
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR, MOLECULAR E
MICROBIOLOGIA
(PPG- BCMM)**

**AÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO* DO OZÔNIO SOBRE CÉLULAS DE LINHAGEM
EMBRIONÁRIA (RML-RSE E ISE6) E FÊMEAS ADULTAS DE CARRAPATOS
RHIPICEPHALUS LINNAEI SEMI INGURGITADAS**

MARINA RODRIGUES DE ABREU



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR, MOLECULAR E
MICROBIOLOGIA
(PPG- BCMM)**

**AÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO* DO OZÔNIO SOBRE CÉLULAS DE LINHAGEM
EMBRIONÁRIA (RML-RSE E ISE6) E FÊMEAS ADULTAS DE CARRAPATOS
RHIPICEPHALUS LINNAEI SEMI INGURGITADAS**

ALUNA: MARINA RODRIGUES DE ABREU

ORIENTADORA: PROFA. DRA. MARIA IZABEL SOUZA CAMARGO

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de doutora em Biologia Celular, Molecular e Microbiologia.

A162a Abreu, Marina Rodrigues de
Ação in vitro e in vivo do ozônio sobre células de
linhagem embrionária (RML-RSE E ISE6) e fêmeas
adultas de carrapatos *Rhipicephalus linnaei* semi
ingurgitadas / Marina Rodrigues de Abreu. -- , 2023
253 p. : il., tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista
(Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro,
Orientadora: Maria Izabel Souza Camargo

1. carrapatos. 2. cultivo celular. 3. ozônio. 4. acaricida
natural. 5. morfologia. I. Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: AÇÃO IN VITRO E IN VIVO DO OZÔNIO SOBRE CÉLULAS DE LINHAGEM EMBRIONÁRIA (RML-RSE E ISE6) E FÊMEAS ADULTAS DE CARRAPATOS RHIPICEPHALUS LINNAEI SEMI INGURGITADAS

AUTORA: MARINA RODRIGUES DE ABREU

ORIENTADORA: MARIA IZABEL SOUZA CAMARGO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em Ciências Biológicas, área: Diversidade Biológica e Biologia Ambiental pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. MARIA IZABEL SOUZA CAMARGO (Participação Virtual)
Departamento de Biologia Geral e Aplicada / Unesp - IB Rio Claro

Profa. Dra. GLAUCIA MARIA CAVASIN (Participação Virtual)
Departamento de Histologia, Embriologia e Biologia Celular / Universidade Federal de Goiás

Prof. Dr. LEONARDO DE OLIVEIRA (Participação Virtual)
Laboratório de Toxinologia Aplicada / Instituto Butantan

Profa. Dra. PRISCILA CINTRA SOCOLOWSKI (Participação Virtual)
Departamento de Biologia Geral e Aplicada / Unesp - IB Rio Claro

Rio Claro, 06 de janeiro de 2023

**Dedico esse trabalho à minha filha,
Aurora.**

Agradecimentos

Gostaria de agradecer imensamente a minha família, ao meu companheiro Bruno e minha filha Aurora, por todo amor, apoio e compreensão. Por embarcarem comigo nessa aventura (literalmente) e me inspirarem a ser uma pessoa e profissional melhor todos os dias. Agradeço também aos meus pais e meus irmãos, pelo apoio e suporte emocional, e por fornecerem toda ajuda que eu precisei durante essa etapa, sem vocês nada disso seria possível.

A todos meus amigos que compartilharam momentos bons e ruins ao longo dessa trajetória, obrigada pelas conversas e compartilhamento de angústias e aspirações, por torcerem por mim e vibrarem com as minhas conquistas.

Agradeço ao meu grupo de pesquisa BCSTM (Brazilian Central of Studies on Ticks Morphology) por todo apoio acadêmico e troca de conhecimento, tenho muito orgulho de pertencer a esse grupo tão competente. Obrigada a todos que estiveram ao meu lado nos dias de laboratório, de reuniões, e de trabalho, desejo todo sucesso a vocês.

Agradeço especialmente minha orientadora Profa. Dra. Maria Izabel Souza Camargo, pela oportunidade, confiança, e principalmente pela paciência em me auxiliar nesse processo. Obrigada por sempre exigir o meu melhor e me direcionar pelo árduo caminho de pesquisadora, você é incrível.

Agradeço a colaboração do Prof. Dr. Ítalo Delalibera Jr. da USP-Esalq, o qual auxiliou o desenvolvimento desse trabalho desde o início e apostou na nossa capacidade.

As Profa. Dra Ana Domingos e Dra. Sandra Antunes que me receberam em seu laboratório de pesquisa no IHMT, Lisboa, Portugal e me deram todo suporte para realização do meu estágio BEPE, serei eternamente grata por esse período.

Finalmente, agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento desse estudo (processo nº 2018/02999-9).

E a todos não citados mas que contribuíram direta ou indiretamente com esse trabalho, muito obrigada.

Resumo

A espécie *Rhipicephalus sanguineus* l. s. (*R. linnaei*) mais conhecida como “carrapato do cão”, possui uma grande importância médico-veterinária, não só por espoliar seus hospedeiros, mas também por ser um potencial vetor de agentes patogênicos. Dessa forma, inúmeros estudos vêm buscando métodos eficazes de controle desse hematófago, e atualmente, as estratégias mais utilizadas para seu controle tem sido o uso de acaricidas químicos sintéticos, porém, a aplicação indiscriminada desses químicos tem provocado enormes desvantagens como a seleção de linhagens mais resistentes de carrapatos, risco de toxicidade aos hospedeiros e a saúde humana, e contaminação ambiental. Portanto, novas alternativas eficazes de controle desse ectoparasita precisam ser avaliadas. O ozônio vem sendo relatado na literatura como agente oxidante com potencial ação antimicrobiana, desinfetante, esterilizante e cicatrizante e suas propriedades têm sido amplamente exploradas na indústria alimentícia, na desinfecção de ambientes hospitalares, e recentemente também no controle de pragas agrícolas. Nesse sentido, surgiu a hipótese de sua ação como agente acaricida para o controle de carrapatos, e embora algumas informações na literatura já indiquem esse caminho, pouco se estudou a respeito do seu efeito acaricida e principalmente como funcionam os mecanismos de ação sobre a exposição dos tecidos e das células desses ectoparasitas a essa substância. Diante do exposto, o presente estudo propôs estudar os mecanismos de ação do ozônio (água ozonizada) sobre fêmeas adultas de carrapato *R. sanguineus* l. s. (*R. linnaei*) *in vivo* e culturas de células de linhagem embrionária (RML-RSE e ISE6) *in vitro* avaliando os efeitos apresentados por tal substância nos diferentes modelos celulares e teciduais. Os resultados mostraram que o ozônio (água e óleo ozonizado) pode ser considerado um potencial acaricida natural com ação em carrapatos da espécie *R. sanguineus* l.s. (*R. linnaei*), provocando nestes toxicidade, confirmada pelas alterações morfofisiológicas encontradas tanto nos órgãos desses ectoparasitas (glândulas salivares, ovário, órgão de Gené e integumento), bem como alterando os parâmetros biológicos reprodutivos, a viabilidade celular e a expressão gênica de células embrionárias de carrapatos.

Palavras chave: carrapatos, cultivo celular, ozônio, controle, acaricida, morfologia.

Abstract

The species *Rhipicephalus sanguineus* l. s. (*R. linnaei*), better known as the “dog tick”, is of great medical and veterinary importance, not only for despoiling its hosts, but also for being a potential vector of pathogenic agents. In this way, numerous studies have been searching effective methods to control this hematophagous, and currently, the most used strategies for its control have been the use of synthetic chemical acaricides, however, the indiscriminate application of these chemicals has caused enormous disadvantages such as the selection of more resistant ticks, risk of toxicity to hosts and human health, and environmental contamination. Therefore, new effective alternatives to control this ectoparasite need to be evaluated. Ozone has been reported in the literature as an oxidizing agent with potential antimicrobial, disinfectant, sterilizing and healing action and its properties have been widely explored in the food industry, in the disinfection of hospital environments, and recently also in the control of agricultural pests. In this sense, the hypothesis of its action as an acaricidal agent for the control of ticks arose, and although some information in the literature already indicates this path, little has been studied regarding its acaricidal effect and mainly how the mechanisms of action on the exposure of ticks work in tissues and cells of these ectoparasites to this substance. Given the above, the present study proposed to study the mechanisms of action of ozone (ozonized water) on adult females of the tick *R. sanguineus* l. s. (*R. linnaei*) *in vivo* and embryonic lineage cell cultures (RML-RSE and ISE6) *in vitro* evaluating the effects presented by this substance in different cellular and tissue models. The results showed that ozone (water and ozonized oil) can be considered a potential natural acaricide with action on ticks of the species *R. sanguineus* l.s. (*R. linnaei*), causing toxicity in these, confirmed by the morphophysiological changes found both in the organs of these ectoparasites (salivary glands, ovary, organ of Gené and integument), as well as altering reproductive biological parameters, cell viability and gene expression of embryonic lineage tick cells.

Key-words: ticks, tick cells, ozone, control, acaricide, morphology.

Sumário

Resumo	1
1. Introdução.....	1
1.1. Carrapatos.....	1
1.2. A espécie <i>Rhipicephalus linnaei</i> (<i>R. sanguineus</i> l.s. “linhagem tropical”).....	1
1.3. A biologia do “carrapato marrom do cão”	2
1.4. Importância médica veterinária.....	3
1.5. O controle do carrapato <i>R. linnaei</i>	5
1.6. O estudo da morfologia como aliado no controle de carrapatos	7
1.7. O ozônio.....	7
1.8. Cultura de células de carrapatos.....	8
2. Objetivos	10
3. Material e métodos	11
3.1. Carrapatos.....	11
3.2. Ozônio.....	11
3.3. Bioensaios <i>in vivo</i>	12
3.3.1. Análise morfológica	12
3.3.2. Obtenção dos órgãos de <i>R. linnaei</i>	13
3.3.3. Análise sob microscopia de luz	13
3.3.4. Parâmetros biológicos.....	14
3.4. Cultivo celular.....	15
3.4.1. Cultura primária de glândulas salivares de carrapatos <i>R. linnaei</i>	15
3.4.2. Cultivo de células de linhagem embrionária (RML-RSE)	16
3.4.3. Cultura de células embrionárias (ISE6, IDE8, RS8, HLE/LULS42)	16
3.4.4. Cultura de células de mamíferos (DH82 E J774).....	17
3.5. Bioensaios <i>in vitro</i>	17
3.5.1. Exposição das células RML-RSE ao ozônio	17
3.5.2. Citometria de fluxo (MUSE)	18
3.5.3. Viabilidade celular (ensaio de caspases 3/7)	18
3.5.4. Alterações mitocondriais	19
3.5.5. Análise estatística	19
3.5.6. Cultivo de células das linhagens ISE6, IDE8, RS8, HLE/LULS42.....	19
3.5.7. Cultivo de <i>Ehrlichia canis</i>	20
3.5.8. Infecção de células de carrapato por <i>E. Canis</i>	20
3.5.9. Confirmação molecular da infecção de <i>E. Canis</i> (qPCR)	21

3.5.10. Óleo ozonizado (Oleozon®).....	22
3.5.11. Exposição das células ISE6 ao ozônio (Oleozon).....	22
3.5.12. Viabilidade celular	23
3.5.13. Análise molecular das células expostas ao ozônio (qPCR).....	23
3.5.14. Análise morfológica das células/patógenos	24
4. Resultados	25
Capítulo 1	27
Capítulo 2	42
Capítulo 3	82
Capítulo 4	94
Capítulo 5	103
Capítulo 6	129
Capítulo 7	139
Capítulo 8	147
Capítulo 9	177
5. Discussão geral.....	223
6. Referências	238

1. INTRODUÇÃO

1.1. Carrapatos

Os carrapatos pertencem ao Filo Arthropoda, Classe Arachnida, Subclasse Acari, Ordem Parasitiformes, Subordem Ixodida (NICHOLSON et al., 2019). Estima-se que atualmente existem cerca de 900 espécies divididas entre as famílias Nuttalliellidae, Argasidae e Ixodidae, sendo esta última composta por quase 80% do total de espécies descritas, sendo também a mais relevante economicamente e em aspectos médicos e veterinários (NICHOLSON et al., 2019).

A família Ixodidae, abriga os “carrapatos de corpo duro” (do inglês “hard ticks”), os quais recebem esse nome pois apresentam um escudo dorsal quitinoso, que nos machos recobre quase toda a sua superfície dorsal e nas fêmeas apenas a sua metade anterior, possibilitando assim a expansão do corpo durante o processo de ingurgitamento, e conferindo-lhes um dimorfismo sexual na fase adulta (GUGLIELMONE et al., 2014).

Os carrapatos são vetores de doenças humanas e veterinárias, sendo considerados os artrópodes hematófagos que possuem o maior potencial de transmissão de organismos infecciosos (vírus, bactérias, fungos e protozoários) e por isso o vetor de maior importância veterinária, perdendo apenas para os mosquitos em termos de impactos na saúde pública (NICHOLSON et al., 2019).

Consequentemente, os prejuízos econômicos provocados por esses ectoparasitas são imensos, ressaltando-se também que ainda é difícil mensurar os impactos financeiros globais decorrentes dessa relação carrapatos/doenças transmitidas (JONGEJAN e UILENBERG, 2004). Nessa direção estima-se que considerando-se apenas as perdas no Brasil esse valor chegue a 3,24 bilhões de dólares anuais (GRISI et al., 2014). Dessa forma, o estudo desses ectoparasitas pode auxiliar não apenas no entendimento e no controle de diversas doenças infecciosas, mas também minimizar os prejuízos veterinários e econômicos por eles causados.

1.2. A espécie *Rhipicephalus linnaei* (*R. sanguineus* lato sensu “linhagem tropical”)

A espécie *Rhipicephalus sanguineus* sensu stricto foi descrita pela primeira vez por Latreille em 1806 (como *Ixodes sanguineus*) e renomeada para o gênero *Rhipicephalus* por Koch em 1844. A sua descrição pobre em detalhes e de precisão compatível com a época, dificultou sua identificação ao longo dos anos. Consequentemente, muitas espécies foram erroneamente conferidas a esse táxon (NAVA et al., 2018). Durante as últimas décadas,

taxonomistas divergiram sobre a classificação dessa espécie, assumindo que outras populações de carrapatos haviam sido descritas como *R. sanguineus* sem apresentarem concordâncias morfológicas e compatibilidades genéticas (DANTAS-TORRES et al., 2018). Foi então estabelecido o grupo *Rhipicephalus sanguineus* lato sensu, complexo agregando cerca de 17 espécies com certas similaridades morfológicas e proximidade filogenética incluindo: *R. sulcatus* (NEUMANN, 1908), *R. turanicus* (POMERANTSEV, 1940), *R. secundus* (FELDMAN-MUHSAM, 1952), *R. guilhoni* (MOREL & VASSILADES, 1963), *R. camicasi* (MOREL, MOUCHET & RODHAIN, 1976), *R. afranicus* (BAKKES, 2020), entre outras.

Concomitantemente, novos estudos taxonômicos fazendo uso de análises genéticas, apontaram a existência de ao menos duas linhagens distintas de carrapatos dentro do grande grupo *R. sanguineus* l.s.: a linhagem “temperada” e a linhagem “tropical”, as quais, além de serem diferentes geneticamente, também são encontradas em diferentes regiões do globo (DANTAS-TORRES et al., 2018; NAVA et al., 2015).

Diante desse cenário, muito se avançou no sentido de redescrever a espécie *R. sanguineus* s.s., bem como suas características morfológicas e moleculares, com o propósito de finalmente diferencia-la das demais espécies dentro do complexo *R. sanguineus* l.s., além de auxiliar na identificação das outras (DANTAS-TORRES et al., 2018; NAVA et al., 2015). Ao que indicam os estudos mais atuais, a espécie *R. sanguineus* s.s. trata-se da então conhecida “linhagem temperada” de *R. sanguineus* l.s. (NAVA et al., 2018).

Nesse contexto, recentemente a espécie *R. sanguineus* l.s. linhagem “tropical” foi reconhecida como *Rhipicephalus linnaei* (AUDOUIN, 1826) por Šlapeta et al. (2021), em estudo realizado na Austrália, Fiji e Laos, o qual através de sequenciamento genômico mitocondrial confirmou a identidade e as distinções genéticas entre as outras espécies do complexo *R. sanguineus* l.s. com a espécie até então conhecida como *R. sanguineus* l.s. “linhagem tropical”. Além disso, os autores redescreveram a espécie, e elencaram as características morfológicas e moleculares que devem ser utilizadas para identificação da mesma (ŠLAPETA et al., 2022).

Portanto, a partir desse momento, a espécie até então conhecida como *R. sanguineus* l.s. “linhagem tropical” será aqui chamada de *R. linnaei*, seguindo a nova classificação.

1.3. A biologia do “carrapato marrom do cão”

Os carrapatos *R. linnaei*, bem como os do complexo *R. sanguineus* l.s., são popularmente conhecidos como “carrapato marrom do cão”, visto terem o cão doméstico como

seu hospedeiro preferencial, o que não os impede de parasitar outros mamíferos, inclusive o homem (DANTAS-TORRES; OTRANTO, 2015). O ciclo de vida desse carrapato compreende quatro estágios de desenvolvimento: ovo, larva, ninfa e adulto, que se distinguíveis pelo tamanho dos indivíduos, bem como pela morfologia dos mesmos. As larvas por exemplo, possuem apenas três pares de pernas, enquanto que os adultos possuem 4 pares, além ainda da abertura genital estar presente exclusivamente no indivíduo adulto (DANTAS-TORRES, 2010a).

Especificamente quanto ao comportamento de parasitismo a espécie *R. sanguineus* l.s. “linhagem tropical” (*R. linnaei*) é trioxena, ou seja, os carrapatos necessitam se alimentar em três hospedeiros (não sendo necessariamente nem no mesmo indivíduo e nem em indivíduos da mesma espécie), para que possa atingir com sucesso a fase adulta, sendo que nas mudanças de um estágio para outro (ecdise) as transformações ocorrem no ambiente (DANTAS-TORRES, 2010a).

O comportamento reprodutivo, difere entre as fêmeas e os machos dos carrapatos, uma vez que as fêmeas permanecem fixadas no hospedeiro alimentando-se, e só atingem seu completo ingurgitamento após a cópula com o macho (SONENSHINE; ROE, 2014). Considera-se que é durante a cópula que o macho transfere para a fêmea o chamado “fator de ingurgitamento” ou “fator de macho”, que irá estimular além do ingurgitamento, também a produção de ovos ou ovogênese, processo esse que inclui a vitelogênese, a produção de ovos viáveis e a origem dos novos indivíduos (SONENSHINE; ROE, 2014).

Após a produção dos ovos, tem início a oviposição, que acontecerá no solo após a fêmea se soltar do hospedeiro (DANTAS-TORRES, 2010a). Logo após a oviposição ter sido concluída, a fêmea morrerá e os ovos serão incubados por um período aproximado de 20 dias, dependendo das condições ambientais (DANTAS-TORRES, 2010b). Da eclosão do ovo surgirão as larvas que buscarão um hospedeiro para alimentar-se e então logo após sofrerão a ecdise para ninfas, que por sua vez após alimentar-se e sofrerem ecdise passarão ao estágio adulto (GRAY et al., 2013).

1.4. Importância Médica Veterinária

Alcançar o completo desenvolvimento e garantir o sucesso reprodutivo, levou os carrapatos a se adaptarem e a desenvolverem estratégias refinadas na busca pelo hospedeiro ideal (GUGLIELMONE et al., 2014). Para tanto, seu sistemas sensorial e osmorregulador,

sofreram significativa evolução, o que tem lhes permitido detectar estímulos do ambiente como: odor, vibração, e temperaturas (GUGLIELMONE et al., 2014).

Assim que encontrado o hospedeiro ideal, há também a busca e seleção para encontrar o melhor local de fixação no corpo deste, o que garantirá aos ectoparasitas o sucesso na alimentação (GUGLIELMONE et al., 2014). Essa “escolha” é realizada através dos estímulos externos que estimulam os quimiorreceptores alojados nos palpos dos carrapatos (SONENSHINE; ROE, 2014). Além das quelíceras que se encontram na região bucal e que são importantes ferramentas que auxiliam na perfuração da epiderme e da derme do hospedeiro, a introdução do hipostômio na ferida resultante da fixação com simultâneo depósito do cimento, produzido pelas glândulas salivares, permitem que o carrapato fixe ao hospedeiro e que um canal de alimentação seja estabelecido (SONENSHINE; ROE, 2014). Ressalte-se que nesse canal ocorre a troca de fluidos entre ectoparasita/hospedeiro/ectoparasita levando a saliva (mistura de bioativos secretada pelas glândulas salivares) do carrapato para o hospedeiro e o sangue do hospedeiro (incluindo todos os seus componentes imunológicos) para os carrapatos (GUGLIELMONE et al., 2014).

A saliva dos carrapatos é uma fonte riquíssima de bioativos. Trabalhos recentes com *R. sanguineus* l.s. reportaram a presença de mais de 2.000 proteínas nessa complexa mistura (TIRLONI et al., 2020) que inclui moléculas multifuncionais, inclusive aquela de modular os sistemas imune-inflamatório e hemostático dos hospedeiros (ABREU et al., 2019), garantindo assim não só o sucesso biológico dos ectoparasitas, mas também o de ser importante vetor de patógenos (KAZIMÍROVÁ; ŠTIBRÁNIOVÁ, 2013). A participação dos bioativos da saliva produzida pelos carrapatos, por meio da sua ação imunomoduladora no hospedeiro, facilitaria essa transmissão, uma vez que os microrganismos não encontrariam ou encontrariam obstáculos transponíveis para sua penetração e instalação no organismo hospedeiro (CAMARGO-MATHIAS; FURQUIM; NUNES, 2011; KOTÁL et al., 2015).

Atualmente sabe-se que os patógenos mais transmitidos pelos carrapatos são: as bactérias do gênero *Anaplasma* responsáveis por doenças como a Anaplasmosse; aquelas do gênero *Borrelia* spp, que são conhecidas por causar a doença de Lyme ou Borreliose; as do gênero *Ehrlichia* spp causadoras da famosa Erliquiose canina; e as do gênero *Rickettsia* que são responsáveis por causar a Febre Maculosa; além destas, alguns protozoários, como os do gênero *Babesia* causam a Babesiose; e aqueles do gênero *Hepatozoon* causam a Hepatozoonose canina (MELCHIOR, et al. 2020). Essa espécie de carrapatos também é vetora da *Rickettsia conorii* (responsável pela “Mediterranean spotted fever”) e da *R. rickettsii* (pela “Rocky Mountain

Spotted Fever”) (DANTAS-TORRES; OTRANTO, 2015; HOUSEMAN, 2013; IPEK et al., 2020; SOARES et al., 2012; SZABO et al., 2013).

Além disso, além desta ser uma espécie vetora, também é considerada ser reservatório de patógenos, oferecendo a estes condições para que se mantenham ativos por gerações, podendo o compartilhamento de patógenos dar-se por transmissão transovariana (da fêmea ingurgitada para a prole) ou transestadial (de um estágio de vida (do carrapato) para outro) (AKTAS; OZUBEK, 2018; IPEK et al., 2020).

1.5. O Controle do carrapato *R. sanguineus* l.s. “linhagem tropical” (*R. linnaei*)

Diante da relevante importância econômica e médico veterinária dos carrapatos dessa espécie, inclusive por serem vetores de patógenos causadores de diversas doenças em animais domésticos e humanos (DANTAS-TORRES, OTRANTO, 2015; LABRUNA et al., 2007), torna-se crucial buscar estratégias que auxiliem no controle desse ectoparasita.

Atualmente, as estratégias mais utilizadas fazem uso de acaricidas químicos sintéticos, como: o fipronil que induz alterações no sistema reprodutivo e nas glândulas salivares (OLIVEIRA et al., 2008, 2009; PEREIRA et al., 2011, 2009); a permetrina que provoca a degeneração do singânglio, alterações nas glândulas salivares e no sistema reprodutor (NODARI et al., 2011, 2012; ROMA et al., 2011, 2013, 2014); o fluazuron, que age no integumento e no intestino (OLIVEIRA et al., 2012, 2013, 2014); o dinotefuran que age no sistema reprodutor da fêmea e no intestino médio (OLIVEIRA et al., 2016, 2017); a deltametrina, com comprovada ação sobre o singânglio e sobre o sistema reprodutor feminino (CAMARGO-MATHIAS, 2017; PEREIRA et al., 2017).

Apesar da comprovada eficiência dos acaricidas que tem bases químicas sintéticas e que são amplamente comercializados no mercado de produtos veterinários, existe o agravante, frequentemente relatado na literatura, do uso indiscriminado dos mesmos no controle de ectoparasitas, incluindo o *R. sanguineus* l.s. (BECKER et al., 2019a). Atitudes dessa natureza vem causando sérios prejuízos econômicos e sanitários, reportados através de resultados obtidos do desenvolvimento de vários estudos (EIDEN et al., 2020), e que culmina na seleção de linhagens resistentes de carrapatos aos químicos amplamente utilizados, bem como na necessidade de se formular frequentemente novos produtos, ou então de se aumentar as doses daqueles que já seriam rotineiramente utilizados, culminando na intensificação do risco de toxicidade dos animais considerados não-alvos (EIDEN et al., 2017, 2020). Acrescente-se ainda

a alta contaminação ambiental derivada do acúmulo de resíduos provenientes destes compostos químicos (EIDEN et al., 2017).

Alguns estudos também demonstraram que essa espécie de carrapatos já vem apresentando resistência a compostos como: piretroides, amidinas, fenilpirazol e lactonas macrocíclicas (BECKER et al., 2019b; EIDEN, et al., 2020; EIDEN et al., 2017). Esses dados tem causado extrema preocupação, além de apontarem para a necessidade de que novas estratégias de controle sejam desenvolvidas, que além de eficientes, sejam mais limpas (CAMARGO-MATHIAS, 2013, 2018; EIDEN, et al., 2020; MELCHIOR et al., 2020).

Diante deste cenário, estudos com acaricidas que tenham bases naturais tem se mostrado uma perspectiva promissora para o controle da espécie *R. sanguineus* l. s.. Dentre eles podem ser citados: o óleo de neem (*Azadirachta indica*) que demonstrou efeitos sobre ovários (DENARDI et al., 2010a; 2010b; 2011; REMÉDIO et al., 2015), e integumento (REMÉDIO et al., 2014; LIMA DE SOUZA et al. 2017), singânglio (REMÉDIO et al., 2014) e glândulas salivares de *R. sanguineus* l.s. (*R. linnaei*) (REMÉDIO et al., 2015); o óleo de andiroba (*Carapa guianensis*) que provocou alterações nos ovários da mesma espécie (VENDRAMINI et al., 2012a; b; ROMA et al., 2013a) e no singânglio (ROMA et al., 2013a; b; 2015); o timol que além de alterações no ovários, também agiu sobre as glândulas salivares, o singânglio e o órgão de Gené da mesma espécie (MATOS et al., 2014, 2019, 2020); o carvacrol foi capaz de inibir o desenvolvimento ovariano (LIMA DE SOUZA et al., 2019); bem como o acetilcarvacrol que também teve efeito sobre o ovário e integumento de carrapatos *R. sanguineus* l.s. (*R. linnaei*) (KONIG et al., 2020; OLIVEIRA et al., 2020); o espilantol (extraído do jambú, *Acmella oleraceae*) que agiu sobre os ovários e intestino médio de *R. sanguineus* l.s. (*R. linnaei*) (OLIVEIRA et al., 2019); os ésteres do óleo de mamona (*Ricinus communis*) capazes de alterar a morfologia dos ovários e afetar a vitelogênese desses carrapatos (ARNOSTI et al., 2011b; SAMPIERI et al., 2012; 2013), assim como interferir na secreção das glândulas salivares (ARNOSTI et al., 2011a; CAMARGO-MATHIAS et al., 2016); e o extrato etanólico de *Tagetes patula* L que demonstrou efetividade sobre o ovário de carrapatos dessa mesma espécie (POLITI et al., 2015).

Todos esses bioativos mostraram, em laboratório, serem eficientes no controle de carrapatos, resultando em informações que estimularam a continuação de estudos dessa natureza na busca por estratégias de controle ecologicamente mais sustentáveis e que não provoquem tantos danos aos organismos não alvos e ao meio ambiente (CAMARGO-MATHIAS, 2013, 2018).

