma, visto poucos serem os sintomas que poderiam detectá-la precocemente (TSUCHIYA et al., 2015).

Dentro desta temática, as denominadas lesões pré-neoplásicas (LPN) tem servido atualmente como excelentes modelos para estudos que abordem o desenvolvimento do HCC (CARRASCO-TORRES et al., 2017). De forma geral, estudos com este tipo de câncer tem utilizado modelos experimentais de carcinogênese hepática (DE MINICIS et al., 2013) com produtos químicos indutores tais como: dietilnitrosamina (DEN), carcinogênico indireto que é ativado principalmente pelo citocromo P450 (CYP 2E1) ao mesmo tempo que é um agente genotóxico (ITO et al., 2000) e o 2-acetilaminofluoreno (2-AAF) um carcinogênico que quando administrado após a aplicação do DEN inibe a proliferação da maior parte dos hepatócitos normais através do bloqueio na atividade da DNA polimerase, promovendo assim a proliferação dos hepatócitos modificados (GROOS et al., 2007; WILLIAMS et al., 1998).

A pesquisa de novos tratamentos que sejam eficientes e menos agressivos aos portadores da doença tem se intensificado e se baseiam com frequência nos bioativos com potencial anticarcinogênico produzidos no reino vegetal, ou seja, por plantas, ou por parte delas que, eventualmente apresentem características medicinais. Afora os bioativos de origem vegetal, também tem-se direcionado foco para aqueles bioativos produzidos por animais. Um exemplo seriam os estudos de Abreu et al. (2014) que utilizaram o extrato da glândula salivar de carrapatos do cão, espécie *Rhipicephalus sanguineus* s.l., e verificaram ser esse capaz de inibir a proliferação de tumor de Walker 256 em pata de ratas Wistar. Dessa forma os estudos com esses ectoparasitas e que abordem essa temática, os têm colocado num status diferente do de organismos praga, visto agora também serem considerados reservatórios de potentes bioativos com as mais diversas funções, ressaltando-se, no entanto, que pouquíssimas delas são conhecidas (HOVIUS; LEVI; FIKRIG, 2008b).

Sob essa perspectiva, já é sabido que os bioativos produzidos nas glândulas salivares de carrapatos depois de misturados irão compor a saliva final destes ectoparasitas. Já foram nela reconhecidas: esterases, prostaglandinas, glicoproteínas e lipoproteínas que, além de atuarem nos hospedeiros por ocasião da sua alimentação (BINNINGTON, 1978; BOWMAN; DILLWITH; SAUER, 1996; WALKER; FLETCHER; GILL, 1985b), atuariam também, devido as suas propriedades terapêuticas, caso do Amblyomin-X obtido da saliva bruta do

carrapato *Amblyomma cajennense*, na letalidade de células de melanoma, adenocarcinoma pancreático e de adenocarcinoma renal (AKAGI et al., 2012; SIMONS et al., 2011b).

Pesquisadores do grupo BCSTM (Brazilian Central of Studies on Ticks Morphology), vem desenvolvendo pesquisas que fazem testes com bioativos produzidos pelo carrapato do cão e, em um estudo que se encontra no prelo, após a realização do ensaio prévio de toxicidade do EGS obtido de fêmeas dessa espécie, deu-se início a investigação do papel terapêutico do EGS em LPNs instaladas no fígado de ratos Wistar, objetivo principal do presente trabalho.

O desenvolvimento deste estudo trouxe a luz informações que mostraram que nos ratos, as LPN afetaram principalmente o seu fígado, resultado este já de certa forma esperado, visto ser o fígado o órgão detoxicador nos animais. Foi observado que houve não só o aumento do peso relativo do órgão, mas também alteração na organização estrutural do tecido, o que foi aqui demonstrado por meio dos resultados da aplicação de técnicas histológica e histoquímica. Ficou aqui demonstrado também que o EGS quando aplicado nos animais LPN positivos teve potencial de reduzir a quantidade de regiões do fígado que apresentavam lesões.

Foi aqui também demonstrado que o peso corporal dos animais não sofreu alteração durante os bioensaios, o que indicou que nem a exposição ao protocolo de LPN, nem a exposição ao EGS provocaram toxicidade sistêmica, corroborando dados de Abreu et al. (2018) que ao administrarem o EGS de carrapatos *R. sanguineus* s. l., na concentração de 0,04 µg/µL, em ratos Wistar não observaram alterações no peso das mesmas, indicando que nessa concentração, o extrato não interferiu no metabolismo do indivíduo. Por outro lado, foi observado que o peso relativo do fígado aumentou significativamente nos animais dos grupos LPN e LPN+ EGS, muito provavelmente decorrente da instalação das lesões, uma vez que estas causam edema no tecido por meio da retenção de líquido intersticial, o que pode provocar um aumento do peso do órgão. Esses resultados corroboraram aqueles de Huang et al. (2008) os quais desenvolveram experimentos em ratos fazendo uso do protocolo de indução de HCC, bem como de lesões de cirrose e observaram um aumento do peso relativo do fígado que, segundo os autores, foi decorrente do aumento da retenção de líquidos (edemaciação). Contrariamente diferiram daqueles obtidos por Choi et al. (2016), que ao realizarem a exposição de ratos ao carcinógeno DEN verificaram que o químico levaria o órgão a entrar em necrose, matando as células e, desta forma diminuindo o peso relativo do órgão.

No presente estudo também foi realizada a análise hematológica e, os dados mostraram que não ocorreram processos inflamatórios, uma vez que as células da linhagem branca não tiveram seus índices de referência alterados nem após a indução das LPN e nem após a exposição ao extrato. Este parâmetro foi avaliado para confirmar a presença das lesões, visto

que estudos em humanos conduzidos por Liao et al. (2016), mostraram que um aumento na quantidade de leucócitos poderia estar relacionado a progressão de um hepatocarcinoma, por exemplo.

A análise hematológica, permitiu também quantificar os níveis de colesterol no plasma sanguíneo dos ratos de todos os grupos. Os dados obtidos mostraram que não houve alterações nos níveis nem dos animais com as LPN nem nos expostos ao EGS. A importância em se realizar essa análise residiu no fato de que o nível de colesterol tem sido considerado um marcador das atividades metabólicas normais do fígado. Segundo Che et al., (2019), a atividade biosintética do colesterol ocorrendo em níveis normais seria um indicador importante para o prognóstico negativo do câncer de fígado.

Também a aplicação das técnicas histológica e histoquímica no fígado dos animais representaram o uso de ferramentas importantes que mostraram como o tecido hepático se comportaria quando exposto às diferentes substâncias aqui testadas. Foram, por meio dessa ferramenta, identificadas poucas alterações morfológicas nos fígados dos animais do grupo exposto ao EGS sendo as mais frequentes representadas por: a) vacuolização citoplasmática nos hepatócitos e b) variação da densidade de tecido conjuntivo ao redor dos vasos sanguíneos. O grupo de animais que passou pelo protocolo de indução das LPN foi o que apresentou o tecido hepático com as maiores alterações, a saber com: a) desorganização dos cordões hepáticos, b) aumento da quantidade de tecido conjuntivo por todo o tecido, c) presença de hepatócitos hipertrofiados e com citoplasma vacuolizado e d) presença de hepatócitos com núcleos apoptóticos. Já o grupo que foi exposto ao protocolo de indução das LPN e depois com exposição ao EGS, apresentou diminuição da extensão dos danos no tecido, porém, mesmo assim ainda pode ser observado: a) hepatócitos que não mantiveram-se organizados em cordões, b) hepatócitos com alguma vacuolização citoplasmática, c) menor frequência de hepatócitos apresentando núcleos picnóticos e d) menor presença de tecido conjuntivo nas regiões próximas aos vasos. Com relação ao tecido conjuntivo, deve-se ressaltar que houve um aumento de suas fibras no fígado dos ratos LPN, aumento esse que muito provavelmente tenha sido em decorrência das lesões. Sabe-se que o preenchimento de locais que sofreram qualquer tipo de injúria nos tecidos animais, acontece por meio da proliferação do tecido conjuntivo o que poderia provocar uma desorganização estrutural no tecido como um todo, provocando alteração na disposição dos hepatócitos em cordões, e dessa forma alterando o trajeto da circulação sanguínea no interior do órgão, o que com certeza afetaria sua eficiência. Os dados aqui obtidos corroboraram aqueles de Furtado et al. (2009) que registraram que no fígado de animais

expostos ao DEN e ao 2-AAF o tecido hepático sofreria não só um aumento na síntese de fibras reticulares, mas também um espessamento das mesmas.

Outra alteração morfológica observada nos fígados dos animais dos grupos LPN e LPN+EGS foi a frequência de hepatócitos em apoptose evidenciada por alterações nucleares como: a) marginalização da cromatina e b) picnose e hipercromia do núcleo. Isso provavelmente deveu-se a instalação das lesões, as quais segundo Mazzantini et al., (2008) estariam diretamente envolvidas com a ocorrência de apoptose dos hepatócitos. Além disso esses mesmos autores postularam que essas alterações poderiam influenciar na progressão do câncer hepático.

Especificamente nas regiões com prevalência de hepatócitos que apresentaram-se hipertróficos e com citoplasma vacuolizado, ou seja, aqueles geralmente localizados mais próximos aos vasos sanguíneos ou mesmo próximos a tríade portal, identificou-se maior presença de células de Kupffer, ou seja de macrófagos típicos do tecido hepático. Esses dados sinalizaram que os danos provocados pelas LPN abrangeram o aumento da síntese de fibras reticulares do tecido conjuntivo hepático, e ainda estimulariam o recrutamento de outras células de Kupffer para o tecido, as quais aumentariam a eficiência do sistema de defesa do órgão.

Assim, de forma geral os dados obtidos com o desenvolvimento do presente estudo demonstraram que ratos que passaram por processo de indução de LPN e que foram posteriormente expostos ao EGS obtido a partir de glândulas salivares de carrapatos do cão *R. sanguineus* s. l., tiveram diminuídos os danos hepáticos, demonstrando que estes foram decorrentes da instalação das LPN e que o extrato além de não ter provocado toxicidade nos animais foi potencialmente inibidor do desenvolvimento de um HCC, informações estas que serão úteis em novos estudos fornecendo subsídios para se encontrar alternativas que possam controlar o desenvolvimento de HCC.

AGRADECIMENTOS

Este estudo foi financiado em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001. Agradecimentos ao técnico de laboratório Gerson Mello de Souza pelo apoio técnico.

REFERÊNCIAS

ABREU, M. R.; ROCHA, F. A.; FURQUIM, K. C. S.; ANHOLETO, L. A.; NOVAES, F. C. F.; MORSOLETO, M. J.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Salivary Glands of Female Ticks *Rhipicephalus sanguineus* Like a Potential Source of Molecules with Inhibitory Action: In vivo study with Walker 256 Tumor Cells. **Journal of Pharmaceutical Care & Health Systems**, v. 01, n. 04, p. 1–8, 2014.

ABREU, R. M. M.; ABREU, M. R.; SANTOS, J. P.; HEBLING, L. M. G. F.; ANHOLETO, L. A.; DE SOUZA, J. R. L.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Morphological evaluation of the liver in Wistar rats inoculated with *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) salivary gland extracts. **Microscopy Research and Technique**, v. 81, n. 11, p. 1332–1338, 2018.

AKAGI, E. M.; JÚNIOR, P. L. DE S.; SIMONS, S. M.; BELLINI, M. H.; BARRETO, S. A.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M. Pro-apoptotic effects of Amblyomin-X in murine renal cell carcinoma “in vitro”. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 66, p. 64–69, 2012.

BINNINGTON, K. C. Sequential changes in salivary gland structure during attachment and feeding of the cattle tick, *Boophilus microplus*. **International Journal for Parasitology**, v. 8, n. 2, p. 97–115, 1978.

BOWMAN, A. S.; DILLWITH, J. W.; SAUER, J. R. Tick salivary prostaglandins: Presence, origin and significance. **Parasitology Today**, v. 12, n. 10, p. 388–396, 1996.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.

CARRASCO-TORRES, G.; MONROY-RAMÍREZ, H. C.; MARTÍNEZ-GUERRA, A. A.; BALTIÉRREZ-HOYOS, R.; ROMERO-TLALOLINI, M. DE LOS Á.; VILLA-TREVIÑO, S.; SÁNCHEZ-CHINO, X.; VÁSQUEZ-GARZÓN, V. R. Quercetin Reverses Rat Liver Preneoplastic Lesions Induced by Chemical Carcinogenesis. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, p. 1–8, 27 jun. 2017.

CHE, L.; CHI, W.; QIAO, Y.; ZHANG, J.; SONG, X.; LIU, Y.; LI, L.; JIA, J.; PILO, M. G.; WANG, J.; CIGLIANO, A.; MA, Z.; KUANG, W.; TANG, Z.; ZHANG, Z.; SHUI, G.; RIBBACK, S.; DOMBROWSKI, F.; EVERT, M.; PASCALE, R. M.; COSSU, C.; PES, G. M.; OSBORNE, T. F.; CALVISI, D. F.; CHEN, X.; CHEN, L. Cholesterol biosynthesis supports the growth of hepatocarcinoma lesions depleted of fatty acid synthase in mice and humans. **Gut**, p. gutjnl-2018-317581, 6 abr. 2019.

CHOI, M.-J.; ZHENG, H.-M.; KIM, J. M.; LEE, K. W.; PARK, Y. H.; LEE, D. H. Protective effects of Centella asiatica leaf extract on dimethylnitrosamine-induced liver injury in rats. **Molecular Medicine Reports**, v. 14, n. 5, p. 4521–4528, 1 nov. 2016.

CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M.; DE-SÁ-JÚNIOR, P. L.; SIMONS, S. M.; MARIA, D. A.; DE SOUZA VENTURA, J.; DE FÁTIMA CORREIA BATISTA, I.; FARIA, F.; DURÃES, E.; REIS, E. M.; DEMASI, M. A new tick Kunitz type inhibitor, Amblyomin-X, induces tumor cell death by modulating genes related to the cell cycle and targeting the ubiquitin-proteasome system. **Toxicon**, v. 56, p. 1145–1154, 2010.

DE MINICIS, S.; KISSELEVA, T.; FRANCIS, H.; BARONI, G. S.; BENEDETTI, A.; BRENNER, D.; ALVARO, D.; ALPINI, G.; MARZIONI, M. Liver carcinogenesis: Rodent models of hepatocarcinoma and cholangiocarcinoma. **Digestive and Liver Disease**, v. 45, n. 6, p. 450–459, 2013.

DÍAZ-GONZÁLEZ, Á.; FORNER, A.; RODRÍGUEZ-DE-LOPE, C.; VARELA, M. New challenges in clinical research on hepatocellular carcinoma. **Rev esp enferm dig**, v. 108, p. 485–493, 2016.

DREWES, C. C.; DIAS, R. Y. S.; HEBEDA, C. B.; SIMONS, S. M.; BARRETO, S. A.; FERREIRA, J. M.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M.; FARSKY, S. H. P. Actions of the Kunitz-type serine protease inhibitor Amblyomin-X on VEGF-A-induced angiogenesis. **Toxicon**, 2012.

FURTADO, K. S.; PIRES, P. W.; JUSTULIN, L. A.; RODRIGUES, M. A. M.; FELISBINO, S. L.; BARBISAN, L. F. Metalloproteinases 2 and -9 activity during promotion and progression stages of rat liver carcinogenesis. **Journal of Molecular Histology**, 2009.

GROOS, J.; BANNASCH, P.; SCHWARZ, M.; KOPP-SCHNEIDER, A. Comparison of mode of action of four hepatocarcinogens: A model-based approach. **Toxicological Sciences**, v. 99, n. 2, p. 446–454, 2007.

HASCHEK, W. M.; ROUSSEAU, C. G.; WALLIG, M. A. **Fundamentals of toxicologic pathology**. 2nd. ed. Boston: Elsevier Inc., 2010.

HOVIUS, J. W. R.; LEVI, M.; FIKRIG, E. Salivating for Knowledge: Potential Pharmacological Agents in Tick Saliva. **PLoS Medicine**, v. 5, n. 2, p. e43, fev. 2008.

HUANG, K.-W.; HUANG, Y.-C.; TAI, K.-F.; CHEN, B.-H.; LEE, P.-H.; HWANG, L.-H. Dual Therapeutic Effects of Interferon- α Gene Therapy in a Rat Hepatocellular Carcinoma Model With Liver Cirrhosis. **Molecular Therapy**, v. 16, n. 10, p. 1681–1687, out. 2008.

IKEDA, M.; MORIZANE, C.; UENO, M.; OKUSAKA, T.; ISHII, H.; FURUSE, J. Chemotherapy for hepatocellular carcinoma: current status and future perspectives. **Japanese Journal of Clinical Oncology**, v. 48, n. 2, p. 103–114, 1 fev. 2018.

ITO, T.; SHIRAKI, K.; SUGIMOTO, K.; YAMANAKA, T.; FUJIKAWA, K.; ITO, M.; TAKASE, K.; MORIYAMA, M.; KAWANO, H.; HAYASHIDA, M.; NAKANO, T.; SUZUKI, A. Survivin promotes cell proliferation in human hepatocellular carcinoma. **Hepatology**, v. 31, n. 5, p. 1080–1085, maio 2000.

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

KARAMI, A.; ROMANO, N.; HAMZAH, H.; SIMPSON, S. L.; YAP, C. K. Acute phenanthrene toxicity to juvenile diploid and triploid African catfish (*Clarias gariepinus*): Molecular, biochemical, and histopathological alterations. **Environmental Pollution**, v. 212, p. 155–165, 1 maio 2016.

LIAO, W.; WANG, Y.; LIAO, Y.; HE, S.; JIN, J. Preoperative Aspartate Aminotransferase to White Blood Cell Count Ratio Predicting Postoperative Outcomes of Hepatocellular Carcinoma. **Medicine**, v. 95, n. 14, p. e3345, abr. 2016.

LOPEZ, P. M.; VILLANUEVA, A.; LLOVET, J. M. Systematic review: evidence-based management of hepatocellular carcinoma – an updated analysis of randomized controlled trials. **Aliment Pharmacol Ther Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 23, p. 1535–1547, 2006.

MAUER, K.; O’KELLEY, R.; PODDA, N.; FLANAGAN, S.; GADANI, S. New Treatment Modalities for Hepatocellular Cancer. **Current Gastroenterology Reports**, v. 17, n. 5, p. 19, 14 maio 2015.

MAZZANTINI, R. PIETRO; DE CONTI, A.; MORENO, F. S. Persistent and remodeling

hepatic preneoplastic lesions present differences in cell proliferation and apoptosis, as well as in p53, Bcl-2 and NF- κ B pathways. **Journal of Cellular Biochemistry**, 2008.

MCMANUS, J. F. A. **Histological demonstration of mucin after Periodic AcidSchiff**, 1946.

MORENO, F. S.; RIZZI, M. B. S. L.; DAGLI, M. L. Z.; PENTEADO, M. V. C. Inhibitory effects of β -carotene on preneoplastic lesions induced in Wistar rats by the resistant hepatocyte model. **Carcinogenesis**, v. 12, n. 10, p. 1817–1822, 1 out. 1991.

PESAPANE, F.; NEZAMI, N.; PATELLA, F.; GESCHWIND, J. F. New concepts in embolotherapy of HCC. **Medical Oncology**, v. 34, n. 4, p. 58, 16 abr. 2017.

SAUER, J. R.; ESSENBERG, R. C.; BOWMAN, A. S. **Salivary glands in ixodid ticks: Control and mechanism of secretion** **Journal of Insect Physiology**, 2000.

SEMPLE-ROBERTS, E.; HAYES, M. A.; ARMSTRONG, D.; BECKER, R. A.; RACZ, W. J.; FARBER, E. Alternative methods of selecting rat hepatocellular nodules resistant to 2-acetylaminofluorene. **International journal of cancer**, v. 40, n. 5, p. 643–5, 15 nov. 1987.

SIMONS, S. M.; JÚNIOR, P. L. DE S.; FARIA, F.; BATISTA, I. DE F. C.; BARROS-BATTESTI, D. M.; LABRUNA, M. B.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M. The action of *Amblyomma cajennense* tick saliva in compounds of the hemostatic system and cytotoxicity in tumor cell lines. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 65, n. 6, p. 443–450, 2011.

SOLT, D.; FARBER, E. New principle for the analysis of chemical carcinogenesis. **Nature**, v. 263, p. 701–703, 1976.

SOUZA, A. C. P.; SZABÓ, M. P. J.; OLIVEIRA, C. J. F.; SILVA, M. J. B. Exploring the anti-tumoral effects of tick saliva and derived components. **Toxicon**, v. 102, p. 69–73, 2015.

TSUCHIYA, N.; SAWADA, Y.; ENDO, I.; SAITO, K.; UEMURA, Y.; NAKATSURA, T. Biomarkers for the early diagnosis of hepatocellular carcinoma. **World Journal of Gastroenterology**, v. 21, n. 37, p. 10573, 7 out. 2015.

WALKER, A. R.; FLETCHER, J. D.; GILL, H. S. Structural and histochemical changes in the salivary glands of *Rhipicephalus appendiculatus* during feeding. **International journal for parasitology**, v. 15, n. 1, p. 81–100, fev. 1985.

WILLIAMS, G. M.; IATROPOULOS, M. J.; WANG, C. X.; JEFFREY, A. M.; THOMPSON, S.; PITTMAN, B.; PALASCH, M.; GEBHARDT, R. Nonlinearities in 2-Acetylaminofluorene Exposure Responses for Genotoxic and Epigenetic Effects Leading to Initiation of Carcinogenesis in Rat Liver. **Toxicological Sciences**, v. 45, n. 2, p. 152–161, out. 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guide to early cancer diagnosis**. [s.l.: s.n.].

ARTIGO 3

Alterações provocadas pelos acaricidas timol e carvacrol em células da linhagem RML-15 oriundas de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* s.l.

¹Natalia Rubio Claret Pereira, ¹Marina Rodrigues de Abreu, ¹Luis Adriano Anholeto, ²Lesley Bell-Sakyi, ¹Maria Izabel Camargo-Mathias

¹ Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual de São Paulo (UNESP), Rio Claro, SP, Brasil

² Departamento de biologia da infecção, Instituto de Infecção e Saúde Global, Universidade de Liverpool, Liverpool, Reino Unido.

RESUMO

Os carrapatos têm sido alvo de estudos, principalmente no que concerne ao seu controle, visto estes ectoparasitas espoliarem seus hospedeiros, bem como transmitir a estes diversos patógenos. Atualmente as estratégias de controle envolvem a utilização de acaricidas químicos que deixam no ambiente resíduos tóxicos. Por isso, a busca por acaricidas que tenham ativos naturais como bases, exemplo do timol e do carvacrol, tem sido uma perspectiva de estratégia menos danosa tanto aos organismos alvos como ao meio ambiente. Essa busca por novos acaricidas, requer também a realização de testes de eficiência, os quais na maioria das vezes são realizados fazendo uso de animais vivos (tanto os carrapatos quanto os animais que simulam em laboratório os seus hospedeiros). Assim a utilização de células em culturas (*in vitro*), derivadas dos próprios carrapatos, é uma alternativa que substitui os hospedeiros e que fornece informações com excelentes níveis de precisão. Diante disso o presente trabalho teve como objetivo realizar um estudo comparativo da ação dos acaricidas timol e carvacrol sobre células RML-15, em cultura, oriundas de carrapatos do cão (*Rhipicephalus sanguineus*) como uma perspectiva futura de controle dos mesmos. Os resultados mostraram que a exposição das células ao timol não alterou a viabilidade das mesmas em nenhuma das concentrações aqui testadas. Já o carvacrol na concentração de 0,3 µL/mL matou mais de 70% das células e a de 0,06µL/mL matou 23% destas. A análise morfológica das células revelou que as expostas as menores concentrações de timol apresentaram-se com morfologia íntegra, estando algumas delas em divisão. As expostas as maiores concentrações do timol (0,014mg/mL e 0,07mg/mL)

apresentaram alterações como: vacuolização citoplasmática, picnose e fragmentação nuclear. Segundo os resultados obtidos o acaricida carvacrol foi, mais do que o timol, o composto que causou as maiores alterações morfológicas, incluindo: perda dos limites celulares, picnose e fragmentação nuclear observadas já nas menores concentrações. Na maior concentração (0,3 $\mu\text{L/mL}$) aqui testada já não foi possível observar células íntegras e sim apenas fragmentos destas. Foi aqui também observado que o carvacrol a 0,012 $\mu\text{L/mL}$ causou a morte das células RML-15 por apoptose, sendo, portanto, este o que provocou os maiores efeitos citotóxico sobre essa linhagem celular quando comparado ao timol.

