UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS – RIO CLARO

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

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

LUÍS ADRIANO ANHOLETO

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

Rio Claro - SP
2019

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

LUÍS ADRIANO ANHOLETO

Orientadora: Profa. Dra. Maria Izabel Souza Camargo

Coorientadora: Dra. Patrícia Rosa de Oliveira

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

Rio Claro – SP

2019

A596j

Anholeto, Luís Adriano

O Jambu (Acmella oleracea) e sua ação acaricida: Estudo dos efeitos sobre a morfofisiologia dos sistemas reprodutores masculino e feminino de Amblyomma cajennense (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) a ele expostos / Luís Adriano Anholeto. -- Rio Claro, 2019

236 p. : fotos

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

Orientadora: Maria Izabel Souza Camargo

Coorientadora: Patrícia Rosa de Oliveira

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

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

Essa ficha não pode ser modificada.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Rio Claro

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

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

AUTOR: LUÍS ADRIANO ANHOLETO
ORIENTADORA: MARIA IZABEL SOUZA CAMARGO
COORIENTADORA: PATRICIA ROSA DE OLIVEIRA

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

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

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

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

Profa. Dra. ELEN FERNANDA NODARI DRAGONI
x / x

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

Rio Claro, 27 de maio de 2019

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

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Melanie Klein

RESUMO

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

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

ABSTRACT

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

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

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Distribuição geográfica de *Amblyomma cajennense* sensu stricto, *A. sculptum* e *A. cajennense* sensu lato no Brasil. Elipses de linhas tracejadas incluem as localidades que foram amostradas durante três expedições de campo para coletas de carrapatos, sendo a primeira expedição em verde, a segunda em marrom e a terceira em amarelo. Adaptado de Martins et al. (2016). 23

Figura 2. Carrapatos *Amblyomma cajennense* sensu lato. **A.** Macho adulto. **B.** Fêmea adulta. Adaptado de Brites-Neto, Duarte e Martins (2015).....24

Figura 3. Carrapatos *Rhipicephalus microplus.* **A.** Macho adulto*.* **B.** Fêmea adulta. Adaptado de Brites-Neto; Duarte e Martins (2015). 26

Figura 4. Micrografia eletrônica de varredura dos testículos de *Amblyomma cajennense* sensu lato em jejum. **A.** Visão geral dos testículos (**t**) no opistossoma e ductos deferentes (**dd**). **B.** Detalhe da região proximal dos testículos (**t**) mostrando os ductos deferentes (**dd**). **C.** Visão geral do complexo de glândulas acessórias do aparelho genital (**gl**) e vesícula seminal (**vs**). **D.** Detalhe da superfície rugosa dos testículos, evidenciando os espermatocistos (**ec**) em seu interior. Tracejado = complexo de glândulas acessórias. **Barras:** A= 2mm; B-C= 1mm; D= 100µm. Adaptado de Anholeto et al. (2015).....27

Figura 5. Secções histológicas do sistema reprodutor de *Amblyomma cajennense* sensu lato após 10 dias de alimentação, coradas pela hematoxilina-eosina. **A.** Complexo multilobulado de glândulas acessórias (**gl**) e vesícula seminal (**vs**). **B**. Região proximal do testículo. **C.** Detalhe da região proximal, mostrando pontes citoplasmáticas entre as células germinativas (**seta**). **D.** Região mediana. **E.** Região distal. **F.** Detalhe da região distal evidenciando a presença das espermátides alongadas (**ea**). **cl =** células somáticas ao redor do lúmen; **ea =** espermátides alongadas; **ec =** espermatocistos; **l =** lúmen; **n =** núcleo; **tc =** tecido conjuntivo. Adaptado de Anholeto et al. (2015).....29

Figura 6. A-B. Microscopia eletrônica de varredura de ovário de fêmeas semi-ingurgitadas de carrapatos *Amblyomma cajennense* sensu lato mostrando ovócitos (**ov**) em vários estágios de desenvolvimento. Adaptado de Camargo-Mathias (2013). 32

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

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

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

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

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

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

endoplasmático rugoso; **va**= vacúolo autofágico; ***** = marginalização cromatínica. **Barras:** A= 2µm; B-D= 0,5 µm. 126

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A. aureolatum = *Amblyomma aureolatum*

A. cajennense = *Amblyomma cajennense*

A. hebraeum = *Amblyomma hebraeum*

A. oleracea = *Acmella oleracea*

A. sculptum = *Amblyomma sculptum*

A. triste = *Amblyomma triste*

Agc = *acessory gland complex*

BCSTM = *Brazilian Central of Studies on Ticks Morphology*

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

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

BOD = *Biochemical Oxygen Demand*

CAPES = Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CGEN = Conselho de Gestão do Patrimônio Genético

CL_{50} = Concentração letal de 50%

CPQBA = Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas

DMSO = Dimetilsulfóxido

E. canis = *Ehrlichia canis*

E. chaffeensis = *Ehrlichia chaffeensis*

E. ewingii = *Ehrlichia ewingii*

E. muris = *Ehrlichia muris*

E. risticii = *Ehrlichia risticii*

E. ruminantium = *Ehrlichia ruminantium*

EEAO = Ethanolic extract of *Acmella oleracea*

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

FMB = Febre Maculosa Brasileira

HE = Hematoxilina - Eosina

I.B. = Instituto de Biociências

MET = Microscopia Eletrônica de Transmissão

O. moubata = *Ornithodoros moubata*

O. rostratus = *Ornithodoros rostratus*

PAS = ácido períodico - Schiff

R. appendiculatus = *Rhipicephalus appendiculatus*

R. evertsi evertsi = *Rhipicephalus evertsi evertsi*

R. microplus = *Rhipicephalus microplus*

R. sanguineus = *Rhipicephalus sanguineus*

R. simus = *Rhipicephalus simus*

s.l. = *sensu lato*

s.s. = *sensu stricto*

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

UNESP = Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

UNICAMP = Universidade Estadual de Campinas

USA = *United States of America*

USP = Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

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

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

INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Carrapatos

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

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

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

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

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

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

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

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

1.2 Carrapatos *Amblyomma cajennense*

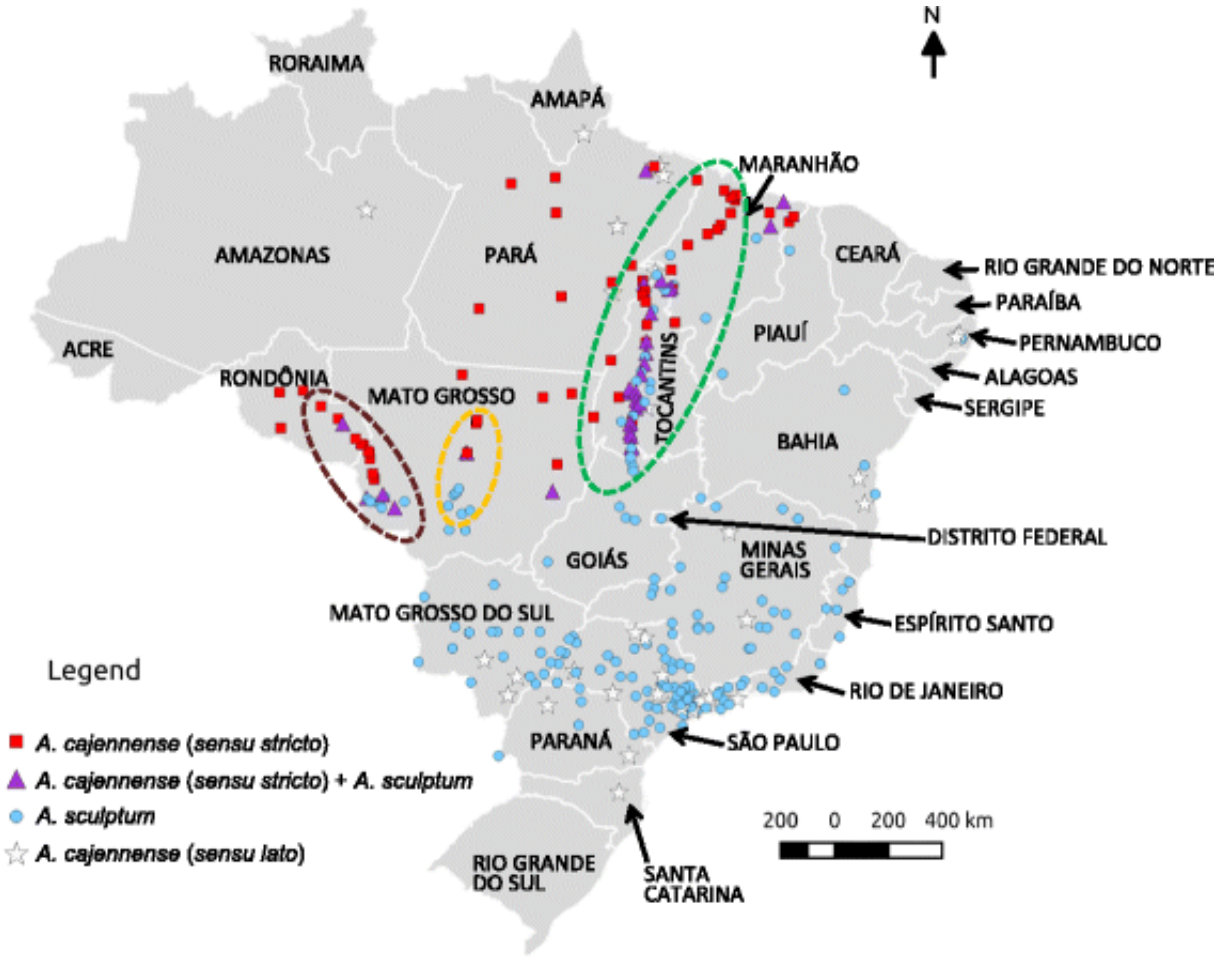
Os carrapatos do “complexo *A. cajennense*”, popularmente conhecidos como carrapatos-estrela, carrapatos do cavalo ou rodoleiros, têm grande importância médica, principalmente por serem encontrados parasitando humanos no Brasil, sobretudo nas fases larvais e ninfais. Além disso, podem ser vetores da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

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

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

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

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



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

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

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

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

1.3 Carrapatos *Rhipicephalus microplus*

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

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

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

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

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

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

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

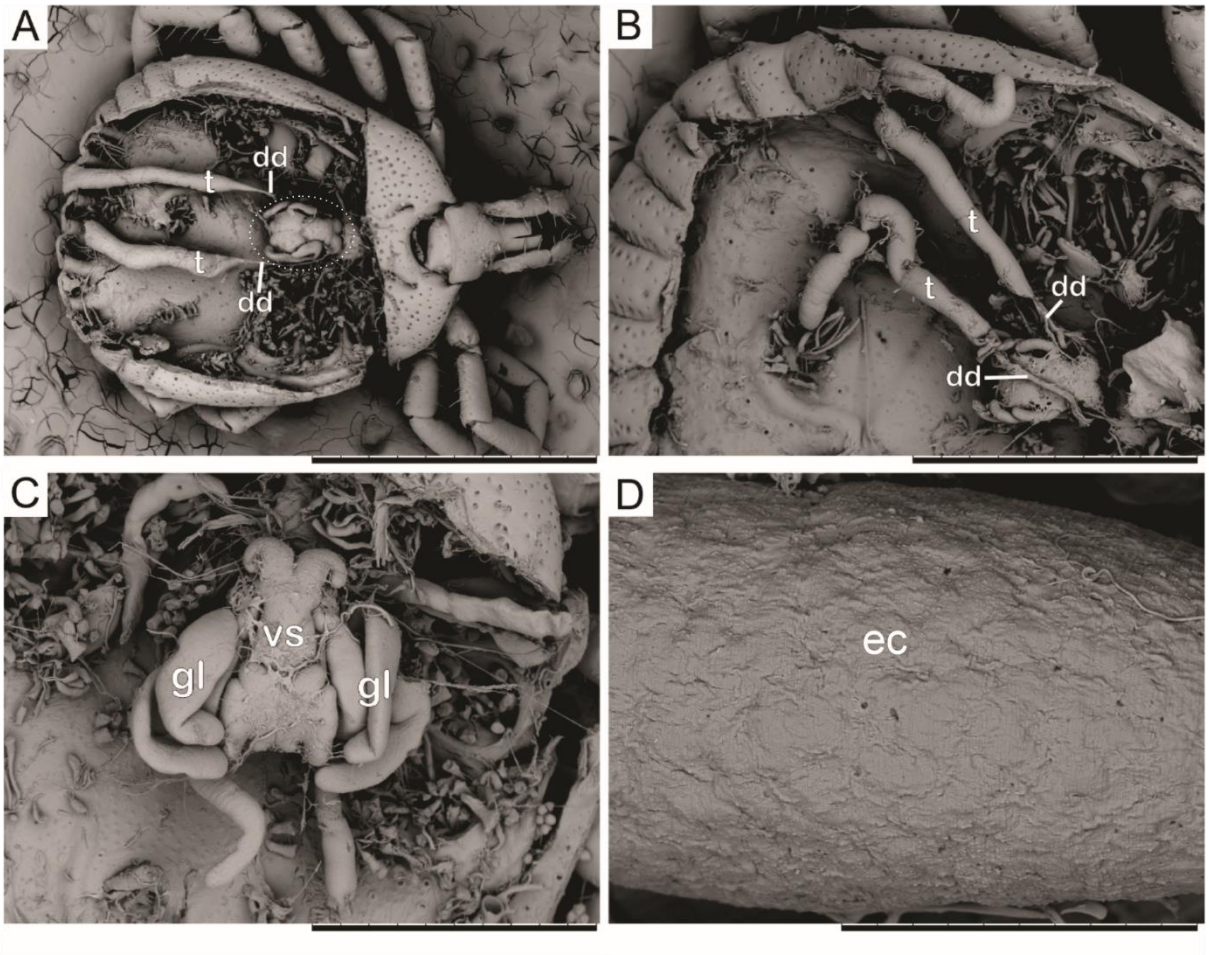
1.4 Sistema reprodutor masculino dos carrapatos

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

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

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

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



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

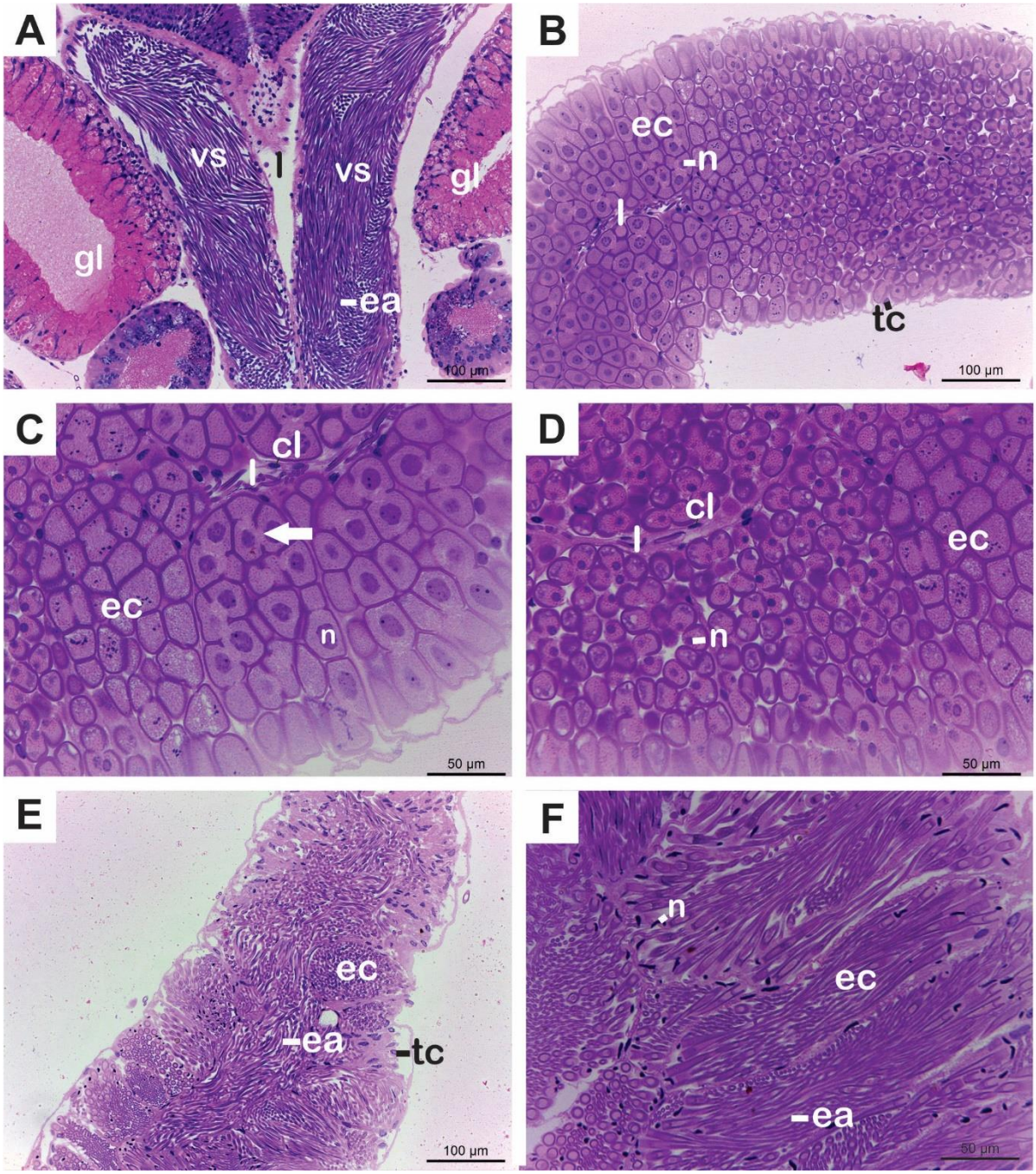
2014). Na família Argasidae, assim como na espécie *O. rostratus,* os testículos são fundidos posteriormente e tem a forma de “U” (HARRISON; FOELIX, 1999).

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

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

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

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



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

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

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

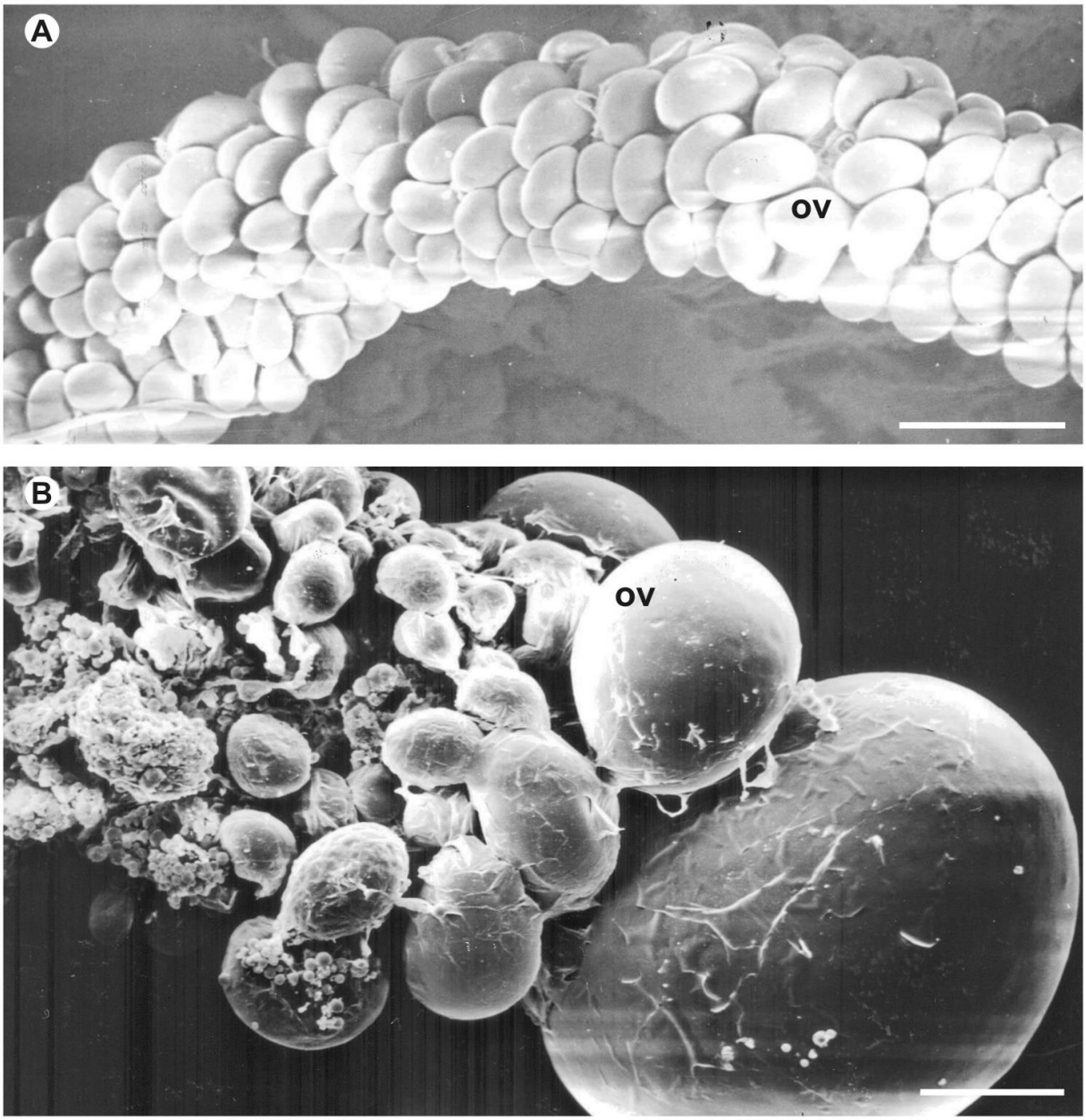
1.5 Sistema reprodutor feminino dos carrapatos

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

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

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

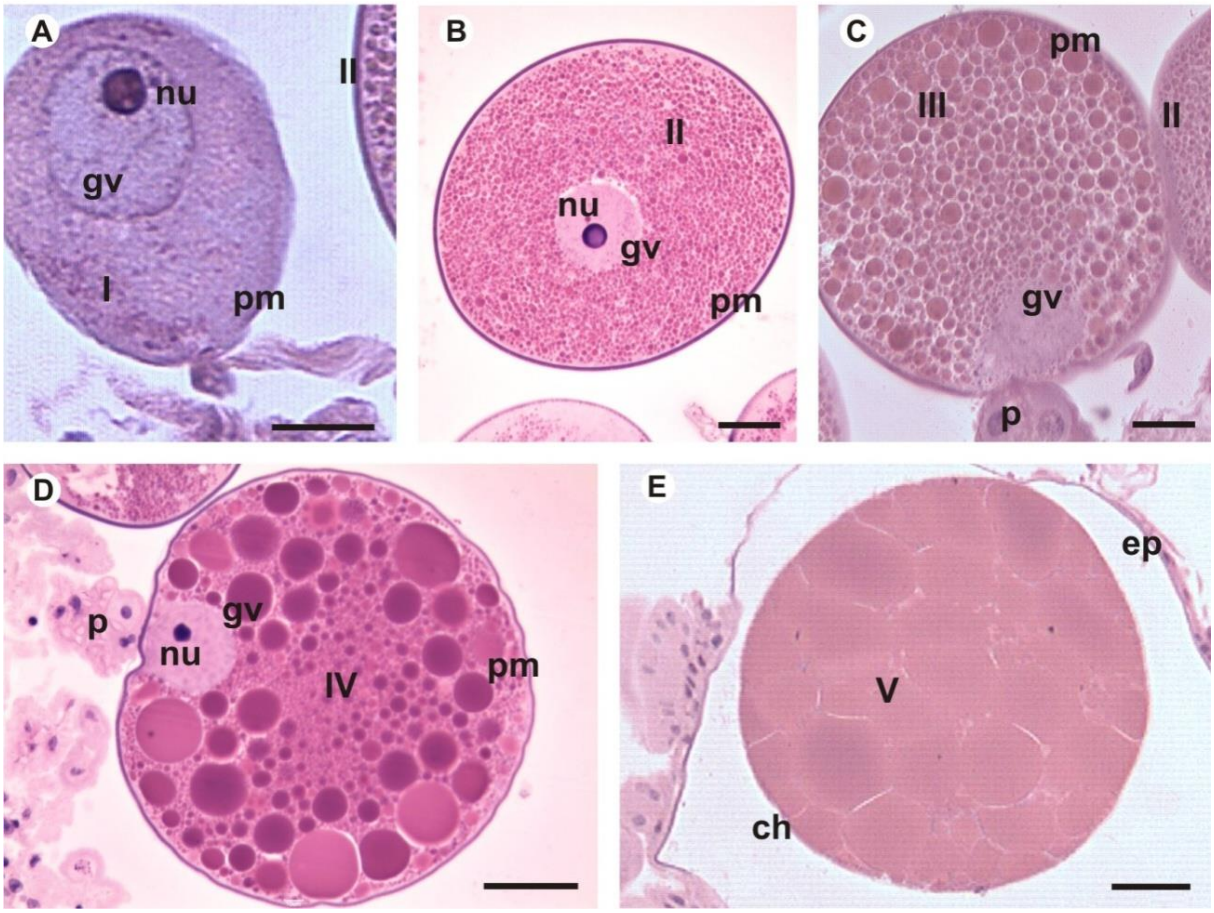
Figura 6. A-B. Microscopia eletrônica de varredura de ovário de fêmeas semi-ingurgitadas de carrapatos *Amblyomma cajennense* sensu lato mostrando ovócitos (**ov**) em vários estágios de desenvolvimento. Adaptado de Camargo-Mathias (2013).



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

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

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



1.6 Métodos de controle de carrapatos

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

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

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

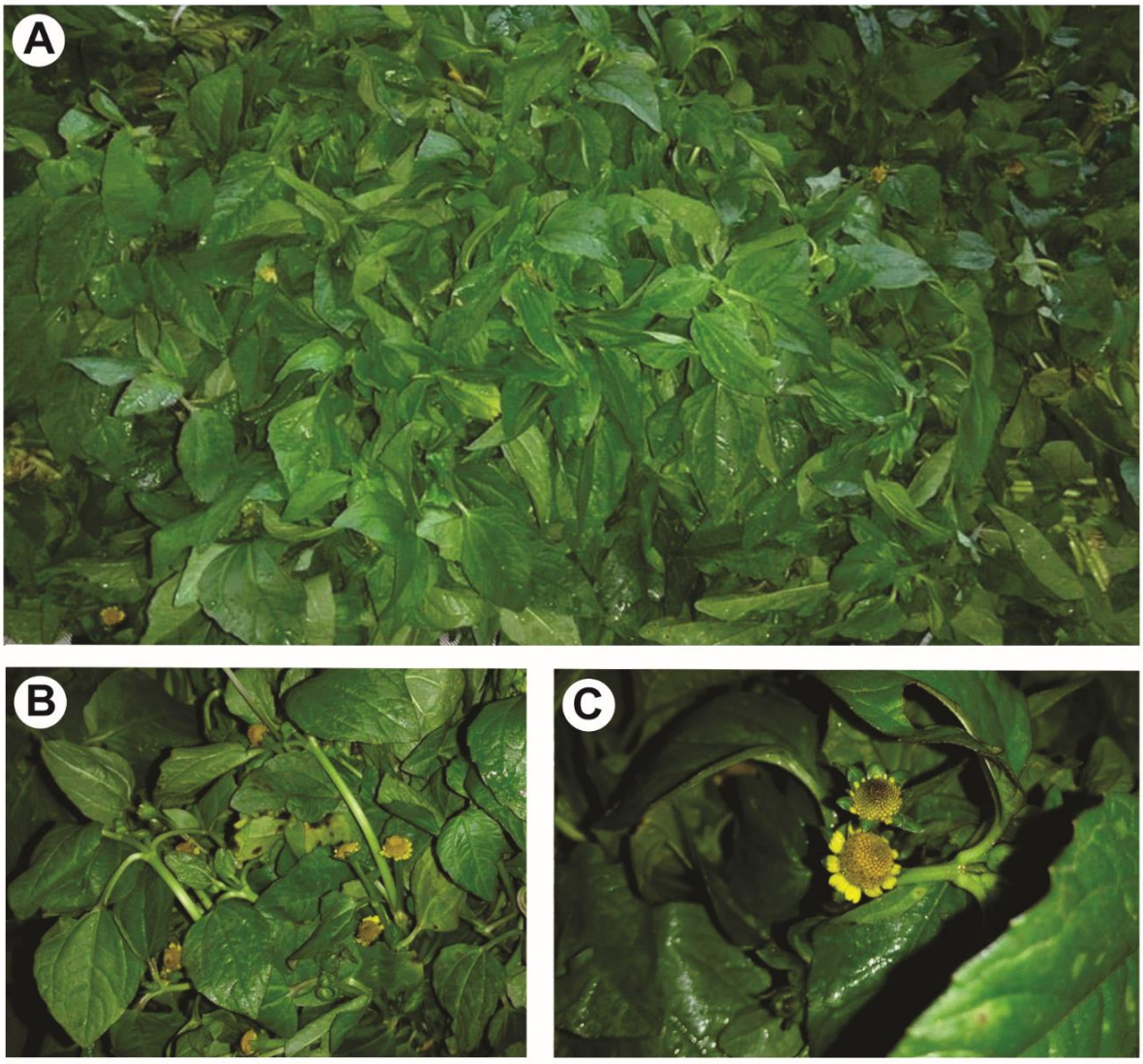
Assim, a busca por novos produtos acaricidas que sejam mais baratos, e ao mesmo tempo apresentem menor toxicidade e causem menor impacto tanto ao meio ambiente quanto aos organismos não alvos tem sido intensificada. Dentre elas pode ser citada a utilização de compostos de origem natural, como os de extratos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

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

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

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

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



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

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

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

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

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

1.8 Linhagens de células de carrapatos

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

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

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

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

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

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

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos tóxicos do extrato etanólico obtido das partes aéreas (flores, folhas e caules) de *Acmella oleracea* sobre os sistemas reprodutores masculino e feminino de carrapatos *Amblyomma cajennense* sensu stricto (Fabricius, 1787), analisando também a molécula do espilantol, a qual tem potencial acaricida sobre linhagens celulares de carrapatos, alternativa aos testes tradicionais que utilizam hospedeiros vivos para realizarem a alimentação dos carrapatos.

2.2 Objetivos específicos

1 – Analisar a ocorrência de alterações morfofisiológicas no sistema reprodutor de machos e fêmeas de *A. cajennense*, por meio de técnicas de Microscopia de Luz de Campo Claro, Eletrônica de Transmissão.

2 - Comparar os resultados obtidos dos indivíduos expostos (grupos de tratamento), com aqueles não expostos (controle), para verificar se extrato age no aparelho reprodutor e tentar elucidar se os ectoparasitas driblam os danos causados nas suas células germinativas.

3 - Investigar e comparar os efeitos do análogo alcino do espilantol sobre duas linhagens celulares obtidas de embriões de *R. microplus:* BME/CTVM6, derivadas de carrapatos resistentes a organofosforados, organoclorados e amitraz, e BME/CTVM2, derivadas de carrapatos susceptíveis a acaricidas, para avaliar o potencial acaricida dessa molécula recém-sintetizada.

4- Analisar o efeito direto de doses acaricidas subletais nos patógenos transmitidos por carrapatos.

MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Locais e equipamentos utilizados para a realização dos estudos:

Foram utilizados os equipamentos disponíveis nas dependências dos Laboratórios de Histologia e de Microscopia Eletrônica do Departamento de Biologia do Instituto de Biociências da UNESP de Rio Claro, SP. Nesta instituição está implantada e em pleno funcionamento a *Brazilian Central of Studies on Ticks Morphology* (BCSTM), onde colônias de carrapatos estão instaladas e são mantidas, sob a coordenação da Profa. Dra. Maria Izabel Camargo-Mathias.

Foram também utilizados os equipamentos disponíveis na Divisão de Química de Produtos Naturais do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas – CPQBA da UNICAMP, SP, sob a coordenação do Prof. Dr. Rodney Alexandre Ferreira Rodrigues.

Para a aquisição das imagens de microscopia eletrônica de transmissão, foram utilizados os equipamentos disponíveis no Laboratório de Microscopia Eletrônica aplicada à Pesquisa Agropecuária (NAP/MEPA) da ESALQ/USP.

Além disso, foram utilizados os equipamentos disponíveis nas dependências do *Institute of Infection and Global Health* da Universidade de Liverpool, Reino Unido, onde está instalado o *Tick Cell Biobank*, considerada a maior coleção mundial de linhagens celulares contínuas derivadas de carrapatos e de outros artrópodes, sob a coordenação da Dra. Lesley Bell-Sakyi.

3.2 Avaliação da ação do extrato de *Acmella oleracea* sobre o sistema reprodutor masculino e feminino de carrapatos *Amblyomma cajennense*

3.2.1 Extrato de *Acmella oleracea*

O extrato etanólico bruto das partes aéreas (flores, folhas e caule) de *A. oleracea* foi produzido no Laboratório de Química de Produtos Naturais do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil, sob a supervisão do Dr. Rodney Alexandre Ferreira Rodrigues.

3.2.1.1 Obtenção do material vegetal

O material vegetal foi semeado e cultivado no campo experimental do CPQBA/UNICAMP, localizado no município de Paulínia, SP, Brasil (22° 47' 52" S, -47° 6' 49" W). As sementes foram gentilmente cedidas pela empresa Centroflora (Botucatu, SP, Brasil) e a coleta das partes aéreas (flores, folhas e caule) foi realizada no mês de Abril de 2015. A planta foi identificada pelo Dr. John F. Pruski do *Missouri Botanical Garden* (*USA*) e a exsicata está depositada no Herbário do CPQBA/UNICAMP, Campinas, SP, Brasil, sob nº 181.452. Também foi obtida autorização de acesso e de remessa de patrimônio genético (CGEN) sob nº 010577/2014-9. Além disso, o estudo está cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado – SisGen sob número A34093F.

3.2.1.2 Secagem e moagem do material vegetal

As partes aéreas de *A. oleracea* foram secas em estufa com ventilação forçada por 48 h a 40º C até massa constante (**Figura 9A**) (RODRIGUES et al., 2006). A moagem deu-se em moinho de facas com peneira de 48 mesh – 0,297 mm (**Figura 9B**). O material vegetal seco e moído foi armazenado em embalagem de papel craft com revestimento de polipropileno com fechamento simples e mantido em freezer - 20º C até a utilização.

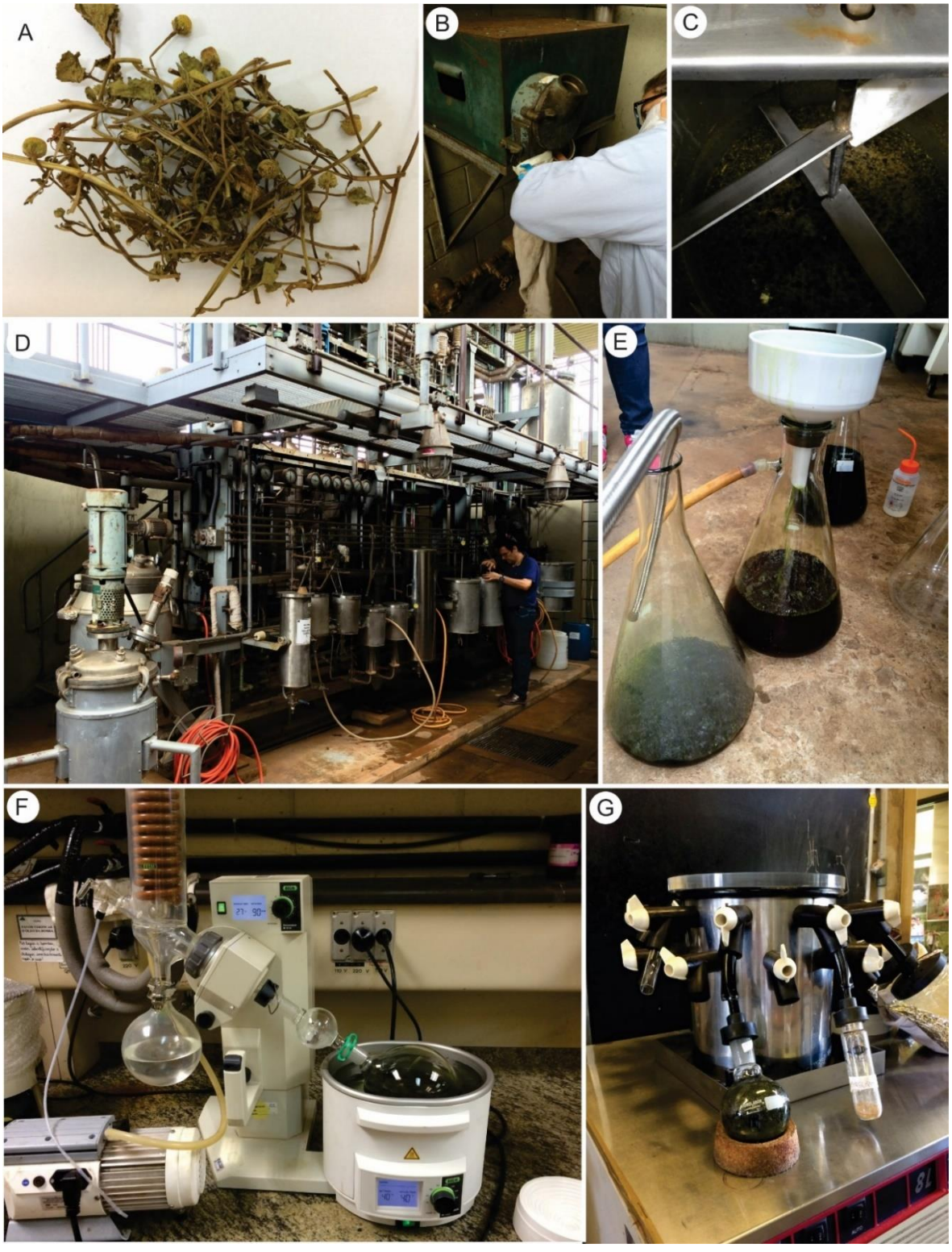
3.2.1.3 Preparação do extrato etanólico bruto de *Acmella oleracea*

A extração foi realizada em etanol 96º GL (na proporção de 1:5, planta/solvente) à temperatura ambiente, em tanque de aço inox com agitação mecânica por uma hora e trinta minutos (**Figura 9C-D**). O resíduo foi separado por filtração (**Figura 9E**), processo este que foi repetido por mais duas vezes (RODRIGUES et al., 2006). Os extratos brutos obtidos foram filtrados e concentrados sob vácuo em sistema de evaporação rotativo em temperatura de 40ºC (**Figura 9F**). O extrato foi então liofilizado até massa constante (**Figura 9G**), acondicionado em frasco âmbar e armazenado em freezer -20º C até a utilização.

3.2.1.4 Monitoramento analítico do extrato

O extrato etanólico bruto aqui utilizado, foi analisado em cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas (GC-MS, Agilent® 5890 Series II mass selective detector Agilent® 5970 EI 70eV) equipado com coluna de sílica fundida WCOT, HP5-MS, Agilent® (30 mm x 0.25 mm x 0.25 µm). As condições de análise foram: temperatura do injetor: 220º C; temperatura do detector: 250º C; programa de temperatura: 60-240º C (3º C/min), injeção de amostra usando modo de divisão de proporção 1:40; e gás Hélio utilizado como transportador a 0,7 bar 1 mL/min.

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



3.2.2 Hospedeiros

Foram utilizadas coelhas adultas do Grupo Genético Botucatu com peso entre 3 a 3,5 Kg, sem contato prévio com carrapatos ou carrapaticidas, adquiridas do Biotério da UNESP de Botucatu, SP, Brasil, que foram mantidas em gaiolas e receberam água e ração comercial *ad libitum*.

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UNESP de Rio Claro, SP, Brasil sob nº 11/2015. Além disso, o estudo está cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado – SisGen sob número A34093F.

3.2.3 Manutenção da colônia de carrapatos *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787)

Os carrapatos *A. cajennense* foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, USP, SP, Brasil. Os adultos foram coletados da vegetação do Município de Governador Jorge Teixeira, Rondônia, região ocidental da Amazônia brasileira (10° 31' 00" S, 62° 38' 00" W) e mantidos em colônia. A identificação das espécies foi realizada por Martins et al. (2016).

Foram aqui utilizados machos adultos e fêmeas semi-ingurgitadas de *A. cajennense* alimentados por dez dias em coelhas hospedeiras e, após coleta, foram mantidos em estufa BOD sob condições controladas (28º ± 1°C, 85% de umidade e fotoperíodo de 12 h) em sala do Biotério do Departamento de Biologia, IB – UNESP, Rio Claro, SP, Brasil. O estágio alimentar de semi-ingurgitamento das fêmeas foi escolhido para aproximar o experimento das condições de campo, visto que nesse estágio os carrapatos permanecem fixados no hospedeiro para o repasto sanguíneo, causando nestes lesões cutâneas e também momento este em que a transmissão de patógenos pode ocorrer.

Para a obtenção dos machos e fêmeas alimentadas, foram realizadas infestações dos carrapatos nas coelhas hospedeiras. A região dorsal destas últimas foi tricotomizada e recebeu uma camada de cola atóxica para a fixação de câmara alimentadora, conforme metodologia adaptada de Bechara et al. (1995). Em seguida,

os carrapatos foram liberados no interior dela e, após decorridas 24 horas (tempo necessário para a acomodação dos ectoparasitas), foram realizadas observações diárias a fim de se determinar o período de alimentação dos carrapatos.

3.2.4 Determinação da concentração letal de 50% (CL_{50})

3.2.4.1 Bioensaio 1: Determinação do intervalo de morte dos carrapatos expostos ao extrato de *Acmella oleracea*

Para se estabelecer qual seria o intervalo de tempo em que ocorreria 100% de morte dos machos alimentados e das fêmeas semi-ingurgitadas de *A. cajennense* foi utilizado o Teste de Imersão de Adultos descrito por Drummond et al. (1973). Para tanto, machos adultos alimentados e com peso médio de 10 mg (cerca de 10 dias de alimentação em coelhas hospedeiras) e fêmeas adultas semi-ingurgitadas com peso médio de 27 mg (cerca de 10 dias de alimentação em coelhas hospedeiras) (210 casais) de *A. cajennense*, foram coletados de infestações artificiais de sete coelhas hospedeiras (30 casais de carrapato/coelho).

Antes do início dos testes, todos os carrapatos foram lavados em água corrente e secos em papel absorvente macio. Os machos e as fêmeas com pesos homogêneos ($p > 0,05$), foram alocados em sete grupos experimentais de 10 carrapatos/grupo:

Grupo Controle 1: os carrapatos foram expostos à água destilada;

Grupo Controle 2: foram expostos ao solvente etanol 50% e DMSO 1%;

Grupos Tratamento 1 a 5: foram expostos às concentrações de 6,2; 12,5; 25; 50 e 100 mg/mL do extrato etanólico bruto das partes aéreas de *A. oleracea*, obtidas por diluição em etanol 50% e DMSO 1%. As concentrações iniciais utilizadas nos Grupos Tratamento foram baseadas naquelas anteriormente obtidas por Castro et al. (2014). Todos os bioensaios foram realizados em triplicatas.

Em cada grupo, os machos e as fêmeas foram imersos nas substâncias a serem testadas durante cinco minutos. Em seguida, foram secos em papel absorvente e colocados em placas de Petri identificadas, que foram levadas à estufa BOD sob condições controladas (28 ± 1°C, 85% de umidade, com fotoperíodo de 12 horas) por sete dias, intervalo de tempo este sugerido por Oliveira, Bechara e Camargo-Mathias (2008) em estudos com fêmeas de *R. sanguineus* submetidas ao fipronil, visto que a

maioria dos efeitos dos acaricidas não são imediatos e as alterações morfológicas geralmente se instalam após esse período. Foram realizadas observações diárias e os carrapatos foram estimulados com gás carbônico e com a ponta de um pincel por 30 minutos (ANHOLETO et al., 2017). Os indivíduos que não tinham capacidade de movimento após 10 minutos do estímulo foram considerados mortos. Nos testes, buscou-se observar visualmente possíveis alterações comportamentais como diminuição da atividade locomotora, prostração em posição invertida, estiramento das pernas e paralisia, além de qualquer outra anormalidade em relação à morfologia, coloração e consistência do integumento (ANHOLETO et al., 2017).

3.2.4.2 Bioensaio 2: Determinação da concentração letal de 50% (CL_{50})

Após a determinação do intervalo de morte (12,5 – 50 mg/mL) no Bioensaio 1, diluições do extrato etanólico de *A. oleracea* foram realizadas com o intuito de se obter novas concentrações dentro desse intervalo, as quais foram posteriormente utilizadas no Bioensaio 2 para determinar a concentração letal 50% (CL_{50}).

Os testes para a determinação da CL_{50} do extrato etanólico bruto obtido das partes aéreas de *A. oleracea* foram realizados de acordo com metodologia descrita por Drummond et al. (1973), Oliveira, Bechara e Camargo-Mathias (2008) e Roma et al. (2009).

Machos alimentados com peso médio de 10 mg (cerca de 10 dias de alimentação em coelhas hospedeiras) e fêmeas com peso médio de 27 mg (cerca de 10 dias de alimentação em coelhas hospedeiras) (240 casais) de *A. cajennense*, foram coletados de infestações artificiais de oito coelhas hospedeiras (30 casais de carrapato/coelho). Antes do início dos testes, os ectoparasitas foram lavados em água corrente e depois secos em papel absorvente macio. Os machos e as fêmeas com pesos homogêneos ($p > 0,05$) foram divididos em oito grupos experimentais, de 10 carrapatos/grupo:

Grupo Controle 1 - os carrapatos foram expostos à água destilada;

Grupo Controle 2 - foram expostos ao solvente etanol 50% e DMSO 1%;

Grupos Tratamento 1 a 6 - foram expostos às concentrações de 14,3; 16,6; 20; 25; 33 e 40 mg/mL do extrato etanólico bruto das partes aéreas de *A. oleracea*, respectivamente, obtidas por diluição em etanol 50% e DMSO 1%.

Em cada grupo experimental, machos e fêmeas foram imersos nas substâncias a serem testadas durante cinco minutos. Em seguida, foram secos em papel absorvente e colocados em placas de Petri identificadas, que foram levadas à estufa BOD sob condições controladas (28 ± 1°C, 85% de umidade, com fotoperíodo de 12 horas) por sete dias. Foram realizadas observações diárias e os carrapatos foram estimulados com gás carbônico e com a ponta de um pincel por 30 minutos. Os indivíduos que não apresentaram capacidade de movimento após 10 minutos do estímulo foram considerados mortos (ANHOLETO et al., 2017). Nos testes, buscou-se observar visualmente possíveis alterações comportamentais como diminuição da atividade locomotora, prostração em posição invertida, estiramento das pernas e paralisia, ou qualquer anormalidade em relação à morfologia, coloração e consistência do integumento. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas (ANHOLETO et al., 2017).

3.2.5 Análises estatísticas

O intervalo de morte para os machos e para as fêmeas de *A. cajennense* obtido no Bioensaio 1 e os dados de mortalidade obtidos no Bioensaio 2 foram analisados utilizando-se a análise de variância (ANOVA) com a aplicação do pós-teste de Tukey, com níveis de significância de $p<0,05$ usando o *software* GraphPad Prism v.6 (GraphPad Software Inc., São Diego, CA, EUA). Os dados de mortalidade do Bioensaio 2 foram submetidos à análise Probit, utilizando o *software* BioStat v.5 (AnalystSoft, 2015), a fim de se determinar a concentração letal de 50% (CL_{50}), bem como seus respectivos intervalos de confiança a 95%, do extrato etanólico bruto de *A. oleracea* em machos e fêmeas de *A. cajennense.*

3.3 Avaliação morfofisiológica e ultraestrutural dos sistemas reprodutores masculino e feminino de *Amblyomma cajennense* após a exposição ao extrato etanólico bruto de *Acmella oleracea* em concentrações subletais

3.3.1 Delineamento experimental

Para a avaliação da morfofisiologia e ultraestrutura dos sistemas reprodutores dos machos alimentados e das fêmeas semi-ingurgitadas de *A. cajennense* após a exposição ao extrato etanólico bruto de *A. oleracea* em concentrações subletais (menores que a CL_{50}), foi utilizado o Teste de Imersão de Adultos (DRUMMOND et al. 1973), para posteriormente serem aplicadas as técnicas histológicas, histoquímicas, de microscopia eletrônica de transmissão.

Machos adultos com peso médio de 10 mg (cerca de 10 dias de alimentação em coelhos hospedeiros) e fêmeas adultas semi-ingurgitadas com peso médio de 27 mg (cerca de 10 dias de alimentação em coelhos hospedeiros) (150 casais) de *A. cajennense*, foram coletados de infestações artificiais de seis coelhos hospedeiros (25 casais de carrapato/coelho). Antes do início dos testes, os carrapatos foram lavados em água corrente e depois, secos em papel absorvente macio.

Machos e fêmeas com pesos homogêneos ($p > 0,05$), foram alocados em cinco grupos experimentais de 10 carrapatos cada e expostos a concentrações subletais do extrato (menores que a CL_{50}):

Machos alimentados:

Grupo Controle 1: os carrapatos foram expostos à água destilada;

Grupo Controle 2 – foram expostos ao solvente etanol 50% e DMSO 1%;

Grupos Tratamento 1 a 3 – foram expostos às concentrações de 6,2; 12,5 e 25 mg/mL do extrato etanólico bruto das partes aéreas de *A. oleracea*, respectivamente, obtidas por diluição em etanol 50% e DMSO 1%.

Fêmeas semi-ingurgitadas:

Grupo Controle 1: foram expostas à água destilada;

Grupo Controle 2: foram expostas ao solvente etanol 50% e DMSO 1%;

Grupos Tratamento 1 a 3: foram expostas às concentrações de 3,1; 6,2 e 12,5 mg/mL do extrato etanólico bruto das partes aéreas de *A. oleracea*, respectivamente, obtidas por diluição em etanol 50% e DMSO 1%.

Em cada grupo experimental, machos e fêmeas foram imersos nas substâncias a serem testadas durante cinco minutos. Em seguida, foram secos em papel absorvente, colocados em placas de Petri identificadas e levadas à estufa BOD sob condições controladas (28 ± 1°C, 85% de umidade, com fotoperíodo de 12 horas) por sete dias, intervalo de tempo sugerido por Oliveira, Bechara e Camargo-Mathias (2008) em estudos com fêmeas de *R. sanguineus* submetidas ao fipronil, visto que a maioria dos efeitos dos acaricidas não são imediatos e as alterações morfológicas geralmente aparecem após esse período. Foram realizadas observações diárias e os carrapatos foram estimulados com gás carbônico e com a ponta de um pincel por 30 minutos. Os indivíduos considerados mortos foram aqueles sem capacidade de movimento após 10 minutos do estímulo e não foram utilizados para as análises morfofisiológicas e ultraestruturais.

Após sete dias da exposição, os machos e as fêmeas de *A. cajennense* foram dissecados sob estereomicroscópio, em placas de Petri contendo solução fisiológica tamponada (NaCl 7.5 g/L, Na2HPO4 2.38 g/L e KH2PO4 2.72 g/L), para coleta dos seus sistemas reprodutores para posterior análise.

3.3.2 Histologia e histoquímica

3.3.2.1 Histologia: Técnica de coloração pela hematoxilina de Harris e eosina aquosa (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983).

Para a realização da análise histológica, os sistemas reprodutores dos machos e das fêmeas foram retirados e fixados em paraformaldeído 4% por 48 horas. Em seguida, foram transferidos para solução de tampão fosfato salino (NaCl 7,5 g/L, Na_2HPO_4 2,38 g/L e KH_2PO_4 2,72 g/L) onde permaneceram por 24 horas. Na sequência, foram desidratados em série crescente de álcool etílico a 70%, 80%, 90% e 95% (banhos de 30 minutos cada), embebidos em historesina composta por solução de infiltração com 50 mL de (2-hidroxietil) metacrilato e 0,5g do ativador dibenzolperóxido, conforme orientação do fabricante (*Leica Historesin Embedding Kit*®) por 24 horas e incluídos em moldes plásticos contendo historesina mais polimerizador (*Leica Historesin Kit®)*. Após esse procedimento, os blocos foram seccionados em micrótomo Leica RM2265 (Leica®), com secções de 3 µm de

espessura, as quais foram recolhidas em lâminas de vidro previamente limpas. As lâminas contendo as secções foram reidratadas por um minuto em água destilada e, em seguida, coradas pela hematoxilina de Harris durante oito minutos. Depois de lavadas por três minutos em água corrente, foram coradas pela eosina aquosa por cinco minutos e novamente lavadas em água corrente. Após secagem em suportes de madeira à temperatura ambiente, as lâminas foram mergulhadas rapidamente em xilol e, em seguida, cobertas com bálsamo do Canadá e lamínula. As lâminas permanentes foram examinadas e fotografadas sob microscópio de luz de campo claro Leica DM750 (Leica®).

3.3.2.2 Detecção de polissacarídeos neutros: Técnica do PAS (ácido periódico-Schiff) (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983).

Para a detecção de polissacarídeos (elemento comum encontrado na substância intercelular do testículo, bem como no vitelo dos ovócitos) foi realizada a reação pelo ácido periódico- Schiff (PAS). Os sistemas reprodutores de machos e fêmeas foram fixados em mistura aquosa de Bouin por cinco dias. Em seguida, foram transferidos para solução de tampão fosfato salino (NaCl 7.5 g/L, Na_2HPO_4 2.38 g/L e KH_2PO_4 2.72 g/L) onde permaneceram por 24 horas. Na sequência, foram desidratados em série crescente de álcool etílico a 70%, 80%, 90% e 95% (banhos de 30 minutos cada), embebidos em historesina por 24 horas e incluídos em moldes plásticos contendo historesina mais polimerizador (*Leica Historesin Kit®)*. Após esse procedimento, os blocos foram seccionados em micrótomo Leica RM2265 (Leica®), com secções de 3 µm de espessura, as quais foram recolhidas em lâminas de vidro previamente limpas. As secções foram reidratadas por um minuto em água destilada e transferidas para solução de ácido periódico 4% por 10 minutos. Logo após, foram lavadas em água destilada por um minuto e imersas por uma hora no reagente de Schiff. Após esta etapa, o material foi lavado por 30 minutos em água corrente e as lâminas deixadas para secar em suportes de madeira à temperatura ambiente. Depois de secas foram cobertas com bálsamo do Canadá e lamínula para posterior observação e fotodocumentação em microscópio de luz de campo claro Leica DM750.

3.3.2.3 Detecção de proteínas totais: Técnica do azul de bromofenol (PEARSE, 1985)

Para a detecção de proteínas totais, os sistemas reprodutores dos machos e das fêmeas depois de coletados foram fixados em paraformaldeído 4% por 48 horas. Em seguida, foram transferidos para tampão fosfato salino (NaCl 7,5 g/L, Na_2HPO_4 2,38 g/L e KH_2PO_4 2,72 g/L) em que permaneceram por 24 horas. Na sequência, foram desidratados em série crescente de álcool etílico a 70%, 80%, 90% e 95% (banhos de 30 minutos cada), embebidos em historesina por 24 horas e incluídos em moldes plásticos contendo historesina mais polimerizador (*Leica Historesin Kit®)*. Após esse procedimento, os blocos foram seccionados em micrótomo Leica RM2265 (Leica®), com secções de 3 µm de espessura, que foram recolhidas em lâminas de vidro previamente limpas. As lâminas foram mergulhadas em solução de azul de bromofenol por duas horas à temperatura ambiente. Em seguida, foram lavadas com ácido acético 0,5% por cinco minutos e com água corrente por 15 minutos. Após secagem em suportes de madeira à temperatura ambiente, as lâminas foram mergulhadas rapidamente em xilol e, em seguida, cobertas com bálsamo do Canadá e lamínula. As lâminas permanentes foram examinadas e fotografadas em microscópio de luz de campo claro Leica DM750 (Leica®).

3.3.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Para a análise ultraestrutural, as amostras foram fixadas em glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7.2), durante 72 horas. Em seguida, foram realizadas duas lavagens em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, com duração de 15 minutos cada e, logo depois, foi realizada a pós-fixação em solução de tetróxido de ósmio (OsO_4) a 1%, durante duas horas. As amostras foram novamente lavadas em tampão cacodilato de sódio por duas vezes de 15 minutos e imersas em etanol aquoso a 10% por 15 minutos. O material foi contrastado em solução de acetato de uranila a 1% dissolvido em álcool 10% por 24 horas, no escuro, sendo, em seguida, desidratado em uma série gradativa de acetona (de 50 a 100%). Posteriormente, o material foi embebido em resina Epon-Araldite mais acetona, na proporção de 1:1, por 24 horas, incluído em resina pura e levado à estufa por 72 horas, a 60ºC, para

polimerização. Secções ultrafinas obtidas em ultramicrótomo Leica Reichert Supernova, foram depositadas sobre grades de cobre e contrastadas com acetato de uranila a 4% durante 20 minutos, e citrato de chumbo por 10 minutos (REYNOLDS, 1963). O material foi observado e fotografado em microscópio eletrônico de transmissão JEOL JEM-1011 (MET, operando a uma voltagem de aceleração de 60kV), nas dependências do Laboratório de Microscopia Eletrônica aplicada à Pesquisa Agropecuária (NAP/MEPA) da ESALQ/USP, Piracicaba, SP.

3.4 Atividade acaricida do análogo alcino do espilantol sobre linhagens celulares derivadas de carrapatos *Rhipicephalus microplus* resistentes e suscetíveis a acaricidas e infectados ou não por *Ehrlichia minasensis*

3.4.1 Análogo alcino do espilantol

O análogo alcino do espilantol foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Júlio Cezar Pastre do Instituto de Química da Universidade de Campinas, UNICAMP, São Paulo, Brasil. O produto foi obtido conforme descrito por Alonso et al. (2018).

3.4.2 Linhagens celulares de carrapatos

As linhagens celulares BME/CTVM6, derivada de embriões de carrapatos *Rhipicephalus microplus* resistentes a organofosforados, organoclorados e amitraz (BELL-SAKYI, 2004) e a BME/CTVM2 derivada de carrapatos *R. microplus* susceptíveis a acaricidas (KOH-TAN et al., 2016), foram gentilmente cedidas pela Dra. Lesley Bell-Sakyi, líder do *Tick Cell Biobank*, localizado na Universidade de Liverpool, Reino Unido. As linhagens foram crescidas e mantidas a 28º C em tubos selados de lado plano (Nunc™ Thermo Scientific, produto n 156758), contendo 2,2 mL de meio de cultura L-15 Leibovitz (Life Technologies), suplementado com 10% de caldo fosfato tryptose, 20% de soro fetal bovino (Sigma), 2 mM de L-glutamina, penicilina (100U/mL) e estreptomicina (100 ug/mL), conforme previamente descrito por Bell-Sakyi (2004). O meio de cultura foi trocado semanalmente e as células foram subcultivadas a cada 15 dias.

3.4.3 Avaliação da ação do análogo alcino do espilantol sobre células BME/CTVM6 e BME/CTVM2

3.4.3.1 Viabilidade, densidade e determinação da concentração letal de 50%

Células derivadas de culturas de mesma passagem foram ressuspensas com o auxílio de pipeta sorológica estéril. Posteriormente, foram contadas em hemocitômetro manual e semeadas na concentração de $1x10^6$ células/mL em novos tubos (2 mL da suspensão celular por tubo). Subsequentemente, as culturas foram expostas a diferentes concentrações do análogo alcino do espilantol (0,8; 0,4; 0,3 e 0,2 mg/mL para as células BME/CTVM6 e 0,8; 0,7; 0,6 e 0,5 mg/mL para as células BME/CTVM2) (Tratamentos), apenas ao meio de cultura L-15 (Controle I) e a etanol 30% e DMSO 0,1% (Controle II), para se buscar a concentração mínima em que o produto fosse capaz de induzir o processo de morte celular em 50% das células expostas ao produto (CL_{50}). As concentrações acima citadas foram baseadas naquelas obtidas por Cruz et al. (2016). Após 72 horas de exposição, foram coletadas pequenas alíquotas da suspensão (0,3 mL) de cada tubo, que foram em seguida coradas com 0,4% p/v de azul de Trypan e contadas utilizando-se um hemocitômetro manual. A média de quatro contagens independentes por tubo foi utilizada para avaliar a viabilidade celular (contagem de células vivas e mortas) e densidade (contagem total de células), conforme descrito anteriormente por Strober (2001).

Os dados de viabilidade obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com a aplicação do teste post-hoc de Tukey, com níveis de significância definidos em $p < 0,05$, utilizando o software GraphPad Prism v.6 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA).

3.4.3.2 Morfologia celular

As linhagens celulares BME/CTVM6 e BME/CTVM2 foram expostas ao análogo alcino do espilantol conforme descrito acima e, decorridos três dias da exposição, as mesmas foram ressuspensas com o auxílio de pipeta sorológica estéril. Posteriormente, foram elaborados preparados citológicos de camada fina (lâminas) com aproximadamente 50 µL da suspensão celular das culturas expostas aos

acaricidas e das culturas não expostas (controles). Posteriormente, as lâminas foram fixadas em metanol e coradas com Giemsa (Sigma) (MANGIA et al., 2018). As lâminas foram examinadas e fotografadas sob microscópio de luz de campo claro Leica DM750 (Leica®).

3.4.4 Avaliação da ação do análogo alcino do espilantol sobre células BME/CTVM6 infectadas com *Ehrlichia minasensis*

Aproximadamente 2 a 5 mL de suspensão celular contendo $1x10^7$ células BME/CTVM6 infectadas com *E. minasensis* (cepa UFMG-EVT, CABEZAS-CRUZ et al., 2016) a uma taxa de infecção maior que 50%, foram recolhidas por pipetagem e centrifugadas à temperatura ambiente por 5 min a 200 x g, fazendo-se uso dos equipamentos disponíveis no *Tick Cell Biobank*, localizado na Universidade de Liverpool, Reino Unido. O sobrenadante foi descartado e o sedimento celular foi ressuspenso em 500 µL de tripsina (500 µg/mL em PBS) e incubado por 20 min a 37ºC. O volume original foi restaurado pela adição de meio de cultura L-15 completo e a suspensão de células foi passada dez vezes através de uma agulha 26G dobrada para romper mecanicamente as células e liberar as bactérias intracelulares. A suspensão resultante foi centrifugada à temperatura ambiente por cinco minutos a 1500 x g. O sobrenadante contendo bactérias livres de células foi coletado e alíquotas de 200-500 µL foram adicionadas a culturas de células BME/CTVM6 não infectadas, crescendo em tubos de lado plano (Nunc^{Tm}) com meio de cultura L-15 completo. Após a inoculação, as culturas foram incubadas por sete dias para monitorar a infecção bacteriana, por meio da análise de preparados citológicos de camada fina (lâminas) coradas com Giemsa. As linhagens celulares BME/CTVM6 infectadas com *E. minasensis* foram então expostas à concentração de 0,2 mg/mL do análogo alcino do espilantol, concentração esta correspondente à CL_{50} para a linhagem BME/CTVM6. Linhagens celulares não infectadas com *E. minasensis* também foram expostas à concentração de 0,2 mg/mL do análogo alcino do espilantol para serem utilizadas como grupo controle. Além disso, linhagens BME/CTVM6 infectadas com *E. minasensis* e não infectadas foram expostas apenas ao meio de cultura L-15 para serem utilizadas também como grupo controle.

Decorridos sete dias da exposição, foram obtidos preparados citológicos de camada fina (lâminas), que foram posteriormente corados por Giemsa (Sigma)

(MANGIA et al., 2018). A taxa de infecção (% de células infectadas) foi determinada pela contagem do número de células não infectadas e células contendo colônias bacterianas, para um total de pelo menos 500 células de carrapato.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

Os resultados obtidos no presente trabalho estão sendo aqui apresentados em nove capítulos: dois capítulos de livro publicados, três artigos publicados em revistas internacionais, um artigo publicado em revista de divulgação científica e três artigos em preparação, para serem posteriormente submetidos a publicação em periódico científico internacional e especializado na área do estudo.

CAPÍTULO 1

MICROSCOPIC TECHNIQUES APPLIED IN TICK RESEARCH[1]

[1] **Luís Adriano Anholeto**; Patrícia Rosa de Oliveira; José Ribamar Lima de Souza; Rusleyd Maria Magalhães de Abreu; Elen Fernanda Nodari, Melissa Carolina Pereira; Izabela Bragião Calligaris; Maria Izabel Camargo-Mathias. Capítulo publicado no livro "**Inside Ticks: Morphophysiology, Toxicology and Therapeutic Perspectives**" Maria Izabel Camargo-Mathias (Ed.). São Paulo: Editora UNESP, 2018.

1
Microscopic techniques applied in tick research

Luis Adriano Anholeto, Patrícia Rosa de Oliveira, José Ribamar Lima de Souza, Rusleyd Maria Magalhães de Abreu, Elen Fernanda Nodari, Melissa Carolina Pereira, Izabela Bragião Calligaris, Maria Izabel Camargo-Mathias

Histology is a useful tool that helps in the study of tissues, showing how cells and intercellular matrix interact in the same environment. The small size of the cells and components of the extracellular matrix, makes histology dependent on the use of microscopes that can be of several types. In the specific case of tissue evaluation, the use of the bright field microscope is quite common, however, in order to reach this stage, it is necessary to perform several procedures which include from the adequate fixation of the material to obtaining the histological sections.

Among the steps that involve the final obtaining of a histological slide are:

- *Collection of biological material*: which consists of removing fragments of the tissue to be analyzed

and obtained from a living organism (biopsy or surgery).

- *Fixation*: fixation is the process of placing the material in a fixative (chemical substances, heat, freezing, etc.) so that the material maintains its morphological and physiological characteristics as similar as possible to its original composition, thus avoiding the occurrence of autolysis, an effect of the action of enzymes in the cells themselves and that with the change of pH, after removal the tissue of live organism, can undergo serious modifications.
- *Dehydration*: is necessary to remove all accumulated water from the tissue so that the fixing substances can penetrate inside the material. In addition, the formulas which are used to include the tissues in the blocks to be sectioned usually carry in their composition paraffin or even plastic resins, which are hydrophobic and therefore do not homogenize with water. For the dehydration, a battery of increasing concentrations (70, 80, 90, 95 and 100%) of ethyl alcohol or acetone is used.
- *Inclusion*: includes the placement of fragments of tissues already fixed and dehydrated in substances that when polymerized will allow the section of the material to proceed. To do so, the fragments already previously infiltrated in paraffin or resins are placed in appropriate molds, filled with paraffin or resin, and transported in an incubator for polymerization (hardening).
- *Microtomy*: the next step is to obtain very thin sections (3 to 7 μm) of the material to be analyzed. The equipment used to make these sections is the microtome, to which a knife that can be made of steel, glass, tungsten, etc. is adapted.