1.6. O estudo da morfologia como aliado no controle de carrapatos

Como já discutido anteriormente, a busca por estratégias eficientes de controle de carrapatos, incluindo o da espécie *R. sanguineus* l.s. (*R. linnaei*) tem se tornado uma constante (CAMARGO-MATHIAS 2013, 2018). Quando essas estratégias tratam de entender como os sistemas do carrapato respondem à exposição aos diferentes agentes químicos (sintéticos ou naturais), muitos estudos surgem mostrando resultados das alterações morfológicas, histológicas, fisiológicas, toxicológicas e ultraestruturais nesses ectoparasitas (ABREU et al., 2020a, 2020b; ARAUJO et al., 2012, 2014; ARNOSTI et al., 2011a, 2011b; CALLIGARIS et al., 2013; CAMARGO-MATHIAS et al., 2016, 2017; DENARDI et al., 2010a,b, 2012; KONIG et al., 2019; LIMA DE SOUZA et al., 2017, 2020; MATOS et al., 2020, 2019, 2018, 2014a, 2014b; NODARI et al., 2011, 2012b, 2012a, 2017; OLIVEIRA et al., 2010, 2012a, 2013, 2014, 2015, 2016a, 2016b, 2018, 2019; OLIVEIRA et al. 2020; PEREIRA et al. 2010; PEREIRA et al., 2017; POLITI et al., 2012, 2015; REMEDIO et al., 2013, 2014, 2016; ROMA et al., 2010, 2012, 2013a, 2013b, 2013c, 2014, 2015; SABADIN et al., 2017; SAMPIERI et al., 2012, 2013, VENDRAMINI et al., 2012a, 2012b).

Para a obtenção de resultados nos níveis morfohistológico, fisiológico e toxicológico das alterações ocorridas nos sistemas dos carrapatos em resposta a exposição aos químicos, faz-se uso de técnicas microscópicas, bem como de protocolos toxicológicos específicos (CAMARGO-MATHIAS, 2013, 2018). Essas técnicas/protocolos são consideradas ferramentas valiosas para o entendimento das alterações, tanto a nível tecidual quanto celular nos sistemas, órgãos e células dos carrapatos, evidenciando modificações organizacionais que chegam até o nível ultraestrutural (CAMARGO-MATHIAS, 2013, 2018; DENARDI et al., 2012; NODARI et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2014, 2016, 2017a, 2019; PEREIRA et al., 2011; REMEDIO et al., 2015, 2016; ROMA et al., 2014, 2015; SAMPIERI et al., 2012).

1.7. O ozônio

O ozônio (O_3) é um gás que resulta da quebra das ligações de moléculas de oxigênio (O_2) pela incidência ou de radiação ultravioleta ou de descargas elétricas de alta voltagem (MAJEWSKI, 2012). Os átomos separados se recombinaem com outras moléculas de oxigênio (O_2) formando uma nova molécula com três átomos de oxigênio (O_3), consideradas instáveis e que se degradam rapidamente no ar atmosférico, dependendo das condições de temperatura e pressão (MOREIRA et al., 2017). Além disso, o resíduo liberado são moléculas de oxigênio, o que é especialmente interessante, uma vez que tal composto não apresenta risco de

contaminação ambiental ou da saúde pública quando utilizado com critério (BATAKLIEV et al., 2014; DE OLIVEIRA et al., 2014; MOREIRA et al., 2017).

O ozônio tem sido descrito na literatura como um agente oxidante com potencial: ação antimicrobiana contra *Streptococcus mutans* e *Enterococcus faecalis* (MOREIRA FONSECA et al., 2015; NAGAYOSHI et al., 2004), ação desinfetante (LOPES et al., 2015), esterilizante (SOUSA et al., 2011) e cicatrizante (MENÉNDEZ ET AL., 2011; PEÑA SISTO et al., 2015; SECHI et al., 2001), sendo suas propriedades já amplamente exploradas na indústria alimentícia (GUZEL-SEYDIM et al., 2004), na desinfecção de ambientes hospitalares (MARSON et al., 2016; SOUSA et al., 2011), no tratamento de água (MAJEWSKI, 2012; PASSOS et al., 2014), e até em procedimentos terapêuticos em animais e humanos (OLIVEIRA et al., 2014; MENÉNDEZ et al., 2011). Estudos recentes já demonstraram a sua eficácia também contra pragas agrícolas e alimentícias, como o *Rhizopertha dominica* no trigo (SUBRAMANYAM et al., 2017), *Alphitobius diaperinus* em granjas (SOARES et al., 2018), e *Ephestia kuehniella* em farinhas e grãos comerciais (MORAGLIO et al., 2018).

Levando-se em consideração as propriedades já exploradas do ozônio (tanto como gás, água ozonizada e óleo ozonizado) (MRSON et al., 2016; MENÉNDEZ; FALCÓN; MAQUEIRA, 2011; NAGAYOSHI et al., 2004; SECHI et al., 2001) vem sendo testada a hipótese de sua ação como agente acaricida para o controle de carrapatos, tendo sido já relatado em estudos recentes sua capacidade de causar alterações na superfície do integumento e na placa espiracular (respiratória) de *R. sanguineus* l.s. (*R. linnaei*) (MOREIRA et al., 2017), concomitante à capacidade cicatrizante de feridas provocadas na pele dos hospedeiros pelos carrapatos (OLIVEIRA et al., 2014). Além disso, resultados do presente estudo já publicados demonstraram que o ozônio, sob forma de água ozonizada foi capaz de alterar a morfofisiologia tanto do integumento quanto das glândulas salivares de carrapatos *R. sanguineus* l.s. (*R. linnaei*) (ABREU et al., 2020a, b).

1.8. Cultura de células de carrapatos

O cultivo de linhagens de células de carrapatos vem se expandindo ao longo dos anos, e estima-se que existam mais de 60 linhagens já estabelecidas de 16 espécies de carrapatos ixodídeos de importância médico-veterinária (BELL-SAKYI et. al., 2018), prática que vem sendo conduzida em diversos laboratórios de pesquisa ao redor do mundo, visto essa ferramenta representar a possibilidade de se obter conhecimentos mais específicos sobre: a biologia celular desses animais (desenvolvimento embrionário e tecidual, produção de secreções, etc.); sobre a

relação ectoparasita-hospedeiro; sobre a interação vetor-patógeno; estímulo a produção de vacinas; e na elucidação de mecanismos de ação de acaricidas para controle desses ectoparasitas (BARROS-BATTESTI et al., 2018, BELL-SAKYI et al., 2007, LIMA-DUARTE et al., 2021, FERROLHO et al., 2016, MARTHINS et al., 2020, ZWEYGARTH et al., 2014).

Além disso, os estudos com células de carrapatos cumprem as exigências do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal que orienta que haja redução do número de animais em laboratório, bem como estimula que sejam desenvolvidos métodos alternativos que substituam os mesmos nas pesquisas (CONCEA, 2013). Isso também é posto em destaque, visto que os carrapatos por serem ectoparasitas hematófagos necessitam dos animais vertebrados (hospedeiros) para se alimentar e completar, portanto, o seu ciclo biológico (NICHOSON et al., 2019).

A maioria das linhagens celulares de carrapatos existente hoje são linhagens embrionárias, ou seja, células de embriões obtidas a partir de ovos de carrapatos, devido este ser um recurso abundante e o estágio de desenvolvimento mais facilmente adquirido e manipulável, além de se tratar de células indiferenciadas com crescimento acelerado (BELL-SAKYI et al., 2018). Culturas celulares originadas de órgãos específicos de carrapatos, como intestino médio, glândulas salivares e ovários tem se mostrado mais difíceis de serem mantidas e replicadas ressaltando-se que apesar dos esforços e das tentativas, ainda não se conseguiu produzir linhagens celulares permanentes (MOSQUEDA et al., 2008).

Assim, diante do estado da arte, constata-se a importância da realização de estudos que utilizem ao invés de animais *in vivo*, o uso de linhagens celulares, no caso em questão, de carrapatos, uma vez que as mesmas possibilitam a investigação científica fazendo uso de métodos diversos e menos agressivos. Afora essa vantagem é importante destacar que os estudos que utilizam essa metodologia de cultura de células, permitem que essa ferramenta seja incrementada por meio: a) da obtenção de novas linhagens celulares, b) do aprimoramento dos métodos de cultivo e c) pela aquisição de informação e prática nos experimentos, o que leva ao estabelecimento de protocolos específicos que enriquecem o conhecimento e a otimização de estudos realizados *in vitro*.

2. OBJETIVOS

Objetivo geral

O presente estudo teve como objetivos: 1) determinar os mecanismos de ação do ozônio na forma de água ozonizada sobre fêmeas adultas de carrapatos *R. sanguineus* l. s. “linhagem tropical” (*R. linnaei*) *in vivo* por meio da análise morfológica de integumento, glândula salivar, ovário e órgão de Gené; 2) verificar a ocorrência de alterações nos parâmetros biológicos dessas fêmeas em decorrência da exposição a água ozonizada; 3) avaliar a viabilidade de células de linhagem embrionária de carrapatos da mesma espécie em cultura (*in vitro*) quando expostas tanto a água quanto ao óleo ozonizados, por meio de análises morfológica e molecular.

Objetivos específicos

- Verificar as alterações morfofisiológicas nas células/tecidos de fêmeas de carrapatos *R. sanguineus* l. s. “linhagem tropical” (*R. linnaei*) *in vivo* (integumento, glândula salivar, ovário e órgão de Gené) e *in vitro* (células embrionárias de carrapatos) através de técnicas de microscopia de luz, após exposição ao ozônio (água ozonizada);
- Avaliar os parâmetros biológicos de fêmeas ingurgitadas de carrapatos *R. sanguineus* l.s. “linhagem tropical” (*R. linnaei*) expostas ao ozônio (água ozonizada) *in vivo*;
- Estabelecer as culturas das linhagens embrionárias de carrapatos *R. sanguineus* l. s. (RML-RSE e RML-15) no Departamento de Biologia Geral e Aplicada da UNESP-Rio Claro, SP e a cultura primária de células de glândula salivar de carrapatos *R. sanguineus* l.s. “linhagem tropical” (*R. linnaei*);
- Verificar a viabilidade das células das linhagens embrionárias de carrapatos (RML-RSE e RML-15) após exposição as diferentes concentrações do ozônio (água ozonizada) *in vitro*;
- Avaliar as alterações mitocondriais (despolarização de membrana mitocondrial) após a exposição ao ozônio (água ozonizada) *in vitro* através de citometria de fluxo (analisador de células MUSE) verificando estresse oxidativo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos para o desenvolvimento do presente trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA, Instituto de Biociências, UNESP – *campus* Rio Claro) protocolo nº 3997 26/2018.

3.1. Carrapatos

Foram utilizados carrapatos *R. sanguineus* l.s. “linhagem tropical” (*R. linnaei*) obtidos de colônia previamente estabelecida pelo grupo BCSTM (***Brazilian Central of Studies on Ticks Morphology***) e mantida em estufa BOD em condições controladas (temperatura 28°C ± 1°C, 80% de umidade, com fotoperíodo de 12 horas) em sala do Biotério do Departamento de Biologia Geral e Aplicada da UNESP de Rio Claro, SP, Brasil.

As infestações artificiais de carrapatos nas coelhas hospedeiras do Grupo Genético Botucatu, obtidas do Biotério Central da UNESP de Botucatu, SP, Brasil, isentas de contato prévio com o ectoparasita ou qualquer tipo de acaricida deram-se segundo protocolo estabelecido por Bechara et al. (1995). As coelhas foram mantidas em gaiolas de contenção em sala do Biotério do Departamento de Biologia Geral e Aplicada da UNESP de Rio Claro, SP e alimentadas com ração e água *ad libitum*.

Para a obtenção de fêmeas tanto as semi-ingurgitadas quanto as completamente ingurgitadas de carrapatos, primeiramente realizou-se infestações subsequentes com todos os estágios de desenvolvimento (larva, ninfa e adultos) até a obtenção do número desejado de adultos em jejum. Posteriormente, foram alocados cerca de 50 casais (uma vez que a fêmea só completa seu ingurgitamento após a cópula com o macho) em câmaras alimentadoras previamente fixadas com cola atóxica na região dorsal tricotomizada das coelhas hospedeiras.

Para garantir que as fêmeas de carrapatos permanecessem fixadas pelo período desejado, realizou-se observação diária do período de alimentação até o total ingurgitamento, quando foram retiradas das hospedeiras com auxílio de pinça cirúrgica, e alocadas em tubos coletores até serem submetidas ao teste de imersão (DRUMMOND et al., 1973) para avaliação dos parâmetros biológicos (ingurgitadas) e da morfologia interna de: glândula salivar, integumento, ovário e órgão de Gené (semi-ingurgitadas).

3.2. Ozônio

O ozônio, nesse estudo, foi utilizado diluído em água para melhor estabilidade molecular e durabilidade, como mencionado anteriormente, portanto, para obtenção da água

ozonizada nas diferentes concentrações utilizou-se um gerador de ozônio modelo BRO3-Plus 1 com produção de 5,6 g/h de ozônio e um gerador de oxigênio PSA modelo Intensity (AIRSEP) com vazão de 2L/minuto de gás oxigênio, instalados num tanque de 40L de água. As concentrações desejadas foram verificadas por sensor digital acoplado ao tanque de água ozonizada. Devido a necessidade de repetições de experimentos ao longo do desenvolvimento desse projeto, tal procedimento foi realizado tanto no laboratório da empresa Brasil Ozônio localizada no CIETEC/IPEN da USP (Universidade de São Paulo), Butantã, São Paulo, Brasil, empresa colaboradora desse trabalho, sob a supervisão do engenheiro de projetos Robson de Almeida Faria, quanto no Laboratório de Patologia e Controle Microbiano, localizado no Departamento de Entomologia e Acarologia, USP, ESALQ, Piracicaba, SP, Brasil, coordenado pelo Professor Dr. Ítalo Delalibera Junior, também colaborador desse trabalho.

3.3. Bioensaios *in vivo*:

3.3.1. Análise Morfológica

Teste de imersão

Para análise da morfologia dos órgãos dos carrapatos foi realizado o teste de imersão das fêmeas semi-ingurgitadas de carrapatos *R. sanguineus* l. s. “linhagem tropical” (*R. linnaei*) em diferentes concentrações de ozônio (Van Leeuwen, 2015), as quais foram alocadas nos seguintes grupos:

Grupo Controle (GC): fêmeas expostas somente a água destilada;

Grupo 1 (G1): expostas a água ozonizada na concentração 3 mg/L;

Grupo 2 (G2): expostas a água ozonizada na concentração 2,25 mg/L;

Grupo 3 (G3): expostas a água ozonizada na concentração 1,5 mg/L;

Grupo 4 (G4): expostas a água ozonizada na concentração 0,75 mg/L.

A imersão dos carrapatos deu-se em recipientes de vidro contendo água ozonizada nas respectivas concentrações segundo protocolo proposto por Drummond et al. (1973). Em cada grupo, cinco fêmeas foram imersas por 5 minutos. Em seguida, foram secas em papel absorvente, colocadas em placas de Petri envoltas por filme de PVC e devidamente identificadas para acondicionamento em estufa BOD, sob condições controladas ($28 \pm 1^\circ\text{C}$, 80% de umidade, com fotoperíodo de 12 horas), por 24, 48 e 72 horas para terem posteriormente seus órgãos analisados (glândulas salivares, integumento, ovário e órgão de Gené) sob microscopia de luz.

3.3.2. Obtenção dos órgãos de fêmeas de *R. sanguineus* l.s. “linhagem tropical” (*R. linnaei*)

Após a exposição à água ozonizada as fêmeas dos carrapatos foram anestesiadas por choque térmico em geladeira e na sequência dissecadas em solução tampão HBSS com Mg^{2+} e Ca^{2+} (NaCl 8g; Na_2HPO_4 48mg; KCl 400mg; KH_2PO_4 60mg; CaCl 140mg; $MgSO_4$ 98mg; D-glucose 1,6g; Penicilina G 100U/mL; Streptomicina 100µg/mL, água destilada 1 L) em gelo, onde tiveram glândula salivar, integumento, ovário e órgão de Gené retirados. Após, o material foi acondicionado em microtubos contendo 100µL de HBSS que foram levados ao Laboratório de Histologia do Departamento de Biologia Geral e Aplicada do IB, UNESP, Rio Claro, SP para processamento histológico.

3.3.3. Análise sob Microscopia de Luz

A) Preparo das lâminas histológicas

Após coleta dos órgãos, os mesmos foram fixados em paraformaldeído 4% durante 48 horas em microtubos plásticos de 1.5 mL. Em seguida, foram lavados por três vezes com tampão fosfato de sódio 0.1M, pH 7.4, e desidratados em série crescente de álcool etílico a 70%, 80%, 90% e 95% (banhos de 30 minutos cada). Posteriormente, foram embebidos pelo período de uma semana em resina LEICA, incluídos em moldes plásticos contendo resina mais polimerizador e mantidos em estufa 37°C até polimerização da mesma. Após esse processo, os blocos foram seccionados na espessura de 3µm, as secções foram recolhidas em lâminas de vidro (oito secções/lâmina) que foram armazenadas em estufa para posterior coloração.

B. Coloração pela hematoxilina e eosina aquosa (HE)

As lâminas foram hidratadas em água destilada por um minuto, coradas com hematoxilina durante 10 minutos e então lavadas por quatro minutos em água parada e depois em água corrente. Em seguida, foram coradas pela eosina aquosa por cinco minutos e novamente lavadas em água corrente. As lâminas foram secas em temperatura ambiente para serem posteriormente montadas com Entellan e lamínula.

C. Detecção de Proteínas (Azul de Bromofenol)

Para detecção de proteínas, as lâminas contendo as secções dos diferentes órgãos foram coradas com azul de bromofenol por uma hora em temperatura ambiente, e na sequência foram

lavadas por cinco minutos em água corrente. A secagem se deu em temperatura ambiente até o processo de montagem.

D. Detecção de Carboidratos (Reação pelo Ácido Periódico de Schiff -PAS)

Para detecção de carboidratos utilizou-se a técnica do PAS. As lâminas foram cobertas com ácido periódico 0,4% durante 10 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, foram lavadas em água destilada e após submetidas ao reativo de Schiff por uma hora no escuro. Posteriormente, as lâminas foram novamente lavadas por 3 vezes em água sulfurosa em banhos de 1 minutos cada. Finalmente, foram lavadas em água corrente por 15 minutos e depois levadas para secagem em temperatura ambiente para serem montadas na sequência.

E. Montagem das lâminas e Fotodocumentação

Após secagem, as lâminas foram rapidamente mergulhadas em xilol e cobertas com Entellan e lamínula de vidro previamente limpa. As lâminas permanentes foram analisadas e fotodocumentadas em fotomicroscópio de luz de campo claro LEICA DM750 alocado no Departamento de Biologia Geral e Aplicada da UNESP de Rio Claro, SP.

3.3.4. Parâmetros biológicos

Para avaliação dos parâmetros biológicos das fêmeas de carrapatos *R. sanguineus* l. s. “linhagem tropical” (*R. linnaei*) foram alocadas em grupos (5 fêmeas/grupo, sendo realizado em triplicata, ou seja, total de 15 fêmeas/bioensaio):

Grupo Controle (GC) - fêmeas ingurgitadas expostas somente à água destilada

Grupo Tratamento (GT) - expostas a água ozonizada na concentração mais alta (3mg/L).

As fêmeas com peso homogêneo (obtido em balança analítica), foram separadas. A concentração de 3mg/L de água ozonizada foi utilizada para o ensaio dos parâmetros biológicos baseada também em resultados prévios obtidos durante o desenvolvimento desse trabalho, e que sinalizaram a ocorrência de alterações morfológicas tanto no integumento quanto nas glândulas salivares (ABREU et al., 2020 a,b).

Nessa etapa, os carrapatos foram colocados em recipientes de vidro preenchidos com 200 mL de água ozonizada (GT) ou água destilada (GC) seguindo protocolo proposto por Drummond et al. (1973). Em cada grupo, cinco fêmeas foram imersas por 5 minutos, e foram secas em papel absorvente para retirada do excesso de líquido. Na sequência, foram pesadas

individualmente em balança analítica, e posteriormente colocadas em placas de Petri (150 x 30mm) com tampa devidamente identificada para posterior acondicionamento em estufa BOD Eletrolab El 202 BOD (Biological Oxygen Demand) sob condições controladas ($28 \pm 1^\circ\text{C}$, 80% de umidade, com fotoperíodo de 12 horas). O grupo controle foi alocado numa segunda estufa evitando assim possíveis interferências na análise.

Para as avaliações dos parâmetros biológicos, fez-se o acompanhamento diário das fêmeas de cada grupo. Foi observada a oviposição, até o momento da morte da última delas. As massas de ovos/fêmea foram pesadas em balança analítica, fotodocumentadas sob estereomicroscópio e acondicionadas em seringa plástica de 10 mL, com extremidade distal cortada, vedada com algodão hidrófilo e acondicionada em BODs nas mesmas condições controladas já descritas.

Os seguintes parâmetros biológicos foram analisados:

- a) peso da fêmea ingurgitada antes da postura,
- b) peso da massa de ovos e
- c) percentual de eclosão (%EC), valores que foram utilizados para o cálculo do índice de produção de ovos (IPO) (BENNETT, 1974) e percentual de controle (DRUMMOND et al., 1973).

A análise estatística dos dados e confecção de gráficos foram realizadas no software Graphpad Prism 8.0.1, utilizando o teste de variância “ANOVA” seguido do teste de Tukey para obtenção dos dados considerados significativos ($p < 0,05$).

3.4. Cultivo celular

3.4.1. Cultura primária de células de glândulas salivares de carrapatos *R. sanguineus* l.s. (*R. linnaei*)

Para a obtenção e estabelecimento do protocolo de cultura celular primária da glândula salivar de carrapatos, foi realizado um ensaio de digestão das glândulas salivares que foram obtidas de fêmeas de carrapatos *R. sanguineus* l. s. “linhagem tropical” (*R. linnaei*) semi-ingurgitadas, alimentadas por quatro dias em coelhas hospedeiras no Biotério do Departamento de Biologia Geral e Aplicada da UNESP de Rio Claro, SP.

Aproximadamente 20 fêmeas semi-ingurgitadas foram anestesiadas em geladeira, por choque térmico, e dissecadas em gelo utilizando-se solução tampão HBSS com Mg^{2+} e Ca^{2+} (NaCl 8g; Na_2HPO_4 48mg; KCl 400mg; KH_2PO_4 60mg; CaCl 140mg; MgSO_4 98mg; D-glucose 1,6g; Penicilina G 100U/mL; Streptomicina 100µg/mL água destilada 1 Litro) para

remoção das glândulas, as quais foram acondicionadas em microtubos contendo 100µL de tampão HBSS.

Em seguida, as glândulas salivares foram fragmentadas com auxílio de uma microtesoura e pinça estéreis, centrifugadas à 110 g por 3 minutos à 4°C e lavadas com o mesmo tampão por 3 vezes. Na sequência procedeu-se a digestão celular com a enzima colagenase tipo II (50U/mL) por 3 horas à 37°C (sob agitação a cada 30 minutos). Depois foi realizada a lavagem com tampão HBSS para inativação da enzima e o material foi centrifugado à 110g por 3 minutos à 4°C, o sobrenadante foi recolhido e ressuspendido em 3mL de meio L-15/MEM (Meio de cultura L-15 (Leibovitz), meio de cultura MEM (Minimal Essential Medium), Tryptose phosphate broth (TPB), L-Glutamina 200mM e Penicilina (10,000 unidades) /Streptomicina (10,000µg)) suplementado com 20% SFB, e filtrado em “cell strainer” (poro de 40µm) com auxílio de uma pipeta automática. Após, uma alíquota foi retirada para contagem de células em câmara de Neubauer com Azul de Tripán (1:2). Após realizada a contagem, a suspensão foi ajustada a 1×10^6 células/mL em meio L-15B suplementado com 20% SFB e transferida para tubos de cultura de células com fundo chato e mantidas em incubadora a 32 °C.

3.4.2. Cultivo de células de linhagem embrionária (RML-RSE)

As células de linhagem embrionária de carrapatos *R. sanguineus* l.s. (RML-RSE) foram gentilmente cedidas pela professora Dra. Lesley Bell-Sakyi coordenadora do “Tick Cell Biobank” da Universidade de Liverpool, Liverpool, UK, as quais aqui foram mantidas em tubos de face plana para cultura contendo meio L-15/MEM (Meio de cultura L-15 (Leibovitz) - 35mL, meio de cultura MEM (Minimal Essential Medium) - 35mL, Tryptose phosphate broth (TPB) - 10mL, L-Glutamina 200mM - 1mL e Penicilina (10,000unidades)/ Streptomicina (10,000µg) - 1mL) suplementado com 20% de Soro Fetal Bovino (SFB), em incubadoras à 28°C até atingirem total confluência para a realização dos bioensaios *in vitro*.

3.4.3. Cultura de células embrionárias de carrapatos (ISE6, IDE8, RS8, HLE/LULS42 - IHMT, Lisboa, Portugal)

As células de linhagens embrionárias ISE6 e IDE8 (*Ixodes scapularis*), RS8 (*R. sanguineus*), e HLE/LULS42 (*Hyalomma lusitanicum*) cedidas pela Dra. Ana Domingos no IHMT (Instituto de Higiene e Medicina Tropical) – UNL (Universidade Nova de Lisboa), Lisboa, Portugal, foram cultivadas em tubos para cultura de face plana com 2,2 mL de meio L15B300 (MUNDERLOH et al., 1999), L-15B (MUNDERLOH AND KURTTI, 1989), e

L15/L15B (MUNDERLOH AND KURTTI, 1989), respectivamente, com troca de meio uma vez/semana e mantidas em incubadoras com temperatura controlada entre 28 à 32°C até o momento da realização dos bioensaios.

3.4.4. Cultura de células de mamíferos (DH82 e J774) (IHMT, Lisboa, Portugal)

Foram cultivadas também células de mamíferos (de cão DH82 e de camundongos J774) em meio de cultivo DMEM suplementado com 20% de Soro Fetal Bovino (SFB) sem antibióticos em frascos de cultivo 75cm² em incubadora de CO₂ com temperatura controlada de 35 a 37°C, para que servissem como reservatório para o crescimento de *E. canis* e serem utilizadas posteriormente para a infecção em novas linhagens de células de carrapato.

3.5. Bioensaios *in vitro*

-Células RML-RSE (UNESP- Rio Claro)

3.5.1. Exposição das células RML-RSE ao ozônio

A exposição *in vitro* à água ozonizada deu-se com a linhagem de células embrionárias RML-RSE de carrapatos *R. sanguineus* l.s. cultivadas em tubos para cultura de face plana contendo meio de cultura L-15/MEM durante 24 horas em incubadora a 28°C.

As células foram divididas nos seguintes grupos:

Grupo Controle Negativo - GCN (expostas somente a água destilada);

Grupo Controle Positivo- GCP (expostas ao DMSO);

Grupo Ozônio- GO (expostas a 3mg/L de ozônio);

Posteriormente, foram adicionados 50 µL de água destilada no grupo GCN, 50 µL de DMSO no grupo GCP e 50 µL da maior concentração de ozônio (água ozonizada) 3mg/L no GO. Os tubos foram levados de volta à incubação nas mesmas condições de cultura descritas anteriormente, nos períodos de 24 e 48 horas, para posterior análise das células em citometria de fluxo.

O DMSO (dimetilsulfóxido - (CH₃)₂SO) foi utilizado nesse bioensaio como controle positivo, pela suas propriedades antioxidativas e também pela sua toxicidade moderada em culturas células. Como controle negativo foi utilizado água destilada.

Os procedimentos para obtenção das concentrações de água ozonizada, bem como o equipamento utilizado para esse experimento foram os mesmos descritos no bioensaio *in vivo*, realizados também no Laboratório de Patologia e Controle Microbiano, coordenado pelo

Professor Dr. Ítalo Delalibera Junior, colaborador desse trabalho, e localizado no Departamento de Entomologia e Acarologia, USP, ESALQ, Piracicaba, SP, Brasil.

3.5.2. Citometria de Fluxo (MUSE)

Os bioensaios *in vitro* foram realizados utilizando-se o equipamento de Citometria de Fluxo/Analisador e Contador Celular MUSE™ (Merck – Millipore) e o kit *Muse Caspase 3/7 Assay Kit* e o *Muse MitoPotential Kit* (Merck®, Kenilworth, NJ, USA), no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Biologia Geral e Aplicada da UNESP de Rio Claro.

As células da linhagem embrionária (RML-RSE) expostas ao ozônio (água ozonizada) na maior concentração (3mg/L) e períodos foram processadas para análise no citômetro de fluxo/cell analyzer MUSE® segundo orientações do fabricante para obtenção dos dados de viabilidade celular e de alterações mitocondriais.