Palavras-chave: cultura celular, controle, viabilidade, análise morfológica.

INTRODUÇÃO

Os estudos com carrapatos, de forma geral, têm crescido nas últimas décadas, visto estes ectoparasitas serem hoje considerados de extrema importância médico-veterinária, uma vez que provocam lesões no hospedeiro, seja no processo de repasto sanguíneo, seja pela transmissão de agentes patogênicos. Estes artrópodos tem a hematofagia como seu hábito alimentar o que facilita a transmissão de microorganismos que provocam várias doenças como a febre maculosa (*Rickettsia rickettsii*), erliquiose (*Ehrlichia canis*) e babesiose (*Babesia canis*) tanto no homem quanto nos animais domésticos e silvestres (DANTAS-TORRES, 2010; KAUFMAN, 1990; SONESHINE; ROE, 2014).

Devido a espoliação que causam nos seus hospedeiros, a procura por métodos de controle que sejam eficientes tem se tornado prioridade. Aquele que é atualmente mais utilizado tem bases químicas de natureza sintética (CHAGAS et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2016) e ainda como agravante há o fato dos mesmos serem utilizados de forma indiscriminada o que além de provocar danos colaterais não só para o seu hospedeiro como para o ambiente, ainda pode selecionar populações resistentes de carrapatos, comprometendo a eficiência dos acaricidas (OLIVEIRA; BECHARA; CAMARGO-MATHIAS, 2008) e deixando resíduos tóxicos no solo, nos cursos d'água, na flora e no próprio homem (ALVES et al., 2019; MAUND et al., 2011; PRUETT, 1999; ROMA et al., 2009)

Nesse cenário, a busca por novos produtos acaricidas que sejam mais baratos, e que apresentem menor toxicidade e 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 extratos e óleos essenciais extraídos de plantas reconhecidamente sintetizadoras de bioativos com potencial para controlar carrapatos (CASTRO et al., 2014;

DENARDI et al., 2010; REMEDIO; NUNES; CAMARGO-MATHIAS, 2015; VENDRAMINI et al., 2012). Dentre eles está o carvacrol ($C_{10}H_{14}O$), um monoterpene aromático oxigenado, volátil, sintetizado a partir do γ -terpineno e do p-cimeno (CACCIATORE et al., 2015). É encontrado em uma grande variedade de plantas das famílias Lamiaceae e Verbanaceae (DE OLIVEIRA-CRUZ et al., 2013; KOC et al., 2013; LAGE et al., 2013), e apresenta reconhecida ação acaricida. Assim como o carvacrol, o timol, também conhecido como ácido tímico; isopropilmetacresol (= 5 metil – 2 isopropil – 1- fenol) é um monoterpene volátil presente em óleos essenciais de plantas das famílias Apiacea, Lamiacea e Verbenaceae, que tem atividade acaricida quando aplicado em diferentes espécies e estágios de vida de diversas espécies de carrapatos (LIMA DE SOUZA et al., 2019; MATOS et al., 2014).

Estudar a ação de acaricidas requer a inclusão de vertebrados vivos nos bioensaios a serem desenvolvidos. Nessa direção fazer uso do sistema de cultura *in vitro*, no caso linhagens celulares derivadas de carrapatos, têm sido uma alternativa que permite substituir os hospedeiros. Além disso quando se trata de estudos com patógenos e vetores, incluindo biologia básica de parasitas, essa estratégia traz resultados muito mais rápidos e muitas vezes mais precisos (BELL-SAKYI et al., 2007). Assim a performance de ensaios *in vitro* para o escaneamento de substâncias acaricidas em linhagens celulares de carrapatos, tem se sobreposto aos tradicionais ensaios que fazem uso de animais vivos, tanto carrapatos quanto hospedeiros (coelhos, por exemplo) (COSSIO-BAYUGAR; WAGNER; HOLMAN, 2002; GUZZIE, 1994).

Frente ao exposto, o presente trabalho teve como objetivo realizar um estudo comparativo da ação dos acaricidas timol e carvacrol em cultura de células RML-15 obtidas de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* para que essas informações futuramente possam ser utilizadas no desenvolvimento de novos acaricidas.

MATERIAL E MÉTODOS

Linhagem de células de carrapatos: RML-15 (Rocky Mountain Lab)

A linhagem RML-15, derivada de embriões de carrapatos da espécie *R. sanguineus* foi inicialmente desenvolvida por Yunker et al., (1981) no laboratório *Rocky Mountain* em Hamilton, Montana, EUA. A mesma foi originalmente depositada no Biobanco de Células de Carrapatos na Universidade de Liverpool, Reino Unido, porém, a mesma foi caracterizada como sendo derivada de embriões de carrapatos da espécie *Dermacentor variabilis* (YUNKER; CORY; MEIBOS, 1981), equívoco que foi sanado com o sequenciamento de um fragmento do

gene 16S rRNA (BLACK IV; PIESMANT, 1994) cujos resultados revelaram ser esta linhagem de fato, derivada da espécie *R. sanguineus*.

Manutenção da linhagem RML-15

As células desta linhagem foram gentilmente cedidas pelo Banco de células de carrapatos, da Universidade de Liverpool que tem como coordenadora a Dra. Lesley Bell-Sakyi. As células RML-15 foram mantidas em incubadoras com atmosfera controlada, em frascos selados ou tubos de lado plano (Nunc, produto n.º 156758). O meio de cultura utilizado foi o L-15/MEM (Meio de cultura L-15 (Leibovitz) - 35mL, meio de cultura MEM (Minimal Essential Medium) com - 35mL, Tryptose phosphate broth (TPB) - 10mL, L-Glutamina 200mM - 1mL e Penicilina (10,000unidades)/ Streptomicina (10,000µg) - 1mL) com 20% de Soro Fetal Bovino adquiridos da empresa Sigma. As trocas do meio de cultura foram realizadas uma vez por semana, removendo-se cerca de 50% a 80% do volume do meio consumido e substituindo-o por um meio novo e preparado no dia. Ressalte-se que as células de carrapatos podem sobreviver por períodos de até 3 semanas sem que haja necessidade de manutenção, e por vários meses sem repique celular.

Protocolo de exposição da linhagem celular RML-15 ao timol e ao carvacrol.

As células da linhagem RML-15 foram cultivadas em 11 tubos de lado plano utilizados para exposição ao timol:

T1: Timol na concentração de 0,07 mg/mL;

T2: Timol a 0,014 mg/mL;

T3: Timol a 0,0028 mg/mL;

T4: Timol a 0,00056 mg/mL;

TC: Controle do timol (etanol a 1,3% usado para solubilizar a maior concentração de timol aqui testada- 0,07mg/mL); e ao carvacrol

C1: Carvacrol na concentração de 0,3 µL/mL;

C2: Carvacrol a 0,06 µL/mL;

C3: Carvacrol a 0,012 µL/mL;

C4: Carvacrol a 0,0025 µL/mL;

C5: Carvacrol a 0,0005 µL/mL;

CC: Controle do carvacrol (etanol a 2,2% usado para solubilizar a maior concentração de carvacrol aqui testada- 0,3 µL/mL).

Análise da viabilidade celular e da confluência das células

Após decorridas 24, 48 e 72 horas das exposições ao timol e ao carvacrol, realizou-se a contagem do número de células viáveis as quais foram evidenciadas pela técnica do azul de Trypan. A contagem foi manual fazendo uso de câmara de Neubauer e diretamente nos tubos. As imagens foram obtidas em microscópio invertido (Axiovert 25; Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha) para observação da confluência das mesmas.

Análise morfológica das células RML-15

Também, após decorridos os três tempos de exposição (24, 48 e 72h) a ambos os compostos, realizou-se esfregaços das células em lâminas de vidro, os quais foram corados com Giemsa para serem posteriormente fotodocumentados em microscópio Axio Imager 2, Carl Zeiss, Jena, Alemanha.

Quantificação da ocorrência de células apoptóticas

Após exposição das células a ambos os compostos, as células foram destacadas dos tubos e centrifugadas para retirada do meio de cultura. Após, realizou-se a ressuspensão e o número total de células (células/mL) foi obtido por meio do analisador de células MUSE (MERK Millipore Corporation, USA). Na sequência, foi realizada a diluição das células com tampão de ensaio proveniente do kit MUSETM Caspase-3/7 para adequação da quantidade necessária estipulada pelo kit (de 1 a 5×10^6 células/mL) e aplicou-se o protocolo de marcação celular via kit MUSETM Caspase-3/7 (Merk Millipore Corporation, USA). A porcentagem de células marcadas com caspase-3/7 (apoptóticas) ou com o corante 7-AAD (necróticas) foi determinada por meio de software próprio do equipamento, cujos resultados, expressos em histogramas, mostraram o número de eventos em função da fluorescência correspondente a cada marcador. A informação sobre a presença de caspase-3/7 ativa na célula foi revelada pelo aumento da fluorescência. O marcador de células mortas (7-AAD) foi indicador da alteração na integridade estrutural da membrana celular.

RESULTADOS

Os dados que estão sendo aqui apresentados são oriundos de uma parceria internacional e foram obtidos a partir da aplicação do protocolo de identificação de alterações nas células da linhagem RML-15 em cultura, expostas ao timol e ao carvacrol, substâncias com potencial acaricida, voláteis e lipossolúveis.

Viabilidade das células expostas ao timol e ao carvacrol

Para a realização do ensaio de viabilidade, fez-se uso do corante vital azul de Trypan, que evidencia as células sem, no entanto, danificá-las, resultado mostrado no Gráfico 1, onde observa-se que a exposição das mesmas ao timol não provocou aumento de mortalidade em nenhuma das concentrações do acaricida.

A figura 2 traz os resultados da viabilidade destas células quando expostas ao carvacrol. Observou-se que no grupo controle (CC) houve 35% de células mortas no período de 24 horas, 18% em 48 e 19% em 72 horas. Na exposição a maior concentração, ou seja, a de 0,3 $\mu\text{L/mL}$ (C1), depois de decorridas 24 horas observou-se que houve uma média de 77% de células mortas, porcentagem muito maior do que a observada no grupo controle (35%). Depois de decorridas 48 horas todas as células morreram.

Quando fez-se a exposição das células a concentração de 0,06 $\mu\text{L/mL}$ de carvacrol (C2) e após decorridas 24 horas da exposição houve uma média de morte de 23,5%, próximo ao observado no grupo controle após 48 horas (32%) e, após 72 horas a mortalidade foi de 58%, maior ainda que o controle neste mesmo tempo (72%).

Na concentração de 0,012 $\mu\text{L/mL}$ (C3) de carvacrol, a porcentagem média de células mortas foi de: 20,5% em 24, 27,3% em 48 e 32% em 72 horas.

Na exposição a menor concentração de carvacrol aqui testada (0,0024 $\mu\text{L/mL}$) (C4) houve uma média de 9% de células mortas em 24 horas, 28% em 48 horas e 21% em 72 horas.

Análise morfológica das células RML-15 expostas ao timol

Para o estudo da morfologia das células RML-15 depois de expostas aos potenciais acaricidas timol e carvacrol nas concentrações aqui propostas (Figs. 3 e 4), foram analisadas lâminas contendo esfregaços celulares. Os grupos: controle timol (etanol a 1,36%) e controle carvacrol (etanol 2,2%) serviram de comparação com aquelas expostas a ambos os acaricidas, visto não haver disponível na literatura trabalhos trazendo a descrição morfológica de células da linhagem RML-15. Ressalte-se que, pelos resultados obtidos, o etanol não interferiu no processo de divisão celular.

As células alocadas no grupo controle (etanol 1,36%), apresentaram diferentes tamanhos, com limites celulares bem definidos, presença de vacuolização citoplasmática, que nesse caso é uma característica comum de ser encontrada em células de carrapatos e, ainda células mono ou binucleadas. Foram também observadas células que se encontravam em divisão (Figura 3B-C).

Nestas células expostas ao timol a 0,0005mg/mL, observou-se que após 24 horas (Figura 3D) não houve alterações morfológicas, no entanto, decorridas 48 horas (Figura 3E) as mesmas apresentaram citoplasma com extensa vacuolização, além da presença de núcleos picnóticos. Nesta mesma concentração de timol e no tempo de 72 horas (Grupo 3F) observou-se que as células estavam entrando em divisão.

Na concentração de 0,0028mg/mL de timol e decorridas 24 horas (Figura 3G) não detectou-se alterações nem citoplasmática nem nuclear nestas células, no entanto, após 48 horas (Figura 3H) houve aumento da extensão da vacuolização citoplasmática. Pode-se também aqui observar presença de células com núcleos com cromatina condensada. No tempo de 72 horas (Figura 3I) as alterações foram semelhantes aquelas das células expostas ao timol a 0,0005mg/mL (Figura 3F) inclusive com divisão celular.

Os resultados da exposição das células ao timol a 0,014mg/mL, mostrou que no período de 24 horas as mesmas não sofreram alteração morfológica. Após 48 horas ainda pode-se observar a ocorrência de divisão celular (Figura 3K). Depois de 72 horas as divisões celulares cessaram e passou a ser frequente a presença de células em processo de morte (Figura 3L).

Na exposição a maior concentração de timol (0,07mg/mL) após decorridas 24 horas observou-se células (Figura 3M) com núcleos alterados, inclusive com perda da sua forma arredondada original e com início de fragmentação (processo de morte). Após 72 horas (Figura 5O) a frequência de células apoptóticas aumentou.

Análise morfológica das células RML-15 expostas carvacrol

As células do grupo controle do carvacrol (etanol a 2,2%) apresentaram a mesma morfologia já descrita no item anterior, visto pertencerem a mesma linhagem (RML-15) (Figura 4A-C).

A exposição ao carvacrol na menor concentração (0,0024µL/mL) e decorridas 24, 48 e 72 horas não provocou alterações nem citoplasmáticas nem nucleares (Figura 4D-F), tendo inclusive sido observadas células em divisão (Figura 4F).

Na concentração de 0,012µL/mL de carvacrol, houve alterações morfológicas apenas depois de decorridas 72 horas (Figura 4I), estando presentes células com núcleo picnótico e/ou fragmentado (morte celular).

Na exposição a 0,06 μ L/mL as alterações morfológicas só foram observadas após 48 (Figura 4K) e 72 horas (Figura 4L), onde a frequência de células em processo de morte e com alterações citoplasmáticas (perda de limite) e nucleares (fragmentação) foi maior.

Na exposição a maior concentração do carvacrol (0,3 μ L/mL), depois de 24 horas (Figura 4M) todas as células morreram, restando apenas fragmentos destas.

Quantificação de células apoptóticas após exposição ao timol e ao carvacrol

Foi realizada a quantificação da caspase-3/7 para se detectar células em apoptose, depois da exposição ao timol, nos tempos de 24, 48 e 72 horas (Tabela 1). Os resultados deixaram claro que a porcentagem de células marcadas pelo kit MUSETM Caspase-3/7, não se modificou quando comparadas ao grupo controle

Os resultados da exposição destas ao carvacrol nas diferentes concentrações (Tabela 2), e marcadas pelo kit MUSETM Caspase-3/7 mostrou que após 24 horas em todas as concentrações do carvacrol, não houve aumento de células mortas ou em apoptose. No tempo de 48 horas e apenas na concentração de 0,012 μ L/mL houve diminuição da frequência de células vivas e aumento daquelas em apoptose.

Após 72 horas não se observou alterações na quantidade de células mortas ou apoptóticas nem no controle nem nos grupos expostos ao carvacrol nas diferentes concentrações.



Figura 1: Gráfico com os resultados do ensaio de viabilidade indicando a porcentagem de células RML-15 ($\times 10^4$) vivas ou mortas após exposição a diferentes concentrações de timol. T1: Timol 0.07mg/mL; T2: Timol 0.014mg/mL; T3: Timol 0.002mg/mL; T4: Timol 0.0005mg/mL; TC: Timol Controle.

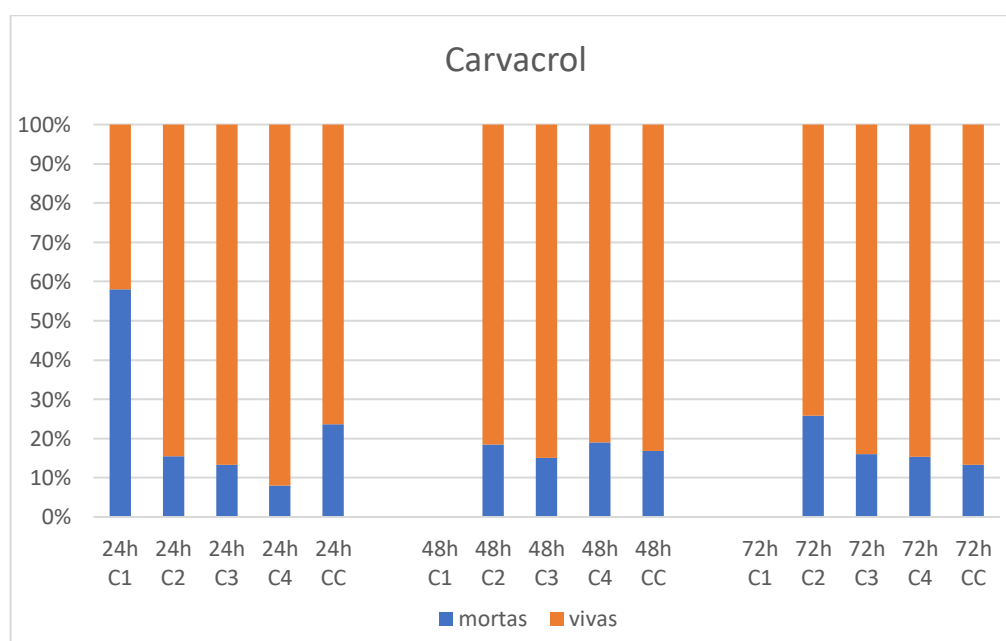


Figura 2: Gráfico com os resultados do ensaio de viabilidade indicando a porcentagem de células RML-15 ($\times 10^4$) vivas ou mortas após exposição a diferentes concentrações de carvacrol. C1: Carvacrol 0.3 μ L/mL; C2: Carvacrol 0.06 μ L/mL; C3: Carvacrol 0.012 μ L/mL; C4: Carvacrol 0.0024 μ L/mL; CC: Carvacrol Controle.

Figura 3: Fotomicrografias de esfregaços de células RML-15, expostas a diferentes tempos e a concentrações crescentes de timol.

A, D, G, J e M= tempo de exposição de 24 horas.

B, E, H, K e N= tempo de exposição 48 horas

C, F, I, L e O= tempo de exposição 72 horas

N e O: correspondem a tempos e concentrações onde houve morte de todas as células.

Coloração: Giemsa

setas= divisão celular, quadrado pontilhado= hemócito, círculo pontilhado= células em apoptose

Barras de Escala: 10 um

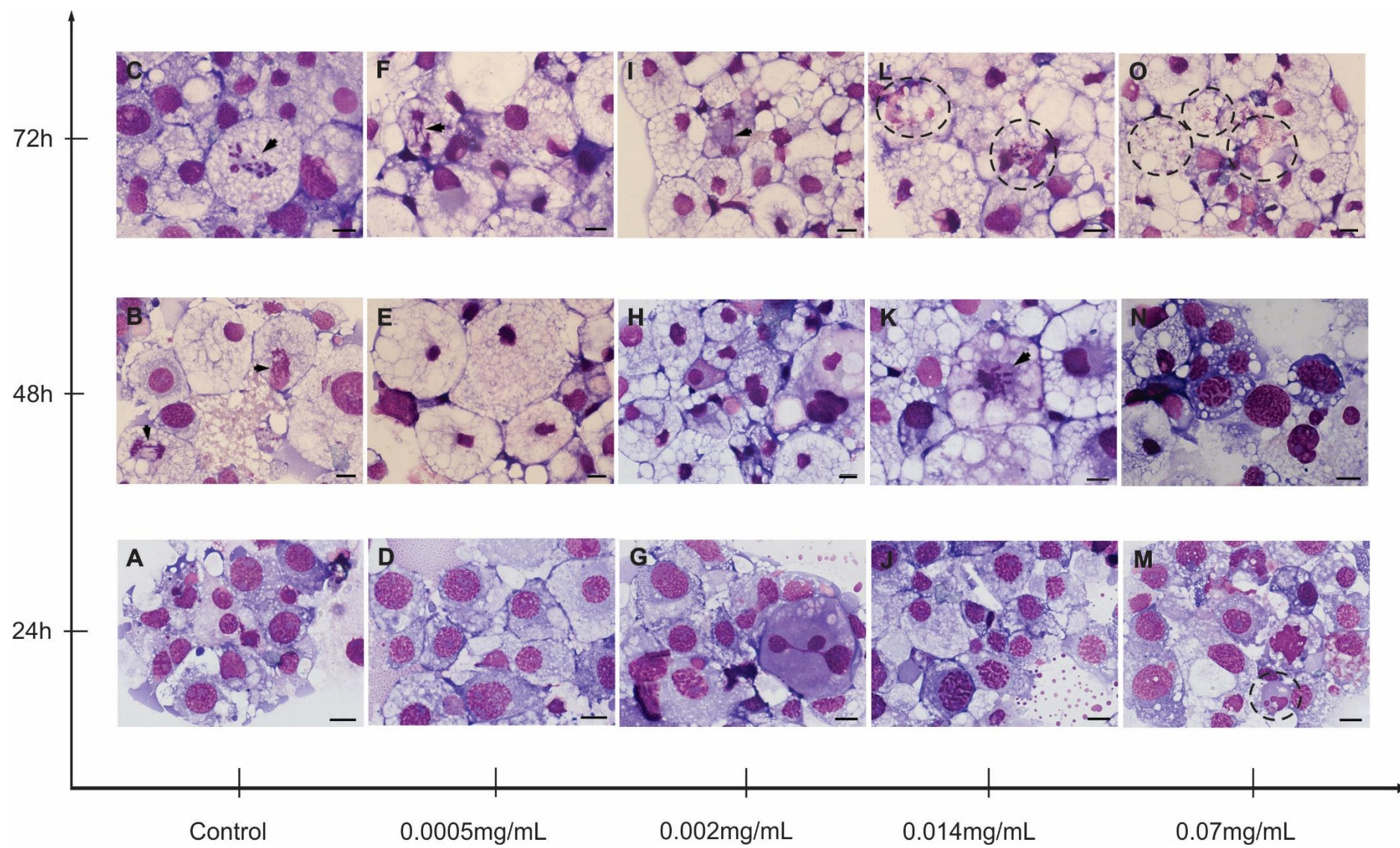


Figura 4: Fotomicrografias de esfregaços de células RML-15, expostas a diferentes tempos e a concentrações crescentes de carvacrol.

A, D, G, J e M= tempo de exposição de 24 horas.