- *Staining*: for the sectioned material to be observed under a bright field microscope, the cells and the extracellular matrix must be evidenced by specific dyes, since without the tissue exhibit a transparency which unable its visualization. Besides allowing to visualize the structures of the tissue, the dyes also show the presence of their chemical constituents (proteins, lipids and carbohydrates). Among the dyes most frequently used in histology are hematoxylin and eosin (HE), which the first staining the nucleus in violet and the second staining the cytoplams in pink. For the detection of specific tissue elements such as lipids, proteins, carbohydrates, special histochemical techniques and/or reactions are employed.

The following are summarized the histological and histochemical techniques most used in laboratory routines:

Harris hematoxylin and aqueous eosin stain (Junqueira; Junqueira, 1983)

Material

Paraformaldehyde 4% (fixative)
PBS (NaCl 7.5 g/L, Na_2HPO_4 2.38 g/L and KH_2PO_4 2.72 g/L)
Ethanol series 70%, 80%, 90% and 95%
Historesin kit/Paraffin
Harris hematoxylin
Aqueous Eosin

Methods

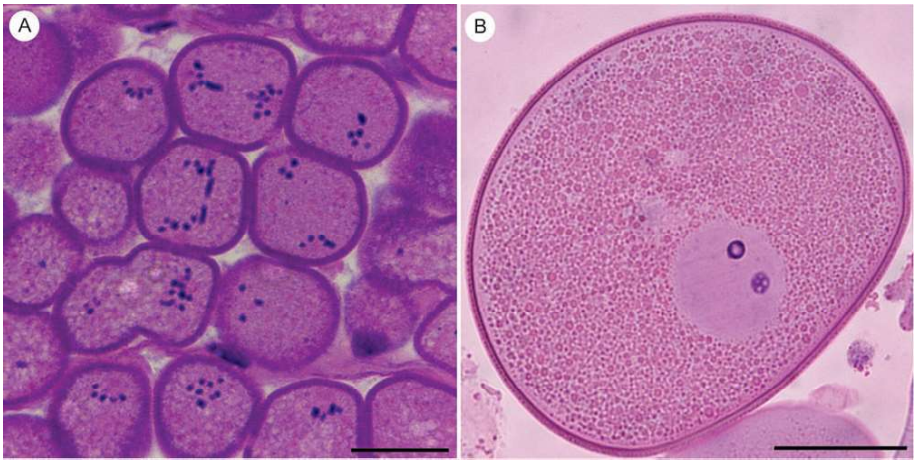
1. The material should be fixed in paraformaldehyde 4% for 48 hours, and transferred to phosphate

buffered saline (NaCl 7.5 g/L, Na_2HPO_4 2.38 g/L and KH_2PO_4 2.72 g/L), remaining for 24 hours.
2. The samples should be dehydrated in graded ethanol series 70%, 80%, 90% and 95% (30 minutes each bath).
3. Embedded in historesin containing an infiltration solution with 50 mL of (2-hydroxyethil) methacrylate and 0.5g of dibenzoylperoxide, according to the manufacturer's orientation for 24 hours.
4. Included in plastic molds containing historesin and polymerizer.
5. The blocks should be sectioned in microtome at 3 μm thickness, mounted on glass slides rehydrated in distilled water for 1 minute and stained with Harris hematoxylin for 8 minutes.
6. The material should be washed in running tap water for 3 minutes, stained with aqueous eosin for 5 minutes and washed in running tap water again. After drying at room temperature, the samples were rapidly immersed in xylol, covered with Canada balsam and a coverslip.

Results

At bright field microscopy, the basophilic components (nucleous for example) in general will present staining in purple and the acidophilic components (proteins for example) in general will present staining in pink (Figure 1A-B).

Figure 1 – Testes of *Amblyomma cajennense* complex stained with HE (A). Oocyte of *A. cajennense* stained with HE (B)



Bars: (A) 20 µm (B) 50 µm

Bromophenol blue (total protein) (Pearse, 1985)

Material

Paraformaldehyde 4% (fixative)
Phosphate buffered saline (PBS)
Ethanol series 70%, 80%, 90% and 95%
Historesin kit/Paraffin
Bromophenol blue
Acetic acid 0.5%

Methods

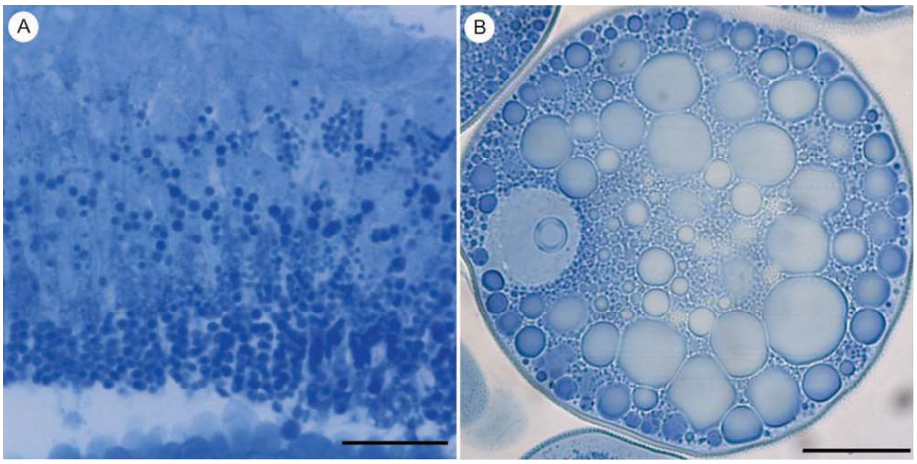
1. Fixation in paraformaldehyde 4% for 48 hours.
2. Transfer to PBS, where they stay for 24 hours.
3. The material should be dehydrated, embedded in historesin containing an infiltration solution and included in plastic molds containing historesin and polymerizer.
4. The blocks sectioned and mounted on glass slides.

5. The slides immersed in Bromophenol blue for 2 hours at room temperature.
6. The material should be washed in acetic acid 0.5% for 5 minutes and in running tap water for 15 minutes.
7. After drying at room temperature, the samples should be rapidly immersed in xylol, and covered with Canada balsam and a coverslip.

Results

At bright field microscopy, the protein contents will be staining in blue (Figure 2A-B).

Figure 2 – Accessory glands of testis of *A. cajennense* stained with bromophenol blue (A). Oocyte of *A. cajennense* stained with bromophenol blue (B)



Bars: (A-B) 20 µm

PAS (Periodic Acid-Schiff) for neutral polysaccharides (Junqueira; Junqueira, 1983)

Material

Aqueous Bouin (fixative)

PBS (NaCl 7.5 g/L, Na_2HPO_4 2.38 g/L and KH_2PO_4 2.72 g/L)

Ethanol series 70%, 80%, 90% and 95%

Historesin kit/Paraffin

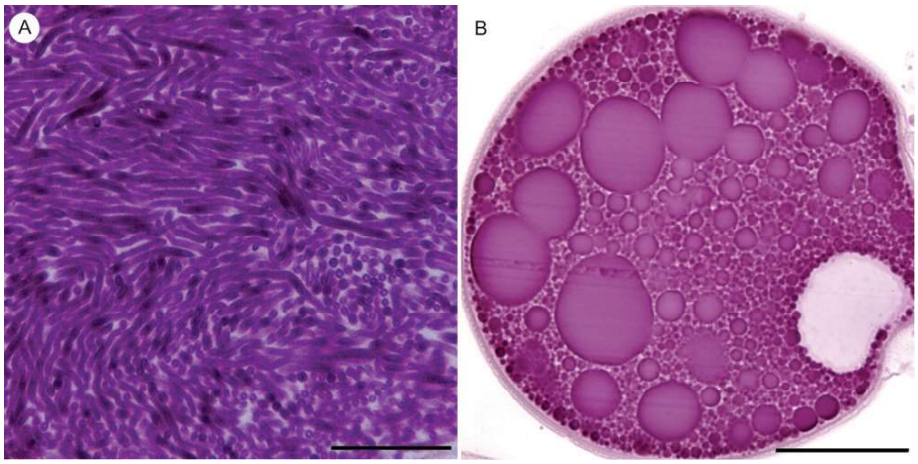
Methods

1. Fixation in aqueous Bouin for 5 days.
2. Transfer to PBS, where they stay for 24 hours.
3. The material should be dehydrated, embedded in historesin containing an infiltration solution and included in plastic molds containing historesin and polymerizer, the blocks sectioned and mounted on glass slides.
4. The slides should be rehydrated for 1 minute in distilled water and transferred to periodic acid solution 4% for 10 minutes.
5. Washed in distilled water for 1 minute, and immersed in Schiff reagent for 1 hour.

Results

PAS staining is mainly used for staining structures containing a high proportion of carbohydrate macromolecules (glycogen, glycoprotein, proteoglycans). At bright field microscopy, these structures will be staining in purple-magenta color (Figure 3A-B).

Figure 3 – Seminal vesicle of *A. cajennense* stained with PAS (A) Oocyte of *A. cajennense* stained with PAS (B)



Bars: (A) 50 µm; (B) 200 µm

Imidazole-osmium (Pereira et al., 2016)

This technique has been applied for the detection of lipids in histological preparations. The affinity of the imidazole – osmium with lipid components present in biological membranes allows a precise individualization of the granules when it reacts with the cell boundaries, through bright field light microscopy. This element is detected in the histological sections showing staining ranging from light brown to dark brown (and sometimes black) depending on the observed cell or other regions.

Material

Glutaraldehyde 2.5%, neutral buffered formalin 10% or formal calcium (fixative)

Phosphate buffered saline (PBS) 0.1M (pH 7.2)

Imidazole buffer 0.2M (pH 7.5) (stock solution)

Osmium tetroxide at 4% (stock solution)

Methods

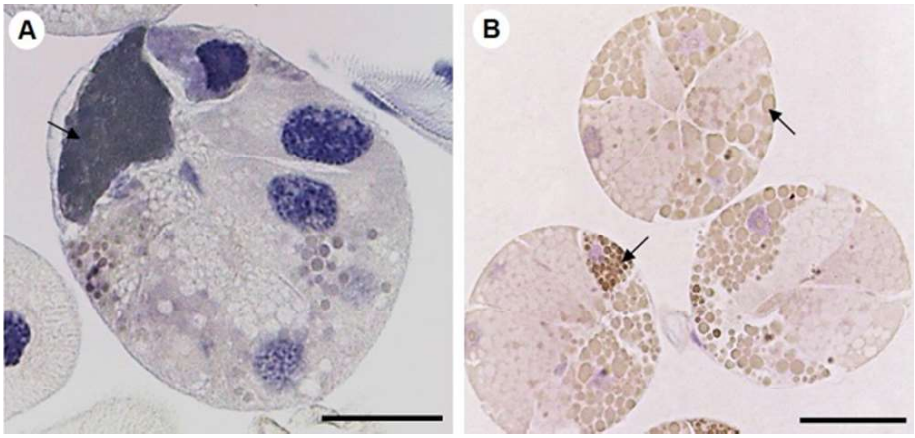
1. Fixation of the material in glutaraldehyde 2.5%, neutral buffered formalin 10% or formal calcium for 2 hours.
2. After 2 hours, wash the material twice with PBS 0.1M (pH 7.2) for 15 minutes each.
3. In a test tube, add 5 mL of osmium tetroxide at 4% and 5 mL of the imidazole buffer 0.2M (pH 7.5) to obtain the ideal concentration of imidazole-osmium solution for the technique (osmium tetroxide at 2% in imidazole buffer 0.1M).
4. In the same test tube, incubate the material in the imidazole-osmium solution for 30 minutes, in the dark, at a room temperature 25°C.
5. After incubation, wash the material once with imidazole buffer 0.1M (pH 7.5) and twice with PBS 0.1M (pH 7.2), for 15 minutes each. The post-fixation time (including the incubation period and washing in buffer and PBS) can be longer than 15 minutes, depending on the size and thickness of the material.
6. Proceed with routine histological processing steps (dehydration, embedding, inclusion and sectioning). The histological sections obtained after sectioning can be counterstained with Harris' hematoxylin or methyl green to detect the nuclei of cells.

Results

After the post-fixation time (incubation in the imidazole-osmium solution), the material will present a denser and darker aspect.

At bright field microscopy, the lipid components in granules and biological membranes in general will present staining ranging from light brown to black (Figure 4 A- B).

Figure 4 – Acini type II (A) and III (B) from salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato stained with imidazole-osmium technique to detect the lipid content (*arrow*) present in their cytoplasmic granules. The staining intensity can range from light brown to black depending on the chemical composition of the observed regions



Bars: (A) 50 µm; (B) 100 µm

Acid phosphatase (Hussein et al., 1990)

This technique aims to detect the activity of acid phosphatase (Figure 5A-B), being used as a localization of lysosomes (to be part of the secretion of this organelle), detection of this free enzyme (as a constituent of secretions, for example glandular secretion) or to confirm the process of autophagic cell death.

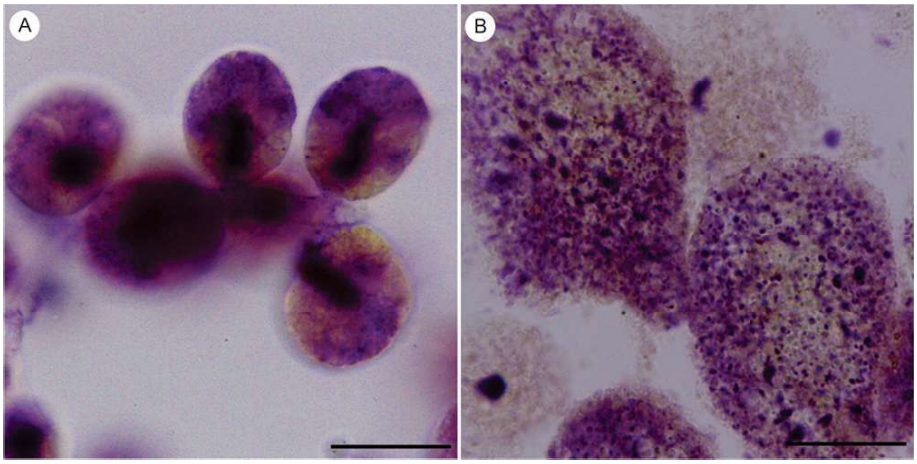
Material

10% buffered neutral formalin (fixative)
Sodium acetate buffer (0.05M, pH 4.8)
Naphthol AS-TR phosphate
DMSO (dimethyl sulfoxide)
10% $MnCl_2$-$4H_2O$
Violet red salt

Methods

1. The material should be fixed in 10% buffered neutral formalin for one hour and thirty minutes at 4°C.
2. Subsequently, they should be washed in sodium acetate buffer (0.05M, pH 4.8) and incubated for 45 minutes at 37°C in the following medium: naphthol AS-TR phosphate, DMSO (dimethyl sulfoxide), sodium acetate buffer (0.05M, pH 4.8), 10% $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ and violet red salt.
3. For the preparation of the incubation medium, 3 mg of the naphthol AS-TR phosphate substrate should be dissolved in two drops of DMSO and then 10 mL of sodium acetate buffer are added.
4. Then 0.2 mL of 10% manganese chloride, 6 mg of the violet red salt should be added and, finally, the final solution will be vigorously stirred.
5. For negative control of the technique, one sample should be incubated without substrate (3 mg naphtol AS-TR phosphate).

Figure 5 – Salivary glands of *R. sanguineus* s. l. stained with acid phosphatase (A). Midgut of *R. sanguineus* s. l. stained with acid phosphatase (B)



Bars: (A) 50 µm; (B) 20 µm

Ponceau Xylidine (Vidal; Mello, 1987)

This technique has been applied to evidence the total proteins in histological preparations.

Material

Paraformaldehyde at 4% or neutral buffered formalin 10% (Fixation)

Phosphate buffered saline (PBS) 0.1M (pH 7.2).

acetic acid 1%

Ponceau Xylidine

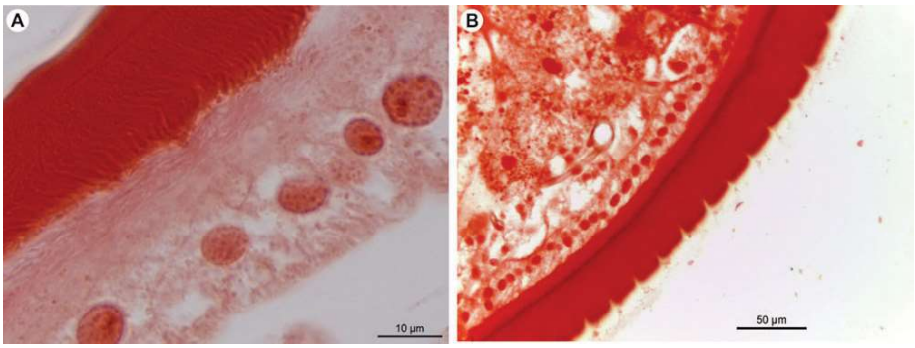
Methods

1. The material should be fixed in paraformaldehyde 4% or in neutral buffered formalin 10% for 72 hours.
2. Subsequently, they should be stained with Ponceau Xylidine for 30 min and washed in tap running water.
3. The material should be transferred to acetic acid 1% for 1 min, dried and mounted in Canada balsam.

Results

The detection of total proteins by orange staining (Figure 6A-B).

Figure 6 – Integument of *R. sanguineus* s. l. (A-B) stained with Ponceau Xylidine



Bars: (A) 10 µm; (B) 50 µm

Toluidine blue (Mello and Vidal,1980)

This technique has been used to evidence DNA and RNA in histological preparations.

Material

Paraformaldehyde at 4% or neutral buffered formalin 10% (Fixation)

Phosphate buffered saline (PBS) 0.1M (pH 7.2)

Toluidine blue.

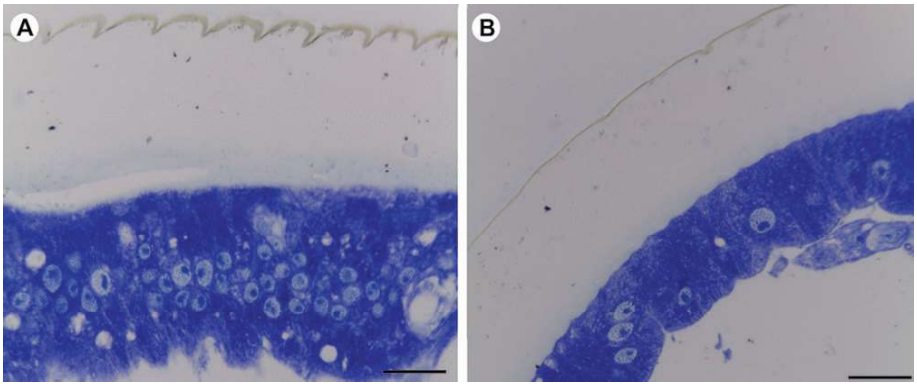
Methods

1. The material should be fixed in paraformaldehyde 4% or in neutral buffered formalin 10% for 72 hours.
2. Subsequently, they should be immersed in a Toluidine blue solution for 3 min at room temperature.
3. The material should be rinsed with distilled water and mounted in Canada balsam.

Results

The detection of DNA and RNA by blue staining (Figure 7A-B).

Figure 7 – Integument of *R. sanguineus* s. l. (A-B) stained with toluidine blue



Bars: (A-B) 50 mm

CAPÍTULO 2

GENERATING NEW INDIVIDUALS II (MALE REPRODUCTIVE SYSTEM)[2]

[2] **Luís Adriano Anholeto**; Bruno Rodrigues Sampieri; Maria Izabel Camargo-Mathias. Capítulo publicado no livro "**Inside Ticks: Morphophysiology, Toxicology and Therapeutic Perspectives**" Maria Izabel Camargo-Mathias (Ed.). São Paulo: Editora UNESP, 2018.

8
Generating new individuals II (male reproductive system)

Luis Adriano Anholeto, Bruno Rodrigues Sampieri, Maria Izabel Camargo-Mathias

Ticks are dioecious arthropods that reproduce by internal syngamy (Coons; Alberti, 1999; Kiszewski; Matuschka; Spielman, 2001). Parthenogenesis is rare, occurring in the Ixodidae species *A. rotundatum* and *Haemaphysalis longicornis* (Luz et al., 2013; Oliver; Stone, 1983; Sonenshine; Roe, 2014).

The reproductive systems (Figure 25) of the families Argasidae and Ixodidae are similar in morphology; however, significant differences between the groups have been reported, and such variations are important for taxonomic and phylogenetic studies (Sampieri et al., 2014).

In both families, the male reproductive system is dorsolaterally arranged in the opisthosoma and is formed by a accessory gland complex multilobulated, a pair of tubular testes (or single testis), a pair of vas deferens, a pair of

seminal vesicle and an ejaculatory duct (Anholeto, 2015; Sampieri et al., 2014; Sonenshine, Roe, 2014).

In Ixodidae, the testes are not interconnected, i.e., the right and the left testis are individual organs. Such pattern has been observed in *Dermacentor andersoni* (Douglas, 1943), *A cajennense*, *A. scultpum* and *A. aureolatum* (Anholeto et al., 2015; Sampieri et al., 2016).

Studies performed by Sampieri et al. (2016), reported the presence of a connection between the right and left testes in *A. triste*, a thin tube found in the distal portion of each testis, also observed in *Ornithodoros moubata* (Wagner-Jevsenko, 1958). In the individuals from the family Argasidae, including those of the species *O. rostratus,* the testes are fused into a single U-shaped structure (Coons; Alberti, 1999).

The testis are responsible for the production of germ cells, which are grouped and surrounded by a simple columnar epithelium, forming the spermatocytes (Sonenshine; Roe, 2014).

The development of germ cells is basically divided into two steps: a) spermatogenesis, characterized by a sequence of mitotic and meiotic division of spermatogonia and spermatocytes, originating spermatids and b) spermiogenesis, differentiation of spermatids to originate the spermatozoa (Sonenshine; Roe, 2014).

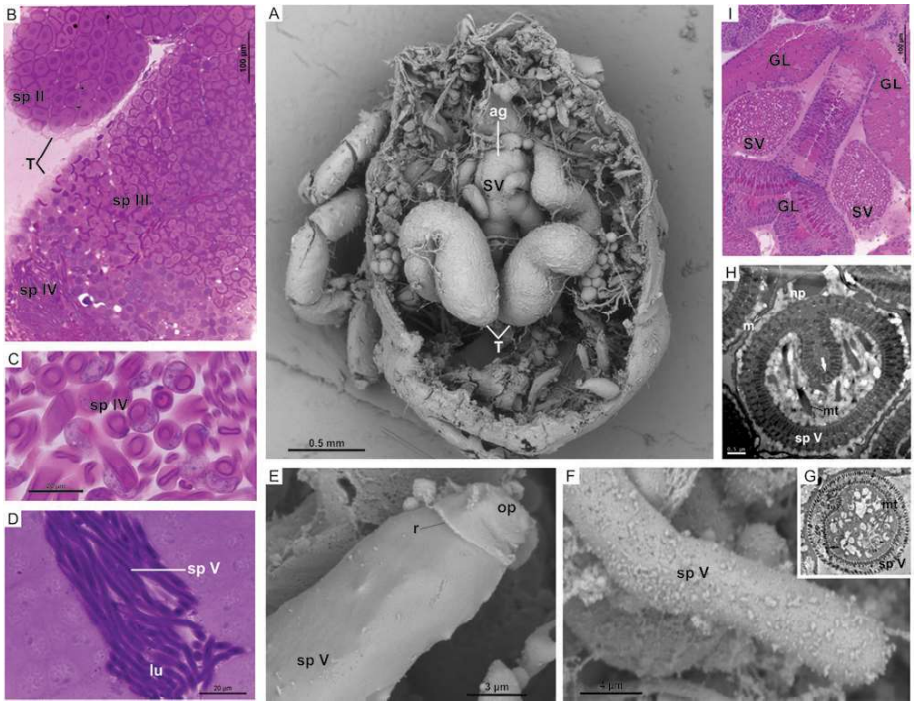
In most Ixodidae species, the spermatogenesis begins in the end of nymph stage, which was demonstrated in *R. sanguineus* s. l. nymphs (Oliveira, et al. 2012), and finishes soon after ecdysis. However, this is not a general rule, once in some species the spermatogenesis is concluded when the male reaches the adult phase and starts the feeding process (Anholeto et al., 2015; Oliver; Brinton, 1972; Sonenshine; Roe, 2014). In some Argasidae and in the extinct *Aponomma,* this process in independent of the feeding stage of the adult individual (Coons; Alberti, 1999; Dumser; Oliver, 1981).

The first staged of spermatogenesis in fed adults males occur from the distal to the proximal regions of the body (Anholeto et al., 2015; Coons; Alberti, 1999; Sampieri et al., 2014).

After differentiation, the elongated spermatids are released into the lumen of a small channel to reach the proximal region of the testes, the beginning of the deferent ducts. These ducts are in contact with the seminal vesicles, which are connected with a complex of multilobulated accessory glands, responsible for the production and secretion of spermatic fluid and for spermatophore synthesis (Anholeto et al., 2015; Coons; Alberti, 1999; Sonenshine; Roe, 2014).

The end of spermiogenesis occurs in the interior of the female genital tract, where the spermatozoa will undergo capacitation, which will enable them to fertilize the oocytes (Kiszewski et al., 2001).

Figure 25 – (A) *R. sanguineus* s. l. reproductive system overview (SEM) of a fed male, showing testis (T), accessory gland (ag) and seminal vesicles (SV) organization and anatomical position. (B-C) Histological section of *R. sanguineus* s. l. testicle distal region, with details of spermatids in different stages of development. (D) Longitudinal section of *A. triste* testicle showing mature spermatids (spV) in its lumen. (E-F) Ultramorphology (SEM) of mature spermatids of *O. rostratus* (Argasidae) and *R. sanguineus* s. l. (Ixodidae), respectively. (G) Ultrastructure of *R. sanguineus* s. l. spermatids, featured the cisternae (*arrow*) formation and mitochondria (mt) distribution. (H) Ultrastructure of *O. rostratus* spermatids. (I) Histological section of *R. sanguinues* s. l. accessory gland and seminal vesicles. gl = glandular lobe; op = operculum; sp = spermatids



CAPÍTULO 3

POTENTIAL ACTION OF EXTRACT OF *Acmella oleracea* (L.) R.K. JANSEN TO CONTROL *Amblyomma cajennense* (FABRICIUS, 1787) (ACARI: IXODIDAE) TICKS[3]

Resumo

Atualmente, o principal método de controle de carrapatos é baseado no uso de acaricidas sintéticos. Entretanto, o uso indiscriminado desses químicos pode levar a seleção de indivíduos resistente, além disso seus resíduos podem acumular no ambiente o que, consequentemente, poderá levar à contaminação do solo, cursos d'água, além da fauna e a flora, o que vem comprometer inclusive a saúde humana. Nesse sentido, o objetivo deste estudo foi investigar o potencial acaricida do extrato etanólico das partes aéreas de *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen em diferentes concentrações em machos alimentados e fêmeas semi-ingurgitadas de *Amblyomma cajennense.* Para isso, foi realizado bioensaio *in vitro* (Teste de Imersão de Adultos) para se determinar a concentração letal de 50% (CL_{50}) do extrato etanólico, calculado pela análise Probit. Os resultados obtidos indicaram que os machos alimentados são sensíveis a todas as concentrações testadas do extrato de *A. oleracea* e a mortalidade dos carrapatos aumentou de 15 a 65%, proporcionalmente ao aumento das concentrações. Entretanto, as fêmeas semi-ingurgitadas não foram sensíveis a todas as concentrações do extrato etanólico aqui utilizadas. Na maior concentração (100 mg/mL) a taxa de mortalidade foi de 100% dos carrapatos, observada já após 72 horas de exposição, indicando que o efeito acaricida provavelmente é dose-dependente. Os valores de CL_{50} obtido para machos alimentados e fêmeas semi-ingurgitadas de *A. cajennense* foram: 29,4534 mg/mL (limites: 24,4467 – 41,3847 mg/mL) e 17,6335 mg/mL (limites: 5,2506 – 23,5335 mg/mL), respectivamente.

Palavras-chave: controle natural; carrapatos; acaricida; jambu; CL_{50}.

[3] **Luís Adriano Anholeto**; Patrícia Rosa de Oliveira; Rodney Alexandre Ferreira Rodrigues; Caroline dos Santos Spindola; Marcelo Bahia Labruna; Marcos Aparecido Pizano; Karina Neoob de Carvalho Castro; Maria Izabel Camargo-Mathias. Artigo publicado na Revista **Ticks and Tick-borne Diseases** em 2017, v.8, p. 65-72.

Ticks and Tick-borne Diseases 8 (2017) 65–72

Contents lists available at ScienceDirect

Ticks and Tick-borne Diseases

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ttbdis

Potential action of extract of *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen to control *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) ticks

Luís Adriano Anholeto[a], Patrícia Rosa de Oliveira[a], Rodney Alexandre Ferreira Rodrigues[b], Caroline dos Santos Spindola[b], Marcelo Bahia Labruna[c], Marcos Aparecido Pizano[d], Karina Neoob de Carvaldo Castro[e], Maria Izabel Camargo-Mathias[a,*]

[a] Department of Biology, Institute of Biosciences, São Paulo State University, UNESP, Av. 24 A, no 1515, 199, 13506-900, Rio Claro, SP, Brazil
[b] Division of Chemistry of Natural Products, CPQBA/UNICAMP, Av. Alexandre Cazellato, 999, 13140-000, Paulínia, SP, Brazil
[c] Department of Preventive Veterinary Medicine and Animal Health, University of São Paulo- USP, Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87, 05508-270, Cidade Universitária, São Paulo, SP, Brazil
[d] Department of Ecology, Institute of Biosciences, São Paulo State University, UNESP, Av. 24 A, 1515, 13506-900, Rio Claro, SP, Brazil
[e] Embrapa Meio-Norte, BR 343, km 35, CP 341, 64.200-970, Parnaíba, PI, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 17 May 2016
Received in revised form 23 August 2016
Accepted 29 September 2016
Available online 30 September 2016

Keywords:
Natural control
Ticks
Acaricide
Jambu
LC_{50}

ABSTRACT

The use of synthetic acaricides is currently the main method to control ticks. However, the indiscriminate use of these chemicals can lead to the selection of resistant individuals and in the accumulation of chemical residues in the environment, contaminating the soil and water streams, consequently affecting the flora, fauna, and the human beings as well. In this sense, the objective of this study was to investigate the acaricidal effect of crude ethanolic extract of *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen aerials parts at different concentrations on fed males and semi-engorged females of *A. cajennense* s.s. An *in vitro* bioassay (Adult Immersion Test) was carried out to determine the lethal concentration 50 (LC_{50}) of ethanolic extract, calculated by Probit analysis. The results showed that the fed males were sensitive to all the concentrations of *A. oleracea* ethanolic extract, and mortality rate progressively increased (15–65%) in higher ethanolic extract concentrations. However, semi-engorged females were not sensitive to all the concentrations used here. In the highest concentration (100 mg/mL), a mortality rate of 100% was observed after 72 h of exposure, indicating that the acaricidal effect would probably be dose-dependent. The LC_{50} values obtained for the fed *A. cajennense* s.s males and semi-engorged females were 29.4534 mg/mL (limits: 24.4467–41.3847 mg/mL) and LC_{50} = 17.6335 mg/mL (limits: 5.2506–23.5335 mg/mL), respectively.
© 2016 Elsevier GmbH. All rights reserved.

1. Introduction

Amblyomma cajennense (Fabricius, 1787) ticks are ectoparasites of great medical and veterinary importance, once they parasitize domestic ungulates and are associated with the transmission of several pathogens to other animals and human beings as well (Beati et al., 2013; Estrada-Peña et al., 2014).

The adult tick *A. cajennense* s.l., popularly known as the star tick or horse tick, is the main vector of the bacterium *Rickettsia rickettsii*, etiologic agent of Brazilian spotted fever (Rocky Mountains fever or tick fever), whose infection can lead the host to death (Soares et al., 2015). In addition, these ticks are vectors of *Theileria equi*, etiological agent of equine piroplasmosis (Scoles and Ueti, 2013; Scoles et al., 2011).

Several studies have focused on these ectoparasites, not only due to their medical and veterinary importance, but also aiming to find new and efficient strategies to control them without harming the environment or non-target organisms (Oliveira et al., 2009, 2008; Roma et al., 2009).

Although several methods for the effective control of ticks have been tried, the most effective is still the use of synthetic chemical acaricides. However, this method causes serious damages to the environment and public health; in addition, the chemicals are costly and the technique requires specialized labor and appropriate equipment (Nolan, 1985; Pruett, 1999). Furthermore, the chemical residues accumulate in the environment, contaminating the soil, water streams, and, consequently, the fauna, flora and the human beings as well (Nolan, 1985; Oliveira et al., 2009, 2008; Pruett, 1999; Roma et al., 2009).

* Corresponding author.
E-mail address: micm@rc.unesp.br (M.I. Camargo-Mathias).

http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.09.018
1877-959X/© 2016 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Acaricides with different chemical formulations and active ingredients have been used in an attempt to overcome the survival strategies of the ticks, which involve reduced penetration or uptake of the chemical, metabolic changes and storage/excretion of the substance used (Abbas et al., 2014; Nolan, 1985). The indiscriminate use of different synthetic chemicals has been responsible for the emergence of resistant tick strains (Abbas et al., 2014; Crampton et al., 1999).

Therefore, control strategies based on the use of acaricides produced from plant extracts are very promising alternatives, especially considering the large amounts and the toxic effects of synthetic acaricides used today, affecting the environment and nontarget organisms as well (Borges et al., 2011; Dietrich et al., 2006; Matos et al., 2014a; Panella et al., 2005; Remedio et al., 2015; Vendramini et al., 2012).

Acmella oleracea is a plant introduced from Brazil and is found in the tropical regions close to the Equator, Africa, Asia and South America (Favoreto and Gilbert, 2010). In Brazil, it is popularly known as Jambu, watercress-of-Pará, watercress-of-the-north or watercress-bravo, being a typical vegetable in the north region, much used in local cuisine (Favoreto and Gilbert, 2010). It is an annual, perennial herbaceous plant, up to 40 cm of height, almost creeping, which presents small yellowish flowers arranged in globular terminal sections of approximately 1 cm (Favoreto and Gilbert, 2010). The ingestion of their aerial parts (flowers, leaves and stem) causes tongue tingling, a result of the anesthetic effect of secondary metabolites present in the plant (Dubey et al., 2013; Favoreto and Gilbert, 20100; Ramsewak, 1999). It is also used in popular medicine as potent analgesic and local anesthetic in the treatment of mouth ulcers, herpes, throat infections; in addition to presenting insecticide, fungicide, and fungistatic activities (Fabry et al., 1996; Nigrinis et al., 1986; Ramsewak, 1999; Torres and Chávez, 2001).

Studies conducted by Castro et al. (2014) demonstrated the acaricidal effects of the extract produced from the aerial parts (flower, leaf and stem) of this plant. These extracts have been used to control *Rhipicephalus microplus* ticks, presenting great efficacy in the control of larvae and engorged females of this species (Castro et al., 2014).

The main biological effects reported herein have been assigned to spilanthol or affinin [*N*-2-Metilpropil-2,6,8-decatrienamida or *N*-isobutyl-2E,*6Z,8E*-decatrienamida], an aliphatic alcamid of molecular formula $C_{14}H_{23}NO$, abundantly found in the *A. oleracea* flowers, leaves and stem (Ramsewak, 1999).

Therefore, the present study evaluated the acaricidal potential of *A. oleracea* (L.) R.K. Jansen ethanolic extract, obtained from the aerial parts (flower, leaf and stem) of the plant, to control fed males and semi-engorged females of *A. cajennense* s.s. (Fabricius, 1787) adults ticks. For this purpose, the Adult Immersion Test (Drummond et al., 1973) was used to estimate the 50% lethal concentration (LC_{50}) of extract for this species.

2. Materials and methods

2.1. Preparing the crude Acmella oleracea (L.) R.K. Jansen ethanol extract

The extract of *A. oleracea* was provided by PhD Rodney A. F. Rodrigues from the Chemical, Biological and Agricultural Pluridisciplinary Research Center CPQBA/UNICAMP, Campinas, SP, Brazil. The plants were cultivated in the experimental field (geographic coordinates, 22°47′52″S, 47°6′49″W) of CPQBA, Paulinia, SP, Brazil, and identified by PhD John F. Pruski from the Missouri Botanical Garden (USA). The voucher specimen was 181.452, deposited at the CPQBA Herbarium (number 181,452). Authorization Genetic Heritage access (Cgen) number 010577/2014-9.

The aerial parts (flowers, leaves and stem) of *A. oleracea* were dried and milled. The extraction was then performed under mechanical agitation with 96° GL ethanol (1:5 ratios, plant: solvent, w/v) in a stainless steel vessel for 1.5 h. The remaining residue was filtered and the extraction step was repeated twice. The final product was filtered, pooled, concentrated under vacuum and then freeze dried to determine the process yield.

2.2. Analytical monitoring of spilanthol

The quantification of spilanthol in the extract was performed through gas chromatography, using a gas chromatograph coupled with a mass detector (GC–MS, Agilent® 5890 Series II mass selective detector Agilent® 5970 EI 70 eV) equipped with a fused silica column WCOT, HP5-MS, Agilent®, dimensions 30 m × 0.25 mm × 0.25 μm. The analysis conditions were: injector temperature: 220 °C; detector temperature: 250 °C, temperature program: 60–240 °C (3 °C/min), sample injection using split mode at 1:40 ratio, Helium gas was used as the carrier 0.7 bar, 1 mL/min. The spilanthol percentage was determined by GC/MS analysis comparing mass fragmentation pattern and the database library from the National Institute of Standards and Technology (NIST) Mass Spectral Search Program® (2005), with 32.4% of purity from normalization method.

2.3. Maintenance of Amblyomma cajennense (Fabricius, 1787) ticks

Amblyomma cajennense s.s. ticks were provided by PhD Marcelo Bahia Labruna from the Department of Preventive Veterinary Medicine and Animal Health, University of Sao Paulo (USP), SP, Brazil. The ticks were maintained under controlled conditions (28 ± 1 °C, 85% humidity and 12 h photoperiod) in BOD (Biological Oxygen Demand) incubator at the Biology Department – UNESP, campus Rio Claro, SP, Brazil.

The adult fed males and semi-engorged females were obtained by artificial infestations on Botucatu Genetic Group rabbit hosts at the Animal Facility from UNESP, Rio Claro Campus, SP, Brazil, following Bechara et al. (1995) protocol. The rabbits, weighing 3–3.5 kg, were obtained from the Animal Facility of UNESP, campus Botucatu, SP, Brazil and housed in the Animal Facility of UNESP, Rio Claro Campus, SP, Brazil. Animals did not have prior contact with ticks or acaricides and were kept under controlled conditions. During the entire experiment, animals were maintained in cages and received water and rabbit food *ad libitum*. This study was approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation of UNESP, Rio Claro Campus, SP, Brazil, protocol number 11/2015.

The semi-engorgement feeding stage was chosen to approximate the experiment to field conditions, once in this phase the ticks remain attached to the host ingesting blood, causing damages to the host organism and transmitting pathogens.

2.4. Adult immersion test (AIT)

2.4.1. Bioassay 1 – mortality interval protocol

The Adult Immersion Test (AIT) described by Drummond et al. (1973) was used to determine the mortality interval *A. cajennense* s.s. fed males and semi-engorged females.

Fed *A. cajennense* s.s. males weighing 10 mg on average (about ten days feeding on rabbit hosts) and semi-engorged females adults (about ten days of feeding on rabbit hosts) weighing 27 mg on average (280 couples) were collected from artificial infestation on five rabbit hosts (56 couples on each rabbit). Prior to the experiment, the ticks were washed in running tap water and dried with soft absorbent paper. Then, the individuals were divided into seven groups of homogeneous weights ($p > 0.05$), 10 ticks for each

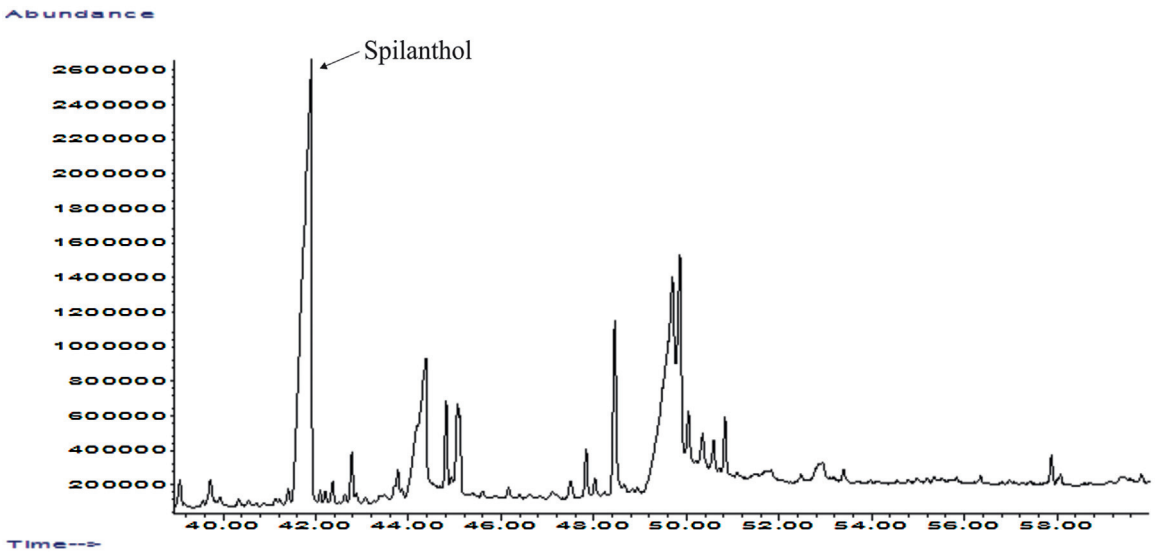


Fig. 1. GC/MS analysis chromatogram of *A. oleracea* crude extract; spilanthol was detected at 41.9 min.

group. The groups were treated as follows: Control group 1–Ticks immersed in distilled water; Control group 2–ticks immersed in 50% ethanol and 1% DMSO; Treatments 1 to 5–ticks immersed in the concentrations of 6.2; 12.5; 25; 50 and 100 mg/mL of *A. oleracea* ethanolic extract, respectively, obtained by the dilution into 50% ethanol and 1% DMSO. The initial concentrations of the extract were established according to Castro et al. (2014). The tests were performed in duplicate.

The ticks were immersed in the concentrations for 5 min, dried in absorbent paper, mounted on labeled Petri dishes, and kept in BOD incubator (28 ± 1 °C, 85% humidity and 12 h photoperiod). To determine the mortality potential of the *A. oleracea* ethanol extract on males and semi-engorged females, daily observations were made for 7 days. This period was suggested by Oliveira et al. (2008) in studies with *R. sanguineus* s.l. females subjected to fipronil, since the acaricide reaction is not immediate, acting slowly on the physiology of the individuals and the morphological alterations usually occur after this period.

In this bioassay, the ticks were exposed to carbon dioxide for 30 min and gently touched with the tip of a paintbrush to stimulate movement. Individuals not moving at all after 10 min were considered dead; and alterations such as a progressive decrease in locomotor capacity, prostration in inverted position, stretching of all legs, paralysis, and morphological alterations (e.g. integument consistency and color) were also observed.

2.4.2. Bioassay 2 – determining the lethal concentration 50%

After determining the mortality interval (12.5–50 mg/mL) in bioassay 1, new dilutions were performed to obtain concentrations within this mortality interval.

Fed males weighing 10 mg on average and semi-engorged females adults (about ten days of feeding on rabbit hosts) weighing 27 mg on average (320 couples) were collected from artificial infestation on five rabbits' hosts (64 couples of ticks each rabbit). Prior to the experiment, ticks were washed in running tap water and dried with soft absorbent paper. The individuals were then divided into eight groups with homogenous weights ($p > 0.05$), 10 ticks each group. The groups were treated as follows: Control Group 1–ticks immersed in distilled water; Control Group 2–ticks immersed in 50% ethanol and 1% DMSO; Treatments 1 to 6–ticks immersed in the concentrations of 14.3; 16.6; 20; 25; 33 and 40 mg/mL of *A. oleracea* ethanolic extract, respectively, obtained by the dilution into 50% ethanol and 1% DMSO. The ticks were immersed in the concentrations for 5 min, dried in absorbent paper, mounted on labeled Petri dishes, and kept in BOD incubator (28 ± 1 °C, 85% humidity and 12 h photoperiod). To determine the mortality potential of the *A. oleracea* ethanol extract on males and semi-engorged females, daily observations were made for 7 days. This period was suggested by Oliveira et al. (2008) in studies with *R. sanguineus* s.l. females subjected to fipronil, since the action of the acaricide is not immediate, acting slowly on the physiology of the individuals and the morphological alterations usually occur after this period.

As in bioassay 1, the ticks were exposed to carbon dioxide for 30 min and gently touched with the tip of a paintbrush to stimulate movement. Individuals not moving at all after 10 min were considered dead; and alterations such as decrease in locomotor capacity, prostration in inverted position, stretching of all legs, paralysis, and morphological alterations (e.g. integument consistency and color) were also observed.

2.5. Statistical analysis

The mortality interval obtained for the fed *A. cajennense* s.s. males and semi-engorged females in Bioassay 1 and the mortality data obtained in Bioassay 2 were analyzed through one-way analysis of variance (ANOVA) with the application of *post hoc* test of Tukey, significance levels set at $p < 0.05$, using the software GraphPad Prism v.6 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). The mortality data obtained in Bioassay 2 were subjected to Probit analysis using the software BioStat v5 (AnalystSoft, 2015) to calculate the lethal concentration 50% (LC_{50}) and 95% confidence interval.

3. Results

3.1. Crude A. oleracea (L.) R.K. Jansen ethanolic extract

Crude ethanolic extract had the yield of 7.7 ± 0.08% on a dry basis. Analytical monitoring of the presence of spilanthol in the extract was performed by gas chromatography (Fig. 1). The ion fragments of spilanthol were consistent to the ion fragments detected in the NIST database, presenting 90% match as well as a confirmatory compound structure. The total ion chromatogram of the crude extract of *A. oleracea* also showed the presence of spilanthol, where the chromatographic peak was produced at retention time of 41.9 min (Fig. 1).

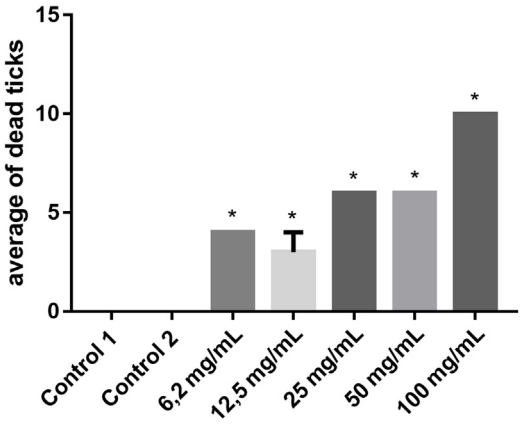


Fig. 2. Bioassay 1: average of dead *Amblyomma cajennense* s.s. male ticks on the 7th day of exposure to different *Acmella oleracea* ethanolic extract concentrations. *indicates statistically significant difference ($p < 0.05$). Control 1 = distilled water; Control 2 = 50% ethanol and 1% DMSO.

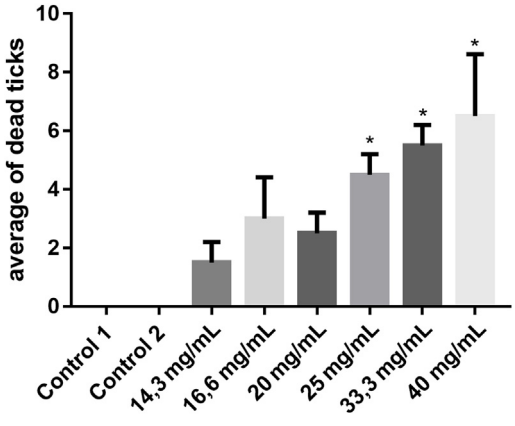


Fig. 3. Bioassay 2: average of dead *Amblyomma cajennense* s.s. male ticks on the 7th day of exposure to different *Acmella oleracea* ethanolic extract concentrations. *indicates statistically significant difference ($p < 0.05$) 1. Control 1 = distilled water; Control 2 = 50% ethanol and 1% DMSO .

3.2. A. oleracea *ethanolic extract efficacy against* A. cajennense *males*

A. oleracea ethanolic extract efficacy against *A. cajennense* s.s. fed males was obtained using 10 different concentrations of extract, tested in duplicate (Tables 1, 3, 5).

Bioassay 1 revealed that the male ticks were sensitive to all the ethanolic extract concentrations used here (Fig. 2). At the lowest concentration (6.2 mg/mL), dead ticks were found as from the 6th day (Table 1). However, after the treatment with the concentrations 25, 50 and 100 mg/mL, dead ticks were observed on the 1 st day (Table 1). At these concentrations, the individuals displayed a progressive decrease in the locomotor activity, prostration in inverted position, stretching of all legs and paralysis. The mortality rate (50–100%) increased with higher concentrations of the ethanolic extract (25, 50 and 100 mg/mL) (Fig. 2; Table 1). In higher concentrations, the ethanolic extract effects increased throughout the observations period. The 6th and 7th days of treatment showed the highest mortality rates (Table 1), the highest concentration of ethanolic extract (100 mg/mL) showed a mortality of 60% on the 1 st day and 100% on the 2nd day of the experiment (Table 1).

In the individuals belonging to control groups 1 and 2, mortality was not statistically significant and no behavioral changes or any abnormality regarding the morphology, coloration and consistence of the integument were visually observed during the 7-day observation period (Fig. 2; Table 1).

The results of Bioassay 1 showed that the mortality interval of fed *A. cajennense* s.s. males was between 12.5 and 50 mg/mL of the *A. oleracea* ethanolic extract. Based on these data, new dilutions were performed and new concentrations were obtained and used in Bioassay 2.

The results obtained in Bioassay 2 indicate that males were sensitive to all the ethanolic extract concentrations of the (Fig. 3; Table 3). In this bioassay, tick mortality progressively increased (15–65%) in higher concentrations of the ethanolic extract (14.3; 16.6; 20; 25; 33; and 40 mg/mL) (Fig. 3; Table 3). The highest mortality rate was observed from the 4th to 7th day of treatment (Table 3).

In the groups comprising fed males treated with the *A. oleracea* ethanolic extract concentrations used in Bioassay 2, the individuals displayed immediate reactions, such as the decrease in the locomotor activity, prostration in inverted position, stretching of all legs, paralysis (as observed in Bioassay 1) and some external morphological alterations (dehydrated integument), demonstrating that these individuals can progressively lose vitality, and eventually die.

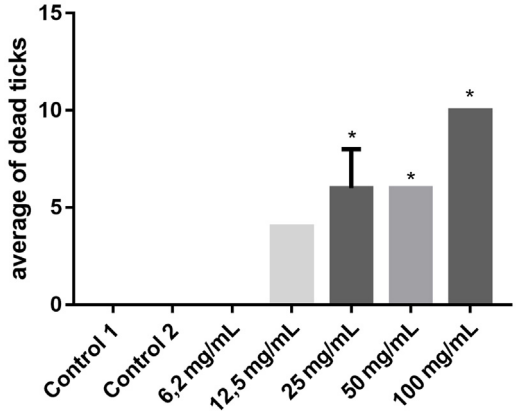


Fig. 4. Bioassay 1: average of dead semi-engorged *Amblyomma cajennense* s.s. female ticks on the 7th day of exposure to different concentrations of *Acmella oleracea* ethanolic extract. * indicates statistically significant difference ($p < 0.05$) 1. Control 1 = distilled water; Control 2 = 50% ethanol and 1% DMSO.

In the individuals belonging to control groups 1 and 2, mortality was not statistically significant and the individuals did not display any behavioral changes or abnormality regarding the morphology and consistence of the integument during the 7-day observation period (Fig. 3; Table 3).

The mortality data obtained in Bioassay 2 were submitted to Probit analysis to estimate the lethal concentration 50% (LC_{50}) and the 95% confidence interval, g (95): LC_{50} = 29.4534 mg/mL (limits: 24.4467–41.3847 mg/mL) (Table 5).

3.3. A. oleracea *ethanolic extract efficacy against* A. cajennense *semi-engorged females*

The efficacy *A. oleracea* ethanolic extract against *A. cajennense* s.s. semi-engorged females was obtained using 10 different concentrations of the extract, tested in duplicate (Tables 2, 4, 6).

Bioassay 1 revealed that *A. cajennense* s.s. semi-engorged females were not sensitive to all the ethanolic extract concentrations used here (Fig. 4). In the lowest concentration (6.2 mg/mL), dead ticks were not found during the 7-day observation period (Table 2). In the concentration of 12.5 mg/mL, dead ticks were observed from the 2nd to 7th day (Table 2). However, after the treatment with the concentrations 25, 50 and 100 mg/mL, dead ticks were found from the 1 st to 7th day (Table 2). At these concentrations, the individuals displayed a progressive decrease in the

Table 1
Bioassay 1: percentage of dead *Amblyomma cajennense* s.s. male ticks exposed to different concentrations of *Acmella oleracea* ethanolic extract.

Concentration of extract (mg/mL)	Percentage of dead ticks/days of treatment (%)						
	1 st day	2 nd day	3 rd day	4 th day	5 th day	6 th day	7 th day
Control 1 (distilled H_20)	0	0	0	0	0	0	0
Control 2 (50% ethanol 1% DMSO)	0	0	0	0	0	0	0
6.2	0	0	0	0	0	10%	15%
12.5	0	10%	10%	10%	10%	15%	15%
25	10%	20%	40%	40%	40%	50%	50%
50	20%	20%	60%	60%	60%	60%	70%
100	60%	100%	100%	100%	100%	100%	100%

Table 2
Bioassay 1: percentage of dead semi-engorged *Amblyomma cajennense* s.s. female ticks exposed to different concentrations of *Acmella oleracea* ethanolic extract. .

Concentration of extract (mg/mL)	Percentage of dead ticks/days of treatment (%)						
	1 st day	2 nd day	3 rd day	4 th day	5 th day	6 th day	7 th day
Control 1 (distilled H_20)	0	0	0	0	0	0	0
Control 2 (50% ethanol 1% DMSO)	0	0	0	0	0	0	0
6.2	0	0	0	0	0	0	0
12.5	0	20%	20%	20%	30%	40%	40%
25	10%	20%	30%	40%	50%	50%	60%
50	20%	50%	50%	60%	60%	60%	80%
100	60%	80%	100%	100%	100%	100%	100%

Table 3
Bioassay 2: percentage of dead *Amblyomma cajennense* s.s. male ticks exposed to different concentrations of *Acmella oleracea* ethanolic extract.

Concentration of extract (mg/mL)	Percentage of dead ticks/days of treatment (%)						
	1 st day	2 nd day	3 rd day	4 th day	5 th day	6 th day	7 th day
Control 1 (distilled H_20)	0	0	0	0	0	0	0
Control 2 (50% ethanol 1% DMSO)	0	0	0	0	0	0	0
14.3	0	0	5%	15%	15%	15%	15%
16.6	0	5%	20%	30%	30%	30%	30%
20	10%	10%	15%	25%	25%	25%	25%
25	10%	15%	20%	40%	40%	40%	45%
33	5%	20%	35%	45%	45%	45%	55%
40	15%	30%	40%	65%	65%	65%	65%

Table 4
Bioassay 2: percentage of semi-engorged *Amblyomma cajennense* s.s. female ticks exposed to different concentrations of *Acmella oleracea* ethanolic extract.

Concentration of extract (mg/mL)	Percentage of dead ticks/days of treatment (%)						
	1 st day	2 nd day	3 rd day	4 th day	5 th day	6 th day	7 th day
Control 1 (distilled H_20)	0	0	0	0	0	0	0
Control 2 (50% ethanol 1% DMSO)	0	0	0	0	0	0	0
14.3	15%	30%	40%	40%	40%	40%	40%
16.6	0	15%	40%	40%	40%	40%	50%
20	5%	25%	30%	50%	55%	55%	55%
25	0	25%	40%	55%	55%	55%	65%
33	0	20%	55%	55%	55%	55%	65%
40	15%	55%	65%	65%	65%	65%	75%

locomotor activity, prostration in inverted position, stretching of all legs and paralysis. In Bioassay 1, the mortality rate (60–100%) increased with higher concentrations of ethanolic extract of *A. oleracea* (25, 50 and 100 mg/mL). In higher concentrations, the ethanolic extract effects increased throughout the observations period, and the 6th and 7th days of treatment showed the highest mortality rates (Table 2). The highest concentration of ethanolic extract (100 mg/mL) showed a mortality of 60% on the 1 st day and 100% on the 3rd day of the experiment (Table 2).

In the individuals belonging to control groups 1 and 2, mortality was not statistically significant and no behavioral changes or any abnormality regarding the morphology and consistence of the integument were observed during the 7-day observation period (Fig. 4; Table 2).

The results of Bioassay 1 established the mortality interval (12.5–50 mg/mL) of *A. cajennense* s.s. semi-engorged females exposed to the ethanolic extract. Based on these data, new dilutions were performed and new concentrations of ethanolic extract were obtained and used in Bioassay 2.

Bioassay 2 results showed that *A. cajennense* s.s. semi-engorged females were sensitive to all concentrations of ethanolic extract (Fig. 5; Table 4) and tick mortality progressively increased (75%) in higher concentrations of the ethanolic extract (14.3; 16.6; 20; 25; 33; and 40 mg/mL) (Fig. 5; Table 4). The highest mortality rate was observed in the period between the 5th and the 7th day of treatment (Table 4).

In the concentrations used in the bioassay 2, the semi-engorged female ticks showed immediate reactions such the decrease in the locomotor activity, prostration in inverted position, stretching of all

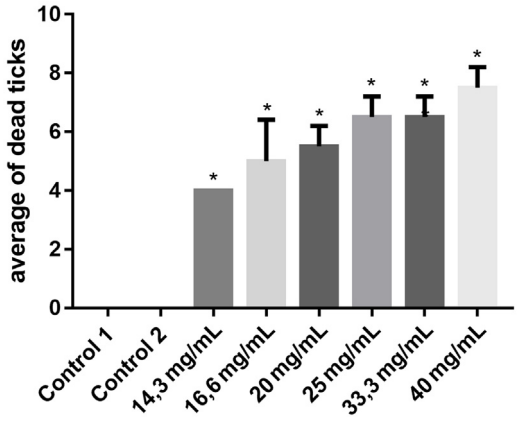


Fig. 5. Bioassay 2: average of dead of semi-engorged *Amblyomma cajennense* s.s. female ticks on the 7th day of exposure to different concentrations of *Acmella oleracea* ethanolic extract. * indicates statistically significant difference ($p < 0.05$) 1. Control 1 = distilled water; Control 2 = 50% ethanol and 1% DMSO.

Table 5
Probit analysis results based on the mortality of *Amblyomma. cajennense* s.s. male ticks exposed to the ethanolic extract in Bioassay 2.

LC_{50}	29.4534 mg/mL limits: 24.4467–41.3847
Standard error	0.0583
Chi-square	0.7747
Degrees of freedom	4
P-value	0.9418

Table 6
Probit analysis results based on the mortality of semi-engorged *Amblyomma. cajennense* s.s. female ticks exposed to the ethanolic extract in Bioassay 2.

LC_{50}	17.6335 mg/mL limits: 5.2506–23.5335
Standard error	0.1662
Chi-square	0.1753
Degrees of freedom	4
P-value	0.9964

legs and paralysis – as observed in Bioassay 1 – demonstrating that these individuals can progressively lose vitality, and eventually die.

In the individuals belonging to control group 1 and 2, mortality was not statistically significant and no behavioral changes or any abnormality regarding the morphology, coloration and consistence of the integument were observed during the 7-day observation period (Fig. 5; Table 4).

In these experimental conditions, the mortality data obtained in Bioassay 2 were submitted to Probit analysis to estimate the lethal concentration 50% (LC_{50}) and the 95% confidence interval, g (95): LC_{50} = 17.6335 mg/mL (limits: 23.5335–5.2506 mg/mL) (Table 6).

4. Discussion

Studies have demonstrated the potential biological effects of *A. oleracea* extracts against invertebrates (Fabry et al., 1996; Pandey et al., 2007; Ramsewak, 1999; Torres and Chávez, 2001). These effects are attributed to spilanthol, major component of these extracts and the ethanol crude extract used in the present study (Ramsewak, 1999).

This compound, obtained through ethanolic extraction, presented yield of 7.7 ± 0.08% on a dry basis; these values were comparable to those reported in other studies using ethanol and similar methods of extraction (Dias et al., 2012; Yadav et al., 2011). Spilanthol presents good stability in ethanol extracts; therefore, ethanol was chosen as a solvent in the extract production in addition to being safe and inexpensive when compared to other solvents (Bae et al., 2010; Rodrigues et al., 2006). Furthermore, a study carried out by Resende et al. (2012) demonstrated that the ethanol presents low toxicity to ticks, not causing mortality in s *A. cajennense* adults, species used in the bioassays performed in this experiment.

In present study, analytical monitoring of spilanthol in the *A. oleracea* ethanolic extract was performed through GC/MS analysis, comparing the mass fragmentation pattern and the database library from the National Institute of Standards and Technology (NIST) Mass Spectral Search Program® (2005). The total ion chromatogram of the crude extract of *A. oleracea* also showed the presence of spilanthol, with chromatographic peak produced at 41.9 min retention time.

The bioassay Adult Immersion Test (AIT) was used to monitor the susceptibility of *A. cajennense* s.s. ticks to ethanolic extract of *A. oleracea*, once the AIT is an efficient tool to measure the sensitivity of the ticks to acaricide chemical compounds (Drummond et al., 1973; Scott, 1995).

The results obtained in the bioassays 1 and 2 showed that *A. cajennense* s.s. males were sensitive to all the *A. oleracea* ethanolic extract concentrations tested here (6.2; 12.5; 14.3; 16.6; 20; 25; 33; 40, 50 and 100 mg/mL). There was a gradual increase in mortality (5–100%), proportional to the increase of the concentrations and to the time of exposure. At the highest concentration (100 mg/mL), the mortality rate was 100%, observed after 24 h of exposure. Similar results were found by Roma et al. (2009) and Oliveira et al. (2011) studying *Rhipicephalus sanguineus* s.l. females exposed to permethrin and fipronil, which, applied at specific concentrations, were able to cause the death of 100% individuals in 24 h.

However, semi-engorged females were not sensitive to all the ethanolic extract concentrations used here. In the lowest concentration (6.2 mg/mL), dead ticks were not found during the 7-day observation period. In the concentration of 12.5 mg/mL, dead ticks were observed from the 2nd to 7th day. After the treatment with the concentrations 25, 50 and 100 mg/mL, dead ticks were found in the period between the 1 st and the 7th day. In the highest concentration (100 mg/mL), 100% mortality was observed after 72 h of exposure. These data corroborate Castro et al. (2014), who observed an increase in mortality rates of 20.7; 26.6 and 59.2% for *R. microplus* exposed to hexane extract of *A. oleracea* in concentrations of 25, 50 and 100 mg/mL, respectively, confirming the dose-dependent action of the extracts of *A. oleracea*. Studies carried out by Roma et al. (2009) showed no mortality for ticks exposed to lower concentrations of chemical permethrin; however, the application of higher concentrations caused a progressive mortality rate increase. Farias et al. (2009, 2007), studying the species *Boophilus microplus, Anocentor nitens* and *R. sanguineus* s.l. exposed to andiroba seed oil, detected 100% mortality in the females exposed to the higher concentrations tested (25, 30, 50 and 100%), except in 10%, whose mortality was 90% on the second day after the exposure, with the oviposition of infertile eggs.

Moreover, all the individuals tested and exposed to different concentrations of the extract displayed behavioral alterations were also observed, such as the decrease of locomotor activity, prostration in inverted position, stretching of the legs and paralysis. The occurrence of such alterations were also observed by Roma et al. (2009) and Oliveira et al. (2011) in *R. sanguineus* s.l. ticks exposed to fipronil and permethrin, respectively.

In the present study, we verified that the ethanolic extract of *A. oleracea,* even at low concentrations, showed a remarkable level of toxicity to ticks, similar to that of other natural products or extracts, such as azadirachtin, thymol, carvacrol, *Ageratum conyzoides* and *Artemisia absinthium* (Koc et al., 2013; Matos et al., 2014b; Parveen et al., 2014; Srivastava et al., 2008). In addition, this study confirms the acaricidal efficacy of *A. oleracea* extract, corroborating Castro et al. (2014), who showed mortality rates of 100% in larvae exposed to 6.2 mg/mL and 98.2% in engorged *R. microplus* females

exposed to the concentration of 150 mg/mL of the extract. The same authors verified that the hexane extract from *A. oleracea* was able to reduce oviposition and the viability of eggs, relevant information to ground further studies aiming to develop strategies to control these ectoparasites.

The literature also reports that the extract obtained from *A. oleracea* is able to control the proliferation of other arthropods, functioning efficiently against *Aedes aegypti* (Diptera) larvae, *Plutella xylostella* (Lepidoptera) adults and American cockroaches (*Periplaneta americana)* (Blattodea) (Kadir et al., 1989; Ramsewak, 1999; Sharma et al., 2012).

Therefore, the present study established that the *A. oleracea* ethanolic extract presents a LC_{50} of 29.5 mg/mL for *A. cajennense* s.s. males and 17.6 mg/mL for semi-engorged females, confirming the high efficiency of this extract in comparison with others obtained from Asteraceae plants, such as *Calea serrata* and *Artemisia annua* (Chagas et al., 2011; Ribeiro et al., 2008). The LC_{50} obtained for the semi-engorged females (17.6335 mg/mL) differs from that determined by Castro et al. (2014) for *R. microplus* engorged females (79.7 mg/mL) exposed to *A. oleracea* hexane extract. This difference can be explained by the higher level and preservation of the active principle spilanthol, a possible variation caused by the use of different solvents and extraction processes. In addition, climatic conditions, growing site, harvesting season, soil, fertilizing, rainfall, and development or flowering stages are important factors to be considered when evaluating the concentration of spilanthol in *A. oleracea* plants (Cavalcanti, 2008).

Natural chemical acaricides present several advantages when compared to synthetic ones. Most importantly, natural chemicals minimize the development of resistant individuals, once plant extracts comprise a pool of active ingredients and can be used to a lesser extent. In addition, these acaricides are affordable and less harmful to the environment and nontarget organisms. Thus, this study analyzed the potential of the ethanol extract obtained from *A. oleracea* flowers, leaves and stems to control *A. cajennense* s.s fed males and semi-engorged females, bringing relevant data on the use of this chemical as a sustainable tool to control these ectoparasites.

Conflict of interest

The author(s) declare(s) that there is no conflict of interest regarding the publication of this paper.

Acknowledgments

We would like to thank to São Paulo Research Foundation (FAPESP) Grant no. 2015/01496-5 and CAPES/Brazil for financial support.