As células das linhagens embrionárias (RML-RSE) dos grupos expostos aos bioensaios *in vitro* foram desprendidas do fundo do tubo com auxílio de pipeta automática e por meio de movimentos delicados de “flush”. Em seguida, a suspensão de 300 µL de células foram centrifugadas por 5 minutos a 1500 rpm e 28°C. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 1200 µL de HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution) para a realização da leitura e quantificação do número total de células (células/mL) pelo equipamento MUSE™ e posteriormente as amostras foram encaminhadas para as etapas do protocolo de cada Kit.

3.5.3. Viabilidade celular (Ensaio de Caspases 3/7)

O ensaio de viabilidade celular através do Kit *Muse Caspase 3/7 Assay Kit* foi realizado para obtenção da porcentagem de células vivas e apoptóticas de cada grupo.

Para este ensaio, foi aplicado o protocolo de marcação das células segundo indicação do fabricante do kit, onde amostras das células após contagem (procedimento descrito no item anterior), foram colhidas e ressuspensas em 600 µL tampão de ensaio (1X Assay Buffer BA). Na sequência, alíquotas de 50 µL de células de cada grupo (controle, DMSO e exposto a 3mg/L de ozônio) foram incubadas com 5 µL de solução *MUSE™ Caspase-3/7 Reagent* durante 30 minutos a 37°C. Após esse período, foram adicionados 150 µL do reagente MUSE™ Caspase 7-AAD em cada amostra, que permaneceram por 5 minutos em temperatura ambiente e protegidas da luz. Ao final deste período cada amostra foi levada para análise pelo equipamento MUSE™.

Determinou-se a porcentagem de células vivas e apoptóticas por meio do software próprio do analisador de células MUSE™, cujos dados foram plotados em histogramas representativos do número de eventos em função da fluorescência.

3.5.4. Alterações mitocondriais

Para esse ensaio foi utilizado o kit “MUSE™ MitoPotential Kit” e aplicado o protocolo de marcação das células segundo indicação do fabricante para obtenção da porcentagem de células com alterações mitocondriais. Após a contagem, as células foram ressuspensas em 600 µL tampão de ensaio (1X Assay Buffer BA). Em seguida foram realizadas alíquotas de 100 µL da suspensão em tubos eppendorfs e adicionados 95 µL da solução *MUSE™ Mitopotential Working*. As mesmas foram incubadas durante 20 minutos a 37°C. Após esse processo, foram adicionados 5 µL do reagente *MUSE™ Mitopotential 7-AAD* às amostras, incubadas por mais 5 minutos em temperatura ambiente e protegidas da luz. Ao final deste período, cada amostra foi levada para análise pelo equipamento MUSE™.

A porcentagem de células vivas ou mortas com membrana despolarizada foi determinada por meio de software próprio do equipamento cujos resultados geraram histogramas representativos do número de eventos em função da fluorescência.

3.5.5. Análise Estatística

A análise estatística dos dados e confecção de gráficos foram realizadas no software Graphpad Prism 8.0.1, utilizando o teste de variância “ANOVA” seguido do teste de Tukey para obtenção dos dados considerados significativos ($p < 0,05$).

-Células ISE6, IDE8, RS8, HLE/LULS42 (IHMT, Lisboa, Portugal)

As etapas a seguir foram realizadas durante o estágio BEPE – FAPESP no Instituto de Higiene e Medicina Tropical, da Universidade NOVA de Lisboa, Portugal sob a supervisão da professora Dra. Ana Domingos e Dra. Sandra Antunes.

3.5.6. Cultivo de células das linhagens ISE6, IDE8, RS8, HLE/LULS42

As células de linhagens embrionárias ISE6 e IDE8 (*Ixodes scapularis*), RS8 (*R. sanguineus*), e HLE/LULS42 (*Hyalomma lusitanicum*) foram cultivadas em tubos para cultura de face plana com 2,2 mL como descrito anteriormente, e mantidas em incubadoras com temperatura controlada entre 28 à 32°C. Simultaneamente, foram cultivadas também células de

cão DH82 conforme descrito previamente. Essas células foram cultivadas para servirem de reservatório para o crescimento de bactérias *E. canis* e possibilitarem a infecção em novas linhagens de células de carrapato.

3.5.7. Cultivo de *Ehrlichia canis*

As bactérias *E. canis* (Spain 105) previamente isoladas do sangue de um cão naturalmente infectado e mantidas através da linhagem de células de cão DH82 e IDE8 (ZWEYGARTH et al., 2014) foram criopreservadas (10% de DMSO) em nitrogênio. As mesmas foram também cedidas pela Dra. Ana Domingos para realização da infecção de novas linhagem celulares.

As células IDE8 infectadas com *E. canis* foram mantidas por 3 semanas para crescimento das bactérias em meio L-15B suplementado com 10% de tryptose phosphate broth (TPB), 5% de Soro Fetal Bovino (SFB), 0.1% concentrado de lipoproteína bovina (MP Biomedicals), 0.1% NaHCO₃ e 10 mM HEPES, sem antibióticos (ECM) (ZWEYGARTH et al., 2014).

3.5.8. Infecção de células de carrapato por *E. canis*

A partir da terceira semana de cultivo as células IDE8 infectadas com *E. canis* foram destacadas por meio de movimentos de “up-and-down” e por raspagem do fundo com auxílio de micropipeta de 2mL. A suspensão de células foi centrifugada a 200x g por 5 minutos em temperatura ambiente. Na sequência as células foram ressuspensas em 500µL de Tripsina (500µL/mL de PBS) e incubadas a 37°C por 20 minutos. Após, o volume original foi completado (2-5mL) com meio ECM (L-15B sem antibióticos), e a suspensão passou por agulha 26G por 10 vezes para ruptura mecânica das células e liberação das bactérias intracelulares. Centrifugou-se a suspensão de células em 1500 x g a 5 minutos e a alíquota de 500mL do sobrenadante contendo as bactérias foi transferido para cada tubo de cultura de células de ISE6 e DH82 previamente estabelecidas.

As células infectadas com *E. canis* foram mantidas continuamente em tubos de face plana selados contendo 2,2mL de meio L-15B sem antibióticos à 32°C (ISE6) e em frasco de 75cm² com meio DMEM suplementado com 20% de SFB sem antibióticos a 35°C (DH82). O meio foi trocado uma vez por semana. A análise dessas células deu-se semanalmente para identificação de infecção através de análise morfológica de lâminas citocentrifugadas em

CitoSpin e coradas com Giensa (FERROLHO et al., 2016), com observação sob microscópio de luz convencional.

Todos os experimentos seguiram as normas e diretrizes de biossegurança do IHMT-NOVA, Lisboa, Portugal.

3.5.9. Confirmação molecular da infecção de *E. canis* (qPCR)

-Extração de RNA e DNA

A extração de DNA e RNA foi realizada seguindo o protocolo Tri Reagent® (Sigma–Aldrich). A preparação das amostras iniciou-se centrifugando-as a 12000 x g por 10 minutos a 5°C, em seguida o sobrenadante foi descartado e foram adicionados 250 µL de Tri Reagent® deixando reagir por 5 minutos em temperatura ambiente. A separação das fases foi realizada adicionando 50 µL de clorofórmio, invertendo por 15 segundos e deixando a temperatura ambiente por 15 minutos antes de centrifugar a 12000 x g por mais 15 minutos a temperatura de 5°C.

Para isolamento do RNA, foi retirada cuidadosamente a fase aquosa da amostra e transferida para um novo microtubo de 1,5 mL onde foram adicionados 125 µL de 2-propanol e deixado a temperatura ambiente por 10 minutos. A seguir, o microtubo foi centrifugado a 12 000 x g a 5°C por 10 minutos para precipitação do RNA. O sobrenadante foi retirado e foram adicionados 250 µL de etanol 75% e centrifugado a 7500 x g por 5 minutos a temperatura de 5°C. Depois retirou-se o etanol e deixou-se secar a amostra em temperatura ambiente por 10 minutos e o pellet foi ressuscitado em SDS 0,5% e armazenado em -2-8°C. A confirmação da extração e concentração da amostra foi realizada utilizando equipamento Nanodrop 1000 Spectrophotometer da Thermo Fisher Scientific.

-Síntese de cDNA

Para a produção de cDNA a partir do RNA isolado de cada amostra foi utilizado o kit da BioRad “Script cDNA Synthesis Kit” seguindo o protocolo do fabricante. Após adicionar os componentes do kit (água sem nuclease, 5x Script Reation Mix, Script reverse transcriptase e o RNA) totalizando 20 µL de solução, a mesma foi colocada em termociclador T100™ Thermal Cycler com ciclos de 5 minutos a 25°C, 20 minutos a 46°C e 1 minuto a 95°C. A concentração de cDNA foi confirmada através da utilização do equipamento Nanodrop 1000 Spectrophotometer da Thermo Fisher Scientific.

-qPCR para análise de infecção por *E. canis*

A PCR foi conduzida utilizando-se o protocolo para Real Time TaqMan Probe para identificação do gene *dsb* de *E. canis*, utilizando primers Dsb-300 e Dsb-728 (Doyle, 2005). Uma reação de 10 μ L foi preparada com 5 μ L de Mix PCR Buffer, 0,8 μ L de cada primer a 10 μ M, 0,8 μ L da sonda *dsb* (Probe), 2 μ L de cDNA e água sem nuclease para completar o volume. A PCR foi realizada em equipamento de PCR Real Time “CFX Connect Real Time System” (Bio-Rad, CA, USA) em 45 ciclos com condições de 5 minutos de 95°C, 15 segundos a 95°C e 1 minuto de 60°C cada.

3.5.10. Óleo ozonizado (Oleozon®)

Devido à grande instabilidade do ozônio, nessa etapa realizada no Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT) da Universidade NOVA de Lisboa, Portugal, local onde foi realizado o estágio BEPE, optou-se por utilizar o óleo ozonizado Oleozon produto comercial composto por óleo de girassol ozonizado, visando garantir a estabilidade do composto para a realização dos bioensaios *in vitro*.

3.5.11. Exposição das células ISE6 ao ozônio (Oleozon)

A exposição *in vitro* das células embrionárias de carrapatos (ISE6) foi realizada em placas de 24 poços. As células dos tubos de face plana contendo meio de cultura L-15B300 foram ressuspensas com auxílio de pipeta graduada e pipetador automático com movimentos de “*up and down*” até que todas fossem desgrudadas do tubo. Em seguida, uma alíquota de células foi retirada para contagem em câmara de Neubauer e a suspensão foi ajustada para concentração de 1×10^6 células/mL, em seguida foram adicionados 500 μ L da suspensão de células em cada poço. As placas foram mantidas em incubadora a 32°C até completa aderência (2-3 dias).

Para exposição das células (ISE6) a placa de 24 poços foi assim dividida:

Grupo Controle Negativo - GCN (células expostas somente a meio L-15B300);

Grupo Controle Positivo- GCP (células expostas ao DMSO);

Grupo Ozônio 50 μ L/mL- GO50 (células expostas ao óleo ozonizado na concentração de 50 μ L/mL); e

Grupos Ozônio 100 μ L/mL- GO100 (células expostas ao óleo ozonizado na concentração de 100 μ L/mL).

Para esse experimento foi utilizado o óleo ozonizado (Oleozon®),

Essas diferentes concentrações de óleo ozonizado foram definidas através de LC50 (a concentração mínima do composto capaz de induzir 50% de morte das células) obtida através da análise de viabilidade celular.

O DMSO (dimetilsulfóxido - $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$) foi utilizado nesse bioensaio como controle positivo, pela suas propriedades já conhecidas sobre toxicidade moderada em culturas células, induzindo morte celular. Como controle negativo foi utilizado apenas meio de cultivo L-15B300.

Foram adicionados 50 μL de meio L-15B300 no grupo **GCN**, 50 μL de DMSO no grupo **GCP**, 50 μL e 100 μL do óleo ozonizado nos grupos **GO50** e **GO100** (respectivamente). Os tubos foram incubados nas mesmas condições de cultura a 32°C, durante 24 horas e levados para análises dos resultados.

3.5.12. Viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada após 24 horas da exposição das células ao meio de cultivo (L15B-300), ao DMSO e ao óleo ozonizado nas concentrações 50 e 100 $\mu\text{L/mL}$ (concentrações essas definidas após ensaio piloto com diferentes concentrações com o intuito de se estabelecer a concentração mínima do composto capaz de induzir 50% de morte das células LC50) através de contagem de células vivas utilizando o método de Azul de Tripan (1:2) em Câmara de Neubauer. Os dados de viabilidade obtidos foram analisados e a confecção de gráficos foram realizados no software Graphpad Prism 6.0, utilizado o teste de variância “ANOVA”, seguido do teste de Tukey, sendo os valores de $p < 0,05$ considerados significativos.

3.5.13. Análise molecular das células expostas ao ozônio (qPCR)

Análises de PCR quantitativo foram realizadas para avaliação de genes associados a estresse e morte celular (GST, Caspases 1 e 3) após a exposição das células de carrapato (ISE6) ao óleo ozonizado e comparado com os grupos controle. Esta técnica foi realizada no IHMT NOVA sob a supervisão da Dra. Sandra Antunes.

O RNA das células foi extraído utilizando TriReagent (Sigma–Aldrich), a concentração das amostras foi avaliada usando o equipamento Nanodrop 1000 Thermo Fisher Scientific de acordo com as instruções do fabricante. Para a síntese de cDNA foi utilizado o kit “iScript™ cDNA Synthesis Kit” (Bio-Rad) em um equipamento T100 Thermal Cycler (Bio-Rad), assim como descrito anteriormente.

Para realização do qPCR para avaliação da expressão gênica de genes relacionados ao estresse e morte celular foram escolhidos os genes GST (relacionado ao estresse oxidativo), Caspase 1 (relacionada a processos pró-inflamatórios e a morte celular por piroptose) e Caspase 3 (diretamente relacionada a morte celular por apoptose).

Os ensaios foram realizados em triplicatas utilizando o kit iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix (BioRad) seguindo o protocolo do fabricante. Uma reação de 10 µL foi preparada utilizando 5 µL de Mix para PCR Buffer, 0,5 µL de cada primer, 1 µL de cDNA e água livre de nucleases até completar o volume. As reações foram conduzidas em termociclador CFX Connect Real-Time System (Bio-Rad, CA, USA), em 45 ciclos com temperatura de anelamento e extensão a 60°C e com inserção da melt curve 55-95°C, sendo 0,5°C a cada 0,05 minutos. Uma curva padrão com diluições em série foi incluída para determinar a eficiência de amplificação através da inclinação da curva padrão. Os primers utilizados foram CASP1, CASP3 e GST. Os primers foram desenhados utilizando-se da plataforma Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) e bases de dados como o Genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/). Foram também utilizados os genes de referência: R13A e 16S para normalização da expressão relativa. Os produtos foram purificados com kit “NZYGelpure kit” (NZYTech), corrido em gel de agarose e sequenciados.

A análise dos resultados foi realizada com recurso ao CFX Manager™ version 3.1 (Bio-Rad, CA, USA) que utiliza o método de Pfaff, sendo que $p > 0,05$ define uma diferença estatisticamente significativa. Assim, os valores de expressão diferencial foram calculados com as eficiências de amplificação e a derivação do Cq de uma amostra versus uma amostra controle.

3.5.14. Análise morfológica das células/patógenos

Para monitoramento morfológico da infecção bactéria e para análise morfológica após a exposição ao óleo ozonizado, esfregaços de células preparados em citocentrífuga CitoSpin, utilizando uma alíquota de 150 µL da suspensão celular, centrifugando a 4400 rpm durante 5 minutos, foram posteriormente corados com Giemsa (Hemacolor Rapid Staining Kit) e examinados sob fotomicroscópio por meio de comparação entre os grupos controle negativo e positivo.

4. RESULTADOS

Os resultados obtidos no presente trabalho serão aqui apresentados em 9 capítulos: um capítulo de livro publicado, dois artigos publicados em periódicos internacionais, dois artigos submetido a revista internacional especializada na área do estudo, dois protocolos de experimentação, um manuscrito em preparação e um relatório científico realizado durante o estágio BEPE no IHMT, Lisboa, Portugal.

1. Capítulo 1 (Capítulo de livro)

“Ticks On The Magnifying Glass”. Ebook Inside Ticks Morphophysiology, Toxicology and Therapeutic Perspectives. CAMARGO-MATHIAS, M.I. (Org.), São Paulo: Editora UNESP, 2018. Disponível em www.editoraunesp.com.br.

2. Capítulo 2 (Revisão)

ABREU, M. R.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. State of the art of control of the tick *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato: A review of strategies and future perspectives with focus on morphohistological studies. Situação: Submetido ao periódico internacional: “Ticks and Tick-borne Diseases”.

3. Capítulo 3 (Artigo Publicado 1)

Exposure of Ticks *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae) to Ozonated Water: Integument Response. Ozone: Science & Engineering, v. 1, p. 1-10, 2020. doi: 10.1080/01919512.2020.1727310.

4. Capítulo 4 (Artigo Publicado 2)

Morphophysiological analysis of the salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae) exposed to ozonated water: A control strategy. Medical and Veterinary Entomology, 2020. doi: 10.1111/mve.12472.

5. Capítulo 5 (Artigo Submetido)

Ozone as a potential acaricide: evaluation of reproductive parameters and detection of morphophysiological changes in reproductive tissue of female ticks of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato.

6. Capítulo 6 (Protocolo 1 – cultura primária de células de glândulas salivares)

“Protocolo de cultivo primário de células de glândulas salivares de fêmeas de carrapatos *R. sanguineus* l. s. semi-ingurgitadas”

7. Capítulo 7 (Protocolo 2- testagem de acaricidas em células embrionárias de carrapatos)

“Protocolo de testagem de compostos acaricidas em células embrionárias de carrapatos”

8. Capítulo 8 (Cultivo e bioensaios com células RML-RSE)

“Análise mitocondrial e viabilidade celular de células embrionárias de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* lato sensu (RML-RSE) expostas ao ozônio”

9. Capítulo 9 (Resultado Parcial obtido na BEPE)

“Avaliação *in vitro* da atividade acaricida do ozônio sobre células de linhagem embrionária de carrapatos (RSE8 e IDE8) infectadas e não infectadas com *Ehrlichia canis*”

Capítulo de livro “**Ticks on the magnifying glass**” no livro “Inside ticks: Morphophysiology, toxicology and therapeutic perspectives”, publicado pela Editora Unesp em 2018 e organizado pela Dra. Maria Izabel Camargo-Mathias, de autoria: Abreu, M.R., Travaglini, R. V.; Oliveira, P. R.; Anholeto, L. A.; Matos, R. S.; Sanches, G. S.; Camargo-Mathias, M. I.



CAMARGO-MATHIAS, M. I. Inside ticks: Morphophysiology, toxicology and therapeutic perspectives. 1. ed. São Paulo: Editora Unesp, 2018.

2

TICKS ON THE MAGNIFYING GLASS

**Abreu, M. R.; Travaglini, R. V.; Oliveira, P. R.; Anholeto, L. A.; Matos, R. S.;
Sanches, G. S.; Camargo-Mathias, M. I.**

TAXONOMY AND SYSTEMATIC

Ticks are obligatory ectoparasites which belong to the Phylum Arthropoda, Class Arachnida, Subclass Acari, Order Parasitiformes, Suborder Ixodida (BARKER; MURRELL, 2004). There are currently an estimated 899 species of ticks divided into the families Nuttalliellidae, Argasidae and Ixodidae, the latter comprising the largest number of species, with great medical, veterinary and economic importance (ANDERSON; MAGNARELLI, 2008; DANTAS-TORRES, 2008; NAVA et al., 2015).

The member of the family Ixodidae, constituted of 702 species (GUGLIELMONE et al., 2014), have the mouthparts inserted in the anterior scutum of the body, as well as a chitinous scutum covering almost the entire dorsal part in the males and almost half or one third in the females, allowing the enlargement of the body during engorgement. Ticks, therefore, present gender dimorphism in adult stage (REMEDIÓ;

NUNES; CAMARGO-MATHIAS, 2015). The family Argasidae comprises 193 species (SONENSHINE; ROE, 2014). The main characteristic of these ticks is the absence of a dorsal scutum. Their mouthparts are located on the underside of the body and they ingest less blood in comparison with the ones belonging to the family Ixodidae (WALKER, 1994).

The third family, Nuttalliellidae, is constituted of a single species called *Nuttalliella namaqua*, recently reported in South Africa (MANS et al., 2012). It is considered the most basal lineage of ticks, and differs from the other families mainly for the heavily corrugated integument and the form of fenestrated plates (ROSHDY et al., 1983).

Ticks in general represent a great public health concern, once they cause considerable livestock losses (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*), and are vectors of zoonosis that affect domestic/wild animals and the human beings as well (*Rhipicephalus sanguineus* s. l., brown dog tick, *Amblyomma sculptum*, and *Amblyomma triste*).

***Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae)**

Popularly knowed as the cattle tick, this species is endemic to tropical and subtropical areas of the world (ESTRADA-PEÑA et al., 2006). Despite having cattle as preferential hosts, they can be occasionally found parasitizing buffalo, horses, goats, sheep, dogs and wild animals (FRANQUE et al., 2007). This species has great veterinary significance by transmitting pathogens that cause babesiosis (*Babesia bovis* and *B. bigemina*) and anaplasmosis (*Anaplasma marginale*), affecting consequently

cattle health and productivity (GIGLIOTI et al., 2016; MEKONNEN et al., 2002). Therefore, *R. (B.) microplus* is responsible for causing noteworthy economic losses in livestock industries (GRISI et al., 2014).

Rhipicephalus sanguineus sensu lato (Acari: Ixodidae)

The species *R. sanguineus sensu stricto* (s. s.) was first described by Latreille in 1806. The original morphological description presented is not sufficient to allow an accurate identification of this species. Moreover, there is no type specimen available for comparisons, making its identification even more difficult (WALKER et al., 2005). It is currently a group of uncertain morphological definition, once recent molecular studies demonstrated that *R. sanguineus sensu lato* (s. l.) actually consists of a complex of species (MORAES-FILHO et al., 2011; NAVA et al., 2015). The species remains object of discussion among taxonomists (DANTAS-TORRES; OTRANTO, 2015).

R. sanguineus s. l. ticks have the dog as preferential host and are vectors of pathogens, such as bacteria, protozoa and nematodes, which are responsible for transmitting several diseases to domestic animals and the human beings as well (DANTAS-TORRES, 2010).

Amblyomma cajennense sensu lato (Acari: Ixodidae)

The *Amblyomma cajennense* complex, also called *A. cajennense sensu lato* is composed of two species in Brazil, *A. cajennense* s. s. and *A. sculptum* (MARTINS et

al., 2016). While *A. cajennense* s. s. is restricted to Amazonian region, *A. sculptum* can be found in coastal and central-western states (MARTINS et al., 2016; NAVA et al., 2014). Thus, many specimens that had been classified as *A. cajennense* s. s. corresponds, in fact, to *A. sculptum*.

Amblyomma sculptum is popularly known as star ticks, are mainly equine parasites, and are occasionally found on other hosts including cattle, deer, domestic animals, birds, reptiles and even human beings (OLIVEIRA et al., 2003).

This species is the main transmitter of the bacteria *Rickettsia rickettsii*, the causative agent of spotted fever, a disease that seriously affects animal health in several regions of Brazil (SZABO et al., 2013; LABRUNA et al., 2007).

***Amblyomma triste* (Koch, 1844) (Acari: Ixodidae)**

The geographic distribution of the species *Amblyomma triste* is restricted to South America. These ticks parasitize cattle, deer, capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*), dogs and human beings. The species is considered the main vector of rickettsiosis, caused by the bacteria *Rickettsia conorii*. The disease is characterized by skin lesions with a black ulcerous crust (*tache noire*), high fever and severe headache (OLIVEIRA, 2006).

EXTERNAL MORPHOLOGY OF TICKS

The external structure of the ticks comprises the capitulum and the body, also called idiosoma (**Fig. 8 A**). The former contains the mouthparts, which are responsible for fixation and feeding (**Fig. 8 B**), and is constituted of: a) a pair of palps with chemiosensorial structures that select the site on the host body where the tick will attach; b) a pair of chelicerae, with the function of perforating the host skin; and c) a hypostome, which acts as a fixation organ and as a food channel, passing out the saliva into the host and the host blood into the tick digestive tube. The hypostomal shape and dentition are important features used in the identification of species (ANDERSON; MAGNARELLI, 2008; BARKER; MURRELL, 2004).

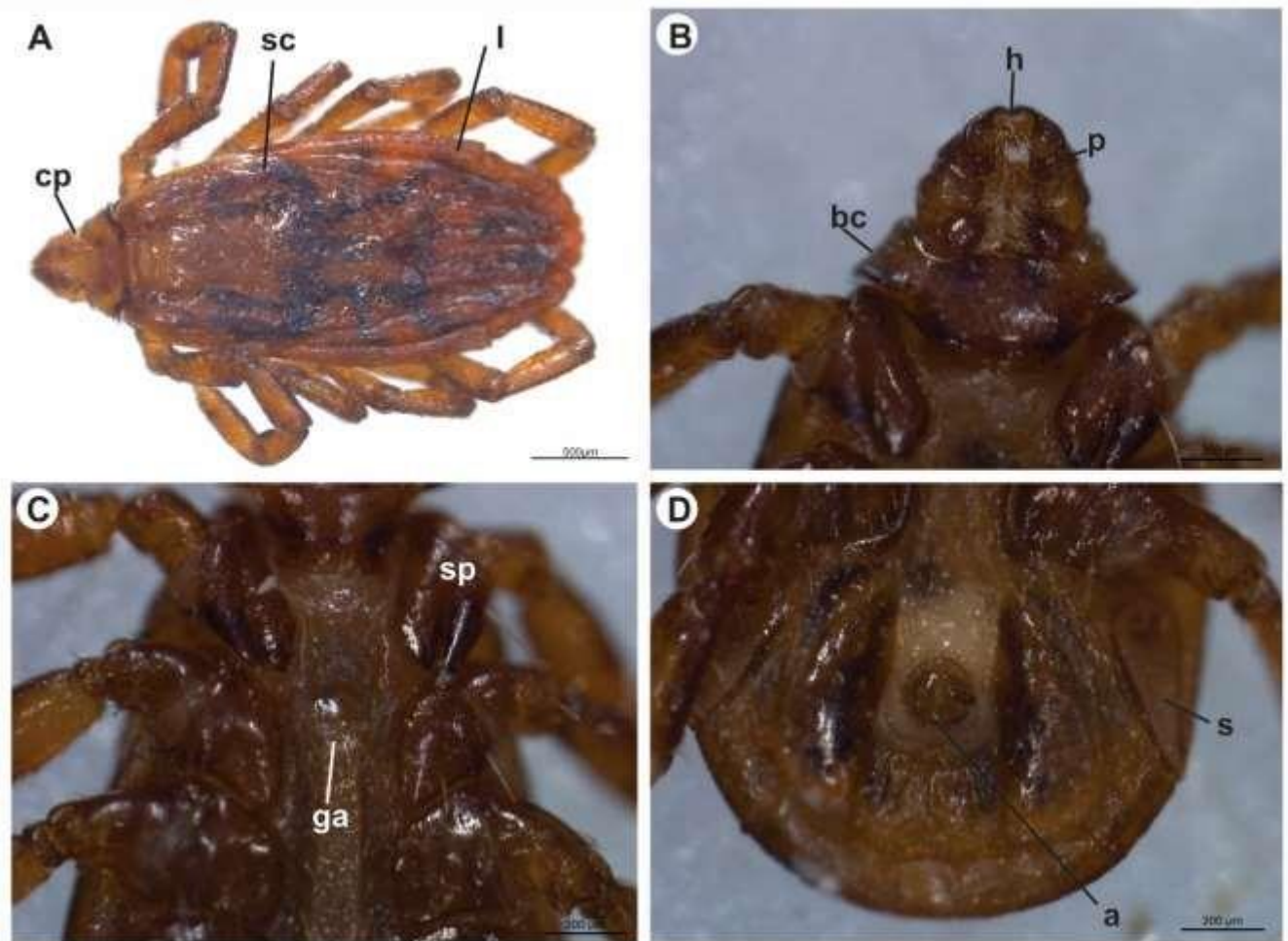
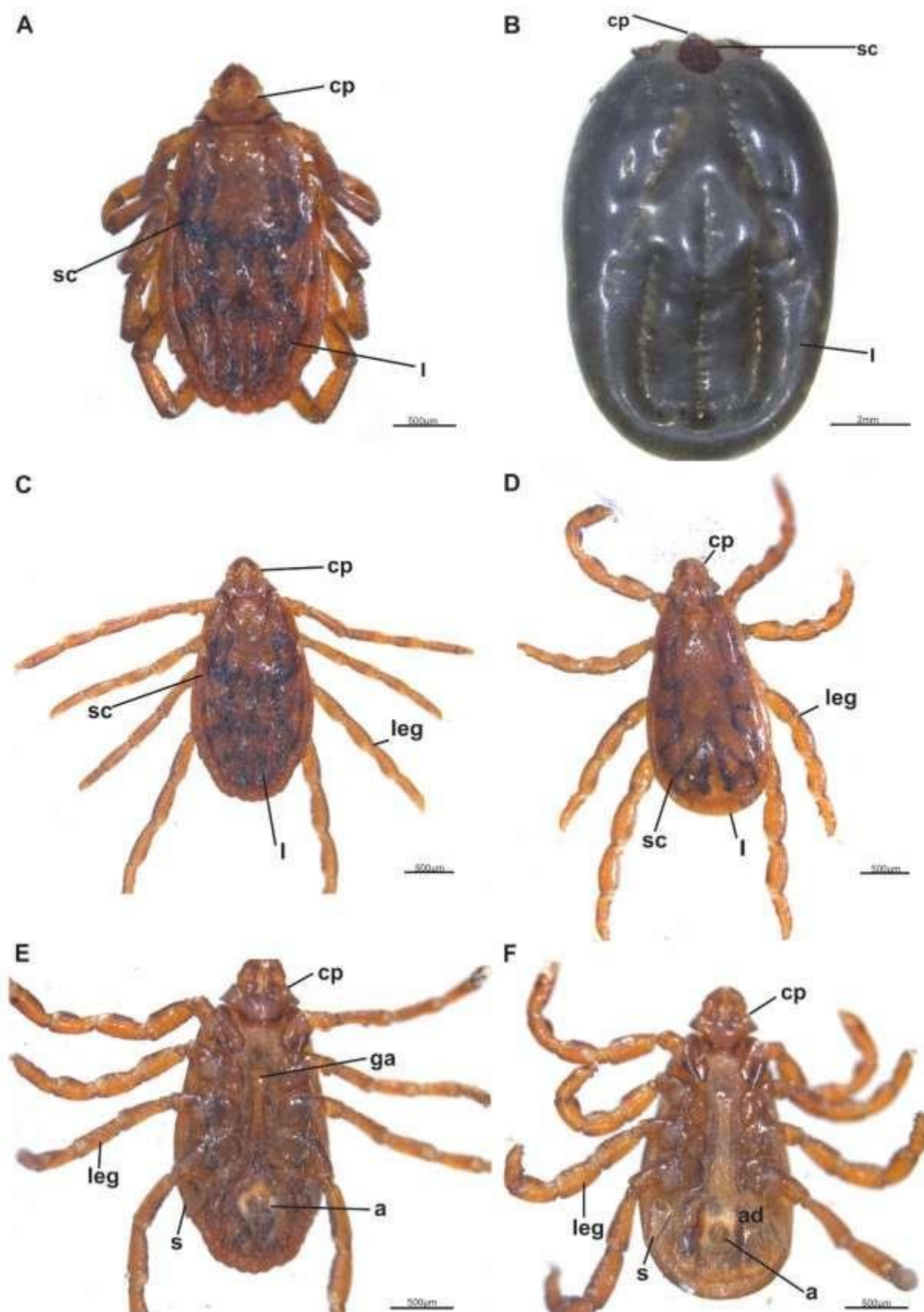


Figure 8: (A) Dorsal region of a *R. sanguineus* s. l. unfed female; (B-C) Ventral region of a *R. sanguineus* s. l. unfed female in detail; (D) Ventral region of a *R. sanguineus* s. l. unfed male in detail. **a**= anus; **i**= idiosoma; **bc**= basis capitulum; **cp**= capitulum; **h**= hypostome; **ga**= genital aperture; **p**= palpi; **s**= spiracular plate; **sp**= spur; **sc**= scutum.