B, E, H, K e N= tempo de exposição 48 horas

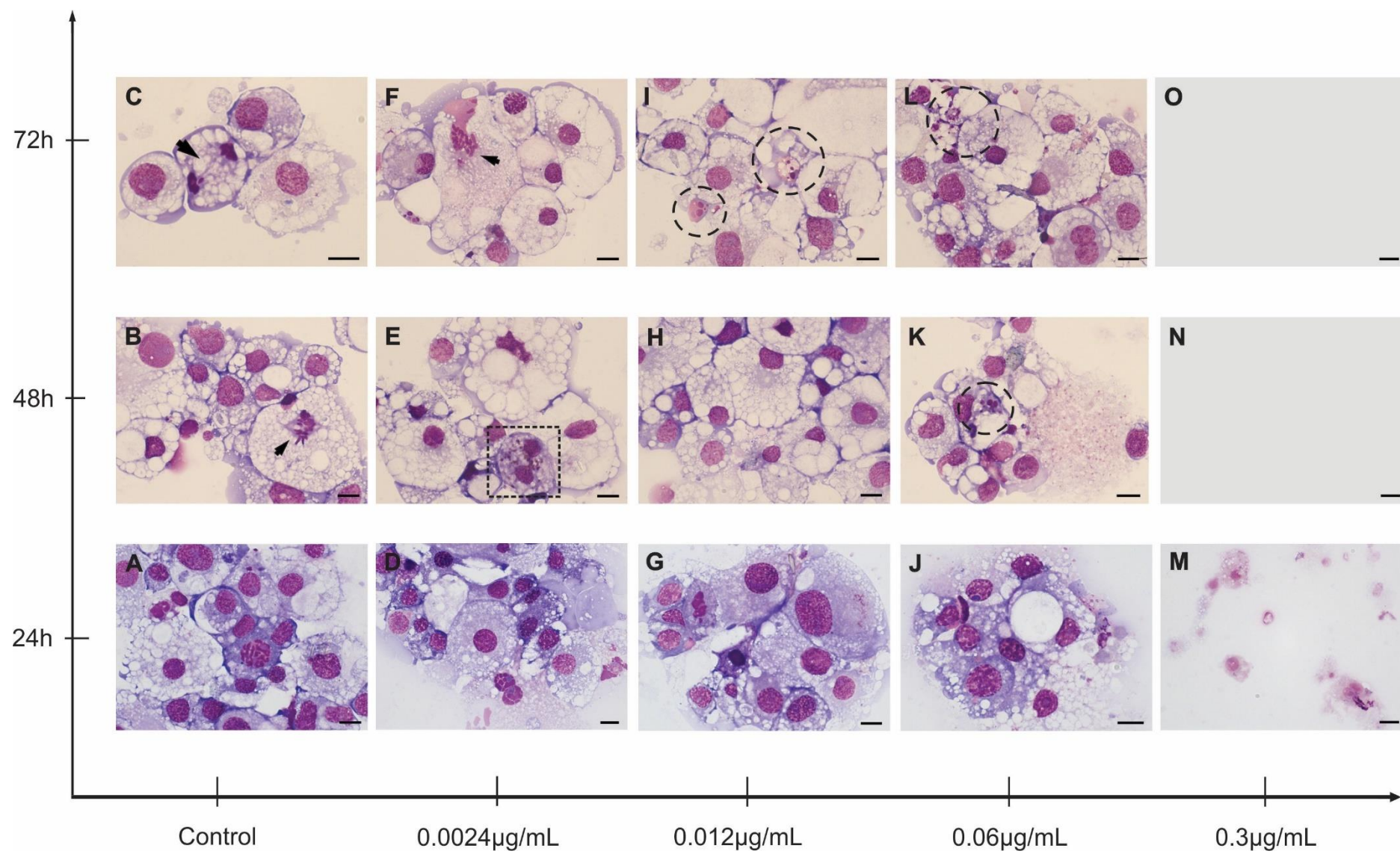
C, F, I, L e O= tempo de exposição 72 horas

N e O: correspondem a tempos e concentrações onde houve morte de todas as células.

Coloração: Giemsa

setas= divisão celular, quadrado pontilhado= hemócito, círculo pontilhado= células em apoptose

Barras de Escala: 10 um



		Vivas (%)			Necrose (%)			Apoptóticas (%)		
		24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h
T1	0,07mg/mL	72,05	50,25	89,55	2,25	0,5	1,2	25,7	49,25	9,25
T2	0,014mg/mL	62,15	68,35	89,1	5,95	1,7	0,75	31,9	29,95	10,15
T3	0,002mg/mL	64,05	56,35	88	6,4	2,15	0,65	29,5	41,5	11,35
T4	0,0005mg/mL	64,8	52	86,55	5,5	0,8	1,05	29,7	47,2	12,4
TC	Controle	68,55	58,75	90,05	2,85	2,25	1,2	28,6	39	8,75

Tabela 1: Porcentagens de células RML-15 vivas, mortas por necrose ou por apoptose após exposição a diferentes concentrações de timol. T1: Timol 0.07mg/mL; T2: Timol 0.014mg/mL; T3: Timol 0.002mg/mL; T4: Timol 0.0005mg/mL e TC: Timol Controle. Dados obtidos através do analisador de células marcadas com o kit Caspase-3/7 MUSE™.

		Vivas (%)			Necrose (%)			Apoptóticas (%)		
		24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h
C2	0,06uL/mL	73,7	72,05	89,15	2,9	0,9	1,55	23,4	27,05	9,3
C3	0,012uL/mL	69,7	44,3	87,6	5,95	0,9	0,8	24,35	54,8	11,6
C4	0,002uL/mL	68,35	60,55	86,25	6,95	1,65	1,05	24,7	37,8	12,7
C5	0,0004uL/mL	67,6	67,2	88,6	5,85	1,45	0,95	26,55	32,35	10,45
CC	Controle	63,85	59,2	83,9	5,3	1,15	0,65	30,85	39,65	15,45

Tabela 2: Porcentagens de células RML-15 vivas, mortas por necrose ou por apoptose após exposição a diferentes concentrações de carvacrol. C1: Carvacrol 0.3µL/mL (Ausente na tabela); C2: Carvacrol 0.06µL/mL; C3: Carvacrol 0.012µL/mL; C4: Carvacrol 0.0024µL/mL; C5 Carvacrol 0.0005 µL/mL; CC: Carvacrol Controle. Dados obtidos através do analisador de células marcadas com o kit Caspase-3/7 MUSE™.

DISCUSSÃO

O carrapato *Rhipicephalus sanguineus* s. l. também conhecido como carrapato marrom, tem como principal hospedeiro o cão embora também possa parasitar outros mamíferos, inclusive o homem (FLECHTMANN, 1973) e, por esse motivo é considerado parasita em ambientes domiciliares, além de em áreas rurais (PAZ; LABRUNA; LEITE, 2008).

Os acaricidas frequentemente encontrados no mercado de produtos veterinários desempenham um papel crucial no controle dos carrapatos e principalmente no controle dos patógenos por eles transmitidos (DAVEY et al., 1998).

A busca por novos compostos acaricidas tem se intensificado e, para testá-los em laboratório existe a necessidade de que se utilize animais vertebrados, no caso, aqueles que simulem os hospedeiros dos ectoparasitas, o que vem de encontro com as novas normas de uso

de animais tanto para pesquisa como para o ensino, baixadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) (BRASIL, 2016). Estes tem sido utilizados para testar a eficiência e segurança dos produtos (CAMARGO-MATHIAS, 2018) e por esse motivo, entende-se que haja uma necessidade urgente não só de se encontrar novos produtos acaricidas que substituam os até agora disponíveis, mas também de se encontrar estratégias que minimizem ou até excluam de vez o uso de animais na realização dos testes.

Nessa direção, a cultura de células *in vitro* tem despontado como uma estratégia bastante importante, pois possibilita que testes iniciais tanto de triagem, quanto de desenvolvimento e toxicidade de produtos, no caso acaricidas, substituam o uso dos animais experimentais (ERHIRHIE; IHEKWEREME; ILODIGWE, 2018; ERKEKOGLU; KOCER GIRAY; BAŞARAN, 2011). As linhagens de células obtidas de várias espécies de carrapatos tem sido uma estratégia em potencial nas pesquisas. Nas triagens preliminares *in vitro* o uso destas é menos oneroso e de mais fácil reprodutibilidade para a identificação destes compostos (BELL-SAKYI et al., 2007a; MANGIA et al., 2018a).

Diante disso o presente estudo buscou estabelecer um protocolo para o estudo *in vitro* dos produtos acaricidas timol e carvacrol, utilizando a linhagem de células de carrapatos RML-15, obtidas da espécie *R. sanguineus*, como alternativa aos testes tradicionais que utilizam carrapatos os quais precisam ser alimentados em animais vertebrados simulando seus hospedeiros.

Inicialmente, foi aqui realizado o teste de viabilidade celular fazendo uso do corante azul de Trypan, o qual penetraria nas células sem, no entanto, danificá-las. Ainda neste ensaio realizou-se a identificação daquelas concentrações (de ambos os acaricidas) que teriam potencial para provocar alterações na viabilidade celular.

Os resultados aqui obtidos mostraram que a exposição das células RML-15 a todas as concentrações do timol não interferiu na viabilidade destas quando comparou-se os resultados com aqueles do grupo controle, indicando que as concentrações aqui utilizadas não foram letais a essa linhagem. Estudos desenvolvidos por Mendes et al. (2011) mostraram que em larvas de carrapatos da espécie *Amblyomma cajenense* a concentração de 10 mg/mL de timol causaria a mortalidade de 90% das larvas em jejum, lembrando ainda que embora as larvas dos carrapatos tenham maior sensibilidade aos acaricidas do que os indivíduos adultos, sabe-se que cada espécie tem um nível de resposta de resistência diferente (GOMES et al., 2014; SCORALIK et al., 2017) e ainda que para os indivíduos adultos há a necessidade de utilizar concentrações maiores do acaricida.

As exposições das células ao acaricida carvacrol na maior concentração (0,3µL/mL) provocou alteração da viabilidade das mesmas, uma vez que 77% das células morreram, isto é, diferentemente do observado no grupo controle onde a porcentagem de células mortas foi de 35%, ambos os resultados tendo sido obtidos no tempo de 24 horas de exposição. Em 48 horas essa mesma concentração matou 100% das células, enquanto o controle matou cerca de 18%, sinalizando a letalidade desta concentração. Aquelas mais baixas não provocaram alterações na quantidade de células mortas. Diferentemente dos dados aqui obtidos, em estudo desenvolvido por Lima de Souza et al., (2019) utilizando o carvacrol na concentração de 100µL/mL, foram obtidos resultados que mostraram que mesmo em alta concentração o carvacrol não foi suficiente para matar fêmeas adultas ingurgitadas de carrapatos *R. sanguineus*, no entanto, a substância nesta concentração agiu no ectoparasita provocando danos no seu sistema reprodutor, representados por alterações morfológicas nos ovócitos e inibição da vitelogênese, visto que essas células só conseguiram chegar até o estágio II de desenvolvimento o que certamente inviabilizou a geração de novos indivíduos. Outra informação que é relevante e que deve ser considerada é a de que fêmeas ingurgitadas apresentam maior resistência aos acaricidas do que aquelas em jejum (CAPERUCCI; CAMARGO-MATHIAS; BECHARA, 2009), além do fato de que as concentrações consideradas letais são diferentes para cada fase de vida das diferentes espécies de carrapatos (GOMES et al., 2014).

No presente trabalho realizou-se também a avaliação de possíveis alterações na morfologia das células RML-15, após exposição aos acaricidas timol e ao carvacrol.

As células do grupo controle apresentaram morfologia preservada e em divisão. Quando procedeu-se a sua exposição ao timol na menor concentração (0,0005 mg/mL), foram observadas alterações apenas depois de decorridas 48 horas e estas foram do tipo: vacuolização citoplasmática e picnose nuclear. No tempo de 72 horas essas alterações na morfologia foram menos intensas, inclusive tendo sido observadas algumas células em divisão, mostrando que o uso dessa concentração não deve ultrapassar a 72 horas, quando depois disso o produto não será eficiente.

A exposição a concentração de 0,0025 mg/mL de timol provocou alterações semelhantes aquelas observadas no grupo exposto a 0,0005 mg/mL. Notou-se que a medida que a concentração e o tempo de exposição foram aumentando, as alterações morfológicas ficaram mais frequentes e mais intensas, uma vez que na concentração de 0,014 mg/mL houve um aumento da frequência de células apoptóticas após 72 horas de exposição, e na exposição a

concentração de 0,07mg/mL (a maior aqui testada), a morte celular teve início logo nas primeiras 24 horas de exposição, tendo aumentado após 72 horas. Esses dados indicaram que o timol teve um efeito citotóxico sobre essas células, levando as mesmas a morte por apoptose e que, provavelmente, isso tenha sido dependente da dose e do tempo de exposição. Resultados semelhantes sobre a ocorrência de morte celular por exposição de carrapatos *R. sanguineus* ao timol foram observados por Matos et al., (2018), que observaram características que sugeriram estar ocorrendo necrose e/ou apoptose as células das glândulas salivares e do singânglio dos ectoparasitas.

A exposição das células ao carvacrol na concentração de 0,0024µL/mL não provocou o surgimento de alterações morfológicas. Estas sim começaram a ser observadas após 72 horas na concentração de 0,012µL/mL, visto serem observados núcleos picnóticos e fragmentados. À medida que a concentração do produto aumentou, as alterações foram mais precocemente observadas, como por exemplo na exposição a 0,06 µL/mL as alterações foram vistas após 48 horas, embora as mesmas tivessem se mantido até decorridas 72 horas de exposição. Quando expôs-se as células a maior concentração (0,3 µL/mL) de carvacrol verificou-se 100% de morte já nas primeiras 24 horas, quando restaram apenas fragmentos celulares, demonstrando que nesta concentração o carvacrol foi citotóxico.

Outros trabalhos desenvolvidos por outros autores registraram também resultados semelhantes com respeito a ocorrência de morte celular, como naquele de Lima de Souza et al., (2019) onde houve inibição do desenvolvimento dos ovócitos de fêmeas ingurgitadas de *R. sanguineus* quando foram expostos ao carvacrol a 100µL/mL, células estas que não conseguiram passar do estágio II de maturação em função da presença do composto tóxico que provocou aumento de morte das células por apoptose.

Ainda a fim de se detectar o tipo de morte celular envolvida na exposição das células RML-15 aos compostos acaricidas timol e carvacrol, aplicou-se a técnica da caspase-3/7, uma protease que, em resposta a sinais pró-apoptóticos, propaga a morte celular programada (apoptose). O sinal apoptótico, ativa as caspases 3 e 7 e uma cascata proteolítica leva a morte celular programada (JULIEN; WELLS, 2017; MORRIS et al., 2018). O Kit MuseTM caspase-3/7 além de marcar as caspases, tem um marcador de morte celular por ruptura da membrana nuclear, o 7-AAD o qual se liga ao DNA deixando fluorescente as células que estão com a permeabilidade comprometida (LECOEUR; DE OLIVEIRA-PINTO; GOUGEON, 2002)

A técnica da caspase nas células expostas a todas as concentrações do timol, não marcou nem a caspase-3/7 nem o 7-AAD, sugerindo que, assim como observado nos resultados anteriores, o timol não seria potencialmente citotóxico para as células.

Na exposição ao carvacrol na concentração de 0,012uL/mL após 48 horas, houve um aumento das células marcadas apenas pela caspase-3/7, indicando que a morte celular envolvida, nessas condições, seria a apoptose. Nas demais exposições as concentrações de carvacrol, tanto a maior (0,06 uL/mL) quanto as menores (0,002 e 0,0004uL/mL) não foram observadas alterações nas marcações das células não tendo sido possível se identificar o mecanismo de morte envolvido. Pesquisas anteriormente realizadas registraram que o carvacrol além de ser um potencial acaricida teria também efeitos anticâncer, anti-inflamatório, hepatoprotetor e vasorelaxante e que o mesmo causaria apoptose nas células tumorais (FACHINI-QUEIROZ et al., 2012; SHARIFI-RAD et al., 2018; SUNTRES; COCCIMIGLIO; ALIPOUR, 2015; YIN et al., 2012). No presente trabalho os dados sugeriram que o efeito acaricida deste produto deve também ter influenciado na morte das células por apoptose corroborando pesquisas já realizadas anteriormente que indicaram alterações morfológicas com ocorrência de morte de células em diversos outros órgãos dos carrapatos (CAMARGO-MATHIAS, 2018).

Desta forma, os resultados aqui apresentados demonstraram claramente que o uso dos acaricidas timol e carvacrol poderia ser uma estratégia promissora para o controle de carrapatos, com vantagens adicionais sobre os acaricidas químicos tradicionais, visto que o timol agiu alterando a morfologia das células RML-15, e o carvacrol agiu induzindo a morte celular por apoptose. Ficou ainda, aqui demonstrado que esse tipo de estudo *in vitro* teria condições de substituir aqueles que fazem uso de animais *in vivo* para o desenvolvimento de novos acaricidas, sejam eles vertebrados para simular os hospedeiros e/ou invertebrados como os próprios carrapatos inteiros.

Referências:

- ABREU, M. R. DE; ROCHA, F. A.; FURQUIM, K. C. S.; ANHOLETO, L. A.; NOVAES, F. C. F.; MORSOLETO, M. J.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Salivary Glands of Female Ticks *Rhipicephalus sanguineus* Like a Potential Source of Molecules with Inhibitory Action: In vivo study with Walker 256 Tumor Cells. **Journal of Pharmaceutical Care & Health Systems**, v. 01, n. 04, p. 1–8, 2014.
- ABREU, R. M. M.; DE ABREU, M. R.; SANTOS, J. P.; HEBLING, L. M. G. F.; ANHOLETO, L. A.; DE SOUZA, J. R. L.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Morphological evaluation of the liver in Wistar rats inoculated with *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari:

Ixodidae) salivary gland extracts. **Microscopy Research and Technique**, v. 81, n. 11, p. 1332–1338, 2018.

AKAGI, E. M.; JÚNIOR, P. L. DE S.; SIMONS, S. M.; BELLINI, M. H.; BARRETO, S. A.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M. Pro-apoptotic effects of Amblyomin-X in murine renal cell carcinoma “in vitro”. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 66, p. 64–69, 2012.

ALVES, P. R. L.; BANDEIRA, F. O.; GIRALDI, M.; PRESOTTO, R.; SEGAT, J. C.; CARDOSO, E. J. B. N.; BARETTA, D. Ecotoxicological assessment of Fluazuron: effects on *Folsomia candida* and *Eisenia andrei*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 6, p. 5842–5850, 6 fev. 2019.

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*, 2007.

BINNINGTON, K. C. Sequential changes in salivary gland structure during attachment and feeding of the cattle tick, *Boophilus microplus*. **International Journal for Parasitology**, v. 8, n. 2, p. 97–115, 1978.

BLACK IV, W. C.; PIESMANT, J. Phylogeny of hard-and soft-tick taxa (Acari: Ixodida) based on mitochondrial 16S rDNA sequences. **Evolution**, v. 91, p. 10034–10038, 1994.

BOWMAN, A. S.; DILLWITH, J. W.; SAUER, J. R. Tick salivary prostaglandins: Presence, origin and significance. **Parasitology Today**, v. 12, n. 10, p. 388–396, 1996.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.

BRASIL. **Resolução Normativa N 33, de 18 de novembro de 2016** Brasília, DF CONCEA Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicação., , 2016. Disponível em: <http://www.mctic.gov.br/mctic/export/sites/institucional/institucional/concea/arquivos/legislacao/resolucoes_normativas/Resolucao-Normativa-CONCEA-n-33-de-18.11.2016-D.O.U.-de-21.11.2016-Secao-I-Pag.-05.pdf>. Acesso em: 20 maio. 2019

CACCIATORE, I.; DI GIULIO, M.; FORNASARI, E.; DI STEFANO, A.; CERASA, L. S.; MARINELLI, L.; TURKEZ, H.; DI CAMPLI, E.; DI BARTOLOMEO, S.; ROBUFFO, I.; CELLINI, L. Carvacrol codrugs: A new approach in the antimicrobial plan. **PLoS ONE**, v. 10, n. 4, p. 1–20, 2015.

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

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

CAPERUCCI, D.; CAMARGO-MATHIAS, M. I.; BECHARA, G. H. Histopathology and Ultrastructure Features of the Midgut of Adult Females of the Tick *Amblyomma cajennense* Fabricius, 1787 (Acari: Ixodidae) in Various Feeding Stages and Submitted to Three Infestations. **Ultrastructural Pathology**, v. 33, n. 6, p. 249–259, 20 jan. 2009.

CARRASCO-TORRES, G.; MONROY-RAMÍREZ, H. C.; MARTÍNEZ-GUERRA, A. A.; BALTIÉRREZ-HOYOS, R.; ROMERO-TLALOLINI, M. DE LOS Á.; VILLA-TREVIÑO, S.; SÁNCHEZ-CHINO, X.; VÁSQUEZ-GARZÓN, V. R. Quercetin Reverses Rat Liver Preneoplastic Lesions Induced by Chemical Carcinogenesis. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, p. 1–8, 27 jun. 2017.

- 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, out. 2014.
- CHAGAS, A. C. DE S.; GEORGETTI, C. S.; CARVALHO, C. O. DE; OLIVEIRA, M. C. DE S.; RODRIGUES, R. A.; FOGLIO, M. A.; MAGALHÃES, P. M. DE. 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, mar. 2011.
- CHE, L.; CHI, W.; QIAO, Y.; ZHANG, J.; SONG, X.; LIU, Y.; LI, L.; JIA, J.; PILO, M. G.; WANG, J.; CIGLIANO, A.; MA, Z.; KUANG, W.; TANG, Z.; ZHANG, Z.; SHUI, G.; RIBBACK, S.; DOMBROWSKI, F.; EVERT, M.; PASCALE, R. M.; COSSU, C.; PES, G. M.; OSBORNE, T. F.; CALVISI, D. F.; CHEN, X.; CHEN, L. Cholesterol biosynthesis supports the growth of hepatocarcinoma lesions depleted of fatty acid synthase in mice and humans. **Gut**, p. gutjnl-2018-317581, 6 abr. 2019.
- CHOI, M.-J.; ZHENG, H.-M.; KIM, J. M.; LEE, K. W.; PARK, Y. H.; LEE, D. H. Protective effects of *Centella asiatica* leaf extract on dimethylnitrosamine-induced liver injury in rats. **Molecular Medicine Reports**, v. 14, n. 5, p. 4521–4528, 1 nov. 2016.
- CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M.; DE-SÁ-JÚNIOR, P. L.; SIMONS, S. M.; MARIA, D. A.; DE SOUZA VENTURA, J.; DE FÁTIMA CORREIA BATISTA, I.; FARIA, F.; DURÃES, E.; REIS, E. M.; DEMASI, M. A new tick Kunitz type inhibitor, Amblyomin-X, induces tumor cell death by modulating genes related to the cell cycle and targeting the ubiquitin-proteasome system. **Toxicon**, v. 56, p. 1145–1154, 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, mar. 2002.
- CUNHA, N. C.; FONSECA, A. H.; REZENDE, J.; ROZENTAL, T.; FAVACHO, A. R. M.; BARREIRA, J. D.; MASSARD, C. L.; LEMOS, E. R. S. First identification of natural infection of *Rickettsia rickettsii* in the *Rhipicephalus sanguineus* tick, in the State of Rio de Janeiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 2, p. 105–108, fev. 2009.
- DANTAS-TORRES, F. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): From taxonomy to control. **Veterinary Parasitology**, v. 152, n. 3, p. 173–185, 2008.
- DANTAS-TORRES, F. Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. **Parasites & vectors**, v. 3, n. 26, p. 1–11, 2010.
- DANTAS-TORRES, F.; FIGUEREDO, L. A.; BRANDÃO-FILHO, S. P. *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae), the brown dog tick, parasitizing humans in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 1, p. 64–67, fev. 2006.
- DAVEY, R. B.; AHRENS, E. H.; GEORGE, J. E.; HUNTER, J. S.; JEANNIN, P. Therapeutic and persistent efficacy of fipronil against *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) on cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 74, n. 2, p. 261–276, 1998.
- DE MINICIS, S.; KISSELEVA, T.; FRANCIS, H.; BARONI, G. S.; BENEDETTI, A.; BRENNER, D.; ALVARO, D.; ALPINI, G.; MARZIONI, M. Liver carcinogenesis: Rodent models of hepatocarcinoma and cholangiocarcinoma. **Digestive and Liver Disease**, v. 45, n. 6, p. 450–459, 2013.
- DE OLIVEIRA-CRUZ, E. M.; COSTA-JUNIOR, L. M.; PINTO, J. A. O.; SANTOS, D. DE

- A.; ARAÚJO, S. A.; FÁTIMA, A.-B. M. DE; BACCI, L.; ALVES, P. B.; CAVALCANTI, S. C. DE H.; BLANK, A. F. Acaricidal activity of *Lippia gracilis* essential oil and its major constituents on the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 195, n. 1–2, p. 198–202, 2013.
- DENARDI, S. E.; BECHARA, G. H.; OLIVEIRA, P. R. DE; 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, dez. 2010.
- DÍAZ-GONZÁLEZ, Á.; FORNER, A.; RODRÍGUEZ-DE-LOPE, C.; VARELA, M. New challenges in clinical research on hepatocellular carcinoma. **Rev esp enferm dig**, v. 108, p. 485–493, 2016.
- DREWES, C. C.; DIAS, R. Y. S.; HEBEDA, C. B.; SIMONS, S. M.; BARRETO, S. A.; FERREIRA, J. M.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M.; FARSKY, S. H. P. Actions of the Kunitz-type serine protease inhibitor Amblyomin-X on VEGF-A-induced angiogenesis. **Toxicon**, 2012.
- ERHIRHIE, E. O.; IHEKWEREME, C. P.; ILODIGWE, E. E. Advances in acute toxicity testing: strengths, weaknesses and regulatory acceptance. **Interdisciplinary toxicology**, v. 11, n. 1, p. 5–12, maio 2018.
- ERKEKOGLU, P.; KOCER GIRAY, B.; BAŞARAN, N. **3R Principle and Alternative Toxicity Testing MethodsJ. Pharm. Sci.** [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://dergi.fabad.org.tr/pdf/volum36/issue2/101-117.pdf>>. Acesso em: 20 maio. 2019.
- FACHINI-QUEIROZ, F. C.; KUMMER, R.; ESTEVÃO-SILVA, C. F.; CARVALHO, M. D. DE B.; CUNHA, J. M.; GRESPAN, R.; BERSANI-AMADO, C. A.; CUMAN, R. K. N. Effects of Thymol and Carvacrol, Constituents of *Thymus vulgaris* L. Essential Oil, on the Inflammatory Response. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, p. 1–10, 5 jul. 2012.
- FARBER, E.; SARMA, D. S. Hepatocarcinogenesis: a dynamic cellular perspective. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, v. 56, n. 1, p. 4–22, jan. 1987.
- FLECHTMANN, C. H. W. **Ácaros de Importância Médico-Veterinária**. São Paulo: Ed. Livraria Nobel S.A., 1973.
- FURTADO, K. S.; PIRES, P. W.; JUSTULIN, L. A.; RODRIGUES, M. A. M.; FELISBINO, S. L.; BARBISAN, L. F. Metalloproteinases 2 and -9 activity during promotion and progression stages of rat liver carcinogenesis. **Journal of Molecular Histology**, 2009.
- GOMES, G. A.; MONTEIRO, C. M. O.; JULIÃO, L. DE S.; MATURANO, R.; SENRA, T. O. S.; ZERINGÓTA, V.; CALMON, F.; MATOS, R. DA S.; DAEMON, E.; CARVALHO, M. G. DE. Acaricidal activity of essential oil from *Lippia sidoides* on unengorged larvae and nymphs of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) and *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). **Experimental Parasitology**, v. 137, p. 41–45, 1 fev. 2014.
- GRAY, J.; DANTAS-TORRES, F.; ESTRADA-PEÑA, A.; LEVIN, M. **Systematics and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* ticks and tick-borne diseases**, 2013.
- GROOS, J.; BANNASCH, P.; SCHWARZ, M.; KOPP-SCHNEIDER, A. Comparison of mode of action of four hepatocarcinogens: A model-based approach. **Toxicological Sciences**, v. 99, n. 2, p. 446–454, 2007.