References

Abbas, R.Z., Zaman, M.A., Colwell, D.D., Gilleard, J., Iqbal, Z., 2014. Acaricide resistance in cattle ticks and approaches to its management: the state of play. Vet. Parasitol. 203, 6–20, http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.03.006.

Bae, S.S., Ehrmann, B.M., Ettefagh, K.A., Cech, N.B., 2010. A validated liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry method for quantification of spilanthol in *Spilanthes acmella* (L.) Murr. Phytochem. Anal. 21, 438–443, http://dx.doi.org/10.1002/pca.1215.

Beati, L., Nava, S., Burkman, E.J., Barros-Battesti, D.M., Labruna, M.B., Guglielmone, A., Cáceres, a, Guzmán-Cornejo, A.G., León, C.M., Durden, R., a, L., Faccini, J.L.H., 2013. *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae), the Cayenne tick: phylogeography and evidence for allopatric speciation. BMC Evol. Biol. 13, 267, http://dx.doi.org/10.1186/1471-2148-13-267.

Bechara, G., S, M.P.J., Ferreira, B., Garcia, M., 1995. *Rhipicephalussanguineus* tick in Brazil: feeding and reproductive aspects under laboratorial conditions. Braz. J. Vet. Parasitol. 4, 61–66.

Borges, L.M., Sousa, L.A., Barbosa Cda, S., 2011. Perspectives for the use of plant extracts to control the cattle tick *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 20, 89–96.

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., 2014. Acaricide activity in vitro of *Acmella oleracea* against *Rhipicephalus microplus*. Parasitol. Res. 113, 3697–3701, http://dx.doi.org/10.1007/s00436-014-4034-2.

Cavalcanti, V.M.S., 2008. Extração de espilantol de *Spilanthes acmella var oleracea* com dióxido de carbono supercrítico. Tese (Doutorado em Eng. Process). Universidade Estadual de Campinas, Campinas – SP.

Chagas, A.C., Georgetti, C.S., Carvalho, C.O., Oliveira, M.C., Rodrigues, R.A., Foglio, M.A., Magalhães, P.M., 2011. In vitro activity of *Artemisia annua* L. (Asteraceae) extracts against *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 20, 31–35, http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612011000100007.

Crampton, A., Baxter, G., Barker, S., 1999. Identification and characterisation of a cytochrome P450 gene and processed pseudogene from an arachnid: the cattle tick *Boophilus microplus*. Insect Biochem. Mol. Biol. 29, 377–384, http://dx.doi.org/10.1016/S0965-1748(99)00013-2.

Dias, A.M.A., Santos, P., Seabra, I.J., Júnior, R.N.C., Braga, M.E.M., de Sousa, H.C., 2012. Spilanthol from *Spilanthes acmella* flowers, leaves and stems obtained by selective supercritical carbon dioxide extraction. J. Supercrit. Fluids 61, 62–70, http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2011.09.020.

Dietrich, G., Dolan, M.C., Peralta-Cruz, J., Schmidt, J., Piesman, J., Eisen, R.J., Karchesy, J.J., 2006. Repellent activity of fractioned compounds from *Chamaecyparis nootkatensis* essential oil against nymphal *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). J. Med. Entomol. 43, 957–961, http://dx.doi.org/10.1093/jmedent/43.5.957.

Drummond, R.O., Ernst, S.E., Trevino, J.L., Gladney, W.J., Graham, O.H., 1973. *Boophilus annulatus* and *B. microplus*: laboratory tests of insecticides. J. Econ. Entomol. 66, 130–133.

Dubey, S., Maity, S., Singh, M., Saraf, S.A., Saha, S., 2013. Phytochemistry, pharmacology and toxicology of *Spilanthes acmella*: a review. Adv. Pharmacol. Sci. 2013, 423750, http://dx.doi.org/10.1155/2013/423750.

Estrada-Peña, A., Tarragona, E.L., Vesco, U., Meneghi, D., De Mastropaolo, M., Mangold, A.J., Guglielmone, A.A., Nava, S., 2014. Divergent environmental preferences and areas of sympatry of tick species in the *Amblyomma cajennense* complex (Ixodidae). Int. J. Parasitol. 44, 1081–1089, http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2014.08.007.

Fabry, W., Okemo, P., Ansorg, R., 1996. Fungistatic and fungicidal activity of east African medicinal plants. Mycoses 39, 67–70.

Farias, M.P.O., Sousa, D.P., Arruda, A.C., Arruda, M.S.P., Wanderley, A.G., Alves, L.C., Faustino, M.A.G., 2007. Eficácia in vitro do óleo da *Carapa guianensis* Aubl. (andiroba) no controle de *Boophilus microplus* (Acari Ixodidae). Rev. Bras. Plantas Med. 9, 68–71.

Farias, M.P.O., Sousa, D.P., Arruda, A.C., Wanderley, A.G., Teixeira, W.C., Alves, L.C., Faustino, M.A.G., 2009. Potencial acaricida do óleo de andiroba *Carapa guianensis* Aubl. sobre fêmeas adultas ingurgitadas de *Anocentor nitens* Neumann, 1897 e *Rhipicephalus sanguineus* Latreille, 1806. Arq. Bras. Med. Vet. e Zootec. 61, 877–882, http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352009000400015.

Favoreto, R., Gilbert, B., 2010. Estado da Arte/State of the Art – *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen (Asteraceae) – Jambu. Rev. Fitos 5, 83–91.

Kadir, H.A., Zakaria, M.B., Kechil, A.A., Azirun, M.D.S., 1989. Toxicity and electrophysiological effects of *Spilanthes amella* Murr. extracts on *Periplaneta americana* L. Pestic. Sci. 25, 329–335, http://dx.doi.org/10.1002/ps.2780250402.

Koc, S., Oz, E., Cinbilgel, I., Aydin, L., Cetin, H., 2013. Acaricidal activity of *Origanum bilgeri* P.H Davis (Lamiaceae) essential oil and its major component, carvacrol against adults *Rhipicephalus turanicus* (Acari: Ixodidae). Vet. Parasitol. 193, 316–319, http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.11.010.

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., 2014a. Histopathological study of ovaries of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) exposed to different thymol concentrations. Parasitol. Res. 113, 4555–4565, http://dx.doi.org/10.1007/s00436-014-4145-9.

Matos, R., da, S., Melo, D.R., Monteiro, C.M.O., Zeringóta, V., Senra, T.O.S., Calmon, F., Maturano, R., Prata, M.C.A., Daemon, E., 2014b. Determination of the susceptibility of unengorged larvae and engorged females of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) to different methods of dissolving thymol. Parasitol. Res. 113, 669–673, http://dx.doi.org/10.1007/s00436-013-3694-7.

Nigrinis, L.S.O., de Caro, J.O., Olarte, E.N., 1986. Estudio fitofarmacológico de la fraccion liposoluble de las flores de la *Spilanthes americana* (Mutis) parte I: Estudio fitoquimico. Rev. Colomb. Ciências Químico-Farmacêuticas 15, 37–47.

Nolan, J., 1985. Mechanisms of resistance to chemicals in arthropod parasites of veterinary importance. Vet. Parasitol. 18, 155–166, http://dx.doi.org/10.1016/0304-4017(85)90064-0.

Oliveira, P.R., Bechara, G.H., Camargo-Mathias, M.I., 2008. Evaluation of cytotoxic effects of fipronil on ovaries of semi-engorged *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) tick female. Food Chem. Toxicol. 46, 2459–2465, http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2008.03.034.

Oliveira, P.R., Bechara, G.H., Morales, M.A.M., Mathias, M.I.C., 2009. Action of the chemical agent fipronil on the reproductive process of semi-engorged females of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). Ultrastructural evaluation of ovary cells. Food Chem. Toxicol. 47, 1255–1264, http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2009.02.019.

Oliveira, P.R., Bechara, G.H., Denardi, S.E., Pizano, M.A., Mathias, M.I.C., 2011. Toxicity effect of the acaricide fipronil in semi-engorged females of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): preliminary determination of the minimum lethal concentration and LC(50). Exp. Parasitol. 127, 418–422, http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2010.09.009.

Pandey, V., Agrawal, V., Raghavendra, K., Dash, A.P., 2007. Strong larvicidal activity of three species of *Spilanthes* (Akarkara) against malaria (*Anopheles stephensi* Liston *Anopheles culicifacies*, species C) and filaria vector (*Culex quinquefasciatus* Say). Parasitol. Res. 102, 171–174, http://dx.doi.org/10.1007/s00436-007-0763-9.

Panella, N.A., Dolan, M.C., Karchesy, J.J., Xiong, Y., Peralta-cruz, J., Khasawneh, M., Montenieri, J.A., Maupin, G.O., 2005. Use of novel compounds for pest control: insecticidal and acaricidal activity of essential oil components from heartwood of alaska yellow cedar. J. Med. Entomol. 42, 352–358, http://dx.doi.org/10.1093/jmedent/42.3.352.

Parveen, S., Godara, R., Katoch, R., Yadav, A., Verma, P.K., Katoch, M., Singh, N.K., 2014. In vitro evaluation of ethanolic extracts of *Ageratum conyzoides* and *Artemisia absinthium* against cattle tick, *Rhipicephalus microplus*. Sci. World J. 2014, 1–6, http://dx.doi.org/10.1155/2014/858973.

Pruett, J.H., 1999. Immunological control of arthropod ectoparasites – a review. Int. J. Parasitol. 29, 25–32, http://dx.doi.org/10.1016/S0020-7519(98)00172-6.

Ramsewak, R., 1999. Bioactive N-isobutylamides from the flower buds of *Spilanthes acmella*. Phytochemistry 51, 729–732, http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422(99)00101-6.

Remedio, R.N., Nunes, P.H., Anholeto, L.A., Oliveira, P.R., Camargo-Mathias, M.I., 2015. Morphological effects of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) seed oil with known azadirachtin concentrations on the oocytes of semi-engorged *Rhipicephalus sanguineus* ticks (Acari: Ixodidae). Parasitol. Res. 114, 431–444, http://dx.doi.org/10.1007/s00436-014-4200-6.

Resende, J.D., de, S.A., Daemon, E., Monteiro, C.M., de, O., Maturano, R., Prata, M.C., de, A., Ferreira Rodrigues, A.F.S., 2012. Toxicity of solvents and surfactants to *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) and *Dermacentor nitens* (Neumann, 1897) (Acari: Ixodidae) larvae. Exp. Parasitol. 131, 139–142, http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2012.03.002.

Ribeiro, V.L.S., Avancini, C., Gonçalves, K., Toigo, E., von Poser, G., 2008. Acaricidal activity of *Calea serrata* (Asteraceae) on *Boophilus microplus* and *Rhipicephalus sanguineus*. Vet. Parasitol. 151, 351–354, http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.11.007.

Rodrigues, R.A.F., Foglio, M.A., Boaventura Júnior, S., Santos, A., da, S., Rehder, V.L.G., 2006. Otimização do processo de extração e isolamento do antimalárico artemisinina a partir de *Artemisia annua* L. Quim. Nova 29, 368–372, http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422006000200030.

Roma, G.C., de Oliveira, P.R., Pizano, M.A., Camargo Mathias, M.I., 2009. Determination of LC(50) of permethrin acaricide in semi-engorged females of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). Exp. Parasitol. 123, 269–272, http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2009.08.001.

Scoles, G.A., Ueti, M.W., 2013. *Amblyomma cajennense* is an intrastadial biological vector of *Theileria equi*. Parasites Vectors 6, 306, http://dx.doi.org/10.1186/1756-3305-6-306.

Scoles, G.A., Hutcheson, H.J., Schlater, J.L., Hennager, S.G., Pelzel, A.M., Knowles, D.P., 2011. Equine piroplasmosis associated with *Amblyomma cajennense* Ticks, Texas, USA. Emerg. Infect. Dis. 17, 1903–1905, http://dx.doi.org/10.3201/eid1710.101182.

Scott, J.A., 1995. The molecular genetics of resistance: resistance as a response to stress. Florida Entomol. 78, 399–414, http://dx.doi.org/10.2307/3495526.

Sharma, A., Kumar, V., Rattan, R.S., Kumar, N., Singh, B., 2012. Insecticidal toxicity of spilanthol from *Spilanthes acmella* Murr. against *Plutella xylostella* L. Am. J. Plant Sci. 03, 1568–1572, http://dx.doi.org/10.4236/ajps.2012.311189.

Soares, H.S., Barbieri, A.R.M., Martins, T.F., Minervino, A.H.H., de Lima, J.T.R., Marcili, A., Gennari, S.M., Labruna, M.B., 2015. Ticks and rickettsial infection in the wildlife of two regions of the Brazilian Amazon. Exp. Appl. Acarol. 65, 125–140, http://dx.doi.org/10.1007/s10493-014-9851-6.

Srivastava, R., Ghosh, S., Mandal, D.B., Azhahianambi, P., Singhal, P.S., Pandey, N.N., Swarup, D., 2008. Efficacy of *Azadirachta indica* extracts against *Boophilus microplus*. Parasitol. Res. 104, 149–153, http://dx.doi.org/10.1007/s00436-008-1173-3.

Torres, J.M., Chávez, A.G., 2001. Alcamidas en plantas: distribución e importancia. Av. y Perspect. 20, 377–387.

Vendramini, M.C.R., Camargo-Mathias, M.I., Faria, A.U., Bechara, G.H., Oliveira, P.R., Roma, G.C., 2012. Cytotoxic effects of andiroba oil (*Carapa guianensis*) in reproductive system of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) semi-engorged females. Parasitol. Res. 111, 1885–1894, http://dx.doi.org/10.1007/s00436-012-3031-6.

Yadav, R., Yadav, N., Kharya, M.D., Savadi, R., 2011. Preliminary studies on diuretic effect of *Spilanthes acmella* leaves extracts in rats. Int. J. Pharm. Pharm. Sci. 3, 245–247.

CAPÍTULO 4

TOXIC ACTION OF *Acmella oleracea* EXTRACT ON THE MALE REPRODUCTIVE SYSTEM OF *Amblyomma cajennense* TICKS[4]

Resumo

O presente estudo avaliou por meio da morfohistologia e histoquímica, os efeitos de diferentes concentrações do extrato etanólico bruto de *Acmella oleracea* (Jambu) sobre o sistema reprodutor masculino de carrapatos *Amblyomma cajennense*, estabelecendo a toxicidade desse químico natural e sinalizando que o mesmo num futuro próximo poderá representar uma estratégia a ser utilizada no controle destes importantes ectoparasitas. Foram aqui utilizados 100 machos alimentados em coelhos hospedeiros com pesos homogêneos ($p > 0,05$), os quais foram divididos em cinco grupos experimentais (10 animais cada): Controle 1 - expostos à água destilada; Controle 2 - expostos ao solvente etanol 50% e DMSO 1%; Tratamento 1 a 3 - expostos às concentrações de 6,2; 12,5 e 25 mg/mL do extrato, respectivamente, obtidas por diluição em etanol 50% e DMSO 1%, com exposição realizada pelo método de imersão segundo Drummond et al. (1973) Após exposição, os machos foram dissecados e tiveram o seu sistema reprodutor retirados para serem submetidos às técnicas histológicas rotineiras com coloração pela HE e às histoquímicas (PAS para detecção de polissacarídeos neutros e azul de bromofenol para detecção de proteínas totais). Os indivíduos expostos apresentaram alterações nas células do complexo glandular causadas pelo extrato, o que, no entanto, não aconteceu nos testículos os quais se mantiveram íntegros. As células secretoras das glândulas acessórias multilobuladas apresentaram severa vacuolização citoplasmática, bem como tiveram os grânulos de secreção com síntese e secreção diminuídas, principalmente quando considerados os elementos polissacarídicos, glico e lipoproteícos, substâncias essas que irão compor o fluido seminal, o qual viabilizará a capacitação dos espermatozóides no trato genital feminino e que também serão necessárias para a formação do espermatóforo (que abrigará as espermátides maduras). As alterações observadas foram mais intensas e severas à medida que a concentração do produto aumentou sendo os efeitos, portanto, considerados dose-dependentes. Neste trabalho ficou confirmado o potencial citotóxico do extrato etanólico de *A. oleracea* nas concentrações de 6,2; 12,5 e 25 mg/mL sobre o sistema reprodutor de machos de carrapatos *A. cajennense* a eles expostos.

Palavras-chave: sistema reprodutor masculino, controle químico, carrapato-estrela, citotoxicidade, produto natural.

[4] **Luís Adriano Anholeto**; Patrícia Rosa de Oliveira; Rodney Alexandre Ferreira Rodrigues; Lais Thiemi Yamane; Karina Neoob de Carvalho Castro; Allan Roberto Fernandes Ferreira; Maria Izabel Camargo-Mathias. Artigo publicado na Revista **Microscopy Research and Technique** em 2018, v. 81, p. 1347-1357.

Veterinary Parasitology 244 (2017) 164–171

Contents lists available at ScienceDirect

Veterinary Parasitology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vetpar

Research paper

Toxic action of *Acmella oleracea* extract on the male reproductive system of *Amblyomma cajennense* ticks

Luís Adriano Anholeto[a], Patrícia Rosa de Oliveira[a], Rodney Alexandre Ferreira Rodrigues[b], Lais Thiemi Yamane[b], Karina Neoob de Carvalho Castro[c], Allan Roberto Fernandes Ferreira[a], Maria Izabel Camargo-Mathias[a,*]

[a] Department of Biology, Institute of Biosciences, São Paulo State University, UNESP, Av. 24 A, n° 1515, 199, 13506-900, Rio Claro, SP, Brazil
[b] Chemical, Biological and Agricultural Research Center (CPQBA), Natural Products Chemistry Division, University of Campinas, Av. Alexandre Cazellato, n° 999, 13148-218, Campinas, SP, Brazil
[c] Embrapa Meio-Norte, BR 343, km 35, CP 341, 64.200-970, Parnaíba, PI, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Male reproductive system
Chemical control
Star tick
Cytotoxicity
Natural product

ABSTRACT

The present study evaluated through morphohistological and histochemical techniques the effects of different concentrations of crude ethanolic extract of *A. oleracea* (EEAO) (Jambu) on the male reproductive system of *Amblyomma cajennense* sensu stricto (s.s.) ticks. The toxicity of this natural chemical was stablished, signalizing the promising potential of the compound as a strategy to control ectoparasites in the near future. For the experiment, 100 males fed on host rabbits with homogeneous weight ($p > 0.05$) were used. The ticks were divided into five groups (10 animals each): Control 1–exposed to distilled water; Control 2–exposed to ethanol 50% and DMSO 1%; Treatment 1–3–exposed to the concentrations of 6.2, 12.5 and 25 mg/mL of the EEAO, respectively, diluted in ethanol 50% and DMSO 1%, with exposure by immersion. After exposure, the males were dissected for the removal of the reproductive system and subjected to routine histological analysis with HE staining and histochemical techniques (PAS for the detection of neutral polysaccharides and Bromophenol blue to detect total proteins). The exposed individuals showed alterations in the glandular complex cells; however, the testes remained intact. The secretory cells of the multilobulated accessory glands presented intense cytoplasmic vacuolation. Additionally, the synthesis and secretion were reduced in the secretion granules, mainly concerning the polysaccharides, glyco- and lipoprotein elements, substances that will constitute the seminal fluid and enable the capacitation of spermatozoa in the female genital tract and also necessary for the formation of the spermatophore, which will encapsulate the mature spermatids. The alterations were dose-dependent, i.e., more intense and severe as the concentration of the product increased. .This experiment confirmed the cytotoxic potential of *A. oleracea* ethanolic extract in the concentrations of 6.2, 12.5 and 25 mg/mL on the reproductive system of *A. cajennense* s.s. male ticks.

1. Introduction

Ticks of the complex *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) have great medical and veterinary importance, once they parasitize different hosts, including the human beings. These ectoparasites are potential vectors of *Rickettsia rickettsii*, causative agent of Brazilian Spotted Fever or Rocky Mountain Fever (Beati et al., 2013; Guedes et al., 2005; Labruna, 2009; Soares et al., 2015; Tarragona et al., 2015), being found throughout the American continent, from the South of the U.S.A. and Central America to the North of Argentina (Beati et al., 2013; Estrada-Peña et al., 2014; Martins et al., 2016). With specific regard to Brazil, the species *A. cajennense* s. s. is spread in the western north of the Amazon Basin (Martins et al., 2016).

Currently, the most efficient and widely used method to control ticks is the use of chemical acaricides, mainly the synthetic ones; however, these substances present serious inconveniences, such as the high cost (Oliveira et al., 2011, 2015). Moreover, the indiscriminate use of such compounds induce the selection of resistant individuals, their toxicity can be lethal to non-target organisms and the residues accumulate in the environment, contaminating soils, water streams, fauna and flora, affecting animals in general and the human beings as well (Nolan, 1985; Oliveira et al., 2008; Pruett, 1999; Roma et al., 2009).

In this sense, the search for alternative control strategies is ongoing, and among these strategies is the use of vaccines and natural chemical

* Corresponding author.
E-mail address: micm@rc.unesp.br (M.I. Camargo-Mathias).

http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.07.031
Received 11 May 2017; Received in revised form 11 July 2017; Accepted 26 July 2017
0304-4017/ © 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

acaricides, usually obtained from plant extracts (Castro et al., 2014; Oliveira et al., 2016).

Acmella oleracea is a plant of the family Asteraceae, found in tropical regions close to the Equator in Africa, South America and Asia. It is widely used in popular medicine as a potent local analgesic and anesthetic, and also presents fungistatic, fungicide and insecticide properties (Dubey et al., 2013; Favoreto and Gilbert, 2010).

Recent studies by Castro et al. (2014) and Oliveira et al. (2016) have demonstrated that crude hexane extracts obtained from the aerial parts of *A. oleracea* (flower, leaf and stem) have acaricide action, causing a high mortality rate in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* larvae and engorged females, in addition to interfering in the female reproductive system dynamics, significantly reducing oviposition and hatchability.

In ticks, the mating results in profound physiological changes that eventually results in egg production (Donohue et al., 2009). In the *Dermacentor variabilis*, for example, mating causes partially blood-fed female ticks to commence rapid engorgement to repletion and eventual detachment from the host and egg laying (Donohue et al., 2009). The peptidic male pheromone (engorgement factor α/β) transferred to the female during mating is known only from a single tick species, *Amblyomma hebraeum* (Donohue et al., 2009).

Thus, the present study had the objective to evaluate the effects of different concentrations of *A. oleracea* ethanolic extract on the morphophysiology of the reproductive system of fed *Amblyomma cajennense* s.s. males, in order to stablish whether this natural chemical has the potential to be used as a strategy to control this important ectoparasites.

2. Materials and methods

2.1. Obtaining the Acmella oleracea (L.) R. K. Jansen

The plants were cultivated in the experimental field (geographic coordinates 22° 47′ 52″ S, 47° 6′ 49″W) of the Chemical, Biological and Agricultural Research Center (CPQBA) of UNICAMP, Paulinia, SP, Brazil, and identified by PhD John F. Pruski from the Missouri Botanical Garden (USA). The voucher specimen was 181.452, deposited at the CPQBA/UNICAMP Herbarium (number 181,452). Authorization from Genetic Heritage Management Council (CGEN) was under number 010577/2014-9.

2.2. Preparing the crude ethanolic extract of Acmella oleracea

The crude ethanolic extract of the aerial parts of *A. oleracea* was obtained at Natural Products Chemistry Division from Chemical, Biological and Agricultural Research Center CPQBA/UNICAMP, Campinas, SP, Brazil.

The aerial parts (flowers, leaves and stem) of *A. oleracea* were dried and milled in a knife mill (Primotecnica®) using 0.5 mm sieve. The extraction was performed under mechanical agitation with 96° GL ethanol (1:5 plant/solvent, w/v ratio) in a stainless-steel vessel with 5 l' capacity for 1.5 h. The remaining residue was filtered and the extraction step was repeated twice with new solvent portion. The crude extract was filtered, pooled and concentrated in rotary vacuum evaporator at 40 °C. Then, the material was lyophilized until constant mass, stored in amber flasks and kept in freezer at −18 °C until use.

The chemical analysis of the extract was performed as Anholeto et al. (2017).

2.3. Amblyomma cajennense s.s. ticks

Ticks used in this study derived from a laboratory colony that started with adult ticks collected from the vegetation in Governador Jorge Teixeira Municipality, state of Rondônia, western Brazilian Amazon. Species identification followed Martins et al. (2016). For the bioassays, *A. cajennense* s.s. males adults weighing on average 10 mg were used. The ticks fed for 10 days on host rabbits provided by the Animal Facilities of UNESP, Botucatu Campus, SP, Brazil. The feeding stage was chosen to approximate the experiment to field conditions, once in this phase the ticks remain attached to the host ingesting blood, causing damages to the host organism and transmitting pathogens. The artificial infestations were performed according to the protocol described by Bechara et al. (1995). During the entire experiment, animals were maintained in cages in the Animal Facilities of UNESP, Rio Claro Campus, SP, Brazil, and received water and rabbit food *ad libitum*. This study was approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation of UNESP, Rio Claro Campus, SP, Brazil, protocol number 11/2015.

2.4. Experimental design

The Adult Immersion Test (Drummond et al., 1973) was used for the tick exposure to the crude ethanolic extract of *A. oleracea*.

Adult ticks with homogeneous weights ($p > 0.05$), were divided into 5 groups (10 ticks each):

Control Group 1–exposed to distilled water;

Control Group 2–exposed to ethanol solvent at 50% and dimethyl sulfoxide (DMSO) at 1%;

Treatment 1–3–exposed to the concentrations of 6.2; 3.1 and 12.5 mg/mL of the crude ethanolic extract of *A. oleracea* aerial parts, respectively, obtained by dilution in ethanol 50% and DMSO 1%. The sublethal concentrations used in the treatment were based on studies by Anholeto et al. (2017) and all tests were performed in duplicate.

Prior to the experiment, ticks were washed in running tap water and dried with soft absorbent paper. The ticks were immersed in the concentrations for 5 min, dried in absorbent paper, mounted on labeled Petri dishes, and kept in BOD incubator (28 ± 1 °C, 85% humidity and 12 h photoperiod) for 7 days. This period was suggested by Oliveira et al. (2008) in studies with *R. sanguineus* sensu lato (s.l.) females subjected to fipronil, since the action of the acaricide is not immediate, acting slowly on the physiology of the individuals and the morphological alterations usually occur after seven days.

2.5. Morphophysiological evaluation

After exposed to sublethal concentrations of the crude ethanolic extract, the *A. cajennense* s.s. males were mounted on Petri dishes with phosphate buffered saline (NaCl 7.5 g/L, Na_2HPO_4 2.38 g/L and KH_2PO_4 2.72 g/L) and dissected using stereomicroscope.

2.5.1. Histology

a **Harris hematoxylin and aqueous eosin technique (Junqueira and Junqueira, 1983).**

The material was fixed in paraformaldehyde 4% for 48 h, and transferred to phosphate buffered saline (NaCl 7.5 g/L, Na_2HPO_4 2.38 g/L and KH_2PO_4 2.72 g/L), remaining for 24 h. Then, the samples were dehydrated in graded ethanol series 70%, 80%, 90% and 95% (30 min each bath), embedded in historesin containing an infiltration solution with 50 mL of (2-hydroxyethil) methacrylate and 0.5 g of dibenzoylperoxide, according to the manufacturer's orientation (*Leica Historesin Embedding Kit*®) for 24 h and included in plastic molds containing historesin and polymerizer (*Leica Historesin Kit*®). After, the blocks were sectioned in microtome Leica RM2265 (Leica®) at 3-μm thickness, mounted on glass slides, rehydrated in distilled water for 1 min and stained with Harris hematoxylin for 8 min. Then, the material was washed in running tap water for 3 min, stained with aqueous eosin for 5 min and washed in running tap water again. After drying at room temperature, the samples were rapidly immersed in xylol, covered with Canada balsam and a coverslip.

The permanent slides were analyzed and documented using bright-field microscope Leica DM750 (Leica®).

b **Histochemistry**

Histochemical tests were applied in order to detect the presence of polysaccharides (PAS technique – periodic acid Schiff) according to Junqueira and Junqueira (1983) and proteins (Bromophenol blue technique) according to Pearse (1985).

3. Results

3.1. Histology

3.1.1. Control groups I and II

The reproductive system of *A. cajennense* s.s. males fed for 10 days on host rabbits (Control Groups I and II) showed typical characteristics, previously described by Anholeto et al. (2015) and Sampieri et al. (2014), subdivided into two regions: anterior and posterior. The anterior region consists of a multilobulated accessory gland complex (Fig. 1**E–H**) associated with a pair of seminal vesicles and connected to the ejaculatory duct (Fig. 1**A**). The glandular complex is subdivided into four distinct regions: a) anterodorsal (Fig. 1**E**), b) laterodorsal (Fig. 1**F**), c) posterodorsal (Fig. 1**G**) and d) posterolateral (Fig. 1**H**) lobes differing according to their location, morphology and type of synthetized molecules (proteins, polysaccharides and lipids) that will constitute the spermatic fluid and the spermatophore. The posterior region contains a pair of elongated and tubular testes, connected to the multilobulated accessory gland complex through deferent ducts.

The testes are surrounded by a simple squamous epithelium, which penetrates the organ dividing it into spermatocytes, and are subdivided into three distinct regions, classified according to the germ cells developmental stages, as follows: a) proximal region (Fig. 1**B**), in contact with the deferent ducts, which are connected with the accessory gland complex. It contains the primary spermatids in early stages of development (immature); b) medial or intermediate region (Fig. 1**C**), where the germ cells are in the intermediate stage of development (secondary spermatids) and c) distal or posterior region (Fig. 1**D**) where the mature spermatids are found.

3.1.2. Treatment I – 6.2 mg/mL

The males of this group, exposed to the crude ethanolic extract of *A. oleracea* at the concentration of 6.2 mg/mL showed morphological alterations in the reproductive system in comparison with the individuals from the control groups I and II (Fig. 1**I–M**). The testes and the laterodorsal and posterodorsal lobes of the accessory glands did not present significant alterations, while the cells of the anterodorsal lobe had the cytoplasm full of large vacuoles (Fig. 1**I**). The nuclei of these cells were irregular and strongly stained with hematoxylin, suggesting the onset of pyknosis (Fig. 1**I**). The secretion granules in the lobe lumen were less frequent than the ones observed in the individuals belonging to the Control Group (Fig. 1**I**). The secretory cells of the posterolateral lobes showed cytoplasmic granules strongly stained with hematoxylin and the nuclei of these cells were irregular and strongly stained (Fig. 1**M**).

3.1.3. Treatment II – 12.5 mg/mL

In this group, the males showed more intense morphological alterations than those from Treatment I (Fig. 1**J** and **N**). The testes were intact; however, alterations were observed in the accessory glands. The cells of the anterodorsal lobe had the cytoplasm intensely vacuolated and with few secretion granules (Fig. 1**J**). The nuclei of the cells were irregular and strongly strained by hematoxylin (Fig. 1**J**).

The cytoplasm of the cells in the posterolateral lobes was reduced due to the presence of large vacuoles (Fig. 1**N**). The nuclei of these cells were irregular and intensely stained by hematoxylin (Fig. 1**N**). In comparison with the Control Group, fewer secretion granules were observed (Fig. 1**N**).

The laterodorsal, posterodorsal and posterolateral lobes showed similar results to the ones found in Treatment I.

3.1.4. Treatment III – 25 mg/mL

The results obtained for the males exposed to the crude ethanolic

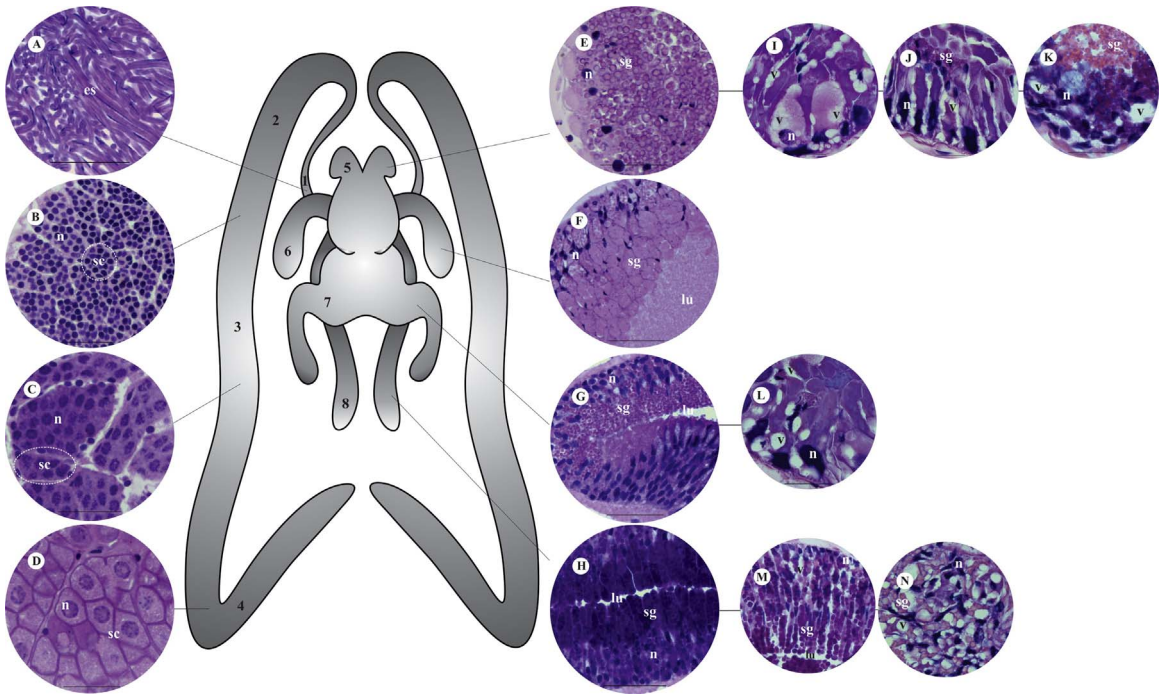


Fig. 1. Schematic representation and histological sections of *Amblyomma cajennense* s.s. male reproductive system stained by hematoxylin and eosin **A** = Histological section of the seminal vesicle – Control I and II. **B–D** = Histological sections of the testes – Control I and II. **E–H** = Histological sections of the multilobulated accessory gland complex (agc) – Control I and II. **I;M** = Histological sections of the agc of the males exposed to 6.2 mg/mL of the EEAO. **J;N** = Histological sections of the agc of the males exposed to 12.5 mg/mL of the EEAO. **K;L** = Histological sections of the agc of the males exposed to 25 mg/mL of the EEAO. **agc** = accessory gland complex. **es** = elongated spermatid. **sc** = spermatocytes. **sg** = secretion granules. **lu** = lumen. **n** = nucleus. **v** = vacuole. **1** = seminal vesicle. **2** = proximal region of the testes. **3** = medial region of the testes. **4** = distal region of the testes. **5** = anterodorsal lobe. **6** = laterodorsal lobe. **7** = posterodorsal lobe. **8** = posterolateral lobe. Bars **A–D** = 50 μm; **E-N** = 20 μm.

extract of *A. oleracea* at the concentration of 25 mg/mL, reveled the occurrence of the most severe morphological alterations in the accessory glands (Fig. 1**K** and **L**); however, the morphology of the testes was not affected.

The cells of the laterodorsal lobe had the cytoplasm vacuolated and with few secretion granules, damages observed in great part of the tissue (Fig. 1**K**).

In the posterodorsal lobes, the secretory cells had the cytoplasm moderately stained by eosin, in addition to secretion granules and large round-shaped vacuoles occupying most part of it. The nuclei of these cells were irregular and strongly stained by hematoxylin (Fig. 1**L**).

The laterodorsal lobes showed similar morphology to the Control Group, i.e., without alterations.

3.2. Histochemistry

In addition to histological techniques, histochemical tests were performed on the male reproductive system of *A. cajennense* males for the detection of polysaccharides (PAS)(Fig. 2) and total proteins (Bromophenol blue)(Fig. 3). For a better understanding, the results are shown in tables (Tables 1–2).

a **PAS reaction for the detection of neutral polysaccharides**

b **Bromophenol blue reaction for the detection of total proteins**

4. Discussion

The most efficient and widely used control method is based on synthetic chemicals; however, it has to be periodically replaced, once the active ingredients induce the selection of resistant ticks (Abbas et al., 2014; Crampton et al., 1999; Nolan, 1985).

Under this perspective, the search for acaricides based on plant extracts has been intensified, considering the indiscriminate use of synthetic acaricides and their toxic effects on the environment, non-target organisms and on the human health as well (Borges et al., 2011).

In this regard, plants as the ones from the family Meliaceae, including the genera *Melia* (Oelrichs et al., 1983)*, Trichilia, Toona, Aglaia, Azadirachta* (Martinez, 2002)*, Carapa* (Vendramini et al., 2012), and the family Asteraceae, as *Calea serrata, Artemisia annua* (Chagas et al., 2011; Ribeiro et al., 2008) and *Acmella oleracea* have been acknowledged as promising alternatives to control populations of arthropods (Castro et al., 2014; Oliveira et al., 2016).

Thus, the present study had the objective to evaluate the effects of *A. oleracea* ethanolic extracts at the sublethal concentrations of 6.2, 12.5 and 25 mg/mL on the morphophysiology of the reproductive

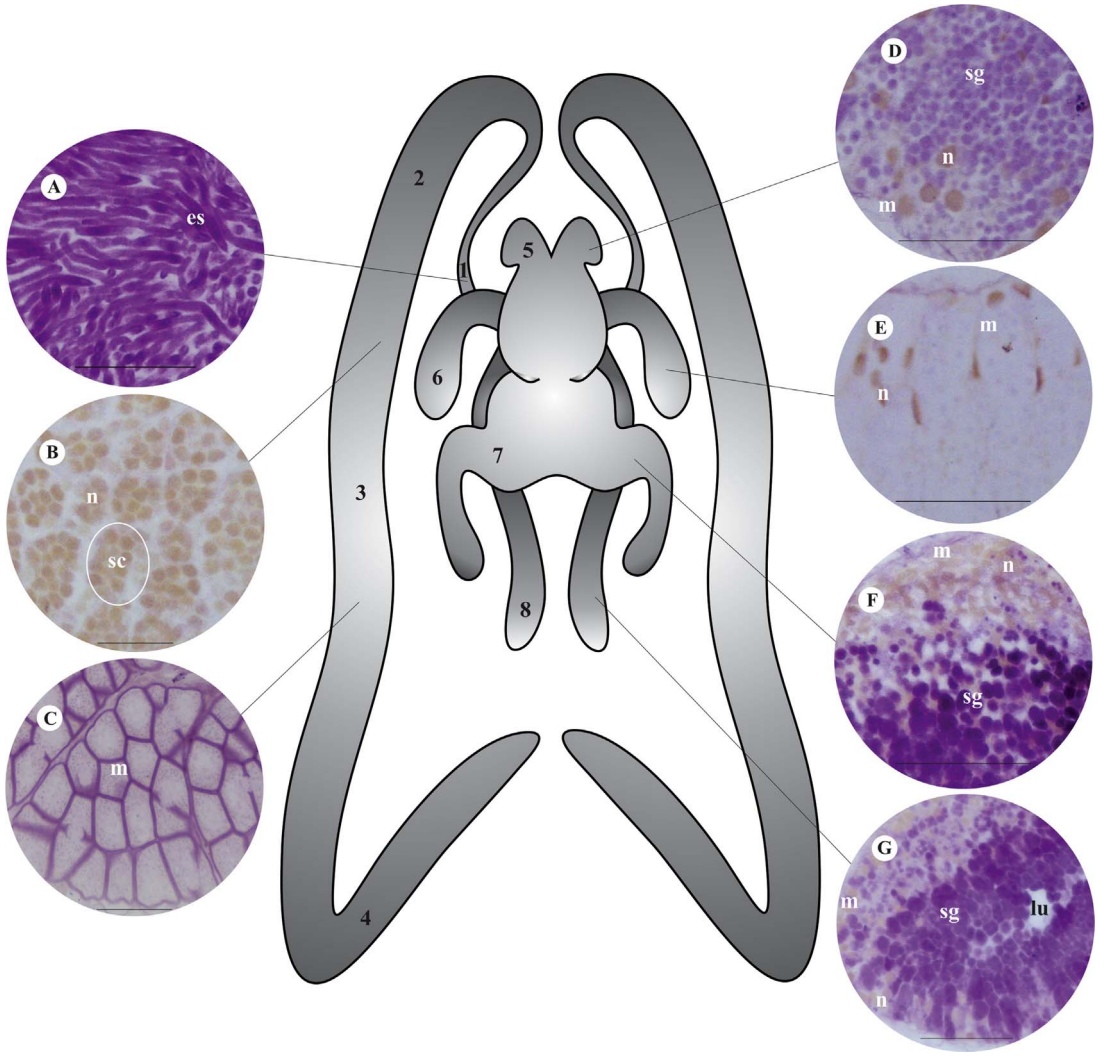


Fig. 2. Schematic representation and histological sections of the male reproductive system of *Amblyomma cajennense* s.s., subjected to PAS reaction (periodic acid Schiff) **A** = Histological section of the seminal vesicle – Control I and II. **B-C** = Histological sections of the testes – Control I and II. **D–G** = Histological sections of the multilobulated accessory gland complex (agc) – Control I and II **agc** = accessory gland complex **es** = elongated spermatid **sc** = spermatocytes. **sg** = secretion granules. **m** = membrane **lu** = lumen **n** = nucleus **v** = vacuole **1** = seminal vesicle **2** = proximal region of the testes **3** = medial region of the testes **4** = distal region of the testes **5** = anterodorsal lobe **6** = laterodorsal lobe **7** = posterodorsal lobe **8** = posterolateral lobe. Bars **A–C** = 50 µm; **D–G** = 20 µm.

Table 1
Results of the PAS (periodic acid Schiff) histochemical test on the male reproductive system of *A. cajennense* s.s. for the detection of neutral polysaccharides.

	Organ region	Spermatids	Control I and II	Figure	Treatment Group I (6.2 mg/mL)	Treatment Group II (12.5 mg/mL)	Treatment Group III (25 mg/mL)
Testes	Proximal	*membrane*	–	**2B**	–	–	–
		cytoplasm	–		–	–	–
	Medial	*membrane*	+	**2C**	Ø	Ø	Ø
		cytoplasm	+		Ø	Ø	Ø
	Distal	*membrane*	Ø		Ø	Ø	Ø
		citoplasm	Ø		Ø	Ø	Ø
Multilobulated accessory gland	Lobes	Secretory cells					
	Anterodorsal	*membrane*	–	**2D**	–	Ø	–
		cytoplasm	+ +		+ +	Ø	+ +
		secretion granules	+ +		+ +	Ø	+ +
	Laterodorsal	*membrane*	–	**2E**	–	–	–
		cytoplasm	–		–	–	–
		secretion granules	–		–	–	–
	Posterodorsal	*membrane*	–	**2F**	–	–	–
		cytoplasm	+ + +		+ + +	+ + +	+ + +
		secretion granules	+ + +		+ + +	+ + +	+ + +
	Posterolateral	*membrane*	–	**2G**	–	Ø	Ø
		cytoplasm	+ + +		+ + +	Ø	Ø
		secretion granules	+ + +		+ + +	Ø	Ø
	Region	Eloganted spermatids					
	Seminal vesicle	*membrane*	–	**2A**	–	–	–
		cytoplasm	+ + +		+ + +	+ + +	+ + +

+, weakly positive; + +, moderately positive; + + +, strongly positive; −, negative; Ø, region not observed.

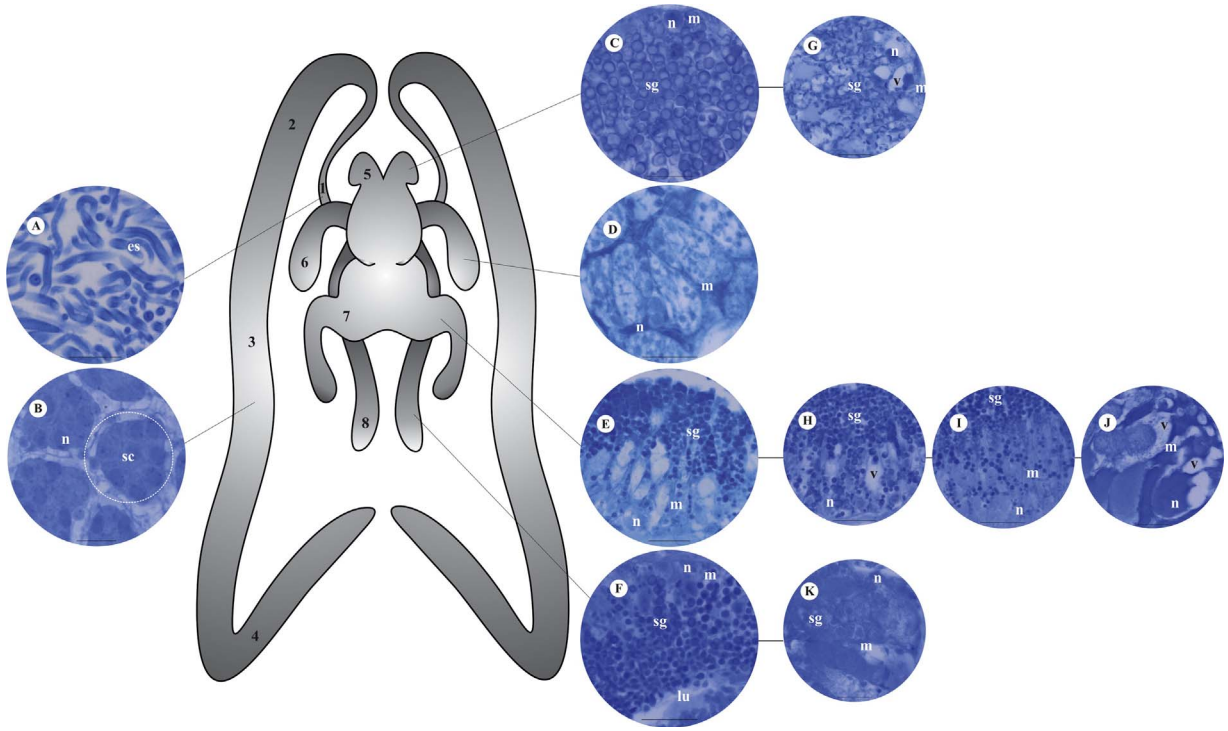


Fig. 3. Schematic representation and histological sections of the male reproductive system of *Amblyomma cajennense* s.s. subjected to Bromophenol blue reaction **A** = Histological section of the seminal vesicle – Control I and II. **B** = Histological section of the testes – Control I and II. **C-F** = Histological sections of the multilobulated accessory gland complex (agc) – Control I and II **G–H** = Histological sections of the agc of the males exposed to 6.2 mg/mL of the EEAO **I;K** = Histological sections of the agc of the males exposed to 12.5 mg/mL of the EEAO **J** = Histological sections of the agc of the males exposed to 25 mg/mL of the EEAO **agc** = accessory gland complex **es** = elongated spermatid **sc** = spermatocytes **sg** = secretion granules **m** = membrane **lu** = lumen **n** = nucleus **v** = vacuole **1** = seminal vesicle **2** = proximal region of the testes **3** = medial region of the testes **4** = distal region of the testes **5** = anterodorsal lobe **6** = laterodorsal lobe **7** = posterodorsal lobe **8** = posterolateral lobe. Bars **A** and **B** = 50 μm; **C–K** = 20 μm.

Table 2
Results of the histochemical test with Bromophenol blue on the male reproductive system of *A. cajennense* s.s. for the detection of total protein.

	Organ region	Spermatids	Control I and II	Figure	Treament Group I (6.2 mg/mL)	Figure	Treatment Group II (12.5 mg/mL)	Figure	Treatment Group III (25 mg/mL)	Figure
Testes	Proximal	*membrane*	Ø		Ø		Ø		Ø	
		citoplasm	Ø		Ø		Ø		Ø	
		nucleus	Ø		Ø		Ø		Ø	
	Medial	*membrane*	+ +	**3B**	+ +		+ +		+ +	
		cytoplasm	+ + +		+ + +		+ + +		+ + +	
		nucleus	+ + +		+ + +		+ + +		+ + +	
	Distal	*membrane*	Ø		Ø		Ø		Ø	
		cytoplasm	Ø		Ø		Ø		Ø	
		nucleus	Ø		Ø		Ø		Ø	
Multilobulated accessory gland	Lobes	Secretory cells								
	Anterodorsal	*membrane*	+ +	**3C**	+ +	**3G**	Ø		+ +	
		cytoplasm	+ +		+ +		Ø		+ +	
		secretion granules	+ +		+ +		Ø		+ +	
		nucleus	+ + +		+ + +		Ø		+ + +	
	Laterodorsal	*membrane*	+ + +	**3D**	+ + +		+ + +		+ + +	
		cytoplasm	+		+		+		+	
		secretion granules	+ +		+ +		+ +		+ +	
		nucleus	+ + +		+ + +		+ + +		+ + +	
	Posterodorsal	*membrane*	+ +	**3E**	+ +	**3H**	+ +	**3I**	+ +	**3J**
		cytoplasm	+ +		+ + +		+ +		+ +	
		secretion granules	+ + +		+ + +		+ + +		Ø	
		nucleus	+ +		+ +		+ +		+ +	
	Posterolateral	*membrane*	+ +	**3F**	+ +		+ +	**3K**	+ +	
		cytoplasm	+ +		+ +		+ +		+ +	
		secretion granules	+ + +		+ + +		+ + +		+ + +	
		nucleus	+ +		+ +		+ +		+ +	
	Region	Eloganted spermatids								
	Seminal vesicle	*membrane*	+ + +	**3A**	+ + +		+ + +		+ + +	
		cytoplasm	+ + +		+ + +		+ + +		+ + +	
		nucleus	+ + +		+ + +		+ + +		+ + +	

+, weakly positive; + +, moderately positive; + + +, strongly positive; −, negative; Ø, region not observed; * presence of negative cytoplasmic vacuoles.

system of *Amblyomma cajennense* s.s. male ticks.

According to Sampieri et al. (2016), the male reproductive system of *A. cajennense* comprises a pair of tubular testes, responsible for the production and maturation of germ cells until they reach spermatid stage and a complex of multilobulated accessory glands that produce and secrete the spermatic fluid and synthetize the spermatophore. The morphohistological and histochemical analyses performed on the individuals from control groups I and II in this study corroborate Sampieri et al. (2016).

In the testes of the *A. cajennense* ticks analyzed in this study, the germ cells were enclosed by a simple squamous epithelium, where the spermatocytes are formed. According to Sonenshine and Roe (2014), the development of the spermatids occurs in two phases: a) the spermatogenesis, characterized by the mitotic and meiotic divisions of the spermatogonia and spermatocytes, originating the spermatids and b) the spermiogenesis, final phase of the spermatid development (differentiation), originating the spermatozoa. The spermatogenesis in most species from the family Ixodidae begins in the final nymph stage and is concluded soon after ecdysis, as demonstrated by Oliveira et al. (2012) in *Rhipicephalus sanguineus* s.l. However, such dynamics is not a general rule, once in some species the spermatogenesis is concluded only when the male reaches the adult stage and the feeding process starts, as is the case of *Dermacentor variabilis* (Sonenshine and Roe, 2014). Furthermore, some spermiogenic phases are dependent of other physiological processes, such as the development of the adult feeding process and the production of spermatophore and ejaculatory secretions (Feldman-Muhsam and Borut, 1983, 1978; Reger, 1974, 1961; Sonenshine and Roe, 2014). The most advanced spermiogenic stage observed in this study was the mature spermatid, classified by Sampieri et al. (2016) as spermatid V and described as elongated filiform cells (Reger, 1974, 1961; Sampieri et al., 2016).

Some studies developed on the male reproductive system of ticks have reported that the developing germ cells (during spermatogenesis and spermiogenesis) would be sensitive to any physiological alterations occurring in the animal organism, including exposure to substances with proven toxic potential (Sampieri et al., 2016). However, the present study showed that the ethanolic extract of *A. oleracea* at the concentrations of 6.2, 12.5 and 25 mg/mL did not cause significant damage in the spermatids in initial or final phases of development. This can be explained by the fact that, when the spermatids reach the final stages of spermatogenesis, i.e., when they are fully differentiated, the spermatic cell is encapsulated, having then a protective barrier against the direct action of toxic agents, such as the extract analyzed here (Montasser et al., 2005; Resler et al., 2009; Roshdy, 1966; Shepherd et al., 1982). These data oppose Montasser and Amin (2010), who analyzed the testes ultrastructure in *Argas persicus* ticks exposed to ivermectin a macrocyclic lactone, at the concentration of 400 µg/kg host. The authors observed the rupture of the spermatids plasma membranes and organelles, in addition to the presence of multivesicular bodies and numerous vacuoles in the cytoplasm of these germ cells, alterations that prevent the normal development of the spermatids, and, consequently, of the spermatozoa.

The individuals exposed to the crude ethanolic extract of the aerial parts (flower, leaf and stem) of *A. oleracea* at the concentrations of 6.2, 12.5 and 25 mg/mL differently from the ones belonging to the control groups, showed significant morphological alterations in the secretory cells of the accessory gland complex. Such alterations were more intense and severe as the concentration of the chemical increased (dose-dependent), corroborating the results obtained by Sampieri et al. (2015), who exposed male *A. cajennense* ticks to the esters of ricinoleic acid obtained from castor oil.

The ethanolic extract of *A. oleracea*, caused intense and severe cytoplasmic vacuolation in the secretory cells of the accessory gland complex, which in turn reduced the synthesis and storage of the

secretion granules that would constitute the spermatic fluid and the spermatophore (Sampieri et al., 2015; Sonenshine and Roe, 2014). These data corroborate Sampieri et al. (2015), who studied the action of castor oil esters on *A. cajennense* s.l. ticks and observed the significant cytoplasmic vacuolation in the secretory cells of the accessory glands in the individuals treated with higher concentrations of the acaricide, offered to the host rabbits via commercial food. The cytoplasmic vacuoles observed in these cells would probably be autophagic, and would be removing from the system the organelles damaged by the toxic components of the extract. Moreover, this vacuolation could represent the recycling of damaged portions of the cytoplasm, in an attempt to preserve the viability of the cell (Carvalho and Recco-Pimentel, 2012; Junqueira and Carneiro, 2013).

In addition to the intense cytoplasmic vacuolation in the cells of the accessory gland complex, the secretion granules produced by them were reduced, signalizing a drop in the synthesis and secretion of polysaccharides, glycoprotein, mucoprotein, lipoprotein and glycosaminoglycan, elements that constitute the seminal fluid. The lack of these substances can impair the process of spermatozoa capacitation in the female genital tract, and inhibit the formation of the spermatophore (mature spermatids capsule) (Garcia-Fernandez et al., 1998; Sonenshine and Roe, 2014). These are important alterations, once they directly affect the fertilization of the females, as the male sperm and spermatids are transferred to the female genital tract via spermatophore (Anholeto et al., 2015; Sampieri et al., 2015; Sonenshine and Roe, 2014). Oliver and Brinton (1972) studied *Dermacentor variabilis* and *Ornithodoros moubata* ticks and reported that the spermatids capacitation in the female reproductive tract would be activated by a polypeptide produced by the male accessory glands. Lomas and Kaufman (1992) reported the presence of a chemical factor produced by the accessory glands of *A. hebraeum* ticks. After released into the seminal fluid, this substance would act on the degeneration of the salivary glands of the female. The same authors suggested that other chemical factors produced in the male genital tract would influence female engorgement; however, the chemical nature of such factors has not been clarified yet. Thus, alterations in the morphophysiology of the male glandular complex affects the synthesis of the secreted products and, consequently, alters the fertilization and reproduction processes (Sampieri et al., 2015).

The results presented here clearly show that the *A. oleracea* ethanolic extract at the concentrations of 6.2; 12.5 and 25 mg/mL caused morphohistological and physiological damages to the accessory gland complex of *A. cajennense* males; however, such damages were not sufficient to affect the germ cells. Nevertheless, this extract can be considered a promising alternative to control *A. cajennense* ticks once it was able to inhibit the production and secretion of seminal fluids, which would hinder the ectoparasites reproductive process. These findings open the possibility to use the ethanolic extract obtained from the flowers, leaves and stems of *A. oleracea*, as a control strategy.

Conflicts of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgements

We thank Sao Paulo State Research Foundation (FAPESP) (process number 2015/01496-5) and CAPES/Brazil for the financial support.

References

Abbas, R.Z., Zaman, M.A., Colwell, D.D., Gilleard, J., Iqbal, Z., 2014. Acaricide resistance in cattle ticks and approaches to its management: the state of play. Vet. Parasitol. 203, 6–20. http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.03.006.

Anholeto, L.A., Nunes, P.H., Remédio, R.N., Camargo-Mathias, M.I., 2015. Testes of fed and unfed *Amblyomma cajennense* ticks (Acari: Ixodidae). First morphological data. Acta Zool. 96, 375–382. http://dx.doi.org/10.1111/azo.12083.

Anholeto, L.A., de Oliveira, P.R., Rodrigues, R.A.F., Spindola, C. dos S., Labruna, M.B., Pizano, M.A., Castro, K.N. de C., Camargo-Mathias, M.I., 1787. Potential action of extract of *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen to control *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) ticks. Ticks Tick. Borne. Dis. 8, 65–72. http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.09.018.

Beati, L., Nava, S., Burkman, E.J., Barros-Battesti, D.M., Labruna, M.B., Guglielmone, A.A., Cáceres, A.G., Guzmán-Cornejo, C.M., León, R., Durden, L.A., Faccini, J.L.H., 2013. *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae), the Cayenne tick: phylogeography and evidence for allopatric speciation. BMC Evol. Biol. 13, 267. http://dx.doi.org/10.1186/1471-2148-13-267.

Bechara, G.H., Szabó, M.P.J., Ferreira, B.R., Garcia, M.V., 1995. *Rhipicephalus sanguineus* tick in Brazil: feeding and reproductive aspects under laboratorial conditions. Braz. J. Vet. Parasitol. 4, 61–66.

Borges, L.M.F., Sousa, L.A.D., Barbosa, C.S., 2011. Perspectives for the use of plant extracts to control the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Rev. Bras. Parasitol. Veterinária = Brazilian J. Vet. Parasitol. Órgão Of. do Colégio Bras. Parasitol. Veterinária 20, 89–96.

Carvalho, H.F., Recco-Pimentel, S.M., 2012. A Célula, 3ª ed. Editora Manole, São Paulo.

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., 2014. Acaricide activity in vitro of *Acmella oleracea* against *Rhipicephalus microplus*. Parasitol. Res. 113, 3697–3701. http://dx.doi.org/10.1007/s00436-014-4034-2.

Chagas, A.C.S., Georgetti, C.S., Carvalho, C.O., Oliveira, M.C.S., Rodrigues, R.A., Foglio, M.A., Magalhães, P.M., 2011. *In vitro* activity of *Artemisia annua L.* (Asteraceae) extracts against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Rev. Bras. Parasitol. Veterinária 20, 31–35. http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612011000100007.

Crampton, A., Baxter, G., Barker, S., 1999. Identification and characterisation of a cytochrome P450 gene and processed pseudogene from an arachnid: the cattle tick, *Boophilus microplus*. Insect Biochem. Mol. Biol. 29, 377–384. http://dx.doi.org/10.1016/s0965-1748(99)00013-2.

Donohue, K.V., Khalil, S.M.S., Ross, E., Mitchell, R.D., Roe, R.M., Sonenshine, D.E., 2009. Male engorgement factor: role in stimulating engorgement to repletion in the ixodid tick, *Dermacentor variabilis*. J. Insect Physiol. 55, 909–918. http://dx.doi.org/10.1016/j.jinsphys.2009.05.019.

Drummond, R.O., Ernst, S.E., Trevino, J.L., Gladney, W.J., Graham, O.H., 1973. *Boophilus annulatus* and *B. microplus*: laboratory tests of insecticides. J. Econ. Entomol. 66, 130–133.

Dubey, S., Maity, S., Singh, M., Saraf, S.A., Saha, S., 2013. Phytochemistry, pharmacology and toxicology of *Spilanthes acmella*: a review. Adv. Pharmacol. Sci. 2013, 423750. http://dx.doi.org/10.1155/2013/423750.

Estrada-Peña, A., Tarragona, E.L., Vesco, U., Meneghi, D., Mastropaolo, M., Mangold, A.J., Guglielmone, A.A., Nava, S., 2014. Divergent environmental preferences and areas of sympatry of tick species in the *Amblyomma cajennense* complex (Ixodidae). Int. J. Parasitol. 44, 1081–1089. http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2014.08.007.

Favoreto, R., Gilbert, B., 2010. Estado da Arte/state of the art – *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen (Asteraceae)–Jambu. Rev. Fitos 5, 83–91.

Feldman-Muhsam, B., Borut, S., 1978. Further observations on spermatophore formation in argasid ticks. J. Insect Physiol. 24, 693–697. http://dx.doi.org/10.1016/0022-1910(78)90066-5.

Feldman-Muhsam, B., Borut, S., 1983. On the spermatophore of ixodid ticks. J. Insect Physiol. 29, 449–457. http://dx.doi.org/10.1016/0022-1910(83)90073-2.

Garcia-Fernandez, C., Garcia, S.M.L., Garcia, R.N., 1998. The male genital accessory gland complex of the cattle tick *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). Rev. Bras. Biol. 58, 453–462. http://dx.doi.org/10.1590/S0034-71081998000300010.

Guedes, E., Leite, R.C., Prata, M.C., Pacheco, R.C., Walker, D.H., Labruna, M.B., 2005. Detection of *Rickettsia rickettsii* in the tick *Amblyomma cajennense* in a new Brazilian spotted fever-endemic area in the state of Minas Gerais. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 100, 841–845. http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762005000800004.

Junqueira, L.C., Carneiro, J., 2013. Histologia Básica. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.

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

Labruna, M.B., 2009. Ecology of *Rickettsia* in South America. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1166, 156–166. http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04516.x.

Lomas, L.O., Kaufman, W.R., 1992. The influence of a factor from the male genital tract on salivary gland degeneration in the female ixodid tick, *Amblyomma hebraeum*. J. Insect Physiol. 38, 595–601. http://dx.doi.org/10.1016/0022-1910(92)90111-p.

Martinez, S.S., 2002. O Nim – *Azadirachta indica*: Natureza, usos múltiplos. IAPAR, Londrina.

Martins, T.F., Barbieri, A.R.M., Costa, F.B., Terassini, F.A., Camargo, L.M.A., Peterka, C.R.L., Pacheco, R.C., Dias, R.A., Nunes, P.H., Marcili, A., Scofield, A., Campos, A.K., Horta, M.C., Guilloux, A.G.A., Benatti, H.R., Ramirez, D.G., Barros-Battesti, D.M., Labruna, M.B., 2016. Geographical distribution of *Amblyomma cajennense* (sensu lato) ticks (Parasitiformes: Ixodidae) in Brazil, with description of the nymph of *A. cajennense* (sensu stricto). Parasit. Vectors 9, 186. http://dx.doi.org/10.1186/s13071-016-1460-2.

Montasser, A., Amin, A., 2010. Effect of ivermectin on the integument and dorsoventral muscles of the tick *Argas (Persicargas) persicus* (Oken) (Ixodoidea: Argasidae). Parasitol. Res. 107, 975–982. http://dx.doi.org/10.1007/s00436-010-1963-2.

Montasser, A.A., Gadelhak, G.G.G., Tariq, S., 2005. Impact of ivermectin on the ultrastructure of the testis of *Argas (Persicargas) persicus* (Ixodoidea: Argasidae). Exp. Appl. Acarol. 36, 119–129. http://dx.doi.org/10.1007/s10493-005-1270-2.

Nolan, J., 1985. Mechanisms of resistance to chemicals in arthropod parasites of veterinary importance. Vet. Parasitol. 18, 155–166. http://dx.doi.org/10.1016/0304-4017(85)90064-0.

Oelrichs, P.B., Hill, M.W., Vallely, P.J., MacLeod, J.K., Molinski, T.F., 1983. Toxic

tetranortriterpenes of the fruit of *Melia azedarach*. Phytochemistry 22, 531–534. http://dx.doi.org/10.1016/0031-9422(83)83039-8.

Oliveira, P.R., Bechara, G.H., Camargo-Mathias, M.I., 2008. Evaluation of cytotoxic effects of fipronil on ovaries of semi-engorged *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) tick female. Food Chem. Toxicol. 46, 2459–2465. http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2008.03.034.

Oliveira, P.R., Bechara, G.H., Denardi, S.E., Pizano, M.A., Camargo-Mathias, M.I., 2011. Toxicity effect of the acaricide fipronil in semi-engorged females of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): preliminary determination of the minimum lethal concentration and LC(50). Exp. Parasitol. 127, 418–422. http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2010.09.009.

Oliveira, P.R., Calligaris, I.B., Roma, G.C., Bechara, G.H., Camargo-Mathias, M.I., 2012. Morphological characterization of the nymphs *Rhipicephalus sanguineus* ticks (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). Description of the testes, integument, Malpighian tubules, and midgut on the detachment day. Microsc. Res. Tech. 75, 727–736. http://dx.doi.org/10.1002/jemt.21118.

Oliveira, P.R., Pizano, M.A., Remédio, R.N., Bechara, G.H., de Abreu, R.M.M., Camargo-Mathias, M.I., 2015. Potential of the chemical dinotefuran in the control of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) semi-engorged female ticks. Exp. Parasitol. 155, 82–88. http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2015.04.021.

Oliveira, P.R., Castro, K.N.C., Anholeto, L.A., Camargo-Mathias, M.I., 2016. Cytotoxic effects of extract of *Acmella oleracea* (Jambú) in *Rhipicephalus microplus* females ticks. Microsc. Res. Tech. 79, 744–753. http://dx.doi.org/10.1002/jemt.22693.

Oliver, J.H., Brinton, L.P., 1972. Cytogenetics of ticks (Acari: Ixodoidea) 7. Spermatogenesis in the Pacific Coast tick, *Dermacentor occidentalis* Marx (Ixodidae). J. Parasitol. 58, 365–379.

Pearse, A., 1985. Histochemistry Theoretical and Applied. Livingstone, Churchill.

Pruett, J.H., 1999. Immunological control of arthropod ectoparasites—a review. Int. J. Parasitol. 29, 25–32. http://dx.doi.org/10.1016/S0020-7519(98)00172-6.

Reger, J.F., 1961. The fine structure of spermatids from the tick, *Amblyomma dissimili*. J. Ultrastruct. Res. 5, 584–599. http://dx.doi.org/10.1016/S0022-5320(61)80028-2.

Reger, J.F., 1974. The origin and fine structure of cellular processes in spermatozoa of the tick *Dermacentor andersoni*. J. Ultrastruct. Res. 48, 420–434. http://dx.doi.org/10.1016/S0022-5320(74)80012-2.

Resler, J.H., Frazier, J.L., Shepherd, J.G., Modafferi, J.D., 2009. Migration and motility of spermatozoa in the female reproductive tract of the soft tick *Ornithodoros moubata* (Acari, Argasidae). Parasitology 136, 511–521. http://dx.doi.org/10.1017/S0031182009005630.