The legs, segmented in coxa, trochanter, femur, larva, tibia, tarsus and ambulacrum, are located in the anterior part of the body (**Fig. 9 C-F**) (three pairs in larva, four pairs in the nymphs and adults) (ANDERSON; MAGNARELLI, 2008; DANTAS-TORRES, 2008). The coxae may have spurs (**Fig. 8 C** and **Fig. 9 E-F**) which are also used in tick's taxonomy. The genital pore is in the ventral anterior regions (closed in larvae and open in nymphs and adults) (**Fig. 8 C** and **Fig. 9 E-F**). The spiracle and anus are situated in the posterior region (**Fig. 8 D**) (SONENSHINE; ROE, 2014). Males of some tick genus can also present a group of ventral plates represented by adanal (**Fig. 9 F**), accessory and subadanal plates (KONEMAN; ALLEN; JANDA, W.M. SCHRECKENBERGER, 1997).

The scutum is a sclerotized plate, ornamented or no, that covers the whole dorsal region of the males, but a small anterior part in the females (**Fig. 9 C-D**), allowing cuticle expansion during feeding and oogenesis (**Fig. 9 A-B**) (ANDERSON; MAGNARELLI, 2008; SONENSHINE; ROE, 2014).

Figure 9: **(A, C)** Dorsal region of a *R. sanguineus* s. l. unfed female; **(B)** Dorsal region of a *R. sanguineus* s. l. engorged female; **(D)** Dorsal region of a *R. sanguineus* s. l. unfed male; **(E)** Ventral region of a *R. sanguineus* s. l. unfed female; **(F)** Ventral region of a *R. sanguineus* s. l. unfed male; **a**= anus; **i**= idiosoma; **cp**= capitulum; **ga**= genital aperture; **leg**= leg; **s**= spiracular plate; **sc**= scutum; **ad**= adanal plate.



TICK'S BIOLOGY

The life cycle of ticks consists of four stages of development: egg, larvae, nymph and adult. Some species are monoxenous, as the cattle tick (*R. (B.) microplus*), i.e., they parasitize a single host during the whole life cycle. Other species are heteroxenous, feeding on different hosts, including: mammals, rodents, birds, amphibians, reptiles, other ticks, and the human beings as well (DENARDI et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2003). An important characteristic of these ectoparasites is that, during their biological cycle, they can survive for long periods after dropping off the host, sheltered in the vegetation or soil cracks and crevices (WALKER, 1994).

After fully engorged and having completed oogenesis, the females drop off the host and start oviposition, which can last approximately 18 days and produce up to 7.000 eggs, as reported for the species *R. sanguineus* s. l. (DANTAS-TORRES, 2010). The female dies after laying the eggs, and the incubation period will last approximately 20 days, depending on the environmental conditions. The larvae will find and feed on a host, to eventually undergo ecdysis (SONENSHINE; ROE, 2014).

Ticks need to find a host to feed on to complete their development and ensure their reproductive success. In this phase, stimuli as odor, vibration, visual appearance (some species have simple eyes located in the scutum margin) and the temperature of the host are essential parameters. The site for fixation on the host is selected by chemoreceptors located on the palps and chelicerae, used to “taste” the host. After the host dermis and epidermis are perforated by the chelicerae, the hypostome is introduced in the lesion and there remains, anchoring the tick with the aid of a protein substance named cement, secreted by the salivary glands. Through the hypostome

(food channel), the tick saliva is passed out into the host, and host blood fluids sucked into the tick (ANDERSON; MAGNARELLI, 2008).

MEDICAL AND VETERINARY IMPORTANCE

Geographically, ticks are globally spread, being found in all regions of the world (GRAY, DANTAS-TORRES, ESTRADA-PEÑA, LEVIN, 2013). This wide distribution can be attributed to the diversity of hosts, including mammals, birds, reptiles, amphibians, other arachnids, other ticks (LABRUNA et al., 2007) and the human beings. The slow feeding process of the ectoparasites is another important factor, once ticks cover long distances transported by the hosts (ANDERSON; MAGNARELLI, 2008).

Ticks have great medical and veterinary importance, not only for the host blood spoliation, but also for being vectors of several pathogens, such as bacteria, viruses, protozoa and helminths, affecting domestic/wild animals and the human beings as well (DANTAS-TORRES, 2010). These pathogens are transmitted through the saliva, which, according to Sonenshine e Roe (2014), consists of a species-specific complex mixture of molecules, varying according to the interaction parasite/host and the physiological state of the tick.

The multifunctional molecules of the saliva modulate the immunoinflammatory and hemostatic systems of the host, ensuring not only the biological success of the ectoparasites, but also their role as pathogen vectors, once its immunomodulatory action facilitates the transmission of microorganisms, minimizing the obstacles to their

penetration into the host organism (FRANCISCHETTI et al., 2009; NUTTALL; LABUDA, 2004).

REFERENCES

- ANDERSON, J. F.; MAGNARELLI, L. A. Biology of ticks. **Infectious disease clinics of North America**, v. 22, n. 2, p. 195–215, v, jun. 2008.
- BARKER, S. C.; MURRELL, A. Systematics and evolution of ticks with a list of valid genus and species names. **Parasitology**, v. 129 Suppl, n. February, p. S15–S36, 2004.
- DANTAS-TORRES, F. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): From taxonomy to control. **Veterinary Parasitology**, 2008.
- DANTAS-TORRES, F. Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. **Parasites & Vectors**, v. 3, p. 26, 2010.
- DANTAS-TORRES, F.; OTRANTO, D. Further thoughts on the taxonomy and vector role of *Rhipicephalus sanguineus* group ticks. **Veterinary Parasitology**, v. 208, n. 1–2, p. 9–13, 2015.
- 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. 379–395, 2004.
- ESTRADA-PEÑA, A.; BOUATTOUT, 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 and Applied Acarology**, v. 38, n. 2–3, p. 219–235, 2006.
- 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, 2009.
- FRANQUE, M. P.; SANTOS, R. A.; SILVA, G. V. O.; TAJIR, J. T.; MASSARD, C. L. Biological characteristics of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) on dog under experimental infestation. **Revista Brasileira De Parasitologia Veterinaria**, v. 16, n.

4, p. 238–242, 2007.

GIGLIOTI, R.; OLIVEIRA, H. N.; SANTANA, C. H.; IBELLI, A. M. G.; NO, T. A.; BILHASSI, T. B.; RABELO, M. D.; MACHADO, R. Z.; BRITO, L. G.; OLIVEIRA, M. C. *S. Babesia bovis* and *Babesia bigemina* infection levels estimated by qPCR in Angus cattle from an endemic area of São Paulo state, Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 7, n. 5, p. 657–662, 2016.

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

GRISI, L.; LEITE, R. C.; MARTINS, J. R. S.; BARROS, A. T. M.; ANDREOTTI, R.; CANÇADO, P. H. D.; LEÓN, A. A. P.; PEREIRA, J. B.; VILLELA, H. S. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, n. 2, p. 150–156, 2014.

GUGLIELMONE, A. A.; APANASKEVICH, D. A.; ESTRADA-PEÑA, A.; ROBBINS, R. G.; PETNEY, T. N.; HORAK, I. G. The hard ticks of the world: (Acari: Ixodida: Ixodidae). **Springer**, Dordrecht. doi, v. 10, n. 1007, p. 978-94, 2014

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W.M. SCHRECKENBERGER, P. C. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. **Lippicott Williams & Wilkins**, p. 136-42, 1997.

LABRUNA, M. B.; MCBRIDE, J. W., CAMARGO, L. M. A.; AGUIAR, D. M.; YABSLEY, M. J.; DAVIDSON, W. R.; STROMDAHL, E. Y.; WILLIAMSON, P. C.; STICH, R. W.; LONG, S. W.; CAMARGO, E. P.; WALKER, D. H. A preliminary investigation of Ehrlichia species in ticks, humans, dogs, and capybaras from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 143, n. 2, p. 189–195, 2007.

MANS, B. J.; DE KLERK, D.; PIENAAR, R.; DE CASTRO, M. H.; LATIF, A. A. The Mitochondrial Genomes of *Nuttalliella namaqua* (Ixodoidea: Nuttalliellidae) and *Argas africanus* (Ixodidae: Argasidae): Estimation of Divergence Dates for the Major Tick Lineages and Reconstruction of Ancestral Blood-Feeding Characters. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, 2012.

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.

MEKONNEN, S.; BRYSON, N. R.; FOURIE, L. J.; PETER, R. J.; SPICKETT, A. M.; TAYLOR, R. J.; STRYDOM, T.; HORAK, I. G. Acaricide resistance profiles of single- and multi-host ticks from communal and commercial farming areas in the Eastern Cape and North-West Provinces of South Africa. **The Onderstepoort journal of veterinary research**, v. 69, n. 2, p. 99–105, 2002.

MORAES-FILHO, J.; MARCILI, A.; NIERI-BASTOS, F. A.; RICHTZENHAIN, L. J.; LABRUNA, M. B. Genetic analysis of ticks belonging to the *Rhipicephalus*

- sanguineus* group in Latin America. **Acta Tropica**, v. 117, n. 1, p. 51–55, 2011.
- NAVA, S.; BEATI, L.; LABRUNA, M. B.; CÁCERES, A. G.; MANGOLD, A. J.; GUGLIELMONE, A. A. Reassessment of the taxonomic status of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) with the description of three new species, *Amblyomma tonelliae* n. sp., *Amblyomma interandinum* n. sp. and *Amblyomma patinoi* n. sp., and reinstatement of *Amblyomma mixtum*, and *Amblyomma sculptum* (Ixodida: Ixodidae). **Ticks Tick Borne Diseases**, v. 5, n. 3, p. 252-276, 2014.
- 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.
- NUTTALL, P. A.; LABUDA, M. Tick-host interactions: saliva-activated transmission. **Parasitology**, v. 129, p. S177–S189, 2004.
- OLIVEIRA, P. R.; BORGES, L. M. F.; LEITE, R. C.; FREITAS, C. M. V. Seasonal dynamics of the Cayenne tick, *Amblyomma cajennense* on horses in Brazil. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 17, n. 4, p. 412–416, 2003.
- OLIVEIRA, P. R. **Dinâmica da vitelogênese de carrapatos *Amblyomma triste* (Koch, 1844) (ACARI : IXODIDAE)**. 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas: Biologia Celular e Molecular) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2006.
- REMEDIÓ, R. N.; NUNES, P. H.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. The extensible integument of *Rhipicephalus sanguineus* female ticks in different feeding stages: a morphological approach. **Acta Zoologica**, v. 96, n. 3, p. 319–327, 2015.
- ROSHDY, M. A.; HOOGSTRAAL, H.; BANAJA, A. A.; EL SHOURA, S. M. Nuttalliella namaqua (Ixodoidea: Nuttalliellidae): Spiracle structure and surface morphology. **Zeitschrift für Parasitenkunde Parasitology Research**, v. 69, n. 6, p. 817–821, 1983.
- SONENSHINE, D.; ROE, R. M. **Biology of ticks**, v. 2. 2014.
- SZABO, M. P. J.; PINTER, A.; LABRUNA, M. B. Ecology, biology and distribution of spotted-fever tick vectors in Brazil. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 3, n. July, p. 27, 2013.
- WALKER, A. R. Arthropods of humans and domestic animals. A guide to preliminary identification. **Springer Science & Business Media**, 1994.
- WALKER, J. B.; KEIRANS, J. E.; HORAK, I. G. The genus *Rhipicephalus* (Acari, Ixodidae): A guide to the brown ticks of the world. **Cambridge University Press**, 2005.

Capítulo 2

State of the art of control of the tick *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato: A review of strategies and future perspectives with focus on morphohistological studies.

Marina Rodrigues de Abreu¹, Maria Izabel Camargo-Mathias^{1*}.

¹General and Applied Biology Department, Bioscience Institute, São Paulo State University “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Rio Claro, SP, Brazil.

Abstract

The tick *Rhipicephalus sanguineus* s.l. has unquestionable economic, veterinary and medical importance, not only for debilitating its host (preferentially dogs), but also for acting as a vector of diseases transmitted to domestic animals and humans. Hence, this ectoparasite is a public health concern, and finding efficient strategies to control it is urgent. This is particularly true given the problems caused by the often-inadequate use of the acaricides available in the market, such as the development of resistant strains, toxicity to the host, and environmental contamination by residues of synthetic chemicals. Therefore, this review compiles the results of articles published in the last ten years identified in the PubMed, Scholar Google and Mendeley platforms involving bioassays with potential acaricides to combat *R. sanguineus* s.l., (*R. linnaei*) with emphasis on descriptions of the morphotoxicological alterations of these ticks.

Keywords: review, control, dog tick, morphology, toxicology.

Situação: Submetido ao periódico internacional: “Ticks and Tick-borne Diseases”.

1. The species *Rhipicephalus linnaei* (*R. sanguineus* sensu lato “tropical lineage”)

Ticks are obligate ectoparasites belonging to the phylum Arthropoda, class Arachnida, subclass Acari, order Parasiformes, suborder Ixodida. Those belonging to the family Ixodidae (hard ticks) (Barker and Murrell, 2008) have the greatest economic, veterinary and medical importance (Anderson and Magnarelli, 2008; Dantas-Torres, 2008; Nava et al., 2015).

The species *Rhipicephalus sanguineus* sensu stricto was first described by Latreille in 1806 (Nava et al., 2018). Because the poor description of details and precision, its identification became difficult throughout of years. Consequently, many species were incorrectly assigned to this taxon (NAVA et al., 2018). During the last decades, taxonomists have diverged on the classification of this species, assuming that others species of tick were described as *R. sanguineus* without presenting morphological concordances and genetic compatibilities. The taxonomic studies have revealed that *R. sanguineus* sensu lato actually is a complex of approximately 17 species that share similar morphology, but with some questions about the biological and genetic compatibility of these ticks (Dantas-Torres et al., 2018; Nava et al., 2018, 2015; Sanches et al., 2016). Results of molecular studies have shown the existence of at least two different lineages within the *R. sanguineus* s.l. group, namely “temperate” and “tropical”, which besides being found in different regions of the globe, also are genetically distinct (Dantas-Torres et al., 2018).

In this context, recently the species *R. sanguineus* l.s. “tropical lineage” was recognized as *Rhipicephalus linnaei* (Audouin, 1826) by Šlapeta et al. (2021), in a study carried out in Australia, Fiji and Laos, which through mitochondrial genomic sequencing confirmed the identity and genetic distinctions between the other species of the complex with the species known as *R. sanguineus* l.s. “tropical lineage” In addition, the authors redescribed the species, and listed the morphological and molecular characteristics that should be used for its identification (Šlapeta et al, 2022).

2. The biology of the “brown dog tick”

The species *R. sanguineus* s.l. is popularly known as the “brown dog tick”, because of its color and preferred host, although this does not mean it cannot parasitize other mammals, including humans (Dantas-Torres and Otranto, 2015). The life cycle of the species involves four stages: egg, larva, nymph and adult (Dantas-Torres, 2010). It is also considered a trioxene species, since it requires three hosts for feeding (not necessarily the same individual or even the

same species) to reach the adult phase, also considering that the change from one stage to the other (ecdysis) occurs off the host (Dantas-Torres, 2010).

The reproductive behavior of these ticks has aspects that distinguish males and females. After copulation, the females remain fixed to the host and feed until complete engorgement (Sonenshine and Roe, 2014). During copulation, the male transfers to the female the “engorgement factor” or “male factor”, which stimulates not only engorgement, but also oogenesis and vitellogenesis, producing viable eggs for survival of the species (Sonenshine and Roe, 2014). The eggs are laid off the host and hatch in approximately 20 days, depending on environmental conditions (Dantas-Torres, 2010). The larvae then search for a host on which to feed (Gray et al., 2013).

3. The veterinary importance of *R. sanguineus* s.l. “tropical lineage” (*R. linnaei*)

The host-parasite relationship is a two-way process, whereby the tick’s saliva (a mixture of bioactive substances secreted by the salivary glands) is transferred to the host, after which the tick feeds on its blood (with all its immunological components) (Guglielmone et al., 2014).

The tick saliva is a rich source of bioactive compounds. Recent studies of *R. sanguineus* s.l. (*R. linnaei*) have reported the presence of more than 2,000 proteins in this complex mixture (Tirloni et al., 2020), containing multifunctional molecules that not only keep the host’s blood from coagulating, also modulate the immune-inflammatory and hemostatic systems of the host (Abreu et al., 2019), ensuring the biological success of the tick, but also acting as a vector for transfer of pathogens to the host (Kazimírová and Štibrániová, 2013). The immunomodulatory action of the saliva facilitates the transmission of microorganisms, which do not face major obstacles to the penetration and establishment in the host (Camargo-Mathias et al., 2011; Kotál et al., 2015).

Among the pathogens transmitted by ticks are bacteria of the genera *Anaplasma*, responsible for diseases like anaplasmosis; *Borrelia* spp, known to cause Lyme (or Borreliose) disease; *Ehrlichia* spp., causing canine ehrlichiosis; and *Rickettsia*, such as the species *Rickettsia conorii* (responsible for Mediterranean spotted fever) and *R. rickettsii* (causing Rocky Mountain spotted fever). Besides these, some protozoa can be transmitted, such as those of the genus *Babesia*, which cause babesiosis; and the genus *Hepatozoon*, which cause canine hepatozoonosis (Dantas-Torres; Otranto, 2015; Houseman, 2013; Ipek et al., 2020; Melchior, et al. 2020; Soares et al., 2012; Szabo et al., 2013). Furthermore, *R. sanguineus* s.l. (*R. linnaei*)

is considered not only to be a vector, but also a reservoir of pathogens, offering conditions for pathogens to remain active for many generations, based on sharing through transovarial transmission (from the engorged female to her offspring) or by transstadial transmission (from one life stage to another) (Aktas and Ozubek, 2018; Ipek et al., 2020).

4. Control of *Rhipicephalus sanguineus* s.l. (*R. linnaei*)

The search for efficient strategies to control ticks in general is constant (Camargo-Mathias 2013, 2018). The investigation of these strategies aims to understand how the tick's systems respond to exposure to different chemical agents (synthetic or natural). In this respect, many studies have been conducted that have identified morphological, histological, physiological, toxicological and ultrastructural alterations of the ectoparasite (Abreu et al., 2020a, 2020b; Araujo et al., 2012, 2014; Arnosti et al., 2011a, 2011b; Calligaris et al., 2013; Camargo-Mathias et al., 2016, 2017; Denardi et al., 2010a,b, 2012; Konig et al., 2019; Lima de Souza et al., 2017, 2020; Matos et al., 2020, 2019, 2018, 2014a, 2014b; Nodari et al., 2011, 2012b, 2012a, 2017; Oliveira et al., 2010, 2012a, 2013, 2014, 2015, 2016a, 2016b, 2018, 2019; Oliveira et al. 2020; Pereira et al. 2010; Pereira et al., 2017; Politi et al., 2012, 2015; Remedio et al., 2013, 2014, 2016; Roma et al., 2010, 2012, 2013a, 2013b, 2013c, 2014, 2015; Sabadin et al., 2017; Sampieri et al., 2012, 2013, Vendramini et al., 2012a, 2012b).

To obtain results at the morphohistological, physiological and toxicological levels revealing the alterations that occur in the tick's systems in response to chemicals, specific microscopic techniques and toxicological protocols are employed (Camargo-Mathias, 2013, 2018). These techniques/protocols are valuable tools to understand the alterations, both in the tissues and cells of the tick's systems and organs, revealing the organizational changes at the ultrastructural level (Camargo-Mathias, 2013, 2018; Denardi et al., 2012; Nodari et al., 2017; Oliveira et al., 2014, 2016, 2017a, 2019; Pereira et al., 2011; Remedio et al., 2015, 2016; Roma et al., 2014, 2015; Sampieri et al., 2012).

5. The use of synthetic acaricides

At present, the most frequent strategies applied to combat *R. sanguineus* s.l. (*R. linnaei*) ticks involve use of commercial formulations of chemical acaricides based on synthetic molecules (Eiden et al., 2020) (Table 1).

5.1. Fipronil

Among the chemical bases commonly sold is fipronil, which mainly acts on the central nervous system of invertebrates, provoking deregulation and hyperexcitation, together leading to death (Oliveira et al., 2008, 2009). The effects of fipronil on *R. sanguineus* (*R. linnaei*) were reported by Oliveira et al. (2008), who exposed semi-engorged females to different concentrations of the compound and observed morphological alterations in the female reproductive system, mainly in germinative cells (oocytes), such as the presence of cytoplasmic vacuoles and disorganized microtubules, along with alterations in other organelles, indicating the high sensitivity of the female reproductive system to this compound, so that the use of this acaricide reduces the reproductive potential (Oliveira et al., 2008, 2009, 2011). Besides the toxic effects on the reproductive system (in particular the oocytes), morphological studies have revealed that fipronil also causes morphophysiological changes to the salivary glands of females when in fasting or semi-engorged condition, causing precocious degeneration of these organs, interfering in the production of saliva by altering the processes of synthesizing and secreting it, culminating in the death of salivary gland acinar cells (Pereira et al., 2011). All these changes prevent the female tick from concluding the feeding process, thus reducing the reproductive success (Pereira et al., 2011).

5.2. Permethrin

The pyrethroids are also in the front line to fight ticks, among them permethrin, a synthetic pyrethroid that acts fast, causing paralysis and death of ectoparasites due to hyperexcitation of the central nervous system (Nodari et al., 2011). According to Roma et al. (2013a, c, 2014), this compound acts directly on the synganglion (central nervous system of ticks), causing its degeneration by inducing apoptosis and autophagic death of neurons. Permethrin also has potential to interfere in the female reproductive system, shown by the presence of oocytes (female germinative cells) with characteristics of death, including alteration of cell shape, cytoplasmic vacuolation and nuclear alterations (acting directly on the integrity of DNA) (Roma et al., 2011, 2010). Other studies (Nodari et al., 2011; 2012; 2017) have found that permethrin also has cytotoxic effect on the salivary glands of *R. sanguineus* s.l. (*R. linnaei*) causing morphological alterations such as changed shape of acini, and intense cytoplasmic vacuolation of acinar cells, both granular (secretory) and agranular (osmoregulatory) ones, leading to tissue degeneration via cell death, including the formation of apoptotic bodies. Further regarding this pyrethroid, Roma et al. (2009) conducted laboratory tests with different

concentrations and found that doses much lower than recommended by the manufacturer were sufficient to prevent reproduction of this tick species (Roma et al., 2009).

5.3. Deltamethrin

Deltamethrin is another pyrethroid used to control *R. sanguineus* s.l., (*R. linnaei*) by acting on the synganglion, causing severe damages to this organ's surrounding peripheral membranes (neurilemma and perineurium), besides causing disorganization (and degeneration) of the cells in the neural and cortical regions, due to the extensive cytoplasmic vacuolation, causing death by apoptosis of the cells forming this tissue (Pereira et al., 2017). There are also reports of serious morphophysiological damages to the female reproductive system, by interfering in vitellogenesis and preventing the oocytes from synthesizing and incorporating the elements of the yolk (proteins, carbohydrates and lipids) (Camargo-Mathias et al. 2017).

5.4. Fluazuron

Fluazuron is a synthetic chemical that acts as an analog of the juvenile hormone, thus interfering in or preventing ecdysis (Oliveira et al., 2012a). Previous studies by Oliveira et al. (2012a, 2013, 2014) described the effects of this acaricide on the morphostructural organization of the integument and the histological and structural organization of the gut of *R. sanguineus* (*R. linnaei*) nymphs. The authors' results clearly showed that this chemical can reduce or even prevent the secretion of certain constituents that compose the cuticle layers (Oliveira et al., 2012a, 2013). This interference acts mainly on the synthesis of chitin, an important protein that composes the cuticle, preventing the tick from molting and thus passing from the nymph to the adult stage (Oliveira et al., 2012a, 2013). Calligaris et al. (2013) performed experiments that corroborated those results, when analyzing the ultramorphology of the integument of *R. sanguineus* (*R. linnaei*) nymphs exposed to this chemical, demonstrating impairment of the chitinous structures, in turn interfering in the organization of the hypostome, chelicerae and shield, diminishing the level of cuticular sclerotization, as well as altering the distribution of cuticular pores, inhibiting the formation of tegumentary grooves and disorganizing the anal plate. According to the authors, these alterations totally or partially impair the development of the nymphs and interfere in the success of the few that manage to molt into adults (Calligaris et al., 2013). Besides the integument, the damages caused by this chemical agent also include disorganization of the midgut, which inhibits or prevents absorption of nutrients from the blood

ingested from the host by the digestive cells, hampering the development of nymphs (Oliveira et al., 2012a, 2013, 2014).

5.5. Dinotefuran

The list of chemical bases with acaricidal potential also includes dinotefuran, a neonicotinoid used to control various pests, including ticks. Besides being efficient, it also has low toxicity to mammals (Oliveira et al., 2016, 2017). According to those studies, this compound acts directly on the reproductive system of *R. sanguineus* s.l. (*R. linnaei*) females, provoking morphological alterations in the oocytes, such as cytoplasmic vacuolation, alteration of mitochondria, and interference in the processes of synthesis and incorporation of elements of the yolk, thus preventing the oocytes from reaching the more advanced maturity stages (IV and V). Besides interference in the reproductive system, the authors also described morphological and ultrastructural damages of cells of the midgut of females. These damages were described as being very aggressive, mainly in the generative or trunk cells, responsible for the origin of the other cell types found in the intestinal epithelium of ticks (Oliveira et al., 2016, 2017). The damages to these cells result in failure to replace digestive cells, with a direct effect on the intestinal absorption processes and viability of new individuals (Oliveira et al., 2016, 2017).