- GUZZIE, P. J. Lethality testing. In: SHAYNE, C. G. (Ed.). **In vitro toxicology**. New York: Raven, 1994. p. 57–87.
- HASCHEK, W. M.; ROUSSEAUX, C. G.; WALLIG, M. A. **Fundamentals of toxicologic pathology**. 2nd. ed. Boston: Elsevier Inc., 2010.
- HAYES, A. W. (ANDREW W. **Principles and methods of toxicology**. 5th ed ed. New York: CRC Press/Taylor & Francis Group, 2008.
- HOVIUS, J. W. R.; LEVI, M.; FIKRIG, E. Salivating for Knowledge: Potential Pharmacological Agents in Tick Saliva. **Plos Medicine**, v. 5, n. 2, p. 202–208, 2008.
- HUANG, K.-W.; HUANG, Y.-C.; TAI, K.-F.; CHEN, B.-H.; LEE, P.-H.; HWANG, L.-H. Dual Therapeutic Effects of Interferon- α Gene Therapy in a Rat Hepatocellular Carcinoma Model With Liver Cirrhosis. **Molecular Therapy**, v. 16, n. 10, p. 1681–1687, out. 2008.
- IKEDA, M.; MORIZANE, C.; UENO, M.; OKUSAKA, T.; ISHII, H.; FURUSE, J. Chemotherapy for hepatocellular carcinoma: current status and future perspectives. **Japanese Journal of Clinical Oncology**, v. 48, n. 2, p. 103–114, 1 fev. 2018.
- ITO, T.; SHIRAKI, K.; SUGIMOTO, K.; YAMANAKA, T.; FUJIKAWA, K.; ITO, M.; TAKASE, K.; MORIYAMA, M.; KAWANO, H.; HAYASHIDA, M.; NAKANO, T.; SUZUKI, A. Survivin promotes cell proliferation in human hepatocellular carcinoma. **Hepatology**, v. 31, n. 5, p. 1080–1085, maio 2000.
- JULIEN, O.; WELLS, J. A. Caspases and their substrates. **Cell Death & Differentiation**, v. 24, n. 8, p. 1380–1389, 12 ago. 2017.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 13^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.
- KARAMI, A.; ROMANO, N.; HAMZAH, H.; SIMPSON, S. L.; YAP, C. K. Acute phenanthrene toxicity to juvenile diploid and triploid African catfish (*Clarias gariepinus*): Molecular, biochemical, and histopathological alterations. **Environmental Pollution**, v. 212, p. 155–165, 1 maio 2016.
- KAUFMAN, W. R. Organ culture of ixodid-tick salivary glands. **Experimental and Applied Acarology**, 1990.
- 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, 31 mar. 2013.
- LAGE, T. C. D. A.; MONTANARI, R. M.; FERNANDES, S. A.; DE OLIVEIRA MONTEIRO, C. M.; DE OLIVEIRA SOUZA SENRA, T.; ZERINGOTA, V.; CALMON, F.; DA SILVA MATOS, R.; DAEMON, E. Activity of essential oil of *Lippia triplinervis* Gardner (Verbenaceae) on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v. 112, n. 2, p. 863–9, fev. 2013.
- LECOEUR, H.; DE OLIVEIRA-PINTO, L. M.; GOUGEON, M.-L. Multiparametric flow cytometric analysis of biochemical and functional events associated with apoptosis and oncosis using the 7-aminoactinomycin D assay. **Journal of immunological methods**, v. 265, n. 1–2, p. 81–96, 1 jul. 2002.
- LIAO, W.; WANG, Y.; LIAO, Y.; HE, S.; JIN, J. Preoperative Aspartate Aminotransferase to White Blood Cell Count Ratio Predicting Postoperative Outcomes of Hepatocellular Carcinoma. **Medicine**, v. 95, n. 14, p. e3345, abr. 2016.

- LIMA DE SOUZA, J. R.; OLIVEIRA, P. R.; ANHOLETO, L. A.; ARNOSTI, A.; DAEMON, E.; REMEDIO, R. N.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Effects of carvacrol on oocyte development in semi-engorged *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato females ticks (Acari: Ixodidae). **Micron**, v. 116, n. June 2018, p. 66–72, 2019.
- LINDSTROM, N. M.; MOORE, D. M.; ZIMMERMAN, K.; SMITH, S. A. **Hematologic Assessment in Pet Rabbits** *Clinics in Laboratory Medicine*, 2015.
- LOPEZ, P. M.; VILLANUEVA, A.; LLOVET, J. M. Systematic review: evidence-based management of hepatocellular carcinoma – an updated analysis of randomized controlled trials. **Aliment Pharmacol Ther Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 23, p. 1535–1547, 2006.
- 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, 31 dez. 2018.
- MARTINEZ, G. R.; LOUREIRO, A. P. M.; MARQUES, S. A.; MIYAMOTO, S.; YAMAGUCHI, L. F.; ONUKI, J.; ALMEIDA, E. A.; GARCIA, C. C. M.; BARBOSA, L. F.; MEDEIROS, M. H. G.; DI MASCIO, P. Oxidative and alkylating damage in DNA. **Mutation research**, v. 544, n. 2–3, p. 115–27, nov. 2003.
- MATOS, R. 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, dez. 2014.
- MATOS, R. S.; DAEMON, E.; DE OLIVEIRA MONTEIRO, C. M.; SAMPIERI, B. R.; MARCHESINI, P. B. C.; DELMONTE, C.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Thymol action on cells and tissues of the synganglia and salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato females (Acari: Ixodidae). **Ticks and Tick-borne Diseases**, 2018.
- MAUER, K.; O’KELLEY, R.; PODDA, N.; FLANAGAN, S.; GADANI, S. New Treatment Modalities for Hepatocellular Cancer. **Current Gastroenterology Reports**, v. 17, n. 5, p. 19, 14 maio 2015.
- MAUND, S. J.; CAMPBELL, P. J.; GIDDINGS, J. M.; HAMER, M. J.; HENRY, K.; PILLING, E. D.; WARINTON, J. S.; WHEELER, J. R. Ecotoxicology of Synthetic Pyrethroids. In: [s.l.] Springer, Berlin, Heidelberg, 2011. p. 137–165.
- MAZZANTINI, R. PIETRO; DE CONTI, A.; MORENO, F. S. Persistent and remodeling hepatic preneoplastic lesions present differences in cell proliferation and apoptosis, as well as in p53, Bcl-2 and NF-κB pathways. **Journal of Cellular Biochemistry**, 2008.
- MCMANUS, J. F. A. **Histological demonstration of mucin after Periodic Acid** *Nature*, 1946.
- MENDES, A. DA S.; DAEMON, E.; DE OLIVEIRA MONTEIRO, C. M.; MATURANO, R.; BRITO, F. C.; MASSONI, T. Acaricidal activity of thymol on larvae and nymphs of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 183, n. 1–2, p. 136–139, 29 dez. 2011.
- MOERBECK, L.; VIZZONI, V. F.; MACHADO-FERREIRA, E.; CAVALCANTE, R. C.; OLIVEIRA, S. V.; SOARES, C. A. G.; AMORIM, M.; GAZÊTA, G. S. *Rickettsia* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) Vector Biodiversity in High Altitude Atlantic Forest Fragments Within a Semiarid Climate: A New Endemic Area of Spotted-Fever in Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 53, n. 6, p. 1458–1466, 1 nov. 2016.

- MORENO, F. S.; RIZZI, M. B. S. L.; DAGLI, M. L. Z.; PENTEADO, M. V. C. Inhibitory effects of β -carotene on preneoplastic lesions induced in Wistar rats by the resistant hepatocyte model. **Carcinogenesis**, v. 12, n. 10, p. 1817–1822, 1 out. 1991.
- MORRIS, G.; WALKER, A. J.; BERK, M.; MAES, M.; PURI, B. K. Cell Death Pathways: a Novel Therapeutic Approach for Neuroscientists. **Molecular Neurobiology**, v. 55, n. 7, p. 5767–5786, 19 jul. 2018.
- MULENGA, A.; BLANDON, M.; KHUMTHONG, R. The molecular basis of the *Amblyomma americanum* tick attachment phase. **Experimental and Applied Acarology**, v. 41, n. 4, p. 267–287, 2 maio 2007.
- MURPHY, S. D. Some Concepts in Toxicology. v. 32, n. October, p. 261–266, 1979.
- 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, jul. 2008.
- OLIVEIRA, C. J. F.; SÁ-NUNES, A.; FRANCISCHETTI, I. M. B.; CARREGARO, V.; ANATRIELLO, E.; SILVA, J. S.; SANTOS, I. K. F. M.; RIBEIRO, J. M. C.; FERREIRA, B. R. Deconstructing tick saliva: Non-protein molecules with potent immunomodulatory properties. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, p. 10960–10969, 2011.
- OLIVEIRA, P. R.; REMÉDIO, R. N.; BECHARA, G. H.; ANHOLETO, L. A.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. 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. 829–49, 28 fev. 2016.
- PAZ, G. F.; LABRUNA, M. B.; LEITE, R. C. Ritmo de queda de *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) de cães artificialmente infestados. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, n. 3, p. 139–144, 2008.
- PESAPANE, F.; NEZAMI, N.; PATELLA, F.; GESCHWIND, J. F. New concepts in embolotherapy of HCC. **Medical Oncology**, v. 34, n. 4, p. 58, 16 abr. 2017.
- PITOT, H. C. Animal models of neoplastic development. **Developments in biologicals**, v. 106, p. 53–7; discussion 57-9, 143–60, 2001.
- PRUETT, J. H. Immunological control of arthropod ectoparasites - A review. **International Journal for Parasitology**, v. 29, n. 1, p. 25–32, 1999.
- REMÉDIO, R. N.; NUNES, P. H.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. The extensible integument of *Rhipicephalus sanguineus* female ticks in different feeding stages: a morphological approach. **Acta Zoologica**, v. 96, n. 3, p. 319–327, jul. 2015.
- ROMA, G. C.; DE 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, nov. 2009.
- SAUER, J. R.; ESSENBERG, R. C.; BOWMAN, A. S. **Salivary glands in ixodid ticks: Control and mechanism of secretion** *Journal of Insect Physiology*, 2000.
- SCHRAUF, S.; MANDL, C. W.; BELL-SAKYI, L.; SKERN, T. Extension of Flavivirus Protein C Differentially Affects Early RNA Synthesis and Growth in Mammalian and Arthropod Host Cells. **Journal of Virology**, v. 83, n. 21, p. 11201–11210, 2009.
- SCOLASTICI, C.; DE CONTI, A.; TESTONI CARDOZO, M.; PRATES ONG, T.;

- PURGATTO, E.; ADERUZA HORST, M.; HEIDOR, R.; SILVA FURTADO, K.; KEMPFER BASSOLI, B.; SALVADOR MORENO, F. β -Ionone Inhibits Persistent Preneoplastic Lesions During the Early Promotion Phase of Rat Hepatocarcinogenesis: TGF- α , NF- κ B, and p53 as Cellular Targets. **Nutrition and Cancer**, v. 66, n. 2, p. 234–241, 2014.
- SCORALIK, M. G.; DAEMON, E.; MONTEIRO, C. M. DE O.; MATURANO, R. Enhancing the acaricide effect of thymol on larvae of the cattle tick *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) by solubilization in ethanol. **Parasitology Research**, v. 110, n. 2, p. 645–648, 2017.
- SEMPLE-ROBERTS, E.; HAYES, M. A.; ARMSTRONG, D.; BECKER, R. A.; RACZ, W. J.; FARBER, E. Alternative methods of selecting rat hepatocellular nodules resistant to 2-acetylaminofluorene. **International journal of cancer**, v. 40, n. 5, p. 643–5, 15 nov. 1987.
- SHARIFI-RAD, M.; VARONI, E. M.; IRITI, M.; MARTORELL, M.; SETZER, W. N.; DEL MAR CONTRERAS, M.; SALEHI, B.; SOLTANI-NEJAD, A.; RAJABI, S.; TAJBAKHSH, M.; SHARIFI-RAD, J. Carvacrol and human health: A comprehensive review. **Phytotherapy Research**, v. 32, n. 9, p. 1675–1687, 1 set. 2018.
- SILVA, A. B.; DUARTE, M. M.; DA COSTA CAVALCANTE, R.; DE OLIVEIRA, S. V.; VIZZONI, V. F.; DE LIMA DURÉ, A. Í.; DE MELO IANI, F. C.; MACHADO-FERREIRA, E.; GAZÊTA, G. S. Rickettsia rickettsii infecting *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Latreille 1806), in high altitude atlantic forest fragments, Ceara State, Brazil. **Acta Tropica**, v. 173, p. 30–33, 1 set. 2017.
- SIMONS, S. M.; JÚNIOR, P. L. DE S.; FARIA, F.; BATISTA, I. DE F. C.; BARROS-BATTESTI, D. M.; LABRUNA, M. B.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M. The action of Amblyomma cajennense tick saliva in compounds of the hemostatic system and cytotoxicity in tumor cell lines. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 65, n. 6, p. 443–450, 2011.
- SOLT, D.; FARBER, E. New principle for the analysis of chemical carcinogenesis. **Nature**, v. 263, p. 701–703, 1976.
- SONESHINE, D. E.; ROE, M. R. **Biology of Ticks Vol. 1**. 2nd. ed. New York: Oxford University Press, 2014.
- SOUZA, A. C. P.; SZABÓ, M. P. J.; OLIVEIRA, C. J. F.; SILVA, M. J. B. Exploring the anti-tumoral effects of tick saliva and derived components. **Toxicon**, v. 102, p. 69–73, 2015.
- SUNTRES, Z. E.; COCCIMIGLIO, J.; ALIPOUR, M. The Bioactivity and Toxicological Actions of Carvacrol. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 55, n. 3, p. 304–318, 23 fev. 2015.
- TANNAPFEL, A.; WITTEKIND, C. Genes involved in hepatocellular carcinoma: deregulation in cell cycling and apoptosis. **Virchows Archiv**, v. 440, n. 4, p. 345–352, 6 abr. 2002.
- TSUCHIYA, N.; SAWADA, Y.; ENDO, I.; SAITO, K.; UEMURA, Y.; NAKATSURA, T. Biomarkers for the early diagnosis of hepatocellular carcinoma. **World Journal of Gastroenterology**, v. 21, n. 37, p. 10573, 7 out. 2015.
- VENDRAMINI, M. C. R.; CAMARGO-MATHIAS, M. I.; DE FARIA, A. U.; FURQUIM, K. C. S.; DE SOUZA, L. P.; BECHARA, G. H.; ROMA, G. C. Action of andiroba oil (*Carapa guianensis*) on *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) semi-engorged females: morphophysiological evaluation of reproductive system. **Microscopy Research and Technique**, v. 75, n. 12, p. 1745–54, dez. 2012.
- WALKER, A. R.; FLETCHER, J. D.; GILL, H. S. Structural and histochemical changes in the salivary glands of *Rhipicephalus appendiculatus* during feeding. **International journal for parasitology**, v. 15, n. 1, p. 81–100, fev. 1985.

WILLIAMS, G. M.; IATROPOULOS, M. J.; WANG, C. X.; JEFFREY, A. M.; THOMPSON, S.; PITTMAN, B.; PALASCH, M.; GEBHARDT, R. Nonlinearities in 2-Acetylaminofluorene Exposure Responses for Genotoxic and Epigenetic Effects Leading to Initiation of Carcinogenesis in Rat Liver. **Toxicological Sciences**, v. 45, n. 2, p. 152–161, out. 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guide to early cancer diagnosis**. [2018].

YIN, Q.-H.; YAN, F.-X.; ZU, X.-Y.; WU, Y.-H.; WU, X.-P.; LIAO, M.-C.; DENG, S.-W.; YIN, L.-L.; ZHUANG, Y.-Z. Anti-proliferative and pro-apoptotic effect of carvacrol on human hepatocellular carcinoma cell line HepG-2. **Cytotechnology**, v. 64, n. 1, p. 43–51, jan. 2012.

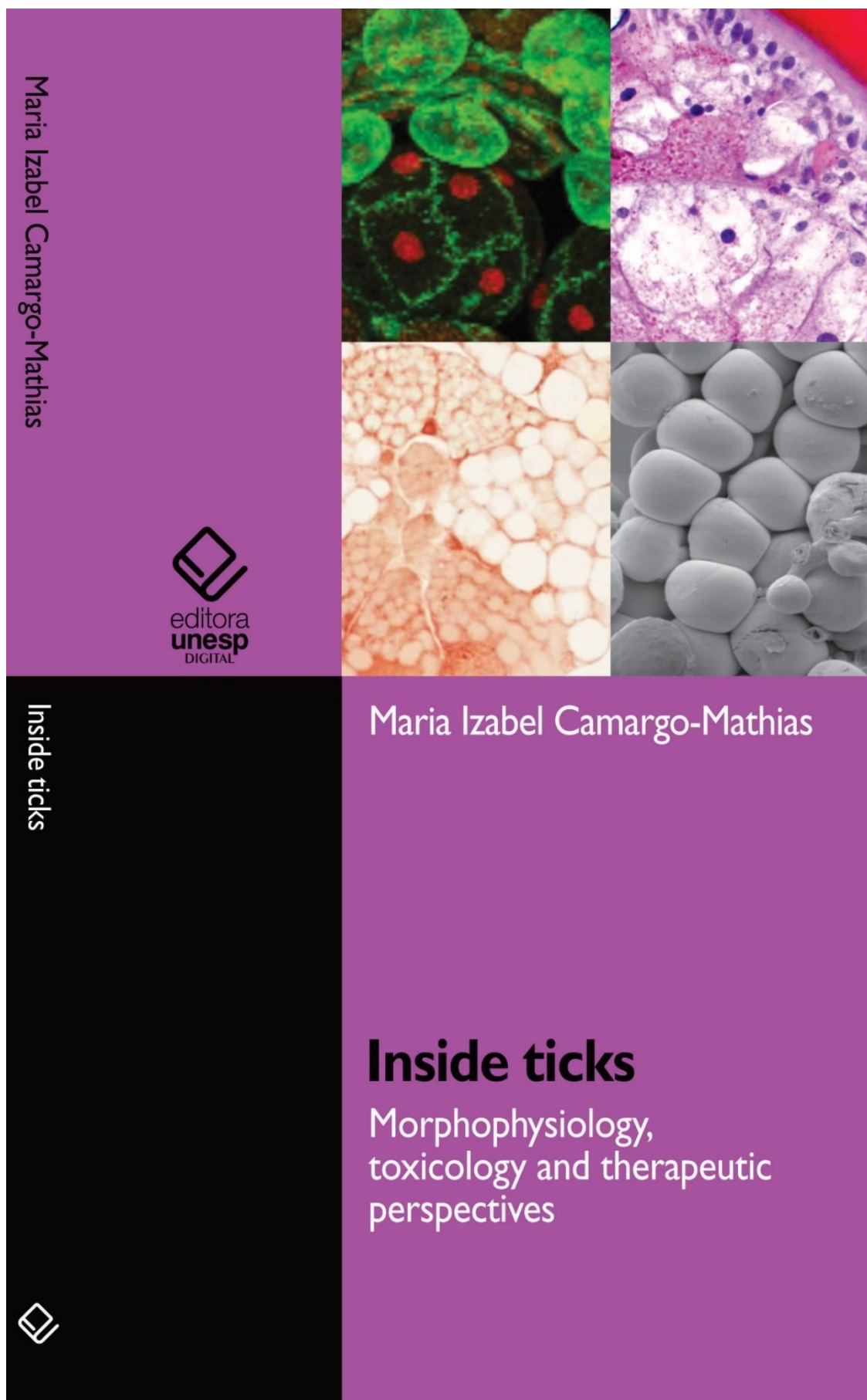
YU, M. C.; YUAN, J.-M. Environmental factors and risk for hepatocellular carcinoma. **Gastroenterology**, v. 127, n. 5 Suppl 1, p. S72-8, nov. 2004.

YUNKER, C. E.; CORY, J.; MEIBOS, H. Continuous cell lines from embryonic tissues of ticks (Acari: Ixodidae). **In Vitro**, v. 17, n. 2, p. 139–142, fev. 1981.

CAPÍTULOS DE LIVRO

- 1) OLIVEIRA, P.R., ANHOLETO, L.A., **PEREIRA, N.R.C.**; FERREIR, A.R.F., CAMARGO-MATHIAS, M.I. Generating New Individuals I (Female Reproductive System. CAMARGO-MATHIAS, M.I. *Inside Ticks: Morphophysiology, toxicology and therapeutic perspectives*. 1a ed. São Paulo: Editora UNESP, 2018

- 2) OLIVEIRA, P.R., NODARI, E.F., PEREIRA, M.C., **PEREIRA, N.R.C.**, ANHOLETO, L.A., ABREU, M.R., OLIVEIRA, S.A.R., ARNOSTI, A., CAMARGO-MATHIAS, M.I. Synthetic Acaricides. CAMARGO-MATHIAS, M.I., *Inside Ticks: Morphophysiology, toxicology and therapeutic perspectives*. 1a ed. São Paulo: Editora UNESP, 2018



7

GENERATING NEW INDIVIDUALS I (FEMALE REPRODUCTIVE SYSTEM)

*Patrícia Rosa de Oliveira, Luis Adriano Anholeto,
Natalia Rubio Claret Pereira, Allan Roberto Fernandes
Ferreira, Maria Izabel Camargo-Mathias*

The reproductive system of female ticks consists of a single U-shaped tubular ovary located in the posterior third of the body and extending towards the posterolateral region, paired oviducts, a single uterus, and a pair of accessory glands opening at the junction of two vaginal regions (Sonenshine, 1991; Said, 1992; Sonenshine; Roe, 2014). The vagina is subdivided into a posterior muscular and a vestibular vagina (Sonenshine; Roe, 2014).

Until 2003, studies on the reproductive system of ticks have not addressed the morphology of the ovaries (Till, 1961; Balashov, 1983; Sonenshine, 1991). In 2004, Denardi et al. developed morphological studies and classified the ovaries of these ectoparasites as panoistic, i.e., all the germ cells correspond to oogonia (future oocytes);

therefore, the nurse cells – and, specifically on the ticks, the follicle ones – are not present.

The ovary of ticks, in general, consists of a lumen delimited by a wall of small epithelial cells with rounded nuclei. A large number of oocytes remains attached to this wall through the pedicel cells (ovary epithelial cells that proliferate to fix the oocyte) until they are released into the lumen (Denardi et al., 2004; Oliveira et al., 2005; Saito et al., 2005; Oliveira et al., 2006; Oliveira et al., 2007a, b; Ricardo et al., 2007; Sonenshine; Roe, 2014). Recent studies have demonstrated that, in addition to fixing the oocytes to the ovary, the pedicel synthesizes part of the vitellogenic elements that are transported to the interior of the oocytes via active transportation, which occurs mainly in the region next to the oocyte/pedicel complex (Oliveira et al., 2007a).