Ribeiro, V.L.S., Avancini, C., Gonçalves, K., Toigo, E., von Poser, G., 2008. Acaricidal activity of *Calea serrata* (Asteraceae) on *Boophilus microplus* and *Rhipicephalus sanguineus*. Vet. Parasitol. 151, 351–354. http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.11.007.

Roma, G.C., Oliveira, P.R., Pizano, M.A., Camargo-Mathias, M.I., 2009. Determination of LC(50) of permethrin acaricide in semi-engorged females of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). Exp. Parasitol. 123, 269–272. http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2009.08.001.

Roshdy, M.A., 1966. Comparative internal morphology of subgenera of Argas ticks (Ixodoidea, Argasidae). IV. Subgenus Ogadenus: *Argas brumpti* Neumann, 1907. J. Parasitol. 52, 776–782.

Sampieri, B.R., Labruna, M.B., Bueno, O.C., Camargo-Mathias, M.I., 2014. Dynamics of cell and tissue genesis in the male reproductive system of ticks (Acari: Ixodidae) *Amblyomma cajennense* [corrected] (Fabricius, 1787) and *Amblyomma aureolatum* (Pallas, 1772): a comparative analysis. Parasitol. Res. 113, 1511–1519. http://dx.doi.org/10.1007/s00436-014-3795-y.

Sampieri, B.R., Furquim, K.C.S., Carvalho, P., Bueno, O., Camargo-Mathias, M.I., 2015. Ricinoleic acid esters from castor oil modifying male reproductive system of *Amblyomma cajennense* (Fabricius 1787). Emerg. Life Sci. Res. 1, 26–37.

Sampieri, B.R., Moreira, J.C.S., Páez, F.A.R., Camargo-Mathias, M.I., 2016. Comparative morphology of the reproductive system and germ cells of *Amblyomma* ticks (Acari: Ixodidae): a contribution to Ixodidae systematics. J. Microsc. Ultrastruct. 4, 95–107. http://dx.doi.org/10.1016/j.jmau.2015.11.003.

Shepherd, J., Oliver, J.H., Hall, J.D., 1982. A polypeptide from male accessory glands which triggers maturation of tick spermatozoa. Int. J. Invertebr. Reprod. 5, 129–137. http://dx.doi.org/10.1080/01651269.1982.10553462.

Soares, H.S., Barbieri, A.R.M., Martins, T.F., Minervino, A.H.H., Lima, J.T.R., Marcili, A., Gennari, S.M., Labruna, M.B., 2015. Ticks and rickettsial infection in the wildlife of two regions of the Brazilian Amazon. Exp. Appl. Acarol. 65, 125–140. http://dx.doi.org/10.1007/s10493-014-9851-6.

Sonenshine, D.E., Roe, R.M., 2014. Biology of Ticks, 2ª. ed. Oxford University Press, United States of America.

Tarragona, E.L., Cicuttin, G.L., Mangold, A.J., Mastropaolo, M., Salvo, M.N., Nava, S., 2015. *Rickettsia* infection in *Amblyomma tonelliae*, a tick species from the *Amblyomma cajennense* complex. Ticks Tick. Borne Dis. 6, 173–177. http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2014.11.010.

Vendramini, M.C.R., Camargo-Mathias, M.I., Faria, A.U., Bechara, G.H., Oliveira, P.R., Roma, G.C., 2012. Cytotoxic effects of andiroba oil (*Carapa guianensis*) in reproductive system of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, (Acari: Ixodidae) semi-engorged females. Parasitol. Res. 111, 1885–1894. http://dx.doi.org/10.1007/s00436-012-3031-6.

CAPÍTULO 5

MORPHOLOGICAL ALTERATIONS IN THE OVARIES OF *Amblyomma cajennense* SEMI-ENGORGED TICKS EXPOSED TO ETHANOLIC EXTRACT OF *Acmella oleracea*[5]

Resumo

O presente estudo analisou os efeitos de diferentes concentrações do extrato etanólico bruto de *Acmella oleracea* (Jambu) sobre o desenvolvimento das células germinativas de fêmeas semi-ingurgitadas de carrapatos *Amblyomma cajennense*, fazendo uso de técnicas de morfologia e de histoquímica, a fim de se avaliar se este químico natural poderá num futuro próximo ser uma estratégia para a realização do controle destes importantes ectoparasitas. Foram utilizadas 100 fêmeas semi-ingurgitadas com pesos homogêneos (p> 0,05), as quais foram alocadas em cinco grupos experimentais (10 animais/grupo): Controle 1 - foram expostas à água destilada; Controle 2 - foram expostas ao solvente etanol 50% e DMSO 1%; Tratamentos 1 a 3 - foram expostas às concentrações de: 3,1; 6,2 e 12,5 mg/mL do extrato etanólico bruto das flores, folhas e caules de *A. oleracea*, respectivamente, obtidas por diluição em etanol 50% e DMSO 1%. As fêmeas foram imersas nas diferentes concentrações do extrato por 5 minutos, secas em papel absorvente e levadas à incubadora BOD sob condições controladas por 7 dias. Após esse período, foram dissecadas para remoção dos ovários, que foram submetidos às técnicas histológicas rotineiras com coloração pela hematoxilina de Harris e eosina aquosa (HE) e histoquímicas (PAS para detecção de polissacarídeos totais e azul de bromofenol para detecção de proteínas totais). Foi observado nos indivíduos dos grupos tratamento que o extrato provocou alterações significativas nos ovócitos, as quais incluíram mudanças na forma da célula, desorganização e vacuolização citoplasmática, diminuição dos grânulos de vitelo e fragmentação da vesícula germinal. Essas alterações foram mais intensas e severas nos ovócitos em estágios iniciais de desenvolvimento (I e II). Os dados aqui obtidos confirmaram o potencial citotóxico do extrato etanólico de *A. oleracea* sobre as células germinativas femininas de carrapatos *A. cajennense*, vindo abrir a possibilidade do seu uso como alternativa eficiente e sustentável para o controle populacional dessa espécie.

Palavras-chave: controle químico, carrapato-estrela, citotoxicidade, produto natural, jambu.

[5] **Luís Adriano Anholeto**; Patrícia Rosa de Oliveira; Rodney Alexandre Ferreira Rodrigues; Lais Thiemi Yamane; Karina Neoob de Carvalho Castro; Maria Izabel Camargo-Mathias. Artigo publicado na Revista **Microscopy Research and Technique** em 2018, v. 81, p. 1347-1357.

Received: 2 February 2018 | Revised: 29 August 2018 | Accepted: 1 September 2018

DOI: 10.1002/jemt.23145

WILEY MICROSCOPY RESEARCH & TECHNIQUE

RESEARCH ARTICLE

Morphological alterations in the ovaries of *Amblyomma cajennense* semi-engorged ticks exposed to ethanolic extract of *Acmella oleracea*

Luís Adriano Anholeto[1] | Patrícia Rosa de Oliveira[1] | Rodney Alexandre Ferreira Rodrigues[2] | Lais Thiemi Yamane[2] | Karina Neoob de Carvalho Castro[3] | Maria Izabel Camargo-Mathias[1]

[1]Department of Biology, Institute of Biosciences, São Paulo State University UNESP, Rio Claro, SP, Brazil

[2]Chemical, Biological and Agricultural Research Center (CPQBA), Natural Products Chemistry Division, University of Campinas, Campinas, SP, Brazil

[3]Embrapa Meio-Norte, Parnaíba, PI, Brazil

Correspondence
Email: micm@rc.unesp.br

Funding information
Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Grant/Award Number: 2015/01496-5

Abstract

The present study analyzed the effects of different concentrations of *Acmella oleracea* crude ethanolic extract (EEAO) on the development of germ cells from semi-engorged *Amblyomma cajennense* females in order to evaluate the potential of this natural chemical as a strategy to control these important ectoparasites. A hundred semi-engorged females were divided into five groups (duplicates) (10 animals/group): Control 1 (distilled water); Control 2 (solvent ethanol 50% and DMSO 1%); and Treatment I to III (3.1, 6.2, and 12.5 mg/mL of EEAO, respectively). For the exposure of the ticks to the extract was used the Adult Immersion Test. After the exposition, the ovaries were removed and submitted to histological analysis using Harris hematoxylin and aqueous eosin. The histochemical tests were performed using PAS and Bromophenol blue staining techniques, for the detection of total polysaccharides and total protein, respectively. The extract caused significant alterations in the oocytes, including changes in the shape of the cells, disorganization, and cytoplasmic vacuolation, decrease in the number of yolk granules and germ vesicle fragmentation. These alterations were more intense in the oocytes in initial developmental stages (I and II). The results obtained in this study confirm the cytotoxic potential of the ethanolic extract of *A. oleracea* on the germ cells of *A. cajennense* females, opening up the possibility to use this extract as an alternative to control these ectoparasites.

KEYWORDS

control, jambu, morphology, oocytes, ticks

1 | INTRODUCTION

The medical and veterinary importance of ticks of the *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) species complex is widely acknowledged, as they have different hosts, including the human being (Sonenshine & Roe, 2014). Additionally, these ectoparasites are potential vectors of *Rickettsia rickettsii*, the causative agent of Rocky Mountain Spotted Fever and Brazilian Spotted Fever (Labruna, 2009; Martins et al., 2016; Soares et al., 2015; Tarragona et al., 2015). This species group is spread throughout the American continent (Beati et al., 2013; Estrada-Peña & De La Fuente, 2014), where two species are reported in Brazil: *A. cajennense* sensu stricto in the Amazon Basin (northern Brazil), and *Amblyomma sculptum* in the remaining regions of the country, except for the extreme south where this species group is absent (Martins et al., 2016).

The female reproductive system of *Amblyomma cajennense* ticks was described by Denardi et al. (2004). According to the authors, the ovary of these ticks is panoistic and comprised of many oocytes (germ cells) in developmental stages classified from I to V. These oocytes are attached to the ovary through a cellular pedicel (Denardi et al., 2004; Oliveira, Bechara, Denardi, Nunes, & Camargo-Mathias, 2005; Saito et al., 2005).

The widely used method to control ticks is the use of synthetic chemical acaricides (Nolan, 1985; Oliveira et al., 2015; Oliveira, Bechara, Denardi, Pizano, & Camargo-Mathias, 2011; Pruett, 1999). However, the indiscriminate use of such products can induce the

The authors declare that there are no conflicts of interest.

 © 2018 Wiley Periodicals, Inc.

selection of resistant individuals and to the accumulation of chemical residues in the environment, contaminating the soil and water streams, and consequently affecting other animals, including human beings (Anholeto et al., 2017; Oliveira, Bechara, & Camargo-Mathias, 2008).

In this sense, new ticks control strategies have been promising as the use of vaccines and chemical acaricides of natural origin, with active ingredients based on plant extracts (Agnolin et al., 2010; Anholeto et al., 2017; Castro et al., 2014).

The use of natural substances represents an alternative to control ectoparasites (Borges, Sousa, & Barbosa, 2011). In this scenario, plants of the Meliaceae family, including the members of the genus *Melia* (Oelrichs, Hill, Vallely, MacLeod, & Molinski, 1983), *Trichilia*, *Toona*, *Aglaia* and *Azadirachta* (Martinez, 2002) and the Asteraceae family, such as the species *Acmella oleracea* have been widely recognized as effective strategies to control pests (Anholeto et al., 2017; Castro et al., 2014; Oliveira, Castro, Anholeto, Camargo-Mathias, & Camargo-Mathias, 2016).

Acmella oleracea (L.) R.K. Jansen (Asteraceae), is a plant found in tropical regions close to the Equator in Africa, Asia, and South America. In Brazil, it is popularly known as Jambu among other names, and it is used as a condiment, ingredient in popular medicine and its pharmacological activities have been object to several studies (Barbosa, Carvalho, Smith, & Sabaa-Srur, 2016; Cheng et al., 2015; Favoreto & Gilbert, 2010; Nomura et al., 2013). Recent studies have shown that the extract of the flowers, leaves and stem of *A. oleracea* have fungistatic, fungicide, and insecticide properties (Barbosa et al., 2016; Dubey, Maity, Singh, Saraf, & Saha, 2013; Fabry, Okemo, & Ansorg, 1996; Favoreto & Gilbert, 2010; Nigrinis, Caro, & Olarte, 1986; Ramsewak, 1999; Torres & Chávez, 2001).

Castro et al. (2014) and Oliveira et al. (2016) demonstrated that the n-hexane extracts of *A. oleracea* would have acaricide action, causing death in larvae and engorged females of the tick species *Rhipicephalus microplus*, in addition to interfering in the dynamics of the female reproductive system, significantly affecting oviposition and hatchability.

Thus, the objective of the present study was to investigate the effects of different concentrations of *A. oleracea* extract on germinative cells of semi-engorged *A. cajennense* ticks through morphological, histological and histochemical techniques. The results provide relevant information for the development of sustainable strategies and the improvement of current methods to control these ticks, minimizing environmental contamination, tick-resistance development and risks to nontarget organisms as well.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Chemical substance

2.1.1 | *Acmella oleracea*

The plants were cultivated in the experimental field of the CPQBA/UNICAMP, Paulinia, SP, Brazil, geographic coordinates 22°47′52″S, 47°6′49″W. The seeds were provided by the company Centroflora (Botucatu, SP, Brazil) and the aerial parts (flowers, leaves, and stem) were collected in April 2015. The plant was identified by Dr. John F. Pruski of Missouri Botanical Garden (USA), and a voucher specimen was deposited in CPQBA/UNICAMP Herbarium, Campinas, SP, Brazil, number 181,452. This project was authorized by the Council of the Genetic Heritage Management, under protocol number 010577/2014-9.

2.1.2 | Preparing the crude ethanolic extract of *Acmella oleracea*

The crude ethanolic extract of the aerial parts (flowers, leaves, and stem) of *A. oleracea* (EEAO) was prepared according to Anholeto et al. (2017b).

2.2 | Hosts

Grupo Genético Botucatu rabbits, weighing between 3 and 3.5 kg, were used as hosts. Rabbits were obtained from the Animal Facility of UNESP – Botucatu Campus/São Paulo – Brazil and housed in the Animal Facility of UNESP – Rio Claro Campus/São Paulo – Brazil. The animals had not been exposed previously to ticks or acaricides and were kept under controlled conditions. During the entire experiment, the rabbits were maintained in individual cages, receiving water and commercial food ad libitum.

This study was approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation of UNESP/SP/Brazil, protocol n° 11/2015.

2.3 | *Amblyomma cajennense* ticks

The *Amblyomma cajennense* semi-engorged females weighing 27 mg on average were used throughout the experiment. The ticks were provided by the Animal Facility of the Department of Biology – UNESP, Rio Claro Campus/São Paulo, Brazil, where the colony is maintained under controlled conditions (28°C, 85% humidity, and 12-hr photoperiod) in a Biological Oxygen Demand incubator. Unfed *A. cajennense* couples were fed for 10 days (semi-engorged stage) on two naive Grupo Genético Botucatu rabbits (50 couples of ticks/rabbit) (duplicates) following Bechara et al. (1995). Females studied here were collected in the feeding stage of semi-engorgement, with the intention of approaching the conditions observed in the field. In this stage of feeding, the females ticks remain attached to the host's skin to complete the blood meal, a process that leads to the appearance of skin lesions, as well as an open door for the transmission of pathogens to hosts.

2.4 | Experimental design

Adult ticks with homogeneous weights ($p > 0.05$), were divided into five groups (10 ticks each):

Group	Exposition
Control group I	Distilled water
Control group II	Ethanol solvent at 50% and dimethyl sulfoxide (DMSO) at 1%
Treatment I	3.1 mg/mL of EEAO
Treatment II	6.2 mg/mL of EEAO
Treatment III	12.5 mg/mL of EEAO

The sublethal concentrations used in the treatment were based on previous studies by Anholeto et al. (2017).

The Adult Immersion Test (Drummond et al., 1973) was used for the tick exposure to the crude ethanolic extract of *A. oleracea*.

2.5 | Morphophysiological evaluation

All semi-engorged females maintained in the refrigerator for thermal shock anesthesia were dissected using stereomicroscope in a phosphate buffered saline-PBS solution (NaCl 7.5 g/L, Na_2HPO_4 2.38 g/L, and KH_2PO_4 2.72 g/L).

2.5.1 | Histology

a. Harris hematoxylin and aqueous eosin technique (Junqueira and Junqueira, 1983).

The ovaries were fixed for 24 hr in 4% paraformaldehyde, dehydrated in ethanol, embedded in Leica resin for 24 hr at 4°C and transferred to plastic molds previously filled with polymerized Leica resin. After resin polymerization, all the blocks were sectioned at 3 μm thickness slices using a Leica RM 2265 microtome (Leica®) and stained with hematoxylin and eosin, following routine histological procedures. The permanent slides were analyzed and documented using bright-field microscope Leica DM750 (Leica®).

b. Histochemistry

To detect changes such as presence or absence, frequency, and distribution of proteins and polysaccharides in the semi-engorged females of control and extract-treated groups, histological sections were prepared for the histochemical techniques listed below.

PAS technique for Polysaccharide Detection (Junqueira and Junqueira 1983):

The ovaries of semi-engorged females were fixed with aqueous Bouin. Slides with sections were immersed for 10 min in 0.4% periodic acid, washed with distilled water, and stained with Schiff's reagent for 1 hr in the dark. The material was then washed thrice with sulfur water for 3 min each and rinsed with tap water for 30 min. Then, the material was stained with hematoxylin for 5 min. After drying, slides were clarified with xylol and mounted in Canada balsam.

Bromophenol Blue Staining for Protein Detection (Pearse 1985):

The ovaries of semi-engorged females were fixed with 4% paraformaldehyde. All slides were stained with bromophenol blue for 2 hr at room temperature. Afterward, they were washed with 0.5% acetic acid for 5 min and tap water for 15 min; slides were quickly immersed in tertiary butyl alcohol, allowed to dry at room temperature, clarified, and mounted in Canada balsam.

3 | RESULTS

3.1 | Histology

3.1.1 | Control Groups I and II.

The results showed that the ovary of *A. cajennense* is a tubular horseshoe-shaped structure, limiting a lumen, where a considerable number of oocytes undergoing several stages of development (I to V) are fixed through the pedicel cells (Figure 1a–e). In the control groups I and II, the oocytes I were small elliptical cells presenting a germ vesicle with an evident nucleolus in the central part of the cytoplasm (Figure 1a). The cytoplasm had a homogeneous aspect, with no granulations, and was limited by a thin plasma membrane, (Figure 1a). Oocytes II were larger than oocytes I, elliptical, and had a central germ vesicle (Figure 1b). The cytoplasm, limited by a thin plasma membrane, showed some thin and homogenous granulations (Figure 1b). Oocytes III showed rounded shape and intermediate size (Figure 1c). The germ vesicle was located in the oocyte pole, facing the pedicel (Figure 1c). The cytoplasm was filled with yolk granules of varied sizes, the smallest of which found in the central region and the largest in the periphery of the cells (Figure 1c). The plasma membrane was thick and it was possible to observe the chorion deposition (Figure 1c). The Oocytes IV were elliptical and larger than oocytes III, the cytoplasm was filled with large yolk grains homogeneously distributed (Figure 1d). At this stage, it was possible to observe the complete deposition of the chorion (Figure 1d). The germ vesicle was located at the oocyte pole facing the pedicel (Figure 1d). Oocytes V were also observed, round, and larger than IV ones, with large yolk granules homogeneously distributed in the cytoplasm, which did not allow the germ vesicle to be observed. These oocytes were involved by the fully deposited chorion (Figure 1e).

3.1.2 | Treatment I: Exposed to 3.1 mg/mL of EEAO.

The oocytes belonging to this group showed morphological alterations throughout the ovary in comparison with control groups I and II, including changes in the original shape of all oocytes (I, II, III, and V), from elliptic or round-shaped to irregular (Figure 1f–j). Oocytes I, II, and III showed cytoplasmic disorganization (Figure 1f–h). Oocytes IV showed decreased number of yolk granules, mainly in the peripheral region (Figure 1h–j). Additionally, the germ vesicle showed fragmentation in oocytes IV (Figure 1i) and a thicker chorion was deposited in oocytes IV and V (Figure 1i, j). The chorion of oocytes V was folded, which altered its original shape (Figure 1j).

3.1.3 | Treatment II: Exposed to 6.2 mg/mL of EEAO.

The results showed the occurrence of more significant morphological alterations, mainly in the oocytes in initial stages of development (I and II) (Figure 1k, l). The cells lost their original shape, from round to irregular. Large cytoplasmic vacuoles of the oocytes I and II were observed (Figure 1k, l). The oocytes I displayed chromatin marginalization in the germ vesicle (Figure 1k). In the oocytes V, the chorion was less folded in comparison with the Treatment Group I (Figure 1o).

3.1.4 | Treatment III: Exposed to 12.5 mg/mL of EEAO.

The females belonging to this group showed more intense morphological alterations (Figure 1p–t), such as a change in the shape of oocytes I (Figure 1p), cytoplasmic disorganization in oocytes I and II, and vacuolation in the oocytes II (Figure 1q). Yolk granules were smaller in oocytes III (Figure 1r) and oocytes IV when compared to the Control Groups I and II (Figure 1s). In the oocytes V, the yolk granules were ruptured, and their content was released in the cytoplasm (Figure 1t).

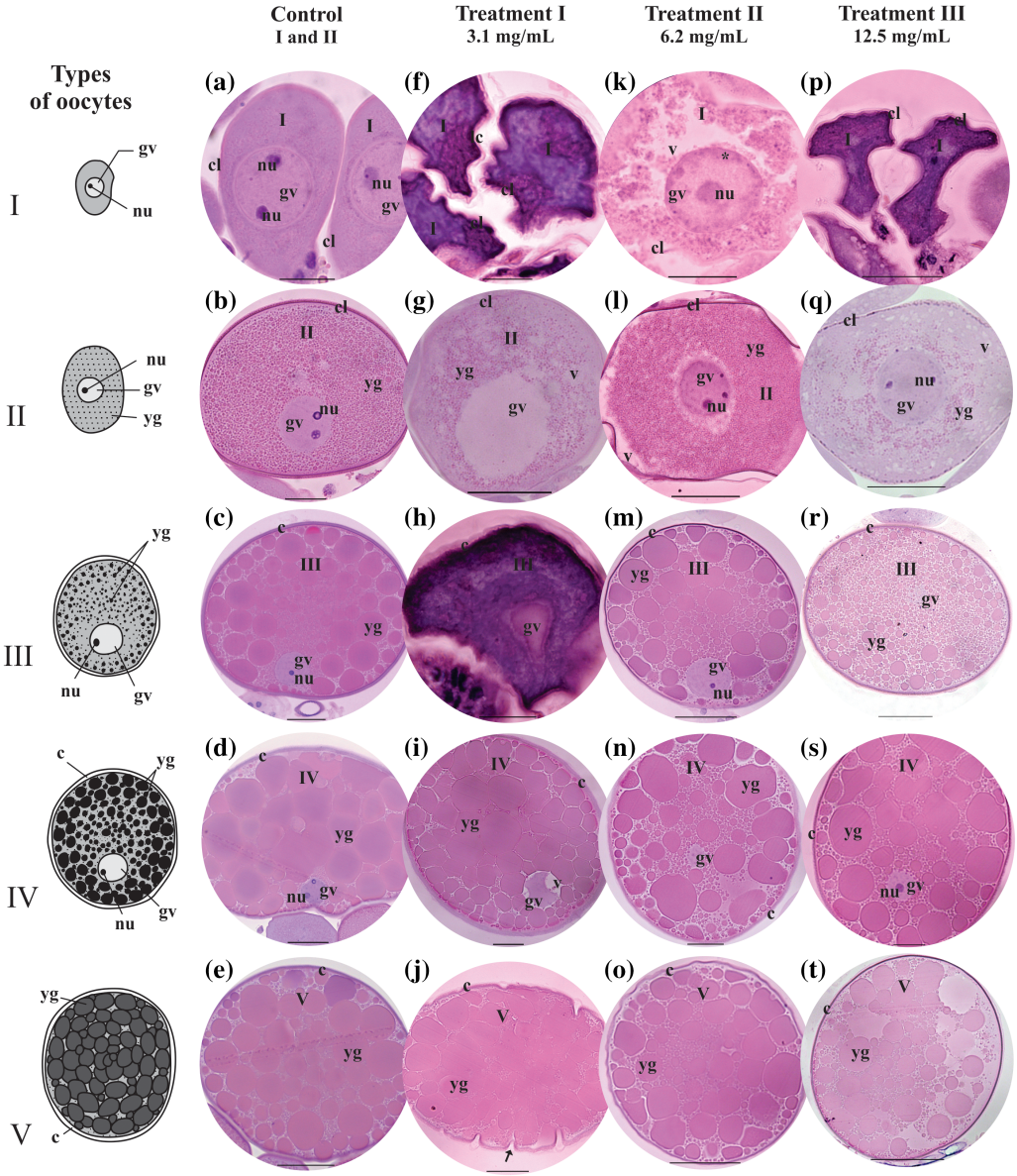


FIGURE 1 Schematic representation of the oocytes (adapted from Oliveira et al. 2005) and histological sections of the ovary from *Amblyomma cajennense* stained with hematoxylin and eosin (a–e) control groups I and II. (f–j) Females exposed to 3.1 mg/mL of the EEAO. (k–o) Females exposed to 6.2 mg/mL of the EEAO. (p–t) Females exposed to 12.5 mg/mL of the EEAO. I = oocyte I; II = oocyte II; III = oocyte III; IV = oocyte IV; V = oocyte V; c = chorion; yg = yolk granules; cl = cell limit; n = nucleus; nu = nucleolus; v = vacuole; gv = germ vesicle; * = chromatin marginalization; arrow = chorion folds. Bars = a–d; f–i; k–n; p–s = 50 μm; e; j; o; t = 100 μm [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

3.2 | Histochemistry

a. PAS reaction for the detection of neutral polysaccharides (Junqueira and Junqueira, 1983)

PAS histochemical test results are summarized in Table 1.

Control Groups I and II.

The use of PAS (periodic acid - Schiff) histochemical test revealed the presence of polysaccharides in the oocytes of the *A. cajennense* semi-engorged females. Oocytes I presented rare positive granulation and weakly positive cytoplasm to PAS (Figure 2a). However, oocytes II showed weakly positive cytoplasm with strongly positive fine granulation to PAS (Figure 2b). The germ vesicle of these oocytes (I and II) did not react to the test, whereas the plasma membrane (oocyte I) showed moderate positivity (Figure 2a,b). The cytoplasm of oocytes III was filled with yolk granules of varied sizes, the smaller ones located in the central region and strongly positive, while the larger ones, moderately positive for PAS, were found in the periphery of the cells, and (Figure 2c). The germ vesicle reacted negatively, and the chorion reacted moderately (Figure 2c).

In the oocytes IV, the cytoplasm showed large moderately positive granules and smaller strongly positive ones. The germ vesicle was negative to the technique and the chorion was moderately positive (Figure 2d). The oocytes V presented large yolk granules homogenously distributed in the cytoplasm and weakly positive for PAS (Figure 2e). These oocytes showed a moderately positive chorion; however, the germ vesicle was not observed (Figure 2e).

TABLE 1 Results of the PAS (periodic acid Schiff) histochemical test applied in the female reproductive system of *A. cajennense* s.s. for the detection of neutral polysaccharides

Types of oocytes	Oocyte region	Control I and II	Figure	Treatment I (3.1 mg/mL)	Figure	Treatment II (6.2 mg/mL)	Figure	Treatment III (12.5 mg/mL)	Figure
I	*Cell limit*	++	2a	++	2f	++	2k	++	2p
	Cytoplasm	+		+		–		–	
	Yolk granules	Ø		Ø		Ø		Ø	
	Germ vesicle	–		–		–		–	
	Nucleolus	++		++		++		++	
II	*Cell limit*	++	2b	++	2g	++	2l	++	2q
	Cytoplasm	+		+++		+++		+++	
	Yolk granules	++		++		+++		+++	
	Germ vesicle	–		–		–		–	
	Nucleolus	Ø		Ø		++		++	
III	*Chorion*	++	2c	++	2h	+++	2m	++	2r
	Cytoplasm	+++		+++		+++		+++	
	Yolk granules	+++		+++		+++		+++	
	Germ vesicle	–		–		–		–	
	Nucleolus	Ø		++		++		++	
IV	*Chorion*	++	2d	++	2i	+++	2n	++	2s
	Cytoplasm	+++		+++		+++		+++	
	Yolk granules	+++		+++		+++		+++	
	Germ vesicle	–		–		–		–	
	Nucleolus	++		Ø		Ø		Ø	
V	*Chorion*	+++	2e	+++	2j	+++	2o	+++	2t
	Cytoplasm	+++		+++		+++		+++	
	Yolk granules	++		++		+++		+++	
	Germ vesicle	Ø		Ø		Ø		Ø	
	Nucleolus	Ø		Ø		Ø		Ø	

+ weakly positive; **++** moderately positive; **+++** strongly positive; – negative; Ø region not observed.

Treatment I: Exposed to 3.1 mg/mL of EEAO.

When submitted to the PAS reaction, the *A. cajennense* semi-engorged females exposed to the *A. oleracea* ethanolic extract at the concentration of 3.1 mg/mL showed polysaccharides in the oocytes, and significant morphological alterations when compared to the control groups I and II. Oocytes I were unaffected by the treatment (Figure 2f). On the other hand, the oocytes II presented fine strongly positive granulation in the central region, in addition to a thickened and moderately positive plasma membrane (Figure 2g). In oocytes IV, the cytoplasm presented large and moderately positive bead granules of and smaller and strongly positive granules (Figure 2i). The oocytes III (Figure 2h) and V presented the same characteristics described in the control group (Figure 2j).

Treatment II: Exposed to 6.2 mg/mL of EEAO.

In the oocytes I, the cytoplasm did not react to PAS technique (Figure 2k). In oocytes II, there was a loss of yolk granules, mainly in the peripheral region of the cytoplasm and around the germ vesicle, which was strongly positive to the technique. The plasma membrane was irregular and moderately positive (Figure 2l). The oocytes III presented larger yolk granules in the periphery and smaller ones in the central region of the cytoplasm, both of strong positivity (Figure 2m). The oocytes IV presented strongly positive yolk granules, fewer in comparison with the control group (Figure 2n). The oocytes V showed strongly positive yolk granules, fewer in comparison with the control group (Figure 2o).

Treatment III: Exposed to 12.5 mg/mL of EEAO.

The female reproductive system of *A. cajennense* exposed to *A. oleracea* ethanolic extract at the concentration of 12.5 mg/mL showed polysaccharides in the oocytes when submitted to PAS technique. In the oocytes I, the germ vesicle and the cytoplasm did not react to PAS (Figure 2p). In the oocytes II, loss of yolk granules was observed, mainly in the peripheral region of the oocyte cytoplasm, which in turn was strongly positive for PAS. The plasma membrane was irregular and moderately positive (Figure 2q). The oocytes III

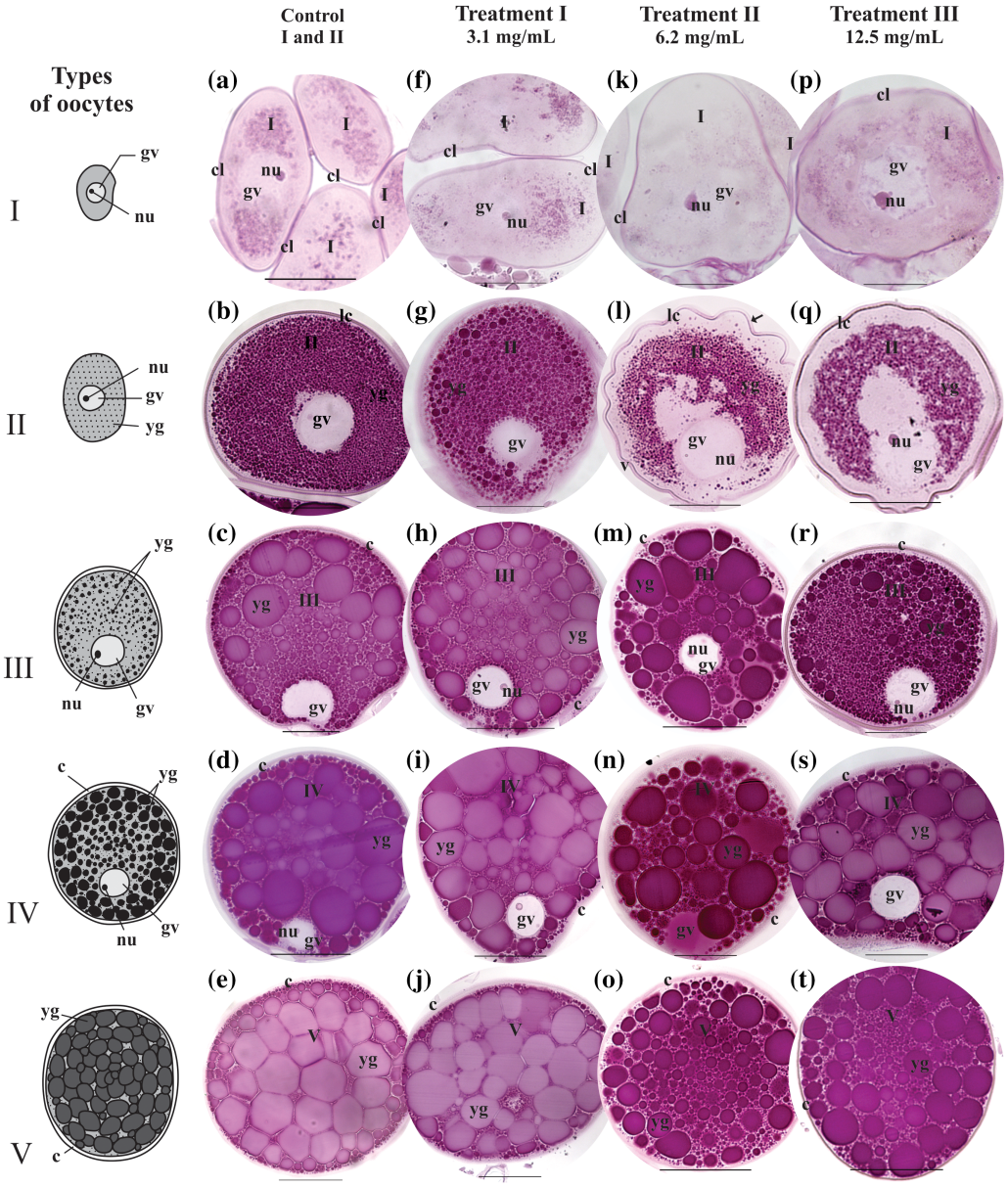


FIGURE 2 Schematic representation of the oocytes (adapted from Oliveira et al. 2005) and histological sections of the ovary from *Amblyomma cajennense* subjected to PAS reaction (periodic acid Schiff). (a–e) Control groups I and II. (f–j) Females exposed to 3.1 mg/mL of the EEAO. (k–o) Females exposed to 6.2 mg/mL do EEAO. (p–t) Females exposed to 12.5 mg/mL of the EEAO. I = oocyte I; II = oocyte II; III = oocyte III; IV = oocyte IV; V = oocyte V; c = chorion; yg = yolk granules; cl = cell limit; n = nucleus; nu = nucleolus; gv = germ vesicle. Bars = a–d; f–i; k–n; p–s = 50 μm; e; j; o; t = 100 μm [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

presented strongly positive yolk granules, smaller than those of the control group (Figure 2r). The oocytes IV showed the same characteristics described in the control groups (Figure 2s). The oocytes V showed strongly positive yolk granules, fewer in comparison with the control group (Figure 2t).

b. Bromophenol blue reaction for the detection of total protein (Pearse, 1985)

Bromophenol blue histochemical test results are summarized in Table 2.

Control Groups I and II.

The bromophenol blue reaction revealed a large amount of protein in the oocytes of the *A. cajennense* semi-engorged female ticks, characterized by an intense positive reaction in the yolk granules distributed throughout the cytoplasm. In the oocytes I, the cytoplasm and the germ vesicle were weakly positive to bromophenol blue, whereas the nucleolus was strongly positive (Figure 3a). The plasma membrane was weakly positive (Figure 3a). Oocytes II showed strongly positive yolk granules homogeneously distributed throughout the cytoplasm (Figure 3b). The germ vesicle was weakly positive to bromophenol blue, and the plasma membrane was moderately positive (Figure 3b). The oocytes III presented large and weakly positive yolk granules, located mainly in the central region of the cytoplasm, whereas granules of smaller size and high positivity were found in the peripheral region of the cytoplasm (Figure 3c). The germ vesicle, located at the pole facing the oocyte pedicel, was weakly reactive to the bromophenol blue, whereas the chorion showed moderate

TABLE 2 Results of the bromophenol blue histochemical test applied in the female reproductive system of *A. cajennense* s.s. for the detection of total protein

Types of oocytes	Oocyte region	Control I and II	Figure	Treatment I (3.1 mg/mL)	Figure	Treatment II (6.2 mg/mL)	Figure	Treatment III (12.5 mg/mL)	Figure
I	*Cell limit*	++	3a	++	3f	++	3k	++	3p
	Cytoplasm	+		+		+		+	
	Yolk granules	Ø		Ø		Ø		Ø	
	Germ vesicle	+		+		+		+	
	Nucleolus	+++		+++		+++		+++	
II	*Cell limit*	++	3b	++	3g	++	3l	++	3q
	Cytoplasm	+++		+++		+++		+++	
	Yolk granules	+++		+++		++		+++	
	Germ vesicle	+		+		+		+	
	Nucleolus	+++		+++		Ø		Ø	
III	*Chorion*	++	3c	++	3h	++	3m	++	3r
	Cytoplasm	++		++		++		++	
	Yolk granules	++		+++		++		++	
	Germ vesicle	+		+		+		+	
	Nucleolus	+++		Ø		Ø		Ø	
IV	*Chorion*	++	3d	++	3i	++	3n	++	3s
	Cytoplasm	++		++		++		++	
	Yolk granules	++		++		++		+	
	Germ vesicle	+		+		+			
	Nucleolus	Ø		+++		Ø		Ø	
V	*Chorion*	++	3e	++	3j	++	3o	++	3t
	Cytoplasm	++		++		++		++	
	Yolk granules	++		++		++		++	
	Germ vesicle	Ø		Ø		Ø		Ø	
	Nucleolus	Ø		Ø		Ø		Ø	

+ weakly positive; ++ moderately positive; +++ strongly positive; – negative; Ø region not observed.

positivity (Figure 3c). In the oocytes IV, large and weakly positive yolk granules were found in the central region of the cytoplasm, while small and moderately positive granules were observed in the peripheral region of the cytoplasm (Figure 3d). The germ vesicle, located at the pole facing the oocyte pedicel were weakly positive, and the chorion was moderately positive (Figure 3d). The oocytes V showed large and weakly positive yolk granules homogeneously distributed in the cytoplasm (Figure 3e). The germ vesicle was not observed and the chorion presented moderate positivity (Figure 3e).

Treatment I: Exposed to 3.1 mg/mL of EEAO.

When submitted to bromophenol blue reaction, the semi-engorged *A. cajennense* females exposed to *A. oleracea* ethanolic extract at the concentration of 3.1 mg/mL presented proteins in the oocytes, with significant morphological alterations when compared to the control groups I and II. The oocytes I presented a weakly positive cytoplasm, with vacuoles in the central region of the cytoplasm and around the germ vesicle (Figure 3f). In oocytes II, the yolk granules were strongly positive to bromophenol blue (Figure 3g). Differently from the control group, the large yolk grains located mainly in the peripheral region of the oocyte III showed moderate positivity to the reaction, whereas the small granules arranged in the middle portion of the oocyte showed high positivity (Figure 3h). The oocytes IV did not present alterations in comparison with the control group (Figure 3i). In oocytes V, large yolk granules showed moderate to intense positivity to bromophenol blue (Figure 3j).

Treatment II: Exposed to 6.2 mg/mL of EEAO.

The histochemical test to detect polysaccharides showed a large number of proteins in the oocytes of the individuals exposed to *A. oleracea* ethanolic extract at the concentration of 6.2 mg/mL. The cytoplasm of oocytes type I was moderately positive for this technique (Figure 3k). In oocytes II, there was loss of yolk granules, especially in the peripheral region of the cytoplasm, which was weakly positive to the technique (Figure 3l). Differently from the control group, the large yolk grains located mainly in the peripheral region of

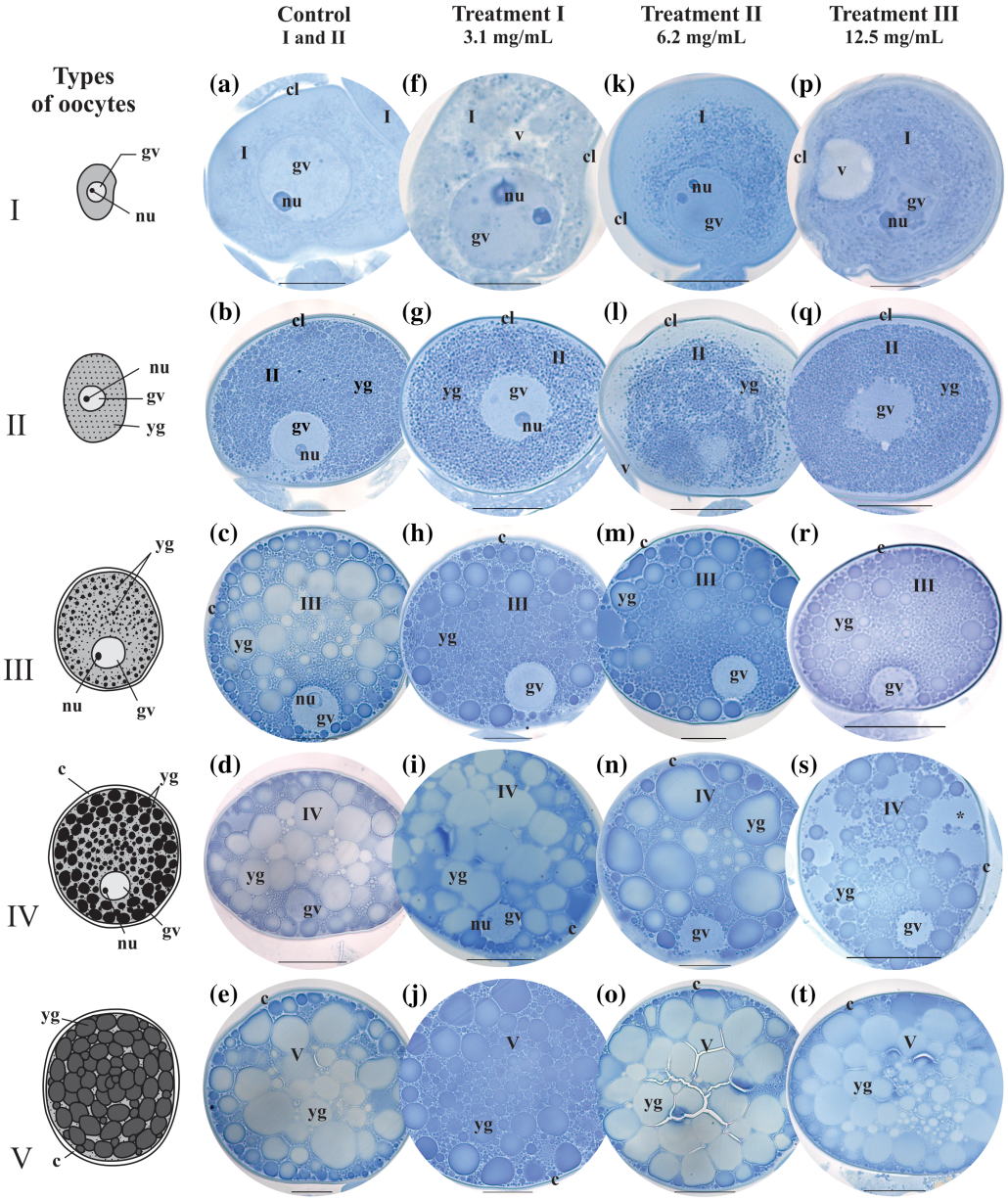


FIGURE 3 Schematic representation of the oocytes (adapted from Oliveira et al. 2005) and histological sections of the ovary from *Amblyomma cajennense* subjected to bromophenol blue. (a–e) Controls I and II. (f–j) Females exposed to 3.1 mg/mL do EEAO. (k–o) Females exposed to 6.2 mg/mL do EEAO. (p–t) Females exposed to 12.5 mg/mL do EEAO. I = oocyte I; II = oocyte II; III = oocyte III; IV = oocyte IV; V = oocyte V; c = chorion; yg = yolk granule; cl = cell limit; n = nucleus; nu = nucleolus; gv = germ vesicle; * = rupture of the yolk granules. Bars = a–d; f–i; k–n; p–s = 50 μm; e; j; o; t = 100 μm [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

the oocyte III showed moderate positivity to the reaction, whereas the small granules in the middle portion of the oocyte were strongly positive (Figure 3m). The oocytes IV showed moderately positive yolk granules for bromophenol blue (Figure 3n). However, the oocytes V (Figure 3o) presented no alterations when compared to the control groups.

Treatment III: Exposed to 12.5 mg/mL of EEAO.

The female reproductive system of *A. cajennense* exposed to *A. oleracea* ethanolic extract at the concentration of 12.5 mg/mL showed proteins in the oocytes when submitted to the bromophenol blue technique. The cytoplasm of the oocytes I presented a large cytoplasmic vacuole, 1yynon-reactive to the technique (Figure 3p). In oocytes II, loss of yolk pellets was observed, mainly in the peripheral region of the oocyte cytoplasm, which was strongly positive for bromophenol blue (Figure 3q). The oocytes III showed the characteristics described in the group treatment III (Figure 3r). In the oocytes IV, there was a fusion of large and weakly positive yolk granules, in addition to the presence of small yolk moderately positive granules (Figure 3s). The oocytes V did not present any morphological or histochemical alterations (Figure 3t).

4 | DISCUSSION

Ovaries of *Amblyomma cajennense* semi-engorged females ticks exposed to three concentrations (3.1, 6.2, and 12.5 mg/mL) of

A. oleracea ethanolic extract showed morphological and histochemical changes when compared to nontreated organs, mainly in the oocytes in initial developmental stages (I and II). This data corroborates studies by Oliveira et al. (2016) on semi-engorged *Rhipicephalus microplus* females exposed to the n-hexane extract of *A. oleracea*, Vendramini et al. (2012) on *R. sanguineus* exposed to andiroba oil (*Carapa guianensis*) and Remedio et al. (2015), who exposed the same species to neem oil (*Azadirachta indica*). Additionally, an important data obtained in this study was that the cytotoxic potential of the *A. oleracea* ethanolic extract was very similar to those observed by Oliveira et al. (2008, 2009) and Roma et al. (2010), who tested the synthetic acaricides fipronil and permethrin on *R. sanguineus*, respectively, signalizing the natural chemicals as a potential control strategy. This cytotoxic potential was demonstrated by alterations regarding the morphology of the germinative cells and yolk granules, presence, number, size, and location of vacuoles in the cytoplasm and nuclear alterations in the germinative cells.

In the individuals exposed to *A. oleracea* ethanolic extract, the oocytes in stages I and III from the treatment group I and those in stages I and II from the treatment groups II and III displayed cytoplasmic disorganization and significant vacuolation (regions that were negative to PAS and Bromophenol blue). Such alterations were also found by Roma et al. (2010) in the oocytes of *R. sanguineus* exposed to the synthetic chemical permethrin. This vacuolation could represent the recycling of cytoplasm portions damaged by the product action, allowing the cell to survive and maintain its viability (Carvalho & Recco-Pimentel, 2012; Junqueira & Carneiro, 2013). The cytoplasmic vacuoles emerged mainly in oocytes in initial stages of development, corroborating Vendramini et al. (2012) for *R. sanguineus* exposed to andiroba oil and by Oliveira et al. (2016) for *R. microplus* exposed to n-hexane extract from *A. oleracea*. This type of damage could be related to the fact that the chorion is not deposited in oocytes in initial developmental stages, and the chorion functions as a protective barrier that impedes/selects the entry and exit of elements in the cells, including the toxic product (Oliveira et al., 2016). According to Denardi et al. (2004), the chorion deposition would start in oocytes III and be completed in stage V, which means that oocytes I and II are more susceptible.

Still regarding the cytoplasm of the oocytes, alterations and disorganization of the yolk granules were observed in those in stages II to V in the individuals exposed to the concentration of 3.1 mg/mL. In the individuals exposed to the concentration of 6.2 mg/mL, a decrease in the yolk granules may be suggested; and in those exposed to the concentration of 12.5 mg/mL the granules also may be decreased; however, this alteration was more evident in the peripheral regions of oocytes III. These data are similar to those obtained by Oliveira et al. (2016), who studied the effects of *A. oleracea* extract on the reproductive system of *R. microplus* and concluded that alterations in the vitellogenesis can lead to a decrease in the yolk granules, and, consequently, to a deficit in the embryo nutrition, affecting the normal development of new individuals.

The oocytes of the individuals exposed to some of the concentrations applied herein showed fragmentation (in addition to vacuolation) of the germ vesicle. Such alteration had already been reported by Denardi et al. (2010), who studied the action of *Azadirachta indica* on the reproductive system of *R. sanguineus* females, and found that the germ cells start a death process when damaged, interrupting their development and, consequently, the production of new individuals. Therefore, this study confirms that the components of *A. oleracea* extract, even in low concentrations (3.1 and 6.2 mg/mL), would be able to cause alterations in the germ cells of *A. cajennense* ticks. Studies by Oliveira et al. (2009) on *R. sanguineus* ticks exposed to fipronil also demonstrated intense and severe morphological alterations in the germ vesicle of the oocytes exposed to the synthetic chemical product.

Moreover, the chorion was supposedly thicker in oocytes V from the individuals exposed to 3.1 mg/mL of the *A. oleracea* extract and in oocytes IV and V from the individuals exposed to 6.2 mg/mL. Such thickening would be a strategy of the cells to protect the oocyte content against the damages caused by the toxic substance, corroborating Denardi et al. (2004) and Oliveira et al. (2016).

In ixodid ticks, vitellogenin, the main constituent of the yolk, is synthesized in the fat body, released into the hemolymph and taken up by developing oocytes by endocytosis (Xavier et al., 2018). After this process, it is converted into vitellin, a lipoglycoprotein that will be used during embryogenesis (Xavier et al., 2018).

According to Denardi et al. (2004), the yolk would consist of lipids, proteins, and polysaccharides, deposited in the following order: the lipid is the first one to be synthesized, followed by proteins, and finally by carbohydrates. In this study, for the detection of the presence of polysaccharides and proteins in the ovaries of the semi-engorged females from control groups I and II and treatment groups I, II, and III histochemical techniques (PAS and Bromophenol blue, respectively) were used. In the oocytes in stage I of *A. cajennense*, the carbohydrates were not evidenced (weak reactivity to PAS). This fact points that the synthesis and/or incorporation of this element starts in oocytes in stage II, confirming results obtained by Denardi et al. (2004).

According to Ricardo et al. (2007), the production and absorption of carbohydrates would have the participation of pedicel cells and the hemolymph, being therefore exogenous, and would only begin in oocytes II. However, oocytes II of the individuals exposed to *A. oleracea* extract at concentrations of 6.2 and 12.5 mg/mL presented a decrease in carbohydrate deposition, when compared to those of the control group. These results are similar to those found by Sampieri et al. (2013), when studying the action of acid esters of castor oil (*Ricinus communis*) on *R. sanguineus* ticks. The authors suggested that these esters would have action on the hydrolysis of polysaccharides, which would delay the synthesis and incorporation of carbohydrates.

On the other hand, oocytes at stage V from ticks exposed to the concentrations of 6.2 and 12.5 mg/mL showed high positivity to the PAS reaction when compared to the control group. In ticks, oocytes at stages IV and V of development are at the end of vitellogenesis, which is when the deposition of carbohydrates is performed on a larger scale (Ricardo et al., 2007). Therefore, the high positivity for carbohydrates in oocytes V of the individuals exposed the concentrations of 6.2 and 12.5 mg/mL would be related with an increase in the production of these elements. The presence of *A. oleracea* toxic components probably led to a greater lysis of polysaccharide granules, which triggered a higher carbohydrate production (Sampieri et al., 2013).

Regarding the proteins, the cytoplasm of the oocytes I of the individuals exposed to *A. oleracea* ethanolic extract at the concentrations of 6.2 and 12.5 mg/mL was moderately positive to Bromophenol blue, whereas those of the control group were weakly positive. According to Oliveira et al. (2005), the synthesis and/or incorporation of proteins by early-stage oocytes is slow. Therefore, the extract would be stimulating the protein synthesis in oocytes I, which would be using the proteins to produce enzymes to neutralize the toxic action of the extract in an attempt to maintain the integrity and viability of the cell rather than performing the yolk composition (Roma, Furquim, Bechara, & Camargo-Mathias, 2011). Similar data were found by Roma et al. (2010), who studied the cytotoxic effects of permethrin on *R. sanguineus* oocytes.

Moreover, the extract caused a gradual reduction in the number of protein elements, especially in the oocytes II, III, and IV in the treatment groups I, II, and III. These modifications occurred due to the vacuolation in the interior of the cells, the decrease in the number and size of yolk granules and the decrease in affinity to the histochemical stain (in the cytoplasm, yolk granules, and membranes).

Such data indicate that the treatment with *A. oleracea* extract affected the synthesis and storage of polysaccharides and proteins in the germinative cells of the *R. sanguineus* females treated. Consequently, several components of the germinative cells would become fragile, deformed and the synthesis and storage of yolk would be compromised (quantitatively and qualitatively). As a result, the forming germinative cells would be so impaired that they would not be capable to originate a new individual.

In conclusion, the data obtained in this study confirmed the cytotoxic potential of *A. oleracea* ethanolic extract at the concentrations of 3.1, 6.2, and 12.5 mg/mL on the germ cells of *A. cajennense* female ticks, opening up the possibility to use this chemical as an efficient alternative to control these ectoparasites.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank São Paulo Research Foundation (FAPESP) Grant no. 2015/01496-5 and CAPES/Brazil for the financial support.

ORCID

Luís Adriano Anholeto https://orcid.org/0000-0001-8712-2630
Patrícia Rosa de Oliveira https://orcid.org/0000-0002-2695-2101
Rodney Alexandre Ferreira Rodrigues https://orcid.org/0000-0001-5631-0970
Maria Izabel Camargo-Mathias https://orcid.org/0000-0002-9418-8934

REFERENCES

Agnolin, C. A., Olivo, C. J., Leal, M. L. R., Beck, R. C. R., Meinerz, G. R., Parra, C. L. C., … Nicolodi, P. R. S. (2010). Eficácia do óleo de citronela [*Cymbopogon nardus* (L.) Rendle] no controle de ectoparasitas de bovinos. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, *12*(4), 482–487. https://doi.org/10.1590/S1516-05722010000400012

Anholeto, L. A., Oliveira, P. R., Rodrigues, R. A. F., Spindola, C. D. S., Labruna, M. B., Pizano, M. A., … Camargo-Mathias, M. I. (2017). Potential action of extract of *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen to control *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) ticks. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, *8*(1), 65–72. https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.09.018

Barbosa, A. F., Carvalho, M. G., Smith, R. E., & Sabaa-Srur, A. U. O. (2016). Spilanthol: Occurrence, extraction, chemistry and biological activities. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, *26*(1), 128–133. https://doi.org/10.1016/j.bjp.2015.07.024

Beati, L., Nava, S., Burkman, E. J., Barros-Battesti, D. M., Labruna, M. B., Guglielmone, A. A., … Faccini, J. L. H. (2013). *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae), the Cayenne tick: Phylogeography and evidence for allopatric speciation. *BMC Evolutionary Biology*, *13*(1), 267. https://doi.org/10.1186/1471-2148-13-267

Borges, L. M. F., Sousa, L. A. D., & Barbosa, C. S. (2011). Perspectives for the use of plant extracts to control the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*, *20*(2), 89–96.

Carvalho, H. F., & Recco-Pimentel, S. M. (2012). *A Célula (3ª)*. São Paulo: Editora Manole.

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. (2014). Acaricide activity in vitro of *Acmella oleracea* against *Rhipicephalus microplus*. *Parasitology Research*, *113*(10), 3697–3701. https://doi.org/10.1007/s00436-014-4034-2

Cheng, Y.-B., Liu, R., Ho, M.-C., Wu, T.-Y., Chen, C.-Y., Lo, I.-W., … Chang, F.-R. (2015). Alkylamides of *Acmella oleracea*. *Molecules*, *20*(4), 6970–6977. https://doi.org/10.3390/molecules20046970

Denardi, S. E., Bechara, G. H., Oliveira, P. R., & Camargo-Mathias, M. I. (2010). *Azadirachta indica* a. Juss (neem) induced morphological changes on oocytes of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) tick females. *Experimental Parasitology*, *126*(4), 462–470. https://doi.org/10.1016/j.exppara.2010.05.017

Denardi, S. E., Bechara, G. H., Oliveira, P. R. !de, Nunes, E. T., Saito, K. C., & Camargo-Mathias, M. I. (2004). Morphological characterization of the ovary and vitellogenesis dynamics in the tick *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology*, *125*(3–4), 379–395. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.07.015

Drummond, R. O., Ernst, S. E., Trevino, J. L., Gladney, W. J., & Graham, O. H. (1973). *Boophilus annulatus* and *B. microplus*: Laboratory tests of insecticides. *Journal of Economic Entomology*, *66*(1), 130–133.

Dubey, S., Maity, S., Singh, M., Saraf, S. A., & Saha, S. (2013). Phytochemistry, pharmacology and toxicology of *Spilanthes acmella*: A review. *Advances in Pharmacological Sciences*, *2013*(423750), 1–9. https://doi.org/10.1155/2013/423750

Estrada-Peña, A., & De La Fuente, J. (2014). The ecology of ticks and epidemiology of tick-borne viral diseases. *Antiviral Research*, *108*, 104–128. https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2014.05.016

Fabry, W., Okemo, P., & Ansorg, R. (1996). Fungistatic and fungicidal activity of east African medicinal plants. *Mycoses*, *39*(1–2), 67–70.

Favoreto, R., & Gilbert, B. (2010). Estado da Arte/state of the art - *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen (Asteraceae) – Jambu. *Revista Fitos*, *5*(1), 83–91.

Junqueira, L. C., & Carneiro, J. (2013). *Histologia Básica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

Junqueira, L. C. U., & Junqueira, L. M. M. S. (1983). *Técnicas básicas de citologia e histologia*. São Paulo: Livraria Editora Santos.

Labruna, M. B. (2009). Ecology of rickettsia in South America. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1166*, 156–166. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04516.x

Martinez, S. S. (2002). In S. S. Martinez (Ed.), *O Nim - Azadirachta indica: Natureza, usos múltiplos*. Londrina: IAPAR.

Martins, T. F., Barbieri, A. R. M., Costa, F. B., Terassini, F. A., Camargo, L. M. A., Peterka, C. R. L., … Labruna, M. B. (2016). Geographical distribution of *Amblyomma cajennense* (sensu lato) ticks (Parasitiformes: Ixodidae) in Brazil, with description of the nymph of *A. cajennense* (sensu stricto). *Parasites & Vectors*, *9*(1), 186. https://doi.org/10.1186/s13071-016-1460-2

Nigrinis, L. S. O. de, Caro, J. O., & Olarte, E. N. (1986). Estudio fitofarmacológico de la fraccion liposoluble de las flores de la *Spilanthes americana* (Mutis) parte I: Estudio fitoquimico. *Revista Colombiana de Ciências Químico-Farmacêuticas*, *15*, 37–47.

Nolan, J. (1985). Mechanisms of resistance to chemicals in arthropod parasites of veterinary importance. *Veterinary Parasitology*, *18*(2), 155–166. https://doi.org/10.1016/0304-4017(85)90064-0

Nomura, E. C. O., Rodrigues, M. R. A., Silva, C. F., Hamm, L. A., Nascimento, A. M., Souza, L. M., … de Werner, M. F. P. (2013). Antinociceptive effects of ethanolic extract from the flowers of *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, *150*(2), 583–589. https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.09.007

Oelrichs, P. B., Hill, M. W., Vallely, P. J., MacLeod, J. K., & Molinski, T. F. (1983). Toxic tetranortriterpenes of the fruit of *Melia azedarach*. *Phytochemistry*, *22*(2), 531–534. https://doi.org/10.1016/0031-9422(83)83039-8

Oliveira, P. R., Bechara, G. H., Marin-Morales, M. A., & Camargo-Mathias, M. I. (2009). Action of the chemical agent fipronil on the reproductive process of semi-engorged females of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). Ultrastructural evaluation of ovary cells. *Food and Chemical Toxicology*, *47*(6), 1255–1264. https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.02.019

Oliveira, P. R., Pizano, M. A., Remédio, R. N., Bechara, G. H., Abreu, R. M. M., … Camargo-Mathias, M. I. (2015). Potential of the chemical dinotefuran in the control of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) semi-engorged female ticks. *Experimental Parasitology*, *155*, 82–88. https://doi.org/10.1016/j.exppara.2015.04.021

Oliveira, P. R., Bechara, G. H., & Camargo-Mathias, M. I. (2008). Evaluation of cytotoxic effects of fipronil on ovaries of semi-engorged *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) tick female. *Food and Chemical Toxicology*, *46*(7), 2459–2465. https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.03.034

Oliveira, P. R., Bechara, G. H., Denardi, S. E., Nunes, E. T., & Camargo-Mathias, M. I. (2005). Morphological characterization of the ovary and oocytes vitellogenesis of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). *Experimental Parasitology*, *110*(2), 146–156. https://doi.org/10.1016/j.exppara.2004.12.016

Oliveira, P. R., Bechara, G. H., Denardi, S. E., Pizano, M. A., & Camargo-Mathias, M. I. (2011). Toxicity effect of the acaricide fipronil in semi-engorged females of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): Preliminary determination of the minimum lethal concentration and LC(50). *Experimental Parasitology*, *127*(2), 418–422. https://doi.org/10.1016/j.exppara.2010.09.009

Oliveira, P. R., Castro, K. N. d. C., Anholeto, L. A., & Camargo Mathias, M. I. (2016). Cytotoxic effects of extract of *Acmella oleracea* (Jambú) in *Rhipicephalus microplus* females ticks. *Microscopy Research and Technique*, *79*(8), 744–753. https://doi.org/10.1002/jemt.22693

Pearse, A. (1985). *Histochemistry theoretical and applied*. Churchill: Livingstone.

Pruett, J. H. (1999). Immunological control of arthropod ectoparasites - a review. *International Journal for Parasitology*, *29*(1), 25–32. https://doi.org/10.1016/S0020-7519(98)00172-6

Ramsewak, R. (1999). Bioactive N-isobutylamides from the flower buds of *Spilanthes acmella*. *Phytochemistry*, *51*(6), 729–732. https://doi.org/10.1016/S0031-9422(99)00101-6

Remedio, R. N., Nunes, P. H., Anholeto, L. A., Oliveira, P. R., & Camargo-Mathias, M. I. (2015). Morphological effects of neem (*Azadirachta indica* a. Juss) seed oil with known azadirachtin concentrations on the oocytes of semi-engorged *Rhipicephalus sanguineus* ticks (Acari: Ixodidae). *Parasitology Research*, *114*(2), 431–444. https://doi.org/10.1007/s00436-014-4200-6

Ricardo, A. J., Oliveira, P. R., Bechara, G. H., & Camargo-Mathias, M. I. (2007). Ultrastructural detection of proteins, lipids and carbohydrates in oocytes of *Amblyomma triste* (Koch, 1844) (Acari; Ixodidae) during the vitellogenesis process. *Tissue and Cell*, *39*(3), 203–215. https://doi.org/10.1016/J.TICE.2007.03.005

Roma, G. C., Furquim, K. C. S., Bechara, G. H., & Camargo-Mathias, M. I. (2010). Permethrin-induced morphological changes in oocytes of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) semi-engorged females. *Food and Chemical Toxicology*, *48*(3), 825–830. https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.12.016

Roma, G. C., Furquim, K. C. S., Bechara, G. H., & Camargo-Mathias, M. I. (2011). Cytotoxic effects of permethrin in oocytes of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) fully engorged females: I. direct or indirect action of the acaricide in germ cells? *Experimental and Applied Acarology*, *53*(3), 287–299. https://doi.org/10.1007/s10493-010-9401-9

Saito, K. C., Bechara, G. H., Nunes, E. T., Oliveira, P. R., Denardi, S. E., & Camargo-Mathias, M. I. (2005). Morphological, histological, and ultrastructural studies of the ovary of the cattle-tick *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology*, *129*(3–4), 299–311. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.09.020

Sampieri, B. R., Arnosti, A., Furquim, K. C. S., Chierice, G. O., Bechara, G. H., Carvalho, P. L. P. F., … Camargo-Mathias, M. I. (2013). Effect of ricinoleic acid esters from castor oil (*Ricinus communis*) on the oocyte yolk components of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology*, *191*(3–4), 315–322. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.09.013

Soares, H. S., Barbieri, A. R. M., Martins, T. F., Minervino, A. H. H., Lima, J. T. R., Marcili, A., … Labruna, M. B. (2015). Ticks and rickettsial infection in the wildlife of two regions of the Brazilian Amazon. *Experimental & Applied Acarology*, *65*(1), 125–140. https://doi.org/10.1007/s10493-014-9851-6

Sonenshine, D. E., & Roe, R. M. (2014). *Biology of ticks*. (D. E. Sonenshine & R. M. Roe, Eds.) (2ª). New York: Oxford University Press.

Tarragona, E. L., Cicuttin, G. L., Mangold, A. J., Mastropaolo, M., Nazarena De Salvo, M., & Nava, S. (2015). *Rickettsia* infection in *Amblyomma tonelliae*, a tick species from the *Amblyomma cajennense* complex. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, *6*(2), 173–177. https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2014.11.010

Torres, J. M., & Chávez, A. G. (2001). Alcamidas en plantas: distribución e importancia. *Avance y Perspectiva*, *20*(Noviembre-Diciembre), 377–387.

Vendramini, M. C. R., Camargo-Mathias, M. I., Faria, A. U., Bechara, G. H., Oliveira, P. R., & Roma, G. C. (2012). Cytotoxic effects of andiroba oil (*Carapa guianensis*) in reproductive system of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) semi-engorged females. *Parasitology Research*, *111*(5), 1885–1894. https://doi.org/10.1007/s00436-012-3031-6

Xavier, M. A., Tirloni, L., Pinto, A. F. M., Diedrich, J. K., Yates, J. R., Mulenga, A., … Termignoni, C. (2018). A proteomic insight into vitellogenesis during tick ovary maturation. *Scientific Reports*, *8*(1), 4698. https://doi.org/10.1038/s41598-018-23090-2

How to cite this article: Anholeto LA, de Oliveira PR, Rodrigues RAF, Yamane LT, Castro Karina Neoob de Carvalho, Camargo-Mathias MI. Morphological alterations in the ovaries of *Amblyomma cajennense* semi-engorged ticks exposed to ethanolic extract of *Acmella oleracea*. *Microsc Res Tech*. 2018; 81:1347–1357. https://doi.org/10.1002/jemt.23145

CAPÍTULO 6

PLANTA ECLÉTICA[6]

[6] **Luís Adriano Anholeto**; Patrícia Rosa de Oliveira; Rodney Alexandre Ferreira Rodrigues; Karina Neoob de Carvalho Castro; Maria Izabel Camargo-Mathias. Artigo de divulgação científica publicado na **Revista FAPESP** Edição 263 de Janeiro de 2018.