5.6. Isoxazolines

Isoxazolines comprise a family of molecules with great insecticidal and acaricidal potential which have been widely studied and used in the veterinary market (Shoop et al., 2014). In general, the mechanism of action of these molecules consists of the inhibition of the neurotransmitter GABA (gamma-aminobutyric acid) and glutamate receptors, resulting in excessive neuronal stimulation and, consequently, arthropod death (Long et al., 2018). The chemical compounds belonging to this family, well known and used in commercial acaricides, which are effective against ticks of the species *R. sanguineus* sl (*R. linnaei*) are: afoxolaner, sarolaner, fluralaner, and lotinaler (Six et al., 2016).

5.6.1. Afoxolaner

Afoxolaner is an insecticide and acaricide compound of the isoxazoline family used in veterinary practice to control fleas and ticks in dogs (NexGard®, Boehringer Ingelheim) (Tinkruejeen, 2019). Kunkle et al. (2014) tested its efficacy, specifically against *R. sanguineus*

s.l. (*R. linnaei*) ticks, in 16 dogs infested with 50 adult ticks each, which were weekly reinfested. Results showed that oral treatment at the minimum dose of afoxolaner was 98.8-100% effective at 48 hours, while efficacy against reinfestations was 95.7% at five weeks (Kunkle et al., 2014). Another study carried out on this compound and the same tick species demonstrated efficacy of approximately 96% in the control of adult ticks in naturally infested dogs (with more than 500 ticks). After the 28th day, the efficacy increased to 99%, remaining at this rate until day 84 (Tinkruejeen, 2019).

5.6.2. Fluralaner

Fluralaner is an antiparasitic compound of the isoxazoline family. Commercially, it is known as Bravecto® (MSD Salud Animal) and can be administered to dogs and cats either orally or topically (Rohdich et al., 2014). Studies have demonstrated its effectiveness against the tick *R. sanguineus* s.l, showing an efficacy rate against fasting nymphs of 91% within 72 hours, 76.8% within 28 days, and 86.3% within 56 days. Regarding engorged nymphs of the same species, the efficacy rate reached 100% after 72 hours (Allen, 2020).

According to the results obtained by Williams et al. (2015), who tested in vitro lethal concentrations (LC) of fluralaner, death rates of 50% and 90% were found in the population of ticks tested. After *R. sanguineus* ticks at different stages of life were exposed to the compound, the following lethal concentrations were obtained: larvae – LC₅₀ 0.7 µg/mL and LC₉₀ 2.4 µg/mL; nymphs – LC₅₀ 1.4 µg/mL and LC₉₀ 2.6 µg/mL; and adults – LC₅₀ 278 µg/mL and LC₉₀ 1973 µg/mL (Williams et al., 2015).

5.6.3. Sarolaner

Sarolaner is a chemical compound commercially known as Simparic (Zoetis) and used orally in the treatment of dogs against infestations by fleas, ticks, mange, and other mites (Six et al., 2016a). The authors also conducted efficacy tests of this compound on five tick species and reported a 99.6% effectiveness in controlling all tested species, including *R. sanguineus* sl, within 48 hours after administration of oral treatment, as well as a 96.9% rate against weekly reinfestations for a period of 35 days.

According to McTier et al. (2016), plasma concentrations of 1.25 to 5 mg/kg of sarolaner after oral administration in dogs indicated a high efficacy of 99% against fleas (*C. felis*) and various tick species (*Rhipicephalus sanguineus*, *Ixodes ricinus*, and *Dermacentor reticulatus*) for approximately 35 days. Moreover, Geurden et al. (2016) stated that a single oral

administration of sarolaner had an effectiveness of 99.7% against *R. sanguineus* infestations in 48 hours and of 97.5% against weekly reinfestations for 35 days. These studies demonstrated the efficacy of a single monthly dose of sarolaner for the treatment of dogs infested with the tick *R. sanguineus* sl, as indicated by the manufacturer.

5.6.4. Lotilaner

Lotilaner is an isoxazoline and the active ingredient in the commercial product Credeli™ (Elanco) which guarantees fast absorption and long-lasting protection against fleas and ticks in dogs after oral administration. In order to verify the effectiveness of this compound against tick infestations in dogs, Murphy et al. (2017) studied four species (*D. variabilis*, *R. sanguineus*, *A. Americanum*, and *I. scapularis*) and obtained a 100% control rate for all species within 48 hours and 98% after reinfestation during four months. Another study that corroborated these results was that by Cavalleri et al. (2017). The authors tested the compound in beagle dogs and found an efficacy rate greater than 98% against *R. sanguineus* sl ticks after oral treatment and subsequent reinfestations for 35 days. Moreover, they reported that lotilaner had >98% efficacy against *R. sanguineus* tick infestations within 56 days of oral treatment, as well as a 100% efficacy recorded on days 70 and 84 after treatment. Thus, according to the authors, lotilaner is a highly effective isoxazoline compound that offers long-lasting protection against ticks of this species (Cavalleri et al., 2017).

5.6.5. Comparative studies of isoxazolines

A comparative study carried out by Burgio et al. (2016) on three isoxazolines, fluralaner, sarolaner, and afoxolaner, demonstrated that the active ingredients fluralaner and sarolaner initiated the reduction of infestation by *R. sanguineus* s.l. in dogs after 4 hours of oral treatment (60.2% and 48.2% of effectiveness, respectively). Furthermore, both compounds reached 100% of effectiveness within 12 hours of treatment. Afoxolaner, on the other hand, started working within 8 hours (90.8% efficacy) and reached 100% efficacy within 48 hours of ingestion. The same study demonstrated that isoxazolines performed much better than topical acaricides (imidacloprid and permethrin). Therefore, they would be the ideal treatment options against infestations by ticks of the species *R. sanguineus* s.l. due to their acaricidal activity and the high death rate of these arthropods (Burgio et al., 2016).

This study also corroborated the findings of Six et al. (2016b), who demonstrated that the sarolaner compound provided faster control (>99% efficacy within 24 hours) than

afoxolaner (<90% efficacy) and greater protection for days (35 days after treatment). According to these authors, an oral dose of sarolaner provided highly effective control against ticks of the species *R. sanguineus* s.l. and reduced the risk of spread of pathogens transmitted by these ectoparasites (Six et al., 2016).

Furthermore, Becskei et al. (2016) compared the efficacy of sarolaner and fluralaner against *R. sanguineus* infestations in dogs 95 days after initial treatment. The authors concluded that both products significantly reduced the number of ticks within 8 hours of treatment and eliminated them all in 24 hours. After reinfestation, sarolaner provided a reduction of $\geq 98.5\%$ in the number of arthropods from 24 hours to the 74th day compared with fluralaner, which provided a decrease of $\geq 95.5\%$ until day 44 (Becskei et al., 2016).

Thus, the studies mentioned here indicate that isoxazoline compounds are highly effective against tick infestations by *R. sanguineus* s.l. in dogs (Burgio et al., 2014). In addition to ensuring a high efficacy rate, they offer fast and long-lasting protection after treatment with a single oral dose and the benefit of not harming the hosts (Six et al., 2016a; b). However, there are no studies in the literature on the effects of these compounds on the morphophysiology of ticks of the species *R. sanguineus* s.l. in their different stages of life or on the mechanisms involved in this control. Such data would contribute much to a better understanding and even optimization of the use of these compounds widely found in the veterinary market for the control of this species.

Table 1- Synthetics Acaricide

Synthetic Acaricide	Chemical Base	Affected Organs	Morphophysiological effects	References
Fipronil	Phenylpyrazole	Female Reproductive System	– cytoplasmic vacuoles; – mitochondrial damage; – damage to the plasma membrane;	Oliveira et al. (2008, 2009, 2011)
		Salivary Glands	– alteration of protein synthesis. – accelerated glandular degeneration; – changes in the acinar morphophysiology; – presence of autophagic vacuoles; – disorganized microtubules.	
Permethrin	Pyrethroid	Female Reproductive System	– alteration of cell shape; – cytoplasmic vacuolation; – reduction of the number of yolk granules; – apoptosis.	Roma et al. (2010, 2011)
		Synganglion	– apoptosis and autophagic cell death; – marginalization of chromatin and nuclear fragmentation; – alterations in the nerve cells; – damage in the cell membrane; – cytoplasmic disorganization; – reduction of acid phosphatase; – mitochondrial degeneration.	
		Salivary Glands	– alteration of acini shape; – cytoplasmic vacuolation in the acinar cells; – degeneration via cell death; – tissue disorganization; – marginalization of chromatin and nuclear	Nodari et al. (2011, 2012, 2017)

Table 1- Synthetics Acaricide

Deltamethrin	Pyrethroid	Synganglion	– peripheral membranes damages (neurilemma and perineurium); – disorganization and degeneration of the cells in the neural and cortical regions; – cytoplasmic vacuolation; – pycnotic and hypertrophic nuclei; – apoptosis.	Pereira et al. (2017)
		Female Reproductive System	– alteration in the vitellogenesis; – changes in the chorion; – oocytes disorganization and cytoplasmic vacuolation; – nuclear alterations in oocytes.	Camargo-Mathias et al. (2017)
Fluazuron	Benzoylphenylurea	Integumento	– cuticle disorganization; – alteration in the epithelial cells; – interference in the synthesis and deposition of chitin; – changes in the cuticle subdivisions.	Oliveira et al. (2013, 2014) Calligaris et al. (2013)
		Midgut	– modification in the digestive cells size; – digestive residue accumulated; – cytoplasmic vacuolation in the digestive cells.	Oliveira et al. (2013,2014)
Dinotefuran	Neonicotinoid	Female Reproductive System	– modification in the oocytes size and yolk granules; – germinatives cells vacuolation;	Oliveira et al. (2016, 2017)
		Midgut	– generative cells damages; – modification in the digestive cells size; – digestive residue accumulated; – cytoplasmic vacuolation in the digestive cells; – alteration in the proteins and carbohydrates.	Oliveira et al. (2016, 2017)

6. Natural Acaricides

Despite the proven efficacy of acaricides based on synthetic chemicals that are widely sold in the veterinary market, risks have often been reported regarding the indiscriminate use of these substances to control *R. sanguineus* s.l. (Becker et al., 2019a), causing serious economic losses and sanitary damages (Eiden et al., 2020), especially the selection of lineages that are resistant to these chemicals. This has already been reported for pyrethroids, amidines, phenylpyrazole and macrocyclic lactones (Becker et al., 2019b; Eiden, et al., 2020; Eiden et al., 2017). This causes the frequent need to formulate new products, or increase the dosages of those already routinely used, heightening the risk of toxicity to non-target animals (Eiden et al., 2020, 2017). An additional drawback is the environmental contamination by the accumulation of residues from these chemical compounds (Eiden et al., 2017). These disadvantages have been causing strong concern and pointing to the need to develop new control strategies that are more effective while also being environmentally friendly (Camargo-Mathias, 2013, 2018; Eiden, et al., 2020; Melchior et al., 2020).

The search for acaricides based on bioactive substances extracted from plants or other natural sources has been rewarded with many positive results (Coelho et al., 2020; Denardi et al., 2010, 2012; Konig et al., 2020; Lima de Souza et al., 2017, 2019; Matos et al., 2014b, 2018, 2019, 2020; Oliveira et al., 2016a; Oliveira et al., 2018, 2020; Remedio et al., 2014, 2016; Roma et al., 2013b, 2015; Vendramini et al., 2012b, 2012a) (Table 2).

6.1. *Azadirachta indica* (neem)

Among the plants containing bioactive substances is *Azadirachta indica*, popularly called neem, which has been gaining attention among researchers (Denardi et al., 2012; Lima de Souza et al., 2017; Remedio et al., 2015). Neem is a plant belonging to the family Meliaceae, native to South and Southeast Asia, where it is commonly used to make teas and other extracts due to its antiseptic, antiviral, antifungal, anti-inflammatory, hypotensive and contraceptive properties (Remedio et al. 2015). More recent studies have demonstrated these bioactive substances can also be used for control of various species of arthropods considered to be pests (Alzohairy, 2016).

According to Denardi et al. (2010), the acaricidal potential of neem is related to the production of important morphological alterations in the ovaries of *R. sanguineus* (*R. linnaei*) when exposed to aqueous extracts at concentrations of 10% and 20%. These alterations include structural and histological changes of the cells of the pedicel (cell structure that connects the

oocyte to the epithelial wall of the ovary), resulting in the inhibited production of the vitellogenic elements (yolk granules composed of lipids, proteins and carbohydrates) that fill the cytoplasm of the oocyte to serve as nutrient for the future embryo (Denardi et al. 2010). Besides this, those authors reported the development of extensive cytoplasmic vacuolation in these germinative cells, besides nuclear alterations (in the DNA), including to the shape of the nucleus, at the extreme causing fragmentation (indicating cell death processes) (Denardi et al., 2010). Another aspect is that these oocytes do not reach maturity, i.e., they do not pass through all the subsequent stages, preventing the generation of new individuals. The authors also observed dehydration of the chorion, the membrane of the oocytes/eggs protecting them against mechanical shocks, dehydration and temperature variations. This dehydration caused them to develop wrinkles along with alterations of their cytoplasmic content, i.e., the yolk contained granules that were abnormal in size, arrangement and constitution (Denardi et al., 2010). Denardi et al. (2012) also carried out investigations at the ultrastructural level that produced information confirming the data obtained by light microscopy, such as alteration of the shape of the pedicel cells, cytoplasmic vacuolation, disorganized organelles, mainly in the mitochondria, and irregular cell membranes (chorion), confirming the occurrence of cell death in this tissue.

The acaricidal potential of the aqueous extract of neem leaves was also studied by Remedio et al. (2014) by exposing other tick organs (integument and synganglion) to the substance. They found that even the integument, a highly rigid structure due to its chitinous composition, was affected by the neem extract, which caused structural damages including intense disorganization of the epithelium, disruption of cell boundaries and cytoplasmic vacuolation of epithelial cells. Besides these effects, they also observed that sub-cuticular layers underwent alterations, such as reduced thickness, probably due to impaired production of the cuticular components secreted by the epithelial cells (Remedio et al., 2014).

Other research groups (Remedio et al. 2015; 2016; Lima de Souza et al. 2017) conducted bioassays with neem oil to ascertain its acaricidal potential, specifically at concentrations of 20%, 40% and 60%. The results revealed the occurrence of significant morphological and histochemical alterations in the integument, such as reduction of the cuticle thickness, modification of the epithelial cells, involving cytoplasmic vacuolation and nuclear alterations, such as pyknosis and nuclear fragmentation, indicating the start of cell death processes caused by exposure to the oil (Lima de Souza et al., 2017). Disorganized oocytes and cytoplasmic vacuolation were found in the ovaries, along with the presence of irregular nuclei and dilation

of the mitochondrial crests, culminating in alterations of the mitochondrial matrix (Remedio et al., 2015). In turn, in the salivary glands neem oil damaged the acinar cells (I, II and III), changing their rounded morphology, and intensified the vacuolation and disorganization of the cytoplasm, besides impairing the morphology and functioning of organelles, such as roughness of the endoplasmic reticulum with dilated lumen (Remedio et al., 2016). The authors also found that the alterations intensified with higher neem oil concentrations, indicating a dose-dependent effect (Lima de Souza et al., 2017; Remedio et al., 2016).

6.2. *Carapa guianensis* (Andiroba Oil)

Andiroba oil is extracted from *Carapa guianensis*, a species belonging to the Meliaceae family and it has been found to contain bioactive substances that have acaricidal potential as well as other activities (Vendramini et al., 2012a). Andiroba is a large tree that is native to the Amazon region but that can now be found in northern South America, Central America and the Caribbean, along with some areas of Sub-Saharan Africa. In Brazil it grows throughout the Amazon basin, mainly in low-lying regions along rivers subject to flooding (Roma et al., 2015). Among its medicinal properties are anti-fever, antirheumatic, anti-inflammatory and antibacterial, besides acting as an insect repellent (Roma et al., 2015).

With respect to its acaricidal potential, Vendramini et al. (2012) evaluated the effects of the oil at concentrations of 5, 10 and 20% on the reproductive system of semi-engorged *R. sanguineus* (*R. linnaei*) females and observed alterations considered irreversible in the oocytes, ranging from alteration of shape in all maturation stages (I to V) and vacuolation of the cytoplasm, denoted by the presence of vacuoles containing organelles destroyed by the oil, besides partial damage of the cytoplasm, probably a defense reaction of the cells in an attempt to preserve their integrity/viability. Besides this, they reported reduced quantity and damages to the composition of the yolk grains, along with damage to the DNA, as indicated by irregular, pyknotic and even vacuolated nuclei, alterations that according to the authors impair the development of the oocytes, impairing the quantity and quality of the eggs (Vendramini et al., 2012b).

Besides the reproductive system, the nervous system has also been studied through morphophysiological analysis of the synganglion in semi-engorged females exposed to the same concentrations (5, 10 and 20%) of andiroba oil (Roma et al., 2013b). These concentrations were neurotoxic to the ticks and interfered in the production of enzymes such as acid phosphatase, which are associated with degenerative processes and autophagic cell death

(Roma et al., 2013b). Other alterations included the emergence of spaces between the perineurium and the cortical region of the synganglion, along with the presence of cortex cells with extensive vacuolization, cell edema, nerve cells with pyknotic nuclei or chromatin in the initial stage of marginalization (Roma et al., 2013b). Regarding the ultrastructures, the authors reported that exposure to the andiroba oil altered the thickness of the neural lamella of the synganglion, a membrane that acts mainly as a barrier with selective permeability to nutrients and ions from the hemolymph. This effect is very important because this membrane serves as the first barrier protecting the nervous system, so the alteration of its selective capacity can allow the entry of toxic substances in this tissue (Roma et al., 2015). Besides the membranes and the nerve cells themselves with irregular membranes, the glial cells (responsible for regulating the neural metabolism) also suffered changes, such as extensive cytoplasmic vacuolation and retraction of cytoplasmic expansions, causing them to contact the nerve cells of the cortex (Roma et al., 2015). These glial cells probably act as a defense mechanism by reducing the contact area and keeping the bioactive compound from causing greater damages to the nerve tissue as a whole (Roma et al., 2015).

6.3. Thymol

Thymol, also known as 2-isopropyl-5-methylphenol, is a volatile monoterpene present in the essential oils of plants of the families Apiacea, Lamiacea and Verbenaceae, such a thyme and oregano, which are also used to spice foods (Matos et al., 2013).

Its acaricidal properties have been studied by exposing *R. sanguineus* (*R. linnaei*) females to different concentrations, as in the study of Matos et al. (2014). They found that the oocytes of these females presented cytoplasmic vacuoles and invaginations in the chorion, indicating that thymol interferes in the maturation of oocytes and thus the ticks' reproductive success. These findings were later corroborated by Matos et al. (2020) through bioassays that showed reduced viability of eggs of engorged females exposed to thymol, and also that it acts directly on Gené's organ, an apparatus exclusive to female ticks that secretes a wax coat on the eggs, increasing their viability after laying due to its waterproofing, cohesive and antimicrobial properties. According to the authors, thymol also caused damage to the cells of the accessory and tubular glands of this organ, interfering with the quality and quantity of the wax secretion (Matos et al., 2020). In another study, Matos et al. (2019) described alterations caused by thymol of the salivary glands of *R. sanguineus* s.l., (*R. linnaei*) mainly in the acini. In type I acini, which have osmoregulatory function, thymol caused dilation of the lumen, probably a

strategy of the organ to more efficiently release the toxic product present in the hemolymph, while in the type II and III acini, said to be granular, with the function of synthesizing and secreting various bioactive compounds from the saliva, thymol caused extensive cytoplasmic vacuolization and nuclear fragmentation in the acinar cells, indicating its acaricidal potential (Matos et al., 2019).

6.4. Carvacrol

Carvacrol is a volatile phenolic monoterpene found in the essential oils extracted from plants of the families Lamiaceae and Verbenaceae, such as oregano and thyme, plants that are often used as food seasonings (Lima de Souza et al., 2019). This bioactive substance, besides functions in cuisine, also has confirmed acaricidal action, as demonstrated by a recent study of Lima De Souza et al. (2019), who showed its potential against *R. sanguineus* s.l. (*R. linnaei*) by means of exposing ticks to concentrations of 20, 50 and 100 µL/mL of the substance. The results showed that the ovaries of semi-engorged females suffered morphological alterations that ranged from modification of the shape of the oocytes and germinative vesicles (their nuclei), to intense vacuolation in the cytoplasm. These alterations rendered the generation of new individuals impossible (Lima de Souza et al., 2019). The same authors also observed that carvacrol at concentration of 100 µL/mL prevented oocytes attached to the ovary wall from surpassing stage II of development, a finding that was confirmed by the total absence in these females of oocytes in stages greater than II (Lima de Souza et al., 2019).

6.4.1 Acetylcarvacrol

Acetylcarvacrol is the result of acetylation of carvacrol, a recognized alternative to control infestations of ticks. It is a bioactive substance with a pharmacological profile that is both efficient and less toxic to non-target organisms compared to carvacrol (Damasceno et al., 2014). Oliveira et al. (2020) recently reported the acaricidal activity of acetylcarvacrol by exposing engorged *R. sanguineus* s.l. (*R. linnaei*) females to it. The results of these bioassays indicated a mortality rate of 90.9% when exposed to the concentration of 8.0 µL/mL, besides no detection of morphological alterations of the integument (Oliveira et al., 2020). With respect to the biological parameters, the tests with sublethal concentrations resulted in reduction of the hatching rate, reproduction rate and egg production index (Oliveira et al., 2020). The morphological study revealed alterations of the cuticle, with particular harm to the cells of the epithelium of the integument, whose shape changed from cubic to irregular, together with

extensive cytoplasmic vacuolization (Oliveira et al., 2020). More recently, König et al. (2020) investigated the same compound and reported morphological alterations in the ovaries of ticks of the same species, observing reduction of the size of the oocytes, with some of them being irregularly shaped, besides extensive vacuolation both of the cytoplasm and nucleoli, and the presence of irregular folds in the chorion. Furthermore, the histochemistry study conducted by the same authors found significant alteration of the oocytes regarding synthesis of proteins and carbohydrates after exposure to acetylcarvacrol, causing irreversible damages to the reproductive process of these ticks (König et al., 2020).

6.5. *Ricinus communis* (castor oil)

The esters of ricinoleic acid derived from castor oil (*Ricinus communis*) are other compounds synthesized in the laboratory that have demonstrated promising results regarding control of *R. sanguineus* (*R. linnaei*) ticks. Studies conducted by Arnosti et al. (2011 a,b), Sampieri et al. (2012, 2013a,b) and Camargo-Mathias et al. (2016) exposed *R. sanguineus* (*R. linnaei*) females indirectly to these compounds, i.e., the esters were supplied through enrichment in the feed of the hosts prior to infestation with the fleas.

The results revealed the occurrence of significant morphological and ultrastructural alterations in the ticks' salivary glands. The most interesting aspect was the absence of any harm to the hosts (Camargo-Mathias et al., 2016). The alterations in the systems of the ticks due to the presence of these esters were extensive, culminating in early degeneration of the salivary glands, since the cells entered into a death process before engorgement was concluded (Arnosti et al., 2011a; Camargo-Mathias et al., 2016). Cell alterations were also observed in the oocytes, including inhibited or even interrupted vitellogenesis, a finding confirmed by the alterations in the granulation of the yolk (Arnosti et al., 2011b; Sampieri et al., 2013, 2012). Based on these findings, the authors inferred that the esters of ricinoleic acid from castor oil have potential to interfere in the ticks' reproduction, both directly (inhibiting the engorgement due to the early degeneration of the salivary glands) and indirectly (inefficient engorgement preventing the digestive tube from sending nutrients for successful vitellogenesis), making these bioactive substances strong candidates for integrated management in association with other methods for natural control of these ectoparasites (Arnosti et al., 2011b, 2011a; Camargo-Mathias et al., 2016; Sampieri et al., 2013, 2012).

6.6. *Acmella oleracea* (Jambu - *Spilanthol*)

Acmella oleracea, popularly known as jambu, is a common plant found in the North region of Brazil that has long been used in the local cuisine (Favoreto and Gilbert, 2010), besides having recognized anesthetic and analgesic action along with anti-inflammatory, fungicidal and insecticidal properties (Dubey et al., 2013; Favoreto; Gilbert, 2010).

With respect for the insecticidal potential of jambu, Oliveira et al. (2018) found that the bioactive substances present in this plant have acaricidal action, demonstrated by toxicological tests involving exposure of semi-engorged *R. sanguineus* (*R. linnaei*) females to an extract of *A. oleracea*. The mortality rate of these females was 100% when exposed to a concentration of 100 mg/mL (Oliveira et al., 2018). Besides this, in a later morphohistological study the authors found that the oocytes of these females suffered alterations along with the generative cells of the midgut, i.e., the cells of the trunk responsible for the origin of other types of cells, including digestive and absorption cells of the intestine (Oliveira et al., 2019). Based on these findings, the authors inferred that the oviposition of these females was severely impaired since the oocytes were unable to fully develop for fecundation. They also observed damages to the intestinal epithelium that inhibited absorption of the blood elements necessary for the development and reproduction of the ticks (Oliveira et al., 2019, 2018).

6.7. *Tagetes patula* L.

Tagetes patula L. is a species belonging to the Asteraceae family, popularly known as French marigold. It is native to North America but now is widely disseminated around the world (Politi et al., 2012). Besides its decorative uses, it has economic importance for producing secondary metabolites, mainly flavonoids, thiophenes and terpenes that have proven insecticidal and acaricidal action (Politi et al., 2012).

Politi et al. (2012) analyzed the acaricidal potential of these bioactive substances by exposing larvae and engorged females of *R. sanguineus* (*R. linnaei*) to the ethanolic extract of the aerial parts of *T. patula* at a concentration of 50 mg/mL. This exposure reduced the oviposition by 21.5% and caused 99.78% larval mortality (Politi et al., 2012). Additionally, morphological findings in a later study showed that the ovaries of engorged females exposed to the same extract at the same concentration suffered structural damages including intense cytoplasmic vacuolation (oocytes III-V), irregular formation of yolk granules and deformity in the chorion (oocytes IV and V), and rupture and externalization of yolk granules (oocytes V). These damages directly interfered in oogenesis, hindering or preventing the formation of larvae and interrupting the life cycle of the ticks (Politi et al., 2015).