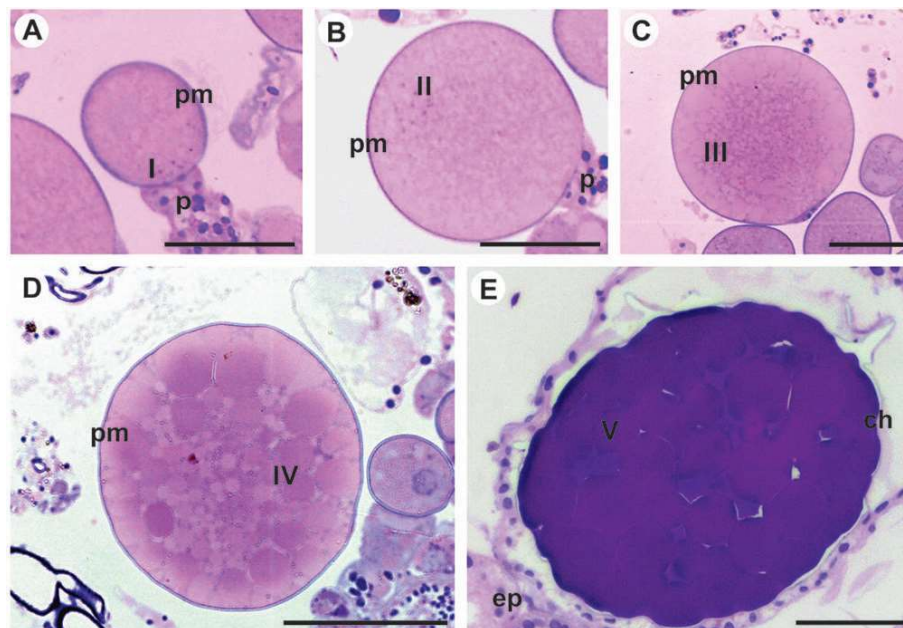
In ticks, the oocytes (Figure 24) are distributed in the ovaries on a preferential basis; i.e., the ones in early developmental stages (I and II), small and with light staining, are found in the distal region, while the more developed ones (developmental stages III, IV and V), larger and darker, are located in the proximal region. The development of oocytes is simultaneous, but asynchronous; i.e., although all the oocytes develop at the same time, the vitellogenesis occurs in different moments, enabling these cells to be fecundated also in different moments (Denardi et al., 2004; Oliveira et al., 2005).

Earlier studies on the reproductive system of ticks have suggested a classification for the oocyte developmental stages (Till, 1961; Sonenshine, 1991); however, more recent ones have improved this classification, renaming it and adding other criteria to facilitate the comprehension of the reproductive processes of these ectoparasites.

Currently, the oocytes are classified in developmental stages, according to several morphological criteria, as

follows: a) cytoplasmic aspect, b) germinal vesicle location, c) presence and constitution of yolk granules and d) presence of chorion (Denardi et al., 2004). In *Amblyomma sculptum* (Denardi et al., 2004), *R. (Boophilus) micropus* (Saito et al., 2005), *R. sanguineus* s. l. (Oliveira et al., 2005) and *A. brasiliensis* (Sanches et al., 2009) the oocytes are classified into 5 developmental stages (I-V), while in *A. triste* (Oliveira et al., 2006) they are classified into 4 stages (I-IV).

Figure 24 – Histological sections of *R. sanguineus* s. l. ovary stained by HE. (A) Detail of oocyte I. (B) Detail of oocyte II. (C) Detail of oocyte III. (D) Detail of oocyte IV. (E) Detail of oocyte V. ch = chorion; ep = ovary epithelium; I = oocyte stage I; II = oocyte stage II; III = oocyte stage III; IV = oocyte stage IV; V = oocyte stage V; p = pedicel; pm = plasma membrane



Bars: (A-D) 200 μ m; (E) 100 μ m

The oocyte stages are classified as follows:

- *Oocytes I*: small and elliptical cells, with central germinal vesicle (nucleus), displaying an evident nucleolus occupying great part of the cytoplasm,

which is homogeneous due to the absence of vitellogenic granulations, but rich in free ribosomes and polyribosomes, and presenting some mitochondria, located mainly in the peripheral region. These cells are surrounded by a thin plasma membrane presenting the onset of specializations, when they are called microvilli. In this stage, only structural proteins are produced (endogenous); i.e., the exogenous vitellogenesis process has not started yet (Denardi et al., 2004; Oliveira et al., 2005; Saito et al., 2005; Oliveira et al., 2006; Oliveira et al., 2007b; Sonenshine; Roe, 2014).

- *Oocytes II*: larger than oocytes I and elliptical. The germinal vesicle is still found in the central region. These cells show fine and homogeneous granulation in the cytoplasm, once in this phase the endogenous synthesis and/or the incorporation of extra-ovarian (exogenous) elements have already started. The mitochondria are the most frequent organelles, occupying the peripheral region, and numerous ribosomes, free and/or adhered to the membrane of a little developed rough endoplasmic reticulum are present. The oocytes are enveloped by a plasma membrane supported by a thick basal lamina, full of elongated microvilli. The inner region of the basal lamina is thicker, in direct contact with microvilli; while the outer region is thinner and with fibrillar aspect (Denardi et al., 2004; Oliveira et al., 2005; Saito et al., 2005; Oliveira et al., 2006; Oliveira et al., 2007b; Sonenshine; Roe, 2014).
- *Oocytes III*: these oocytes have intermediate size, and their shape range from rounded to elliptical. The germinal vesicle is translocated to the oocyte pole, due to the smaller size of the yolk granules.

The remaining cytoplasm is full of granules of different sizes, the smaller occupying the central region and the larger concentrated in the periphery, indicating the fusion of the smaller granules towards the peripheral region of the oocyte. In this developmental stage presents an accumulation of mitochondria, possibly because the cells are being prepared for an important phase of vitellogenesis, in which the organelles are required for the endogenous production and exogenous incorporation of elements that will constitute the egg yolk, such as lipids, proteins and carbohydrates (Balashov, 1972b; Sonenshine; Roe, 2014). Abundant ribosomes and rough endoplasmic reticulum are found, indicating that the oocyte is still endogenously synthesizing the vitellogenic elements. Numerous microvilli are found in the plasma membrane, which remains supported by a thick basal lamina (Denardi et al., 2004; Oliveira et al., 2005a; Saito et al., 2005; Oliveira et al., 2006; Oliveira et al., 2007b; Sonenshine; Roe, 2014).

- *Oocytes IV*: larger than the ones from the previous stage and round-shaped. The germinal vesicle occupies the oocyte pole close to the pedicel. The cytoplasm contains several yolk granules of various sizes randomly scattered, in addition to small mitochondria. The process of chorion (resistant membrane that minimizes desiccation and mechanical impacts, protects from predation and allows gas exchange between the embryo and the environment) deposition continues, demonstrated by the presence of exocytosis vesicles (surrounded by a membrane and containing material to be secreted into the external environment) that transport material to be deposited and polymerized in the

region between the basal lamina and the plasma membrane. Microvilli are no longer observed in this stage, once the process of hemolymph incorporation has already been concluded (Denardi et al., 2004; Oliveira et al., 2005; Saito et al., 2005; Oliveira et al., 2006; Oliveira et al., 2007b; Sonenshine; Roe, 2014).

- *Oocytes V*: the largest germinal cells, rounded-shaped, where the visualization of the germinal vesicle is difficult due to the presence of numerous granules in the cytoplasm. The chorion is fully deposited, and is constituted of two layers: the exochorion, outer and thinner; and the endochorion, inner and thicker, in direct contact with the oocyte, indicating the end of the vitellogenic process (Denardi et al., 2004; Oliveira et al., 2005; Saito et al., 2005; Oliveira et al., 2006; Oliveira et al., 2007b; Sonenshine; Roe, 2014).

Unlike ticks in general, the ones belonging to the species *A. triste*, the oocytes IV (final developmental stage), accumulate a smaller amount of yolk (proteins, lipids and carbohydrates), and the chorion is not subdivided into endo and exochorion.

Recent studies have pointed that the main component of the yolk is the vitellin, whose precursor is the vitellogenin, protein synthesized mainly by exogenous sources, such as the fat body and midgut, and taken into the oocytes via endocytosis (Sonenshine; Roe, 2014).

Therefore, studies on the reproductive system of Ixodidae in general bring relevant information for the comprehension of their biology, helping in the search for alternative methods to control their reproduction as well as the pathologies caused by them.

SYNTHETIC ACARICIDES

*Patrícia Rosa de Oliveira, Elen Fernanda Nodari,
Melissa Carolina Pereira, Natalia Rubio Claret Pereira,
Luis Adriano Anholeto, Marina Rodrigues de Abreu,
Solange Aparecida Rossini de Oliveira, André Arnosti,
Juan Parente Santos, Maria Izabel Camargo-Mathias*

Fipronil: action on the female reproductive system and salivary glands

Fipronil, manufactured by Rhône-Poulenc Agro Company in 1987 and registered in 1996, belongs to the chemical group phenylpyrazole, with acknowledged potential to control pests (Oliveira et al., 2011). It is a broad-spectrum insecticide, and in the EUA, it has been used in formulation of baits to control ants and cockroaches as well as in veterinary sprays against ticks, fleas and acari (Penaliggon, 1997; Hugnet et al., 1999; Higgins et al., 2001). The commercial formulations are: Terimidor[®], Frontline[®], Regent[®], manufactured by Bayer Crop-science (Oliveira et al., 2011).

Fipronil acts specifically on the central nervous system (CNS) of the invertebrate, preventing the flow of chloride ions to the interior of nervous cells and interfering in the GABA (Gamma-aminobutyric acid) neurotransmitters bindings to the receptors. This causes a disruption in the CNS, with an overexcitation of muscles and nerves, leading the exposed individuals to death (Rhône-Poulenc, 1995; Oliveira et al., 2008, 2009). Due to this exclusive action mechanism, the affinity to the invertebrate receptors and the fact that mammals lack glutamate chloride channels (GluCl – CNS components), fipronil has a wide margin of safety (Rhône-Poulenc, 1995). Moreover, the great efficiency in controlling resistant/tolerant pest justifies its widespread use in several countries (Oliveira et al., 2008, 2009, 2011).

Female reproductive system

Studies developed in 2008 by Oliveira et al. brought the first information on the effects of synthetic chemical products on the female reproductive system of ticks (Figure 29, 30). Since then, the action of acaricides has been better understood, once the authors investigated the effects of different concentrations of fipronil on the germ cells and ovary tissue in semi-engorged *R. sanguineus* s. l. females. In that study, the ticks were immersed in fipronil at the concentrations of 1, 5 and 10 ppm. The chemical caused alterations in the ovaries of the individuals from all the treatment groups. The alterations were mainly regarding the number of oocytes affected, the presence, number and size of cytoplasmic vacuoles, the presence of myelin figures and cytoplasmic microtubules, and modifications in the germ cell organelles (Oliveira et al., 2008, 2009, 2011).

After the exposure to the concentration of 1 ppm of fipronil, few oocytes I displayed alterations, which occurred only in their shape, showing median constriction and few small cytoplasmic vacuoles. The individuals exposed to 5 ppm, presented a larger number of altered oocytes I with a high level of cytoplasmic vacuolation. In the females exposed to 10 ppm, oocytes I could no longer be observed, which demonstrated that, as fipronil concentrations increased, more and diverse histological alterations occurred (Oliveira et al., 2008, 2009). The vulnerability of the cell in early stages of development would be associated with the fact that the chorion is not yet deposited. The chorion is a membrane with special and typical characteristics, constitution and thickness, with the function of protecting the eggs by acting as a barrier to the toxic substance (Oliveira et al., 2009).

Oocytes II and III of the *R. sanguineus* s. l. ticks subjected to fipronil at the concentration of 1 ppm showed the onset of cytoplasmic vacuolation. The individuals subjected to the concentration of 5 ppm showed a larger number of altered oocytes II and III in comparison with the previous group, in addition to presenting extensive areas of cytoplasmic vacuolation and myelin figures, resulting from the digestion of damaged organelles. In those subjected to the concentration of 10 ppm, 75% of oocytes II and III presented an even higher level of vacuolation in most part of the cytoplasm limiting the presence of yolk granules (Oliveira et al., 2008). Such alterations indicate that the vacuoles would be autophagic, digesting cell components or cytoplasmic portions damaged by the chemical (Vendramini et al., 2012). Moreover, it was demonstrated that higher concentrations of fipronil would inhibit the development of oocytes (Oliveira et al., 2009, 2011).

Carvalho and Recco-Pimentel (2013) and Junqueira & Carneiro (2013) provided more details on the cell

alterations caused by the exposure to chemical products. The authors reported that autophagic vacuoles would be commonly observed in the cells undergoing degradation processes, and damaged portions of the cytoplasm and/or organelles would be recycled. This autophagy has the function of promoting a membrane turnover, providing elements to be reused by the cells (Roma et al., 2010).

The oocytes III from the *R. sanguineus* s. l. exposed to fipronil at the concentration of 10 ppm displayed significant alterations in the vitellogenic granules (protein), in the rough endoplasmic reticulum, in the mitochondria, and in the cytoskeleton elements. It is known that the arrangement of the cytoskeleton elements could be associated with a strategy of the cell to isolate areas of the cytoplasm (which would still be functional) from the damaged content, avoiding the spread of the damages and preserving this important cell (oocyte), responsible for the generation of a new individual (Jedrzejowska; Kubrakiewicz, 2007).

The oocytes IV from the individuals treated with fipronil at the concentrations of 1, 5 and 10 ppm showed extensive vacuolated areas, as well as a thinner chorion in comparison with the control group (Oliveira et al., 2008, 2009). The progressive increase in cytoplasmic alterations, including vacuolation, in comparison with oocytes IV from the ticks exposed to the previous concentrations, indicated the occurrence of much more intense autophagic processes, probably aiming to eliminate the damaged cytoplasmic elements more efficiently (Oliveira et al., 2009).

The oocytes V from the ticks treated with fipronil at the concentration of 1 ppm, did not show the typical characteristics of a cell capable of completing the developmental process, once the yolk granules (normally found in the cytoplasm in this stage) were replaced by extensive vacuolated areas. Additionally, the oocyte was surrounded by a thin membrane, which did not show the

same characteristics of the chorion, normally present in the oocytes in this developmental stage (Oliveira et al., 2008, 2009).

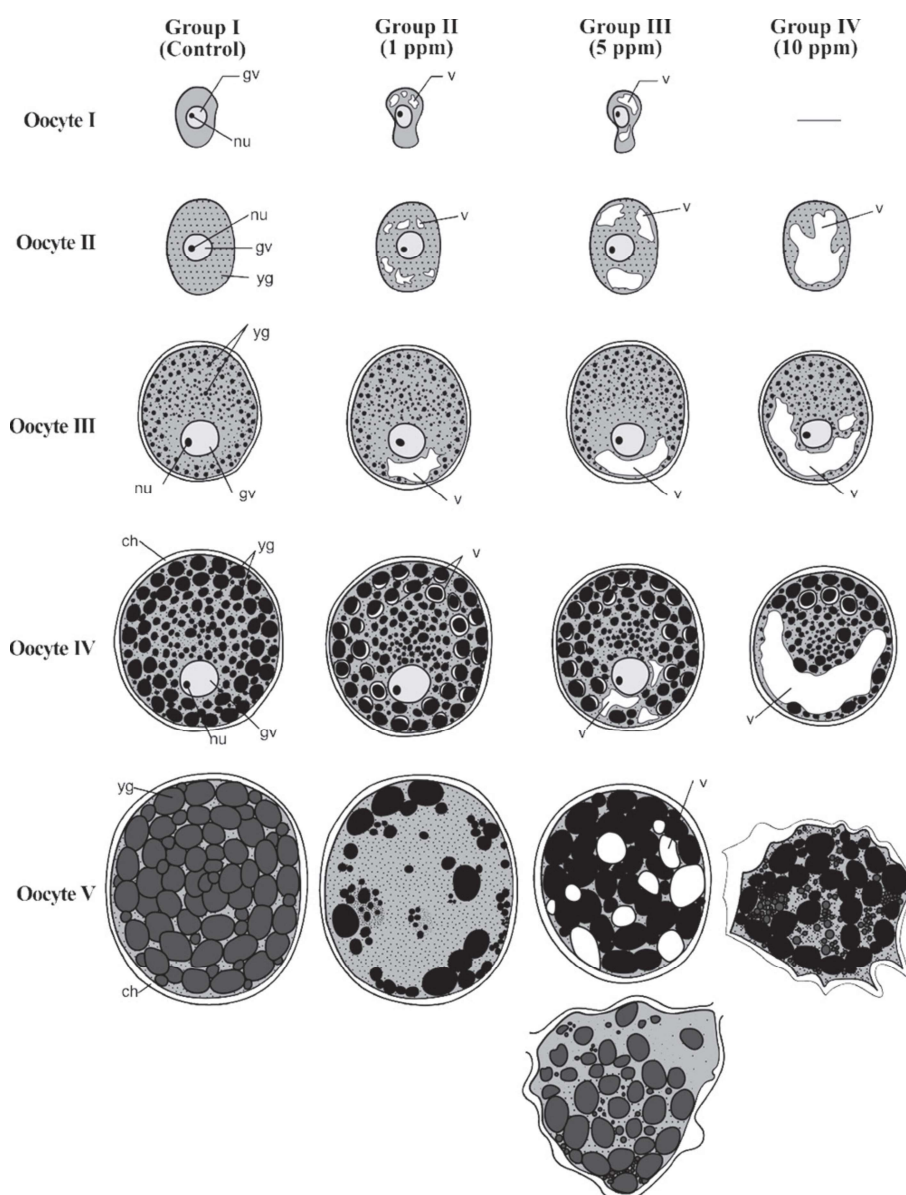
Two types of oocytes V were observed in the individuals subjected to the concentration of 5 ppm. The first type comprises those with yolk granules with varied electron-density, myelin figures, cytoplasmic vacuoles and a much thinner chorion supported by a ruptured basal lamina. The second type includes the oocytes with intact yolk granules, several vacuoles and a thicker chorion supported by an intact basal membrane (Oliveira et al., 2009). These data suggest that oocytes V react differently to the chemical agent. i.e., those with a thicker chorion would be less permeable and less susceptible to the penetration of external agents, which represents a higher level of preservation of the intracellular environment.

In the individuals subjected to the concentration of 10 ppm, the oocytes V suffered the most significant morphological alterations, confirming that this concentration of fipronil caused the greatest damage to the germ cells of *R. sanguineus* s. l. females (Oliveira et al., 2008).

Other studies on the reproductive system of ticks exposed to chemical products, such as the one developed by Friesen et al. (2003), showed that exposure to avermectin, in addition to the alterations described, caused the ovary shortening and modified the size and yolk content of the oocytes in *A. hebraeum* ticks. The authors still reported that the chemical products act directly in the inhibition of vitellogenin taken by the oocyte via hemolymph.

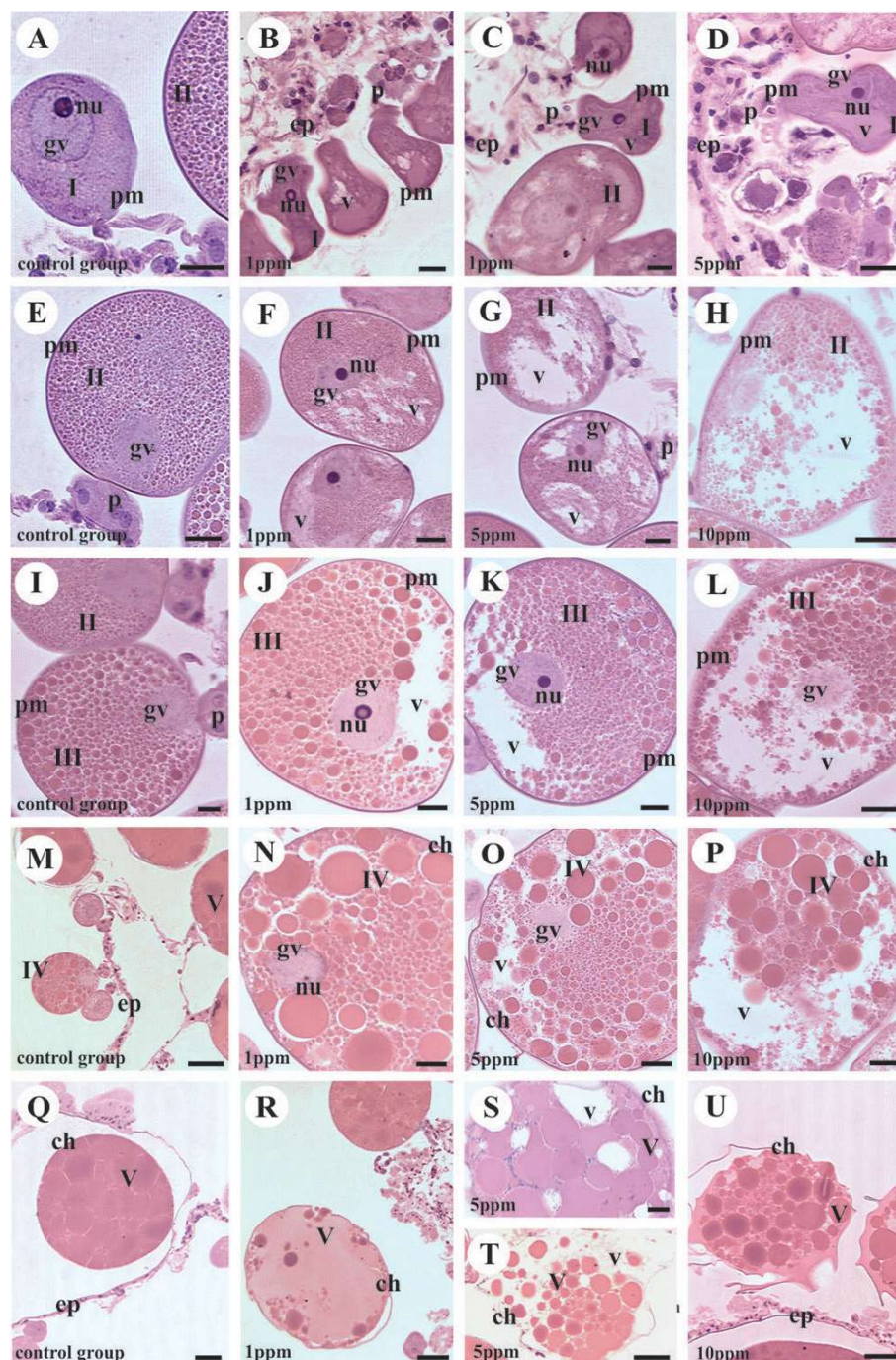
Thus, the high level of sensitivity of the female germ cells to the exposure to the chemical products used as acaricides was confirmed, once these substances are able to reduce fertility and cause damages to the CNS and other organs of great importance for the biological success of these ectoparasites.