Planta eclética

O jambu, além da culinária, é utilizado em cosméticos e poderá ter uso na odontologia e como carrapaticida

Originário da região amazônica, o jambu (*Acmella oleracea*) é uma hortaliça muito utilizada na culinária do norte do Brasil, principalmente no Pará, em pratos famosos como o tacacá e o pato no tucupi. Além da alimentação, a planta é usada pelos povos indígenas e ribeirinhos como analgésico e anestésico para tratar aftas, herpes, dores de dente e garganta. Duas outras propriedades conhecidas dessa planta, a de fungicida e de combate a carrapatos, despertaram o interesse de alguns pesquisadores com o objetivo de desenvolver medicamentos.

A analgesia é a característica do jambu que atrai maior atenção, tanto nos apreciadores das iguarias, que sentem a dormência na boca durante a refeição, como nos pesquisadores. Já se sabe, desde os anos 1950, que os efeitos anestésicos e analgésicos são provocados pela substância espilantol, embora não existam medicamentos comerciais com essa base. São informações que fizeram o farmacêutico industrial Rodney Alexandre Ferreira Rodrigues, professor do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) e da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP), ambos da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), desenvolver um filme (película fina) odontológico em colaboração com a mestranda Verônica Santana de Freitas-Blanco.

"Nosso objetivo foi produzir um pré-anestésico de uso oral para o paciente suportar a dor da agulha na anestesia", explica Rodrigues. "Purificamos o extrato da planta e produzimos um filme para incorporar o produto. Hoje, o extrato também está em testes em nosso laboratório para o uso no combate à mucosite – inflamação nas partes internas da boca e da garganta, que é um efeito colateral em pacientes de quimioterapia."

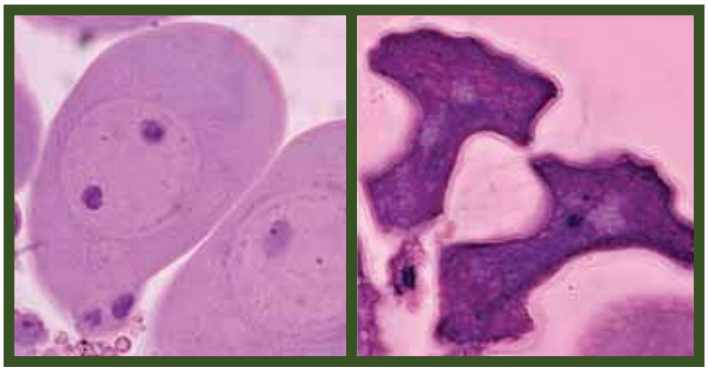
Rodrigues conta que seu grupo desenvolveu um processo para a obtenção do extrato de jambu com melhor aproveitamento do espilantol. De acordo com ele, o método, já com pedido de patente depositado no Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI), é mais simples e rápido do que os tradicionais, porque possui poucas etapas e utiliza reagentes atóxicos e mais baratos. "Outra vantagem é que nosso processo de purificação elimina pigmentos verdes da clorofila, que dão uma cor indesejada ao extrato, principalmente para uso cosmético", explica Rodrigues. "Essa coloração não é bem-aceita pelo mercado."

A Unicamp licenciou a patente do processo de extração do extrato de jambu para a empresa Brasil Aromáticos, de São Paulo, que pretende usá-lo em um futuro próximo. Hoje, a empresa compra no mercado, para uso em cosméticos, o quilo do extrato comum, sem purificação, por R$ 10 mil. "Licenciamos a patente e agora estamos verificando a possibilidade de fazer uma fábrica de extratos e incentivar a plantação de jambu aqui na região Sudeste", conta Raquel da Cruz, sócia-fundadora da Brasil Aromáticos. "Nossa estimativa é de que o preço do quilo fique em torno de R$ 3 mil." A empresa, que fatura R$ 2,5 milhões por ano e exporta seus produtos para vários países, utiliza o extrato de jambu em um lubrificante sexual.

CONTRA CARRAPATOS

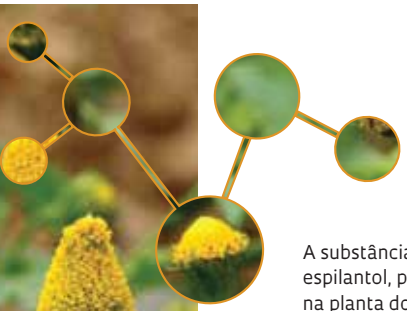
O processo de produção do extrato de jambu desenvolvido na Unicamp também está sendo usado para a elaboração de produtos acaricidas, capazes de con-

1



2

Imagens de microscopia mostram células germinativas (oócitos) em dois momentos: íntegras (*à esq.*) e irregulares depois de expostas ao extrato de jambu (*à dir.*)



A substância espilantol, presente na planta do jambu, tem efeitos anestésicos e analgésicos

trolar os carrapatos do boi, o *Rhipicephalus microplus*, e do cavalo, o *Amblyomma cajennense*, conhecido como carrapato-estrela. O estudo, iniciado em 2015, é do doutorando em ciências biológicas Luís Adriano Anholeto, da Universidade Estadual Paulista (Unesp) em Rio Claro, sob a orientação das professoras Maria Izabel Camargo-Matias e Patrícia Rosa de Oliveira.

Os resultados até agora obtidos por Anholeto demonstram que o extrato do jambu afeta as células germinativas dos carrapatos (tanto dos machos como das fêmeas), comprometendo a sua reprodução. Segundo ele, a partir da obtenção desse novo conhecimento, abre-se a possibilidade de futuramente ser criado um acaricida de origem vegetal. "A ideia é desenvolver um produto que cause menos danos aos animais e ao ambiente do que os disponíveis no mercado", explica Anholeto.

A pesquisadora da área de sanidade animal Karina Neoob de Carvalho Castro, da Embrapa Meio-Norte, uma unidade da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), localizada em Parnaíba (PI), também trabalha em conjunto com o grupo da Unesp e pretende desenvolver um repelente natural com jambu. Os estudos começaram em 2012 e são realizados em parceria com outras unidades da Embrapa e universidades. "Foi produzido um extrato com ação acaricida sobre fêmeas e larvas de carrapato em testes em laboratório", conta Karina. "Em 2014, mostramos que o extrato prejudica a reprodução de fêmeas de carrapato ingurgitadas – que estão prontas para fazer a postura de 3 mil ovos, em média – com uma eficácia de até 98,2%." Com isso, a Embrapa pretende desenvolver um repelente com jambu que possa ser utilizado em animais jovens, que são aqueles mais sensíveis aos produtos convencionais.

Sob a liderança da bióloga Ana Carolina Chagas, os pesquisadores vão avaliar a estabilidade de uma formulação nos animais, em análises toxicológicas e testes pré-clínicos. Karina ressalta que muitos produtos vindos da natureza, não sintéticos, necessitam de desenvolvimento de formulações que possam manter a vida útil do repelente em atividade nos animais. A parceria entre a Embrapa e universidades poderá render um repelente inédito produzido com recursos da biodiversidade da Amazônia. ■

Projetos

1. Desenvolvimento e avaliação de formulações tópicas contendo espilantol para uso no tratamento da mucosite oral (nº 14/16186-9); **Modalidade** Auxílio à pesquisa – Regular; **Pesquisador Responsável** Rodney Alexandre Ferreira Rodrigues (Unicamp); **Investimento** R$ 89.983,26.
2. O jambu (*Acmella oleracea*) e sua ação acaricida: I. Estudo dos efeitos sobre a morfofisiologia dos sistemas reprodutores masculino e feminino de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) (nº 01496-5); **Modalidade** Bolsa de Doutorado; **Pesquisadora Responsável** Maria Izabel Souza Camargo (Unesp); **Bolsista** Luís Adriano Anholeto; **Investimento** R$ 125.702,46.

Artigos científicos

FREITAS BLANCO, V. S., FRANZ-MONTAN, M. *et al.* Development and evaluation of a novel mucoadhesive film containing *acmella oleracea* extract for oral mucosa topical anesthesia. **PLOS ONE**. On-line. set. 2016.
CASTRO, K. N. C.; ANHOLETO, L. A. *et al.* Cytotoxic effects of extract of *acmella oleraceae* (Jambu) in rhipicephalus microplus females ticks. **Microscopy research and technique**. On-line. ago. 2016.

FOTOS **1** WIKIMEDIA COMMONS **2** LUÍS ADRIANO ANHOLETO / UNESP

CAPÍTULO 7

AÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO DE *Acmella oleracea* EM CARRAPATOS *Amblyomma cajennense* (ACARI: IXODIDAE): AVALIAÇÃO ULTRAESTRUTURAL DO SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO[7]

Resumo

No presente estudo avaliou-se ultraestruturalmente os efeitos de diferentes concentrações do extrato etanólico bruto das flores, folhas e caules de *Acmella oleracea* sobre o sistema reprodutor masculino carrapatos *Amblyomma cajennense.* Para tanto, foram utilizados 100 machos com pesos homogêneos (p> 0,05), os quais foram alocados em cinco grupos experimentais (10 animais/grupo): Controle 1 - foram expostos à água destilada; Controle 2 - ao solvente etanol 50% e DMSO 1%; Tratamentos 1 a 3 - às concentrações de: 6,2; 12,5 e 25 mg/mL do extrato, respectivamente, obtidas por diluição em etanol 50% e DMSO 1% (em duplicata). Os carrapatos foram imersos nas diferentes concentrações do extrato por cinco minutos, secos em papel absorvente e levados à incubadora BOD sob condições controladas por sete dias. Após esse período, foram dissecados para remoção do sistema reprodutor, que foram submetidos às técnicas de microscopia eletrônica de transmissão. Foi observado nos indivíduos dos grupos tratamento que o extrato provocou alterações significativas nas células secretoras do complexo de glândulas acessórias dos testículos, que incluíram mudanças na sua forma, desorganização e vacuolização citoplasmática, diminuição dos grânulos de secreção e presença de figuras mielínicas. Além disso, as espermátides maduras apresentaram desarranjo do citoesqueleto. Os dados aqui obtidos confirmaram o potencial citotóxico do extrato etanólico de *A. oleracea* sobre o sistema reprodutor masculino de carrapatos *A. cajennense*, vindo abrir a possibilidade do seu uso como alternativa eficiente e sustentável para o controle populacional dessa espécie.

Palavras-chave: controle químico, carrapato-estrela, citotoxicidade, microscopia eletrônica de transmissão, jambu.

[7] **Luís Adriano Anholeto**; Patrícia Rosa de Oliveira; Rodney Alexandre Ferreira Rodrigues; Karina Neoob de Carvalho Castro; Maria Izabel Camargo-Mathias. Artigo científico em elaboração.

1 INTRODUÇÃO

Carrapatos do complexo *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) são importantes artrópodes de relevância médica e veterinária por parasitarem diferentes hospedeiros, dentre eles os humanos. A relevância de sua importância no contexto atual reside ainda no fato de que estes ectoparasitas são também vetores potenciais da *Rickettsia rickettsii*, causadora da Febre Maculosa Brasileira ou Febre das Montanhas Rochosas (BEATI et al., 2013; GUEDES et al., 2005; LABRUNA, 2009; SOARES et al., 2015; TARRAGONA et al., 2015). Eles estão distribuídos por todo o continente americano e, especificamente no Brasil, a espécie *A. cajennense* pode ser encontrada na zona Norte ocidental da Bacia Amazônica, enquanto que *A. sculptum* nos estados do Sudeste, Centro-Oeste, Nordeste e Sul do Paraná (BEATI et al., 2013; ESTRADA-PEÑA et al., 2014; MARTINS et al., 2016).

Atualmente, o método de controle de carrapatos mais eficiente, além de ser o mais amplamente utilizado, é aquele que faz uso de acaricidas químicos de natureza sintética (CHAGAS et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2016a). Entretanto, o uso indiscriminado desses produtos pode induzir a seleção de indivíduos resistentes o que compromete a eficiência dos acaricidas, bem como sua toxicidade pode ser letal aos organismos não alvos. Além disso, seus resíduos se acumulam no ambiente, o que pode comprometer o solo, cursos d'água, a flora e a saúde animal, inclusive a humana (NOLAN, 1985; OLIVEIRA; BECHARA; CAMARGO-MATHIAS, 2008; PRUETT, 1999; ROMA et al., 2009).

Diante desse cenário, a busca por novas estratégias de controle tem sido uma constante. Dentre elas está a utilização de vacinas ou de acaricidas químicos de origem natural, geralmente com seus princípios ativos originados de extratos de plantas (CASTRO et al., 2014; DENARDI et al., 2010; REMEDIO et al., 2015; RODRÍGUEZ-MALLON, 2016; VENDRAMINI et al., 2012; YOU et al., 2003).

Acmella oleracea é uma planta da família Asteraceae, encontrada em regiões tropicais próximas à linha do Equador na África, Ásia e América do Sul. No Brasil ela é conhecida popularmente como jambu, sendo muito utilizada na culinária e na medicina popular como potente analgésico e anestésico local (BARBOSA et al., 2016; CHENG et al., 2015; FAVORETO; GILBERT, 2010; NOMURA et al., 2013). Estudos recentes mostraram que extratos das flores, folhas e caules de *A. oleracea* apresentaram atividades fungistática, fungicida e inseticida (BARBOSA et al., 2016;

DUBEY et al., 2013; FABRY; OKEMO; ANSORG, 1996; FAVORETO; GILBERT, 2010; NIGRINIS; CARO; OLARTE, 1986; RAMSEWAK, 1999; TORRES; CHÁVEZ, 2001).

Castro et al. (2014) e Oliveira et al. (2016) demostraram também que extratos hexânicos brutos das flores, folhas e caules de *A. oleracea* teriam atividade acaricida, provocando a ocorrência de alta taxa de mortalidade em larvas e em fêmeas ingurgitadas de carrapatos *Rhipicephalus microplus*, além de interferir na dinâmica do sistema reprodutor feminino, comprovado pela redução significativa da oviposição e eclosão dos ovos.

Anholeto et al. (2017a) verificaram em laboratório que em machos de *A. cajennense* expostos à concentração de 50 mg/mL do extrato etanólico bruto de *A. oleracea* houve 20% de mortalidade após um dia de tratamento, 60% após três dias e 70% após sete dias. Na maior concentração (100 mg/mL), a taxa de mortalidade foi de 100%, dado observado já após 24 horas de exposição, corroborando resultados obtidos com os químicos sintéticos permetrina e fipronil reconhecidamente eficazes para o controle de carrapatos. Além disso, Anholeto et al. (2017b) demostraram que machos dessa espécie quando expostos ao mesmo extrato, tiveram as células do complexo de glândulas acessórias do sistema reprodutor morfologicamente alteradas, o que fisiologicamente acarretaria na inibição da síntese e produção de substâncias para compor o fluido seminal, responsável por viabilizar a capacitação dos espermatozóides no trato genital feminino e pela formação do espermatóforo (que abrigará as espermátides maduras).

Diante deste cenário bastante promissor quanto ao uso de *A. oleracea* como acaricida, o presente trabalho teve por objetivo avaliar ultraestruturalmente os efeitos de diferentes concentrações (6,2; 12,5 e 25 mg/mL) (ANHOLETO et al., 2017a) do extrato etanólico de *A. oleracea* sobre o sistema reprodutor de machos de carrapatos *A. cajennense*, a fim de se estabelecer se este químico natural poderá num futuro próximo se tornar uma estratégia a ser utilizada no controle desses carrapatos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Locais de realização dos estudos

Para a realização do presente estudo foram utilizados os equipamentos disponíveis nas dependências dos Laboratórios de Histologia e de Microscopia Eletrônica do Departamento de Biologia do I.B. - UNESP de Rio Claro, SP. Nesta instituição está implantada e em pleno funcionamento a *Brazilian Central of Studies on Ticks Morphology* (BCSTM), onde colônias de carrapatos estão instaladas e são mantidas, sob a coordenação da Profa. Dra. Maria Izabel Camargo-Mathias.

Foram também utilizados os equipamentos disponíveis na Divisão de Química de Produtos Naturais do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas – CPQBA da UNICAMP, SP, sob a coordenação do Prof. Dr. Rodney Alexandre Ferreira Rodrigues, e àqueles disponíveis no Laboratório de Microscopia Eletrônica aplicada à Pesquisa Agropecuária (NAP/MEPA) da ESALQ/USP.

2.2 Extrato de *Acmella oleracea*

O extrato etanólico bruto das partes aéreas (flores, folhas e caules) de *A. oleracea* foi produzido no Laboratório de Química de Produtos Naturais do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil, sob a supervisão do Dr. Rodney Alexandre Ferreira Rodrigues.

2.2.1 Obtenção do material vegetal

O material vegetal foi semeado e cultivado no campo experimental do CPQBA/UNICAMP, localizado no município de Paulínia, SP, Brasil (coordenadas geográficas -22° 47' 52" S, -47° 6' 49"). As sementes foram gentilmente cedidas pela empresa Centroflora (Botucatu, SP, Brasil) e a coleta das partes aéreas (flores, folhas e caule) foi realizada no mês de abril de 2015. A planta foi identificada pelo Dr. John F. Pruski do *Missouri Botanical Garden (USA)* e a exsicata está depositada no Herbário do CPQBA/UNICAMP, Campinas, SP, Brasil, sob nº 181.452. Também foi

obtida autorização de acesso e de remessa de patrimônio genético (CGEN) sob nº 010577/2014-9. Além disso, o estudo está cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado – SisGen sob número A34093F.

2.2.2 Secagem e moagem do material vegetal

Depois de coletadas, as flores, folhas e caules de *A. oleracea* foram secas em estufa com ventilação forçada por 48h a 40º C até massa constante (RODRIGUES et al., 2006). A moagem deu-se em moinho de facas com peneira de 48 mesh – 0,297 mm. O material vegetal seco e moído foi armazenado em embalagem de papel craft com revestimento de polipropileno com fechamento simples e mantido em freezer - 20º C até a utilização.

2.2.3 Preparação do extrato etanólico bruto de *Acmella oleracea* (L.) R. L. Jansen

A extração foi realizada em etanol 96º GL (na proporção de 1:5, planta/solvente) à temperatura ambiente, em tanque de aço inox com agitação mecânica por uma hora e trinta minutos, ao final da qual o resíduo foi separado por filtração. Este processo foi repetido por mais duas vezes (RODRIGUES et al., 2006). Os extratos brutos obtidos foram filtrados, reunidos e concentrados sob vácuo em sistema de evaporação rotativo na temperatura de 40ºC. O extrato foi então liofilizado até massa constante, acondicionado em frasco âmbar e armazenado em freezer - 20º C até a utilização.

2.2.4 Monitoramento analítico do extrato

A presença do espilantol, componente majoritário das partes aéreas (flores, folhas e caules) de *A. oleracea* e do extrato etanólico bruto aqui utilizado, foi monitorada em cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas (GC-MS, Agilent® 5890 Series II mass selective detector Agilent® 5970 EI 70eV) equipado com uma coluna de sílica fundida WCOT, HP5-MS, Agilent®, dimensões 30m x 0.25 mm x 0.25 µm. As condições de análise foram: temperatura do injetor: 220º C; temperatura do detector: 250º C; programa de temperatura: 60-240º C (3º C/min),

injeção de amostra usando modo de divisão de proporção 1:40; gás Hélio foi utilizado como transportador a 0,7 bar, 1 mL/min.

2.3 Hospedeiros

Foram utilizados como hospedeiras coelhas adultas do Grupo Genético Botucatu com peso entre 3 a 3,5 Kg, sem contato prévio com carrapatos ou carrapaticidas, que foram adquiridas do Biotério da UNESP de Botucatu, SP, Brasil. Os animais foram mantidos em gaiolas e receberam água e ração comercial *ad libitum*. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UNESP de Rio Claro, SP, Brasil sob nº 11/2015.

2.4 Manutenção da colônia de carrapatos *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787)

Os carrapatos *A. cajennense* foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, USP, SP, Brasil. Os carrapatos adultos foram coletados da vegetação do Município de Governador Jorge Teixeira, Rondônia, região ocidental da Amazônia brasileira (coordenadas geográficas 10° 31' 00" S, 62° 38' 00" W) e mantidos em colônia. A identificação das espécies foi realizada por Martins et al. (2016).

Para o presente estudo foram utilizados machos de *A. cajennense* alimentados por 10 dias em coelhas hospedeiras e mantidos em estufa BOD sob condições controladas (28º ± 1°C, 85% de umidade e fotoperíodo de 12 h) em sala de Biotério do Departamento de Biologia, I.B, – UNESP, Rio Claro, SP, Brasil.

Para obtenção dos machos de carrapatos alimentados, foram realizadas infestações artificiais. Para esse procedimento, a região dorsal das coelhas foi tricotomizada e recebeu uma camada de cola atóxica para a fixação de câmara alimentadora, conforme metodologia descrita por Bechara et al. (1995). Em seguida, os carrapatos foram no interior dela liberados e, decorridas 24 horas da liberação (tempo necessário para a acomodação dos ectoparasitas), foram realizadas observações diárias a fim de se determinar o período de alimentação dos carrapatos.

2.5 Avaliação ultraestrutural do sistema reprodutor masculino de *Amblyomma cajennense* após a exposição ao extrato etanólico bruto de *Acmella oleracea* em concentrações subletais

2.5.1 Delineamento experimental

Para a avaliação ultraestrutural do sistema reprodutor dos machos alimentados de *A. cajennense* após a exposição ao extrato etanólico bruto de *A. oleracea* em concentrações subletais (concentrações menores que a CL_{50}), foi utilizado o Teste de Imersão de Adultos (DRUMMOND et al., 1973). As concentrações subletais foram determinadas por Anholeto et al. (2017a)

Machos alimentados com peso médio de 10 mg (cerca de 10 dias de alimentação em coelhas hospedeiras) (150 indivíduos) de *A. cajennense*, foram coletados de infestações artificiais de três coelhas hospedeiras (50 casais de carrapato/coelho). Antes do início dos testes, os carrapatos foram lavados em água corrente e depois, secos em papel absorvente macio.

Machos com pesos homogêneos ($p > 0,05$), foram alocados em cinco grupos experimentais de 10 carrapatos cada e expostos a concentrações subletais do extrato:

Machos alimentados:

Grupo Controle 1 - os carrapatos foram expostos à água destilada;

Grupo Controle 2 - foram expostos ao solvente etanol 50% e DMSO 1%;

Grupos Tratamento 1 a **3** - foram expostos às concentrações de 6,2; 12,5 e 25 mg/mL do extrato etanólico bruto das partes aéreas (flores, folhas e caules) de *A. oleracea*, respectivamente, obtidas por diluição em etanol 50% e DMSO 1%.

Em cada grupo experimental, os indivíduos foram imersos nas substâncias a serem testadas durante cinco minutos. Em seguida, foram secos em papel absorvente, colocados em placas de Petri identificadas e levadas à estufa BOD sob condições controladas (28 ± 1°C, 85% de umidade, com fotoperíodo de 12 horas) por sete dias, intervalo de tempo sugerido por Oliveira, Bechara e Camargo-Mathias (2008) em estudos com fêmeas de *R. sanguineus* submetidas ao fipronil, visto que a maioria dos efeitos dos acaricidas não são imediatos e as alterações morfológicas geralmente aparecem após esse período. Foram realizadas observações diárias e os

carrapatos foram estimulados com gás carbônico e com a ponta de um pincel por 30 minutos. Os indivíduos considerados mortos foram aqueles sem capacidade de movimento após dez minutos do estímulo e não foram utilizados para as análises ultraestruturais. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Após o teste de imersão, os machos de *A. cajennense* foram dissecados sob estereomicroscópio em placas de Petri contendo solução fisiológicas tamponada (NaCl 7,5 g/L, Na2HPO4 2,38 g/L e KH2PO4 2,72 g/L) para coleta do sistema reprodutor para posterior análise.

2.5.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Para a análise ultraestrutural, as amostras foram fixadas em glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7.2), durante 72 horas. Em seguida, foram realizadas duas lavagens em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, com duração de 15 minutos cada e, logo depois, foi realizada a pós-fixação em solução de tetróxido de ósmio (OsO_4) a 1%, durante duas horas. As amostras foram novamente lavadas em tampão cacodilato de sódio por duas vezes de 15 minutos e imersas em etanol aquoso a 10% por 15 minutos. O material foi contrastado em solução de acetato de uranila a 1%, dissolvido em álcool 10%, por 24 horas no escuro, sendo, em seguida, desidratado em série gradativa de acetona (de 50 a 100%). Posteriormente, o material foi embebido em resina Epon-Araldite mais acetona, na proporção de 1:1, por 24 horas, incluído em resina pura e levado à estufa por 72 horas, a 60ºC, para polimerização.

Secções ultrafinas obtidas em ultra micrótomo Leica Reichert Supernova foram depositadas sobre grades de cobre e contrastadas em acetato de uranila a 4%, durante 20 minutos, e citrato de chumbo por 10 minutos (REYNOLDS, 1963). O material foi observado e fotografado em microscópio eletrônico de transmissão JEOL JEM-1011 (MET, operando a uma voltagem de aceleração de 60kV), nas dependências do Laboratório de Microscopia Eletrônica aplicada à Pesquisa Agropecuária (NAP/MEPA) da ESALQ/USP, Piracicaba, SP.

3 RESULTADOS

3.1 Grupos Controle 1 e 2

O sistema reprodutor de machos de *A. cajennense* alimentados por 10 dias em coelhos hospedeiros (Grupos Controle I e II), apresentou as características típicas já descritas anteriormente por Sonenshine e Roe (2014) e Anholeto et al. (2015). As células secretoras do complexo de glândulas acessórias multilobuladas mostraram-se íntegras, com núcleo arredondado apresentando heterocromatina localizada na região periférica e eucromatina na porção central do mesmo (**Figura 10A**). O citoplasma, se mostrou homogêneo, com presença de retículo endoplasmático rugoso bem desenvolvido, além de grande quantidade de ribossomos livres (**Figura 10B**). Além disso, foram observados grânulos de secreção arredondados, sendo esses eletrondensos (**Figura 10B**).

Já nos testículos, foram observadas espermátides maduras, também chamadas de espermióforos ou prospermia, que apresentaram ultraestrutura preservada conforme já descrito por Feldman-Muhsam e Filshie (1976) (**Figuras 14A-B**).

3.2 Grupo Tratamento 1: exposição a 6,2 mg/mL do extrato

Os machos alocados nesse grupo de estudo quando expostos à concentração de 6,2 mg/mL do extrato etanólico bruto de *A. oleracea,* apresentaram alterações ultraestruturais no seu sistema reprodutor em comparação aos dados obtidos dos indivíduos dos grupos Controle I e II (**Figuras 11A-C**). O núcleo das células secretoras das glândulas acessórias apresentou morfologia alterada, visto terem passado de arredondado a irregular (**Figura 11A**). No citoplasma, foi possível notar a presença de grânulos de secreção eletrondensos de morfologia irregular (**Figuras 11A-B**). Além disso, vacúolos foram encontrados sobretudo ao redor dos grânulos de secreção (**Figuras 11B-C**). Em relação ao espermióforo, verificaram dobras na membrana plasmática e desarranjo do citoesqueleto (**Figuras 14C-D**).

3.3 Grupo Tratamento 2: exposição a 12,5 mg/mL do extrato

Neste grupo de tratamento, as alterações ultraestruturais foram mais acentuadas, sendo que os núcleos das células secretoras das glândulas acessórias apresentaram-se irregulares e com marginalização cromatínica (**Figura 12A**). Em relação ao citoplasma, foi possível observar grânulos de secreção menores quando comparados aos do grupo controle (**Figuras 12A-D**). Além disso, foram encontrados grânulos de secreção irregulares com conteúdo desorganizado, além de grânulos fragmentados e até mesmo vacuolizados (**Figuras 12A-D**), bem como regiões desorganizadas e eletronlúcidas, vacúolos autofágicos com organelas em seu interior (**Figuras 12A-D**) e figuras mielínicas (**Figura 12B**).

Em relação ao espermióforo, pode-se notar dobras na membrana plasmática, bem como desarranjo do citoesqueleto **(Figuras 14E-F**).

3.4 Grupo Tratamento 3: exposição a 25 mg/mL do extrato

Nesses machos houve alterações ultraestruturais severas no complexo de glândulas acessórias multilobuladas. Os núcleos das células secretoras mostraram morfologia irregular (**Figuras 13A-D**) e o citoplasma apresentou grânulos de secreção ainda menores quando comparados aos dos grupos controle e aos de tratamento anteriormente descritos (**Figuras 13A-F**). Além disso, no citoplasma foram observadas regiões desorganizadas e eletronlúcidas, grânulos de secreção irregulares com conteúdo desorganizado, grânulos fragmentados (**Figuras 13A-F**), grânulos com vacuolização ao seu redor (**Figuras 13A-F**) e vacúolos autofágicos com restos celulares em seu interior (**Figura 13B, E, F**). Em relação ao espermióforo, observou-se dobras na membrana plasmática, bem como desarranjo do citoesqueleto (**Figuras 14G**).

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

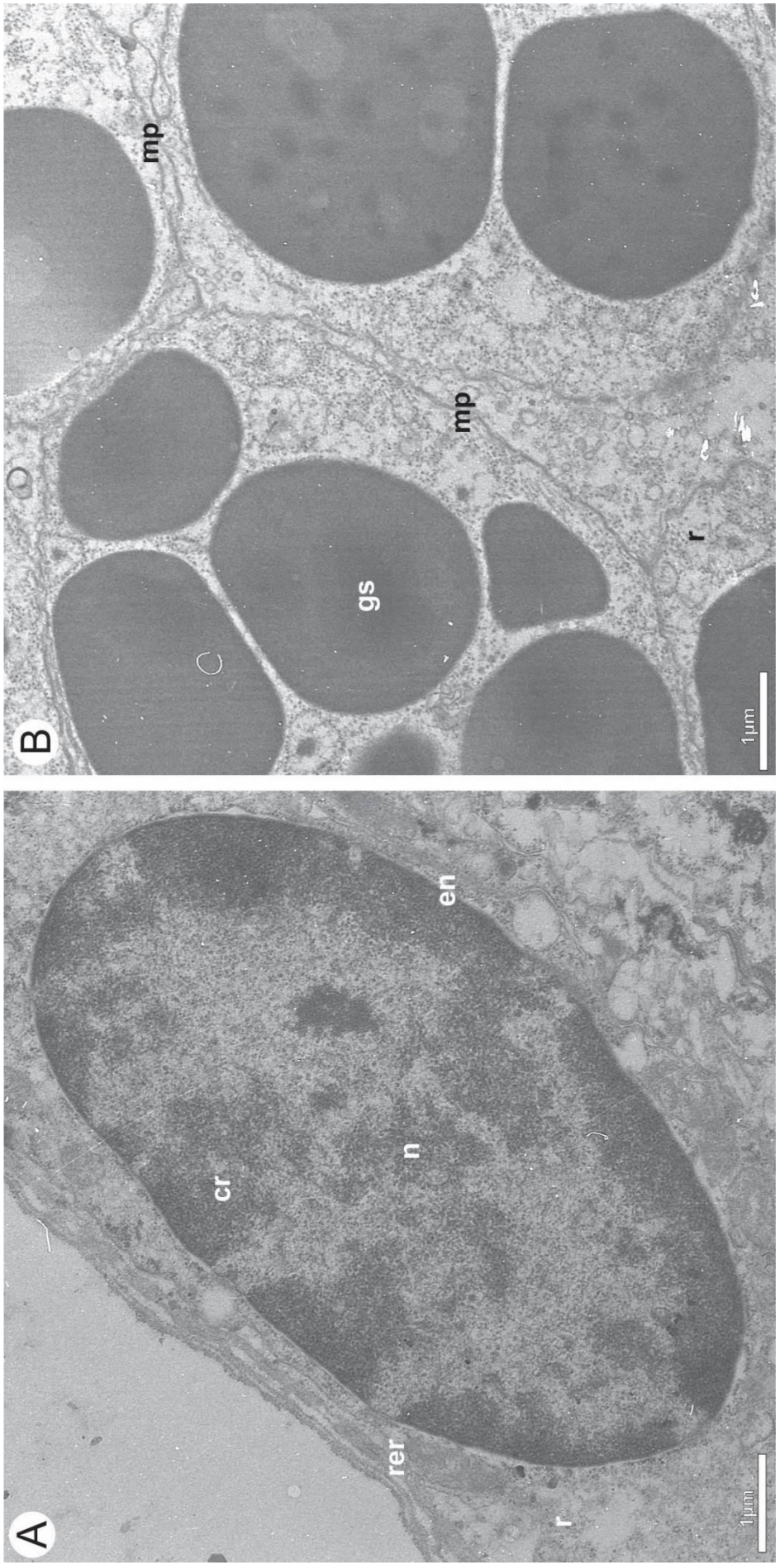

A
cr
n
en
rer
r
1µm
B
mp
gs
mp
r
1µm

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

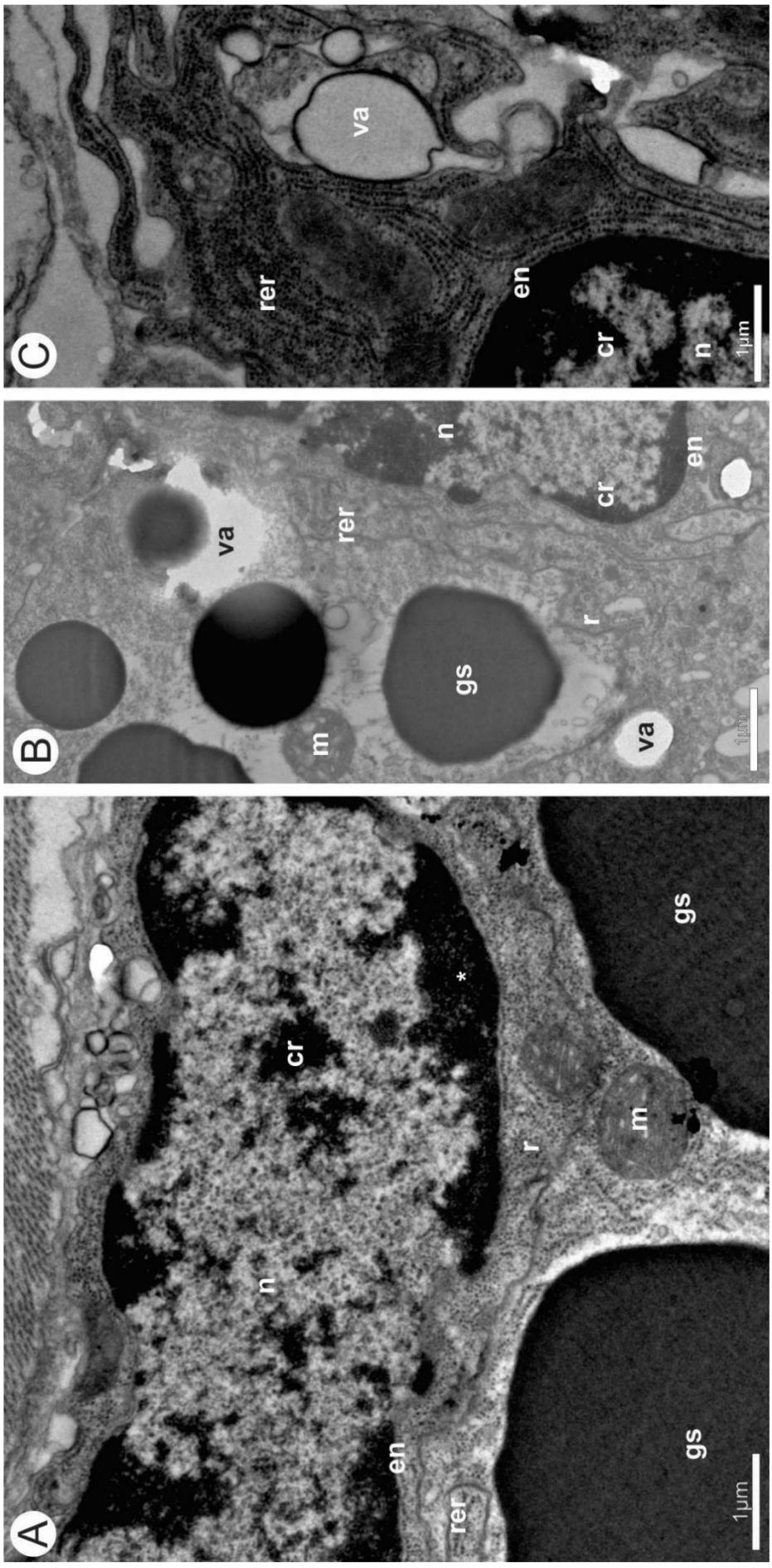

A
en
rer
n
cr
*
r
m
gs
gs
1µm
B
va
m
rer
n
gs
r
cr
en
va
1µm
C
rer
va
en
cr
n
1µm

Figura 12. Ultraestrutura do sistema reprodutor masculino de *Amblyomma cajennense* (Grupo Tratamento 2: exposição a 12,5 mg/mL do extrato etanólico de *Acmella oleracea*). **A-D.** Células secretoras do complexo de glândulas acessórias multilobuladas. **cr**= cromatina; **fm**= figura mielínica; **gs**= grânulos de secreção; **m**= mitocôndria; **n**= núcleo; **r**= ribossomos livres; **rer**: retículo endoplasmático rugoso; **va**= vacúolo autofágico; ***** = marginalização cromatínica. **Barras:** A= 2µm; B-D= 0,5 µm.

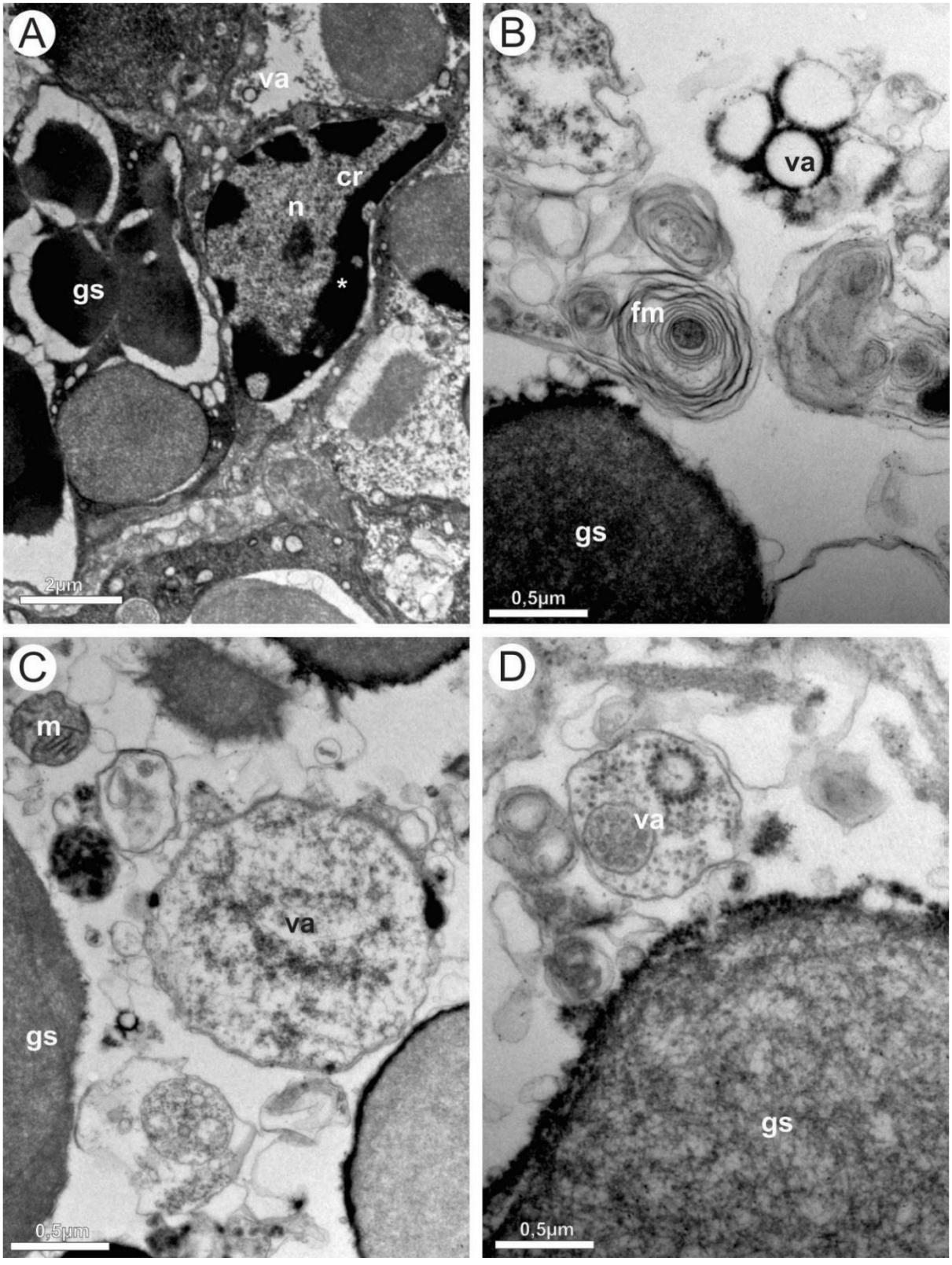

A
va
cr
n
gs
*
2µm
B
va
fm
gs
0,5µm
C
m
va
gs
0,5µm
D
va
gs
0,5µm

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

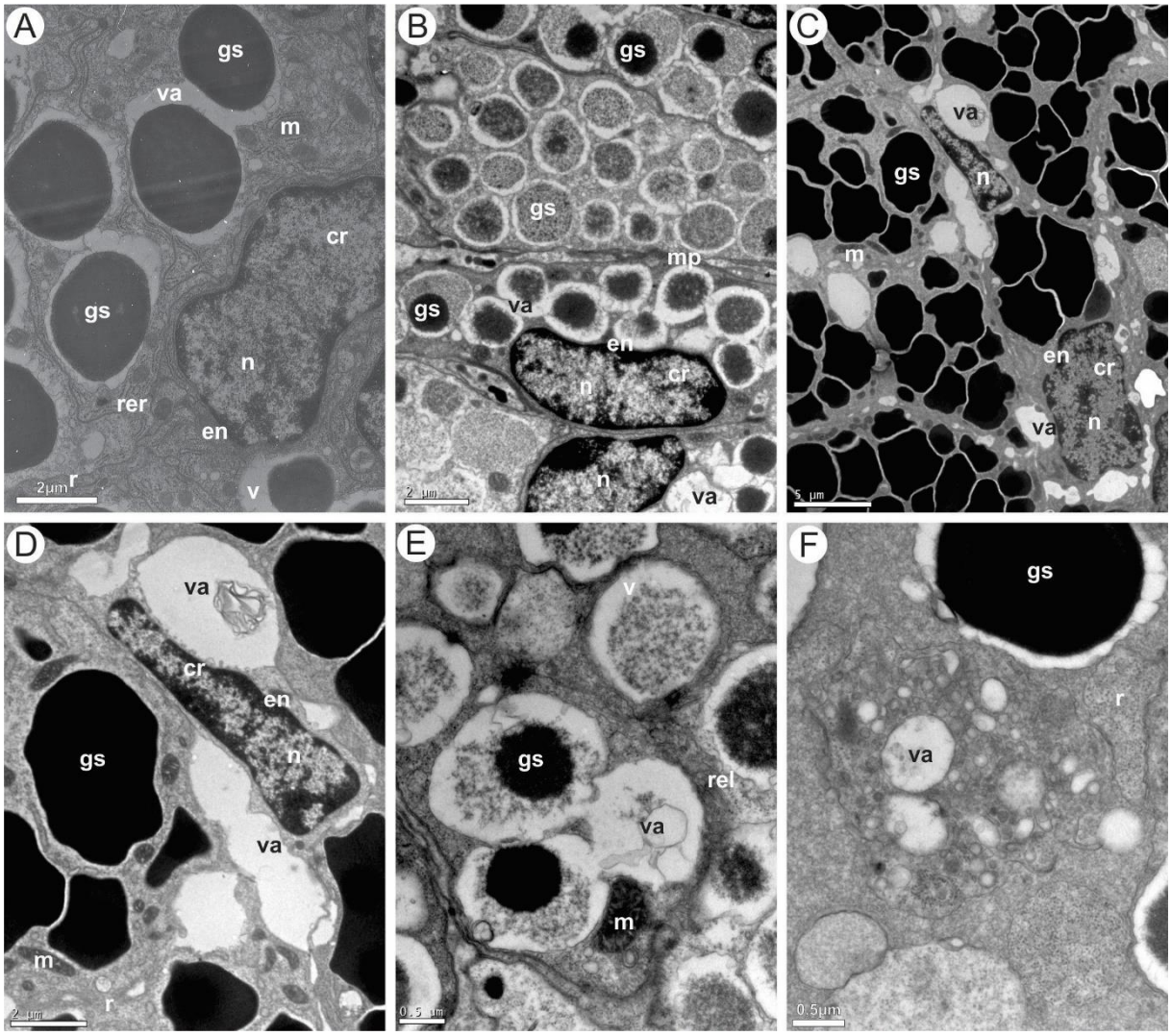
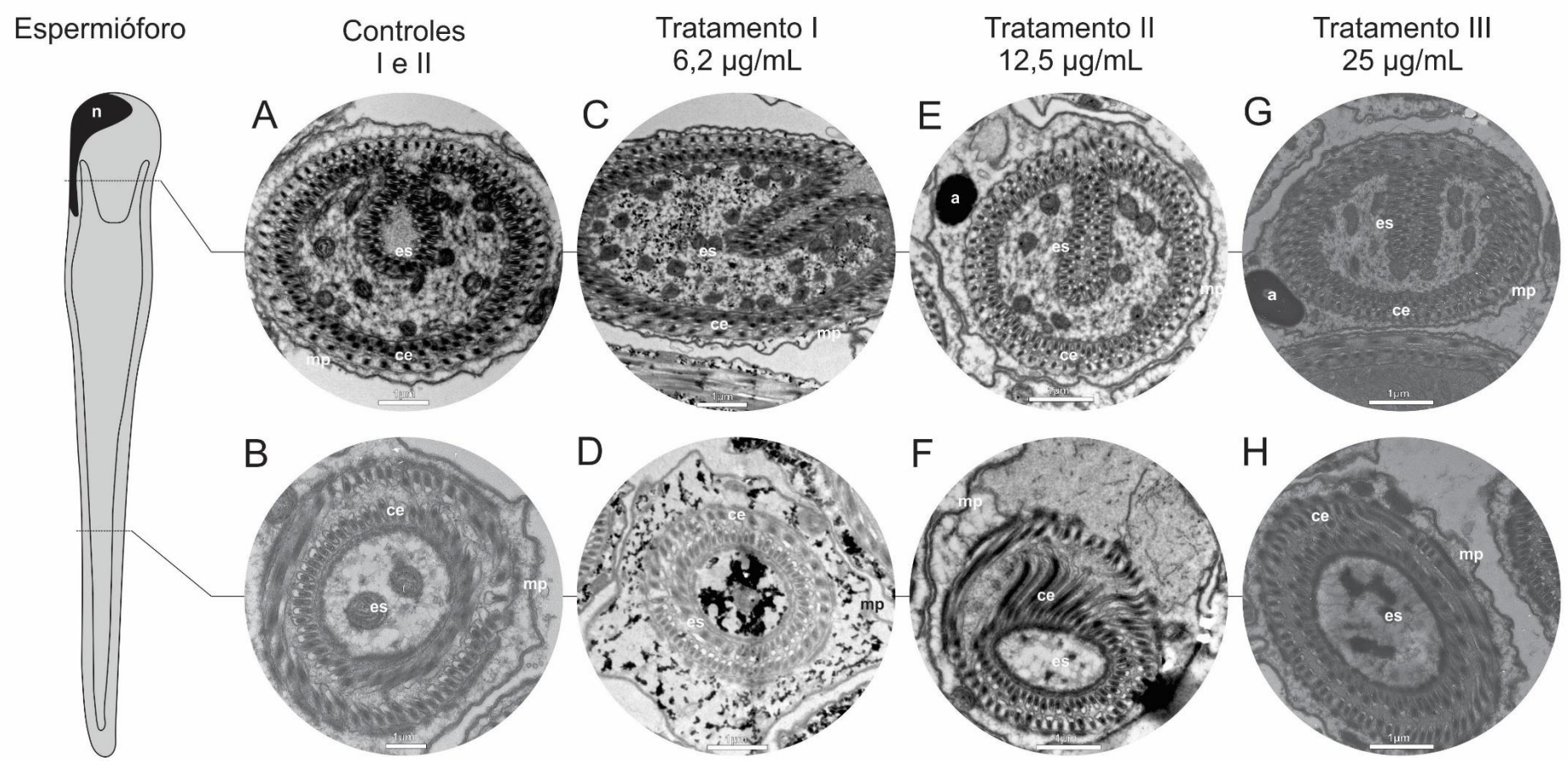

A
gs
va
m
cr
gs
n
rer
en
r
v
2µm
B
gs
gs
mp
gs
va
en
cr
n
n
va
2 µm
C
va
gs
n
m
en
cr
va
n
5 µm
D
va
cr
en
gs
n
va
m
r
2 µm
E
v
gs
rel
va
m
0.5 µm
F
gs
r
va
0.5µm

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


Espermióforo
Controles
I e II
Tratamento I
6,2 µg/mL
Tratamento II
12,5 µg/mL
Tratamento III
25 µg/mL
n
A
B
C
D
E
F
G
H
es
ce
mp
a
1µm

4 DISCUSSÃO

Segundo Anholeto et al. (2015) e Sampieri et al. (2015b), o sistema reprodutor masculino dos carrapatos *A. cajennense* é composto por um par de testículos tubulares responsáveis pela produção e maturação das células germinativas até o estágio de espermátides e por um complexo de glândulas acessórias multilobuladas responsável pela produção e secreção do fluído espermático e pela síntese do espermatóforo. Os dados ultraestruturais aqui obtidos para a mesma espécie nos indivíduos dos grupos Controles I e II confirmaram aqueles de Sampieri et al. (2015b)

Segundo Sonenshine e Roe (2014), o desenvolvimento morfológico das espermátides dos carrapatos da família Ixodidae ocorre basicamente em duas etapas: a espermatogênese, caracterizada pela sequência de divisões mitóticas e meióticas das espermatogônias e dos espermatócitos, originando as espermátides; e a espermiogênese, etapa final do desenvolvimento (diferenciação) das espermátides e que resultarão nos espermatozóides. A espermatogênese na maioria dos Ixodidae tem início no final do estágio de ninfa e é concluída logo após a ecdise do estágio de ninfa para o adulto (OLIVEIRA et al., 2012). Porém, esta dinâmica não é regra, visto que para algumas espécies a espermatogênese só é concluída quando o macho, depois de atingir o estágio adulto, inicia o processo de alimentação, caso de *Dermacentor variabilis* (SONENSHINE; ROE, 2014). A espermiogênese ocorre em etapas que são dependentes de outros processos fisiológicos, tais como o avanço da alimentação do adulto, bem como a produção do espermatóforo e da síntese das secreções ejaculatórias (FELDMAN-MUHSAM; BORUT, 1978, 1983; REGER, 1961, 1974; SONENSHINE; ROE, 2014). No presente estudo, o estágio celular mais avançado da espermiogênese foi a espermátide madura, que segundo Sampieri et al. (2015b) é a espermátide V, com morfologia alongada (REGER, 1961, 1974; SAMPIERI et al., 2015b). Outros trabalhos já desenvolvidos com o sistema reprodutor masculino de carrapatos postularam que as células germinativas em processo de desenvolvimento (espermatogênese e espermiogênese) seriam mais sensíveis às alterações fisiológicas do animal, incluindo a exposição dos indivíduos às substâncias com comprovado potencial tóxico (SAMPIERI et al., 2015a). Aqui pode-se sugerir que as concentrações de 6,2; 12,5 e 25 mg/mL do extrato etanólico de *A. oleracea* foram suficientes para provocar danos nas espermátides, danos representados por dobras na membrana plasmática e desorganização dos elementos do citoesqueleto,

resultados semelhantes aqueles obtidos por Montasser e Amin (2005) quando analisaram ultraestruturalmente os testículos de *Argas persicus* expostos à ivermectina, lactona macrocíclica, na dose de 400 µg/Kg do hospedeiro, onde foi observado o rompimento da membrana plasmática e das organelas das espermátides.

Já em relação às células secretoras do complexo de glândulas acessórias do sistema reprodutor de *A. cajennense*, indivíduos expostos às concentrações de 6,2; 12,5 e 25 mg/mL do extrato etanólico bruto das partes aéreas (folhas, flores e caules) de *A. oleracea*, respectivamente, apresentaram alterações ultraestruturais significativas. Essas células apresentaram regiões do citoplasma desorganizadas e eletronlúcidas, além da presença de vacúolos autofágicos abrigando organelas no seu interior, provavelmente já desativadas, as quais passariam posteriormente pelo processo de digestão intracelular. Sugere-se que tais alterações ultraestruturais poderiam provocar a diminuição de síntese e de armazenamento dos grânulos de secreção que iriam compor o fluído espermático e o espermatóforo (SAMPIERI et al., 2015b; SONENSHINE; ROE, 2014), corroborando dados obtidos por Sampieri et al. (2015a), quando estudaram a ação de ésteres do ácido ricinoleico do óleo de rícino, sobre carrapatos *A. cajennense* s.l. Esses mesmos autores registraram a presença de significativa vacuolização citoplasmática nas células secretoras das glândulas acessórias dos indivíduos expostos à maior concentração do produto acaricida. A presença de intensa vacuolização citoplasmática em células de indivíduos que foram expostos a agente tóxicos, provavelmente isolaria organelas ou porções do citoplasma já danificadas pelos mesmos, o que de certa forma permitiria que a célula ainda conseguisse sobreviver e se manter biologicamente viável (CARVALHO; RECCO-PIMENTEL, 2012; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017).

Outra alteração que estaria confirmando a ocorrência de sérios danos às células do complexo de glândulas acessórias, no caso dos indivíduos expostos ao extrato, seria a presença significativa de figuras mielínicas (estruturas membranosas derivadas da autodigestão celular) no citoplasma. Estas também já foram reportadas por Oliveira et al. (2009) em ovócitos de fêmeas de carrapatos *R. sanguineus* expostas ao fipronil. Além disso, Remedio et al. (2015) quando estudaram a ação do óleo de neem (*Azadirachta indica* A. Juss) em concentrações conhecidas de azadiractina (200, 400 e 600 ppm) sobre o sistema reprodutor feminino de *R. sanguineus,* encontraram resultados semelhantes.

Além da intensa vacuolização citoplasmática das células do complexo de glândulas acessórias, os grânulos de secreção por elas produzidos estavam: a) menores, irregulares e com conteúdo desorganizado, b) fragmentados e c) até mesmo vacuolizados, sinalizando possível queda na síntese e na secreção de polissacarídeos, glicoproteínas, lipoproteínas, glicosaminoglicanos, elementos estes que compõem o fluido seminal. Isso provavelmente implicaria num prejuízo ao processo de capacitação dos espermatozóides no trato genital da fêmea, inclusive inibindo a formação do espermatóforo (envoltório das espermátides maduras) (GARCIA-FERNANDEZ; GARCIA; GARCIA, 1998; SONENSHINE; ROE, 2014). Essas alterações trariam consequências diretas para o processo de fecundação das fêmeas do carrapato, visto que a transferência do esperma e das espermátides do trato masculino para o feminino dar-se-ia por meio do espermatóforo (ANHOLETO et al., 2015; SAMPIERI et al., 2015b; SONENSHINE; ROE, 2014). Estudos realizados por Oliver and Brinton (1972) com carrapatos *Dermacentor variabilis* e *Ornithodoros moubata* mostraram que a capacitação das espermátides no trato feminino seria ativada por um polipeptídio produzido pelas glândulas acessórias dos machos. Lomas and Kaufman (1992) em seus estudos observaram em *A. hebraeum* a presença de um fator químico também produzido nestas glândulas dos machos, que depois de liberados no fluído seminal teriam ação sobre o processo de degeneração das glândulas salivares das fêmeas dessa mesma espécie. Os mesmos autores sugeriram ainda que outros fatores químicos produzidos no trato masculino influenciariam na fase de ingurgitamento das fêmeas, porém a natureza química desses fatores ainda continua pouco esclarecida. Portanto, a alteração da ultraestrutura do complexo glandular do sistema reprodutor dos machos traria por consequência alterações no processo de síntese e secreção e consequentemente alteraria os processos de fecundação e de reprodução dos carrapatos (SAMPIERI et al., 2015a).

De maneira geral, os resultados aqui apresentados deixaram claro que o extrato etanólico de *A. oleracea* nas concentrações de 6,2; 12,5 e 25 mg/mL teria ação tóxica e provocaria danos na ultraestrutura do complexo de glândulas acessórias dos testículos de carrapatos *A. cajennense*, dados esses que o elegem como uma alternativa acaricida para o controle de carrapatos *A. cajennense*, visto seu potencial de inibir a produção e a secreção dos fluidos seminais, bem como de modificar a ultraestrutura das espermátides maduras, consequentemente comprometendo o processo de reprodução dessa espécie. Esses achados vêm abrir a possibilidade do

uso do extrato etanólico obtido a partir das flores, folhas e caule de *A. oleracea*, como uma estratégia de controle mais vantajosa se comparada àquelas oferecidas pelos químicos sintéticos.

5 AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (processo nº 2015/01496-5) e CAPES/Brasil pelo suporte financeiro. Ao Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna pela colaboração. À Sra. Monika Iamonte e aos Srs. Gerson de Melo Souza e Antônio Teruyoshi Yabuki pelo apoio técnico.

REFERÊNCIAS

ABBAS, R. Z.; ZAMAN, M. A.; COLWELL, D. D.; GILLEARD, J.; IQBAL, Z. Acaricide resistance in cattle ticks and approaches to its management: the state of play. **Veterinary Parasitology**, v. 203, n. 1–2, p. 6–20, 2014.

ANHOLETO, L. A.; NUNES, P. H.; REMÉDIO, R. N.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Testes of fed and unfed *Amblyomma cajennense* ticks (Acari: Ixodidae). First morphological data. **Acta Zoologica**, v. 96, n. 3, p. 375–382, 2015.

ANHOLETO, L. A.; OLIVEIRA, P. R.; RODRIGUES, R. A. F.; SPINDOLA, C. S.; LABRUNA, M. B.; PIZANO, M. A.; CASTRO, K. N. C.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Potential action of extract of *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen to control *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) ticks. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 8, n. 1, p. 65–72, 2017a.

ANHOLETO, L. A.; OLIVEIRA, P. R.; RODRIGUES, R. A. F.; YAMANE, L. T.; CASTRO, K. N. C.; FERREIRA, A. R. F.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Toxic action of *Acmella oleracea* extract on the male reproductive system of *Amblyomma cajennense* ticks. **Veterinary Parasitology**, v. 244, p. 164–171, 2017b.

BARBOSA, A. F.; CARVALHO, M. G.; SMITH, R. E.; SABAA-SRUR, A. U. O. Spilanthol: occurrence, extraction, chemistry and biological activities. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, n. 1, p. 128–133. 2016.

BEATI, L.; NAVA, S.; BURKMAN, E. J.; BARROS-BATTESTI, D. M.; LABRUNA, M. B.; GUGLIELMONE, A. A; CÁCERES, A. G.; GUZMÁN-CORNEJO, C. M.; LEÓN, R.; DURDEN, L. A; FACCINI, J. L. H. *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae), the Cayenne tick: phylogeography and evidence for allopatric speciation. **BMC Evolutionary Biology**, v. 13, n. 1, p. 267, 2013.

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

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

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

CARVALHO, H. F.; RECCO-PIMENTEL, S. M. **A Célula**. 3ª ed. São Paulo: Editora Manole, 2012.

CASTRO, K. N. C.; LIMA, D. F.; VASCONCELOS, L. C.; LEITE, J. R. S. A.; SANTOS, R. C.; PAZ NETO, A. A.; COSTA-JÚNIOR, L. M. Acaricide activity *in vitro* of *Acmella oleracea* against *Rhipicephalus microplus.* **Parasitology Research**, v. 113, n. 10, p. 3697–701, 2014.

CHAGAS, A. C. S.; GEORGETTI, C. S.; CARVALHO, C. O.; OLIVEIRA, M. C. S.; RODRIGUES, R. A.; FOGLIO, M. A.; MAGALHÃES, P. M. *In vitro* activity of *Artemisia annua* L (Asteraceae) extracts against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 1, p. 31–35, 2011.

CHENG, Y.; LIU, R.; HO, M.; WU, T.; CHEN, C.; LO, I.; HOU, M.; YUAN, S.; WU, Y.; CHANG, F. Alkylamides of *Acmella oleracea*. **Molecules**, v. 20, n. 4, p. 6970–6977, 2015.

CRAMPTON, A.; BAXTER, G.; BARKER, S. Identification and characterisation of a cytochrome P450 gene and processed pseudogene from an arachnid: the cattle tick, *Boophilus microplus.* **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 29, n. 4, p. 377–384, 1999.

DENARDI, S. E.; BECHARA, G. H.; OLIVEIRA, P. R.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. *Azadirachta indica* A. Juss (neem) induced morphological changes on oocytes of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) tick females. **Experimental Parasitology**, v. 126, n. 4, p. 462–70, 2010.

DRUMMOND, R. O.; ERNST, S. E.; TREVINO, J. L.; GLADNEY, W. J.; GRAHAM, O. H. *Boophilus annulatus* and *B. microplus*: laboratory tests of insecticides. **Journal of Economic Entomology**, v. 66, n. 1, p. 130–3, fev. 1973.

DUBEY, S.; MAITY, S.; SINGH, M.; SARAF, S. A.; SAHA, S. Phytochemistry, pharmacology and toxicology of *Spilanthes acmella*: A Review. **Advances in Pharmacological Sciences**, v. 2013, p. 423750, 2013.

ESTRADA-PEÑA, A.; TARRAGONA, E. L.; VESCO, U.; MENEGHI, D.; MASTROPAOLO, M.; MANGOLD, A. J.; GUGLIELMONE, A. A.; NAVA, S. Divergent environmental preferences and areas of sympatry of tick species in the *Amblyomma cajennense* complex (Ixodidae). **International Journal for Parasitology**, v. 44, n. 14, p. 1081–9, 2014.

FABRY, W.; OKEMO, P.; ANSORG, R. Fungistatic and fungicidal activity of east African medicinal plants. **Mycoses**, v. 39, n. 1–2, p. 67–70, 1996.

FAVORETO, R.; GILBERT, B. Estado da Arte/State of the Art - *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen (Asteraceae) – Jambu. **Revista Fitos**, v. 5, n. 1, p. 83–91, 2010.

FELDMAN-MUHSAM, B.; BORUT, S. Further observations on spermatophore formation in argasid ticks. **Journal of Insect Physiology**, v. 24, n. 10–11, p. 693–697, 1978.

FELDMAN-MUHSAM, B.; BORUT, S. On the spermatophore of ixodid ticks. **Journal of Insect Physiology**, v. 29, n. 5, p. 449–457, 1983.

FELDMAN-MUHSAM, B.; FILSHIE, B. K. Scanning and transmission electron microscopy of the spermiophores of *Ornithodoros ticks*: an attempt to explain their motility. **Tissue & Cell**, v. 8, n. 3, p. 411–9, 1976.

GARCIA-FERNANDEZ, C.; GARCIA, S. M. L.; GARCIA, R. N. The male genital accessory gland complex of the cattle tick *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 58, n. 3, p. 453–462, 1998.

GUEDES, E.; LEITE, R. C.; PRATA, M. C.; PACHECO, R. C.; WALKER, D. H.; LABRUNA, M. B. Detection of *Rickettsia rickettsii* in the tick *Amblyomma cajennense* in a new Brazilian spotted fever-endemic area in the state of Minas Gerais. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 8, p. 841–845, 2005.

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

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

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

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

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

MONTASSER, A. A.; GADELHAK, G. G. G.; TARIQ, S. Impact of ivermectin on the ultrastructure of the testis of *Argas (Persicargas) persicus* (Ixodoidea: Argasidae). **Experimental & Applied Acarology**, v. 36, n. 1–2, p. 119–29, 2005.

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

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

NOMURA, E. C. O.; RODRIGUES, M. R. A.; DA SILVA, C. F.; HAMM, L. A.; NASCIMENTO, A. M.; DE SOUZA, L. M.; CIPRIANI, T. R.; BAGGIO, C. H.; WERNER, M. F. DE P. Antinociceptive effects of ethanolic extract from the flowers of

Acmella oleracea (L.) R.K. Jansen in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 150, n. 2, p. 583–589, 2013.

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

OLIVEIRA, P. R.; BECHARA, G. H.; MARIN-MORALES, M. A.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Action of the chemical agent fipronil on the reproductive process of semi-engorged females of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). Ultrastructural evaluation of ovary cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 6, p. 1255–1264, 2009.

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

OLIVEIRA, P. R.; CALLIGARIS, I. B.; ROMA, G. C.; BECHARA, G. H.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Morphological characterization of the nymphs *Rhipicephalus sanguineus* ticks (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). Description of the testes, integument, Malpighian tubules, and midgut on the detachment day. **Microscopy Research and Technique**, v. 75, n. 6, p. 727–36, 2012.

OLIVEIRA, P. R.; CASTRO, K. N. C.; ANHOLETO, L. A.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Cytotoxic effects of extract of *Acmella oleracea* (Jambú) in *Rhipicephalus microplus* females ticks. **Microscopy Research and Technique**, v. 79, n. 8, p. 744–53, 2016b.

OLIVEIRA, P. R.; ANHOLETO, L. A.; RODRIGUES, R. A. F.; BECHARA, G. H.; CASTRO, K. N. C.; CAMARGO MATHIAS, M. I. The potential of *Acmella oleracea* (Jambu) extract in the control of semi-engorged *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) female ticks. **International Journal of Acarology**, v. 44, n. 4–5, p. 192–197, 2018.

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

OLIVER, J. H.; BRINTON, L. P. Cytogenetics of ticks (Acari: Ixodoidea). 7. Spermatogenesis in the Pacific Coast tick, *Dermacentor occidentalis* Marx (Ixodidae). **The Journal of Parasitology**, v. 58, n. 2, p. 365–79, 1972.

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

RAMSEWAK, R. Bioactive N-isobutylamides from the flower buds of *Spilanthes acmella*. **Phytochemistry**, v. 51, n. 6, p. 729–732, 1999.