Table 2 – Natural Acaricides

Natural Acaricide	Plant Based	Affected Organs	Morphophysiological effects	References
Aqueous/oil extract of neem	<i>Azadirachta indica</i>	Female Reproductive System	– modification in the pedicel cells shape; – cytoplasmic vacuolation; – nuclear alterations and fragmentation; – oocytes IV and V damage; – dehydration of the chorion; – disorganized organelles (mitochondria and RER).	Denardi et al. (2010a, 2010b, 2011) Remédio et al. (2015)
		Integumento	– disorganization of the epithelium; – cytoplasmic vacuolation in the epithelial cells; – disruption of cell boundaries; – nuclear fragmentation and pyknosis; – sub-cuticular layers with reduced thickness.	Remédio et al. (2014) Lima de Souza et al. (2017)
		Synganglion	– cytoplasmic vacuolation; – disruption of cell boundaries; – tissue disorganization.	Remédio et al. (2014)
		Salivary Glands	– modification in the acinar shape; – cytoplasmic vacuolation and disorganization; – roughness of the endoplasmic reticulum with dilated lumen; – mitochondrial alterations.	Remédio et al. (2016)

Table 2 – Natural Acaricides

		Female Reproductive System	– modification in the oocytes shape; – cytoplasmic vacuolation; – reduced quantity and damages to the composition of the yolk grains; – pyknotic and vacuolated nuclei.	Vendramini et al. (2012a, b) Roma et al. (2013a)
		Synganglion	– emergence of spaces between the perineurium and the cortical region; – cortex cells with extensive vacuolation; – nerve cells with pyknotic nuclei and marginalized chromatin; – damage in the glial cells; – alteration in the thickness of the neural lamella; – cytoplasmic vacuolation; – mitochondrial damages; – interference in the production of acid phosphatase enzyme.	Roma et al. (2013a, b, 2015)
Andiroba Oil	<i>Carapa guianensis</i>			
Thymol	Plantas das famílias Apiacea, Lamiacea e Verbenaceae	Female Reproductive System	– invaginations in the chorion membrane; – disorganized and cytoplasmic vacuolation in the oocytes	Matos et al. (2014)
		Salivary Glands	– dilation of the lumen (type I acini); – cytoplasmic vacuolation in the acinar cells (type II and III acini); – nuclear fragmentation.	Matos et al. (2019)
		Synganglion	– cytoplasmic vacuolation in the cells of the perineurium and the cortical region; pyknotic nuclei; neural lamella	Matos et al. (2019)

Table 2 – Natural Acaricides

Esters of Ricinoleic Acid	<i>Ricinus communis</i>	Gene	– damage to the cells of the accessory and tubular glands; – disruption of cell boundaries; – disorganization and cytoplasmic vacuolation; – nuclear fragmentation.	Matos et al. (2020)
		Female Reproductive System	– cytoplasmic vacuolation; – alteration in the proteins, carbohydrates and lipids synthesis; – modification in the chorion composition; – alterations in the granulation of the yolk.	Arnosti et al. (2011b) Sampieri et al. (2012,2013)
		Salivary Glands	– accelerated tissue degeneration; – cytoplasmic vacuolation in the acinar cells; – damages in the secretory cycle.	Arnosti et al. (2011a) Camargo-Mathias et al. (2016)
		Female Reproductive System	– alteration in the size of the germinative cells and yolk granules; – vacuolation in the germinative cells; – nuclear damages.	Oliveira et al. (2019)
Jambu (Spilanthol)	<i>Acmella oleracea</i>	Midgut	– generative cells damages; – modification in the digestive cells size; – digestive residue accumulated; – alteration in the proteins, carbohydrates and lipids distribution.	Oliveira et al. (2019)

Table 2 – Natural Acaricides

Carvacrol	Lamiaceae and Verbenaceae	Female Reproductive System	– modification of the shape of the oocytes and germinative vesicles; – intense vacuolation in the cytoplasm; – interruption of the oocytes development (total absence of the II, IV and V stages).	Lima de Souza, et al. (2019)
Acetylcarvacrol	Lamiaceae and Verbenaceae	Female Reproductive System	– irregularly shaped in the germ cells; – nucleoli vacuolation; – irregular chorion; – reduction of the size of the oocytes; – alteration in the proteins,	Konig et al. (2020)
		Integumento	– carbohydrates and lipids synthesis. – alterations of the cuticle; – damages in the cells of the epithelium; – cytoplasmic vacuolation in the epithelial cells; – change in the size of the exocrine glands.	
Ethanollic extract of the <i>Tagetes patula</i> L.	<i>Tagetes patula</i> L.	Female Reproductive System	– intense cytoplasmic vacuolation (oocytes in the stages III-V); – irregular formation of yolk granules; – deformity in the chorion (oocytes IV and V); – rupture and externalization of yolk granules (oocytes V).	Politi et al. (2015)

7. Synergies

Although synthetic acaricides can be effective to control ticks, they cause many problems, such as the selection of tick strains that are resistant to the main active ingredients, damages to non-target organisms, and environmental contamination by their residues (Camargo-Mathias, 2018). For these and other reasons, many researchers are studying the potential synergies between acaricides, both synthetic and natural, in varying combinations (Araújo et al., 2016; Coelho et al., 2020; Lopes et al., 2019).

In the case of synthetic chemicals, synergism has been well studied, as revealed by the presence in the veterinary market of many formulations that combine different molecules in lower concentrations, where the association enhances the biological activity against ectoparasites (Baggott et al., 2011). Besides the advantage of synergy, the combination of two or more substances can reduce selection for resistance of ectoparasites, one of the great drawbacks of using only one type of synthetic chemical, where ever increasing concentrations are needed to produce the same effect (Baggott et al., 2011; Becker et al., 2019b).

On the other hand, there are many fewer studies about the synergy between bioactive substances extracted from plants and animals to achieve biological control that is effective and also more environmentally friendly (Araújo et al., 2016; Coelho et al., 2020; Lopes et al., 2019). It is known that the association of the bioactive substances in essential oils naturally act with synergy in plants to protect them against herbivory and parasitism (Coelho et al., 2020).

Araujo et al. (2016) observed that the association of carvacrol, thymol and eugenol was effective to control ticks of the species *R. microplus* and *R. sanguineus* s.l. (*R. linnaei*). They found that the combination of carvacrol + thymol (at the LC_{50} of both) caused 94.46% mortality of the exposed larvae. In turn, the association of carvacrol + eugenol (at LC_{50}) killed 97.35% of the larvae, while the combination of thymol + eugenol caused 100% mortality of the exposed larvae. In a more recent study, Coelho et al. (2020) described the synergistic action of thymol and eugenol on the immature stages (larvae and nymphs) of *R. sanguineus*, with mortality of 95% at the concentration of 5.0 mg/mL, confirming the potential of this association to control the immature stages of these ticks. Another relevant advantage of using synergistic associations is the need for lower concentrations of each substance, reducing the cost in comparison with the use of individual compounds (Coelho et al., 2020)

8. An eye on the future: ozone as a potential acaricide

Ozone is a gas formed by a molecule containing three oxygen atoms (O_3), originating from splitting the bonds of regular oxygen molecules (O_2) due to the incidence of ultraviolet radiation or high-voltage electrical discharges (Majewski, 2012). It is a potent oxidant that is highly unstable, quickly degrading in the atmosphere, at a pace that depends on the temperature and pressure, generating only oxygen molecules as residue. This is particularly interesting because ozone does not pose a risk of environmental contamination or public health when used with caution (Moreira et al., 2017).

In recent years, many studies have demonstrated the potential of ozone as an antimicrobial, disinfectant, sterilizer and healing agent, as well as to control agricultural pests (Campabadal et al., 2013; da Soares et al., 2018; Guzel-Seydim et al., 2004; Moreira Fonseca et al., 2015; Rozado et al., 2008; Subramanyam et al., 2017). In this respect, Abreu et al. (2020a, b) tested the acaricidal potential of ozone diluted in water (ozonated water) by exposing *R. sanguineus* s.l. (*R. linnaei*) ticks to it.

The dilution of ozone in water makes its molecules more stable, increasing the potential for reactions that generate oxidant radicals, which are involved in triggering biochemical reactions both *in vivo* and *in vitro* (Bocci and Via, 2004). The laboratory studies reported so far involving immersion of semi-engorged female brown dog ticks have demonstrated the existence of morphophysiological alterations of the integument and salivary glands caused by exposure to concentrations of 0.75, 1.5, 2.25 and 3.0 mg/L of ozonated water (Abreu et al., 2020a, b).

The microscopic analysis of the integument of the female ticks exposed to ozonated water revealed alterations, mainly in the epithelium cells, whose function is to synthesize and secrete all the components that compose the various layers of the integument (cuticle) (Abreu et al., 2020a). These alterations include metaplasia, i.e., cubic cells taking on cylindrical shape, suggesting intensification of their function to secrete cuticular components (and thicken the cuticle), probably to increase the protective barrier and prevent the compound from penetrating the body (Abreu et al., 2020a). At the highest concentration (3 mg/L) tested by Abreu et al. (2020a), the alterations were more severe, since the epithelial layer, formerly singular, became stratified (multiple cell layers), also as a strategy to protect the tick against the action of ozone.

Abreu et al. (2020b) analyzed the salivary glands of females of the same species that were exposed to ozonated water at the same concentrations as in the previous study. The results showed that the glandular acini also were altered and presented different characteristics in

relation to the control ticks. Among the changes were dilation of the lumens of the acini I, cytoplasmic vacuolation and nuclear alterations such as chromatin marginalization, pyknosis and nuclear fragmentation of the acini I and II cells, and formation of irregular granules within the cells of these acini, indicating that the ozonated water caused irreversible damages to the glandular tissues and interfered in the engorgement process, thus hampering the reproductive process and generation of offspring (Abreu, 2020b).

9. Conclusions and Perspectives

The data presented in this review provide a better understanding of the state of the art and the problems posed by the synthetic acaricides, especially their indiscriminate use. Although these substances have proven efficacy in controlling *R. sanguineus* s.l. (*R. linnaei*) there are many questions still to be answered regarding the effects on non-target organisms and the environment. It is necessary to find new methods and alternative strategies to control these ticks and other ectoparasites that are both more efficient and environmentally friendly.

In this respect, high expectations exist about natural acaricides extracted from plants or obtained from animal secretions. Many studies have shown that bioactive substances alone or in combination can control ticks at lower cost and less environmental harm. Other substances have also shown acaricidal potential, especially ozonated water, whose use is effective against *R. sanguineus* (*R. linnaei*) and also environmentally friendly.

The systematic studies summarized here have made an unquestionable contribution to knowledge of how the morphology and physiology of ticks react to the toxic effects of various acaricides, both synthetic and natural, alone or in combination, as well as in association with other techniques, to enhance control with lower cost and less environmental impact.

Acknowledgments

The authors are grateful to FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), grant no. 2018/02999-9 and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) for the financial support.

Declaration of Interest Statement

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Abreu, M.R., Rocha, F.A., Furquim, K.C.S., Anholeto, L.A., Novaes, F.C.F., Morsoleto, M.J., Camargo-Mathias, M.I., 2014. Salivary Glands of Female Ticks *Rhipicephalus sanguineus* Like a Potential Source of Molecules with Inhibitory Action: In vivostudy with Walker 256 Tumor Cells. J. Pharm. Care Heal. Syst. 01, 1–8. <https://doi.org/10.4172/2376-0419.1000121>
- Abreu, M.R., Pereira, M.C., Ucelli, P.S., Nodari, E.F., Negrini, L., Camargo-Mathias, M.I., 2019. Immunomodulatory and morphophysiological effects of *Rhipicephalus sanguineus* s. l. (Acari : Ixodidae) salivary gland extracts. Vet. Immunol. Immunopathol. 207, 36–45. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2018.11.017>
- Abreu, M.R., Delalibera Junior, I., Pereira, N.R.C., Camargo-Mathias, M.I., 2020a. Exposure of Ticks *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari : Ixodidae) to Ozonated Water : Integument Response. Ozone Sci. Eng. 00, 1–10. <https://doi.org/10.1080/01919512.2020.1727310>
- Abreu, M.R. de, Delalibera Junior, I., Pereira, N.R.C., Camargo-Mathias, M.I., 2020b. Morphophysiological analysis of the salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari : Ixodidae) exposed to ozonated water : A control strategy. Med. Vet. Entomol. 1–9. <https://doi.org/10.1111/mve.12472>
- Aktas, M., Ozubek, S., 2018. Molecular evidence for trans-stadial transmission of *Anaplasma platys* by *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato under field conditions. Med. Vet. Entomol. 78–83. <https://doi.org/10.1111/mve.12261>
- Allen, K., Little, S., Petersen, M., Gruntmeir, J., Barrett, A., Herrin, B., ... & Guerino, F. 2020. Evaluation of oral fluralaner (Bravecto®) for efficacy against nymphs of *Amblyomma americanum* and *Rhipicephalus sanguineus* (sensu lato). Parasites & vectors, 13(1), 1-8. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04179-y>
- Alzohairy, M.A., 2016. Therapeutics Role of *Azadirachta indica* (Neem) and Their Active Constituents in Diseases Prevention and Treatment, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/7382506>
- Anderson, J.F., Magnarelli, L.A., 2008. Biology of Ticks. Infect. Dis. Clin. North Am. 22, 195–215. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2007.12.006>
- Araujo, A. M., Roma, G. C., Pizano, M. A., Scopinho Furquim, K. C., de Oliveira, P. R., & Camargo-Mathias, M. I. ,2012. Determination of the LC50 of selamectin (active principle of the antiparasitic Revolution®, Pfizer) applied on engorged female of the tick *Rhipicephalus*

sanguineus (Latreille, 1806)(Acari: Ixodidae). International Journal of Acarology, 38(4), 277-281. <https://doi.org/10.1080/01647954.2011.638320>

Araújo, L.X., Novato, T.P.L., Zeringota, V., Maturano, R., Melo, D., da Silva, B.C., Daemon, E., de Carvalho, M.G., Monteiro, C.M.O., 2016. Synergism of thymol, carvacrol and eugenol in larvae of the cattle tick, *Rhipicephalus microplus*, and brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. Med. Vet. Entomol. 30, 377–382. <https://doi.org/10.1111/mve.12181>

Arnosti, A., Desjardins, P., Christina, K., Furquim, S., Orivaldo, G., Claro, S., Henrique, G., Rodrigues, B., Camargo-Mathias, M.I., 2011a. Effects of *Ricinus communis* oil esters on salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille , 1806) (Acari : Ixodidae). Exp. Parasitol. 127, 569–574. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2010.10.009>

Arnosti, A., Desjardins, P., Christina, K., Furquim, S., Orivaldo, G., Henrique, G., Braggião, I., Camargo-mathias, M.I., 2011b. Effects of ricinoleic acid esters from castor oil of *Ricinus communis* on the vitellogenesis of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille , 1806) (Acari : Ixodidae) ticks. Exp. Parasitol. 127, 575–580. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2010.10.006>

Baggott, D., Ollagnier, C., Yoon, S.S., Collidor, N., Mallouk, Y., Cramer, L.G., 2011. Efficacy of a novel combination of fipronil, amitraz and (S)-methoprene for treatment and control of tick species infesting dogs in Europe. Vet. Parasitol. 179, 330–334. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.03.045>

Barker, S.C., Murrell, A., 2008. Systematics and evolution of ticks with a list of valid genus and species names. Ticks Biol. Dis. Control 129 Suppl, 1–39. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511551802.002>

Becker, S., Webster, A., Doyle, R.L., Martins, J.R., Reck, J., Klafke, G.M., 2019a. Resistance to deltamethrin , fipronil and ivermectin in the brown dog tick , *Rhipicephalus sanguineus* sensu stricto , Latreille (Acari : Ixodidae). Ticks Tick. Borne. Dis. 10, 1046–1050. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.05.015>

Becskei, C., Geurden, T., Liebenberg, J., Cuppens, O., Mahabir, S. P., & Six, R. H. 2016. Comparative speed of kill of oral treatments with Simparica TM (sarolaner) and Bravecto®(fluralaner) against induced infestations of *Rhipicephalus sanguineus* on dogs. Parasites & vectors, 9(1), 1-6. doi: 10.1186/s13071-016-1376-x

Bocci, V., Via, A., 2004. Ozone as Janus : this controversial gas can be either toxic or medically useful 13, 3–12. <https://doi.org/10.1080/0962935062000197083>

Burgio, F., Meyer, L., & Armstrong, R. 2016. A comparative laboratory trial evaluating the immediate efficacy of fluralaner, afoxolaner, sarolaner and imidacloprid+ permethrin

against adult *Rhipicephalus sanguineus* (sensu lato) ticks attached to dogs. Parasites & vectors, 9(1), 1-6. doi: 10.1186/s13071-016-1900-z

Calligaris, I.B., Oliveira, P.R. de, Roma, G.C., Bechara, G.H., Camargo-Mathias, M.I., 2013. Action of the Insect Growth Regulator Fluazuron, The Active Ingredient of the Acaricide Acatak V, in *Rhipicephalus sanguineus* Nymphs (Latreille, 1806) (Acari : Ixodidae). Microsc. Res. Tech. 1185, 1177–1185. <https://doi.org/10.1002/jemt.22282>

Camargo-Mathias, M. I.; Furquim, K. C. S.; Nunes, P., 2011. Immunomodulatory effects of tick saliva. ISJ. 8, 231–240.

Camargo-Mathias, M.I., 2013. Guia básico de morfologia interna de carrapatos ixodídeos. Editora Unesp, São Paulo.

Camargo-Mathias, M.I., Chierice, G.O., Brienza, P.D., Arnosti, A., Calligaris, I.B., Sampieri, B.R., Nodari, E.F., Ferreira, A.R.F., 2016. Esters from castor oil : interfering with the salivary gland secretory cycle of *Rhipicephalus sanguineus* ticks (Acari : Ixodidae) 2, 66–72.

Camargo-Mathias, M.I., Pereira, N.R.C., da Silva Reis, C., de Almeida, C.R., dos Santos Mendes, D.R., de Araújo, G.B., Postali, L., Figueroa, T., Ferreira, A.R.F., Santos, J.P., de Oliveira, P.R., 2017. Deltamethrin as inductor agent of precocious ovarian degeneration in *Rhipicephalus sanguineus* s.l. (Acari: Ixodidae) ticks. Exp. Appl. Acarol. 72, 161–169. <https://doi.org/10.1007/s10493-017-0144-8>

Camargo-Mathias, M. I., 2018. Inside ticks: Morphophysiology, toxicology and therapeutic perspectives. Editora UNESP, São Paulo.

Campabadal, C.A., Maier, D.E., Mason, L.J., 2013. Efficacy of fixed bed ozonation treatment to control insects in stored bulk grain. Appl. Eng. Agric. <https://doi.org/10.13031/aea.29.9888>

Cavalleri, D., Murphy, M., Gorbea, R. L., Seewald, W., Drake, J., & Nanchen, S. 2017. Laboratory evaluations of the immediate and sustained effectiveness of lotilaner (Credelio™) against three common species of ticks affecting dogs in Europe. Parasites & vectors, 10(1), 1-7. doi: 10.1186/s13071-017-2477-x

Coelho, L., de Paula, L.G.F., Alves, S. das G.A., Sampaio, A.L.N., Bezerra, G.P., Vilela, F.M.P., Matos, R. da S., Zeringóta, V., Borges, L.M.F., Monteiro, C., 2020. Combination of thymol and eugenol for the control of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato: Evaluation of synergism on immature stages and formulation development. Vet. Parasitol. 277, 108989. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2019.108989>

Da Soares, C.E.S., Weber, A., Moecke, E.H.S., de Souza, C.K., Reiter, M.G.R., Scussel,

V.M., 2018. Use of ozone gas as a green control alternative to beetles *Alphitobius diaperinus* (panzer) infestation in aviary bed utilized in the poultry industry. Chem. Eng. Trans. <https://doi.org/10.3303/CET1864099>

Damasceno, S.R.B., Rodrigo, F., Oliveira, A.M., Carvalho, N.S., Brito, C.F.C., Silva, I.S., Beatriz, F., Sousa, M., Silva, R.O., Sousa, D.P., Luiz, A., Barbosa, R., Freitas, R.M., Medeiros, J.R., 2014. Carvacryl acetate , a derivative of carvacrol , reduces nociceptive and inflammatory response in mice. Life Sci. 94, 58–66. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2013.11.001>

Dantas-Torres, F., 2008. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): From taxonomy to control. Vet. Parasitol. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.12.030>

Dantas-Torres, F., 2010. Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. Parasit. Vectors 3, 26. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-3-26>

Dantas-Torres, F., Otranto, D., 2015. Further thoughts on the taxonomy and vector role of *Rhipicephalus sanguineus* group ticks. Vet. Parasitol. 208, 9–13. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.12.014>

Dantas-Torres, F., Latrofa, M.S., Ramos, R.A.N., Lia, R.P., Capelli, G., Parisi, A., Porretta, D., Urbanelli, S., Otranto, D., 2018. Biological compatibility between two temperate lineages of brown dog ticks, *Rhipicephalus sanguineus* (sensu lato). Parasites and Vectors 11, 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2941-2>

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

Denardi, S.E., Bechara, G.H., De Oliveira, P.R., Camargo-Mathias, M.I., 2012. Ultrastructural analysis of the oocytes of female *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) ticks subjected to the action of *Azadirachta indica* A. Juss (Neem). Ultrastruct. Pathol. <https://doi.org/10.3109/01913123.2011.588819>

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. <https://doi.org/10.1155/2013/423750>

Eiden, A.L., Kaufman, P.E., Oi, F.M., Dark, M.J., Bloomquist, J.R., Miller, 2017. Determination of metabolic resistance mechanisms in pyrethroid-resistant and fipronil-tolerant brown dog ticks. Med. Vet. Entomol. 31, 243–251. <https://doi.org/10.1111/mve.12240>

Eiden, A.L., Phillip, E., Faith, M., Sandra, A., Robert, J., Eiden, A.L., Kaufman, P.E., Oi, F.M., Allan, S.A., Miller, R.J., 2020. Detection of Permethrin Resistance and Fipronil Tolerance in *Rhipicephalus sanguineus* (Acari : Ixodidae) in the United States. J. Med. Entomol. 52, 429–436. <https://doi.org/10.1093/jme/tjv005>

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.

Geurden, T., Becskei, C., Grace, S., Strube, C., Doherty, P., Liebenberg, J., ... & Six, R. H. 2016. Efficacy of a novel oral formulation of sarolaner (Simparica™) against four common tick species infesting dogs in Europe. Veterinary parasitology, 222, 33-36. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.03.024>

Gray, J., Dantas-Torres, F., Estrada-Peña, A., Levin, M., 2013. Systematics and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. Ticks Tick. Borne. Dis. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2012.12.003>

Guglielmone, A.A., Apanaskevich, D.A., Estrada-Peña, A., Robbins, R.G., Petney, T.N., Horak, I.G., 2014. The hard ticks of the world: (Acari: Ixodida: Ixodidae), The Hard Ticks of the World: (Acari: Ixodida: Ixodidae). <https://doi.org/10.1007/978-94-007-7497-1>

Guzel-Seydim, Z.B., Greene, A.K., Seydim, A.C., 2004. Use of ozone in the food industry. LWT - Food Sci. Technol. 37, 453–460. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2003.10.014>

Houseman, R.M., 2013. Guide to Ticks and Tick-borne Diseases. University of Missouri, Missouri.

Ipek, A., Sayin, N.D., Duygu, N., Ipek, S., Özübek, S., Aktas, M., 2020. Molecular Evidence for Transstadial Transmission of *Ehrlichia canis* by *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato Under Field Conditions. 55, 440–444. <https://doi.org/10.1093/jme/tjx217>

Kazimírová, M., Štibrániová, I., 2013. Tick salivary compounds: their role in modulation of host defences and pathogen transmission. Front. Cell. Infect. Microbiol. 3, 43. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00043>

Konig, I.F.M., Oliveira, M.V.S., Gonçalves, R.R.P., Peconick, A.P., Thomasi, S.S., Anholeto, L.A., Lima-de-Souza, J.R., Camargo-Mathias, M.I., Remedio, R.N., 2020. Low concentrations of acetylcarvacrol induce drastic morphological damages in ovaries of surviving *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato ticks (Acari: Ixodidae). Micron 129, 102780. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2019.102780>

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., 2015. Modulation of host

immunity by tick saliva. J. Proteomics 128, 58–68. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.07.005>

Kunkle, B., Daly, S., Dumont, P., Drag, M., & Larsen, D. 2014. Assessment of the efficacy of orally administered afoxolaner against *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato. Veterinary parasitology, 201, 3-4, 226-228. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.02.018>

Lima de Souza, J.R., Remedio, R.N., Arnosti, A., de Abreu, R.M.M., Camargo-Mathias, M.I., 2017. The effects of neem oil (*Azadirachta indica* A. JUSS) enriched with different concentrations of azadirachtin on the integument of semi-engorged *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae) females. Microsc. Res. Tech. 80, 838–844. <https://doi.org/10.1002/jemt.22871>

Lima de Souza, J.R., Oliveira, P.R. de, Anholeto, L.A., Arnosti, A., Daemon, E., Remedio, R.N., Camargo-Mathias, M.I., 2019. Effects of carvacrol on oocyte development in semi-engorged *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato females ticks (Acari: Ixodidae). Micron 116, 66–72. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2018.09.015>

Lopes, T., Novato, P., Marchesini, P., Muniz, N., Cristina, M., Prata, D.A., Furlong, J., Maria, F., Vilela, P., Daemon, E., Maturano, R., Monteiro, C., 2019. Evaluation of synergism and development of a formulation with thymol , carvacrol and eugenol for *Rhipicephalus microplus* control. Exp. Parasitol. 207, 107774. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2019.107774>

Majewski, J., 2012. Methods for measuring ozone concentration in ozone-treated water. Prz. Elektrotechniczny (Electrical Rev. 253–255.

Matos, R.S., Daemon, E., Camargo-Mathias, M.I., Furquim, K.C.S., Sampieri, B.R., Remédio, R.N., Araújo, L.X., Novato, T.P.L., 2014a. Histopathological study of ovaries of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) exposed to different thymol concentrations. Parasitol. Res. 113, 4555–4565. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-4145-9>

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., 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. <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3694-7>

Matos, R.S., Daemon, E., de Oliveira Monteiro, C.M., Sampieri, B.R., Marchesini, P.B.C., Delmonte, C., Camargo-Mathias, M.I., 2019. Thymol action on cells and tissues of the synganglia and salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato females (Acari: Ixodidae). Ticks Tick. Borne. Dis. 10, 314–320. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.11.003>

Matos, R.S., de Oliveira, P.R., Coelho, L., de Paula, L.G.F., Zeringota, V., Carvalho

Silva, B., Monteiro, C., Daemon, E., Camargo-Mathias, M.I., 2020. Thymol: Effects on reproductive biology and Gene's organ morphology in *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato engorged females (Acari: Ixodidae). Ticks Tick. Borne. Dis. 11, 101308. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.101308>

McTier, T. L., Chubb, N., Curtis, M. P., Hedges, L., Inskip, G. A., Knauer, C. S., ... & Meeus, P. 2016. Discovery of sarolaner: a novel, orally administered, broad-spectrum, isoxazoline ectoparasiticide for dogs. Veterinary Parasitology, 222, 3-11. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.02.019>

Moreira Fonseca, P.M., Feitosa, L. dos S., Fernandes, A.B., Zangaro, R.A., Miyakawa, W., de Lima, C.J., 2015. Disinfection of Dental Instruments Contaminated with *Streptococcus mutans* Using Ozonated Water Alone or Combined with Ultrasound. Ozone Sci. Eng. 37, 85–89. <https://doi.org/10.1080/01919512.2014.904740>

Moreira, L.H., Figueiredo, T.F.B., Alves, L.P., Fernandes, A.B., Zângaro, R.A., Mendes, A.L. da S., Gaudêncio, F.N., Lima, C.J. de, 2017. Effect of Ozone as Acaricide: Action of the Ozone on the Cuticle and Respiratory Spiracle of Tick *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato. Ozone Sci. Eng. 00, 1–8. <https://doi.org/10.1080/01919512.2017.1403306>

Murphy, M., Garcia, R., Karadzovska, D., Cavalleri, D., Snyder, D., Seewald, W., ... & Nanchen, S. 2017. Laboratory evaluations of the immediate and sustained efficacy of lotilaner (Credelio™) against four common species of ticks affecting dogs in North America. Parasites & vectors, 10(1), 1-8. (2017). doi: 10.1186/s13071-017-2476-y

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., 2015. The taxonomic status of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806). Vet. Parasitol. 208, 2–8. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.12.021>

Nava, S., Beati, L., Venzal, J.M., Labruna, M.B., Szabó, M.P.J., Petney, T., Saracho-Bottero, M.N., Tarragona, E.L., Dantas-Torres, F., Silva, M.M.S., Mangold, A.J., Guglielmone, A.A., Estrada-Peña, A., 2018. *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806): Neotype designation, morphological re-description of all parasitic stages and molecular characterization. Ticks Tick. Borne. Dis. 9, 1573–1585. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.08.001>

Nodari, E.F., Roma, G.C., Furquim, K.C.S., Bechara, G.H., Mathias, M.I.C., 2011. Cytotoxic effects of permethrin in salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) semi-engorged females. Exp. Parasitol. 128, 151–158. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2011.02.003>

Nodari, E.F., Roma, G.C., Furquim, K.C.S., Bechara, G.H., Camargo-Mathias, M.I., 2012a. Action of permethrin on *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) semi-engorged females: Morpho-physiological evaluation of salivary glands. Ticks Tick. Borne. Dis. 3, 219–226. <https://doi.org/10.1002/jemt.22126>

Nodari, E.F., Roma, G.C., Furquim, K.C.S., De Oliveira, P.R., Bechara, G.H., Camargo-Mathias, M.I., 2012b. Degenerative process and cell death in salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) semi-engorged female exposed to the acaricide permethrin. Microsc. Res. Tech. 75, 1012–1018. <https://doi.org/10.1002/jemt.22025>

Nodari, E.F., Roma, G.C., Christina, K., Furquim, S., Oliveira, P.R. De, Henrique, G., Camargo-mathias, M.I., 2017. Morpho-ultrastructural alterations in the salivary glands of semi-engorged *Rhipicephalus sanguineus* s.l. females subjected to permethrin . Emergent Life Sci. Res. 3, 18–31. <https://doi.org/10.7324/elsr.2017.311831>

Oliveira, P.R., Bechara, G.H., Camargo Mathias, M.I., 2007. *Amblyomma triste* (Koch, 1844) (Acari: Ixodidae). Ovaries: An ultrastructural analysis. Exp. Parasitol. 116, 407–413. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2007.02.006>