Figure 29 – Schematics drawing of the histological alterations observed in oocytes (I to V) of *R. sanguineus* s. l. treated with fipronil in different concentrations (control group, 1 ppm, 5 ppm, 10 ppm). ch = chorium; gv = germ vesicle; I = oocyte stage I; II = oocyte stage II; III = oocyte stage III; IV = oocyte stage IV; V = oocyte stage V; nu = nucleolus; pm = plasma membrane; v = vacuoles; yg = yolk granules



Reproduced from Oliveira, P. R., Camargo-Mathias, M. I. and Bechara, G. H. (2008) Evaluation of cytotoxic effects of fipronil on ovaries of semi-engorged *Rhipicephalus sanguineus* s. l. (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) tick female. *Food Chemical Toxicology*, Oxford, v. 46, p. 2459-2465, with permission from Elsevier

Figure 30 – Histological sections of *R. sanguineus* s. l. ovary stained by HE. (A) Detail of oocyte I of the group I (control). (B) Oocytes I of the group II (1 ppm). (C) Oocytes I and II of the group II (1 ppm). (D) Detail of oocyte I of the group III (5 ppm). (E) Detail of oocyte II of the group I (control). (F) Oocytes II of the group II (1 ppm). (G) Oocytes II of the group III (5 ppm). (H) Detail of oocyte II of the group IV (10 ppm). (I) Detail of oocytes II and III of the group I (control). (J) Detail of oocyte III of the group II (1 ppm). (K) Detail of oocyte III of the group III (5 ppm). (L) Detail of oocyte III of the group IV (10 ppm). (M) Oocytes IV and V of the group I (control). (N) Detail of oocyte IV of the group II (1 ppm). (O) Detail of oocyte IV of the group III (5 ppm). (P) Detail of oocyte IV of the group IV (10 ppm). (Q) Detail of oocyte V of the group I (control). (R) Oocyte V of the group II (1 ppm). (S) Detail of oocytes V of the group III (5 ppm). (T) Oocytes V of the group III (5 ppm). (U) Oocytes V of the group IV (10 ppm). ch = chorium; ep = ovary epithelium; gv = germ vesicle; I = oocyte stage I; II = oocyte stage II; III = oocyte stage III; IV = oocyte stage IV; V = oocyte stage V; nu = nucleolus; p = pedicel; pm = plasma membrane; v = vacuoles. Bars: (A-L, N-P, S) 0.02 mm; (M, Q-R, T) 0.1 mm; (U) 0.05 mm



Reproduced from Oliveira, P. R., Camargo-Mathias, M. I. and Bechara, G. H. (2008) Evaluation of cytotoxic effects of fipronil on ovaries of semi-engorged *Rhipicephalus sanguineus* s.l. (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) tick female. *Food Chemical Toxicology*, Oxford, v. 46, p. 2459-2465, with permission from Elsevier

Salivary glands

Studies on the acaricide action of fipronil on the salivary glands of unfed and semi-engorged *R. sanguineus* s. l. females (Pereira et al., 2009) revealed the occurrence of severe alterations in these organs after exposure to different concentrations of fipronil. Additionally, it was demonstrated that this chemical does not modify the nature of the glandular secretion or the shape of the cells, but interferes in the acinar morphophysiology and accelerates the glandular degeneration.

The results revealed that fipronil at the concentration of 1 ppm modified the glandular acini type I, and the morphological alterations would be associated with the size, shape and mainly with the increase in the diameter of the lumen; however, acini II and III were not affected. It is important to note that acini type I are probably involved in the hydric balance of the tick during the fasting period (Binnington, 1978; Walker et al., 1985), or even associated with osmoregulation (excretory function) (Balashov, 1972a; Coons; Roshdy, 1973), while the acini II and III are essentially secretors.

The morphological alterations observed in acini I would represent an attempt to eliminate the fipronil (present in the circulating hemolymph) from the biological system. This confirms the role of acini I as osmoregulators, i.e., through the production of saliva, the toxic compound would be removed from the hemolymph, which was proven by the increase in the diameter of the lumen in these structures (Pereira et al., 2009)

Pereira et al. (2009, 2011), who developed studies using fipronil at the concentrations of 1, 5, and 10 ppm, demonstrated that the salivary glands of the females exposed to 1ppm showed more severe alterations than those from the control group. The alterations included loss

of turgidity and decrease in the number of acini, general tissue disorganization, irregularities in the shape of the nuclei in acinar cells, chromatin marginalization, nuclear fragmentation (Kerr et al., 1995), release of several apoptotic bodies (Kerr et al., 1995; Häcker, 2000) and intense cytoplasmic vacuolation (Bowen, 1993; Zakeri et al., 1995). Regardless the concentration, fipronil caused the salivary glands to degenerate, on a dose-dependent basis, i.e., as the concentrations increased the processes of cell death accelerated (Pereira et al., 2009, 2011).

The action of fipronil on the glandular cells was intense, once even resistant structures, as the spherocrystals found in the cytoplasm (Petit, 1970), were disorganized, with their shapes altered from round to completely irregular (Pereira et al., 2011). Another indicator of the high level of toxicity of fipronil was the disarrangement of the cytoskeleton elements, once a concentration of microfilaments was observed only in some regions of the cytoplasm, probably still intact areas, as a self-preservation strategy of the cell (Jedrzejowska, Kubrakiewicz, 2007). The disarrangement of the cytoskeleton proteins probably occurred due to the depolarization of the proteins, indicating that the cell would be in preparation for the following cell death stages (Ndozangue-Touriguine et al., 2008).

In general, studies on this thematic demonstrated that the chemical compound fipronil has the capability to accelerate glandular degeneration, interfering in the physiology of the organ and disrupting secretion synthesis and release, ultimately triggering death processes in the cells. The females are unable to complete the feeding process, which reflects on the reproductive process, impairing or preventing oviposition. Finally, the precocious glandular degeneration caused minor blood losses on the hosts and reduced the transmission of biopathogens that would normally be transported by these glands.

Permethrin: action on the synganglion, salivary glands and female reproductive system

Permethrin, a synthetic pyrethroid, is widely used to control *R. sanguineus* s. l. ticks, with rapid action, causing paralysis to the individuals exposed via alterations in the CNS. Such alterations include the modification of the permeability of sodium channels, keeping them open in the neuron membranes (repetitive effect) and making the sensorial organs and the nerve terminations react in a particularly sensitive way, causing a state of hyperexcitation (Mencke et al., 2003; Dong, 2007). Permethrin, as well as other pyrethroids, acts on the CNS, preventing GABA neurotransmitter bindings to the receptor, blocking the flow of chloride ions to the interior of the cell and causing hyperexcitation, tremors, spasms, paralysis and, ultimately, death.

Synganglion

The action of permethrin on the synganglion resulted in the degeneration of the organ through apoptosis involving autophagy, characterized by chromatin condensation and marginalization, formation of membrane blebs, nuclear fragmentation, alterations in the shape of nerve cells and membrane integrity, cytoplasmic retraction and decrease in the levels of acid phosphatase in the nerve tissue. These alterations were dose-dependent (Roma et al. 2013). Ultrastructurally, the neural lamella was affected, facilitating the penetration of the toxic agent into the synganglion. Significant modifications were observed in the perineurium glial cells and in the cortex neuronal cells, such as the emergence of irregular nuclei with chromatin marginalization, cytoplasm vacuolation and degeneration

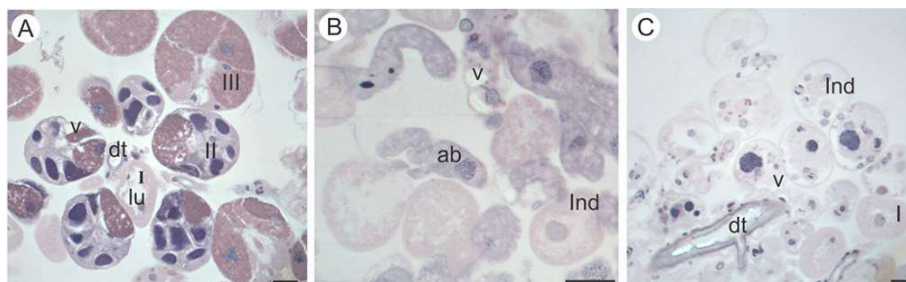
of the mitochondria. The rough endoplasmic reticulum of the neuronal cells was enlarged, indicating an intensification of the synthesis of hydrolytic enzymes used in the degradation of damaged cell structures (lysosome formation) (Roma et al. 2014).

Studies on the compound have confirmed its neurotoxic action on the nervous system metabolism in *R. sanguineus* s. l., affecting the physiology of other systems, all of them dependent on neural control. Furthermore, the chemical action is dose-dependent, once more significant alterations were observed as the concentrations increased, affecting the organism as a whole (Roma et al. 2013; 2014).

Salivary glands

The action of permethrin on the morphophysiology of the glandular tissue (Figure 31) was confirmed, i.e., the compound caused significant alterations in the shape of the acini, intense cytoplasmic vacuolation in the acinar cells and a high level of disorganization in the glandular tissue, culminating in the progression of degeneration and consequent formation of apoptotic bodies (Nodari et al., 2011). The pyrethroids affected the salivary gland secretion mechanism, drastically reducing the synthesis of proteins, lipids and polysaccharides in the different cell types (Nodari et al., 2012a). The nucleus and the nuclear genetic material of the glandular tissue cells underwent severe alterations regarding their shape, size, chromatin marginalization and nuclear fragmentation. These cells displayed pyknotic nuclei, mainly under higher concentrations of the chemical (Nodari et al., 2012b). Cell death processes, which normally occur in the end of the female engorgement phase, were observed in the glandular cells.

Figure 31 – Histological sections of salivary glands of *R. sanguineus* s. l. semi-engorged females exposed to 206 ppm (A), 1031 ppm (B) and 2062 ppm (C) of permethrin stained with hematoxylin-eosin (HE). (A) showing I (type I acinus), II (type II acinus) and III acini (type III acinus). (B) showing I (type I acinus) and indeterminate acini (Ind). (C) showing I (type I acinus) with dilated lumen (lu), besides indeterminate acini (Ind). dt = duct; v = vacuoles; ab = apoptotic body; lu = lumen



Bars: (A-C) 25 μ m

Thus, permethrin induced precocious degeneration in the glandular tissue by triggering significant morphophysiological alterations in the acinar cells and intensified the production of enzymes associated with cell death process, affecting cell and nuclear integrity, consequently modifying the physiology.

Female reproductive system

The action of permethrin on the ovaries of semi-engorged *R. sanguineus* s. l. females caused significant morphological alterations, changing the structure of the oocytes, as well as the emergence of large vacuolated regions in the cytoplasm, reducing the number of yolk granules and the size of the oocytes (Roma et al., 2010a). Regarding ultrastructure, the emergence of cytoplasmic vacuolation, disorganization of the plasma membrane and organelles and the presence of myelin figures can be

observed. Such alterations confirm that, even in low concentrations, the permethrin would have the potential to modify the germ cells, making the cell mechanisms unviable, including an attempt of the cell to minimize the action of the chemical by decreasing the area and surface in which the oocytes are in contact with the hemolymph. It is important to emphasize that such damages are irreversible, ultimately leading the cell to death (Roma et al., 2010b). Thus, the studies demonstrated that permethrin is a potent acaricide, able to impair reproduction in the *R. sanguineus* s. l. females exposed, even to lower concentrations of the chemical (Roma et al., 2010a, b).

Fluazuron: action on the integument and midgut

Fluazuron belongs to a class of arthropod growth regulators (AGRs) (Taylor, 2001; Coop et al., 2002, Vieira, 2009; Vieira, 2012). The AGRs are classified into: a) juvenile hormone analogues, which prevent the activation of genetic sequences essential for the development of organs and tissues; b) benzoylphenylureas, inhibitors of the synthesis and/or deposition of chitin; and c) triazin and pyrimidine derivatives, which interfere in ecdysis (Chavasse; Yap, 1997).

Fluazuron was the first growth regulator to be registered for the control of Ixodidae ticks (Bull et al., 1996; Zenner et al., 2004), due to its systemic action via blood flow and remarkable acaricide efficacy (Catto et al., 2010; Andreotti, 2010). The commercial formulations are Acatak[®], Superhion[®], Tackzuron[®], and Contratack[®], manufactured by different companies.

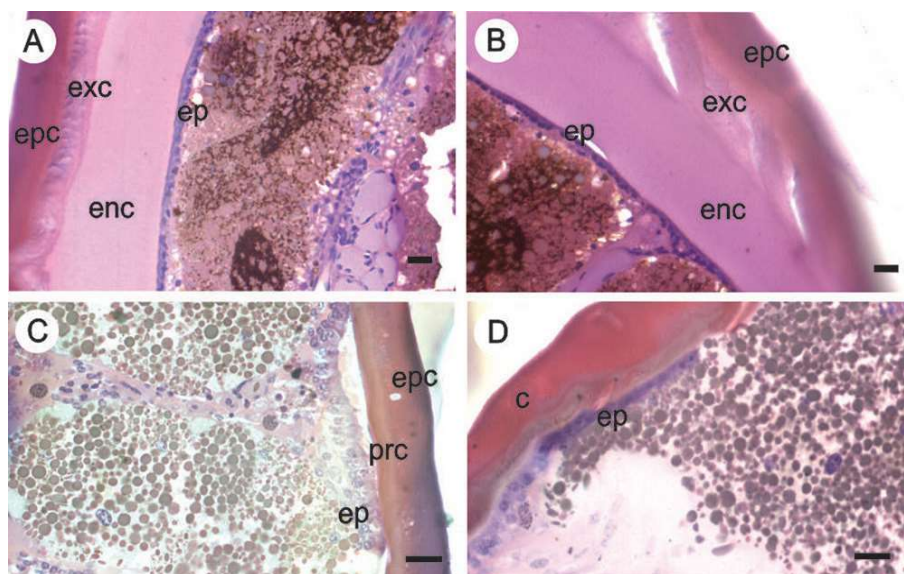
Integument

Studies developed by Oliveira et al. (2013) provided information on the effects of synthetic chemicals on the integument of ticks, demonstrating the action of different concentrations of fluazuron (Acatak[®], Novartis) (20 mg/Kg, 40 mg/Kg and 80 mg/Kg of fluazuron/body weight) applied pour-on to the hosts.

The action of fluazuron was demonstrated through the observation of alterations in the integument and midgut cells of nymphs from the different groups compared with group I (control) (Figure 32) (Oliveira et al., 2014). The alterations were mainly associated with the cuticle subdivisions, size of the digestive cells and amount of blood element taken and digestive residue accumulated, as well as with the presence of vacuoles in the cytoplasm of the digestive cells (Oliveira et al. 2013, 2014).

After the host inoculation with 20 mg/Kg, the integument of the nymphs showed thinner epicuticle and procuticle (exocuticle and endocuticle) in comparison with the control group. In the nymphs fed on the host exposed to 40 mg/Kg of fluazuron, the integument did not display the subdivisions normally found in the procuticle (exocuticle and endocuticle). In the ones fed on hosts exposed to 80 mg/Kg of fluazuron, the integument showed the most significant alterations, once all the cuticle layers (epicuticle and procuticle with exocuticle and endocuticle) seemed to be undergoing a fusion process, originating a single layer (Oliveira et al., 2013, 2014). These data could have resulted from the absence of chitin synthesis, necessary for the formation of the procuticle, which would not be synthesized and/or deposited on the integument due to the action of fluazuron, causing the formation of a single layer.

Figure 32 – Histological sections of fluazuron-treated nymphs tick *R. sanguineus* s. l. (A-D) Hematoxylin and eosin (HE) staining. (A) Control Group, (B) Group II (20mg/Kg), (C) Group III (40mg/Kg), (D) Group IV (80mg/Kg). c = cuticle; ep = epithelial cells; epc = epicuticle; enc = endocuticle; exc = exocuticle; prc = procuticle



Bars: (A-B) 10um, (C-D) 20um

The groups, except the control one, showed no evidence of ecdysis, confirming that fluazuron would inhibit the molting process in the nymphs fed on the exposed hosts, probably by preventing the synthesis and/or deposition of chitin to form a new cuticle to cover the body during periodic ecdysis (Oliveira et al. 2014).

The interference of fluazuron in the synthesis and/or deposition of chitin would cause an irregular deposition of the endocuticle, which would affect the elasticity and rigidity of the cuticle, preventing the deposition of a new cuticle and, consequently, the successful completion of ecdysis process (Oberlander; Silhacek, 1998; Palli; Rentnakaran, 1999; Oberlander; Smagghe, 2001). According to Palli and Retnakaran (1999), the interference in the synthesis and/or deposition of chitin would occur via biochemical processes, as follows: inhibition of

chitin-synthase or the flow UDP-N- acethylglycosamine through the biomembranes; interruption of chitin and cuticle protein bindings; interference in ecdysone metabolism; activation of actinases involved in chitin catabolism; inhibition of proteases that activate chitin-synthase; interruption of the conversion glucose to fructose-6-phosphate and inhibition of DNA synthesis, among others.

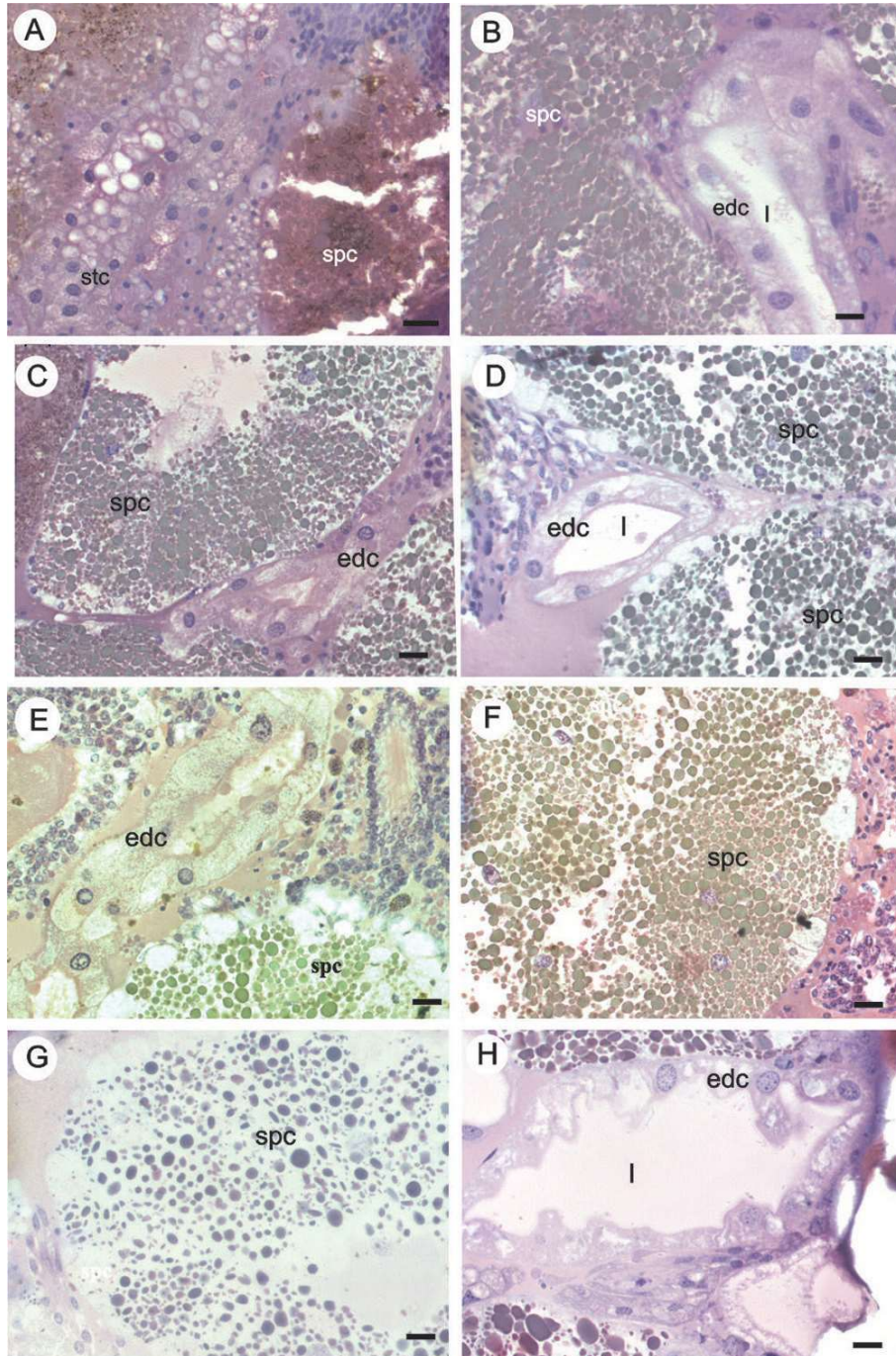
Therefore, it was demonstrated that the arthropod growth regulator fluazuron (active ingredient of Acatak®) interfered in the deposition of the integument in *R. sanguineus* s. l. nymphs fed on inoculated rabbits. The chemical impaired the process of cuticle polymerization, affecting the development of the nymphs to adult phase. These data confirm the potential of fluazuron as a promising strategy to control *R. sanguineus* s. l. nymphs.

Midgut

Oliveira et al. (2013, 2014) studied the effects on fluazuron on the midgut epithelium in engorged *R. sanguineus* s. l. nymphs (Figure 33). The authors demonstrated the alterations caused by the action of the compound, which included modification in the size of digestive cells, amount of blood element taken and digestive residue accumulated, as well as the presence of vacuoles in the cytoplasm of the digestive cells (Oliveira et al., 2013, 2014).

The authors used the concentrations of 20 mg/Kg, 40 mg/Kg and 80 mg/Kg of fluazuron /body weight applied pour-on to the hosts. On the first day (24 hours) after inoculation with fluazuron and distilled water (Control Group) artificial infestation was performed on all hosts, and after more 24 hours (for chamber fixation), each host was infested with *R. sanguineus* s. l. nymphs using a syringe. Soon after engorgement was completed and the engorged nymphs (metanymphs) dropped off the hosts,

Figure 33 – Histological sections of fluazuron-treated nymphs tick *R. sanguineus* s. l. (A-H) Hematoxylin and eosin (HE) staining. (A-B) Control Group I, (C-D) Group II (20 mg/Kg), (E-F) Group III (40 mg/Kg), (G-H) Group IV (80 mg/Kg). edc = Empty digest cells; l = lumen; spc = Spent cells; stc = Stem cells (generative cells)



Bars: (A) 10 mm; (B-H) 20 mm

they were placed on labelled Petri dishes. The dishes were placed in BOD incubator and monitored for 7 days. This period was established to complete 14 days after treatment with fluazuron (from the day of application of the chemical on the host): 7 days to complete the engorgement and 7 days of observation, considering that a maximum of 14 days should be enough for the chemical to cause death of the ectoparasites, (according to Acatak[®], Novartis manufacturer information).

The nymphs fed on the host rabbits treated with 20 mg/Kg of fluazuron presented alterations only in the midgut cells named Spent cells, which accumulated less blood in the endosomes and digestive vacuoles, and showed fewer digestive vacuoles and hematin residual bodies (Oliveira et al., 2013). In the exposition with 40 mg/Kg of fluazuron, the individuals displayed alterations in both digestive cell stages, i.e., Spent cells and Empty cells, as well as in the midgut lumen. Spent cells are smaller, with fewer endosomes, digestive vacuoles and residual bodies, while Empty cells showed small apex undulations and the lumen is evident (Oliveira et al., 2014). The fluazuron concentration of 80 mg/Kg caused the most significant damages to the midgut. The Spent cells are much smaller and with few and small endosomes, digestive vacuoles and residual bodies throughout the cytoplasm. The Empty cells are less frequently observed and show large invaginations in the plasma membrane, as well as extensive vacuolated regions, mainly next to the lumen, which contains few digestion residues (Oliveira et al., 2013, 2014). These data suggest that fluazuron would be inhibiting the synthesis and/or deposition of chitin used to form the peritrophic membrane, normally found in the midgut of arthropods (Matsuo et al., 2003). This membrane is responsible for the selective permeability of the midgut cell plasma membrane (Terra, 2001), for

limiting the area where the digestive events occur (Shen et al., 1999; You et al., 2003) and for protecting the midgut epithelium from microorganisms and digestive enzymes (Matsuo et al., 2003). The increase in the concentrations of fluazuron intensified the damages in the midgut cells and the peritrophic membrane impairment. The epithelial cells have important functions: absorption of the blood ingested, lysis of blood cells in the digestive vacuoles, formation of digestion residues and release of nutrients after the digestion process (Agbede; Kemp, 1985; Koh et al., 1991; Agyei; Runham, 1995). The partial or complete absence of the peritrophic membrane allow the direct contact of digestive enzymes and the epithelial cells, which would be damaged and have their important functions affected (Sonenshine, 1991; Harrison, 1999). The whole metabolism of the organ would consequently be impaired, hindering the viability of the individual, once Ixodidae ticks feed once in each stage, obtaining all the nutrients they need to grow and develop from a single blood meal (Sonenshine, 1991; Harrison, 1999). Gelbic et al. (2002) reported a decrease in hemolysis (lysis of blood elements) in the midgut of *Culex quinquefasciatus* larvae subjected to methopren. Lethal mechanism were observed by Borges et al. (2004) in the midgut cells of *Aedes aegypti* subjected to diflubenzuron.

Thus, the potential of fluazuron to interfere in the digestive processes of *R. sanguineus* s. l. nymphs fed on inoculated hosts was confirmed. The chemical affected the absorption of the blood ingested, minimizing the provision of nutrients to the nymphs, which would not be able to develop and evolve to the following instar. Such evidence point this arthropod growth regulator (AGR) as a promising alternative to control the ectoparasites in this stage of development.

Dinotefuran: action on the female reproductive system

The neonicotinoids, a chemical group with the potential of controlling several pests, have grown in the market since the commercialization of pyrethroids, and are currently considered a promising control strategy, with excellent chemical and biological properties, presenting low toxicity to the mammals (Nauen; Bretschneider, 2006).