REGER, J. F. The fine structure of spermatids from the tick, *Amblyomma dissimili*. **Journal of Ultrastructure Research**, v. 5, n. 6, p. 584–599, 1961.

REGER, J. F. The origin and fine structure of cellular processes in spermatozoa of the tick *Dermacentor andersoni*. **Journal of Ultrastructure Research**, v. 48, n. 3, p.

420–434, 1974.

REMEDIO, R. N.; NUNES, P. H.; ANHOLETO, L. A.; OLIVEIRA, P. R.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Morphological effects of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) seed oil with known azadirachtin concentrations on the oocytes of semi-engorged *Rhipicephalus sanguineus* ticks (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v. 114, n. 2, p. 431–44, 2015.

REYNOLDS, E. S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. **The Journal of Cell Biology**, v. 17, n. 1, p. 208–12, 1963.

RIBEIRO, V. L. S.; AVANCINI, C.; GONÇALVES, K.; TOIGO, E.; VON POSER, G. Acaricidal activity of *Calea serrata* (Asteraceae) on *Boophilus microplus* and *Rhipicephalus sanguineus*. **Veterinary Parasitology**, v. 151, n. 2–4, p. 351–4, 2008.

RODRIGUES, R. A. F.; FOGLIO, M. A.; BOAVENTURA JÚNIOR, S.; SANTOS, A. S.; REHDER, V. L. G. Otimização do processo de extração e isolamento do antimalárico artemisinina a partir de *Artemisia annua* L. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 368–372, 2006.

RODRÍGUEZ-MALLON, A. Developing anti-tick vaccines. **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, v. 1404, p. 243–59, 2016.

ROMA, G. C.; OLIVEIRA, P. R.; PIZANO, M. A.; CAMARGO MATHIAS, M. I. Determination of LC(50) of permethrin acaricide in semi-engorged females of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). **Experimental Parasitology**, v. 123, n. 3, p. 269–72, nov. 2009.

SAMPIERI; FURQUIM, K.; CARVALHO, P.; BUENO, O.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Ricinoleic acid esters from castor oil modifying male reproductive system of *Amblyomma cajennense* (Fabricius 1787). **Emergent Life Sciences Research**, v. 1, n. 1, p. 26–37, 2015a.

SAMPIERI, B. R. B. R.; MOREIRA, J. C. S. C. S.; PÁEZ, F. A. R. A. R.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. I. Comparative morphology of the reproductive system and germ cells of *Amblyomma* ticks (Acari : Ixodidae): A contribution to Ixodidae systematics. **Journal of Microscopy and Ultrastructure**, v. 4, n. 2, p. 95–107, 2015b.

SOARES, H. S.; BARBIERI, A. R. M.; MARTINS, T. F.; MINERVINO, A. H. H.; LIMA, J. T. R.; MARCILI, A.; GENNARI, S. M.; LABRUNA, M. B. Ticks and rickettsial infection in the wildlife of two regions of the Brazilian Amazon. **Experimental & Applied Acarology**, v. 65, n. 1, p. 125–40, 2015.

SONENSHINE, D. E.; ROE, R. M. **Biology of ticks**. 2ª ed. United States of America: Oxford University Press, 2014.

TARRAGONA, E. L.; CICUTTIN, G. L.; MANGOLD, A. J.; MASTROPAOLO, M.; NAZARENA DE SALVO, M.; NAVA, S. *Rickettsia* infection in *Amblyomma tonelliae*, a tick species from the *Amblyomma cajennense* complex. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 6, n. 2, p. 173–177, 2015.

TORRES, J. M.; CHÁVEZ, A. G. Alcamidas en plantas: distribución e importancia. **Avance y Perspectiva**, v. 20, n. Noviembre-Diciembre, p. 377–387, 2001.

VENDRAMINI, M. C. R.; CAMARGO-MATHIAS, M. I.; FARIA, A. U.; BECHARA, G. H.; OLIVEIRA, P. R.; ROMA, G. C. Cytotoxic effects of andiroba oil (*Carapa*

guianensis) in reproductive system of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) semi-engorged females. **Parasitology Research**, v. 111, n. 5, p. 1885–1894, 2012.

YOU, M.; XUAN, X.; TSUJI, N.; KAMIO, T.; TAYLOR, D.; SUZUKI, N.; FUJISAKI, K. Identification and molecular characterization of a chitinase from the hard tick *Haemaphysalis longicornis.* **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 10, p. 8556–63, 2003.

CAPÍTULO 8

AVALIAÇÃO ULTRAESTRUTURAL DO SISTEMA REPRODUTOR FEMININO DE CARRAPATOS *Amblyomma cajennense* (ACARI: IXODIDAE) EXPOSTOS AO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO DE *Acmella oleracea*[8]

Resumo

O presente estudo analisou os efeitos de diferentes concentrações do extrato etanólico bruto de *Acmella oleracea* (Jambu) sobre o desenvolvimento das células germinativas de fêmeas semi-ingurgitadas de carrapatos *Amblyomma cajennense*, por meio da análise ultraestrutural, a fim de se avaliar se este químico natural poderá num futuro próximo ser uma estratégia para a realização do controle destes importantes ectoparasitas. Foram utilizadas 150 fêmeas semi-ingurgitadas com pesos homogêneos (p> 0,05), as quais foram alocadas em cinco grupos experimentais (10 animais/grupo): Controle 1 – foram expostas à água destilada; Controle 2 – foram expostas ao solvente etanol 50% e DMSO 1%; Tratamentos 1 a 3 – foram expostas às concentrações de: 3,1; 6,2 e 12,5 mg/mL do extrato, respectivamente, obtidas por diluição em etanol 50% e DMSO 1% (em triplicata). As fêmeas foram imersas nas diferentes concentrações do extrato por cinco minutos, secas em papel absorvente e levadas à incubadora BOD sob condições controladas por sete dias. Após esse período, foram dissecadas para remoção do sistema reprodutor, que foram submetidos às técnicas de microscopia eletrônica de transmissão. Foi observado nos indivíduos dos grupos tratamento que o extrato provocou alterações significativas nos ovócitos, as quais incluíram mudanças na forma da célula, desorganização e vacuolização citoplasmática, diminuição dos grânulos de vitelo e modificações nas mitocôndrias. Essas alterações foram mais intensas nos ovócitos em estágios iniciais de desenvolvimento (I e II). Os dados aqui obtidos confirmaram o potencial citotóxico do extrato etanólico de *A. oleracea* sobre as células germinativas femininas de carrapatos *A. cajennense*, vindo abrir a possibilidade do seu uso como alternativa eficiente e sustentável para o controle populacional dessa espécie.

Palavras-chave: carrapato-estrela, citotoxicidade, microscopia eletrônica de transmissão, jambu.

[8] **Luís Adriano Anholeto**; Patrícia Rosa de Oliveira; Rodney Alexandre Ferreira Rodrigues; Karina Neoob de Carvalho Castro; Maria Izabel Camargo-Mathias. Artigo científico em elaboração.

1 INTRODUÇÃO

Os carrapatos do complexo *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) têm grande importância médica e veterinária por terem diferentes hospedeiros dentre os quais se incluem os humanos. Somando-se a isso, esses ectoparasitas são também vetores potenciais da *Rickettsia rickettsii*, causadora da Febre Maculosa Brasileira ou Febre das Montanhas Rochosas (BEATI et al., 2013; GUEDES et al., 2005; LABRUNA, 2009; SOARES et al., 2015; TARRAGONA et al., 2015). Estão distribuídos por todo o continente americano e, especificamente no Brasil, a espécie *A. cajennense* s.s. está distribuída na zona Norte ocidental da Bacia Amazônica, enquanto que *A. sculptum* é encontrada nos estados do Sudeste, Centro-Oeste, Nordeste e Sul do Paraná (BEATI et al., 2013; ESTRADA-PEÑA et al., 2014; MARTINS et al., 2016).

Atualmente, o método mais eficiente de controle de carrapatos faz uso de acaricidas químicos de natureza sintética (CAMARGO-MATHIAS, 2018; NOLAN, 1985; OLIVEIRA et al., 2011, 2015; PRUETT, 1999). Entretanto, o uso indiscriminado desses produtos pode induzir a seleção de indivíduos resistentes, bem como sua toxicidade pode ser letal aos organismos não alvos, além de seus resíduos se acumularem no meio ambiente, contaminando o solo, cursos d'água e a flora, comprometendo a saúde animal, inclusive a humana (NOLAN, 1985; OLIVEIRA; BECHARA; CAMARGO-MATHIAS, 2008; PRUETT, 1999; ROMA et al., 2009).

Diante desse cenário, a busca por novas estratégias de controle têm sido uma constante. Dentre elas já encontram-se em prática a utilização de vacinas ou de acaricidas químicos de origem natural, geralmente com seus princípios ativos originados de extratos de plantas (ANHOLETO et al., 2017a; CASTRO et al., 2014; DENARDI et al., 2010; REMEDIO et al., 2015; RODRÍGUEZ-MALLON, 2016; VENDRAMINI et al., 2012; YOU et al., 2003).

Acmella oleracea é uma planta da família Asteraceae, encontrada em regiões tropicais próximas à linha do Equador na África, Ásia e América do Sul. No Brasil ela é conhecida popularmente como Jambu, sendo muito utilizada na culinária e na medicina popular como potente analgésico e anestésico local (BARBOSA et al., 2016; CHENG et al., 2015; FAVORETO; GILBERT, 2010; NOMURA et al., 2013). Estudos recentes mostraram que extratos das flores, folhas e caules de *A. oleracea* apresentaram atividades fungistática, fungicida e inseticida (BARBOSA et al., 2016;

DUBEY et al., 2013; FABRY; OKEMO; ANSORG, 1996; FAVORETO; GILBERT, 2010; NIGRINIS; CARO; OLARTE, 1986; RAMSEWAK, 1999; TORRES; CHÁVEZ, 2001).

Castro et al. (2014) e Oliveira et al. (2016) demostraram também que extratos hexânicos brutos das flores, folhas e caules de *A. oleracea* teriam atividade acaricida, provocando a ocorrência de alta taxa de mortalidade em larvas e em fêmeas ingurgitadas de carrapatos *Rhipicephalus microplus*, além de interferir na dinâmica do sistema reprodutor feminino, comprovado pela redução significativa da oviposição e eclosão dos ovos.

Diante deste cenário o presente trabalho teve por objetivo avaliar os efeitos de diferentes concentrações (3,1; 6,2 e 12,5 mg/mL) (ANHOLETO et al., 2017a) do extrato etanólico de *A. oleracea* sobre o sistema reprodutor de fêmeas semi-ingurgitadas de carrapatos *A. cajennense*, por meio da análise morfológica e ultraestrutural dos ovócitos, a fim de se estabelecer se este químico natural poderá num futuro próximo ser uma estratégia a ser utilizada no controle destes importantes ectoparasitas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Locais de realização dos estudos:

Para a realização do presente estudo foram utilizados os equipamentos disponíveis nas dependências dos Laboratórios de Histologia e de Microscopia Eletrônica do Departamento de Biologia do I.B. – UNESP de Rio Claro, SP. Nesta instituição está implantada e em pleno funcionamento a *Brazilian Central of Studies on Ticks Morphology* (BCSTM), onde colônias de carrapatos estão instaladas e são mantidas, sob a coordenação da Profa. Dra. Maria Izabel Camargo-Mathias.

Foram também utilizados os equipamentos disponíveis na Divisão de Química de Produtos Naturais do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas – CPQBA da UNICAMP, SP, sob a coordenação do Prof. Dr. Rodney Alexandre Ferreira Rodrigues.

Para a aquisição das imagens de microscopia eletrônica de transmissão, foram utilizados os equipamentos disponíveis no Laboratório de Microscopia Eletrônica aplicada à Pesquisa Agropecuária (NAP/MEPA) da ESALQ/USP.

2.2 Extrato de *Acmella oleracea*

O extrato etanólico bruto das partes aéreas (flores, folhas e caule) de *A. oleracea* foi produzido no Laboratório de Química de Produtos Naturais do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil, sob a supervisão do Dr. Rodney Alexandre Ferreira Rodrigues e com a colaboração da mestranda Lais Thiemi Yamane.

2.2.1 Obtenção do material vegetal

O material vegetal foi semeado e cultivado no campo experimental do CPQBA/UNICAMP, localizado no município de Paulínia, SP, Brasil (coordenadas geográficas -22° 47’ 52” S, -47° 6’ 49”). As sementes foram gentilmente cedidas pela empresa Centroflora (Botucatu, SP, Brasil) e a coleta das partes aéreas (flores, folhas

e caule) foi realizada no mês de abril de 2015. A planta foi identificada pelo Dr. John F. Pruski do *Missouri Botanical Garden (USA)* e a exsicata está depositada no Herbário do CPQBA/UNICAMP, Campinas, SP, Brasil, sob nº 181.452. Também foi obtida autorização de acesso e de remessa de patrimônio genético (CGEN) sob nº 010577/2014-9. Além disso, o estudo está cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado – SisGen sob número A34093F.

2.2.2 Secagem e moagem do material vegetal

As flores, folhas e caules de *A. oleracea* depois de coletadas foram secas em estufa com ventilação forçada por 48h a 40º C até massa constante (RODRIGUES et al., 2006). A moagem deu-se em moinho de facas com peneira de 48 mesh – 0,297 mm. O material vegetal seco e moído foi armazenado em embalagem de papel craft com revestimento de polipropileno com fechamento simples e mantido em freezer -20º C até a utilização.

2.2.3 Preparação do extrato etanólico bruto de *Acmella oleracea* (L.) R. L. Jansen

A extração foi realizada em etanol 96º GL (na proporção de 1:5, planta/solvente) à temperatura ambiente, em tanque de aço inox com agitação mecânica por uma hora e meia, ao final da qual o resíduo foi separado por filtração. Este processo foi repetido por mais duas vezes (RODRIGUES et al., 2006). Os extratos brutos obtidos foram filtrados, reunidos e concentrados sob vácuo em sistema de evaporação rotativo na temperatura de 40ºC. O extrato foi então liofilizado até massa constante, acondicionado em frasco âmbar e armazenado em freezer -20ºC até a utilização.

2.2.4 Monitoramento analítico do extrato

A presença do espilantol, componente majoritário das partes aéreas (flores, folhas e caules) de *A. oleracea* e do extrato etanólico bruto aqui utilizado, foi monitorada em cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas (GC-MS, Agilent® 5890 Series II mass selective detector Agilent® 5970 EI 70eV) equipado

com uma coluna de sílica fundida WCOT, HP5-MS, Agilent®, dimensões 30m x 0.25 mm x 0.25 µm. As condições de análise foram: temperatura do injetor: 220º C; temperatura do detector: 250º C; programa de temperatura: 60-240º C (3º C/min), injeção de amostra usando modo de divisão de proporção 1:40; gás Hélio foi utilizado como transportador a 0,7 bar, 1 mL/min.

2.3 Hospedeiros

Foram utilizados como hospedeiras coelhas adultas do Grupo Genético Botucatu com peso entre 3 a 3,5 Kg, sem contato prévio com carrapatos ou carrapaticidas, que foram adquiridas do Biotério da UNESP de Botucatu, SP, Brasil. Os animais foram mantidos em gaiolas e receberam água e ração comercial *ad libitum*. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UNESP de Rio Claro, SP, Brasil sob nº 11/2015.

2.4 Manutenção da colônia de carrapatos *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787)

Os carrapatos *A. cajennense* foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, USP, SP, Brasil. Os carrapatos adultos foram coletados da vegetação do Município de Governador Jorge Teixeira, Rondônia, região ocidental da Amazônia brasileira (coordenadas geográficas 10° 31’ 00” S, 62° 38’ 00” W) e mantidos em colônia. A identificação das espécies foi realizada por Martins et al. (2016).

Para o presente estudo foram utilizadas fêmeas adultas semi-ingurgitadas de *A. cajennense* alimentados por 10 dias em coelhas hospedeiras e mantidas em estufa BOD sob condições controladas (28º ± 1°C, 85% de umidade e fotoperíodo de 12 h) em sala de Biotério do Departamento de Biologia, I.B, – UNESP, Rio Claro, SP, Brasil. O estágio alimentar de semi-ingurgitamento das fêmeas foi escolhido para aproximar o experimento das condições de campo, visto que nesse estágio os carrapatos permanecem fixados na pele do hospedeiro para o repasto sanguíneo, causando lesões cutâneas e podendo transmitir patógenos ao mesmo.

Para a alimentação das fêmeas, foram realizadas infestações artificiais. Para tanto, a região dorsal da coelha hospedeira foi tricotomizada e recebeu uma camada de cola atóxica para a fixação de câmara alimentadora, conforme metodologia descrita por Bechara et al. (1995). Em seguida, os carrapatos foram no interior dela liberados e, decorridas 24 horas (tempo necessário para a acomodação dos ectoparasitas), foram realizadas observações diárias a fim de se determinar o período de alimentação dos carrapatos.

2.5 Avaliação ultraestrutural do sistema reprodutor feminino de *Amblyomma. cajennense* após a exposição ao extrato etanólico bruto de *Acmella oleracea* em concentrações subletais

2.5.1 Delineamento experimental

Para a avaliação ultraestrutural do sistema reprodutor das fêmeas semi-ingurgitadas de *A. cajennense* após a exposição ao extrato etanólico bruto de *A. oleracea* em concentrações subletais (concentrações menores que a CL_{50}), foi utilizado o Teste de Imersão de Adultos descrito por Drummond et al. (1973). As concentrações subletais foram determinadas previamente por Anholeto et al. (2017)

Fêmeas adultas semi-ingurgitadas com peso médio de 27 mg (cerca de 10 dias de alimentação em coelhas hospedeiras) (150 indivíduos) de *A. cajennense*, foram coletados de infestações artificiais de três coelhas hospedeiras (50 casais de carrapato/coelho). Antes do início dos testes, os carrapatos foram lavados em água corrente e depois, secos em papel absorvente macio.

Fêmeas com pesos homogêneos ($p > 0,05$), foram divididos em cinco grupos experimentais de 10 carrapatos cada e expostos a concentrações subletais do extrato (menores que a CL_{50}):

Fêmeas semi-ingurgitadas:

Grupo Controle 1 – foram expostas à água destilada;

Grupo Controle 2 – foram expostas ao solvente etanol 50% e DMSO 1%;

Grupos Tratamento 1 a 3 – foram expostas às concentrações de 3,1; 6,2 e 12,5 mg/mL do extrato etanólico bruto das partes aéreas (flores, folhas e caules) de *A. oleracea*, respectivamente, obtidas por diluição em etanol 50% e DMSO 1%.

Em cada grupo experimental, os indivíduos foram imersos nas substâncias a serem testadas durante cinco minutos. Em seguida, foram secos em papel absorvente, colocados em placas de Petri identificadas e levadas à estufa BOD sob condições controladas (28 ± 1°C, 85% de umidade, com fotoperíodo de 12 horas) por sete dias, intervalo de tempo sugerido por Oliveira, Bechara e Camargo-Mathias (2008) em estudos com fêmeas de *R. sanguineus* submetidas ao fipronil, visto que a maioria dos efeitos dos acaricidas não são imediatos e as alterações morfológicas geralmente aparecem após esse período. Foram realizadas observações diárias e os carrapatos foram estimulados com gás carbônico e com a ponta de um pincel por 30 minutos. Os indivíduos considerados mortos foram aqueles sem capacidade de movimento após 10 minutos do estímulo e não foram utilizados para as análises morfológicas e ultraestruturais. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Após o teste de imersão, as fêmeas de *A. cajennense* foram em placas de Petri contendo solução fisiológicas tamponada (NaCl 7,5 g/L, Na2HPO4 2,38 g/L e KH2PO4 2,72 g/L) dissecados sob estereomicroscópio para coleta dos ovários e posterior análise.

2.5.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Para a análise ultraestrutural, as amostras foram fixadas em glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7.2), durante 72 horas. Em seguida, foram realizadas duas lavagens em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, com duração de 15 minutos cada e, logo depois, foi realizada a pós-fixação em solução de tetróxido de ósmio (OsO4) a 1%, durante duas horas. As amostras foram novamente lavadas em tampão cacodilato de sódio por duas vezes de 15 minutos e imersas em etanol aquoso a 10% por 15 minutos. O material foi contrastado em solução de acetato de uranila a 1%, dissolvido em álcool 10%, por 24 horas, no escuro, sendo, em seguida, desidratado em uma série gradativa de acetona (de 50 a 100%). Posteriormente, o material foi embebido em resina Epon-Araldite mais acetona, na proporção de 1:1, por

24 horas, incluído em resina pura e levado à estufa por 72 horas, a 60ºC, para polimerização.

Secções ultrafinas obtidas em ultra-micrótomo Leica Reichert Supernova foram depositadas sobre grades de cobre e contrastadas em acetato de uranila a 4%, durante 20 minutos, e citrato de chumbo, por 10 minutos (REYNOLDS, 1963). O material foi observado e fotografado em microscópio eletrônico de transmissão JEOL JEM-1011 (MET, operando a uma voltagem de aceleração de 60kV), nas dependências do Laboratório de Microscopia Eletrônica aplicada à Pesquisa Agropecuária (NAP/MEPA) da ESALQ/USP, Piracicaba, SP.

3 RESULTADOS

3.1 Microscopia Eletrônica de Transmissão

3.1.1 Grupos Controle 1 e 2

Os resultados obtidos no presente trabalho, mostraram que o ovário de *A. cajennense*, apresentou o mesmo padrão ultraestrutural já descrito anteriormente por Denardi et al. (2004) para a mesma espécie, ou seja, os ovócitos imaturos (tipos I e II) apresentaram-se íntegros, com vesícula germinal (núcleo) arredondada e eletronlúcida (devido a não condensação da cromatina) e com um nucléolo bem proeminente (**Figura 15A**). O citoplasma mostrou-se homogêneo, com grande quantidade de ribossomos livres, bem como de mitocôndrias, estas de formas variadas e localizadas preferencialmente próxima da vesícula germinal (**Figuras 15A-B**). Na membrana plasmática que envolve os ovócitos, foi possível observar a presença de microvilos voltados para a lâmina basal, esta também preservada (**Figuras 15C-D**).

Os ovócitos III apresentaram o citoplasma mais heterogêneo devido à presença de grande quantidade de grânulos de vitelo (mais concentrados na porção central do ovócito), fortemente eletrondensos (**Figuras 15E-F**). Na região periférica desses ovócitos, verificou-se a presença de grânulos de vitelo de tamanhos maiores, enquanto na região central predominaram aqueles de tamanho menor, visto serem eles os que originarão, através de fusão, os grânulos maiores (**Figura 15F**). Pode-se também observar o início da deposição do cório (**Figura 15F**).

Nos ovócitos IV ainda foi possível observar a presença da vesícula germinal a qual mostrou-se arredondada e pouco eletrondensa no centro do citoplasma (**Figura 15G**). Observou-se também muitos grânulos de vitelo distribuídos pelo citoplasma e, diferentemente do estágio anterior, esses se mostraram maiores (**Figura 15G**).

Nos ovócitos V, também a quantidade de grânulos de vitelo com as mesmas características anteriormente descritas foi considerável, porém, aqui com tamanhos ainda maiores em relação a todos os outros estágios descritos anteriormente (**Figuras 15H-I**). Na região periférica desses ovócitos, notou-se a ausência de grânulos menores de vitelo, além da completa deposição do cório, onde inclusive conseguiu-se

distinguir as camadas, por meio da sua eletrondensidade. Além disso, observou-se a grande quantidade de poros presentes nessa estrutura, as quais teriam a função de auxiliar na oxigenação do futuro embrião (**Figura 15I**).

3.1.2 Grupo Tratamento 1: exposição a 3,1 mg/mL do extrato

Neste grupo observou-se a presença de ovócitos com alterações ultraestruturais significativas quando comparados àqueles dos grupos controle I e II, como: nos ovócitos I e II, os nucléolos mostraram morfologia irregular (**Figuras 16A-B**) e envoltório começando a apresentar dobras, como se a estrutura como um todo estivesse sofrendo encolhimento (**Figura 16C**). A principal alteração no citoplasma foi a presença de extensa vacuolização, principalmente com vacúolos abrigando mitocôndrias no seu interior, as quais provavelmente já estavam com suas funções comprometidas (**Figuras 16C-E**), bem como alguns deles ainda abrigaram figuras mielínicas (restos membranosos) (**Figuras 16D-E**).

Nos ovócitos do tipo III a grande maioria dessas alterações foi recorrente (**Figuras 16F-I**). O citoplasma apresentou mitocôndrias alongadas e em formato de halteres (**Figuras 16G-I**). A presença de muitos vacúolos também foi constante, os quais continham no seu interior materiais de várias naturezas e com diferentes eletrondensidades (**Figuras 16G-I**). Muitos grânulos de vitelo com formas, tamanhos e eletrondensidades variadas foram observados, inclusive alguns deles com alguma vacuolização (**Figuras 16F-I**). Entre os grânulos de vitelo de natureza proteica, também foram evidenciadas gotas de lipídio, estas eletronlúcidas. (**Figuras 16G-H**).

Os ovócitos IV mostraram as mesmas alterações ultraestruturais descritas nos ovócitos III, sendo a intensa vacuolização a mais relevante (**Figuras 16J-L).** Em relação aos grânulos de vitelo, estes apresentaram morfologia irregular, fragmentados e eletronlúcidos (**Figuras 16L-M**).

As alterações observadas nos ovócitos V foram principalmente a presença de grandes vacúolos ao redor de grânulos de vitelo e na região adjacente ao cório (**Figuras 16N-P**). O cório também sofreu sérias alterações, visto que as camadas foram desorganizadas provavelmente pela ação do produto, inclusive a eletrondensidade das mesmas também foi alterada (**Figura 16P**).

3.1.3 Grupo Tratamento 2: exposição a 6,2 mg/mL do extrato

Os ovócitos desse grupo foram os que mostraram as alterações ultraestruturais mais significativas, sobretudo os I e II, os quais foram severamente modificados, no sentido de que inclusive a sua forma foi alterada, pois passaram de arredondados ou elípticos para irregulares (**Figuras 17A-C**). A vesícula germinal, assim como o próprio ovócito, também perdeu sua forma original e apresentou dobras no seu envoltório (**Figura 17A**). Nas micrografias pode-se observar a presença de extensas dobras na membrana plasmática que invadiu a periferia do ovócito (**Figura 17C**). No citoplasma, observou-se a presença de vacúolos, alguns deles contendo figuras mielínicas (**Figuras 17A-C**).

Nos ovócitos do tipo III, foi possível observar as mesmas alterações ultraestruturais encontradas nos ovócitos imaturos, como a presença de vacúolos (**Figuras 17D-F**), contudo verificou-se também a deposição de material fortemente eletrondenso no cório, além da presença de dobras nessa mesma estrutura, que modificaram a forma do ovócito a qual passou de elíptica para irregular. (**Figura 17F**).

Os ovócitos do tipo IV apresentaram diminuição nos grânulos de vitelo quando comparado aos grupos controles, e apresentaram mais vacúolos heterogêneos na região próxima ao cório (**Figura 17G-H**) que se mostrou menos espesso (**Figura 17H**)

Os ovócitos V apresentaram, além da intensa vacuolização citoplasmática, vacuolização nos grânulos de vitelo, o que lhes conferiu um aspecto menos eletrondensa quando comparados aos do grupo controle (**Figuras 17I-J**). O cório mostrou-se desorganizado e eletronlúcido (**Figuras 17I-J**). Na periferia do ovócito, imediatamente adjacente ao cório, foi verificada a presença de uma camada acelular e sem organelas.

3.1.4 Grupo Tratamento 3: exposição a 12,5 mg/mL do extrato

Essas fêmeas apresentaram alterações ultraestruturais severas nos ovócitos sendo as mais significativas aquelas presentes nos ovócitos imaturos, que apresentaram citoplasma com mitocôndrias alongadas e em forma de halteres (**Figuras 18A-B**). Além disso, o citoplasma apresentou vacúolos de tamanhos

diversos, com material de mediana eletrondensidade em seu interior (**Figuras 18A-B**).

Os ovócitos III apresentaram vesícula germinal e nucléolo com deformidades (dobras), como se a mesma estivesse sofrendo encolhimento (**Figura 18C**). No citoplasma desses ovócitos as principais alterações foram a presença de mitocôndrias alongadas e em forma de “halteres” (**Figuras 18D-G)** e intensa vacuolização citoplasmática (**Figuras 18D-G**). Os microvilos da membrana plasmática apareceram diminuídos em altura e a deposição do cório se mostrou desorganizada (**Figura 18H**).

Os ovócitos do tipo IV, apresentaram as mesmas alterações ultraestruturais descritas nos ovócitos III (**Figura 18I**), sendo a vacuolização e irregularidades na vesícula germinal as características mais evidentes.

Os ovócitos V, além da vacuolização citoplasmática (**Figura 18K**), apresentaram o cório eletronlúcido, evidenciando a deposição irregular dos seus componentes (**Figura 18J-K**).

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

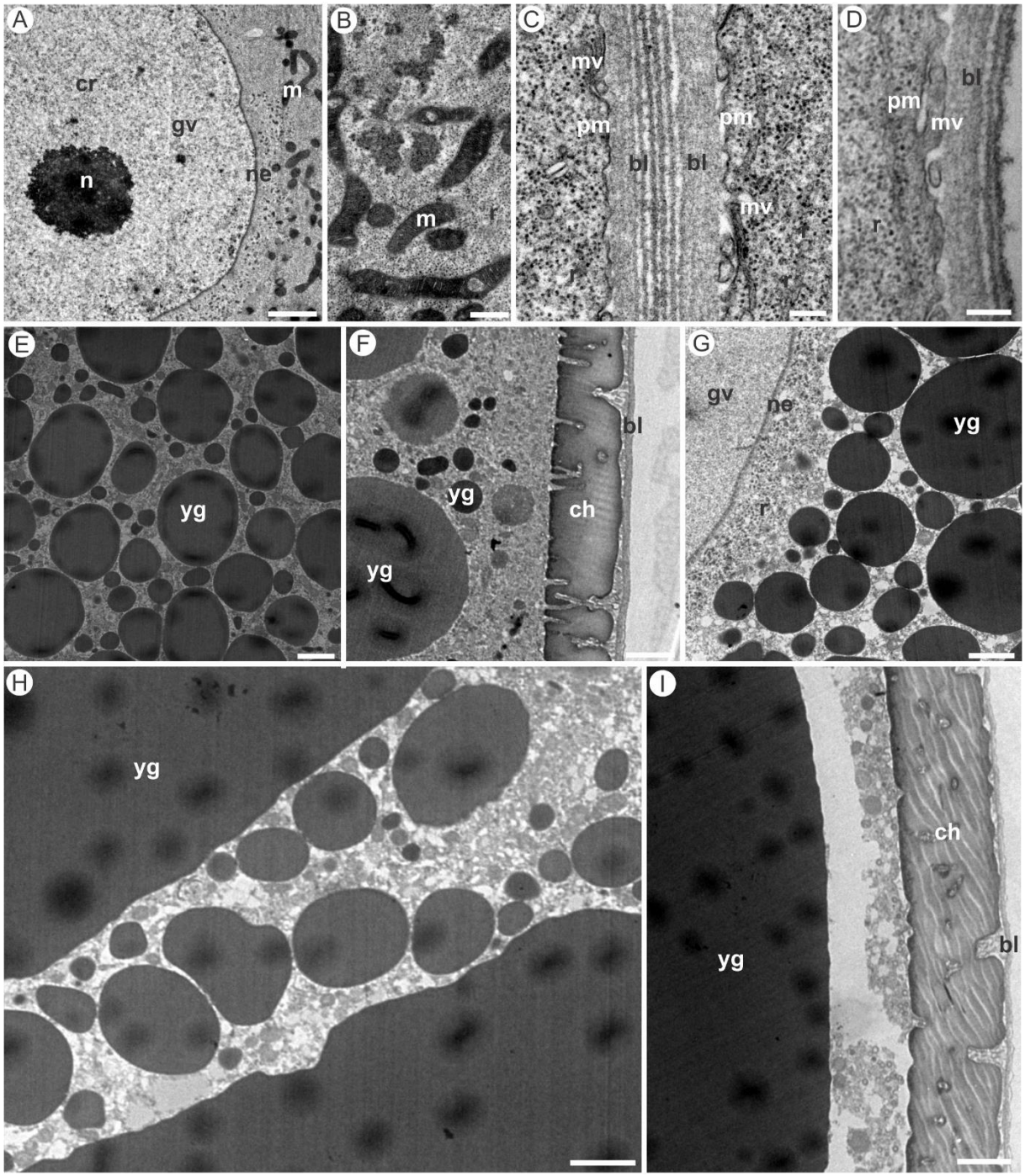

A
cr
m
gv
n
ne
B
m
r
C
mv
pm
bl
pm
bl
mv
r
D
bl
pm
mv
r
E
yg
F
bl
yg
ch
yg
G
gv
ne
yg
r
H
yg
I
ch
yg
bl

Figura 16. Ultraestrutura do ovário de fêmeas semi-ingurgitadas de *Amblyomma cajennense* (Grupo Tratamento: exposição a 3,1 mg/mL do extrato etanólico de *Acmella oleracea*). **A-E.** Ovócitos imaturos (I e II). **A-B.** Detalhe do nucléolo da vesícula germinal. **C.** Detalhe da vesícula germinal e envoltório nuclear. **D-E.** Citoplasma, evidenciando a presença de vacúolos heterogêneos e autofágicos. **F-I.** Ovócitos III. **F.** Detalhe da vesícula germinal. **G.** Citoplasma. **H-I.** Detalhe do citoplasma, evidenciando a presença de vacúolos autofágicos. **J-M.** Ovócitos IV, mostrando o citoplasma repleto de vacúolos autofágicos e grânulos de vitelo com morfologia irregular. **N-P.** Ovócitos V. **N-O.** Citoplasma com grânulos de vitelo e vacúolos heterogêneos. **P.** Detalhe da região periférica do ovócito, evidenciando o cório. ***yg=** grânulos de vitelo com constituição granular **aer=** reticulo endoplasmático agranular **av=** vacúolo autofágico **ch=** cório **cr=** cromatina **g=** Golgi **gv=** vesícula germinal **l=** lipídio **m=** mitocôndria **mb=** figura mielínica **n=** nucléolo **ne=** envoltório nuclear **r=** ribossomo livre **v=** vacúolo **yg=** grânulos de vitelo. **Barras: A-C; E; H; J; L-M; O=** 1 µm. **D; I; K; N=** 0,5 µm; **F; P=** 5 µm. **G=** 2 µm.

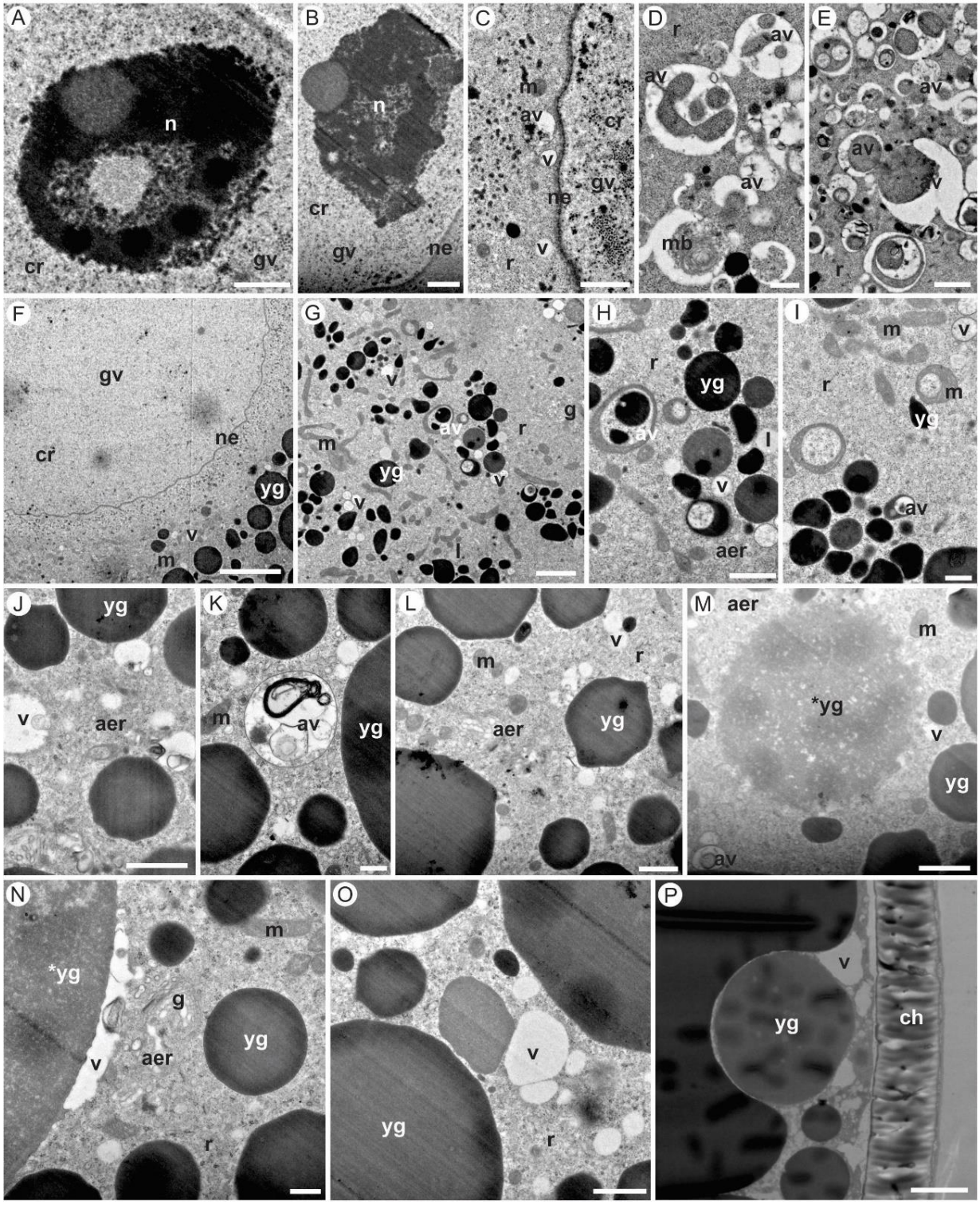

A
n
cr
gv
B
n
cr
gv
ne
C
m
av
cr
v
gv
ne
r
v
D
r
av
av
av
mb
E
av
av
av
r
F
gv
cr
ne
yg
v
m
G
v
av
r
g
m
yg
v
v
l
H
r
yg
av
l
v
aer
I
m
v
r
m
yg
av
J
yg
v
aer
K
m
av
yg
L
v
r
m
aer
yg
M
aer
m
*yg
v
yg
av
N
m
*yg
g
yg
v
aer
r
O
v
yg
r
P
v
yg
ch

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

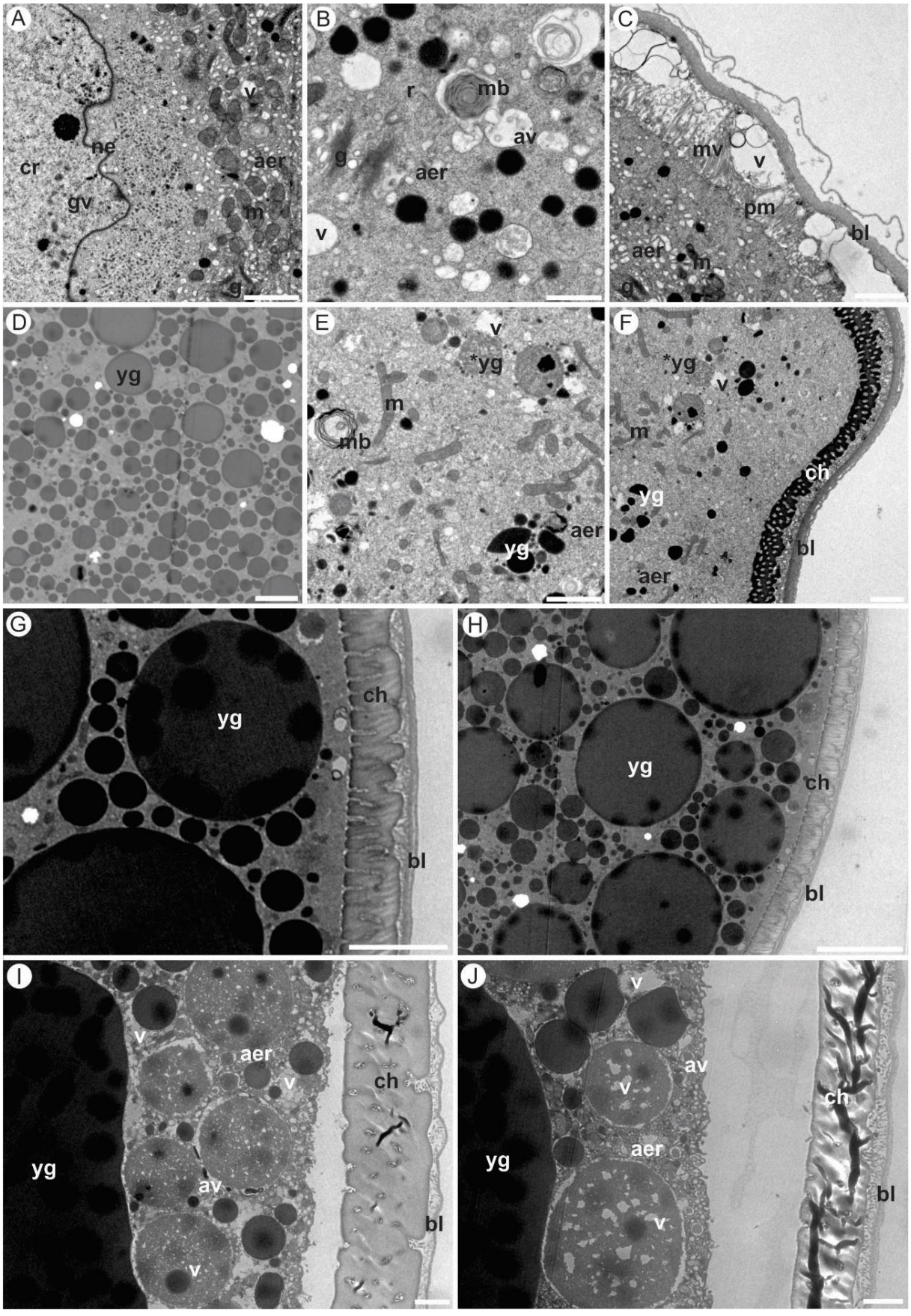
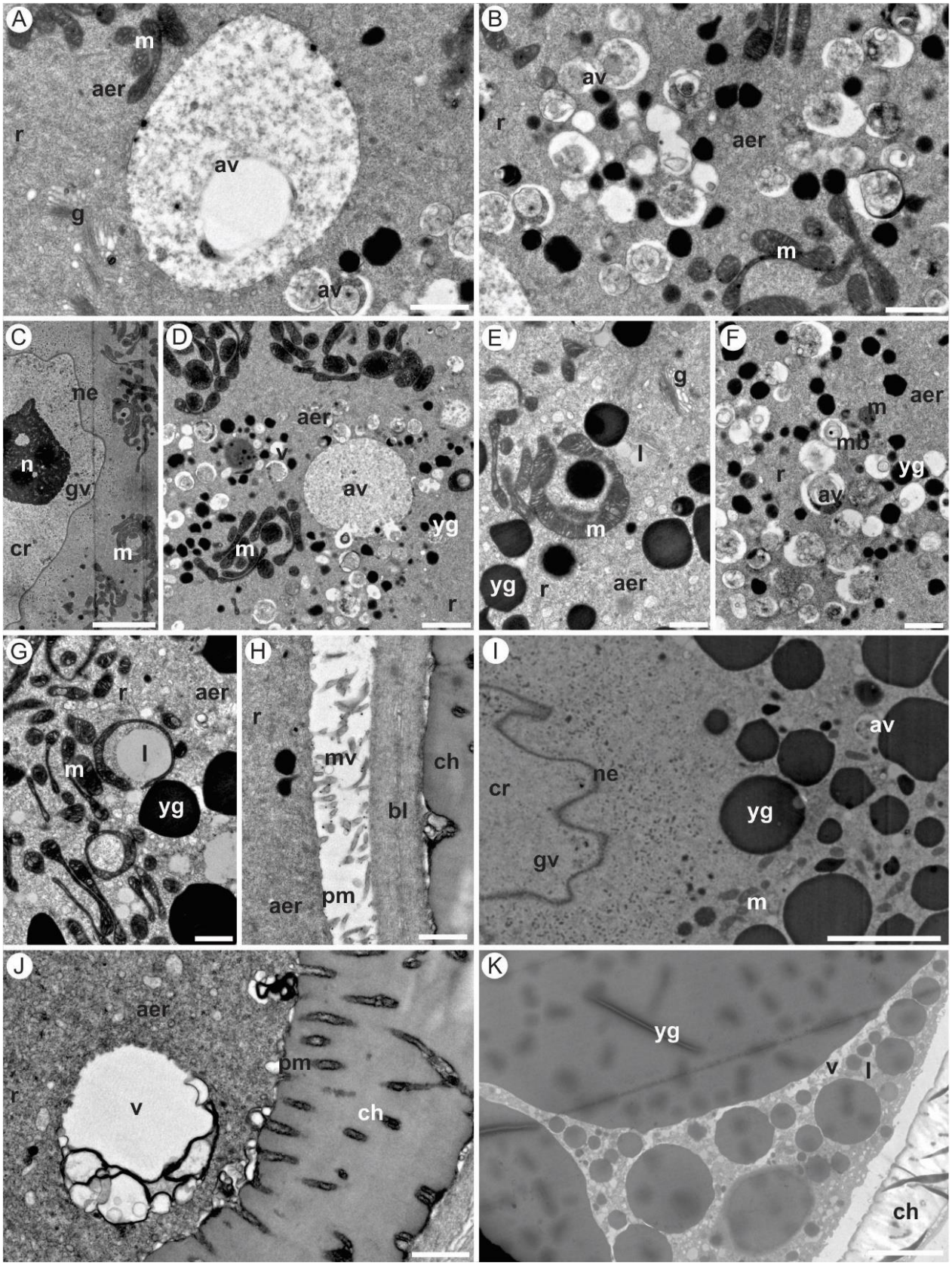

A
v
ne
cr
aer
gv
m
g
B
r
mb
av
g
aer
v
C
mv
v
pm
bl
aer
m
g
D
yg
E
v
*yg
m
mb
aer
yg
F
*yg
v
m
ch
yg
bl
aer
G
yg
ch
bl
H
yg
ch
bl
I
v
aer
v
ch
yg
av
bl
v
J
v
av
v
ch
yg
aer
bl
v

Figura 18. Ultraestrutura do ovário de fêmeas semi-ingurgitadas de *Amblyomma cajennense* (Grupo Tratamento: exposição a 12,5 mg/mL do extrato etanólico de *Acmella oleracea*). **A-B.** Ovócitos em fase inicial de desenvolvimento (I e II), evidenciando citoplasma vacuolizado. **C-H.** Ovócitos III. **C.** Detalhe da vesícula germinal. **D-G.** Detalhe do citoplasma vacuolizado. **H.** Detalhe da região periférica do ovócito, destacando os microvilos. **I.** Ovócitos IV. **I.** Vesícula germinal. **J-K.** Ovócitos V, destacando a região periférica do ovócito (**J**) e o cório. **K.** Região periférica do ovócito, evidenciado a deposição do cório. **aer=** reticulo endoplasmático agranular **av=** vacúolo autofágico **bl=** lâmina basal **ch=** cório **cr=** cromatina **g=** Golgi **gv=** vesícula germinal **l=** lipídio **m=** mitocôndria **mb=** figura mielínica **mv=** microvilos **ne=** envoltório nuclear **pm=** membrana plasmática **r=** ribossomo livre **v=** vacúolo **yg=** grânulos de vitelo. **Barras: A-B; E-H; J= 1** µm. **C; I; K=** 5 µm; **D=** 2 µm.


A
m
aer
r
av
g
av
B
av
r
aer
m
C
ne
n
gv
cr
m
D
aer
v
av
yg
m
r
E
g
l
m
yg
r
aer
F
m
aer
mb
r
yg
av
G
r
aer
l
m
yg
H
r
mv
ch
bl
aer
pm
I
av
ne
cr
yg
gv
m
J
aer
pm
r
v
ch
K
yg
v
l
ch

4 DISCUSSÃO

Segundo Denardi et al. (2004), o ovário de carrapatos *A. cajennense* é do tipo panoístico onde são encontrados ovócitos (células germinativas) em diversos estágios de desenvolvimento, classificados em estágios de I a V, os quais se encontram fixados na parede epitelial do ovário por meio das células do pedicelo (DENARDI et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2005; SAITO et al., 2005).

Os resultados aqui obtidos mostraram que as fêmeas de *A. cajennense* expostas às diferentes concentrações (3,1; 6,2 e 12,5 mg/mL) do extrato etanólico de *A. oleracea,* apresentaram significativas alterações ultraestruturais, principalmente quando se considerou os ovócitos imaturos (I e II). As alterações foram mais intensas e severas à medida que a concentração do produto aumentou, o que permitiu se considerar que esses efeitos foram dose-dependentes. Os dados também corroboraram os estudos desenvolvidos por Oliveira et al. (2016) com fêmeas semi-ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* expostas ao extrato hexânico de *A. oleracea*, os de Vendramini et al. (2012) com fêmeas de *R. sanguineus* expostas ao óleo de andiroba (*Carapa guianensis*) e os de Remedio et al. (2015) quando expuseram fêmeas dessa mesma espécie ao óleo de neem (*Azadirachta indica*). Além disso ficou evidente que os prejuízos aos tecidos do ectoparasita exposto ao extrato etanólico de *A. oleracea,* foram muito semelhantes aqueles obtidos por Oliveira et al. (2009) quando expuseram *R. sanguineus* ao fipronil sinalizando que os químicos naturais podem ser uma estratégia para substituir os sintéticos num futuro próximo.

As alterações celulares decorrentes da exposição ao extrato etanólico de *A. oleracea* foi bastante importante, visto que as mesmas chegaram a atingir a vesícula germinal dos ovócitos, estrutura que abriga o DNA e que, portanto, quando sofre alterações, possivelmente inviabiliza o desenvolvimento da célula germinativa e consequentemente inibiriam a produção de um novo indivíduo. Esses núcleos sofreram modificações que incluíram aquelas na sua forma, que passou de arredondada para irregular, além do aparecimento de dobras na membrana envoltória. Isso foi observado principalmente nos ovócitos I, II e III, quando consideradas as exposições ao extrato na concentração de 3,1 mg/mL. As mesmas alterações foram observadas nos ovócitos imaturos dos indivíduos expostos à 6,2 mg/mL do extrato e nos ovócitos III e IV daqueles submetidos à concentração de 12,5 mg/mL. Dados semelhantes foram obtidos por Oliveira et al. (2009) quando estudaram o sistema

reprodutor feminino de *R. sanguineus* expostos ao fipronil, sinalizando que o produto tóxico foi capaz de ultrapassar a barreira seletiva da membrana plasmática do ovócito, incluindo o próprio cório, membrana muito resistente devido a organização em camadas, chegando no interior da célula e alcançando o núcleo (DENARDI et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2016b).

No citoplasma dos ovócitos em todos os estágios de desenvolvimento observou-se extensa vacuolização, com a presença de vacúolos autofágicos contendo mitocôndrias no seu interior, as quais provavelmente já estavam com suas funções comprometidas, quando submetidos às três concentrações do extrato de *A. oleracea*, corroborando dados encontrados por Oliveira et al. (2009) e Roma et al. (2010) quando fêmeas de *R. sanguineus* foram expostas aos químicos sintéticos fipronil e permetrina, respectivamente. Os vacúolos citoplasmáticos muito provavelmente teriam a função de isolar organelas ou porções do citoplasma já danificadas pelos componentes tóxicos do extrato, o que de certa forma permitiria que a célula ainda conseguisse sobreviver e manter-se biologicamente viável (CARVALHO; RECCO-PIMENTEL, 2012; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017). A presença de vacuolização citoplasmática também foi observada por Vendramini et al. (2012), quando estudaram a ação do óleo de andiroba sobre o sistema reprodutor de fêmeas de *R. sanguineus*. Os mesmos autores ressaltaram que os vacúolos teriam sido observados sobretudo nos ovócitos em estágios iniciais de desenvolvimento (aqui também observado) e em todas as concentrações do óleo. Esse tipo de dano poderia estar relacionado com o fato de que ovócitos imaturos ainda não teriam o cório depositado, ou seja, essa barreira física e com papel de dificultar/selecionar a entrada/saída de elementos na célula, inclusive do produto tóxico estaria ausente (OLIVEIRA et al., 2016b). Segundo Denardi et al. (2004) a deposição dessa membrana teria início nos ovócitos II/III e se completaria naqueles em estágio V.

Outra alteração que estaria confirmando a ocorrência de sérios danos às células germinativas aqui estudadas expostas ao extrato seria a presença significativa de figuras mielínicas (estruturas membranosas derivadas da autodigestão celular) no citoplasma dos ovócitos I e II das fêmeas expostas a concentração de 3,1 mg/mL, o que poderia indicar uma tentativa da célula isolar partes do citoplasma ou organelas danificadas pela ação do extrato. As mesmas estruturas também foram observadas nos ovócitos I, II e III dos animais expostos à concentração de 6,2 mg/mL do extrato e naqueles ovócitos III das fêmeas expostas a 12,5 mg/mL do extrato etanólico de *A.*

oleracea, o que sugeriu que os ovócitos IV e V cujo cório já está depositado, a penetração do produto teria sido dificultada. Presença de figuras mielínicas também foi reportada por Oliveira et al. (2009) em fêmeas de *R. sanguineus* submetidas ao fipronil e por Remedio et al. (2015) quando estudaram a ação do óleo de neem (*Azadirachta indica* A. Juss) em concentrações conhecidas de azadiractina (200, 400 e 600 ppm).

A literatura tem registros de que ovócitos de *R. sanguineus* expostos ao fipronil (OLIVEIRA et al., 2009) e ao extrato da folha de neem (DENARDI et al., 2012), apresentaram sérias alterações na morfologia das mitocôndrias, importante organela que participa do metabolismo energético das células, tendo sido observada desorganização no seu interior e até mesmo em algumas delas a ausência das cristas. No presente estudo observou-se que as mitocôndrias passaram de irregulares para alongadas ou ainda adquirindo a forma de “halteres”, o que poderia trazer prejuízo no processo de amadurecimento do ovócito, uma vez que essas organelas seriam necessárias para o fornecimento de energia no período de incorporação exógena da vitelogênese, onde compostos da hemolinfa seriam transportados para o interior dos ovócitos (BALASHOV, 1972 apud OLIVEIRA et al., 2005).

Estas organelas foram também observadas fazendo parte do conteúdo dos vacúolos autofágicos, provavelmente por estarem com sua morfofisiologia comprometida e tendo sido aí estocadas para um futuro descarte. Danos nessas organelas trariam deficiências energéticas que afetariam o metabolismo dos ovócitos, bem como do futuro embrião.

A importância das mitocôndrias também reside nos processos de síntese e armazenamento de substâncias, como proteínas e lipídios. Elas teriam a capacidade de obter moléculas de ácidos graxos do retículo endoplasmático e transferi-las para a matriz mitocondrial, onde poderiam ser degradadas e convertidas em energia (DENARDI; CAMARGO MATHIAS; BECHARA, 2006). No entanto, parte do processo poderia não ocorrer o que levaria à formação de gota de lipídio no interior da organela (ALBERTS et al., 2010). Essa dinâmica já foi descrita por outros autores tais como Caperucci e Camargo-Mathias (2006) quando desenvolveram trabalhos mostrando qual seria a dinâmica da vitelogênese na formiga *Neoponera villosa*, quando mostraram que a provável fonte de lipídios nos ovócitos desses insetos seria a mitocôndria ou mais especificamente, a transformação dessas organelas.

Segundo Denardi et al. (2004), a síntese e/ou a incorporação dos elementos do vitelo, reserva de nutrientes essencial para a alimentação e, consequentemente, viabilidade dos embriões, ocorreria numa sequência preferencial em que os lipídios seriam os primeiros a aparecer, seguidos pelas proteínas e finalmente pelos carboidratos. Oliveira et al. (2005) quando estudaram o sistema reprodutor feminino de carrapatos *R. sanguineus*, também observaram que o processo de vitelogênese teria início ou por meio da síntese de elementos vitelogênicos no interior da própria célula (síntese endógena) ou pela incorporação de elementos produzidos por outros tecidos (incorporação exógena ou extra ovariana de vitelo) os quais seriam posteriormente captados da hemolinfa pelo ovócito. Os dados obtidos com o estudo do extrato de *A. oleracea*, revelaram significativas alterações na composição e mesmo na morfologia dos grânulos de vitelo nos ovócitos em todos os estágios de desenvolvimento, bem como nos expostos a todas as concentrações do extrato etanólico de *A. oleracea*. Essas alterações incluiriam mudanças na forma do grânulo, os quais originalmente arredondados passaram a irregulares; fragmentação do grânulo; alteração na sua eletrondensidade; além de presença de espaços arredondados no seu interior, dados que foram semelhantes aqueles observados por Oliveira et al. (2016) quando estudaram a ação do extrato de *A. oleracea* no sistema reprodutor de *R. microplus.* Os mesmos autores concluíram que alterações no processo de vitelogênese poderiam levar a uma redução na presença dos grânulos de vitelo e, consequentemente, a um déficit de nutrição do embrião, impactando negativamente no desenvolvimento normal de novos indivíduos.

Friesen, Suri e Kaufman (2003) em estudos com o carrapato *A. hebraeum* registraram que o químico avermectina induziria a interrupção de síntese/incorporação e a degeneração dos grânulos de vitelo presentes nos ovócitos desses indivíduos, corroborando os dados obtidos no presente estudo em relação a ação do extrato de *A. oleracea* sobre ovócitos de *A. cajennense.* Friesen e Kaufman (2003) em outro trabalho observaram a inibição no processo de captação da vitelogenina, pelos ovócitos do carrapato *A. hebraeum* expostos a cipermetrina. Esse processo deve também ter ocorrido nos ovócitos das fêmeas de *A. cajennense* aqui estudados, uma vez que foi observada a diminuição da presença de microvilos na membrana plasmática destes.

Finalmente, observou-se neste trabalho que o cório dos ovócitos também apresentou alterações significativas devido a exposição ao extrato, as quais incluíram

a desorganização na deposição das camadas, muito provavelmente devido a ação do produto. Alterações nessa membrana protetora poderiam significar a ausência de uma barreira física com papel de dificultar/selecionar a entrada/saída de elementos na célula, inclusive do produto tóxico, no caso o extrato aqui testado, protegendo assim a célula (OLIVEIRA et al., 2016b). Alterações no cório já haviam sido reportadas por Oliveira et al. (2016) quando estudaram os efeitos citotóxicos do extrato de *A. oleracea* em fêmeas de *R. microplus*.

Concluindo-se, os dados obtidos no presente trabalho confirmaram o potencial citotóxico do extrato etanólico de *A. oleracea* nas concentrações de 3,1; 6,2 e 12,5 mg/mL sobre as células germinativas de fêmeas de carrapatos *A. cajennense*, o que pode futuramente ser uma estratégia eficiente para o controle de carrapatos dessa e de outras espécies.

5 AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (processo nº 2015/01496-5) e CAPES/Brasil pelo suporte financeiro. Ao Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna pela colaboração. À Sra. Monika Iamonte, aos Srs. Gerson de Melo Souza e Antônio Teruyoshi Yabuki, e a Dra. Priscila Cintra Socolowski pelo apoio técnico.

REFERÊNCIAS

ABBAS, R. Z.; ZAMAN, M. A.; COLWELL, D. D.; GILLEARD, J.; IQBAL, Z. Acaricide resistance in cattle ticks and approaches to its management: the state of play. **Veterinary Parasitology**, v. 203, n. 1–2, p. 6–20, 2014.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia molecular da célula**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

ANHOLETO, L. A.; OLIVEIRA, P. R.; RODRIGUES, R. A. F.; SPINDOLA, C. S.; LABRUNA, M. B.; PIZANO, M. A.; CASTRO, K. N. C.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Potential action of extract of *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen to control *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) ticks. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 8, n. 1, p. 65–72, 2017.

BARBOSA, A. F.; CARVALHO, M. G.; SMITH, R. E.; SABAA-SRUR, A. U. O. Spilanthol: occurrence, extraction, chemistry and biological activities. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, n. 1, p. 128–133, 2016.

BEATI, L.; NAVA, S.; BURKMAN, E. J.; BARROS-BATTESTI, D. M.; LABRUNA, M. B.; GUGLIELMONE, A. A; CÁCERES, A. G.; GUZMÁN-CORNEJO, C. M.; LEÓN, R.; DURDEN, L. A; FACCINI, J. L. H. *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae), the Cayenne tick: phylogeography and evidence for allopatric speciation. **BMC Evolutionary Biology**, v. 13, n. 1, p. 267, 2013.

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

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

CAPERUCCI, D.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Lipids in oocytes of ants *Neoponera villosa* (Hymenoptera: Ponerinae). **Sociobiology**, v. 47, p. 531–541, 2006.

CARVALHO, H. F.; RECCO-PIMENTEL, S. M. **A Célula**. 3ª ed. São Paulo: Editora Manole, 2012.

CASTRO, K. N. C.; LIMA, D. F.; VASCONCELOS, L. C.; LEITE, J. R. S. A.; SANTOS, R. C.; PAZ NETO, A. A.; COSTA-JÚNIOR, L. M. Acaricide activity *in vitro* of *Acmella oleracea* against *Rhipicephalus microplus.* **Parasitology Research**, v. 113, n. 10, p. 3697–701, 2014.

CHAGAS, A. C. S.; GEORGETTI, C. S.; CARVALHO, C. O.; OLIVEIRA, M. C. S.; RODRIGUES, R. A.; FOGLIO, M. A.; MAGALHÃES, P. M. *In vitro* activity of *Artemisia annua* L (Asteraceae) extracts against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 1, p. 31–35, 2011.

CHENG, Y.; LIU, R.; HO, M.; WU, T.; CHEN, C.; LO, I.; HOU, M.; YUAN, S.; WU, Y.; CHANG, F. Alkylamides of *Acmella oleracea*. **Molecules**, v. 20, n. 4, p. 6970–6977, 2015.

CRAMPTON, A.; BAXTER, G.; BARKER, S. Identification and characterisation of a cytochrome P450 gene and processed pseudogene from an arachnid: the cattle tick, *Boophilus microplus.* **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 29, n. 4, p. 377–384, 1999.

DENARDI, S. E.; BECHARA, G. H.; OLIVEIRA, P. R.; NUNES, E. T.; SAITO, K. C.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Morphological characterization of the ovary and vitellogenesis dynamics in the tick *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). **Veterinary parasitology**, v. 125, n. 3–4, p. 379–95, 2004.

DENARDI, S. E.; BECHARA, G. H.; OLIVEIRA, P. R.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. *Azadirachta indica* A. Juss (neem) induced morphological changes on oocytes of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) tick females. **Experimental Parasitology**, v. 126, n. 4, p. 462–70, 2010.

DENARDI, S. E.; BECHARA, G. H.; OLIVEIRA, P. R.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Ultrastructural analysis of the oocytes of female *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) ticks subjected to the action of *Azadirachta indica* A. Juss (Neem). **Ultrastructural Pathology**, v. 36, n. 1, p. 56–67, 2012.

DENARDI, S. E.; CAMARGO MATHIAS, M. I.; BECHARA, G. H. *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae): Salivary gland cells of partially engorged females ticks and the production of lipid by their mitochondria. **Experimental Parasitology**, v. 113, n. 1, p. 30–35, 2006.

DRUMMOND, R. O.; ERNST, S. E.; TREVINO, J. L.; GLADNEY, W. J.; GRAHAM, O. H. *Boophilus annulatus* and *B. microplus*: laboratory tests of insecticides. **Journal of Economic Entomology**, v. 66, n. 1, p. 130–3, 1973.

DUBEY, S.; MAITY, S.; SINGH, M.; SARAF, S. A.; SAHA, S. Phytochemistry, pharmacology and toxicology of *Spilanthes acmella*: A Review. **Advances in Pharmacological Sciences**, v. 2013, p. 423750, 2013.

ESTRADA-PEÑA, A.; TARRAGONA, E. L.; VESCO, U.; MENEGHI, D.; MASTROPAOLO, M.; MANGOLD, A. J.; GUGLIELMONE, A. A.; NAVA, S. Divergent environmental preferences and areas of sympatry of tick species in the *Amblyomma cajennense* complex (Ixodidae). **International Journal for Parasitology**, v. 44, n. 14, p. 1081–9, 2014.

FABRY, W.; OKEMO, P.; ANSORG, R. Fungistatic and fungicidal activity of east African medicinal plants. **Mycoses**, v. 39, n. 1–2, p. 67–70, 1996.

FAVORETO, R.; GILBERT, B. Estado da Arte/State of the Art - *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen (Asteraceae) – Jambu. **Revista Fitos**, v. 5, n. 1, p. 83–91, 2010.

FRIESEN, K. J.; KAUFMAN, W. R. Cypermethrin inhibits egg development in the ixodid tick, *Amblyomma hebraeum*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 76, n. 1, p. 25–35, 2003.

FRIESEN, K. J.; SURI, R.; KAUFMAN, W. R. Effects of the avermectin, MK-243, on ovary development and salivary gland degeneration in the ixodid tick, *Amblyomma hebraeum*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 76, n. 3, p. 82–90, 2003.

GUEDES, E.; LEITE, R. C.; PRATA, M. C.; PACHECO, R. C.; WALKER, D. H.; LABRUNA, M. B. Detection of *Rickettsia rickettsii* in the tick *Amblyomma cajennense* in a new Brazilian spotted fever-endemic area in the state of Minas Gerais. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 8, p. 841–845, 2005.

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

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

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

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

NIGRINIS, L. S. O.; CARO, J. O.; OLARTE, E. N. Estudio fitofarmacológico de la

fraccion liposoluble de las flores de la *Spilanthes americana* (Mutis) parte I: Estudio fitoquimico. **Revista Colombiana de Ciências Químico-Farmacêuticas**, v. 15, p. 37–47, 1986.

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

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

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

OLIVEIRA, P. R.; BECHARA, G. H.; MARIN-MORALES, M. A.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Action of the chemical agent fipronil on the reproductive process of semi-engorged females of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). Ultrastructural evaluation of ovary cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 6, p. 1255–1264, 2009.

OLIVEIRA, P. R.; PIZANO, M. A.; REMÉDIO, R. N.; BECHARA, G. H.; ABREU, R. M. M.; CAMARGO MATHIAS, M. I. Potential of the chemical dinotefuran in the control of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) semi-engorged female ticks. **Experimental Parasitology**, v. 155, p. 82–88, 2015.