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 LC50. Experimental parasitology, 127(2), 418-422. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2010.09.009>

Oliveira, P.R., Calligaris, I.B., Roma, G.C., Bechara, G.H., Pizano, M.A., Camargo Mathias, M.I., 2012. Potential of the insect growth regulator, fluazuron, in the control of *Rhipicephalus sanguineus* nymphs (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): Determination of the LD 95 and LD 50. Exp. Parasitol. 131, 35–39. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2012.02.023>

Oliveira, P.R. De, Calligaris, I.B., Roma, G.C., Bechara, G.H., Camargo-Mathias, M.I., 2013. Fluazuron-induced morphophysiological changes in the cuticle formation and midgut of *Rhipicephalus sanguineus* Latreille , 1806 (Acari: Ixodidae) nymphs 45–58. <https://doi.org/10.1007/s00436-012-3103-7>

Oliveira, P.R., Calligaris, I.B., Nunes, P.H., Bechara, G.H., Camargo-Mathias, M.I., 2014. Fluazuron-induced morphological changes in *Rhipicephalus sanguineus* Latreille, 1806 (Acari: Ixodidae) nymphs: An ultra-structural evaluation of the cuticle formation and digestive processes. Acta Trop. 133, 45–55. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.01.008>

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. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2015.04.021>

Oliveira, P.R., de Carvalho Castro, K.N., Anholeto, L.A., Camargo Mathias, M.I., 2016a. Cytotoxic effects of extract of *Acmella oleraceae* (Jambú) in *Rhipicephalus microplus* females ticks. Microsc. Res. Tech. 79, 744–753. <https://doi.org/10.1002/jemt.22693>

Oliveira, P.R., Remédio, R.N., Bechara, G.H., Anholeto, L.A., Mathias, M.I.C., 2016b. Dinotefuran-induced morphophysiological changes in the ovaries and midgut of semi-engorged females *Rhipicephalus sanguineus* Latreille, 1806 (Acari: Ixodidae) ticks. Parasitol. Res. 115, 829–849. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4814-3>

Oliveira, P.R., Anholeto, L.A., Bechara, G.H., Camargo Mathias, M.I., 2017. Dinotefuran-induced morphophysiological changes in semi-engorged females *Rhipicephalus sanguineus* Latreille, 1806 (Acari: Ixodidae) ticks: Ultra-structural evaluation. Acta Trop. 166, 139–154. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.11.017>

Oliveira, P.R., Anholeto, L.A., Rodrigues, R.A.F., Bechara, G.H., de Carvalho Castro, K.N., Camargo Mathias, M.I., 2018. The potential of *Acmella oleracea* (Jambu) extract in the control of semi-engorged *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) female ticks. Int. J. Acarol. 44, 192–197. <https://doi.org/10.1080/01647954.2018.1472637>

Oliveira, P.R., Anholeto, L., Ferreira Rodrigues, R., Arnosti, A., Bechara, G., de Carvalho Castro, K., Camargo-Mathias, M., 2019. Cytotoxic effects of extract of *Acmella oleracea* in the ovaries and midgut of *Rhipicephalus sanguineus* Latreille, 1806 (Acari: Ixodidae) female ticks. J. Microsc. Ultrastruct. 7, 28. https://doi.org/10.4103/jmau.jmau_16_18

Oliveira, M.V.S., Konig, I.F.M., Reis, A.C., Silva, L., Peconick, A.P., Thomasi, S.S., Lima de Souza, J.R., Camargo-Mathias, M.I., Remedio, R.N., 2020. Sublethal concentrations of acetylcarvacrol affect reproduction and integument morphology in the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae). Exp. Appl. Acarol. <https://doi.org/10.1007/s10493-020-00538-7>

Pereira, C. P. M., de Oliveira, P. R., Furquim, K. C. S., Bechara, G. H., Camargo-Mathias, M. I., 2011. Fipronil-induced cell death in salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806)(Acari: Ixodidae) semi-engorged females. Experimental parasitology, 127(2), 481-489. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2010.10.003>

Pereira, M. C., Gasparotto, A.E., Jurgilas, J.P., da Silva, L.A.C., Pereira, M. C., Silveira, S.S., Silva, T.N., Arnosti, A., Camargo-Mathias, M.I., 2017. Detrimental effect of deltamethrin

on the central nervous system (synganglion) of *Rhipicephalus sanguineus* ticks. Exp. Appl. Acarol. 71, 159–169. <https://doi.org/10.1007/s10493-017-0109-y>

Politi, F.A.S., Figueira, G.M., Araújo, A.M., Sampieri, B.R., Camargo-Mathias, M.I., Szabó, M.P.J., Bechara, G.H., Campaner, L., Vilegas, W., Pietro, R.C.L.R., 2012. Acaricidal activity of ethanolic extract from aerial parts of *Tagetes patula* L. (Asteraceae) against larvae and engorged adult females of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille , 1806) 1–11.

Politi, F.A.S., Mara, G., Camargo-mathias, M.I., Berenger, J., Parola, P., Cristina, R., Rodrigues, L., 2015. Action of ethanolic extract from aerial parts of *Tagetes patula* L. (Asteraceae) on hatchability and embryogenesis of *Rhipicephalus sanguineus* eggs (Acari : Ixodidae). Ind. Crop. Prod. 67, 55–61. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.01.014>

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

Remedio, R.N., Sampieri, B.R., Vendramini, M.C.R., Souza, N.M., Anholeto, L.A., Denardo, T.A.G.B., Camargo-Mathias, M.I., 2013. Morphology of the midgut of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) adult ticks in different feeding stages. Parasitol. Res. 112, 415–425. <https://doi.org/10.1007/s00436-012-3153-x>

Remedio, R.N., Nunes, P.H., Anholeto, L.A., Camargo-Mathias, M.I., 2014. Morphological alterations in the synganglion and integument of *Rhipicephalus sanguineus* ticks exposed to aqueous extracts of neem leaves (*Azadirachta indica* A. JUSS). Microsc. Res. Tech. 77, 989–998. <https://doi.org/10.1002/jemt.22427>

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. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-4200-6>

Remedio, R.N., Nunes, P.H., Anholeto, L.A., Oliveira, P.R., Sá, I.C.G., Camargo-Mathias, M.I., 2016. Morphological alterations in salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus* ticks (Acari: Ixodidae) exposed to neem seed oil with known azadirachtin concentration. Micron 83, 19–31. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2016.01.004>

Rohdich, N., Zschiesche, E., Wolf, O., Loehlein, W., Pobel, T., Gil, M. J., & Roepke, R. K. 2018. Field effectiveness and safety of fluralaner plus moxidectin (Bravecto® Plus) against ticks and fleas: a European randomized, blinded, multicenter field study in naturally-infested client-owned cats. Parasites & vectors, 11, 1-11. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3175-z>

Roma, G.C., Oliveira, P.R. De, 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. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2009.08.001>

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 Chem. Toxicol. 48, 825–30. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.12.016>

Roma, G.C., Furquim, K.C.S., Bechara, G.H., Mathias, M.I.C., 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? Exp. Appl. Acarol. 53, 287–299. <https://doi.org/10.1007/s10493-010-9401-9>

Roma, G.C., Camargo-Mathias, M.I., de Oliveira, P.R., Furquim, K.C.S., Bechara, G.H., 2013a. Neurotoxic action of permethrin in *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) female ticks. Morphological and cytochemical evaluation of the central nervous system. Vet. Parasitol. 196, 482–491. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.02.025>

Roma, G.C., Mathias, M.I.C., De Faria, A.U., De Oliveira, P.R., Furquim, K.C.S., Bechara, G.H., 2013b. Morphological and cytochemical changes in synganglion of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) female ticks from exposure of andiroba oil (*Carapa guianensis*). Microsc. Res. Tech. 76, 687–696. <https://doi.org/10.1002/jemt.22219>

Roma, G. C., Vendramini, M. C. R., Camargo-Mathias, M. I., Nunes, P. H., de Faria, A. U., Bechara, G. H., 2013c. Action of andiroba oil and permethrin on the central nervous and reproductive systems of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806)(Acari: Ixodidae) ticks females. A confocal study. Research in veterinary science, 95(2), 529-536. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.06.009>

Roma, G.C., Camargo Mathias, M.I., Nunes, P.H., Bechara, G.H., 2014. Changes in the synganglion of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) female ticks exposed to permethrin: An ultrastructural overview. Acta Trop. 136, 19–26. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.04.004>

Roma, G.C., Camargo-Mathias, M.I., Nunes, P.H., Remédio, R.N., de Faria, A.U., Bechara, G.H., 2015. Effects of andiroba (*Carapa guianensis*) oil in ticks: Ultrastructural analysis of the synganglion of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae).

Acta Trop. 7–15. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.06.018>

Rosa, P., Oliveira, D., Braggião, I., Cristina, G., Henrique, G., Aparecido, M., Izabel, M., Mathias, C., 2012. Experimental Parasitology Potential of the insect growth regulator , fluazuron , in the control of *Rhipicephalus sanguineus* nymphs (Latreille , 1806) (Acari : Ixodidae): Determination of the LD 95 and LD 50 131, 35–39. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2012.02.023>

Rozado, A.F., Faroni, L.R.A., Urruchi, W.M.I., Guedes, R.N.C., Paes, J.L., 2008. Aplicação de ozônio contra *Sitophilus zeamais* e *Tribolium castaneum* em milho armazenado. Rev. Bras. Eng. Agrícola e Ambient. 12, 282–285.

Sampieri, B.R., Arnosti, A., Nunes, P.H., Furquim, K.C.S., Chierice, G.O., Camargo-Mathias, M.I., 2012. Ultrastructural changes in the ovary cells of engorged *Rhipicephalus sanguineus* female ticks treated with esters of ricinoleic acid from castor oil (*Ricinus communis*) 690, 683–690. <https://doi.org/10.1002/jemt.21112>

Sampieri, B.R., Arnosti, A., Furquim, K.C.S., Chierice, G.O., Bechara, G.H., de Carvalho, P.L.P.F., Nunes, P.H., 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). Vet. Parasitol. 191, 315–322. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.09.013>

Sanches, G.S., Évora, P.M., Mangold, A.J., Jittapalapong, S., Rodriguez-Mallon, A., Guzmán, P.E.E., Bechara, G.H., Camargo-Mathias, M.I., 2016. Molecular, biological, and morphometric comparisons between different geographical populations of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae). Vet. Parasitol. 215, 78–87. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.11.007>

Six, R. H., Everett, W. R., Young, D. R., Carter, L., Mahabir, S. P., Honsberger, N. A., ... Rugg, J. J. 2016. Efficacy of a novel oral formulation of sarolaner (Simparica™) against five common tick species infesting dogs in the United States. Veterinary parasitology, 222, 28-32. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.12.023>

Soares, J.F., Soares, H.S., Barbieri, A.M., Labruna, M.B., 2012. Experimental infection of the tick *Amblyomma cajennense*, Cayenne tick, with *Rickettsia rickettsii*, the agent of Rocky Mountain spotted fever. Med. Vet. Entomol. 26, 139–151. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2011.00982.x>

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

Shoop, W. L., Hartline, E. J., Gould, B. R., Waddell, M. E., McDowell, R. G., Kinney, J. B., ... Confalone, P. N. 2014. Discovery and mode of action of afoxolaner, a new isoxazoline parasiticide for dogs. *Veterinary Parasitology*, 201, 3-4, 179-189. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.02.020>

Subramanyam, B., Xinyi, E., Savoldelli, S., Sehgal, B., 2017. Efficacy of ozone against *Rhyzopertha dominica* adults in wheat. *J. Stored Prod. Res.* <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2016.12.002>

Szabo, M.P.J., Pinter, A., Labruna, M.B., Szabó, J., Pinter, A., Labruna, M.B., 2013. Ecology, biology and distribution of spotted-fever tick vectors in Brazil. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 3, 27. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00027>

Tinkruejeen, G., Meesaimongkon, P., Tangtrongsup, S., Thitaram, N., Srifawattana, N., Beugnet, F., & Tiwananthagorn, S. 2019. Comparative efficacy of afoxolaner and ivermectin in dogs naturally infested with *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato: A clinical field study conducted in Thailand. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 18, 100340. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2019.100340>

Vendramini, M.C.R., Camargo-Mathias, M.I., De Faria, A.U., Bechara, G.H., De Oliveira, P.R., Roma, G.C., 2012a. 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. <https://doi.org/10.1007/s00436-012-3031-6>

Vendramini, M.C.R., Mathias, M.I.C., De Faria, A.U., Furquim, K.C.S., De Souza, L.P., Bechara, G.H., Roma, G.C., 2012b. Action of andiroba oil (*Carapa guianensis*) on *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) semi-engorged females: Morphophysiological evaluation of reproductive system. *Microsc. Res. Tech.* 75, 1745–1754. <https://doi.org/10.1002/jemt.22126>

Williams, H., Zoller, H., Roepke, R. K., Zschiesche, E., & Heckerroth, A. R. 2015. Fluralaner activity against life stages of ticks using *Rhipicephalus sanguineus* and *Ornithodoros moubata* IN in vitro contact and feeding assays. *Parasites & vectors*, 8(1), 1-5.). doi: 10.1186/s13071-015-0704-x

Capítulo 3

Exposure of Ticks *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari:Ixodidae) to Ozonated Water: Integument Response. Ozone: Science & Engineering, v. 1, p. 1-10, 2020. doi: 10.1080/01919512.2020.1727310.

Abstract

The *Rhipicephalus sanguineus* s. l. has great medical and veterinary importance posing severe risks to the well-being of pets and public health. The ozone is a promising alternative for control of this ectoparasites, by not causing environmental contamination or threatening public health. Due to the fact that the integument is the organ that first comes into contact with topically applied acaricides, the objective of this study was to investigate morphological alterations in ticks exposed *in vivo* to ozonated water for 5 minutes and analyzed after the periods of 24, 48 and 72 hours. The results showed that the exposure to ozonated water at the concentration of 2.25mg/L for 5 minutes and analyzed after 48 hours had the greatest effect, causing irreversible damage to the integument of the *R. sanguineus* s. l. females, interfering in the processes of attachment, engorgement and reproduction.

Keywords: ozone, tick, control, integument, acaricide, morphology.



Exposure of Ticks *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari:Ixodidae) to Ozonated Water: Integument Response

Marina Rodrigues de Abreu, Italo Delalibera Junior, Natalia Rubio Claret Pereira & Maria Izabel Camargo-Mathias

To cite this article: Marina Rodrigues de Abreu, Italo Delalibera Junior, Natalia Rubio Claret Pereira & Maria Izabel Camargo-Mathias (2020): Exposure of Ticks *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari:Ixodidae) to Ozonated Water: Integument Response, *Ozone: Science & Engineering*, DOI: [10.1080/01919512.2020.1727310](https://doi.org/10.1080/01919512.2020.1727310)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/01919512.2020.1727310>



Published online: 21 Feb 2020.



Submit your article to this journal 



View related articles 



View Crossmark data 



Exposure of Ticks *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari:Ixodidae) to Ozonated Water: Integument Response

Marina Rodrigues de Abreu^a, Italo Delalibera Junior^b, Natalia Rubio Claret Pereira^a, and Maria Izabel Camargo-Mathias^a

^aBiology Department, Bioscience Institute, São Paulo State University “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Rio Claro, Av 24A, n° 1515. Rio Claro, SP, CEP 13506-900, Brazil; ^bDepartment of Entomology and Acarology, University of São Paulo, USP, Piracicaba, Av Pádua Dias, n° 11, Postcode 9. Piracicaba, SP, CEP 13418-900, Brazil

ABSTRACT

The *Rhipicephalus sanguineus* s. l. has great medical and veterinary importance posing severe risks to the well-being of pets and public health. The ozone is a promising alternative for control of this ectoparasites, by not causing environmental contamination or threatening public health. Due to the fact that the integument is the organ that first comes into contact with topically applied acaricides, the objective of this study was to investigate morphological alterations in ticks exposed *in vivo* to ozonated water for 5 min and analyzed after the periods of 24, 48, and 72 h. The results showed that the exposure to ozonated water at the concentration of 2.25 mg/L for 5 min and analyzed after 48 h had the greatest effect, causing irreversible damage to the integument of the *R. sanguineus* s. l. females, interfering in the processes of attachment, engorgement, and reproduction.

ARTICLE HISTORY

Received 22 November 2019
Accepted 29 January 2020

KEYWORDS

Ozone; tick; control; integument; acaricide; morphology

Introduction

The species *Rhipicephalus sanguineus* s. l. mainly afflicts dogs, but it can also parasitize other domestic animals and even humans (Gray et al. 2013). This species has great medical and veterinary importance since it is a vector of various pathogens (*Rickettsia rickettsii*, *R. conorii*, *Ehrlichia canis*, and *Babesia vogeli*) that cause diseases in dogs and humans, posing severe risks to animal welfare and public health (Dantas-Torres et al. 2018).

Various studies have been published aiming to find safer and more effective methods to control this hematophage (Camargo-Mathias 2018) rather than the use of synthetic chemical acaricides, as is the standard practice today. These substances provoke morphological alterations in diverse tissues of these ticks. Among them are fipronil (reproductive systems and salivary glands) (Oliveira, Bechara, and Camargo-Mathias 2007; Oliveira et al. 2009; Pereira et al. 2009, 2011); permethrin (synganglion, salivary glands, and reproductive system) (Nodari et al. 2011, 2012; Roma et al. 2014, 2013, 2011); fluzuron (integument and gut) (Oliveira et al. 2013, 2012, 2014); dinotefuran (female reproductive system) (Oliveira et al. 2017, 2016); and deltamethrin (synganglion and female reproductive system) (Camargo-Mathias et al. 2017; Pereira et al. 2017). However, the indiscriminate application of these chemicals

has important drawbacks, such as selection of resistant tick strains, toxicity to non-target animals and environmental contamination due to buildup of residues (Camargo-Mathias 2013, 2018). Consequently, new substances that are efficient to control ticks while provoking less harm to animal health and the environment need to be evaluated (Camargo-Mathias 2013, 2018; Otranto and Wall 2008; Roma et al. 2015).

In this respect, ozone has been shown to be a promising alternative for the control of various pests. Recent studies have shown its efficacy against agricultural and food pests such as *Rhyzopertha dominica* in wheat (Subramanyam et al. 2017), *Alphitobius diaperinus* in poultry (Soares et al. 2018), and *Ephesia kuehniella* in commercial flours and grains (Moraglio et al. 2018). Besides this, it has been reported to be an oxidizing agent with potential antimicrobial actions against *Streptococcus mutans* and *Enterococcus faecalis* (Moreira Fonseca et al. 2015; Nagayoshi et al. 2004), as well as acting as a disinfectant (Lopes et al. 2015), sterilizer (Sousa et al. 2011) and wound healer (Menéndez, Falcón, and Maqueira 2011; Peña Sisto et al. 2015; Sechi et al. 2001). Its properties have been investigated in the food industry (Guzel-Seydim, Greene, and Seydim 2004), for disinfection of hospital

rooms (Marson et al. 2016; Sousa et al. 2011), treatment of water (Majewski 2012; Passos et al. 2014), and in therapeutic procedures in animals and humans (H. H. De Menéndez, Falcón, and Maqueira 2011; Oliveira et al. 2014).

Ozone gas (O_3) is obtained by breaking the bonds of dioxygen molecules (O_2) due to the action of ultraviolet radiation or high-voltage electrical discharges. The separated atoms recombine with other dioxygen molecules (O_2) forming new molecules with three atoms (O_3). Because it is formed only of oxygen atoms, so that oxygen is its only residue, ozone gas does not pose a risk of environmental contamination or to public health (Moreira et al. 2017).

Based on the properties described of this gas, we hypothesized that it might be able to act as an acaricidal agent for control of *R. sanguineus* s. l., since some studies have reported its potential to cause alterations of the integument surface and spiracular (respiratory) plate of ticks of this species (Moreira et al. 2017). However, little is known about the morphophysiological alterations in the integument and its cells, as well as the action mechanisms involved in these alterations.

The integument of ticks is a vital organ that covers the entire body, functioning as a physical barrier against external agents (Camargo-Mathias 2018). Besides this, it is responsible for regulating the water balance and expansion of the body (in females) during the blood meal, enabling the production of eggs and the reproductive success of ticks (Sonenshine and Roe 2014). The integument is basically composed of an epidermal layer, formed by epithelial cells that secrete the acellular cuticle, which composes the exoskeleton. In turn, the cuticle is divided into an epicuticle and procuticle. These layers change according to the feeding periods, mainly in the female, when they expand to hold the ovary that will develop (Remedio, Nunes, and Camargo-Mathias 2015).

Since the integument is the organ that first comes into contact with topically applied acaricidal agents (Remedio, Nunes, and Camargo-Mathias 2015), the aim of this study was to investigate the morphological changes in the organ in semi-engorged females of *R. sanguineus* s. l. exposed to ozonated water *in vivo* for 5 min and analyzed after the periods of 24, 48, and 72 h, by using histological and light microscopic techniques.

Material and methods

All the experimental procedures were approved by the Committee on Ethical Use of Animals (CEUA) of the São Paulo State University (UNESP), Biosciences

Institute, Campus Rio Claro, under protocol 26/2018 no. 3997.

Ticks

Adult female brown dog ticks *R. sanguineus* s. l. (tropical lineage) were obtained from a colony previously established and maintained in a BOD incubator under controlled conditions (29°C, 80% relative humidity and 12-h photoperiod) in a room of the Bioterium of the Biology Department of UNESP, Rio Claro, SP, Brazil. The hosts were rabbits of the Botucatu Genetic Group, obtained from the Central Bioterium of UNESP, Botucatu, SP, Brazil. They were kept in cages in the Bioterium of the Biology Department of UNESP, Rio Claro, with feed and water *ad libitum*.

The rabbits were infested with the ticks according to the method suggested by Bechara et al. (1995), whereby the backs of the host rabbits were trichotomized to affix a chamber with nontoxic gelatin glue (water, unflavored gelatin, glycerin, zinc oxide). Each chamber contained 25 tick pairs (to enable the males to copulate with the females as soon as the latter became engorged). The semi-engorged females were obtained after feeding for 4 days. The females were then removed from the hosts with surgical tweezers by gripping the hypostome and were sent to the laboratory for the *in vivo* bioassay.

In vivo exposure of *R. sanguineus* s. l. females to ozone

Different concentrations of ozonated water were obtained from a BRO3-Plus 1 ozone generator, with the production of 5.6 g/h of ozone, and an AirSep PSA Intensity oxygen generator with the flow of 2 L/minute, installed in a tank with 40 L of tap water. The concentrations were confirmed by a digital sensor attached to the tank containing the ozonated water. That procedure was carried out in the Laboratory of the Brasil Ozônio Company, located on the campus of the University of São Paulo (USP), in Butantã, SP, Brazil, a collaborator with this study, under the supervision of the engineer Robson de Almeida Faria.

For the bioassays, the female ticks were allocated into five groups: Control (CG), where the ticks were only exposed to distilled water, and G1-G4, where they were exposed to ozonated water with different ozone concentrations, according to the suggested pattern by Van Leeuwen (2015), as follows:

- CG: control, exposed only to distilled water;
- G1: exposed to 0.75 mg/L;
- G2: exposed to 1.5 mg/L;

G3: exposed to 2.25 mg/L; and

G4: exposed to 3 mg/L.

The ticks (5 individuals/group) were immersed in glass recipients filled with ozonated water at the respective concentrations for 5 min according to the protocol proposed by Drummond et al. (1973). Then, the ticks were dried on absorbent paper and placed in Petri dishes covered with PVC film. The dishes were labeled and placed in a BOD incubator under controlled conditions (29°C, 80% relative humidity and 12-h photoperiod), during 24, 48, or 72 h. After removal from the incubator, the ticks were evaluated regarding the morphology of the integument by light microscopy.

Histological processing of the integument of females of *R. sanguineus* s. l.

After incubation time to the different concentrations of ozonated water for the selected periods, the females were anesthetized by thermal shock in a refrigerator (2 °C ± 2) and then dissected in an HBSS buffer solution with Mg²⁺ and Ca²⁺ (NaCl 8 g; Na₂HPO₄ 48 mg; KCl 400 mg; KH₂PO₄ 60 mg; CaCl₂ 140 mg; MgSO₄ 98 mg; D-glucose 1.6 g; penicillin G 100 U/mL; streptomycin 100 µg/mL; distilled water 1 L) over ice, where they had the central region of the dorsal alloscutum removed. Then, the material was placed in microtubes containing 100 µL of HBSS, which were sent to the Histology Laboratory of the Biology Department of UNESP, Rio Claro Campus.

Morphological analysis

a) Light microscopy

After collected, the integument was immediately fixed in 4% paraformaldehyde for 48 h in 1.5 mL plastic microtubes. Then, it was washed three times in sodium phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4) and dehydrated in a rising ethyl alcohol series of 70%, 80%, 90%, and 95% (immersed for 30 min in each). Next, the material was embedded in LEICA resin for 1 week, placed in plastic molds containing resin plus hardener and put in an oven at 37 °C until the blocks hardened, after which sections were sliced with a thickness of 3 µm. These sections were mounted on glass slides (six sections/slide) and stored in an oven.

For staining, the slides were hydrated in distilled water for 1 min and then immersed in hematoxylin for 7 min and washed for 4 min in running water. Next, they were stained with aqueous eosin for 5 min and again washed in running water, and allowed to dry at room temperature.

Finally, they were dipped quickly in xylol and covered with Entellan and a previously cleaned glass coverslip for analysis and photodocumentation with a Leica DM750 bright-field photomicroscope, in the Biology Department of UNESP, Rio Claro Campus.

Results

The morphology of the integument of semi-engorged females of *R. sanguineus* s. l. was previously described by Remedio, Nunes, and Camargo-Mathias (2015), so in this work, those in their control group were used as a reference to demonstrate the morphological alterations due to exposure to ozonated water at the different concentrations proposed here (Table 1).

Control

The histological techniques applied to analyze the integument of the semi-engorged females of the control group (exposed only to distilled water), for incubation times of 24, 48, and 72 h, did not show morphological alterations, a result corroborating others available in the literature, namely the presence of a cuticle strongly stained by eosin, a thin subcuticle layer (between the cuticle and epithelium) strongly stained by hematoxylin, and a cuticular epithelium organized in a single layer, with cubic cells, rounded nuclei, and visible nucleoli (Figure 1a,f, k, and Figure 2a).

Group exposed to 0.75 mg/L (G1)

The females exposed to 0.75 mg/L for 5 min and analyzed after 24 h did not present alterations in relation to the control group after this same period (Figure 1a), i.e., the cuticle was unchanged, where it was possible to observe glandular ducts, responsible for releasing the secretion produced by the dermal glands (Figure 1b). The epithelium continued having a single layer, but its cells were flattened and became squamous (Figure 1b). The nuclei were unchanged, with visible nucleoli (Figure 1b).

After 48 h of incubation, some alterations were observed in relation to the control group. The subcuticle layer was more strongly stained by hematoxylin and the epithelial cells, originally cubic, became squamous, but also were significantly flattened, as were their nuclei (Figure 1g).

Finally, after 72 h of incubation, this concentration also caused a change in epithelial cells, this time becoming cylindrical (greater height than width),

Table 1. Alterations in the integument of *R. sanguineus* s. l. females exposed to ozonated water.

	Integument														
	Control			Ozonated water (mg/L)											
	24h	48h	72h	0,75mg/L O ₃			1,5mg/L O ₃			2,25mg/L O ₃			3mg/L O ₃		
<i>Cuticle</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Subcuticle</i>	3	3	3	3	3	4	3	3	4	4	4	3	4	4	4
<i>Epithelium</i>	5	5	5	6	6	7	7	7	7	7	6	7	8	7	7
<i>Cytoplasm</i>	9	9	9	9	9	9	10	9	10	10	10	10	10	10	10
<i>Nucleus</i>	11	11	11	11	12	11	11	11	11	11	13	13	11	13	13
<i>Nucleoli</i>	14	14	14	14	15	15	14	14	15	15	15	14	15	14	15

Cuticle: integrate=1, irregular= 2;

Subcuticle: strait= 3, thickened= 4;

Epithelium: cubic= 5, squamous= 6, cylindrical= 7, stratified= 8;

Cytoplasm: integrate= 9; vacuolated= 10;

Nucleus: rounded=11, flattened = 12, pyknotic = 13;

Nucleoli: present= 14, absent= 15.