Dinotefuran belongs to the third generation of neonicotinoids (Wakita et al., 2003; 2005; 2011), and its main commercial formulations are Vectra 3D[®] and Protetor Pet[®].

This chemical is efficient against a wide variety of pests, including *Periplaneta americana*, *C. quinquefasciatus*, *Anopheles gambia*, *Aedes aegypti*, and is able to eliminate even strains that are resistant to other groups of insecticides, such as the pyrethroids, which demonstrates its effectiveness and excellent insecticide properties (Kiriya; Nishimura et al., 2002; Wakita et al., 2003; Corbel et al., 2004).

Toxicological and ecotoxicological studies have demonstrated that the dinotefuran presents low toxicity for mammals, birds, aquatic animals (Kagabu, 1997; Uneme et al., 1999; Wakita et al., 2005), and the environment as well (Wakita et al., 2005; EPA, 2009; Wakita, 2011). Its chemical, physical, biological and toxicological properties place the chemical in an important position, stimulating further research on its effects and action mechanisms.

Female reproductive system

Studies have been aimed at analyzing the effects of different concentrations of dinotefuran on the germ cells of semi-engorged *R. sanguineus* s. l. females (Oliveira et al., 2016; 2017).

Oliveira et al. (2016) analyzed semi-engorged *R. sanguineus* s. l. exposed to the concentrations of 5000, 6250 and 8334 ppm of dinotefuran and observed that oocytes I, II and III underwent more significant alterations as the concentrations increased, including the loss of chorion, which enabled the chemical to penetrate the cell via the germ cell plasma membrane. Once the toxic is installed in the interior of the cell, it damages the organelles, which undergo lysis in the autophagic vacuoles (Oliveira et al., 2016), corroborating Oliveira et al. (2009), Roma et al. (2010) and Vendramini et al. (2012), who studied *R. sanguineus* s. l. ticks exposed to fipronil, permethrin and andiroba oil, respectively.

Moreover, the high level of vacuolation in oocytes II and III restricts the area that would be occupied by yolk granules (Oliveira et al., 2016). The decrease in the number of granules would impair, partially or totally, the development of oocytes, affecting the progression to more advanced developmental stages (IV and V) to culminate in the mature cell stage, capable of being fertilized (Oliveira et al., 2017).

Oocytes IV and V did not undergo extensive damages as the ones in initial developmental stages. The concentration of 5000 ppm did not affect these oocytes, while at the concentration of 6250 ppm rare alterations were detected, i.e., the membrane showed few pleats and rare vacuoles were observed in the cytoplasm. The individuals exposed to 8334 ppm of dinotefuran showed vacuoles among the yolk granules of oocytes IV, and oocytes V displayed pleats in the membrane, as well as less dense yolk granules, located in the central region. Ruptured granules and vacuoles were observed in the peripheral region (Oliveira et al., 2016; 2017). These data indicate that, even if the oocytes in early developmental stages managed to survive, trying to synthesize the yolk proteins on a small

scale, they could be affected by the dinotefuran in more advanced stages (IV and V) (Oliveira et al., 2008). The presence of the chorion, (Oliveira et al., 2005), responsible for preserving the structure of the future embryo and, consequently, the species (Denardi et al., 2004), would protect the eggs against mechanical impacts and temperature variations, preventing desiccation, minimizing predation and ensuring gas exchange (Hinton, 1982). As this resistant membrane represented a barrier to be overcome by the dinotefuran, it gave the oocyte more permeability, hindering the penetration of the chemical (Oliveira et al., 2017). This process was reported by Oliveira et al. (2008) and Roma et al. (2010).

Still regarding the damages caused by dinotefuran, it is important to emphasize that the ovary wall of semi-engorged *R. sanguineus* s. l. females underwent alterations after the exposure; however, only in the individuals subjected to the concentration of 8334 ppm (Oliveira et al., 2016). The epithelium, instead of small cuboid cells with rounded nuclei, showed flat cells with pyknotic nuclei (Oliveira et al., 2016). Such damages will certainly prevent the organ from performing its functions, such as forming the pedicel, structure that fixes the oocyte to the ovary wall and provides exogenous yolk elements to constitute the yolk granules, supporting the growth and development of germ cells (Oliveira et al., 2016; 2017). Therefore, the dinotefuran affected the number of mature oocytes, i.e., decreased the number of those that would complete vitellogenesis, consequently affecting the preservation of the species.

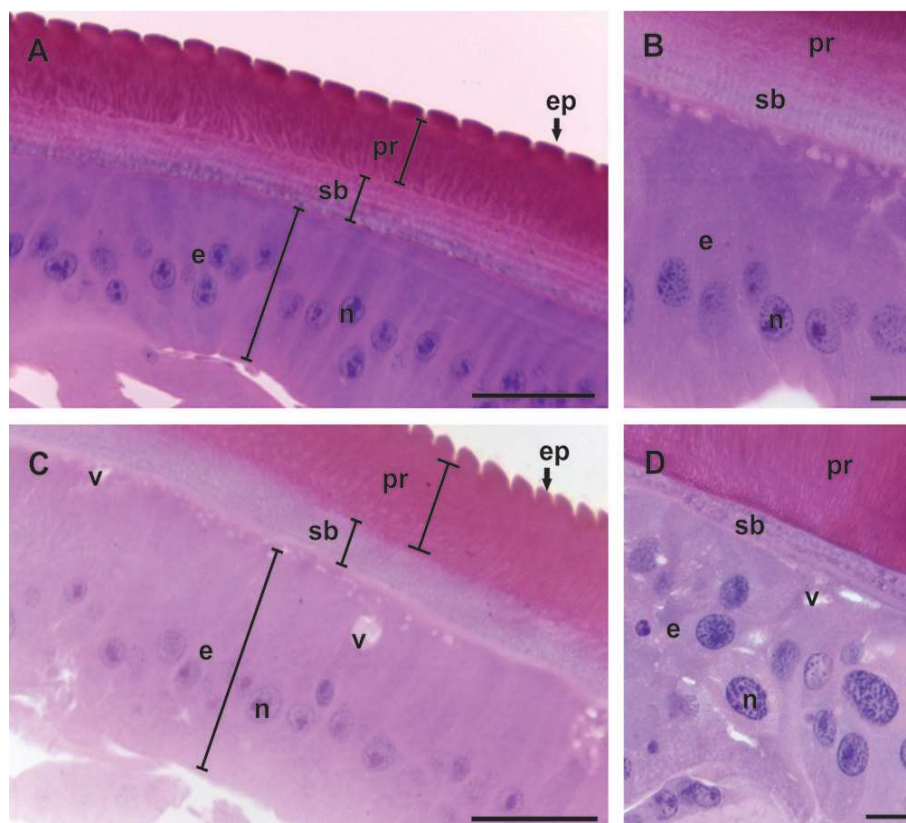
Synergistic components: action on the integument

The extensive and indiscriminate use of acaricides contaminate the environment and the toxicity of the chemicals is affect not only the target organisms, but also other animals and the human beings as well. Moreover, the selection of resistant populations is another important consequence of this practice (Dantas-Torres, 2008).

According to Araújo (2015), several studies have demonstrated the occurrence of *R. (Boophilus) microplus* populations resistant to cypermethrin (Silva et al., 2005; Reck et al., 2014), fipronil (Castro-Janer et al., 2010; Reck et al., 2014), chlorpyrifos, amitraz, ivermectin and fluazuron (Reck et al., 2014). In *R. sanguineus* s. l., studies have reported resistance to amitraz (Miller et al., 2001; Silva et al., 2005), cypermethrin, deltamethrin and coumaphos (Miller et al., 2001; Borges et al., 2007).

Due to the great medical and veterinary importance of the ticks and the emergence of resistant populations, several studies on new bioactives have been developed, aiming to find safer and efficient products (synthetic or natural) to control these pests (Papa et al., 2011). Vectra® 3D is one of the recently launched synthetic products, a combination of permethrin (pyrethroid), dinotefuran (neonicotinoid) and pyriproxyfen (pyridine) the product has shown a persistent acaricide and repellent potential, and the combination of three active ingredients in a single acaricide results in a synergic effect able to fight infestations and cause the death of the target organisms.

Figure 34 – Histological sections of the integument of semi-engorged *R. sanguineus* s. l., stained with Hematoxylin-eosin (HE). (A-B) Group Control, (C-D) Group treatment. ep= epicuticle; e= epidermis; n= nucleus; sb= subcuticle; pr= procuticle; v= vacuoles



Bars: (A; C) 50 µm; (B; D) 10 µm

Pyriproxyfen, one of the compounds of Vectra® 3D, is manufactured by the companies *Sumitomo Chemical Co. Ltda.*, *Syngenta* and *BePharm Ltda.* In the EUA, it is sold under the commercial name *Nylar*, while in Europe it is sold as *Cyclio* (Virbac) and *Exil Flea Free TwinSpot* (Emax). In Brazil, it is commercialized under the name *Tiger 100 CE* and has been used to protect cotton crops against flies (Ishaaya et al., 1995) and also against *Aedes aegypti*, vector of dengue and chikungunya diseases. The substance is analogue to the juvenile hormone, a growth regulator that acts on the endocrine system of the insects, interrupting the life cycle by producing infertile eggs and

blocking the development of larvae, preventing reproduction (Palma et al., 1993).

Camargo-Mathias et al. (personal communication) have developed studies to evaluate the morphological alterations caused to the integument of *R. sanguineus* s. l. females exposed to Vectra® 3D (54.45 mg/mL of dinotefuran, 396.88 mg/mL of permethrin and 4.84 mg/mL of pyriproxyfen) (Figure 34). The authors demonstrated that Vectra® 3D is efficient to control *R. sanguineus* s. l. ticks, not only for its neurotoxic action, but also for affecting the structural organization of the integument, disarranging the epithelial cells, responsible for secreting and maintaining the layers of this exoskeleton. Thus, the product interferes in the efficiency of the first protection barrier of the individuals, leaving them exposed to climatic and environmental impacts.

Deltamethrin: action on the synganglion and female reproductive system

Deltamethrin, a semi-synthetic pyrethrin type II, is a potent calcineurin inhibitor. It was firstly described by Elliott et al. (1974) and registered by the Environmental Protection Agency–EPA (Deltamethrin Summary Document Registration Review, 2010). This chemical interferes in several cell processes and signal transduction pathways, blocking the transmission of nerve impulses and causing paralysis to the insect (Oga; Camargo; Batistuzzo, 2014; Rusnak; Mertz, 2000).

This chemical is widely used to control spiders, fleas, ticks, carpenter ants, cockroaches and bugs, causing immediate paralysis and death by altering the nervous system organs (ETN, 1995; Deltamethrin. Pesticide Information, 2004; Pereira et al., 2017). Its active ingredient is

registered as Butox P CE 25[®], Butoflin[®], Butoss[®], Cislin[®], Crackdown[®], Decis[®], Delsekle[®], Deltaphos[®], K-Othrin[®] and K-Otek[®] (Briggs; Council, 1992).

The toxic effects of deltamethrin are less harmful to mammals, once these animals have higher body temperature, are bigger and have less sensitive sodium channels (Bradberry et al., 2005). The DL₅₀ of deltamethrin orally inoculated in rats was 5000 mg/Kg diluted in aqueous media (Pesticide Residues In Food, 2000: Deltamethrin, 2001), for *R. sanguineus* s. l. larvae the DL₅₀ was 3.2 mg/Kg (Borges et al., 2007).

Synganglion

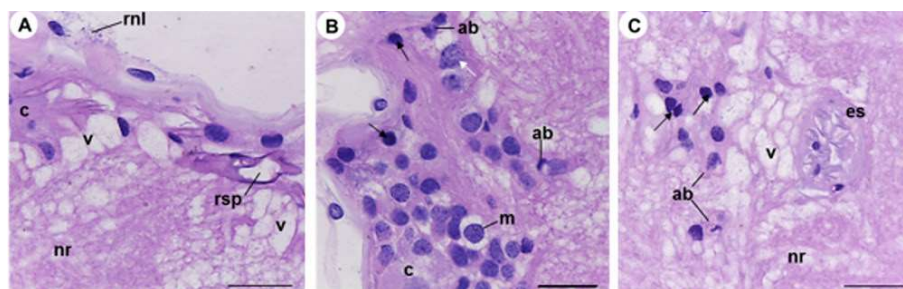
Currently, the most widely used chemical acaricides target the central nervous system (synganglion), once this organ is responsible for controlling all the systemic functions of the ticks. In this sense, Pereira et al. (2017) provided the first information on the effects of deltamethrin on the synganglion of unfed *R. sanguineus* s. l. females, using the commercial product Butox[®] P CE25, of which deltamethrin is the active ingredient.

In that study, the females were exposed to the concentrations of 1.5 ppm (23 times lower than the one recommended by the manufacturer), 3.12 ppm (11 times lower) and 6.25 ppm (5 times lower). The results of the morphological analyses showed dose-dependent alterations in the synganglion morphology (mainly in the regions of the cortex and neuropile), i.e., as the concentrations increased, more significant damages were observed (Pereira et al., 2017).

The concentration of 6.25 ppm caused significant alterations in all the regions of the synganglion, confirming the high toxicity of the chemical: a) damages to the peripheral membranes (neurilemma and perineurium) (Figure 35A), which act as selective barriers for the penetration of

substances in the organ and support the metabolic regulation of the neural activities through the glial cells; b) cortical region causing a high level of disorganization and degeneration in the tissue, mainly altering the cytoplasm of the neuron bodies, significant vacuolation of the cytoplasm, and cells in different stages of apoptotic cell death (Figure 35B); c) irregular folds throughout the subperineurium (membrane that separates the cortical region from the neuropile) and ruptures in some parts of the organ (Figure 35A), allowing the neuron bodies to move from the cortex region to the neuropile (Figure 35C), causing a complete structural disorganization of the organ with consequent loss of functionality; and d) disarrangement of the neural fibers in the neuropile region, causing the emergence of empty spaces in the extracellular matrix, mainly in the regions next to the esophagus opening (Figure 35C).

Figure 35 – Histological sections of the synganglion of unfed *Rhipicephalus sanguineus* l.s. females exposed to 6.25 ppm of deltamethrin and stained with HE. (A) Detail of the damages in the peripheral membranes and subperineurium. (B) Disorganization and degeneration of the cortical region (c). (C) Invasion of the neuron bodies in the neuropile region (nr) next to the esophagus (es) due to the rupture of the subperineurium (rsp). rnl = rupture of the neurilemma; v = vacuolization; ab = apoptotic body; m = chromatin marginalization; black arrow = pyknotic nuclei; white arrow = nuclear hypertrophy



Bars: (A-C) 20 μ m

A similar process of gradual degeneration of the central nervous system in *R. sanguineus* s. l. was observed by Roma et al. (2013), who developed studies with another pyrethroid, the permethrin. Thus, the results found by Pereira et al. (2017), confirmed the neurotoxic potential of deltamethrin, even in lower concentrations than the ones recommended by the manufacturer, and also revealed the potential of the chemical to cause total tissue disorganization. The authors also demonstrated that deltamethrin causes alterations in systemic functions, once the synganglion is a key organ in the tick metabolic processes, and, when morphologically disorganized, is unable to control other important processes, such as feeding and reproduction (ovary development).

Female reproductive system

The ovary of *R. sanguineus* s. l. was studied by Camargo-Mathias et al. (Camargo-Mathias et al., 2017), who analyzed semi-engorged females immersed in the concentrations of 25, 50, 100, and 200 ppm of deltamethrin (Figure 36). These concentrations were established according to the results of DL_{50} in larvae from the same species exposed to deltamethrin (Borges et al., 2007).

This study demonstrated that the chemical was efficient to inhibit ovary growth, causing damages to the female germ cells on a dose-dependent basis, i.e., the most significant alterations were observed in the exposures using the concentrations of 100 and 200 ppm. In general, the compound affected: a) the morphology of the oocytes, which had their shape changed from round to irregular; b) the composition and organization of the yolk granules, which underwent fusion processes resulting in extremely large and mischaracterized granules; c) the cytoplasm, causing intense vacuolation, even in the

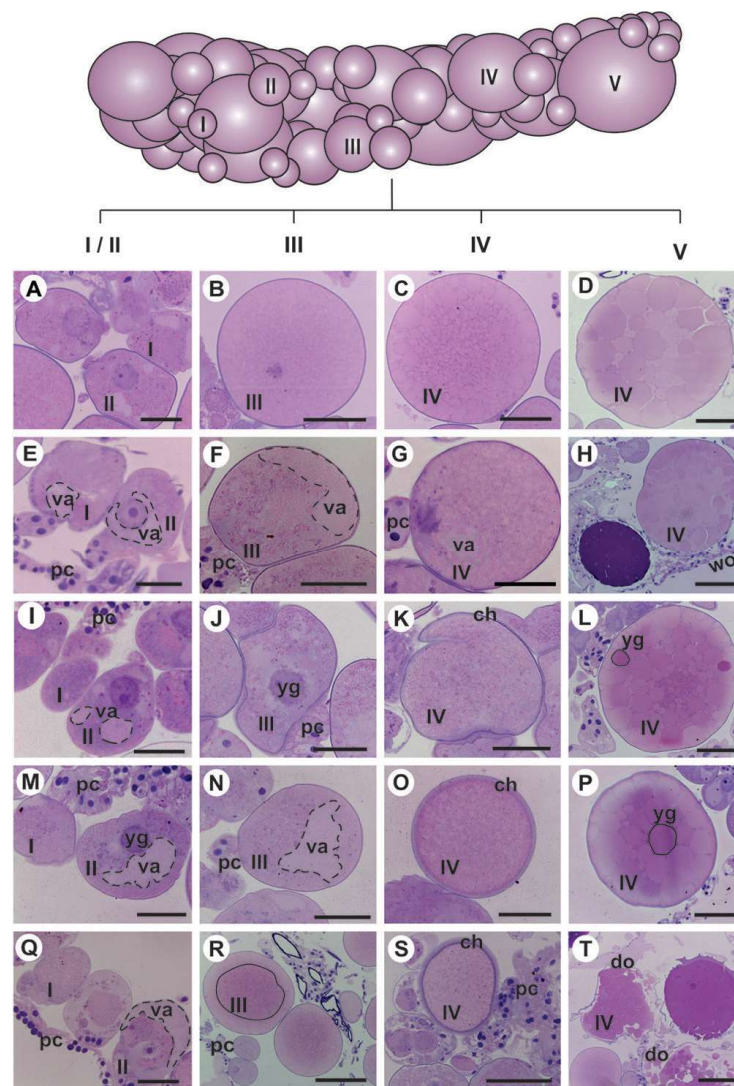
ones in early stages of development and d) the chorion, which was partially secreted, once it was thinner, probably allowing the oocyte to lose its original form (Camargo-Mathias et al., 2017).

Therefore, it was established that the chemical interfered directly in the vitellogenesis, causing significant cytoplasmic disorganization the oocytes, marked by intense vacuolation. Moreover, it caused serious damages to the germ vesicles (nuclei) of some oocytes, such as hypertrophy, chromatin fragmentations, and the formation of apoptotic bodies (strongly stained by hematoxylin), clearly indicating that those cells would be unviable and would not be able to advance the developmental stages. Alterations in the synthesis and secretion of the chorion (secreted in the final developmental stages) were also observed.

This study confirmed that deltamethrin acts not only on the target organ (central nervous system) of *R. sanguineus* s. l. ticks, but also on the reproductive system of the females, preventing them from originating new individuals.

Figure 36 – Vitellogenesis alterations histology of *R. sanguineus* s. l. ticks caused by the exposure to deltamethrin. Scheme showing oocytes in different stages of development (I-V) adhered to the ovary wall. (A-D) Histology of the ovary of ticks belonging to the control group where oocytes are observed at different stages of development and with preserved morphology. (E-F) Histology of the ovary of ticks belonging to the group exposed to the concentration of 25 ppm of deltamethrin in which it is evident the beginning of the loss of original rounded morphology of oocytes as well increase of cytoplasmic vacuolization (va) and with evident wall of the ovary (wo). (I-L) Histology of the ovary of ticks belonging to the group exposed to the concentration of 50 ppm of deltamethrin in which it is evident the increase

of cytoplasmatic vacuolization (va) of the oocytes in I, and the loss of yolk granules in the periphery of the oocyte in L. (M-P) Histology of the ovary of ticks belonging to the group exposed to the concentration of 100 ppm of delta-methrin in wich it is evident the increase of cytoplasmatic vacuolization (va) of the oocytes in M and N. Loss of yolk granules in the periphery and evident fusion of yolk granules in P. (Q-T) Histology of the ovary of ticks belonging to the group exposed to the concentration of 200 ppm of deltamethrin in wich it is observed extensive cytoplasmatic vacuolization in Q. In T it is observed a degenerated oocyte (dg) with loss of yolk granules as well as total loss of oocytes form.



Bars: (A-T) 50 mm

DISCUSSÃO GERAL

O presente estudo teve como objetivo trazer à luz informações sobre o efeito *in vivo* do EGS de carrapatos *R. sanguineus* s. l., em ratos Wistar com LPN induzida, bem como avaliar a toxicidade sistêmica do mesmo em ratos saudáveis, proposta essa decorrente do fato de já se saber que bioativos presentes na saliva de algumas espécies poderiam ser utilizados com fins terapêuticos e antitumorais (DREWES et al., 2012; SOUZA et al., 2015).

Nessa perspectiva, Abreu e colaboradores em 2014 desenvolveram um estudo que demonstrou o efeito inibidor promovido pelo extrato da glândula salivar de fêmeas de carrapatos *R. sanguineus* s. l. sobre tumor de Walker 256 implantado em pata de ratas Wistar, bem como da exposição de células tumorais ao Amblyomin-X, uma proteína extraída do extrato da glândula salivar de carrapatos *Amblyomma cajennense* (CHUDZINSKI-TAVASSI et al., 2016).

No entanto, apesar de terem sido encontrados resultados animadores dentro desta temática, para que a saliva do carrapato se torne uma alternativa segura para utilização, necessita-se investigar o seu potencial terapêutico (em decorrência de eventuais efeitos tóxicos), o que garantiria a obtenção da informação sobre a ocorrência ou não de toxicidade quando da exposição aos bioativos aí presentes.

A exposição de ratas Wistar aos extratos de glândulas salivares de fêmeas de carrapatos *R. sanguineus* s. l. nas concentrações de 10, 40 e 80 µg/µL forneceram resultados que mostraram que a menor concentração (10 µg/µL) não causou toxicidade sistêmica nos animais, apenas causou hepatotoxicidade, demonstrada por alterações morfológicas (vacuolização citoplasmática e desorganização nos cordões de hepatócitos), além da imunossupressão do EGS às células do sangue (diminuição de linfócitos e aumento de neutrófilos). A exposição as maiores concentrações (40 e 80 µg/µL) causaram toxicidade sistêmica, uma vez que o peso relativo do fígado diminuiu, bem como surgiram alterações morfohistológicas e histoquímicas (nos cordões de hepatócitos, vacuolização citoplasmática, acúmulo de vesículas lipídicas e picnose nuclear). Apenas na concentração de 80 µg/µL observou-se um aumento da frequência de células de Kupffer.

A literatura pertinente sobre essa temática tem descrito que sinais de toxicidade nos animais em decorrência de testes de toxicidade também podem ser definidos pela alteração no peso corporal, bem como pelo peso relativo dos órgãos (OECD, 2001; WALLIG et al., 2017). Além disso, alterações na morfologia do fígado também poderiam ser indicativas de toxicidade. Assim no presente trabalho confirmou-se a ocorrência de intoxicação sistêmica nas ratas

expostas às maiores concentrações, visto a observação de alterações provocadas pelas maiores concentrações do EGS.

Estudos com hepatocarcinomas (HCC), um tipo de câncer que compromete o fígado e que tem poucas chances de cura, principalmente devido a sua rápida progressão e a difícil detecção dos sintomas (TSUCHIYA et al., 2015), tem utilizado as denominadas lesões pré-neoplásicas (LPN) como modelos. O HCC tem sido induzido experimentalmente por meio de químicos tais como: a dietilnitrosamina (DEN) e o 2-acetilaminofluoreno (2-AAF) agentes promotores de alteração e proliferação dos hepatócitos (GROOS et al., 2007; ITO et al., 2000; WILLIAMS et al., 1998).

Diante desse cenário, frequentemente são publicados estudos que buscam alternativas para se controlar o câncer hepático e, atualmente muito se tem investido em tratamentos que tenham como base bioativos com potencial anticarcinogênico, podendo os mesmos serem sintetizados por plantas ou mesmo por outros animais.