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

OLIVEIRA, P. R.; BECHARA, G. H.; DENARDI, S. E.; PIZANO, M. A.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Toxicity effect of the acaricide fipronil in semi-engorged females of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): preliminary determination of the minimum lethal concentration and LC(50). **Experimental Parasitology**, v. 127, n. 2, p. 418–22, 2011.

OLIVEIRA, P. R.; CASTRO, K. N. C.; ANHOLETO, L. A.; CAMARGO MATHIAS, M. I. Cytotoxic effects of extract of *Acmella oleraceae* (Jambú) in *Rhipicephalus microplus* females ticks. **Microscopy Research and Technique**, v. 79, n. 8, p. 744–753, 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, 2008.

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

RAMSEWAK, R. Bioactive N-isobutylamides from the flower buds of *Spilanthes acmella*. **Phytochemistry**, v. 51, n. 6, p. 729–732, 1999.

REMEDIO, R. N.; NUNES, P. H.; ANHOLETO, L. A.; OLIVEIRA, P. R.; CAMARGO-

MATHIAS, M. I. Morphological effects of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) seed oil with known azadirachtin concentrations on the oocytes of semi-engorged *Rhipicephalus sanguineus* ticks (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v. 114, n. 2, p. 431–44, 2015.

REYNOLDS, E. S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. **The Journal of Cell Biology**, v. 17, n. 1, p. 208–12, 1963.

RIBEIRO, V. L. S.; AVANCINI, C.; GONÇALVES, K.; TOIGO, E.; POSER, G. V. Acaricidal activity of *Calea serrata* (Asteraceae) on *Boophilus microplus* and *Rhipicephalus sanguineus*. **Veterinary Parasitology**, v. 151, n. 2–4, p. 351–4, 2008.

RODRIGUES, R. A. F.; FOGLIO, M. A.; BOAVENTURA JÚNIOR, S.; SANTOS, A. S.; REHDER, V. L. G. Otimização do processo de extração e isolamento do antimalárico artemisinina a partir de *Artemisia annua* L. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 368–372, 2006.

RODRÍGUEZ-MALLON, A. Developing anti-tick vaccines. **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, v. 1404, p. 243–59, 2016.

ROMA, G. C.; 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, 2009.

ROMA, G. C.; FURQUIM, K. C. S.; BECHARA, G. H.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Permethrin-induced morphological changes in oocytes of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) semi-engorged females. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 3, p. 825–830, 2010.

SAITO, K. C.; BECHARA, G. H.; NUNES, E. T.; OLIVEIRA, P. R.; DENARDI, S. E.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Morphological, histological, and ultrastructural studies of the ovary of the cattle-tick *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 129, n. 3–4, p. 299–311, 2005.

SOARES, H. S.; BARBIERI, A. R. M.; MARTINS, T. F.; MINERVINO, A. H. H.; DE LIMA, J. T. R.; MARCILI, A.; GENNARI, S. M.; LABRUNA, M. B. Ticks and rickettsial infection in the wildlife of two regions of the Brazilian Amazon. **Experimental & Applied Acarology**, v. 65, n. 1, p. 125–40, 2015.

TARRAGONA, E. L.; CICUTTIN, G. L.; MANGOLD, A. J.; MASTROPAOLO, M.; SALVO, M. N.; NAVA, S. *Rickettsia* infection in *Amblyomma tonelliae*, a tick species from the *Amblyomma cajennense* complex. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 6, n. 2, p. 173–177, 2015.

TORRES, J. M.; CHÁVEZ, A. G. Alcamidas en plantas: distribución e importancia. **Avance y Perspectiva**, v. 20, n. Noviembre-Diciembre, p. 377–387, 2001.

VENDRAMINI, M. C. R.; CAMARGO-MATHIAS, M. I.; FARIA, A. U.; BECHARA, G. H.; OLIVEIRA, P. R.; ROMA, G. C. Cytotoxic effects of andiroba oil (*Carapa guianensis*) in reproductive system of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) semi-engorged females. **Parasitology Research**, v. 111, n. 5, p. 1885–1894, 2012.

YOU, M.; XUAN, X.; TSUJI, N.; KAMIO, T.; TAYLOR, D.; SUZUKI, N.; FUJISAKI, K.

Identification and molecular characterization of a chitinase from the hard tick *Haemaphysalis longicornis.* **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 10, p. 8556–63, 2003.

CAPÍTULO 9

ACARICIDAL ACTIVITY *IN VITRO* OF SPILANTHOL ALKYNE ANALOGUE AGAINST CELL LINES DERIVED FROM ACARICIDE-RESISTANT AND ACARICIDE-SUSCEPTIBLE *Rhipicephalus microplus* TICKS WITH OR WITHOUT *Ehrlichia minasensis* INFECTION[9]

Abstract

The present study aims at establishing an *in vitro* protocol for the study of acaricidal products as an alternative to traditional animal tests. The first objective was to investigate the effects of a spilanthol alkyne analogue on two *Rhipicephalus microplus* cell lines: BME/CTVM6, derived from ticks resistant to organophosphates, organochlorines and amitraz, and BME/CTVM2, derived from acaricide-susceptible ticks. The results showed that the spilanthol alkyne analogue at the concentrations of 0.4 and 0.8 mg/mL was able to kill 100% of BME/CTVM6 cells and at the concentration of 0.8 mg/mL was able to kill 100% of BME/CTVM2 cells. The second objective was to investigate the direct effect of sublethal acaricide doses on pathogens carried by ticks; for this, the BME/CTVM6 cell line was infected with *Ehrlichia minasensis*, an obligate intracellular bacterium isolated from the cattle tick *R. microplus*, whose pathogenicity to cattle is unknown. Then, infected and uninfected cells (control) were exposed to the concentration of 0.2 mg/mL of the spilanthol analogue. Light microscopy revealed that the proportion of *E. minasensis*-infected cells was reduced by nearly two-thirds (0.29% compared to 0.88% of control group) in cultures exposed to the spilanthol analogue. In conclusion, the results demonstrated that the use of the spilanthol alkyne analogue could be a promising strategy to control ticks, with additional advantages over the traditional chemical acaricides, minimizing the selection of resistant individuals and offering less harm to the environment and non-target organisms. However, further studies are needed to examine the potential effects on intracellular tick-borne bacteria that can be propagated *in vitro* when exposed to sub-lethal doses of acaricides.

Keywords: jambu; ticks; chemical control; tick cell line; *Ehrlichia minasensis.*

[9] **Luís Adriano Anholeto**; Lesley Bell-Sakyi; Júlio Cézar Pastre; Guilherme Andrade Brancaglion; Patrícia Rosa de Oliveira; Nathália Rubio Claret Pereira; Rodney Alexandre Ferreira Rodrigues; Karina Neoob de Carvalho Castro; Maria Izabel Camargo-Mathias. Artigo científico em elaboração.

1 INTRODUCTION

Ticks in general represent a great public health concern for causing considerable livestock losses and for vectoring pathogens, such as bacteria, viruses, protozoa and helminths, affecting domestic/wild animals and humans as well (SONENSHINE; ROE, 2014).

The *Rhipicephalus microplus* (Canestrini, 1888) tick, previously known as *Boophilus microplus*, is the main tick in Brazil that affecting cattle, causing economic losses by blood loss, retardation of calf development and milk production (GHOSH; AZHAHIANAMBI; FUENTE, 2006; HIGA et al., 2015). This tick species is responsible for the transmission of babesiosis (*Babesia bovis* and *B. bigemina*) and anaplasmosis (*Anaplasma marginale*), hemoparasites that cause the diseases named Bovine Babesiosis and Anaplasmosis (BBA) Complex (HIGA et al., 2015). This tick also causes indirect economic harm due to the additional hours of work required for control, additional facility costs, acaricide acquisition and equipment used for its application (HIGA et al., 2015). Recent studies estimate that cattle tick parasitism causes anual losses of about US$ 3.24 billion in Brazil livestock production (GHOSH; AZHAHIANAMBI; FUENTE, 2006; HIGA et al., 2015).

In addition to those diseases, ehrlichioses comprise an emerging group of infectious zoonoses of great importance. It is caused by gram-negative bacteria of the genus *Ehrlichia* (Family Anaplasmataceae, Order Rickettsiales) (KHAMESIPOUR et al., 2018; VIEIRA et al., 2011). *Ehrlichia* organisms are mainly transmitted by the bite of infected ticks (*Amblyomma variegatum*, *A. hebraeum*, *A. americanum*, *R. sanguineus).* This explains the higher prevalence of ehrlichiosis in tropical and subtropical regions according to the geographical distribution of vectors (VIEIRA et al., 2011). Several species such *Ehrlichia* as *E. chaffeensis, E. muris, E. ewingii, E. canis, E. ruminantium* and *E. risticii,* are known to infect humans and cattle, sheep, goats, horses, dogs, deer and small rodents (KHAMESIPOUR et al., 2018; VIEIRA et al., 2011).

In cattle, ehrlichiosis caused by *E. ruminantium* (PETER; BURRIDGE; MAHAN, 2002). This pathogen is found in the African continent and some Caribbean islands, causing over 80% mortality (PETER; BURRIDGE; MAHAN, 2002).

Until recently, only three species of the genus *Ehrlichia* had been reported in Brazil: *E. canis, E. ewingii and E. chaffeensis* (VIEIRA et al., 2011). However,

Cabezas-Cruz et al. (2012) described a new species of this group, *E. minasensis* (CABEZAS-CRUZ et al., 2016). It was originally isolated from hemolymph of engorged *R. microplus* females (CABEZAS-CRUZ et al., 2012) but its infectivity and pathogenicity for cattle are unknow (AGUIAR et al., 2014; CARVALHO et al., 2016). In this sense, studies on this pathogen are still necessary.

The most widely-used method to control ticks is the application of synthetic chemical acaricides (NOLAN, 1985; OLIVEIRA et al., 2011, 2015; PRUETT, 1999). However, the indiscriminate use of such products can lead to the accumulation of chemical residues in the environment, contaminating the soil and water streams, and consequently affecting other animals, including humans (ANHOLETO et al., 2017b; OLIVEIRA; BECHARA; CAMARGO-MATHIAS, 2008).

It has been reported that even in minimum exposures to different pesticides, nontarget organisms can suffer dramatic consequences, such as acute poisoning. Moreover, the residues of such substances seriously affect public health through contamination of the food chain. The use of pesticides indirectly interferes with the entire wild-life, eliminating not only the pests, but also other organisms (nontarget) which play an important role in the biological balance (PRUETT, 1999).

Over the last century, acaricides based on different chemicals (arsenic, organochlorine, organophosphate, carbamate, nitroguanidine, phenilpirazol, formamidine, pyrethroid, avermectin and benzoylphenylurea) have been widely used (HÄUSERMAN et al., 1992). Ticks develop several survival mechanisms and strategies, decreasing the level of chemical penetration into the organism, modifying the metabolism and altering processes of storage and excretion and sites of toxic action. The selection of resistance populations makes the ectoparasites less susceptible to the products; therefore, new active ingredients are launched in the market in an attempt to keep on controlling these pests (NOLAN, 1985).

In this sense, new tick control strategies have been promising, such as the use of anti-tick vaccines and chemical acaricides of natural origin, with active ingredients based on plant extracts (AGNOLIN et al., 2010; ANHOLETO et al., 2017b; CASTRO et al., 2014).

On the other hand, the search for alternative control methods, less polluting, inexpensive and with lower incidence of resistant strains, has been intensified over recent years (ROSADO-AGUILAR et al., 2010). Biological control is one of these strategies, using natural predators, such as the cattle egret (GONZALES, 1995), or

parasites, as *Escherichia coli*, *Cedecea lapagei* and *Enterobacter agglomerans* (BRUM, 1988) and fungi, as *Metarhizium anisopliae,* which parasitize ticks (COSTA et al., 2002)

Another alternative is the use of compounds of natural origin, i.e., products made of plant extracts, whose active ingredients have the potential to control pests (GUERRA et al., 2011).

Acaricides based on plant extracts have proven to be a very promising alternative, especially when the high levels of synthetic acaricide consumption and the toxic effects to the environment and nontarget organisms are considered (BORGES; SOUSA; BARBOSA, 2011; MARTINEZ, 2002). Therefore, the development of further research on plant derivative compounds will certainly form the basis of the formulation of safer and more suitable products to replace the synthetic ones (DIETRICH et al., 2006; PANELLA et al., 2005).

Acmella oleracea (Asteraceae) is a plant found in tropical regions close to the Equator in Africa, Asia and South America. In Brazil, it is popularly known as Jambu, and it is used as a condiment and an ingredient in popular medicine. Its pharmacological activities have been the subject of several studies (BARBOSA et al., 2016; CHENG et al., 2015; FAVORETO; GILBERT, 2010; NOMURA et al., 2013). Recent studies have shown that the extracts of the flowers, leaves and stem of *A. oleracea* have fungistatic, fungicidal and insecticidal properties (BARBOSA et al., 2016; DUBEY et al., 2013; FABRY; OKEMO; ANSORG, 1996; FAVORETO; GILBERT, 2010; NIGRINIS; CARO; OLARTE, 1986; RAMSEWAK, 1999; TORRES; CHÁVEZ, 2001).

Castro et al. (2014) and Oliveira et al. (2016) demonstrated that hexane extracts of *A. oleracea* could have acaricide action, causing death in larvae and engorged females of *R. microplus*, in addition to interfering in the dynamics of the female reproductive system, significantly affecting oviposition and hatchability.

Anholeto et al. (2017), who studied *A. cajennense* ticks exposed to the concentrations of 6.2 to 100 mg/mL of ethanolic extracts of *A. oleracea* reported between 5 and 100% mortality, proportional to the increase in the concentrations. The concentration of 50 mg/mL caused 20% mortality after 1 day of treatment, 60% after 3 days and 70% after 7 days. In the highest concentration (100 mg/ mL), 100% mortality was observed after 24 hours of exposure. Similar results were reported by Roma et al. (2009) and Oliveira et al. (2011), who studied *R. sanguineus* s. l. female ticks exposed

to the synthetic chemicals permethrin and fipronil, widely acknowledged as efficient to control ticks, as the concentrations of these compounds caused mortality in 100% of the individuals 24h after treatment.

In general, the main biological effects reported above have been assigned to spilanthol, also known as affinin [N-2-Metilpropil)-2,6,8-decatrienamida or N-isobutyl-2E*,6Z,8E*-decatrienamida)], an aliphatic alcamid of molecular formula $C_{14}H_{23}NO$ found in high concentrations in the flowers, leaves and stem of *A. oleracea* (RAMSEWAK, 1999).

Spilanthol is a member of the N-alkylamides, many of which have antibacterial, antifungal, analgesic and endocannabinoid agonists (VERYSER et al., 2014)

The first acaricidal activity of spilanthol on *R. microplus* and *Dermacentor nitens* was reported by Cruz et al. (2016). According to the authors, it caused 100% mortality of *R. microplus* larvae at concentration of 1.6 mg/mL and of *D. nitens* larvae at 12.5 mg/mL. However, further studies on this isolated compound are still required.

Considering all the above, the commercial use of spilanthol as an acaricide agent has become a positive perspective. The ingredient has been already used for different purposes, such as oral hygiene, insecticides, bathing products, shampoos, soaps, creams (used to enhance the refreshing sensation), and even as a therapeutic agent to treat rheumatism (CAVALCANTI, 2008).

Experimental animals are still widely used to generate live ticks for the study of acaricidal products. However *in vitro* culture systems, particularly continuous cell lines derived from vector and host tissues, have an invaluable and irreplaceable role in many aspects of tick and tick-borne pathogen research, including basic parasite biology, host–vector–pathogen relationships and disease control (BELL-SAKYI et al., 2007).

Besides, the use of tick cell culture is a promising alternative to the use of experimental animals, as reducing the use of host animals (rabbits for example) is a requirement of regulatory authorities and research ethics committees. In addition, *in vitro* assays for the preliminary screening of new acaricidal substances and developing drugs may be more accurate and safe because these assays allow experimental parameters to be rigorously controlled, reducing the variability between experiments. In addition, these are cheaper as they do not require animal facilities and inputs for breeding and maintenance of tick hosts (COSSIO-BAYUGAR; WAGNER; HOLMAN, 2002; GUZZIE, 1994).

Thus, this study aims at: a) establishing an *in vitro* protocol for the study of acaricidal products using tick cell lines as an alternative to traditional tests using ticks fed on animals; b) investigate the effects of the spilanthol alkyne analogue on two *R. microplus* cell lines: BME/CTVM6, derived from ticks resistant to organophosphates, organochlorines and amitraz, and BME/CTVM2, derived from acaricide-susceptible ticks; c) understand the direct effect of acaricide doses on pathogens carried by ticks.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Source of the spilanthol alkyne analogue

The spilanthol alkyne analogue was kindly provided by Dr. Júlio Cezar Pastre of Instituto de Química, Universidade de Campinas, UNICAMP, São Paulo, Brazil. The product was obtained as described by Alonso et al. (2018).

2.2 Tick cell lines

The BME/CTVM6 tick cell line, derived from *R. microplus* resistant to organophosphates, organochlorines, and amitraz and the BME/CTVM2 tick cell line, derived from acaricide-susceptible *R. microplus* (KOH-TAN et al., 2016) were provided by the Tick Cell Biobank (University of Liverpool, Liverpool, UK). The cell lines were grown at 28°C in sealed flat-sided culture tubes (Nunc) containing 2.2 mL of complete culture medium (L-15 Leibovitz medium supplemented with 10% tryptose phosphate broth, 20% fetal calf serum (Labtech), 2mM L-glutamine, and penicillin (100 U/mL) and streptomycin (100 µg/mL) (Sigma) as previously described by Bell-Sakyi (2004). The medium was replaced weekly and cells were passaged at least every 15 days.

2.3 Viability assay of BME/CTVM6 and BME/CTVM2 cells exposed to spilanthol alkyne analogue

Cells derived from cultures of the same passage level were re-suspended, pooled, counted with a manual haemocytometer and seeded into new tubes (2 mL cell suspension per tube) at the concentration of 1 x 10^6 cells/mL. Subsequently, cultures were incubated with different concentrations of alkyne analogue (8 to 0.00008 mg/mL) (treatments), or with only culture medium (control I) or with ethanol 30% and DMSO 0,1% (control II). After 72 hours of exposure, the counting of the number of cells (viable or dead) was performed by the Trypan blue exclusion method using a manual haemocytometer. The viability data obtained was analysed through one-way analysis of variance (ANOVA) with the application of post hoc test of Tukey, significance levels

set at $p < 0.05$, using the software GraphPad Prism v.6 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA).

2.4 The BME/CTVM6 and BME/CTVM2 cell morphology after exposure to spilanthol alkyne analogue

Before sampling, the cultures were examined in an inverted microscope to assess their state of health. Subsequently, cytocentrifuge smears were prepared with approximately 50 µL of cell suspension from control cultures and cultures treated with the spilanthol alkyne analogue, fixed in methanol, stained with Giemsa stain and photodocumented under a microscope (Axio Imager 2, Carl Zeiss, Jena, Germany). The morphology of the cells exposed to the different concentrations of the product was analysed, comparing them with the control group.

2.5 The action of spilanthol alkyne analogue on the BME/CTVM6 cell line infected with *Ehrlichia minasensis*

Cultures of BME/CTVM6 infected with *Ehrlichia minasensis* (strain UFMG-EV^T, CABEZAS-CRUZ et al., 2016) were provided by Dr Bell-Sakyi. Approximately 2.5 mL cell suspension containing 1 ×10^7 cells infected with *E. minasensis* at a rate >50% was harvested by pipetting and centrifuged at room temperature for 5 min at 200 x g. The cell pellet was resuspended in 500 µL of trypsin (500 µg/mL in PBS) and incubated for 20 min at 37ºC. The original volume was restored by adding complete culture medium and the cell suspension was passed 10 times through a bent 26G needle to mechanically rupture the cells and release the intracellular bacteria. The resulting suspension was centrifuged at room temperature for five minutes at 1500 x g. The supernatant containing cell-free bacteria was collected and 200 µL aliquots were added to uninfected BME/CTVM6 cell cultures growing in flat-sided tubes with complete L-15 medium. Following inoculation, cultures were incubated for seven days before adding the spilanthol alkyne analogue to monitor the effect on the bacterial infection. All experiments followed biosafety standards and guidelines at the University of Liverpool, UK, as these activities have already been developed in the laboratory of Dr Lesley Bell-Sakyi. The BME/CTVM6 cell lines infected and uninfected (control groups) with *E. minasensis* were exposed to 0.2 mg/mL of spilanthol alkyne analogue.

After 7 days, Giemsa-stained cytocentrifuge smears were prepared and examined as above described. Infection rate (% cells infected) was determined by counting the numbers of uninfected cells and cells containing bacterial colonies, to a total of at least 500 tick cells.

3 RESULTS

3.1 Viability and density

In the BME/CTVM6 cells of the control group I (exposed to L-15 medium) and II (L-15 medium and 30% ethanol and 0.1 % DMSO), cell viability was 84.9 and 90.2%, respectively **(Figure 19)**. However, cells exposed to the concentration of 0.8 mg/mL of the spilanthol analogue were nonviable, ie, all cells were dead by the trypan blue test while viability of cells exposed to 0.4 and 0.3 mg/mL of the product was 10 and 41.4% respectively **(Figure 19)**. Cells exposed to concentration of 0.2 mg/mL had viability of 74.3%, not differing significantly from control groups **(Figure 19)**.

The BME/CTVM2 cells of control groups I and II presented viability percentages of 87.7 and 89.8 %, respectively **(Figure 20)**. The cells exposed to concentrations of 8 and 0.7 mg/mL, were all dead (0.0% viability). However, the cells submitted to 0.6 and 0.5 mg/mL of the product, presented viabilities of 21.9 and 56.8%, respectively **(Figure 20)**.

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

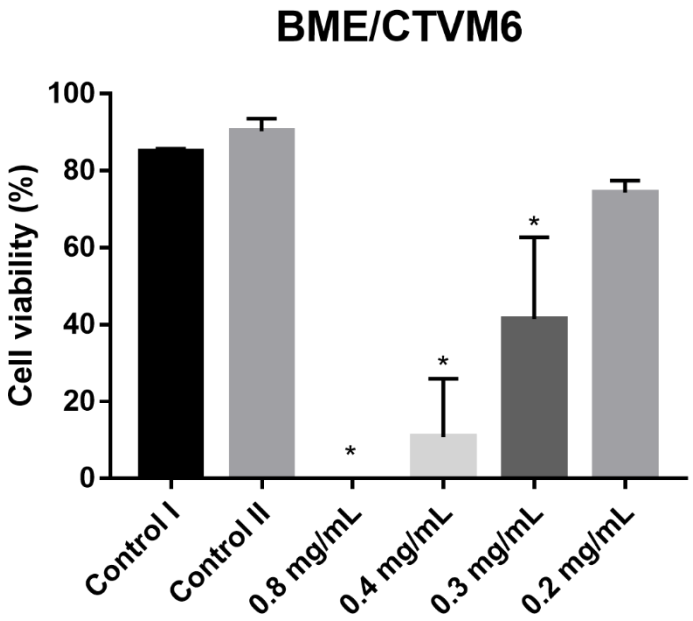
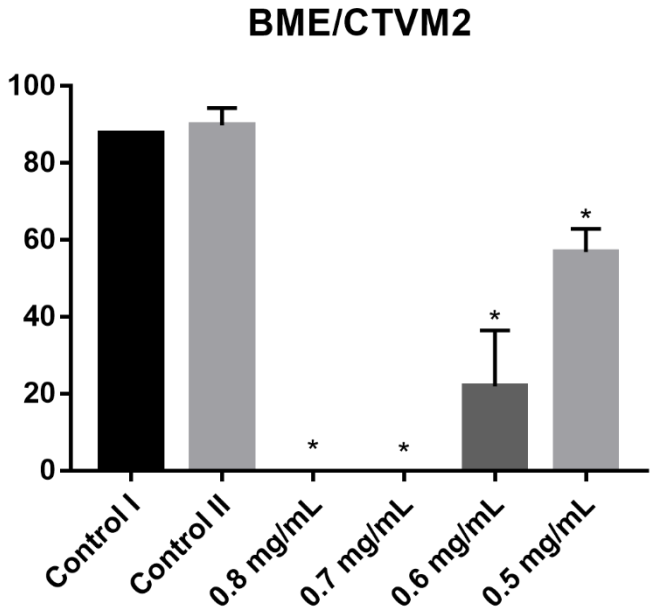


Figure 20. BME/CTVM2 cell viability determined by trypan blue exclusion assay following 72 hours of treatment with spilanthol analogue at concentration of 0.8; 0.7; 0.6 and 0.5 mg/mL.



3.2 The BME/CTVM6 and BME/CTVM2 cell morphology after exposure to spilanthol alkyne analogue

3.2.1 The BME/CTVM6 tick cell line

BME/CTVM2 cells derived from acaricide-resistant ticks belonging to the control groups I **(Figure 21A)** and II **(Figure 21B)** showed preserved morphology as a well-defined cellular limit. The nucleus was rounded and strongly stained by Giemsa and the cytoplasm was full of translucent cytoplasmic vacuoles of varying sizes, whose chemical composition was not determined by the Giemsa technique

In the groups of cells exposed to 0.2 **(Figure 21C)** and 0.3 mg/mL **(Figure 21D)** of the spilanthol analogue, the cell morphology was preserved.

The BME/CTVM6 cells exposed to 0.4 **(Figure 21E)** of the spilanthol analogue showed increase of cytoplasmic vacuoles and the cells exposed to 0.8 mg/mL **(Figure 21F)** showed altered cell morphology. The nucleus was smaller when compared to those in the control group and strongly stained by Giemsa (pyknotic). The cytoplasm was disarranged, and it was not possible to observe the presence of cytoplasmic vacuoles and it was not possible to define the cell limit.

3.2.2 The BME/CTVM2 tick cell line

The BME/CTVM2 cells derived from *R. microplus* susceptible ticks to acaricides from control groups I **(Figure 22A)** and II **(Figure 22B)** showed preserved morphology. The nucleus was rounded and strongly stained by Giemsa. In the cytoplasm it was possible to observe translucent and varied size cytoplasmic vacuoles, whose chemical nature could not be determined by the applied technique. The cellular limit was well defined.

In the groups of cells exposed to 0.5 **(Figure 22C)** and 0.6 mg/mL **(Figure 22D)** of the spilanthol analogue, the nucleus was preserved. In the cytoplasm, were observed cytoplasmic vacuoles of larger size than those of the control group.

The BME/CTVM2 cells exposed to 0.7 **(Figure 22E)** and 0.8 mg/mL **(Figure 22F)** of the spilanthol analogue showed altered cell morphology. The nucleus was smaller when compared to those in the control group and strongly stained by

Giemsa (pyknotic). The cytoplasm was disarranged, and it was not possible to observe the presence of cytoplasmic vacuoles and it was not possible to define the cell limit.

3.2.3 The action of spilanthol alkyne analogue on the BME/CTVM6 cell lines infected with *Ehrlichia minasensis*

Uninfected BME/CTVM6 cells **(Figures 23A-C)** from control groups I (exposed to the L-15 medium) **(Figure 23A)**, II (exposed to the L-15 medium, 30% ethanol and 0.1 % DMSO) **(Figure 23B)** and the treatment group exposed to 0.2 mg/mL of the spilanthol analogue **(Figure 23C)** showed no morphological alterations and no infection with bacteria. The BME/CTVM6 cells infected with *E. minasensis* **(Figure 23D-F)** also showed preserved morphology, but it was possible to detect small colonies of bacteria in their cytoplasm. Light microscopy revealed that the proportion of *E. minasensis*-infected cells was reduced by nearly two-thirds (0.29% compared to 0.88%) in cultures exposed to the spilanthol analogue **(Figure 24)**.

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

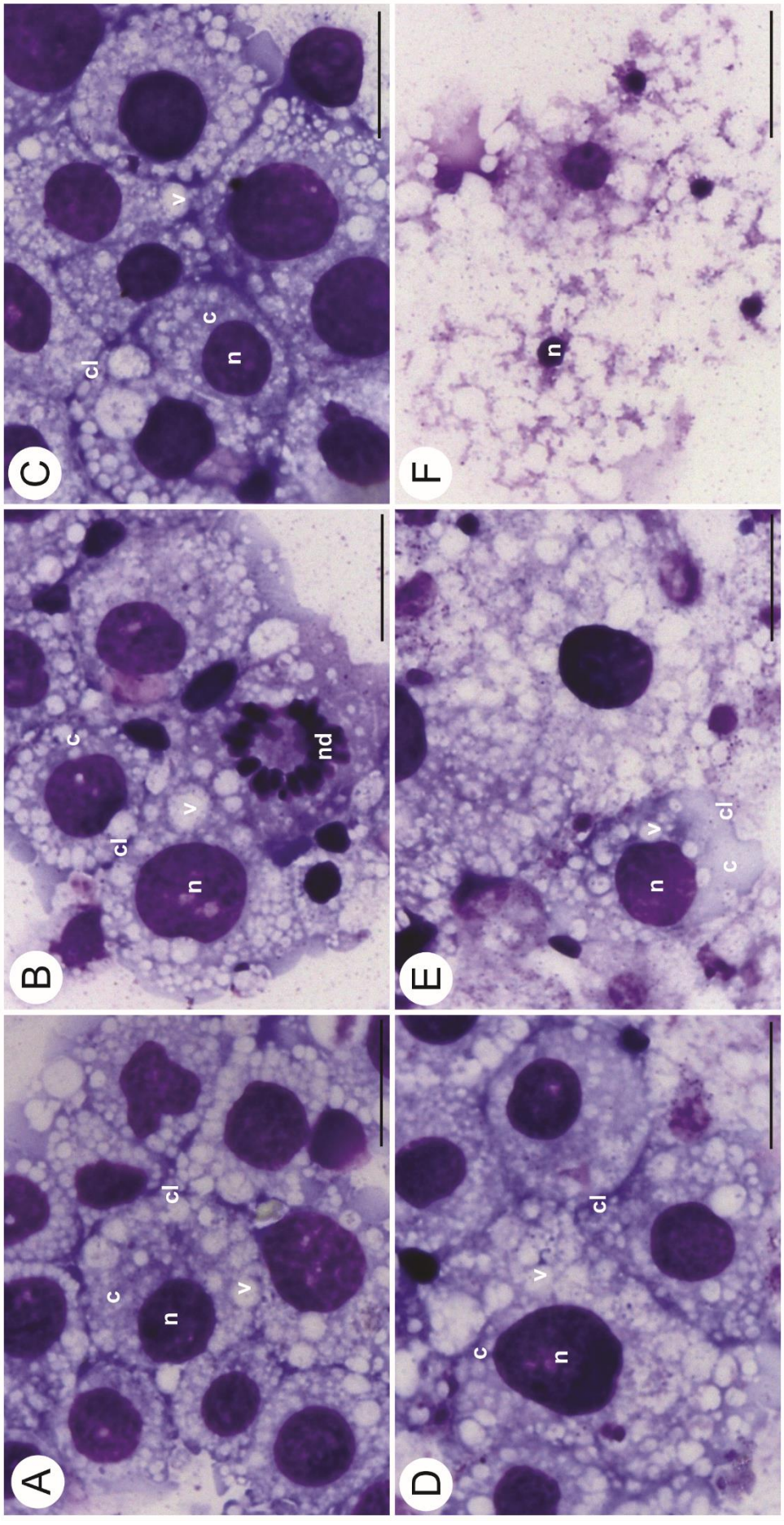

A
c
n
cl
v
B
c
cl
v
n
nd
C
v
c
n
cl
D
c
n
v
cl
E
n
v
c
cl
F
n

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

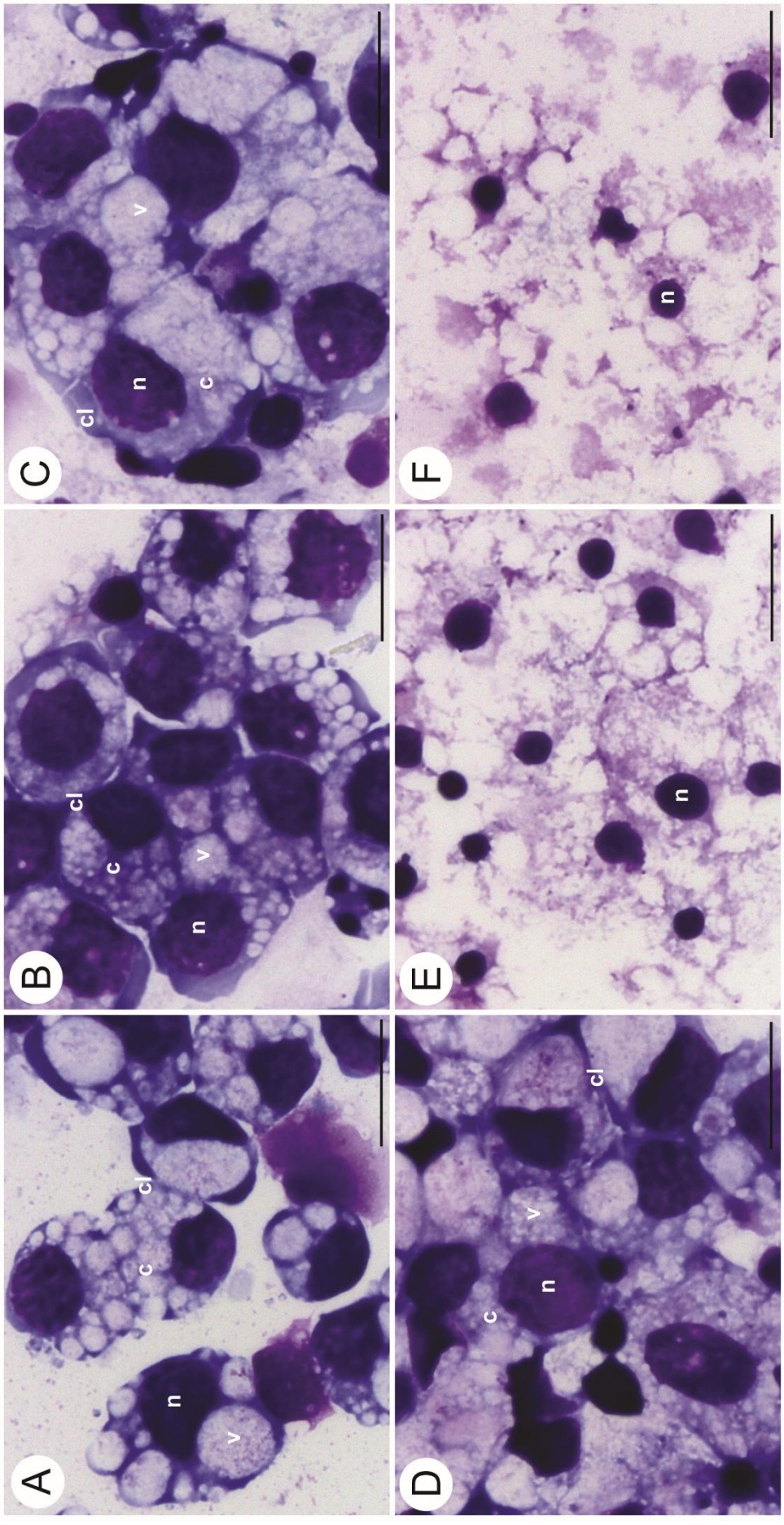

A
n
v
c
cl
B
cl
c
v
n
C
cl
n
c
v
D
cl
v
n
c
E
n
F
n

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

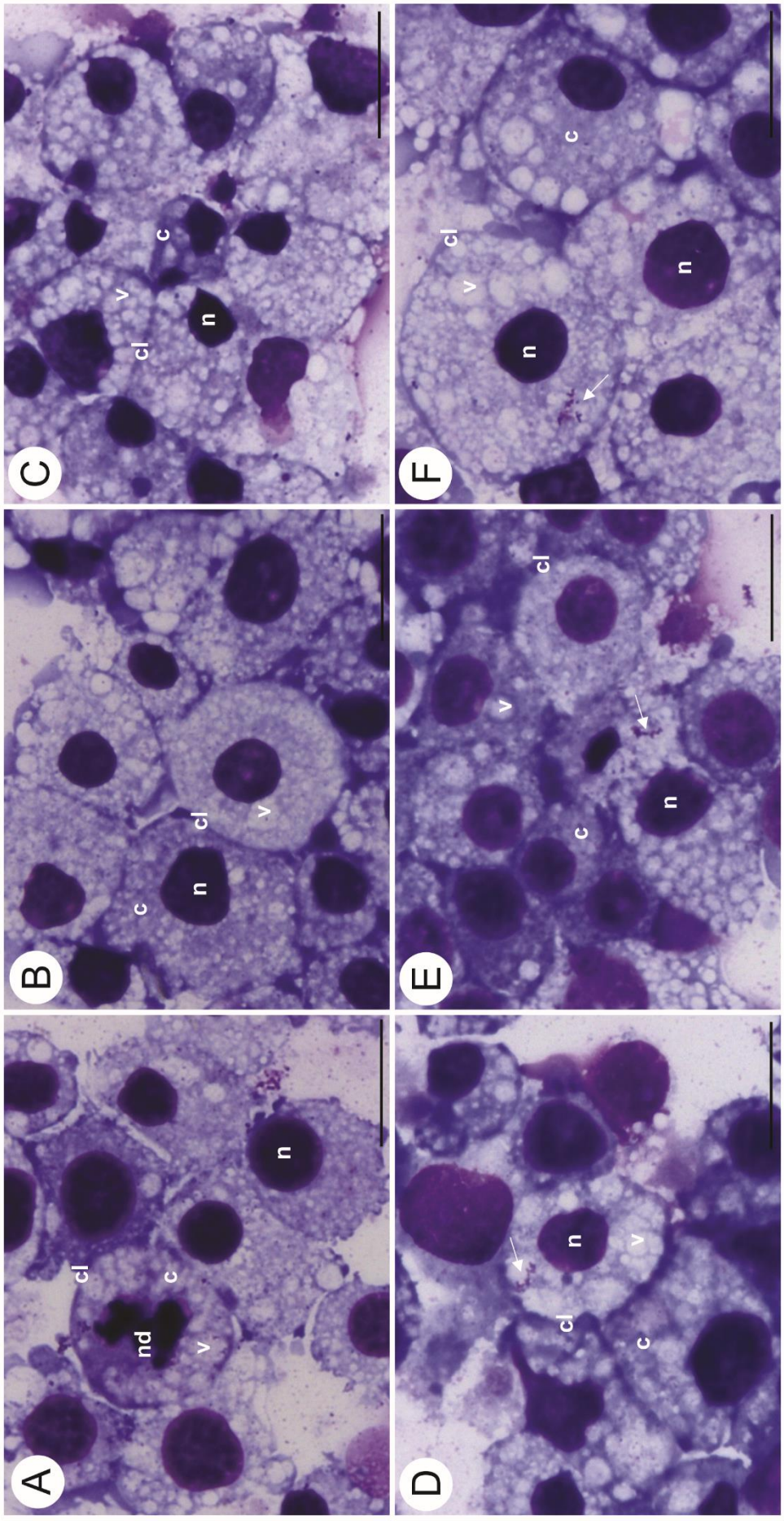
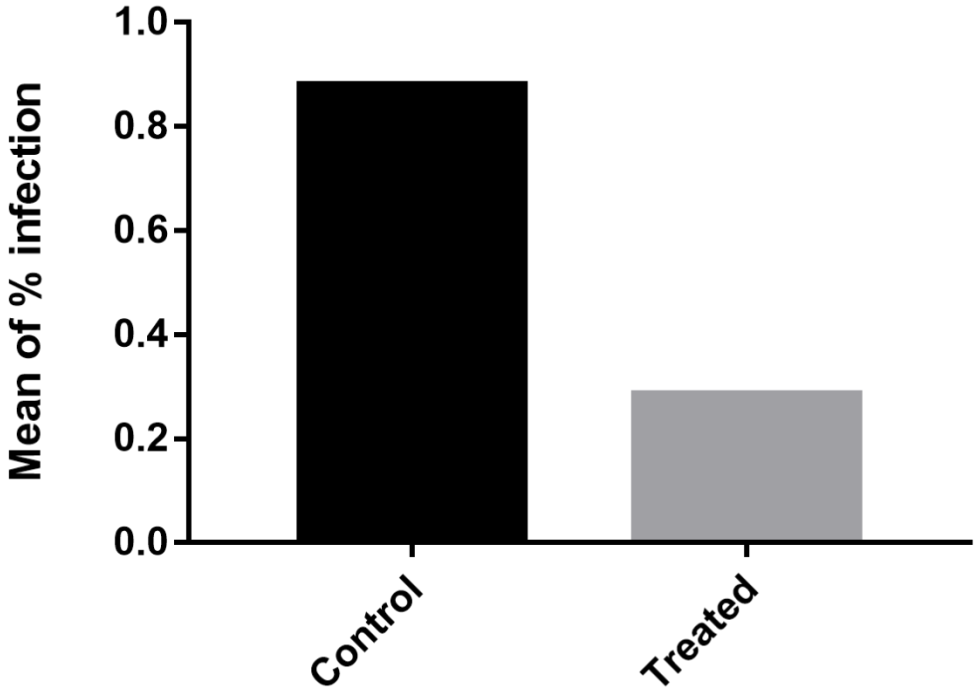

A
cl
nd
c
v
n
B
c
n
cl
v
C
c
v
cl
n
D
cl
n
v
c
E
cl
v
c
n
F
c
cl
v
n
n

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



4 DISCUSSION

Identification and development of novel acaricidal compounds is a prolonged and expensive procedure, requiring the use of large numbers of small and large laboratory animals both to test their safety and efficacy on ticks feeding on hosts, and to generate sufficient numbers of ticks of all life cycle stages to carry out this testing (CAMARGO-MATHIAS, 2018).

The cattle tick *Rhipicephalus microplus* is the most widespread and economically important tick species worldwide, transmitting *Anaplasma* and *Babesia* to its bovine hosts (GHOSH; AZHAHIANAMBI; FUENTE, 2006; HIGA et al., 2015; WALL; SHEARER, 1997). *R. microplus* is notorious for its ability to rapidly develop resistance to any new acaricide and this problem is widespread and increasingly serious in Brazil (HIGA et al., 2015).

There is an urgent need for new acaricidal products to replace those currently available, to which ticks are rapidly developing resistance, and therefore for a new approach to initial identification of novel compounds with acaricidal potential that will be cheaper and more ethical than the present protocols based on whole ticks feeding on animals (BELL-SAKYI et al., 2007; MANGIA et al., 2018; NOLAN, 1985). Tick cell lines offer great potential as a cheap and highly reproducible preliminary *in vitro* screen for identification of compounds with potential acaricidal activity that would significantly reduce the number of experimental animals required for product development (BELL-SAKYI et al., 2007; MANGIA et al., 2018). In addition, the use of cell lines reduces the use of animals *in vivo*, which today is a concern and even a requirement of regulatory agencies that control research using vertebrate animals. Moreover, they have already been used successfully in a variety of *in vitro* studies on the mode of action of known chemical acaricides complementing and broadening previous studies carried out in Brazil on chemical and natural plant-based compounds (KOH-TAN et al., 2016; MANGIA et al., 2018).

In this sense, this study sought to establish an *in vitro* protocol for the study of acaricidal products using tick cell lines as an alternative to traditional tests using ticks. Specifically, the research sought to investigate the effects of spilanthol alkyne analogue on two *R. microplus* cell lines: BME/CTVM6, derived from ticks resistant to organophosphates, organochlorines and amitraz, and BME/CTVM2, derived from acaricide-susceptible ticks.

Initially, the trypan blue exclusion test was used to analyse the viability of cells with or without exposure to the products. Experiments were performed to determine the lethal concentration capable of killing 50% of the BME/CTVM6 and BME/CTVM2 tick cell lines when exposed to alkyne spilanthol analogue. The results obtained here showed that the BME/CTVM6 and BME/CTVM2 cells of the control groups I, when exposed only to the L-15 culture medium, and II, when exposed to the L-15 culture medium, 30% ethanol and 0.1% of DMSO, presented viability greater than 80%. BME/CTVM6 cells exposed to the concentration of 0.8 mg/mL of the spilanthol analogue were found to be nonviable, ie, by the trypan blue test all cells were dead while cells exposed to 0.4 and 0.3 mg/mL of the product showed viability of 10 and 41.4% respectively. The cells exposed to the concentrations of 0.2 mg/mL showed viability percentages of 74.3%, not differing significantly from those of the control groups. The BME/CTVM2 cells exposed to concentrations of 8 and 0.7 mg/mL, were dead (0.0% viability). However, the cells submitted to 0.6 and 0.5 mg/mL of the product, presented viabilities of 21.9 and 56.8%, respectively. The action of spilanthol on ticks *R. microplus* has been reported by Cruz et al. (2016) when studying the effects of this product on unfed larvae, however the data reported here for the tick cell lines are new. The same authors reported that the concentrations of 0.8 and 0.4 mg/mL of spilanthol were able to cause death of 91.3 and 83.2% of the exposed larvae, a similar concentration reported here. However, there are no data in the literature on the acaricidal action of the spilanthol analogue, since this product is newly isolated and synthesized (ALONSO et al., 2018)

Spilanthol is the major component of extracts obtained from aerial parts of *A. oleracea.* Anholeto et al. (2016), who studied *A. cajennense* ticks exposed to the concentrations of 6.2 to 100 mg/mL of the ethanolic extract obtained from the flowers of *A. oleracea* with spilanthol reported 5 to 100% of mortality, proportionally to the increase in the concentrations. The concentration of 50 mg/mL caused 20% of mortality after 1 day of treatment, 60% after 3 days and 70% after 7 days. In the highest concentration (100 mg/mL), 100% of mortality was observed 24 hours after of exposure. The same authors demonstrated that the crude extract of *A. oleracea* at the concentrations of 25 and 50 mg/mL presented significant mortality rates after 24h of exposure. In the highest concentration (100 mg/mL) 100% mortality was observed 72 hours after exposure, corroborating Castro et al. (2014), who reported an increase in mortality corresponding to 20.7, 26.6 and 59.2% in *R. microplus* exposed to hexane

extract of *A. oleracea* at concentrations of 25, 50 and 100 mg/mL, respectively. It was expected that the concentration capable of causing death of the tick cell lines would be lower than those reported for adult ticks, as in cell culture the product is in direct contact with the surface of the cells, that is, there are no barriers such as the integument, to prevent penetration and entry of products into cells.

Cell morphology was assessed to determine if any of the products had an evident cytopathic effect at the doses used. The BME/CTVM6 and BME/CTVM2 cells of the control groups I and II and those exposed to the lowest concentrations of spilanthol analogue (0.2 and 0.3 mg/mL) had preserved morphology. However, BME/CTVM6 cells exposed to spilanthol analogue at the concentration of 0.8 mg/mL and BME/CTVM2 cells exposed to spilanthol analogue at the concentrations of 0.7 and 0.8 mg/mL showed altered morphology as undefined cell limit, as well as a reduction of the cytoplasm and nucleus, indicating a possible cellular death process. The cytotoxic potential of spilanthol, the major compound presented in extracts of *A. oleracea*, was reported by Anholeto et al. (2018) when studying the action of the extract in the female reproductive system (oocytes) of *A. cajennense* ticks. Ovaries of semi-engorged *A. cajennense* females exposed to three concentrations (3.1, 6.2 and 12.5 mg/mL) of an ethanolic extract of the plant *A. oleracea* showed morphological and histochemical changes as compared to non-treated organs, mainly in the oocytes in initial developmental stages (I and II). Additionally, an important result obtained by Anholeto et al. (2018) was that the cytotoxic potential of the *A. oleracea* ethanolic extract was very similar to those observed by Oliveira et al. (2008; 2009) and Roma et al. (2010), who tested the synthetic acaricides fipronil and permethrin on *R. sanguineus*, respectively, indicating the natural chemicals as a potential control strategy. This cytotoxic potential was evidenced by the alterations being mainly associated with the morphology of the germinative cells and yolk granules; presence, number, size and location of vacuoles in the cytoplasm and nuclear alterations in the germinative cells.

Until recently only three species of the genus *Ehrlichia* had been reported in Brazil: *E. canis, E. ewingii and E. chaffeensis* (VIEIRA et al., 2011). However, Cabezas-Cruz et al. (2012) described a new species: *E. minasensis* (UFMG-EV^T strain) (CABEZAS-CRUZ et al., 2016), originally isolated from haemolymph of engorged female *R. microplus* ticks. This bacteria (*E. minasensis* UFMG-EV^T strain)

can be cultivated in cell lines of several ticks species. However, its potential for infection and pathogenicity to cattle is still unknown (CARVALHO et al., 2016).

Published studies on acaricides and acaricide resistance have focused on the direct effects on ticks and the indirect effects of reduction of tick burdens on disease incidence, but no studies have examined the direct effect of sublethal acaricide doses on pathogens carried by ticks. If ticks survive acaricide application, either because they are resistant or because the dose applied was insufficient to kill them, they may go on to infest new hosts and potentially transmit pathogens they harbor. Tick cell lines offer an opportunity to examine the potential effects of sub-lethal doses of acaricides on intracellular tick-borne bacteria that can be propagated *in vitro*. It is not known whether acaricide exposure has any direct effect on intracellular tick-borne pathogens or indirectly, affecting tick ability to transmit them; such effects would have important implications for the role of acaricides in integrated tick and tick-borne disease control. In this way, the present study sought to investigate the direct effect of sublethal acaricide doses on pathogens carried by ticks; for this, one of the tick cell lines was infected with the obligate intracellular bacterium *E. minasensis*. Then, infected and uninfected cells (control) were exposed to the concentration of 0.2 mg/mL of the spilanthol alkyne analogue.

According to Cabezas-Cruz et al. (2016), tick cell lines ISE18, IRE/CTVM20, BME/CTVM2 and BME/CTVM6 were successfully infected with *Ehrlichia* sp. UFMG-EV initial bodies originating from infected IDE8 cultures. In the present study, while the infection rate detectable by light microscopy was low, there was a clear reduction in percentage of infected cells of nearly two-thirds following spilanthol analogue treatment. Uninfected BME/CTVM6 cells from control groups I, II and the treatment group exposed to 0.2 mg/mL of the spilanthol analogue showed no morphological alterations, confirming that this was a sub-lethal dose.

In conclusion, the results clearly demonstrated that the use of the spilanthol alkyne analogue could be a promising strategy to control ticks. However, studies are still needed to examine in more detail the potential effects on intracellular tick-borne bacteria that can be propagated *in vitro* when exposed to sub-lethal doses of acaricides.

5 ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank the Tick Cell Biobank and the Institute of Infection and Global Health, University of Liverpool, Dr. Júlio Cezar Pastre (UNICAMP), Msc. Guilherme Andrade Brancaglion (UNICAMP), Msc. Natália Rubio Claret Pereira (UNICAMP), Dr. Patrícia Rosa de Oliveira (UFMA), Dr. Rodney Alexandre Ferreira Rodrigues (UNICAMP) and Dr. Karina Neoob de Carvalho Castro (EMBRAPA Meio-Norte) for the support. The author thanks São Paulo Research Foundation (FAPESP) Grant no. 2018/08166-9 (BEPE) and Grant no. 2015/01496-5 for their financial support.

REFERENCES

AGNOLIN, C. A.; OLIVO, C. J.; LEAL, M. L. R.; BECK, R. C. R.; MEINERZ, G. R.; PARRA, C. L. C.; MACHADO, P. R.; FOLETTO, V.; BEM, C. M.; NICOLODI, P. R. S. . Eficácia do óleo de citronela [*Cymbopogon nardus* (L.) Rendle] no controle de ectoparasitas de bovinos. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 12, n. 4, p. 482–487, 2010.

AGUIAR, D. M.; ZILIANI, T. F.; ZHANG, X.; MELO, A. L. T.; BRAGA, Í. A.; WITTER, R.; FREITAS, L. C.; RONDELLI, A. L. H.; LUIS, M. A.; SORTE, E. C. B.; JAUNE, F. W.; SANTARÉM, V. A.; HORTA, M. C.; PESCADOR, C. A.; COLODEL, E. M.; SOARES, H. S.; PACHECO, R. C.; ONUMA, S. S. M.; LABRUNA, M. B.; MCBRIDE, J. W. A novel *Ehrlichia* genotype strain distinguished by the TRP36 gene naturally infects cattle in Brazil and causes clinical manifestations associated with ehrlichiosis. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 5, n. 5, p. 537–544, 2014.

ALONSO, I. G.; YAMANE, L. T.; FREITAS-BLANCO, V. S.; NOVAES, L. F. T.; FRANZ-MONTAN, M.; PAULA, E.; RODRIGUES, M. V. N.; RODRIGUES, R. A. F.; PASTRE, J. C. A new approach for the total synthesis of spilanthol and analogue with improved anesthetic activity. **Tetrahedron**, v. 74, n. 38, p. 5192–5199, 2018.

ANHOLETO, L. A.; OLIVEIRA, P. R.; RODRIGUES, R. A. F.; SPINDOLA, C. D. S.; LABRUNA, M. B.; PIZANO, M. A.; CASTRO, K. N. C.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Potential action of extract of *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen to control *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) ticks. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 8, n. 1, p. 65–72, 2017.

ANHOLETO, L. A.; OLIVEIRA, P. R.; RODRIGUES, R. A. F.; YAMANE, L. T.; CASTRO, K. N. C.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Morphological alterations in the ovaries of *Amblyomma cajennense* semi-engorged ticks exposed to ethanolic extract of *Acmella oleracea*. **Microscopy Research and Technique**, v. 81, n. 11, p. 1347–1357, 2018.

BARBOSA, A. F.; CARVALHO, M. G.; SMITH, R. E.; SABAA-SRUR, A. U. O.

Spilanthol: occurrence, extraction, chemistry and biological activities. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, n. 1, p. 128–133, 2016.

BELL-SAKYI, L. *Ehrlichia ruminantium* grows in cell lines from four ixodid tick genera. **Journal of comparative pathology**, v. 130, n. 4, p. 285–93, 2004.

BELL-SAKYI, L.; ZWEYGARTH, E.; BLOUIN, E. F.; GOULD, E. A.; JONGEJAN, F. Tick cell lines: tools for tick and tick-borne disease research. **Trends in Parasitology**, v. 23, n. 9, p. 450–457, 2007.

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

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

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

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

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

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

CARVALHO, I. T. S.; MELO, A. L. T.; FREITAS, L. C.; VERÇOZA, R. V.; ALVES, A. S.; COSTA, J. S.; CHITARRA, C. S.; NAKAZATO, L.; DUTRA, V.; PACHECO, R. C.; AGUIAR, D. M. Minimum infection rate of *Ehrlichia minasensis* in *Rhipicephalus microplus* and *Amblyomma sculptum* ticks in Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 7, n. 5, p. 849–852, jul. 2016.

CASTRO, K. N. C.; LIMA, D. F.; VASCONCELOS, L. C.; LEITE, J. R. S. A.; SANTOS, R. C.; PAZ NETO, A. A.; COSTA-JÚNIOR, L. M. Acaricide activity in vitro of *Acmella oleracea* against *Rhipicephalus microplus.* **Parasitology Research**, v. 113, n. 10, p. 3697–701, 2014.

CAVALCANTI, V. M. S. **Extração de espilantol de *Spilanthes acmella var oleraceae* com dióxido de carbono supercrítico**. Tese (Doutorado em Engenharia Química) Campinas - SP: Universidade Estadual de Campinas, 2008.

CHENG, Y.; LIU, R.; HO, M.; WU, T.; CHEN, C.; LO, I.; HOU, M.; YUAN, S.; WU, Y.; CHANG, F. Alkylamides of *Acmella oleracea*. **Molecules**, v. 20, n. 4, p. 6970–6977,

16 abr. 2015.

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.

COSTA, G. L.; SARQUIS, M. I. M.; MORAES, A. M. L.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Isolation of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* from *Boophilus microplus* tick (Canestrini, 1887), in Rio de Janeiro State, Brazil. **Mycopathologia**, v. 154, n. 4, p. 207–9, 2002.

CRUZ, P. B.; BARBOSA, A. F.; ZERINGÓTA, V.; MELO, D.; NOVATO, T.; FIDELIS, Q. C.; FABRI, R. L.; CARVALHO, M. G.; OLIVEIRA SABAA-SRUR, A. U.; DAEMON, E.; MONTEIRO, C. M. O. Acaricidal activity of methanol extract of *Acmella oleracea* L. (Asteraceae) and spilanthol on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 228, p. 137–143, 2016.

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

DIETRICH, G.; DOLAN, M. C.; PERALTA-CRUZ, J.; SCHMIDT, J.; PIESMAN, J.; EISEN, R. J.; KARCHESY, J. J. Repellent activity of fractioned compounds from *Chamaecyparis nootkatensis* essential oil against nymphal *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 43, n. 5, p. 957–961, 2006.

DUBEY, S.; MAITY, S.; SINGH, M.; SARAF, S. A.; SAHA, S. Phytochemistry, pharmacology and toxicology of *Spilanthes acmella*: A Review. **Advances in Pharmacological Sciences**, v. 2013, p. 423750, 2013.

FABRY, W.; OKEMO, P.; ANSORG, R. Fungistatic and fungicidal activity of east African medicinal plants. **Mycoses**, v. 39, n. 1–2, p. 67–70, 1996.

FAVORETO, R.; GILBERT, B. Estado da Arte/State of the Art - *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen (Asteraceae) – Jambu. **Revista Fitos**, v. 5, n. 1, p. 83–91, 2010.

GHOSH, S.; AZHAHIANAMBI, P.; FUENTE, J. Control of ticks of ruminants, with special emphasis on livestock farming systems in India: present and future possibilities for integrated control - a review. **Experimental & Applied Acarology**, v. 40, n. 1, p. 49–66, 2006.

GONZALES, J. C. **O Controle do Carrapato do Boi**. Porto Alegre: UPF, 1995.

GUERRA, A. T.; GADELHA, C. A. A.; REIS, C. M. M.; SILVA, H. S. DA; SANTOS, L. F. M.; BARBOSA, M. R. V.; VASCONCELLOS, M. L. A. A.; LINDEN, M. M. G. VAN DER; SANTOS, P. R. P. **Biologia e Fisiologia Celular**. 1. ed. João Pessoa: Editora Universitária, 2011.

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

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

HIGA, L. O. S.; GARCIA, M. V.; BARROS, J. C.; KOLLER, W. W.; ANDREOTTI, R. Acaricide Resistance Status of the *Rhipicephalus microplus* in Brazil: A Literature Overview. **Medicinal Chemistry**, v. 5, n. 7, 21 jul. 2015.

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

KOH-TAN, H. H. C.; STRACHAN, E.; COOPER, K.; BELL-SAKYI, L.; JONSSON, N. N. Identification of a novel β-adrenergic octopamine receptor-like gene (βAOR-like) and increased ATP-binding cassette B10 (ABCB10) expression in a *Rhipicephalus microplus* cell line derived from acaricide-resistant ticks. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p. 425, 2016.

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

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

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

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

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

OLIVEIRA, P. R.; BECHARA, G. H.; MARIN-MORALES, M. A.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Action of the chemical agent fipronil on the reproductive process of semi-engorged females of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). Ultrastructural evaluation of ovary cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 6, p. 1255–1264, 2009.

OLIVEIRA, P. R.; BECHARA, G. H.; DENARDI, S. E.; PIZANO, M. A.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Toxicity effect of the acaricide fipronil in semi-engorged females of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): preliminary determination of the minimum lethal concentration and LC(50). **Experimental Parasitology**, v. 127, n. 2, p. 418–22, 2011.

OLIVEIRA, P. R.; PIZANO, M. A.; REMÉDIO, R. N.; BECHARA, G. H.; ABREU, R. M. M.; CAMARGO MATHIAS, M. I. Potential of the chemical dinotefuran in the control of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) semi-engorged female ticks. **Experimental Parasitology**, v. 155, p. 82–88, 2015.

OLIVEIRA, P. R.; CASTRO, K. N. C.; ANHOLETO, L. A.; CAMARGO MATHIAS, M. I.

Cytotoxic effects of extract of *Acmella oleraceae* (Jambú) in *Rhipicephalus microplus* females ticks. **Microscopy Research and Technique**, v. 79, n. 8, p. 744–753, 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, 2008.

PANELLA, N. A.; DOLAN, M. C.; KARCHESY, J. J.; XIONG, Y.; PERALTA-CRUZ, J.; KHASAWNEH, M.; MONTENIERI, J. A.; MAUPIN, G. O. Use of novel compounds for pest control: insecticidal and acaricidal activity of essential oil components from heartwood of Alaska yellow cedar. **Journal of Medical Entomology**, v. 42, n. 3, p. 352–8, 1 2005.

PETER, T. F.; BURRIDGE, M. J.; MAHAN, S. M. *Ehrlichia ruminantium* infection (heartwater) in wild animals. **Trends in Parasitology**, v. 18, n. 5, p. 214–218, 2002.

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

RAMSEWAK, R. Bioactive N-isobutylamides from the flower buds of *Spilanthes acmella*. **Phytochemistry**, v. 51, n. 6, p. 729–732, 1999.

REMEDIO, R. N.; NUNES, P. H.; ANHOLETO, L. A.; OLIVEIRA, P. R.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Morphological effects of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) seed oil with known azadirachtin concentrations on the oocytes of semi-engorged *Rhipicephalus sanguineus* ticks (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v. 114, n. 2, p. 431–44, 2015.

ROMA, G. C.; OLIVEIRA, P. R.; PIZANO, M. A.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Determination of LC(50) of permethrin acaricide in semi-engorged females of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). **Experimental Parasitology**, v. 123, n. 3, p. 269–72, 2009.

ROMA, G. C.; FURQUIM, K. C. S.; BECHARA, G. H.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Permethrin-induced morphological changes in oocytes of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) semi-engorged females. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 3, p. 825–830, 2010.

ROSADO-AGUILAR, J. A.; AGUILAR-CABALLERO, A.; RODRIGUEZ-VIVAS, R. I.; BORGES-ARGAEZ, R.; GARCIA-VAZQUEZ, Z.; MENDEZ-GONZALEZ, M. Acaricidal activity of extracts from *Petiveria alliacea* (Phytolaccaceae) against the cattle tick, *Rhipicephalus* (Boophilus) *microplus* (Acari: ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 168, n. 3–4, p. 299–303, 2010.

SONENSHINE, D. E.; ROE, R. M. **Biology of ticks**. 2ª ed. United States of America: Oxford University Press, 2014.

TORRES, J. M.; CHÁVEZ, A. G. Alcamidas en plantas: distribución e importancia. **Avance y Perspectiva**, v. 20, n. Noviembre-Diciembre, p. 377–387, 2001.

VENDRAMINI, M. C. R.; CAMARGO-MATHIAS, M. I.; FARIA, A. U.; BECHARA, G. H.; OLIVEIRA, P. R.; ROMA, G. C. Cytotoxic effects of andiroba oil (*Carapa guianensis*) in reproductive system of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) semi-engorged females. **Parasitology Research**, v. 111, n. 5, p.

1885–1894, 2012.

VERYSER, L.; WYNENDAELE, E.; TAEVERNIER, L.; VERBEKE, F.; JOSHI, T.; TATKE, P.; SPIEGELEER, B. N-alkylamides: from plant to brain. **Functional Foods in Health and Disease**, v. 4, n. 46, p. 264–275, 2014.

VIEIRA, R. F. C.; BIONDO, A. W.; GUIMARÃES, A. M. S.; SANTOS, A. P.; SANTOS, R. P.; DUTRA, L. H.; DINIZ, P. P. V. P.; MORAIS, H. A.; MESSICK, J. B.; LABRUNA, M. B.; VIDOTTO, O. Ehrlichiosis in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 1, p. 01–12, 2011.

WALL, R.; SHEARER, D. **Veterinary entomology**. London: Chapman and Hall, 1997.

DISCUSSÃO GERAL

5 DISCUSSÃO GERAL

O controle de carrapatos vem, estimulando a busca por diferentes métodos que sejam eficazes, porém, que causem danos mínimos aos organismos não alvos, bem como ao ambiente (OLIVEIRA et al., 2009; OLIVEIRA; BECHARA; CAMARGO-MATHIAS, 2008; ROMA et al., 2009). O método mais utilizado é aquele químico com acaricidas de natureza sintética os quais, no entanto, apresentam sérios inconvenientes tais como altos preços e ainda a necessidade de equipamentos, instalações e mão-de-obra adequados para a sua aplicação (NOLAN, 1985; PRUETT, 1999). Ademais, os seus resíduos químicos levam à contaminação do solo, cursos d'água, além da fauna e da flora, comprometendo inclusive a saúde humana (NOLAN, 1985; OLIVEIRA et al., 2009; OLIVEIRA; BECHARA; CAMARGO-MATHIAS, 2008; PRUETT, 1999; ROMA et al., 2009).

Estratégias de controle que façam uso de acaricidas obtidos a partir de compostos extraídos de plantas tem sido consideradas (BORGES; SOUSA; BARBOSA, 2011; DIETRICH et al., 2006; MATOS et al., 2014b; PANELLA et al., 2005; REMEDIO et al., 2015; VENDRAMINI et al., 2012) e diante desse cenário, plantas da família Meliaceae, incluindo dos gêneros *Melia* (OELRICHS et al., 1983)*, Trichilia, Toona, Aglaia, Azadirachta* (MARTINEZ, 2002)*, Carapa* (VENDRAMINI et al., 2012) e espécies da família Asteraceae como *Calea serrata, Artemisia annua* (CHAGAS et al., 2011; RIBEIRO et al., 2008) e *Acmella oleracea*, têm sido reconhecidas como

promissoras no controle de populações de artrópodes (CASTRO et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2016b).

Spilanthes acmella var oleracea ou *Spilanthes oleracea* ou *Acmella oleracea* é uma planta introduzida no Brasil e atualmente encontrada em regiões tropicais próximas à linha do Equador na África, Ásia e América do Sul (FAVORETO; GILBERT, 2010), sendo popularmente conhecida como jambu, agrião-do-pará, agrião-do-norte ou agrião-bravo com grande emprego na culinária local (FAVORETO; GILBERT, 2010). Suas partes aéreas (flores, folhas e caule) quando ingeridas provocam leve formigamento na língua, resultado do efeito anestésico dos metabólitos secundários nelas presentes (DUBEY et al., 2013; FAVORETO; GILBERT, 2010; RAMSEWAK, 1999). Além da culinária, ela é também utilizada na medicina popular como potente analgésico e anestésico local em aftas, herpes, afecções da garganta, além de apresentar atividades fungistática, fungicida e inseticida (FABRY; OKEMO; ANSORG, 1996; NIGRINIS; CARO; OLARTE, 1986; RAMSEWAK, 1999; TORRES; CHÁVEZ, 2001).

O extrato de *A. oleracea* tem mostrado potencial para controlar a proliferação de artrópodes, principalmente contra larvas de *Aedes aegypti* (Dipera), de adultos da *Plutella xylostella* (Lepidoptera) e da barata americana (*Periplaneta americana)* (Blattodea) (KADIR et al., 1989; RAMSEWAK, 1999; SHARMA et al., 2012). Estudos recentes de Castro et al. (2014) e Oliveira et al. (2016) demostraram também a atividade acaricida, visto que extratos aplicados contra carrapatos *Rhipicephalus microplus* controlaram larvas e fêmeas ingurgitadas.

Diversos compostos já foram identificados em extratos obtidos de *A. oleracea*, tais como óleos voláteis (beta cariofileno, limoneno e timol), fenólicos (ácido vanílico e ácido trans-ferulico), fitoesteróis (estigmasterol e β-sitosterol), polissacarídeos (ramnogalacturonana), cumarina (escopoletina) e alquilamidas (BARBOSA et al., 2016; CAVALCANTI, 2008; PRACHAYASITTIKUL et al., 2013; SARAF; DIXIT, 2002; SPELMAN et al., 2011) tendo sido demonstrado que os efeitos biológicos seriam em decorrência da presença do espilantol ou afinina [N-2-Metilpropil)-2,6,8-decatrienamida ou N-isobutil-2*E,6Z,8E*-decatrienamida)], uma alcamida alifática ($C_{14}H_{23}NO$), componente majoritário também utilizado no presente estudo (RAMSEWAK, 1999). Ainda com relação ao espilantol existe um crescente número de patentes relacionadas à sua utilização em formulações de produtos para uso: na higiene oral, como agente inseticida, cosmético para banho, no tratamento de

reumatismo e condicionamento da pele (MOROE; HOSODA, 1985), além de estar presente na composição de xampus, sabonetes e cremes.

Desta forma, o presente estudo avaliou o potencial do extrato etanólico das partes aéreas de *A. oleracea*, estabelecendo a concentração letal de 50% (CL_{50}), bem como realizou a caracterização morfo-histológica, histoquímica e ultraestrutural do sistema reprodutor de machos alimentados e de fêmeas semi-ingurgitadas de carrapatos *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) expostos às concentrações subletais de 6,2; 12,5 e 25 mg/mL e 3,1; 6,2 e 12,5 mg/mL, respectivamente. Além disso, estabeleceu-se um protocolo para o estudo *in vitro* de novas moléculas com potencial acaricida, aqui no caso, o espilantol, sobre linhagens celulares de carrapatos, alternativa aos tradicionais testes que utilizam hospedeiros vivos. Para isso, foram expostas duas linhagens embrionárias de *R. microplus*: BME/CTVM6, derivadas de carrapatos resistentes a organofosforados, organoclorados e amitraz, e BME/CTVM2, derivadas de carrapatos susceptíveis a acaricidas.

A obtenção do extrato de *A. oleracea* aqui utilizado deu-se por extração etanólica com rendimento de 7.7 ± 0.08% em uma base seca, valores esses comparáveis aos reportados em outros estudos utilizando etanol e métodos similares de extração (DIAS et al., 2012; YADAV et al., 2011). O etanol foi escolhido, visto ser seguro e de baixo custo, quando comparado aos outros solventes utilizados em extrações (BAE et al., 2010; RODRIGUES et al., 2006), além do mesmo apresentar baixa toxicidade aos carrapatos (RESENDE et al., 2012).

Os resultados aqui obtidos mostraram que machos de *A. cajennense* foram sensíveis a todas as concentrações do extrato testadas (6,2; 12,5; 14,3; 16,6; 20; 25; 33; 40, 50 and 100 mg/mL), tendo havido aumento gradual da mortalidade (5–100%), que foi proporcional ao aumento das concentrações, bem como ao tempo de exposição. Na concentração de 50 mg/mL, ocorreu 20% de mortalidade após um dia de tratamento, 60% após três dias e 70% após sete dias. Na maior concentração (100 mg/mL), a taxa de mortalidade foi de 100% após 24 horas de exposição. Resultados semelhantes foram também obtidos por Roma et al. (2009) e Oliveira et al. (2011), quando estudaram fêmeas de carrapatos *R. sanguineus* expostas aos químicos sintéticos permetrina e fipronil reconhecidamente eficazes para o controle de carrapatos.

Ao contrário, as fêmeas semi-ingurgitadas aqui estudadas não foram sensíveis a todas as concentrações do extrato de *A. oleracea*, não tendo sido observada

mortalidade na exposição à 6,2 mg/mL, porém na de 12,5 mg/mL houve mortalidade do 2º ao 7º dia do período de observação. Nas exposições a 25 e de 50 mg/mL a mortalidade já foi observada após 24 horas e na maior concentração (100 mg/mL) houve 100% de morte após 72 horas. Os dados aqui obtidos corroboraram Castro et al. (2014), quando observaram aumento nas taxas de mortalidade de *R. microplus* exposto ao extrato hexânico de *A. oleracea* em diferentes concentrações confirmando mais uma vez a ação dose-dependente do extrato.

Além da mortalidade, foram também observadas reações comportamentais nos indivíduos (machos e fêmeas) expostos, tais como diminuição da atividade locomotora, prostração na posição invertida, estiramento das pernas e paralisia. Ressalte-se que alterações comportamentais também foram observadas por Roma et al. (2009) e Oliveira et al. (2011) em carrapatos *R. sanguineus* expostos aos químicos sintéticos permetrina e fipronil. Assim, ficou demonstrado que o extrato etanólico bruto de *A. oleracea,* mesmo em baixas concentrações, seria tóxico aos carrapatos, corroborando os dados obtidos por outros autores quando analisaram outros químicos naturais: azadiractina, timol, carvacrol, extrato de *Ageratum conyzoides* e de *Artemisia absinthium* (KOC et al., 2013; MATOS et al., 2014a; PARVEEN et al., 2014; SRIVASTAVA et al., 2008). Ficou aqui estabelecido que o extrato etanólico de *A. oleracea*, apresentaria CL_{50} de 29.5 mg/mL para os machos alimentados e 17.6 mg/mL para fêmeas semi-ingurgitadas de carrapatos *A. cajennense*, confirmando a sua alta eficiência.

Após a determinação da CL_{50}, realizou-se a avaliação morfohistológica e histoquímica do sistema reprodutor de machos alimentados de carrapatos *A. cajennense* expostos às concentrações subletais (menores que a CL_{50}) de 6,2; 12,5 e 25 mg/mL.

O extrato bruto de jambu não provocou alterações nas células germinativas masculinas desses indivíduos quando observadas sob microscopia de luz. Contudo, quando se realizou análises ultraestruturais pode-se observar que o extrato etanólico de *A. oleracea* causou danos nas espermátides em estágios finais de desenvolvimento, representados por dobras na membrana plasmática e desarranjo dos elementos do citoesqueleto. Resultados semelhantes foram também obtidos por Montasser e Amin (2005) quando analisaram ultraestruturalmente os testículos de *Argas persicus* expostos à ivermectina, lactona macrocíclica, na dose de 400 µg/kg

do hospedeiro, quando detectaram o rompimento das membranas tanto plasmática quanto das organelas das espermátides.

Associado ao sistema reprodutor masculino de *A. cajennense* existe um complexo de glândulas multilobuladas, as quais sofreram alterações morfofisiológicas significativas nos indivíduos que foram expostos às concentrações de 6,2; 12,5 e 25 mg/mL do extrato do jambu e que foram mais intensas e severas à medida que a concentração do produto aumentou efeitos estes aqui considerados dose-dependentes. De forma geral, as alterações ocorreram nas células secretoras, incluindo a intensa vacuolização citoplasmática, bem como a diminuição da atividade de síntese e de armazenamento dos grânulos de secreção, os quais constituiriam o fluído espermático e o espermatóforo (SAMPIERI et al., 2015b; SONENSHINE; ROE, 2014). Estas alterações foram confirmadas ultraestruturalmente, uma vez que foram observadas regiões desorganizadas no citoplasma, bem como com a presença de vacúolos (autofágicos) contendo organelas, provavelmente já desativadas, as quais passariam posteriormente pelo processo de digestão intracelular. Esses dados sugeriram que os processos de síntese e de armazenamento dos grânulos de secreção que iriam compor o fluído espermático e o espermatóforo poderiam ter sido também afetados ou até mesmo interrompidos por ação do produto tóxico. Resultados semelhantes foram obtidos por Sampieri et al. (2015a), quando estudaram a ação de ésteres do ácido ricinoleico do óleo de mamona, sobre carrapatos *A. cajennense* s.l. e registraram a presença de significante vacuolização citoplasmática nas células secretoras das glândulas acessórias dos indivíduos expostos à maior concentração do acaricida. A presença de intensa vacuolização citoplasmática em células de indivíduos que foram expostos a agente tóxicos, isolaria organelas ou porções do citoplasma já danificadas pelos mesmos, o que de certa forma permitiria que a célula ainda conseguisse sobreviver e se manter biologicamente viável (CARVALHO; RECCO-PIMENTEL, 2012; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017).

Além da intensa vacuolização citoplasmática das células das glândulas acessórias provocadas pela exposição ao acaricida, verificou-se aqui que também os grânulos de secreção por elas produzidos passaram por modificações, uma vez que os mesmos estavam: a) menores, irregulares e com conteúdo desorganizado, b) fragmentados e c) até mesmo vacuolizados, dados que permitiram sugerir que houve queda na síntese e na secreção de polissacarídeos, glicoproteínas, lipoproteínas, glicosaminoglicanos, o que consequentemente traria um prejuízo ao processo de

capacitação dos espermatozóides no trato genital da fêmea, inclusive inibindo a formação do espermatóforo (envoltório das espermátides maduras) (GARCIA-FERNANDEZ; GARCIA; GARCIA, 1998; SONENSHINE; ROE, 2014). Assim, com essas alterações ocorrendo, a transferência do esperma/espermátides do trato masculino para o feminino a qual dar-se-ia via espermatóforo, ficaria também prejudicada (ANHOLETO et al., 2015; SAMPIERI et al., 2015b; SONENSHINE; ROE, 2014). Estudos anteriores realizados por Oliver e Brinton (1972) com carrapatos *Dermacentor variabilis* e *Ornithodoros moubata* já haviam demonstrado que a capacitação das espermátides, no trato feminino, dar-se-ia por meio de um polipeptídio produzido pelas glândulas acessórias dos machos.

Quando fez-se a avaliação morfohistológica e ultraestrutural do sistema reprodutor feminino de *A. cajennense* expostas às concentrações subletais de 6,2; 12,5 e 25 mg/mL do extrato etanólico bruto de *A. oleracea*, observou-se alterações morfofisiológicas e ultraestruturais significativas nas células germinativas, principalmente naqueles ovócitos imaturos (I e II), alterações essas que foram mais intensas e severas à medida que a concentração do produto aumentou. Esses dados corroboraram os obtidos por Oliveira et al. (2016) em exposição de fêmeas semi-ingurgitadas de carrapatos *R. microplus* ao extrato hexânico de *A. oleracea* e por Vendramini et al. (2012) e Remedio et al. (2015) para fêmeas de *R. sanguineus* expostas ao óleo de andiroba (*Carapa guianensis*) e ao óleo de neem (*Azadirachta indica*), respectivamente. As alterações mais frequentes aqui detectadas em razão da exposição foram a desorganização citoplasmática seguida do surgimento de grande vacuolização (regiões negativas ao PAS e ao azul de bromofenol) também confirmada ultraestruturalmente pela presença de vacúolos inclusive contendo mitocôndrias no seu interior, as quais provavelmente já estavam com suas funções comprometidas. Vacúolos autofágicos no citoplasma das células expostas poderiam estar associados à retirada de organelas danificadas, ou ainda, com a reciclagem de porções do citoplasma também danificadas pela ação do produto, o que permitiria que a célula ainda sobrevivesse e mantivesse a sua viabilidade (OLIVEIRA et al., 2016b; OLIVEIRA; BECHARA; CAMARGO-MATHIAS, 2008; ROMA et al., 2010). Presença de vacuolização citoplasmática também foi observada por Vendramini et al. (2012), quando estudaram a ação do óleo de andiroba sobre o sistema reprodutor de fêmeas de *R. sanguineus*. Os mesmos autores ressaltaram que os vacúolos surgiriam sobretudo nos ovócitos em estágios iniciais de desenvolvimento (aqui também

observado), dano este que poderia estar relacionado ao fato de que ovócitos em estágios iniciais de desenvolvimento ainda não teriam o cório depositado, ou seja, essa barreira física e com papel de dificultar/selecionar a entrada/saída de elementos na célula estaria ausente (OLIVEIRA et al., 2016b). Segundo Denardi et al. (2004) a deposição dessa membrana teria início nos ovócitos II/III e se completaria naqueles em estágio V.

Outra alteração morfológica registrada na literatura é que os ovócitos de carrapatos *R. sanguineus* quando expostos ao fipronil (OLIVEIRA et al., 2009) e ao extrato da folha de neem (DENARDI et al., 2012), apresentaram modificações nas mitocôndrias, as quais apresentaram-se com suas cristas desorganizadas e até mesmo algumas delas com ausência de cristas. No presente estudo com o extrato de *A. oleracea,* observou-se que as mitocôndrias tiveram sua morfologia alterada devido à exposição, inclusive adquirindo a forma de “halteres” , o que poderia trazer prejuízo no processo de amadurecimento do ovócito, uma vez que essas organelas seriam necessárias para o fornecimento de energia no período de incorporação exógena da vitelogênese, onde compostos da hemolinfa seriam transportados para o interior dos ovócitos (BALASHOV, 1972 apud OLIVEIRA et al., 2005). A importância das mitocôndrias também reside nos processos de síntese e armazenamento de substâncias, como proteínas e lipídios. Elas teriam a capacidade de obter moléculas de ácidos graxos do retículo endoplasmático e transferi-las para a matriz mitocondrial, onde poderiam ser degradadas e convertidas em energia (DENARDI; CAMARGO MATHIAS; BECHARA, 2006). No entanto, parte do processo poderia não ocorrer o que levaria à formação de gota de lipídio no interior da organela (ALBERTS et al., 2010). Essa dinâmica já foi descrita por outros autores tais como Caperucci e Camargo-Mathias (2006) quando desenvolveram trabalhos mostrando qual seria a dinâmica da vitelogênese na formiga *Neoponera villosa*, quando mostraram que a provável fonte de lipídios nos ovócitos desses insetos seria a mitocôndria ou mais especificamente, a transformação dessas organelas.

Os dados aqui obtidos mostraram também que o extrato de jambu, poderia acarretar significativas alterações nos grânulos de vitelo dos ovócitos em todos os estágios de desenvolvimento independente da concentração do mesmo, modificações que incluiriam a diminuição dos grânulos de vitelo, mudanças na forma, os quais passariam de originalmente arredondados para irregulares, fragmentação dos grânulos, alteração na sua composição e eletrondensidade, além de presença de

espaços arredondados no seu interior, corroborando Oliveira et al. (2016) quando estudaram a ação do extrato de *A. oleracea* no sistema reprodutor de *R. microplus.* Essas alterações na vitelogênese poderiam levar a um déficit de nutrição do embrião, impactando negativamente no desenvolvimento de novos indivíduos.

O potencial tóxico do extrato etanólico de *A. oleracea* sobre o desenvolvimento do sistema reprodutor feminino ficou comprovado também pelas alterações que ele provocou na vesícula germinal dos ovócitos, estrutura que abriga o DNA, o qual se sofresse alterações poderia causar a inviabilidade da produção de um novo indivíduo. As modificações incluíram aquelas na forma, que passou de arredondada para irregular, de fragmentação (além de vacuolização) e o surgimento de dobras na sua membrana envoltória, observadas principalmente nos ovócitos I, II e III, quando consideradas as exposições na concentração de 3,1 mg/mL. As mesmas alterações foram observadas nos ovócitos imaturos (I e II) dos indivíduos expostos à 6,2 mg/mL e nos III e IV quando submetidos à concentração de 12,5 mg/mL. Dados semelhantes foram obtidos por Oliveira et al. (2009) quando estudaram o sistema reprodutor feminino de *R. sanguineus* expostos ao fipronil, sinalizando que o produto tóxico foi capaz de ultrapassar a barreira seletiva da membrana plasmática do ovócito, incluindo o próprio cório, que embora resistente devido a organização das suas camadas, não impediu a passagem do produto tóxico para o interior da célula, visto o mesmo ter alcançado a vesícula germinal (DENARDI et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2016b). Assim os dados aqui obtidos confirmaram que o extrato do jambu, mesmo nas menores concentrações (3,1 e 6,2 mg/mL), seria capaz de causar alterações nas células germinativas de *A. cajennense*.

Neste trabalho demonstrou-se que o cório dos ovócitos também sofreria alterações significativas quando da exposição ao extrato de *A. oleracea*, o qual interferiria na deposição das camadas desta membrana protetora, o que poderia prejudicar a eficiência dessa barreira física com papel de dificultar/selecionar a entrada/saída de elementos na célula e seriam prejudiciais ao desenvolvimento do embrião no ambiente, mesmo com a deposição de cera proveniente do órgão de Gené. Alterações no cório já haviam sido reportadas por Oliveira et al. (2016) quando estudaram os efeitos citotóxicos do extrato de *A. oleracea* em fêmeas de *R. microplus*. Além disso, ovócitos em estágio V, onde o cório já teria sido depositado quase que totalmente, apresentaram essa membrana espessada nos indivíduos expostos a 3,1 mg/mL do extrato e nos ovócitos IV e V dos indivíduos expostos a 6,2 mg/mL,

inferindo-se que esse espessamento poderia ser uma estratégia das células germinativas na direção de proteger o conteúdo do ovócito, principalmente o seu DNA, contra os danos da substância tóxica, dados que corroboraram aqueles obtidos por Denardi et al. (2004) e Oliveira et al. (2016)

De modo geral para se estudar o papel das novas moléculas com potencial acaricida ainda há a necessidade do uso de animais de experimentação, visto que os carrapatos possuem hábito hematófago e se alimentam em um animal vertebrado (hospedeiro) vivo, como coelhos, cães e bovinos (TAJERI; RAZMI; HAGHPARAST, 2016). Entretanto, sistemas de cultura *in vitro*, particularmente linhagens celulares contínuas, têm tido um papel importante na pesquisa de patógenos e de vetores, incluindo as relações hospedeiro-vetor-patógeno (BELL-SAKYI et al., 2007).

O uso da cultura de células para estudos com carrapatos vem sendo uma alternativa promissora já que a redução do uso de animais hospedeiros (coelhos, por exemplo) é uma exigência dos órgãos reguladores da ética na pesquisa. Nos ensaios *in vitro* os resultados obtidos têm sido mais precisos e seguros, pois permitem que os parâmetros experimentais sejam rigorosamente controlados, reduzindo a variabilidade entre os experimentos. O custo destas técnicas também é menor, uma vez que não necessitam de instalações (biotérios) e insumos para a criação e manutenção dos hospedeiros de carrapatos (COSSIO-BAYUGAR; WAGNER; HOLMAN, 2002; GUZZIE, 1994).

Portanto, neste trabalho buscou-se investigar os efeitos do análogo alcino do espilantol sobre duas linhagens celulares obtidas de embriões de *R. microplus*: a) BME/CTVM6, derivadas de carrapatos resistentes a organofosforados, organoclorados e amitraz, e b) BME/CTVM2, derivadas de carrapatos susceptíveis a acaricidas.

No ensaio de exclusão do azul de Tripan (STROBER, 2001), para analisar a viabilidade das células, os resultados mostraram que as células de ambas as linhagens alocadas nos grupos controle I, expostas apenas ao meio de cultura L-15, e II expostas ao meio de cultura L-15, etanol 30% e 0,1% de DMSO, apresentaram viabilidade superior a 80%. No entanto, as células BME/CTVM6 expostas à 0,8 mg/mL não foram viáveis, ou seja, todas morreram. Na exposição a 0,4; 0,3 e 0,2 mg/mL do produto, observou-se viabilidade de 10, 41,4 e 74,3%, respectivamente. Para as células BME/CTVM2 expostas à 0,8 e 0,7 mg/mL, verificou-se mortalidade total (viabilidade de 0,0%) e aquelas submetidas a 0,6 e 0,5 mg/mL apresentaram

viabilidade de 21,9 e 56,8%, respectivamente. Estudos anteriores realizados por Cruz et al. (2016) já haviam demonstrado a ação do espilantol em carrapatos *R. microplus,* reportando que as concentrações de 0,8 e 0,4 mg/mL foram efetivas sobre larvas em jejum. Estas também foram efetivas sobre as linhagens BME/CTVM6 e BME/CTVM2 aqui expostas. Cabe ressaltar que o fato desse análogo ter sido sintetizado recentemente (ALONSO et al., 2018) existem poucos dados disponíveis na literatura a respeito da sua ação acaricida. Além disso, esperava-se que a concentração menor já fosse capaz causar a morte das linhagens, visto que na cultura *in vitro* o produto entraria em contato direto com a superfície das células, não existindo barreiras como o integumento que impedissem a penetração do produto nas células.

Neste estudo, a morfologia celular determinou o efeito citotóxico nas doses utilizadas. As células de ambas as linhagens alocadas nos grupos controle I e II, bem como aquelas expostas às menores concentrações (0,2 e 0,3 mg/mL) apresentaram-se com morfologia íntegra. Àquelas BME/CTVM6 expostas a 0,8 mg/mL e as BME/CTVM2 expostas a 0,4 e 0,8 mg/mL mostraram limite celular indefinido e redução do citoplasma e do núcleo, indicando morte celular. O potencial citotóxico do espilantol, já foi relatado por Anholeto et al. (2018) ao estudarem a ação do extrato no sistema reprodutor feminino (ovócitos) de carrapatos *A. cajennense*.

Até recentemente nenhum estudo buscou examinar quais seriam os efeitos diretos de doses acaricidas subletais (menores que a CL_{50}) sobre patógenos intracelulares transmitidos por carrapatos, bem como ainda não se tem informação sobre se a exposição a acaricidas teria efeito direto sobre os patógenos ou indiretos sobre a capacidade de transmissão dos mesmos, informações que seriam importantes para se conhecer o papel dos acaricidas no controle integrado de carrapatos e doenças por eles transmitidas.

Sob essa perspectiva o presente estudo também investigou o efeito direto de doses subletais de acaricidas sobre patógenos transmitidos por carrapatos, por meio da infecção da linhagem celular BME/CTVM6 com a bactéria *Erlichia minasensis*, que posteriormente foi exposta a 0,2 mg/mL do análogo alcino do espilantol, que resultou na redução de aproximadamente dois terços da taxa de infecção por *E. minasensis* nas células expostas. Além disso, células BME/CTVM6 não infectadas dos grupos controle I, II e do grupo de tratamento exposto a 0,2 mg/mL do mesmo produto não apresentaram alterações morfológicas, confirmando a subletalidade desta última.

Assim, com todos os dados aqui apresentados, o desenvolvimento do presente trabalho mostrou a ação acaricida do extrato etanólico de *A. oleracea* sobre os sistemas reprodutores de machos e de fêmeas de *A. cajennense* a ele expostas. Além dos danos reportados, esse estudo avaliou o potencial acaricida do análogo alcino do espilantol, molécula sintética e análoga ao espilantol, que é encontrada em abundância nas flores, folhas e caules de *A. oleracea*, e que foi capaz de reduzir a viabilidade e alterar a morfologia de células de embriões de *R. microplus* em cultura. Ademais, trouxe à luz informações sobre a ação do mesmo produto sobre as bactérias *E. minasensis*, as quais tiveram taxa de infecção reduzida quando células BME/CTVM6 foram a ele expostas. Os resultados sinalizaram que o uso do extrato etanólico bruto obtido a partir das flores, folhas e caule de *A. oleracea* e do análogo alcino do espilantol poderão ser futuramente uma estratégia eficiente para o controle de carrapatos e de doenças por eles transmitidas.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

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

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

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

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

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

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

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

REFERÊNCIAS

ABBAS, R. Z.; ZAMAN, M. A.; COLWELL, D. D.; GILLEARD, J.; IQBAL, Z. Acaricide resistance in cattle ticks and approaches to its management: the state of play. **Veterinary Parasitology**, v. 203, n. 1–2, p. 6–20, 2014.

AGNOLIN, C. A.; OLIVO, C. J.; LEAL, M. L. R.; BECK, R. C. R.; MEINERZ, G. R.; PARRA, C. L. C.; MACHADO, P. R.; FOLETTO, V.; BEM, C. M.; NICOLODI, P. R. S. Eficácia do óleo de citronela [*Cymbopogon nardus* (L.) Rendle] no controle de ectoparasitas de bovinos. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 12, n. 4, p. 482–487, 2010.

AGUIAR, D. M.; ZILIANI, T. F.; ZHANG, X.; MELO, A. L. T.; BRAGA, Í. A.; WITTER, R.; FREITAS, L. C.; RONDELLI, A. L. H.; LUIS, M. A.; SORTE, E. C. B.; JAUNE, F. W.; SANTARÉM, V. A.; HORTA, M. C.; PESCADOR, C. A.; COLODEL, E. M.; SOARES, H. S.; PACHECO, R. C.; ONUMA, S. S. M.; LABRUNA, M. B.; MCBRIDE, J. W. A novel *Ehrlichia* genotype strain distinguished by the TRP36 gene naturally infects cattle in Brazil and causes clinical manifestations associated with ehrlichiosis. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 5, n. 5, p. 537–544, 2014.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia molecular da célula**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

ALONSO, I. G.; YAMANE, L. T.; FREITAS-BLANCO, V. S.; NOVAES, L. F. T.; FRANZ-MONTAN, M.; PAULA, E.; RODRIGUES, M. V. N.; RODRIGUES, R. A. F.; PASTRE, J. C. A new approach for the total synthesis of spilanthol and analogue with improved anesthetic activity. **Tetrahedron**, v. 74, n. 38, p. 5192–5199, 2018.

ANDERSON, J. F. The natural history of ticks. **The Medical Clinics of North America**, v. 86, n. 2, p. 205–18, 2002.

ANHOLETO, L. A.; NUNES, P. H.; REMÉDIO, R. N.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Testes of fed and unfed *Amblyomma cajennense* ticks (Acari: Ixodidae). First morphological data. **Acta Zoologica**, v. 96, n. 3, p. 375–382, 2015.

ANHOLETO, L. A.; OLIVEIRA, P. R.; RODRIGUES, R. A. F.; SPINDOLA, C. S.;

LABRUNA, M. B.; PIZANO, M. A.; CASTRO, K. N. C.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Potential action of extract of *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen to control *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) ticks. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 8, n. 1, p. 65–72, 2017a.

ANHOLETO, L. A.; OLIVEIRA, P. R.; RODRIGUES, R. A. F.; SPINDOLA, C. D. S.; LABRUNA, M. B.; PIZANO, M. A.; CASTRO, K. N. C.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Potential action of extract of *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen to control *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) ticks. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 8, n. 1, p. 65–72, 2017b.

ANHOLETO, L. A.; OLIVEIRA, P. R.; RODRIGUES, R. A. F.; YAMANE, L. T.; CASTRO, K. N. C.; FERREIRA, A. R. F.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Toxic action of *Acmella oleracea* extract on the male reproductive system of *Amblyomma cajennense* ticks. **Veterinary Parasitology**, v. 244, p. 164–171, 2017c.

ANHOLETO, L. A.; OLIVEIRA, P. R.; RODRIGUES, R. A. F.; YAMANE, L. T.; CASTRO, K. N. C.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Morphological alterations in the ovaries of *Amblyomma cajennense* semi-engorged ticks exposed to ethanolic extract of *Acmella oleracea*. **Microscopy Research and Technique**, v. 81, n. 11, p. 1347–1357, 2018.

ANHOLETO, L. A.; SAMPIERI, B. R.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Generating new individuals II (male reproductive system). In: CAMARGO-MATHIAS, M. I. (Ed.). **Inside Ticks: Morphophysiology, toxicology and therapeutic perspectives**. São Paulo: Editora UNESP, 2018.

BAE, S. S.; EHRMANN, B. M.; ETTEFAGH, K. A.; CECH, N. B. A validated liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry method for quantification of spilanthol in *Spilanthes acmella* (L.) Murr. **Phytochemical Analysis : PCA**, v. 21, n. 5, p. 438–43, 2010.

BARBOSA, A. F.; CARVALHO, M. G.; SMITH, R. E.; SABAA-SRUR, A. U. O. Spilanthol: occurrence, extraction, chemistry and biological activities. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, n. 1, p. 128–133, 2016.

BEATI, L.; NAVA, S.; BURKMAN, E. J.; BARROS-BATTESTI, D. M.; LABRUNA, M. B.; GUGLIELMONE, A. A; CÁCERES, A. G.; GUZMÁN-CORNEJO, C. M.; LEÓN, R.; DURDEN, L. A; FACCINI, J. L. H. *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae), the Cayenne tick: phylogeography and evidence for allopatric speciation. **BMC Evolutionary Biology**, v. 13, n. 1, p. 267, 2013.

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

BELL-SAKYI, L. *Ehrlichia ruminantium* grows in cell lines from four ixodid tick genera. **Journal of comparative pathology**, v. 130, n. 4, p. 285–93, 2004.

BELL-SAKYI, L.; ZWEYGARTH, E.; BLOUIN, E. F.; GOULD, E. A.; JONGEJAN, F. Tick cell lines: tools for tick and tick-borne disease research. **Trends in Parasitology**, v. 23, n. 9, p. 450–457, 2007.

BLACK, W. C.; PIESMAN, J. Phylogeny of hard- and soft-tick taxa (Acari: Ixodida) based on mitochondrial 16S rDNA sequences. **Proceedings of the National**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

CAPERUCCI, D.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Lipids in oocytes of ants *Neoponera villosa* (Hymenoptera: Ponerinae). **Sociobiology**, v. 47, p. 531–541, 2006.

CARVALHO, H. F.; RECCO-PIMENTEL, S. M. **A Célula**. 3ª ed. São Paulo: Editora Manole, 2012.

CARVALHO, I. T. S.; MELO, A. L. T.; FREITAS, L. C.; VERÇOZA, R. V.; ALVES, A. S.; COSTA, J. S.; CHITARRA, C. S.; NAKAZATO, L.; DUTRA, V.; PACHECO, R. C.; AGUIAR, D. M. Minimum infection rate of *Ehrlichia minasensis* in *Rhipicephalus microplus* and *Amblyomma sculptum* ticks in Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 7, n. 5, p. 849–852, jul. 2016.

CASTRO, K. N. C.; LIMA, D. F.; VASCONCELOS, L. C.; LEITE, J. R. S. A.; SANTOS, R. C.; PAZ NETO, A. A.; COSTA-JÚNIOR, L. M. Acaricide activity in vitro of *Acmella oleracea* against *Rhipicephalus microplus.* **Parasitology Research**, v. 113, n. 10, p. 3697–701, 2014.

CAVALCANTI, V. M. S. **Extração de espilantol de *Spilanthes acmella var oleraceae* com dióxido de carbono supercrítico**. Tese (Doutorado em Engenharia de Processos), Universidade Estadual de Campinas, 2008.

CHAGAS, A. C. S.; GEORGETTI, C. S.; CARVALHO, C. O.; OLIVEIRA, M. C. S.; RODRIGUES, R. A.; FOGLIO, M. A.; MAGALHÃES, P. M. *In vitro* activity of *Artemisia annua* L (Asteraceae) extracts against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 1, p. 31–35, 2011.

CHENG, Y.-B.; LIU, R.; HO, M.-C.; WU, T.-Y.; CHEN, C.-Y.; LO, I.-W.; HOU, M.-F.; YUAN, S.-S.; WU, Y.-C.; CHANG, F.-R. Alkylamides of *Acmella oleracea*. **Molecules**, v. 20, n. 4, p. 6970–6977, 2015.

CILIA-LÓPEZ, V. G.; JUÁREZ-FLORES, B. I.; AGUIRRE-RIVERA, J. R.; REYES-AGÜERO, J. A. Analgesic activity of *Heliopsis longipes* and its effect on the nervous system. **Pharmaceutical Biology**, v. 48, n. 2, p. 195–200, 2010.

COSSIO-BAYUGAR, R.; WAGNER, G. G.; HOLMAN, P. J. *In vitro* generation of organophosphate resistant *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) cell lines. **Journal of Medical Entomology**, v. 39, n. 2, p. 278–84, 2002.

COSTA, G. L.; SARQUIS, M. I. M.; MORAES, A. M. L.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Isolation of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* from *Boophilus microplus* tick (Canestrini, 1887), in Rio de Janeiro State, Brazil. **Mycopathologia**, v. 154, n. 4, p. 207–9, 2002.

CRAMPTON, A.; BAXTER, G.; BARKER, S. Identification and characterisation of a cytochrome P450 gene and processed pseudogene from an arachnid: the cattle tick, *Boophilus microplus.* **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 29, n. 4, p. 377–384, 1999.

CRAMPTON, A.; MCKAY, I.; BARKER, S. C. Phylogeny of ticks (Ixodida) inferred from nuclear ribosomal DNA. **International Journal for Parasitology**, v. 26, n. 5, p. 511–7, 1996.

CRUZ, P. B.; BARBOSA, A. F.; ZERINGÓTA, V.; MELO, D.; NOVATO, T.; FIDELIS, Q. C.; FABRI, R. L.; CARVALHO, M. G.; OLIVEIRA SABAA-SRUR, A. U.; DAEMON, E.; MONTEIRO, C. M. O. Acaricidal activity of methanol extract of *Acmella oleracea* L. (Asteraceae) and spilanthol on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) and

Dermacentor nitens (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 228, p. 137–143, 2016.

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

DENARDI, S. E.; BECHARA, G. H.; OLIVEIRA, P. R.; NUNES, E. T.; SAITO, K. C.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Morphological characterization of the ovary and vitellogenesis dynamics in the tick *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). **Veterinary parasitology**, v. 125, n. 3–4, p. 379–95, 2004.

DENARDI, S. E.; BECHARA, G. H.; OLIVEIRA, P. R.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. *Azadirachta indica* A. Juss (neem) induced morphological changes on oocytes of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) tick females. **Experimental Parasitology**, v. 126, n. 4, p. 462–70, 2010.

DENARDI, S. E.; BECHARA, G. H.; OLIVEIRA, P. R.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Ultrastructural analysis of the oocytes of female *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) ticks subjected to the action of *Azadirachta indica* A. Juss (Neem). **Ultrastructural Pathology**, v. 36, n. 1, p. 56–67, 2012.

DENARDI, S. E.; CAMARGO MATHIAS, M. I.; BECHARA, G. H. *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae): Salivary gland cells of partially engorged females ticks and the production of lipid by their mitochondria. **Experimental Parasitology**, v. 113, n. 1, p. 30–35, 2006.

DIAS, A. M. A.; SANTOS, P.; SEABRA, I. J.; JÚNIOR, R. N. C.; BRAGA, M. E. M.; SOUSA, H. C. Spilanthol from *Spilanthes acmella* flowers, leaves and stems obtained by selective supercritical carbon dioxide extraction. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 61, p. 62–70, 2012.

DIETRICH, G.; DOLAN, M. C.; PERALTA-CRUZ, J.; SCHMIDT, J.; PIESMAN, J.; EISEN, R. J.; KARCHESY, J. J. Repellent activity of fractioned compounds from *Chamaecyparis nootkatensis* essential oil against nymphal *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 43, n. 5, p. 957–961, 2006.

DOUGLAS, J. R. The internal anatomy of *Dermacentor andersoni* stiles. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 36, n. 4, p. 601–601, 1943.

DRUMMOND, R. O.; ERNST, S. E.; TREVINO, J. L.; GLADNEY, W. J.; GRAHAM, O. H. *Boophilus annulatus* and *B. microplus*: laboratory tests of insecticides. **Journal of Economic Entomology**, v. 66, n. 1, p. 130–3, 1973.

DUBEY, S.; MAITY, S.; SINGH, M.; SARAF, S. A.; SAHA, S. Phytochemistry, pharmacology and toxicology of *Spilanthes acmella*: A Review. **Advances in Pharmacological Sciences**, v. 2013, p. 423750, 2013.

DUMSER, J. B.; OLIVER, J. H. Kinetics of spermatogenesis in the adult tick, *Dermacentor veriabilis*. **Journal of Insect Physiology**, v. 27, n. 10, p. 681–688, 1981.

ESTRADA-PEÑA, A.; BOUATTOUR, A.; CAMICAS, J.-L.; GUGLIELMONE, A.; HORAK, I.; JONGEJAN, F.; LATIF, A.; PEGRAM, R.; WALKER, A. R. The known distribution and ecological preferences of the tick subgenus *Boophilus* (Acari: Ixodidae) in Africa and Latin America. **Experimental & Applied Acarology**, v. 38, n. 2–3, p. 219–35, 2006.

ESTRADA-PEÑA, A.; TARRAGONA, E. L.; VESCO, U.; MENEGHI, D.; MASTROPAOLO, M.; MANGOLD, A. J.; GUGLIELMONE, A. A.; NAVA, S. Divergent environmental preferences and areas of sympatry of tick species in the *Amblyomma cajennense* complex (Ixodidae). **International Journal for Parasitology**, v. 44, n. 14, p. 1081–9, 2014.

FABRY, W.; OKEMO, P.; ANSORG, R. Fungistatic and fungicidal activity of east African medicinal plants. **Mycoses**, v. 39, n. 1–2, p. 67–70, 1996.

FAVORETO, R.; GILBERT, B. Estado da Arte/State of the Art - *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen (Asteraceae) – Jambu. **Revista Fitos**, v. 5, n. 1, p. 83–91, 2010.

FELDMAN-MUHSAM, B.; BORUT, S. Further observations on spermatophore formation in argasid ticks. **Journal of Insect Physiology**, v. 24, n. 10–11, p. 693–697, 1978.

FELDMAN-MUHSAM, B.; BORUT, S. On the spermatophore of ixodid ticks. **Journal of Insect Physiology**, v. 29, n. 5, p. 449–457, 1983.

FELDMAN-MUHSAM, B.; FILSHIE, B. K. Scanning and transmission electron microscopy of the spermiophores of *Ornithodoros ticks*: an attempt to explain their motility. **Tissue & Cell**, v. 8, n. 3, p. 411–9, 1976.

FRANCISCHETTI, I. M. B.; SA-NUNES, A.; MANS, B. J.; SANTOS, I. M.; RIBEIRO, J. M. C. The role of saliva in tick feeding. **Frontiers in Bioscience (Landmark edition)**, v. 14, p. 2051–88, jan. 2009.

FRANQUE, M. P.; SANTOS, H. A.; SILVA, G. V. O. DA; TAJIRI, J. T.; MASSARD, C. L. Características biológicas de *Boophilus microplus* (acari: ixodidae) a partir de infestação experimental em cão. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 16, n. 4, p. 238–242, 2007.

FRIESEN, K. J.; KAUFMAN, W. R. Cypermethrin inhibits egg development in the ixodid tick, *Amblyomma hebraeum*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 76, n. 1, p. 25–35, 2003.

FRIESEN, K. J.; SURI, R.; KAUFMAN, W. R. Effects of the avermectin, MK-243, on ovary development and salivary gland degeneration in the ixodid tick, *Amblyomma hebraeum*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 76, n. 3, p. 82–90, 2003.

GARCIA-FERNANDEZ, C.; GARCIA, S. M. L.; GARCIA, R. N. The male genital accessory gland complex of the cattle tick *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 58, n. 3, p. 453–462, 1998.

GHOSH, S.; AZHAHIANAMBI, P.; FUENTE, J. Control of ticks of ruminants, with special emphasis on livestock farming systems in India: present and future possibilities for integrated control - a review. **Experimental & Applied Acarology**, v. 40, n. 1, p. 49–66, 2006.

GONZALES, J. C. **O Controle do Carrapato do Boi**. Porto Alegre: UPF, 1995.

GUEDES, E.; LEITE, R. C.; PRATA, M. C.; PACHECO, R. C.; WALKER, D. H.; LABRUNA, M. B. Detection of *Rickettsia rickettsii* in the tick *Amblyomma cajennense* in a new Brazilian spotted fever-endemic area in the state of Minas Gerais. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 8, p. 841–845, 2005.

GUERRA, A. T.; GADELHA, C. A. A.; REIS, C. M. M.; SILVA, H. S.; SANTOS, L. F. M.; BARBOSA, M. R. V.; VASCONCELLOS, M. L. A. A.; LINDEN, M. M. G. VAN

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

OLIVEIRA, P. R.; BECHARA, G. H.; MARIN-MORALES, M. A.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Action of the chemical agent fipronil on the reproductive process of semi-engorged females of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). Ultrastructural evaluation of ovary cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 6, p. 1255–1264, 2009.

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

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

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

MATHIAS, M. I. Toxicity effect of the acaricide fipronil in semi-engorged females of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): preliminary determination of the minimum lethal concentration and LC(50). **Experimental Parasitology**, v. 127, n. 2, p. 418–22, 2011.

OLIVEIRA, P. R.; CALLIGARIS, I. B.; ROMA, G. C.; BECHARA, G. H.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Morphological characterization of the nymphs *Rhipicephalus sanguineus* ticks (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). Description of the testes, integument, Malpighian tubules, and midgut on the detachment day. **Microscopy Research and Technique**, v. 75, n. 6, p. 727–36, 2012.

OLIVEIRA, P. R.; PIZANO, M. A.; REMÉDIO, R. N.; BECHARA, G. H.; ABREU, R. M. M.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Potential of the chemical dinotefuran in the control of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) semi-engorged female ticks. **Experimental Parasitology**, v. 155, p. 82–88, 2015.

OLIVEIRA, P. R.; CASTRO, K. N. C.; ANHOLETO, L. A.; CAMARGO MATHIAS, M. I. Cytotoxic effects of extract of *Acmella oleraceae* (Jambú) in *Rhipicephalus microplus* females ticks. **Microscopy Research and Technique**, v. 79, n. 8, p. 744–753, 2016b.

OLIVEIRA, P. R.; ANHOLETO, L. A.; RODRIGUES, R. A. F.; BECHARA, G. H.; CASTRO, K. N. C.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. The potential of *Acmella oleracea* (Jambu) extract in the control of semi-engorged *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) female ticks. **International Journal of Acarology**, v. 44, n. 4–5, p. 192–197, 2018.

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

OLIVEIRA, P. R.; CAMARGO-MATHIAS, M. I.; BECHARA, G. H. *Amblyomma triste* (Koch, 1844) (Acari: Ixodidae): morphological description of the ovary and of vitellogenesis. **Experimental Parasitology**, v. 113, n. 3, p. 179–185, 2006.

OLIVEIRA, P. R.; CAMARGO-MATHIAS, M. I.; BECHARA, G. H. Vitellogenesis in the tick *Amblyomma triste* (Koch, 1844) (Acari: Ixodidae) Role for pedicel cells. **Veterinary Parasitology**, v. 143, n. 2, p. 134–139, 2007.

OLIVER, J. H.; BRINTON, L. P. Cytogenetics of ticks (Acari: Ixodoidea). 7. Spermatogenesis in the Pacific Coast tick, *Dermacentor occidentalis* Marx (Ixodidae). **The Journal of Parasitology**, v. 58, n. 2, p. 365–79, 1972.

PANELLA, N. A.; DOLAN, M. C.; KARCHESY, J. J.; XIONG, Y.; PERALTA-CRUZ, J.; KHASAWNEH, M.; MONTENIERI, J. A.; MAUPIN, G. O. Use of novel compounds for pest control: insecticidal and acaricidal activity of essential oil components from heartwood of Alaska yellow cedar. **Journal of Medical Entomology**, v. 42, n. 3, p. 352–8, 2005.

PARVEEN, S.; GODARA, R.; KATOCH, R.; YADAV, A.; VERMA, P. K.; KATOCH, M.; SINGH, N. K. *In vitro* evaluation of ethanolic extracts of *Ageratum conyzoides* and *Artemisia absinthium* against cattle tick, *Rhipicephalus microplus.* **The Scientific World Journal**, v. 2014, p. 1–6, 2014.

PEARSE, A. **Histochemistry theoretical and applied**. Churchill: Livingstone, 1985.

PEKÁRIKOVÁ, D.; RAJSKÁ, P.; KAZIMÍROVÁ, M.; PECHÁŇOVÁ, O.; TAKÁČ, P.; NUTTALL, P. A. Vasoconstriction induced by salivary gland extracts from ixodid ticks. **International Journal for Parasitology**, v. 45, n. 14, p. 879–83, 2015.

PÉREZ-GONZÁLEZ, I. E.; PRADO-OCHOA, M. G.; MUÑOZ-GUZMÁN, M. A.; VÁZQUEZ-VALADEZ, V. H.; VELÁZQUEZ-SÁNCHEZ, A. M.; AVILA-SUÁREZ, B. L.; CUENCA-VERDE, C.; ANGELES, E.; ALBA-HURTADO, F. Effect of new ethyl and methyl carbamates on *Rhipicephalus microplus* larvae and adult ticks resistant to conventional ixodicides. **Veterinary Parasitology**, v. 199, n. 3–4, p. 235–41, 2014.

PETER, T. F.; BURRIDGE, M. J.; MAHAN, S. M. *Ehrlichia ruminantium* infection (heartwater) in wild animals. **Trends in Parasitology**, v. 18, n. 5, p. 214–218, 2002.

PRACHAYASITTIKUL, V.; PRACHAYASITTIKUL, S.; RUCHIRAWAT, S.; PRACHAYASITTIKUL, V. High therapeutic potential of *Spilanthes acmella*: A review. **EXCLI Journal**, v. 12, p. 291–312, 2013.

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

RAMSEWAK, R. Bioactive N-isobutylamides from the flower buds of *Spilanthes acmella*. **Phytochemistry**, v. 51, n. 6, p. 729–732, 1999.

REGER, J. F. The fine structure of spermatids from the tick, *Amblyomma dissimili*. **Journal of Ultrastructure Research**, v. 5, n. 6, p. 584–599, 1961.

REGER, J. F. The origin and fine structure of cellular processes in spermatozoa of the tick *Dermacentor andersoni*. **Journal of Ultrastructure Research**, v. 48, n. 3, p. 420–434, 1974.

REMEDIO, R. N.; NUNES, P. H.; ANHOLETO, L. A.; OLIVEIRA, P. R.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Morphological effects of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) seed oil with known azadirachtin concentrations on the oocytes of semi-engorged *Rhipicephalus sanguineus* ticks (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v. 114, n. 2, p. 431–44, 2015.

RESENDE, J. D. S. A.; DAEMON, E.; MONTEIRO, C. M. O.; MATURANO, R.; PRATA, M. C. A.; RODRIGUES, A. F. S. F. Toxicity of solvents and surfactants to *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) and *Dermacentor nitens* (Neumann, 1897) (Acari: Ixodidae) larvae. **Experimental Parasitology**, v. 131, n. 2, p. 139–42, 2012.

REYNOLDS, E. S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. **The Journal of Cell Biology**, v. 17, n. 1, p. 208–12, 1963.

RIBEIRO, V. L. S.; AVANCINI, C.; GONÇALVES, K.; TOIGO, E.; POSER, G. V. Acaricidal activity of *Calea serrata* (Asteraceae) on *Boophilus microplus* and *Rhipicephalus sanguineus*. **Veterinary Parasitology**, v. 151, n. 2–4, p. 351–4, 2008.

RICARDO, A. J.; OLIVEIRA, P. R.; BECHARA, G. H.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Ultrastructural detection of proteins, lipids and carbohydrates in oocytes of *Amblyomma triste* (Koch, 1844) (Acari; Ixodidae) during the vitellogenesis process. **Tissue and Cell**, v. 39, n. 3, p. 203–215, 2007.

RODRIGUES, R. A. F.; FOGLIO, M. A.; BOAVENTURA JÚNIOR, S.; SANTOS, A. S.; REHDER, V. L. G. Otimização do processo de extração e isolamento do antimalárico artemisinina a partir de *Artemisia annua* L. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 368–372, 2006.

RODRÍGUEZ-MALLON, A. Developing anti-tick vaccines. **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, v. 1404, p. 243–59, 2016.

ROMA, G. C.; OLIVEIRA, P. R.; PIZANO, M. A.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Determination of LC(50) of permethrin acaricide in semi-engorged females of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). **Experimental Parasitology**, v. 123, n. 3, p. 269–72, 2009.

ROMA, G. C.; FURQUIM, K. C. S.; BECHARA, G. H.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Permethrin-induced morphological changes in oocytes of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) semi-engorged females. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 3, p. 825–830, 2010.

ROSADO-AGUILAR, J. A.; AGUILAR-CABALLERO, A.; RODRIGUEZ-VIVAS, R. I.; BORGES-ARGAEZ, R.; GARCIA-VAZQUEZ, Z.; MENDEZ-GONZALEZ, M. Acaricidal activity of extracts from *Petiveria alliacea* (Phytolaccaceae) against the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus*) *microplus* (Acari: ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 168, n. 3–4, p. 299–303, 2010.

RUPPERT, E. E.; FOX, R. S.; BARNES, R. D. **Zoologia dos invertebrados: uma abordagem funcional-evolutiva**. 7ª ed. São Paulo: Roca, 2005.

SAITO, K. C.; BECHARA, G. H.; NUNES, E. T.; OLIVEIRA, P. R.; DENARDI, S. E.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Morphological, histological, and ultrastructural studies of the ovary of the cattle-tick *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 129, n. 3–4, p. 299–311, 2005.

SAMPIERI; FURQUIM, K.; CARVALHO, P.; BUENO, O.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Ricinoleic acid esters from castor oil modifying male reproductive system of *Amblyomma cajennense* (Fabricius 1787). **Emergent Life Sciences Research**, v. 1, n. 1, p. 26–37, 2015a.

SAMPIERI, B. R.; LABRUNA, M. B.; BUENO, O. C.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Dynamics of cell and tissue genesis in the male reproductive system of ticks (Acari: Ixodidae) *Amblyomma cajennense* [corrected] (Fabricius, 1787) and *Amblyomma aureolatum* (Pallas, 1772): a comparative analysis. **Parasitology Research**, v. 113, n. 4, p. 1511–9, 2014.

SAMPIERI, B. R. B. R.; MOREIRA, J. C. S. C. S.; PÁEZ, F. A. R. A. R.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. I. Comparative morphology of the reproductive system and germ cells of *Amblyomma* ticks (Acari : Ixodidae): A contribution to Ixodidae systematics. **Journal of Microscopy and Ultrastructure**, v. 4, n. 2, p. 95–107, 2015b.

SANCHES, G. S.; BECHARA, G. H.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Ovary and oocyte maturation of the tick *Amblyomma brasiliense* Aragão, 1908 (Acari: Ixodidae). **Micron (Oxford, England : 1993)**, v. 41, n. 1, p. 84–9, 2010.

SARAF, V. K.; DIXIT, V. K. *Spilanthes acmella* Murr.: study on its extract spilanthol as larvicidal compound. **Asian Journal of Experience Sciences**, v. 16, n. 1, p. 9–19, 2002.

SAUER; ESSENBERG; BOWMAN; SAUER, J.; ESSENBERG, R.; BOWMAN, A . Salivary glands in ixodid ticks: control and mechanism of secretion. **Journal of Insect Physiology**, v. 46, n. 7, p. 1069–1078, 2000.

SAUER, J.; HAIR, J. A. **Morphology, physiology and behavioural biology of ticks**. Chichester: Ellis Horwood, 1986.

SCOLES, G. A.; HUTCHESON, H. J.; SCHLATER, J. L.; HENNAGER, S. G.; PELZEL, A. M.; KNOWLES, D. P. Equine piroplasmosis associated with *Amblyomma cajennense* Ticks, Texas, USA. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 10, p. 1903–5, 2011.

SHARMA, A.; KUMAR, V.; RATTAN, R. S.; KUMAR, N.; SINGH, B. Insecticidal Toxicity of Spilanthol from *Spilanthes acmella* Murr. against *Plutella xylostella* L. **American Journal of Plant Sciences**, v. 03, n. 11, p. 1568–1572, 2012.

SOARES, H. S.; BARBIERI, A. R. M.; MARTINS, T. F.; MINERVINO, A. H. H.; LIMA, J. T. R.; MARCILI, A.; GENNARI, S. M.; LABRUNA, M. B. Ticks and rickettsial infection in the wildlife of two regions of the Brazilian Amazon. **Experimental & Applied Acarology**, v. 65, n. 1, p. 125–40, 2015.

SONENSHINE, D. E.; ROE, R. M. **Biology of ticks**. 2ª ed. United States of America: Oxford University Press, 2014.

SPELMAN, K.; DEPOIX, D.; MCCRAY, M.; MOURAY, E.; GRELLIER, P. The traditional medicine *Spilanthes acmella*, and the alkylamides spilanthol and undeca-2E-ene-8,10-diynoic acid isobutylamide, demonstrate *in vitro* and *in vivo* antimalarial activity. **Phytotherapy Research : PTR**, v. 25, n. 7, p. 1098–101, 2011.

SRIVASTAVA, R.; GHOSH, S.; MANDAL, D. B.; AZHAHIANAMBI, P.; SINGHAL, P. S.; PANDEY, N. N.; SWARUP, D. Efficacy of *Azadirachta indica* extracts against *Boophilus microplus.* **Parasitology Research**, v. 104, n. 1, p. 149–53, 2008.

STEEN, N. A.; BARKER, S. C.; ALEWOOD, P. F. Proteins in the saliva of the Ixodida (ticks): pharmacological features and biological significance. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 47, n. 1, p. 1–20, 2006.

STROBER, W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. **Current Protocols in Immunology**, v. 21, n. 1, p. A.3B.1-A.3B.2, 2001.

TAJERI, S.; RAZMI, G.; HAGHPARAST, A. Establishment of an Artificial Tick Feeding System to Study *Theileria lestoquardi* Infection. **PloS one**, v. 11, n. 12, p. e0169053, 2016.

TARRAGONA, E. L.; CICUTTIN, G. L.; MANGOLD, A. J.; MASTROPAOLO, M.; SALVO, M. N.; NAVA, S. Rickettsia infection in *Amblyomma tonelliae*, a tick species from the *Amblyomma cajennense* complex. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 6, n. 2, p. 173–177, 2015.

TILL, W. M. A contribution to the anatomy and histology of the brown ear tick *Rhipicephalus appendiculatus* Neumann. **Memoirs of the Entomological Society of Southern Africa**, v. 6, p. 1–124, 1961.

TORRES, J. M.; CHÁVEZ, A. G. Alcamidas en plantas: distribución e importancia. **Avance y Perspectiva**, v. 20, n. Noviembre-Diciembre, p. 377–387, 2001.

VENDRAMINI, M. C. R.; CAMARGO-MATHIAS, M. I.; FARIA, A. U.; BECHARA, G. H.; OLIVEIRA, P. R.; ROMA, G. C. Cytotoxic effects of andiroba oil (*Carapa guianensis*) in reproductive system of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) semi-engorged females. **Parasitology Research**, v. 111, n. 5, p. 1885–1894, 2012.

VERYSER, L.; WYNENDAELE, E.; TAEVERNIER, L.; VERBEKE, F.; JOSHI, T.; TATKE, P.; DE SPIEGELEER, B. N-alkylamides: from plant to brain. **Functional Foods in Health and Disease**, v. 4, n. 46, p. 264–275, 2014.

VIEIRA, R. F. C.; BIONDO, A. W.; GUIMARÃES, A. M. S.; SANTOS, A. P.; SANTOS, R. P.; DUTRA, L. H.; DINIZ, P. P. V. P.; MORAIS, H. A.; MESSICK, J. B.; LABRUNA, M. B.; VIDOTTO, O. Ehrlichiosis in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 1, p. 01–12, 2011.

WAKITA, T.; KINOSHITA, K.; YAMADA, E.; YASUI, N.; KAWAHARA, N.; NAOI, A.; NAKAYA, M.; EBIHARA, K.; MATSUNO, H.; KODAKA, K. The discovery of dinotefuran: a novel neonicotinoid. **Pest Management Science**, v. 59, n. 9, p. 1016–1022, 2003.

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

WALL, R.; SHEARER, D. **Veterinary entomology**. London: Chapman and Hall, 1997.

WIKEL, S. K.; BERGMAN, D. Tick-host immunology: Significant advances and challenging opportunities. **Parasitology Today (Personal ed.)**, v. 13, n. 10, p. 383–9, 1997.

WYSOKI, M.; BOLLAND, H. R. Spermatogenesis, chromosomes and sex determination of four *Rhipicephalus* species (Acari: Ixodidae) from East Africa. **Genetica**, v. 48, n. 3, p. 233–238, 1978.

YADAV, R.; YADAV, N.; KHARYA, M. D.; SAVADI, R. Preliminary studies on diuretic effect of *Spilanthes acmella* leaves extracts in rats. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 3, p. 245–247, 2011.

YOU, M.; XUAN, X.; TSUJI, N.; KAMIO, T.; TAYLOR, D.; SUZUKI, N.; FUJISAKI, K. Identification and molecular characterization of a chitinase from the hard tick *Haemaphysalis longicornis.* **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 10, p. 8556–63, 2003.

GLOSSÁRIO

GLOSSÁRIO

Anaplasmoses = doença dos ruminantes causada por bactérias do gênero *Anaplasma*.

Assincrônico = que apresenta assincronia, desacordo.

Babesioses = doenças causadas por protozoários do gênero *Babesia.*

Biotério = instalação capaz de produzir e manter espécies de animais para pesquisa em diferentes áreas da ciência.

Cemento = estrutura formada por substâncias produzidas pelas glândulas salivares de natureza proteica, lipídica e carboidrática que auxilia na fixação do carrapato no hospedeiro.

Cório = estrutura (membrana) mais externa em torno do ovócito.

Ecdise = processo de muda ou eliminação do exosqueleto.

Eletrondensos = estruturas que desviam os elétrons e aparecem escuras na imagem obtida por Microscopia Eletrônica de Transmissão, já que os elétrons não chegam até a tela fluorescente.

Erliquiose = doença causada por bactérias gram-negativas do gênero *Ehrlichia.*

Esclerotização = processo químico que resulta no endurecimento e escurecimento da cutícula dos Arthropoda.

Escudo = estrutura que reveste o dorso dos carrapatos.

Espermatóforo = estrutura pela qual o macho realiza a transferência do esperma para a fêmea durante a cópula.

Eucromatina = cromatina na forma descondensada, correspondendo a regiões em transcrição ativa.

Exsicata = fragmento ou exemplar vegetal, dessecado e prensado, acompanhado de uma ou mais etiquetas, com informações diversas sobre o espécime (nome da espécie, local e data de coleta, nome do coletor etc.), e conservado em herbário para estudo.

Gonóporo = orifício externo do aparelho reprodutor.

Hemolinfa = fluido circulante característico dos animais com sistema circulatório aberto.

Heterocromatina = regiões do material genético que não estão envolvidas na transcrição, podendo mostrar-se bastante densas na microscopia de luz ou mesmo na microscopia eletrônica de transmissão.

Ingurgitadas = fêmeas de carrapatos que completaram seu processo de alimentação em hospedeiro.

Integumento = exoesqueleto responsável por recobrir externamente o corpo dos carrapatos, bem como por evitar a perda/entrada excessiva de água, além de fornecer proteção contra choques mecânicos.

Opistossoma = porção posterior do corpo dos carrapatos.

Panoístico = ovário que não possui células nutridoras nem foliculares.

Pedicelo = estrutura celular com função de sustentar, sintetizar e fornecer substâncias para o desenvolvimento dos ovócitos.

Tricotomizada = que teve os pelos raspados ou cortados.

Trioxeno = carrapato que necessita de três hospedeiros para completar seu ciclo de vida.

Vacúolos autofágicos = estruturas envoltas por membrana que têm como função digerir componentes da própria célula.

Vitelogênese = processo de formação do vitelo.

ANEXOS

ANEXO A – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DA CEUA

unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Rio Claro

COMISSÃO DE ÉTICA
NO USO DE ANIMAL
CEUA – IB – UNESP - CRC

DECISÃO CEUA Nº 11/2015

Instituição: **UNESP – IB – CRC**	Departamento: Biologia
Data de Registro CEUA: 23.04.15	

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado **"O Jambu (Acmella Oleracea) e sua ação acaricida: Estudo dos efeitos sobre a morfofisiologia dos sistemas reprodutores masculino e feminino de Amblyomma cajennense (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae)"** protocolo nº 3545, sob responsabilidade de Maria Izabel Souza Camargo (Pesquisador Responsável) e Luis Adriano Anholeto (Orientando) , que envolve a produção, manutenção e/ou a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto n 1676.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA).

Subprojeto(s) vinculado(s): ==.==

Colaboradores: Patrícia Rosa de Oliveira

A Comissão de Ética no Uso de Animal - CEUA do Instituto de Biociências da UNESP – Campus de Rio Claro, em sua **24º reunião ordinária**, realizada em **17/06/15.**

(**X**)	**Aprovou** o Projeto de Pesquisa acima citado, ratificando o parecer emitido pelo relator.
( )	Desde que **atendidas as pendências** apontadas na reunião (vide anexo), **aprova** o Projeto de Pesquisa acima citado (prazo máximo de 30 dias).
( )	**Referendou** o Projeto de Pesquisa acima citado, ratificando o parecer emitido pelo relator.
( )	Aprovou **retornar** ao interessado para atendimento das pendências encontradas (prazo máximo de 30 dias).
( )	**Não** Aprovou.
( )	**Retirou**, devido à permanência das pendências.

Vigência do Projeto: 01/04/2015 a 01/04/2019

Espécie/linhagem: Coelho branco da Nova Zelândia Número de animais: 06

Peso: 2 kg Idade: Sexo: fêmea

Origem dos animais (Informações sobre o fornecedor): Biotério de Botucatu- UNESP

Objetivo Acadêmico:	( ) TCC ( ) Mestrado (X) Doutorado ( ) Outros – (Iniciação Científica)

Rio Claro, 18/06/2015

Prof. Dr. José Paulo Leite Guadanucci
Coordenador

Instituto de Biociências – Seção Técnica Acadêmica
Avenida 24-A nº 1515 - CEP 13506-900 – Rio Claro - S.P. – Brasil - tel 19 3526-4105 - fax 19 3534-0009 - http://www.rc.unesp.br

ANEXO B – COMPROVANTE DE CADASTRO DE ACESSO SISGEN

Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso

Cadastro nº A34093F

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro:	**A34093F**
Usuário:	**UNESP**
CPF/CNPJ:	**48.031.918/0001-24**
Objeto do Acesso:	**Patrimônio Genético**
Finalidade do Acesso:	

☑ **Pesquisa Científica** ☐ **Bioprospecção** ☐ **Desenvolvimento Tecnológico**

Espécie

Amblyomma cajennense

Oryctolagus cuniculus

Acmella oleracea

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

Equipe

Maria Izabel Souza Camargo	**Instituto de Biociências, UNESP, Rio Claro, SP**
Luís Adriano Anholeto	**UNESP Rio Claro**
Rodney Alexandre Ferreira Rodrigues	**CPQBA - UNICAMP**
Marcelo Bahia Labruna	**USP**
Patrícia Rosa de Oliveira	**UNESP Rio Claro**

Resultados Obtidos

Divulgação de resultados em meios científicos ou de comunicação

Identificação do meio onde foi divulgado:	**Ticks and Tick-borne Diseases. Potential actior**
Identificação do meio onde foi divulgado:	**Toxic action of Acmella oleracea extract on the**

Data do Cadastro:	**20/08/2018 14:24:17**
Situação do Cadastro:	**Concluído**

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **15:55** de **25/04/2019**.

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
ASSOCIADO - **SISGEN**

ÍNDICE

A

A. cajennense, 9, 15, 21, 23, 24, 27, 28, 33, 41, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 79, 88, 97, 112, 113, 114, 117, 118, 119, 120, 132, 133, 134, 137, 141, 142, 143, 146, 147, 148, 150, 162, 165, 166, 168, 175, 193, 194, 204, 205, 206, 207, 209, 211, 212, 213, 222
Acari, 1, 19, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 166, 167, 168, 169, 170, 196, 197, 198, 199, 200, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228
Acmella oleracea, 1, 8, 9, 15, 35, 41, 44, 45, 46, 48, 51, 79, 88, 97, 112, 113, 115, 116, 118, 124, 126, 128, 130, 135, 136, 138, 141, 142, 144, 145, 147, 156, 158, 160, 166, 167, 168, 169, 175, 193, 196, 197, 198, 199, 200, 202, 203, 216, 218, 220, 223, 224
Amblyomma cajennense, 1, 8, 9, 15, 21, 23, 24, 27, 29, 32, 41, 44, 47, 51, 79, 88, 97, 112, 113, 117, 118, 122, 124, 126, 128, 130, 135, 136, 137, 139, 141, 142, 146, 154, 156, 158, 160, 166, 167, 168, 170, 196, 204, 215, 216, 219, 220, 222, 225, 226, 227
Análogo, 55
Análogo alcino do espilantol, 55
Anaplasmoses, 229
Argasidae, 19, 20, 26, 28, 221, 223
Assincrônico, 229
Avaliação morfofisiológica, 51

B

Babesioses, 229
Biotério, 47, 117, 146, 229
BME/CTVM2, 8, 9, 15, 40, 42, 55, 56, 172, 177, 178, 179, 181, 182, 183, 187, 192, 193, 194, 195, 204, 210, 211, 214
BME/CTVM6, 8, 9, 15, 39, 42, 55, 56, 57, 172, 177, 178, 179, 181, 182, 183, 184, 185, 189, 191, 192, 193, 194, 195, 204, 210, 211, 212, 213, 214

C

Carrapatos, 19, 21, 24, 25, 26, 113
Células secretoras, 122, 124, 126, 128
Cemento, 229
Citoplasma, 156, 158
CL50, 8, 15, 48, 49, 50, 51, 56, 57, 79, 118, 147, 204, 205, 211, 213
Concentração letal de 50%, 15
Cório, 229

E

Ecdise, 229
Ehrlichia minasensis, 8, 9, 55, 57, 172, 179, 184, 189, 191, 197, 214, 217, 218
Erliquiose, 229
Esclerotização, 229
Escudo, 229
Espermatóforo, 229

Eucromatina, 230
Exsicata, 230

F

Febre Maculosa Brasileira, 16, 21, 113, 142
Fêmeas, 51, 147

G

Giemsa, 57, 179, 180, 183, 184, 185, 187, 189
Gonóporo, 230
Grânulos de vitelo, 154

H

Hemolinfa, 230
Heterocromatina, 230
Histologia, 6, 43, 52, 115, 137, 144, 168, 221
Hospedeiros, 47, 117, 146

I

Ingurgitadas, 230
Integumento, 230
Ixodidae, 1, 19, 21, 26, 27, 28, 132, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 166, 167, 168, 169, 170, 196, 197, 198, 199, 200, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228

J

Jambu, 1, 37, 88, 97, 136, 138, 141, 142, 168, 175, 198, 220, 224

M

Machos, 49, 51, 118
Membrana plasmática, 154
Microscopia Eletrônica de Transmissão, 54, 119, 148, 150, 229

N

Neem, 167, 219
Nuttalliellidae, 19, 20, 221

O

Ovócitos, 154, 156, 158, 160

P

Panoístico, 230
Pedicelo, 230

R

Rhipicephalus microplus, 8, 9, 15, 16, 25, 26, 55, 114, 136, 138, 143, 162, 167, 169, 172, 173, 176, 197, 198, 199, 200, 203, 217, 218, 221, 222, 224, 225