Estudos com bioativos de carrapatos (ABREU et al., 2014), tem colocado esses ectoparasitas num status diferente do de organismos praga, visto agora também serem os mesmos considerados importantes reservatórios destes potentes bioativos com as mais diversas funções (HOVIUS; LEVI; FIKRIG, 2008a), inclusive com muitas delas até agora pouco esclarecidas e até mesmo desconhecidas. Sabe-se que as glândulas salivares dos carrapatos são os locais onde a síntese desses bioativos ocorre incluindo: esterases, prostaglandinas, glicoproteínas e lipoproteínas as quais além de atuarem nos hospedeiros por ocasião da sua alimentação (BINNINGTON, 1978; BOWMAN; DILLWITH; SAUER, 1996; WALKER; FLETCHER; GILL, 1985), teriam também, devido as suas propriedades, ação terapêutica (AKAGI et al., 2012; SIMONS et al., 2011).

Os dados aqui obtidos trouxeram à luz informações sobre o papel terapêutico do EGS em LPNs instaladas no fígado de ratos Wistar. Ficou demonstrado que o fígado passou por alterações em razão da instalação das LPN, resultado já de certa forma esperado. Observou-se aumento do peso relativo do fígado dos ratos do grupo LPN acompanhado de alterações estruturais, demonstradas morfológicamente (desorganização dos cordões hepáticos, aumento da quantidade de tecido conjuntivo, presença de hepatócitos hipertrofiados e com citoplasma vacuolizado e presença de hepatócitos com núcleos apoptóticos.).

Quando os animais LPN foram expostos ao EGS verificou-se a diminuição da extensão dos danos presentes no tecido em resposta a lesão induzida, indicando que o extrato não causou toxicidade aos animais e, ao contrário, foi capaz de inibir a progressão das lesões, muito embora ainda tenham sido observados nesses fígados hepatócitos que não estavam organizados em

cordões e hepatócitos com alguma vacuolização citoplasmática, além da presença mais intensa de tecido conjuntivo no órgão. Sabe-se que tecidos que sofreram injúrias, passaram por processos de cicatrização realizados pela proliferação do tecido conjuntivo, o que, dependendo da extensão da lesão, provoca uma desorganização estrutural no tecido e no caso do fígado, alterando a disposição dos hepatócitos, o que certamente interferirá no trajeto da circulação sanguínea no interior do órgão, afetando sua eficiência. Esses dados corroboraram aqueles de Furtado et al. (2009) que registraram que no fígado de animais expostos ao DEN e ao 2-AAF o tecido hepático sofreu alterações morfológicas devido não só a um aumento na síntese de fibras reticulares, mas também devido a um espessamento das mesmas.

No estudo aqui apresentado, também procedeu-se a investigação *in vitro* do efeito dos acaricidas naturais timol e carvacrol sobre células da linhagem RML-15 derivadas de carrapatos, trabalho desenvolvido em parceria com o Tick Cell Biobank na Universidade de Liverpool e com o objetivo de se minimizar o uso de animais *in vivo* para testes de eficiência de acaricidas, neste caso servindo como estratégia para controle dos carrapatos da espécie *R. sanguineus* s. l. que tem como principal hospedeiro o cão, embora também possa parasitar outros mamíferos, inclusive o homem (REY, 2008). A substituição de animais *in vivo* atende as novas normas de uso de animais tanto para pesquisa como para o ensino, baixadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) (BRASIL, 2016). Assim sob essa perspectiva, o uso de linhagens de células obtidas de várias espécies de carrapatos vem ser uma alternativa neste tipo de pesquisa, visto que também o uso destas é menos oneroso financeiramente e de mais fácil reprodutibilidade nos estudos de identificação da eficiência de compostos desta natureza (BELL-SAKYI et al., 2007a; MANGIA et al., 2018).

Os resultados aqui obtidos mostraram que a exposição das células ao timol não alterou a viabilidade das mesmas em nenhuma das concentrações testadas. Já o carvacrol na concentração de 0,3 µL/mL matou mais de 70% das células e a de 0,06µL/mL matou cerca de 23% delas. Diferentemente dessas concentrações, Lima de Souza et al. (2019) utilizando o carvacrol na concentração de 100µL/mL, demonstraram que o acaricida não foi eficiente para matar as fêmeas adultas ingurgitadas de carrapatos *R. sanguineus* s. l., no entanto, causou danos no seu sistema reprodutor, representados por alterações morfológicas nos ovócitos e inibição da vitelogênese, inviabilizando a geração de novos indivíduos. É relevante considerar que fêmeas ingurgitadas apresentam maior resistência aos acaricidas do que aquelas em jejum (CAPERUCCI; CAMARGO-MATHIAS; BECHARA, 2009), além do fato de que as concentrações consideradas letais são diferentes para cada fase de vida e para cada diferente espécie de carrapato (GOMES et al., 2014).

A avaliação das alterações na morfologia das células RML-15, após exposição ao timol e ao carvacrol revelou que estas expostas as menores concentrações apresentaram-se com morfologia íntegra, estando algumas delas em divisão. As expostas às maiores concentrações do timol (0,014mg/mL e 0,07mg/mL) apresentaram alterações como: vacuolização citoplasmática, picnose e fragmentação nuclear. Segundo os resultados o carvacrol, foi o composto que causou as maiores alterações morfológicas, incluindo: perda dos limites celulares, picnose e fragmentação nuclear observadas já nas menores concentrações. Na maior concentração (0,3 µL/mL) não foram mais observadas células íntegras e sim apenas fragmentos destas. Outros trabalhos desenvolvidos demonstraram que o timol e o carvacrol foram citotóxicos para *R. sanguineus* s. l., visto terem sido observadas células em apoptose nas glândulas salivares e no singânglio destes indivíduos (MATOS et al., 2018), bem como a inibição do desenvolvimento dos ovócitos de fêmeas ingurgitadas (LIMA DE SOUZA et al., 2019).

Ainda com o objetivo de se detectar qual seria o tipo de morte celular envolvido quando as células RML-15 fossem expostas ao timol e ao carvacrol, aplicou-se a técnica da caspase-3/7, uma protease que, em resposta a sinais pró-apoptóticos, propagaria a morte celular programada (apoptose) (LECOEUR; DE OLIVEIRA-PINTO; GOUGEON, 2002). Os resultados mostraram que em todas as concentrações do timol, não houve marcação da caspase-3/7 corroborando os resultados anteriormente aqui descritos e que confirmaram que o timol não seria potencialmente citotóxico. Já na exposição ao carvacrol na concentração de 0,012uL/mL houve morte das células por apoptose, corroborando dados de Camargo-Mathias (2018).

Em linhas gerais o desenvolvimento do presente trabalho trouxe informações que demonstraram claramente que o uso dos acaricidas naturais timol e carvacrol poderia ser uma estratégia promissora para o controle de carrapatos, com vantagens adicionais sobre os acaricidas químicos tradicionais, visto que o timol agiu alterando a morfologia das células RML-15, e o carvacrol agiu induzindo a morte celular por apoptose. Ficou ainda, aqui demonstrado que esse tipo de estudo *in vitro* teria condições de substituir aqueles que fazem uso de animais *in vivo* para o desenvolvimento e testes de eficiência de novos acaricidas, sejam eles animais vertebrados para simular os hospedeiros e/ou invertebrados (os próprios carrapatos).

CONCLUSÕES

- a) A exposição aguda de ratas Wistar ao extrato (EGS) obtido a partir de glândulas salivares de fêmeas de carrapatos *R. sanguineus* s. l. na concentração de 10 µg/µL não causou toxicidade sistêmica nos animais, mas causou hepatotoxicidade (alterações morfológicas no fígado) e alterações hematológicas (aumento de neutrófilos e diminuição de linfócitos).
- b) A exposição aguda das ratas ao EGS de fêmeas de carrapatos *R. sanguineus* s. l. nas concentrações de 40 e de 80 µg/µL causou toxicidade sistêmica nos animais detectada por meio do aumento do peso relativo do fígado e da presença de alterações morfohistológicas.
- c) A concentração de 80 µg/µL do EGS foi a mais tóxica, inclusive aumentando o recrutamento de células de Kupffer.
- d) O EGS à concentração de 0,04 µg/µL reduziu os danos no fígado dos ratos LPN positivos.
- e) O timol alterou, *in vitro*, a morfologia das células da linhagem RML-15.
- f) O carvacrol foi citotóxico *in vitro*, para as células RML-15 e induziu a apoptose destas.

REFERÊNCIAS

- ABREU, M. R. DE; ROCHA, F. A.; FURQUIM, K. C. S.; ANHOLETO, L. A.; NOVAES, F. C. F.; MORSOLETO, M. J.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Salivary Glands of Female Ticks *Rhipicephalus sanguineus* Like a Potential Source of Molecules with Inhibitory Action: In vivo study with Walker 256 Tumor Cells. **Journal of Pharmaceutical Care & Health Systems**, v. 01, n. 04, p. 1–8, 2014..
- ABREU, R. M. M.; DE ABREU, M. R.; SANTOS, J. P.; HEBLING, L. M. G. F.; ANHOLETO, L. A.; DE SOUZA, J. R. L.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Morphological evaluation of the liver in Wistar rats inoculated with *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) salivary gland extracts. **Microscopy Research and Technique**, v. 81, n. 11, p. 1332–1338, 2018.
- AKAGI, E. M.; JÚNIOR, P. L. DE S.; SIMONS, S. M.; BELLINI, M. H.; BARRETO, S. A.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M. Pro-apoptotic effects of Amblyomin-X in murine renal cell carcinoma “in vitro”. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 66, p. 64–69, 2012.
- 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, 1 set. 2007.
- BINNINGTON, K. C. Sequential changes in salivary gland structure during attachment and feeding of the cattle tick, *Boophilus microplus*. **International Journal for Parasitology**, v. 8, n. 2, p. 97–115, 1978.
- BOWMAN, A. S.; DILLWITH, J. W.; SAUER, J. R. Tick salivary prostaglandins: Presence, origin and significance. **Parasitology Today**, v. 12, n. 10, p. 388–396, 1996.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.
- BRASIL. **Resolução Normativa N 33, de 18 de novembro de 2016** Brasília, DFCONCEA Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicação., , 2016. Disponível em: <http://www.mctic.gov.br/mctic/export/sites/institucional/institucional/concea/arquivos/legislacao/resolucoes_normativas/Resolucao-Normativa-CONCEA-n-33-de-18.11.2016-D.O.U.-de-21.11.2016-Secao-I-Pag.-05.pdf>. Acesso em: 20 maio. 2019
- 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.
- CAPERUCCI, D.; CAMARGO-MATHIAS, M. I.; BECHARA, G. H. Histopathology and Ultrastructure Features of the Midgut of Adult Females of the Tick *Amblyomma cajennense* Fabricius, 1787 (Acari: Ixodidae) in Various Feeding Stages and Submitted to Three Infestations. **Ultrastructural Pathology**, v. 33, n. 6, p. 249–259, 20 jan. 2009.
- CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M.; DE-SÁ-JÚNIOR, P. L.; SIMONS, S. M.; MARIA, D. A.; DE SOUZA VENTURA, J.; DE FÁTIMA CORREIA BATISTA, I.; FARIA, F.; DURÃES, E.; REIS, E. M.; DEMASI, M. A new tick Kunitz type inhibitor, Amblyomin-X, induces

tumor cell death by modulating genes related to the cell cycle and targeting the ubiquitin-proteasome system. **Toxicon**, v. 56, p. 1145–1154, 2010.

CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M.; MORAIS, K. L. P.; PACHECO, M. T. F.; PASQUALOTO, K. F. M.; DE SOUZA, J. G. Tick salivary gland as potential natural source for the discovery of promising antitumor drug candidates. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 77, p. 14–19, 2016.

DANTAS-TORRES, F. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): From taxonomy to control. **Veterinary Parasitology**, v. 152, n. 3, p. 173–185, 2008.

DANTAS-TORRES, F. Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. **Parasites & vectors**, v. 3, n. 26, p. 1–11, 2010.

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

DE OLIVEIRA-CRUZ, E. M.; COSTA-JUNIOR, L. M.; PINTO, J. A. O.; SANTOS, D. DE A.; ARAÚJO, S. A.; FÁTIMA, A.-B. M. DE; BACCI, L.; ALVES, P. B.; CAVALCANTI, S. C. DE H.; BLANK, A. F. Acaricidal activity of *Lippia gracilis* essential oil and its major constituents on the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 195, n. 1–2, p. 198–202, 2013.

DÍAZ-GONZÁLEZ, Á.; FORNER, A.; RODRÍGUEZ-DE-LOPE, C.; VARELA, M. New challenges in clinical research on hepatocellular carcinoma. **Rev esp enferM dig**, v. 108, p. 485–493, 2016.

DREWES, C. C.; DIAS, R. Y. S.; HEBEDA, C. B.; SIMONS, S. M.; BARRETO, S. A.; FERREIRA, J. M.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M.; FARSKY, S. H. P. Actions of the Kunitz-type serine protease inhibitor Amblyomin-X on VEGF-A-induced angiogenesis. **Toxicon**, 2012.

FARBER, E.; SARMA, D. S. Hepatocarcinogenesis: a dynamic cellular perspective. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, v. 56, n. 1, p. 4–22, jan. 1987.

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.

FURTADO, K. S.; PIRES, P. W.; JUSTULIN, L. A.; RODRIGUES, M. A. M.; FELISBINO, S. L.; BARBISAN, L. F. Metalloproteinases 2 and -9 activity during promotion and progression stages of rat liver carcinogenesis. **Journal of Molecular Histology**, 2009.

GOMES, G. A.; MONTEIRO, C. M. O.; JULIÃO, L. DE S.; MATURANO, R.; SENRA, T. O. S.; ZERINGÓTA, V.; CALMON, F.; MATOS, R. DA S.; DAEMON, E.; CARVALHO, M. G. DE. Acaricidal activity of essential oil from *Lippia sidoides* on unengorged larvae and nymphs of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) and *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). **Experimental Parasitology**, v. 137, p. 41–45, 1 fev. 2014.

GROOS, J.; BANNASCH, P.; SCHWARZ, M.; KOPP-SCHNEIDER, A. Comparison of mode of action of four hepatocarcinogens: A model-based approach. **Toxicological Sciences**,

v. 99, n. 2, p. 446–454, 2007.

HASCHEK, W. M.; ROUSSEAU, C. G.; WALLIG, M. A. **Fundamentals of toxicologic pathology**. 2nd. ed. Boston: Elsevier Inc., 2010.

HOVIUS, J. W. R.; LEVI, M.; FIKRIG, E. Salivating for Knowledge: Potential Pharmacological Agents in Tick Saliva. **Plos Medicine**, v. 5, n. 2, p. 202–208, 2008a.

HOVIUS, J. W. R.; LEVI, M.; FIKRIG, E. Salivating for Knowledge: Potential Pharmacological Agents in Tick Saliva. **PLoS Medicine**, v. 5, n. 2, p. e43, fev. 2008b.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK294452/>>. Acesso em: 21 maio. 2019.

ITO, T.; SHIRAKI, K.; SUGIMOTO, K.; YAMANAKA, T.; FUJIKAWA, K.; ITO, M.; TAKASE, K.; MORIYAMA, M.; KAWANO, H.; HAYASHIDA, M.; NAKANO, T.; SUZUKI, A. Survivin promotes cell proliferation in human hepatocellular carcinoma. **Hepatology**, v. 31, n. 5, p. 1080–1085, maio 2000.

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

KAUFMAN, W. R. Organ culture of ixodid-tick salivary glands. **Experimental and Applied Acarology**, 1990.

KAZIMIROVA, M.; STIBRANIOVA, I. Tick salivary compounds their role in modulation of host defences and pathogen transmission. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 3, n. 43, 2013.

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, 31 mar. 2013.

LAGE, T. C. D. A.; MONTANARI, R. M.; FERNANDES, S. A.; DE OLIVEIRA MONTEIRO, C. M.; DE OLIVEIRA SOUZA SENRA, T.; ZERINGOTA, V.; CALMON, F.; DA SILVA MATOS, R.; DAEMON, E. Activity of essential oil of *Lippia triplinervis* Gardner (Verbenaceae) on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v. 112, n. 2, p. 863–9, fev. 2013.

LECOEUR, H.; DE OLIVEIRA-PINTO, L. M.; GOUGEON, M.-L. Multiparametric flow cytometric analysis of biochemical and functional events associated with apoptosis and oncosis using the 7-aminoactinomycin D assay. **Journal of immunological methods**, v. 265, n. 1–2, p. 81–96, 1 jul. 2002.

LIMA DE SOUZA, J. R.; OLIVEIRA, P. R. DE; ANHOLETO, L. A.; ARNOSTI, A.; DAEMON, E.; REMEDIO, R. N.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Effects of carvacrol on oocyte development in semi-engorged *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* females ticks (Acari: Ixodidae). **Micron**, v. 116, n. June 2018, p. 66–72, 2019.

LOPEZ, P. M.; VILLANUEVA, A.; LLOVET, J. M. Systematic review: evidence-based management of hepatocellular carcinoma – an updated analysis of randomized controlled trials. **Aliment Pharmacol Ther Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 23, p.

1535–1547, 2006.

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, 31 dez. 2018.

MARTINEZ, G. R.; LOUREIRO, A. P. M.; MARQUES, S. A.; MIYAMOTO, S.; YAMAGUCHI, L. F.; ONUKI, J.; ALMEIDA, E. A.; GARCIA, C. C. M.; BARBOSA, L. F.; MEDEIROS, M. H. G.; DI MASCIO, P. Oxidative and alkylating damage in DNA. **Mutation research**, v. 544, n. 2–3, p. 115–27, nov. 2003.

MATOS, R. 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, dez. 2014.

MATOS, R. S.; DAEMON, E.; DE OLIVEIRA MONTEIRO, C. M.; SAMPIERI, B. R.; MARCHESINI, P. B. C.; DELMONTE, C.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Thymol action on cells and tissues of the synganglia and salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato females (Acari: Ixodidae). **Ticks and Tick-borne Diseases**, 2018.

MCMANUS, J. F. A. **Histological demonstration of mucin after Periodic Acid** Nature, 1946.

MICHAEL, B.; YANO, B.; SELLERS, R. S.; PERRY, R.; MORTON, D.; ROOME, N.; JOHNSON, J. K.; SCHAFER, K. Evaluation of Organ Weights for Rodent and Non-Rodent Toxicity Studies: A Review of Regulatory Guidelines and a Survey of Current Practices. **Toxicologic Pathology**, v. 35, n. 5, p. 742–750, 6 ago. 2007.

MORENO, F. S.; RIZZI, M. B. S. L.; DAGLI, M. L. Z.; PENTEADO, M. V. C. Inhibitory effects of β -carotene on preneoplastic lesions induced in Wistar rats by the resistant hepatocyte model. **Carcinogenesis**, v. 12, n. 10, p. 1817–1822, 1 out. 1991.

MULENGA, A.; BLANDON, M.; KHUMTHONG, R. The molecular basis of the *Amblyomma americanum* tick attachment phase. **Experimental and Applied Acarology**, v. 41, n. 4, p. 267–287, 2 maio 2007.

OECD. OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method INTRODUCTION. 2001.

OLIVEIRA, C. J. F.; SÁ-NUNES, A.; FRANCISCHETTI, I. M. B.; CARREGARO, V.; ANATRIELLO, E.; SILVA, J. S.; SANTOS, I. K. F. M.; RIBEIRO, J. M. C.; FERREIRA, B. R. Deconstructing tick saliva: Non-protein molecules with potent immunomodulatory properties. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, p. 10960–10969, 2011.

PÉREZ-CARREÓN, J. I.; LÓPEZ-GARCÍA, C.; FATTEL-FAZENDA, S.; ARCE-POPOCA, E.; ALEMÁN-LAZARINI, L.; HERNÁNDEZ-GARCÍA, S.; LE BERRE, V.; SOKOL, S.; FRANCOIS, J. M.; VILLA-TREVIÑO, S. Gene expression profile related to the progression of preneoplastic nodules toward hepatocellular carcinoma in rats. **Neoplasia (New York, N.Y.)**, v. 8, n. 5, p. 373–83, maio 2006.

PITOT, H. C. Animal models of neoplastic development. **Developments in biologicals**, v. 106, p. 53–7; discussion 57–9, 143–60, 2001.

REY, L. **Parasitologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2008.

SAUER, J. R.; ESSENBERG, R. C.; BOWMAN, A. S. **Salivary glands in ixodid ticks: Control and mechanism of secretion** *Journal of Insect Physiology*, 2000.

SCHRAUF, S.; MANDL, C. W.; BELL-SAKYI, L.; SKERN, T. Extension of Flavivirus Protein C Differentially Affects Early RNA Synthesis and Growth in Mammalian and Arthropod Host Cells. *Journal of Virology*, v. 83, n. 21, p. 11201–11210, 2009.

SCOLASTICI, C.; DE CONTI, A.; TESTONI CARDOZO, M.; PRATES ONG, T.; PURGATTO, E.; ADERUZA HORST, M.; HEIDOR, R.; SILVA FURTADO, K.; KEMPFER BASSOLI, B.; SALVADOR MORENO, F. β -Ionone Inhibits Persistent Preneoplastic Lesions During the Early Promotion Phase of Rat Hepatocarcinogenesis: TGF- α , NF- κ B, and p53 as Cellular Targets. *Nutrition and Cancer*, v. 66, n. 2, p. 234–241, 2014.

SEMPLE-ROBERTS, E.; HAYES, M. A.; ARMSTRONG, D.; BECKER, R. A.; RACZ, W. J.; FARBER, E. Alternative methods of selecting rat hepatocellular nodules resistant to 2-acetylaminofluorene. *International journal of cancer*, v. 40, n. 5, p. 643–5, 15 nov. 1987.

SIMONS, S. M.; JÚNIOR, P. L. DE S.; FARIA, F.; BATISTA, I. DE F. C.; BARROS-BATTESTI, D. M.; LABRUNA, M. B.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M. The action of *Amblyomma cajennense* tick saliva in compounds of the hemostatic system and cytotoxicity in tumor cell lines. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, v. 65, n. 6, p. 443–450, 2011.

SOLT, D.; FARBER, E. New principle for the analysis of chemical carcinogenesis. *Nature*, v. 263, p. 701–703, 1976.

SONESHINE, D. E.; ROE, M. R. **Biology of Ticks Vol. 1**. 2nd. ed. New York: Oxford University Press, 2014.

SOUZA, A. C. P.; SZABÓ, M. P. J.; OLIVEIRA, C. J. F.; SILVA, M. J. B. Exploring the anti-tumoral effects of tick saliva and derived components. *Toxicon*, v. 102, p. 69–73, 2015.

TANNAPFEL, A.; WITTEKIND, C. Genes involved in hepatocellular carcinoma: deregulation in cell cycling and apoptosis. *Virchows Archiv*, v. 440, n. 4, p. 345–352, 6 abr. 2002.

TSUCHIYA, N.; SAWADA, Y.; ENDO, I.; SAITO, K.; UEMURA, Y.; NAKATSURA, T. Biomarkers for the early diagnosis of hepatocellular carcinoma. *World Journal of Gastroenterology*, v. 21, n. 37, p. 10573, 7 out. 2015.

WALKER, A. R.; FLETCHER, J. D.; GILL, H. S. Structural and histochemical changes in the salivary glands of *Rhipicephalus appendiculatus* during feeding. *International Journal for Parasitology*, 1985a.

WALKER, A. R.; FLETCHER, J. D.; GILL, H. S. Structural and histochemical changes in the salivary glands of *Rhipicephalus appendiculatus* during feeding. *International journal for parasitology*, v. 15, n. 1, p. 81–100, fev. 1985b.

WALLIG, M. A.; HASCHEK, W. M.; ROUSSEAUX, C. G.; BOLON, B. **Fundamentals of Toxicologic Pathology**. 3rd. ed. London: Elsevier, 2017.

WILLIAMS, G. M.; IATROPOULOS, M. J.; WANG, C. X.; JEFFREY, A. M.; THOMPSON, S.; PITTMAN, B.; PALASCH, M.; GEBHARDT, R. Nonlinearities in 2-

Acetylaminofluorene Exposure Responses for Genotoxic and Epigenetic Effects Leading to Initiation of Carcinogenesis in Rat Liver. **Toxicological Sciences**, v. 45, n. 2, p. 152–161, out. 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guide to early cancer diagnosis**. [s.l: s.n.].

YU, M. C.; YUAN, J.-M. Environmental factors and risk for hepatocellular carcinoma. **Gastroenterology**, v. 127, n. 5 Suppl 1, p. S72-8, nov. 2004.