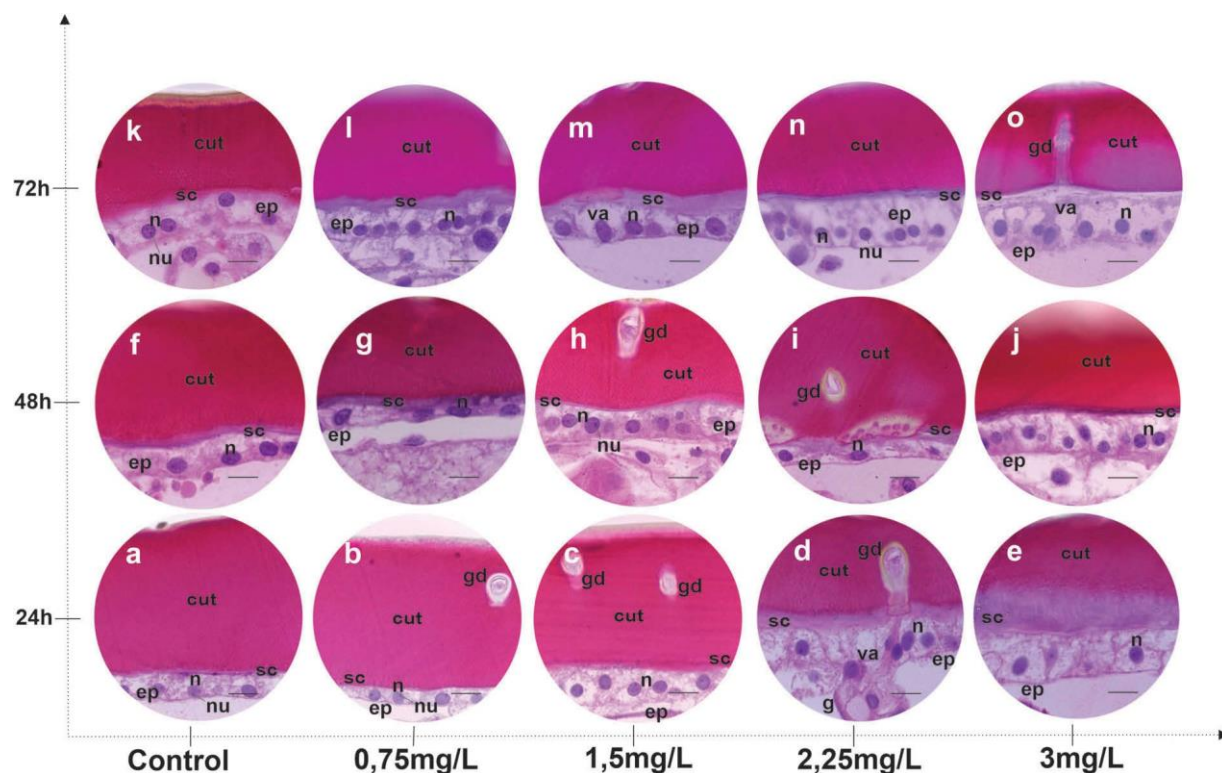


Figure 1. Histological sections of the integument of *R. sanguineus* s. l. females' ticks 24 (a–e), 48 (f–j) and 72 h (k–o) after exposure to distilled water (a, f and k) and ozonated water concentrations: 0.75 mg/L (b, g, and l); 1.5 mg/L (c, h, and m); 2.25 mg/L (d, i and n) and 3mg/L (e, j, and o), stained by HE. cut = cuticle; sc = subcuticle; ep = epithelium; gd = duct of dermal gland; g = dermal gland; n = nucleus; nu = nucleoli; va = vacuolization.

assuming the morphology typical of cells in the process of synthesis and secretion (Figure 1l).

Group exposed to 1.5 mg/L (G2)

The females exposed to 1.5 mg/L for 5 min and analyzed after 24, 48, and 72 h (Figure 1c,h,m) did not present alterations of the integument in comparison with Group 1 after 72 h (Figure 1l), i.e., the epithelial

cells continued to be cylindrical, and even after 24 and 72 h they contained more intensely vacuolated cytoplasm (Figure 1c,m) compared to the control groups at these incubation intervals (Figure 1a, k).

Group exposed to 2.25 mg/L (G3)

The females exposed to 2.25 mg/L for 5 min and analyzed after the times of 24 (Figure 1d) and 72 h (Figure 1n)

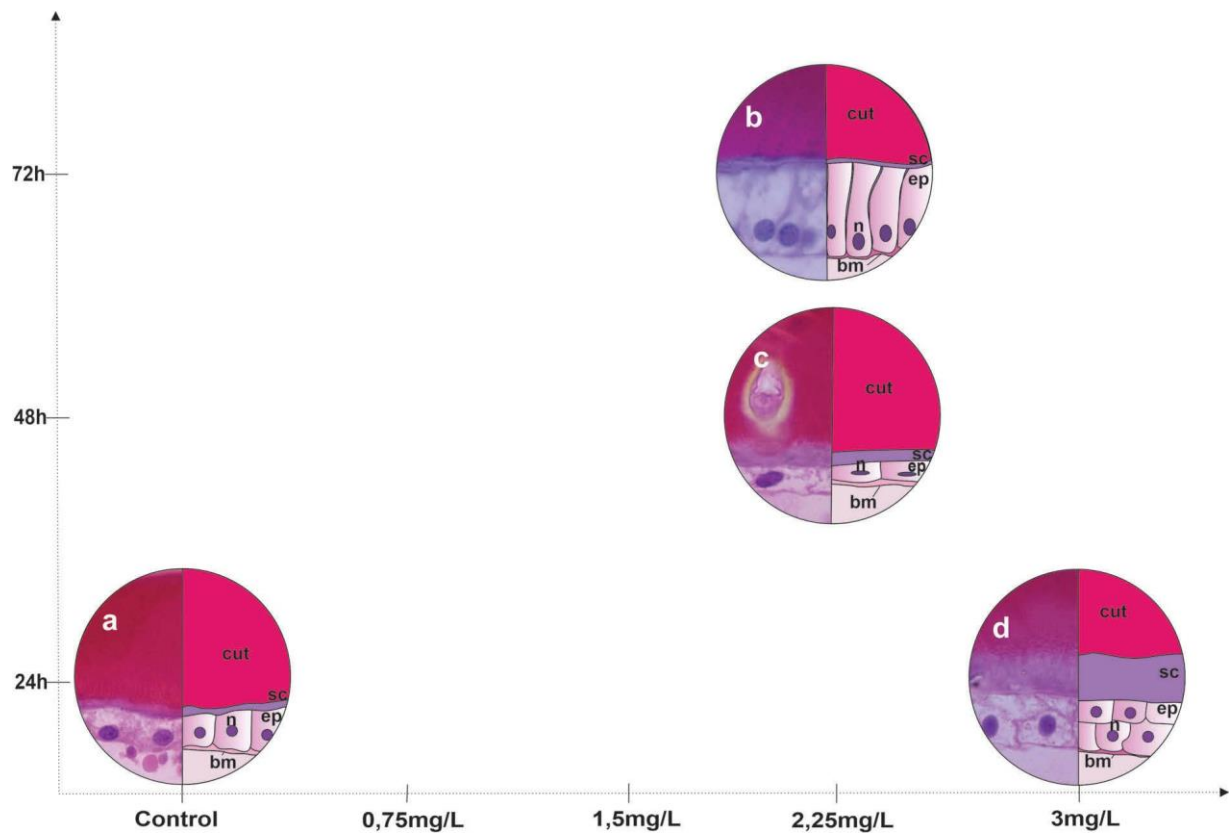


Figure 2. Histological sections/schematics of the integument of *R. sanguineus* s. l. females' ticks exposed to ozonated water showing the main changes that certain concentrations/incubation time have caused. a) control (epithelium simple cubic); b) exposure toozone water at 2.25 mg/L after the incubation time of 72 h (cylindrical simple epithelium); c) exposure to ozonated water at 2.25 mg/L after the incubation time of 48 h (simple squamous epithelium); d) water exposure ozonated at 3mg/L after the incubation time of 24 h (cubic stratified epithelium).HE staining. cut = cuticle; sc = subcuticle; ep = epithelium; n = nucleus; bm = basement membrane.

continued to present epithelial cells with cylindrical morphology (Figure 2b) and intensely vacuolated cytoplasm. After 72 h, in many of these cells the vacuolation was stronger around the nucleus (Figure 1n). Furthermore, after 24 h, the subcuticle layer was thicker, unlike after 72 h, when it was thinner (Figure 1d,n).

After 48 h of incubation, the epithelial cells were totally altered, both in shape and contents (Figure 2c). The epithelium as a whole was flattened, the cell boundaries could no longer be observed, as was often the case of the nuclei as well, with loss of integrity, pyknosis, and extremely reduced size, immersed in a highly vacuolated cytoplasm (Figure 1i). The subcuticle layer was thicker and more intensely stained by hematoxylin (Figure 1i).

Group exposed to 3 mg/L of ozone (G4)

The integument of the females exposed to 3 mg/L ozonized water for 5 min underwent various morphological alterations at all the time intervals evaluated. After 24 h, the epithelium became stratified (several

cell layers) (Figure 2d), a situation that typically occurs when the levels of toxicity are high (Figure 1e). The subcuticle layer became weakly stained by hematoxylin, and the cuticle, thinner, was intensely stained by eosin (Figure 1e).

After 48 h, the subcuticle layer was thinner and the epithelial cells were still cylindrical and vacuolated. Their nuclei were irregular, smaller and pyknotic (Figure 1j).

After 72 h, the disorganization of the epithelium was more pronounced, since there were no observable boundaries between the cells due to the large and intense vacuolation. The irregular nuclei were totally pyknotic, indicating that these cells were in the death process, caused by the high intoxication suffered(Figure 1o).

Discussion

The species *Rhipicephalus sanguineus* s. l., popularly known as the brown dog tick since the dogs are the

main host, has great economic and sanitary importance, since it acts as a vector of pathogens that cause various diseases, not only in domestic animals, but also in humans (Dantas-Torres and Otranto 2015; Labruna et al. 2007).

Due to the harm done by this species to its hosts, the search for control methods has intensified. At present, this control is mainly accomplished by the topical application of synthetic acaricides. While these are efficient, they have serious drawbacks, such as selection for resistant tick strains and generation of chemical residues in the environment that are toxic to non-target organisms, including the hosts themselves (Freitas, Pohl, and Vaz Junior 2005).

In light of this scenario, there is a need to find alternatives for control that are both efficient and more ecologically sustainable, by not causing damages to non-target organisms and harmful accumulation in the environment. Among these alternatives, the use of ozone has been gaining focus as a “clean” option, as demonstrated by studies related to the control of agricultural and food pests (Moraglio et al. 2018; Remondino and Valdenassi 2018; Rozado et al. 2008; Soares et al. 2018; Subramanyam et al. 2017), as well as the more recent discovery of acaricidal potential (Oliveira et al. 2014; Figueiredo et al. 2018; Moreira et al. 2017). Furthermore, from the perspective of environmental contamination and public health risk, the ozone molecule is innocuous because its only residue is oxygen. A final advantage is that ozone is less expensive than the chemical products currently used (Bataklijev et al. 2014; Moreira et al. 2017).

Ticks, like all Arthropoda, have a chitinous exoskeleton, or integument, which is an organ of fundamental importance, responsible for external covering and mechanical support of these animals. As such, the integument acts as a physical barrier that protects the interior against damage from environmental changes (Camargo-Mathias 2018). Another important function is to regulate the water balance, besides enabling expansion of the body, which in female ticks occurs after a blood meal and subsequent development of the ovaries, thus assuring their reproductive success (Sonenshine and Roe 2014).

The histological analysis of the integument of *R. sanguineus* females was first described for Remedio and colleagues, revealing its organization in cellular and acellular layers that change according to the feeding state (fasting, semi-engorged, and engorged). Among the layers is the epidermis, formed by a simple epithelium with cubic cells, responsible for the secretion of the cuticular components that form the acellular layers (Remedio, Nunes, and Camargo-Mathias 2015).

When topical acaricides are used to control ticks, the integument is the organ that first comes into contact with these agents. Therefore, we investigated the effects of ozonated water in different concentrations (0.75, 1.5, 2.25, and 3 mg/L) exposed for 5 min and with different incubation times (24, 48, and 72 h) on the morphological features of this organ of semi-engorged female brown dog ticks as a possible control alternative.

The results obtained in comparison to the control group clearly showed that the cuticle (acellular layer) of the females in the exposed groups, at all incubation times and concentrations of ozonated water, remained integral, unlike what occurred with the subcuticle layer, which underwent intense alterations. Among the most relevant of these changes were the thickening and variation of positive staining by hematoxylin, which depending on the bioassay considered was strong (2.25 mg/L after 48 h) or weak (3 mg/L after 24 h). These observations suggest that the alterations that occurred specifically in this layer resulted from the toxic interference of the ozonated water, which penetrated the cuticle and acted in the epithelium, altering its physiology, and consequently its cycle of secretion and deposition of the cuticular elements. Besides this interference in the secretory cycle, noted by the variation of staining by hematoxylin, it can be inferred that the substances secreted by these cells to compose the cuticle were also modified (probably in their quantity and composition) by exposure to ozonated water. These alterations clearly suggest that the ozonated water was able to overcome the physical barrier of the integument and reach the inner layers (sub-cuticle and epithelial layer).

The data obtained here are in line with the findings of Remedio et al. (2014), who reported the occurrence of alterations in the subcuticle layer of the integument of *R. sanguineus* females exposed to neem oil (*Azadirachta indica* A. Juss), demonstrating the toxicity of this natural acaricide. They also are similar to the findings of Oliveira et al. (2013), who demonstrated that the arthropod growth inhibitor fluazuron, present in commercial acaricide formulations, inhibited the synthesis and deposition of substances that compose the cuticle of *R. sanguineus* nymphs. According to these authors, the presence of the toxic product caused abnormal deposition of the layers of the integument due to alterations in the secretion rate of polysaccharides, which interfered in the elasticity and impermeability of the cuticle, impairing the processes of ecdysis, feeding, and reproduction (Oliveira et al. 2013).

The synthesis and maintenance of the acellular layers of the integument of Arthropoda basically depends on

the performance of the cells of the epithelial layer. Therefore, were conducted direct analyses of the morphophysiology of these cells in the females exposed to ozonated water, since the previous results showed that although this treatment did not cause changes in the external (cuticular) layers of the integument, it did enable overcoming the cuticular barrier and reaching the interior cells, which are responsible for synthesis and secretion of the components in question. The results showed that exposure to ozonated water provoked the phenomenon of metaplasia, i.e., changes of the epithelium's morphology, which presented cells and cell layers (depending on the exposure times and concentrations considered) with shapes and arrangements that were different than those commonly observed in the group, normally composed of cubic cells distributed in a single layer, thus characterizing a single epithelium (Junqueira and Carneiro 2017; Remedio et al. 2014).

The epithelial layer of the integument of the females exposed to ozonated water underwent important alterations related to metaplasia at certain incubation times and concentrations, namely that the cells changed from cubic to cylindrical (0.75 mg/L after 72 h; 1.5 mg/L at all incubation times; 2.25 mg/L after 24 and 72 h; 3 mg/L after 48 and 72 h). This suggests that not only the morphology changed, but the physiology as well, because the presence of an epithelium with cylindrical cells (greater height than width) is a morphological characteristic of cells that are in the process of synthesis and secretion of components. This probably happened due to the toxicity of the ozonated water, which was able to stimulate the cells to secrete cuticular components faster and in greater quantity in an attempt to reinforce the cuticular layers and minimize the damages caused by the entry of the toxic substance inside the organism. This same type of alteration of the epithelium (change of cells from cubic to cylindrical) was observed by Lima de Souza et al. (2017) in the integument of *R. sanguineus* females exposed to neem oil (*Azadirachta indica* A. Juss), a natural acaricide.

The metaplasia observed here resulting from exposure to ozonated water was very intense at the concentration of 3 mg/L after 24 h of incubation. In this case, the morphological change was more radical, because the epithelium became stratified (several layers) instead of one cell layer, which can be interpreted as another strategy to preserve the organism against the action of the toxic product (at the highest concentration tested). A larger number of layers certainly enhances the physical barrier, impairing the entry of the toxic product. These findings corroborate those of Camargo-Mathias (2018), who studied females of the same species

submitted to the action of the combined compounds dinotefuran, permethrin, and pyriproxyfen (Vectra 3D).

However, the most damaging effect of exposure to ozonated water was observed at the concentrations of 0.75 mg/L after 24 and 48 h of incubation, and 2.25 mg/L after 48 h, since the originally simple cubic epithelium became simple squamous, i.e., composed of greatly flattened cells and nuclei (the latter also pyknotic), with hard-to-distinguish cell boundaries. According to Junqueira and Carneiro (2017), the change in the epithelium's morphology also alters its physiology, which ceases being able to secrete the substances that form the cuticle, and can even lead to cell death based on the nuclear characteristics described. It is known that the occurrence of these nuclear alterations (characteristic of cell death) in cells of the epithelial layer of the integument can compromise the synthesis and secretion of the cuticular components, and hence leave the tick more vulnerable to changes in the external environment. Besides this, a weakened integument would probably cause harm to the main biological processes of the ectoparasite, namely its ability to remain attached to the host, feeding, and reproduction.

Among the changes that were observed in the epithelial layer of the integument due to exposure to ozonated water, besides those observed in the cell nuclei, were alterations of their cytoplasm, with intense vacuolation. According to the available literature, the presence of vacuoles in the cytoplasm of cells of organisms exposed to stress agents is a sign of activation of the defense mechanism, whereby the cells start to isolate organelles that have lost their function and/or damaged portions of the cytoplasm in vacuoles, which are subsequently digested by lysosomal enzymes. This strategy allows cells to preserve their internal system, and thus the efficiency of their metabolism (Alberts 2010). Other studies, by Remedio et al. (2014) and Lima de Souza et al. (2017), involving exposure of this same tick species to natural acaricides, have reported the appearance of cytoplasmic vacuoles, representing a form of physiological preservation.

Therefore, the results of this study clearly reveal that exposure of females of the brown dog tick, *R. sanguineus* s. l., to ozonated water caused morphophysiological alterations of the integument, mainly in the epithelial layer, responsible for synthesis and secretion of the cuticular substances of these ectoparasites, indicating that ozone gas can be used for control of ticks.

More specifically, the data presented here allow concluding that the exposure to ozonated water at the

concentration of 2.25 mg/L for 5 min and in the interval of 48 h of incubation provoked the greatest damage to the integument of the semi-engorged female ticks, based on the alterations that occurred with more intensity, including:

- (1) thickening of the subcuticle;
- (2) change in morphology of the epithelium, which became simple squamous instead of simple cubic, going through the stratified stage;
- (3) cytoplasmic vacuolation;
- (4) presence of pyknotic nuclei in the epithelial cells (characteristic of death); and
- (5) loss of boundaries between the epithelial cells.

As a set, these alterations suggest that the ozonated water at this concentration was toxic to the point of causing death of epithelial cells and consequently compromise the physiological function of the epithelium, in turn causing irreversible damage to the integument. This certainly not only increased the ticks' vulnerability to outside agents, but also significantly impaired their processes of attachment, feeding, and reproduction.

Acknowledgments

The authors are grateful to FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), grant no. 2018/02999-9, CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) and EMBRAPPII (Empresa Brasileira de Pesquisa e Inovação Industrial) installed at ESALQ/USP, Piracicaba, Brazil, for the financial support.

Funding

This work was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo [2018/02999-9] and by EMBRAPPII ESALQ unit.

Declaration of Interest Statement

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Alberts, B. 2010. "Bruce Alberts - Molecular Cell Biology, 5^a Edition (Artmed).pdf."
- Bataklijev, T., V. Georgiev, M. Anachkov, S. Rakovsky, and S. Rakovsky. 2014. "Ozone Decomposition." *Interdisciplinary Toxicology* 7(2). doi:10.2478/intox-2014-0008.
- Bechara, G. H., M. P. J. Szabó, B. R. Ferreira, and M. V. Garcia. 1995. "Rhipicephalus Sanguineus Tick in Brazil: Feeding and Reproductive Aspects under Laboratorial Conditions." *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology* 4 (2):61–66.
- Camargo-Mathias, M. I. 2013. *Guia Básico De Morfologia Interna De Carrapatos Ixodídeos*. São Paulo: Editora Unesp.
- Camargo-Mathias, M. I. 2018. *Inside the Ticks. Morphophysiology, Toxicology and Therapeutic Perspectives*. São Paulo: Editora Unesp.
- Camargo-Mathias, M. I., N. R. C. Pereira, C. S. Reis, C. R. de Almeida, D. R. S. Mendes, G. B. Araújo, L. Postali, T. Figueroa, A. R. F. Ferreira, J. P. Santos, et al. 2017. "Deltamethrin as Inductor Agent of Precocious Ovarian Degeneration in *Rhipicephalus Sanguineus* SI (Acari: Ixodidae) Ticks." *Experimental and Applied Acarology* 72 (2):161–69. doi:10.1007/s10493-017-0144-8.
- Dantas-Torres, F., M. S. Latrofa, R. A. N. Ramos, R. P. Lia, G. Capelli, A. Parisi, D. Porretta, S. Urbanelli, and D. Otranto. 2018. "Biological Compatibility between Two Temperate Lineages of Brown Dog Ticks, *Rhipicephalus Sanguineus* (Sensu Lato)." *Parasites and Vectors* 11 (1):1–10. doi:10.1186/s13071-018-2941-2.
- Dantas-Torres, F., and D. Otranto. 2015. "Further Thoughts on the Taxonomy and Vector Role of *Rhipicephalus Sanguineus* Group Ticks." *Veterinary Parasitology* 208 (1–2):9–13. doi:10.1016/j.vetpar.2014.12.014.
- Drummond, R. E. A., S. E. Ernst, J. L. Trevino, W. J. Gladney, and O. H. Graham. 1973. "Boophilus Annulatus and B. Microplus: Laboratory Tests of Insecticides." *Journal of Economic Entomology* 66 (1):130–33. doi:10.1093/jee/66.1.130.
- Figueiredo, T. F. B., C. J. Lima, A. B. Fernandes, R. A. Zângaro, A. L. D. S. Mendes, and L. H. Moreira. 2018. "Effect of Ozone on Engorged *Rhipicephalus Microplus* (Acari : Ixodidae) Females during the Pre-Laying Period Effect of Ozone on Engorged *Rhipicephalus Microplus* (Acari: Ixodidae) Females during the Pre-Laying Period." *Ozone: Science & Engineering* 1–8. doi:10.1080/01919512.2018.1533807.
- Freitas, D. R. J., P. C. Pohl, and I. S. Vaz Junior. 2005. "Caracterização Da Resistência Para Acaricidas No Carrapato *Boophilus Microplus*." *Acta Scientiae Veterinariae* 33 (December 2004):109–17. doi:10.22456/1679-9216.14778.
- Gray, J., F. Dantas-Torres, A. Estrada-Peña, and M. Levin. 2013. "Systematics and Ecology of the Brown Dog Tick, *Rhipicephalus Sanguineus*." *Ticks and Tick-borne Diseases*. doi:10.1016/j.ttbdis.2012.12.003.
- Guzel-Seydim, Z. B., A. K. Greene, and A. C. Seydim. 2004. "Use of Ozone in the Food Industry." *LWT - Food Science and Technology* 37 (4):453–60. doi:10.1016/j.lwt.2003.10.014.
- Junqueira, L. C., and J. Carneiro. 2017. *Histologia Básica - Texto e Atlas 13ªed*. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan.
- Labruna, M. B., M. C. Horta, D. M. Aguiar, G. T. Cavalcante, A. Pinter, S. M. Gennari, and L. M. A. Camargo. 2007. "Prevalence of Rickettsia Infection in Dogs from the Urban and Rural Areas of Monte Negro Municipality, Western Amazon, Brazil." *Vector-borne and Zoonotic Diseases* 7 (2):249–55. doi:10.1089/vbz.2006.0621.
- Lima de Souza, J. R., R. N. Remedio, A. Arnosti, R. M. M. Abreu, and M. I. Camargo-Mathias. 2017. "The Effects of Neem Oil (*Azadirachta Indica* A. JUSS) Enriched

- with Different Concentrations of Azadirachtin on the Integument of Semi-engorged *Rhipicephalus Sanguineus* Sensu Lato (Acari: Ixodidae) Females." *Microscopy Research and Technique* 80 (8):838–44. doi:[10.1002/jemt.22871](https://doi.org/10.1002/jemt.22871).
- Lopes, M. S., J. R. F. Ferreira, K. B. da Silva, I. O. B. Simplício, C. J. de Lima, and A. B. Fernandes. 2015. "Disinfection of Corrugated Tubing by Ozone Andultrasound in Mechanically Ventilated Tracheostomized Patients." *Journal of Hospital Infection* 90 (4):304–09. doi:[10.1016/j.jhin.2015.03.004](https://doi.org/10.1016/j.jhin.2015.03.004).
- Majewski, J. 2012. "Methods for Measuring Ozone Concentration in Ozone-Treated Water." *Przegląd Elektrotechniczny (Electrical Review)* 88 (9):253–55.
- Marson, R. F., L. H. M. Silva Melo, R. A. Zângaro, C. J. Lima, and A. B. Fernandes. 2016. "Use of Ozonated Water for Disinfecting Gastrointestinal Endoscopes." *Ozone: Science and Engineering* 38 (5):346–51. doi:[10.1080/01919512.2016.1192455](https://doi.org/10.1080/01919512.2016.1192455).
- Menéndez, S., L. Falcón, and Y. Maqueira. 2011. "Therapeutic Efficacy of Topical OLEOZON® in Patients Suffering from Onychomycosis." *Mycoses* 54 (5):272–77. doi:[10.1111/j.1439-0507.2010.01898.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2010.01898.x).
- Moraglio, S. T., L. Bosco, C. Pogolotti, and L. Tavella. 2018. "Effect of Ozone Gas against Life Stages of *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) in Laboratory and a Storehouse." *Journal of Stored Products Research*. doi:[10.1016/j.jspr.2018.10.006](https://doi.org/10.1016/j.jspr.2018.10.006).
- Moreira Fonseca, P. M., L. S. Feitosa, A. B. Fernandes, R. A. Zangaro, W. Miyakawa, and C. J. Lima. 2015. "Disinfection of Dental Instruments Contaminated with *Streptococcus Mutans* Using Ozonated Water Alone or Combined with Ultrasound." *Ozone: Science and Engineering* 37 (1):85–89. doi:[10.1080/01919512.2014.904740](https://doi.org/10.1080/01919512.2014.904740).
- Moreira, L. H., T. F. B. Figueiredo, L. P. Alves, A. B. Fernandes, R. A. Zângaro, A. L. S. Mendes, F. N. Gaudêncio, and C. J. Lima. 2017. "Effect of Ozone as Acaricide: Action of the Ozone on the Cuticle and Respiratory Spiracle of Tick *Rhipicephalus Sanguineus* Sensu Lato." *Ozone: Science & Engineering* 1–8. doi:[10.1080/01919512.2017.1403306](https://doi.org/10.1080/01919512.2017.1403306).
- Nagayoshi, M., C. Kitamura, T. Fukuizumi, T. Nishihara, and M. Terashita. 2004. "Antimicrobial Effect of Ozonated Water on Bacteria Invading Dentinal Tubules." *Journal of Endodontia* 30 (11):778–81. doi:[10.1097/00004770-200411000-00007](https://doi.org/10.1097/00004770-200411000-00007).
- Nodari, E. F., G. C. Roma, K. C. S. Furquim, G. H. Bechara, and M. I. Camargo- Mathias. 2011. "Cytotoxic Effects of Permethrin in Salivary Glands of *Rhipicephalus Sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) Semi-Engorged Females." *Experimental Parasitology* 128 (2):151–58. doi:[10.1016/j.exppara.2011.02.003](https://doi.org/10.1016/j.exppara.2011.02.003).
- Nodari, E. F., G. C. Roma, K. C. S. Furquim, P. R. Oliveira, G. H. Bechara, and M. I. Camargo-Mathias. 2012. "Degenerative Process and Cell Death in Salivary Glands of *Rhipicephalus Sanguineus* (Latreille, 1806)(Acari: Ixodidae) Semi-engorged Female Exposed to the Acaricide Permethrin." *Microscopy Research and Technique* 75 (8):1012–18. doi:[10.1002/jemt.22025](https://doi.org/10.1002/jemt.22025).
- Oliveira, H. H., C. J. Lima, A. B. Fernandes, R. A. Zangaro, and L. H. Moreira. 2014. "Uso De Óleo Ozonizado No Tratamento Tópico De Infestação Por Carrapato Em Cão - Relato De Caso." *Revista Brasileira De Medicina Veterinaria* 36 (4):405–08.
- Oliveira, P. R., L. A. Anholeto, G. H. Bechara, and M. I. Camargo-Mathias. 2017. "Dinotefuran-Induced Morphophysiological Changes in Semi-Engorged Females *Rhipicephalus Sanguineus* Latreille, 1806 (Acari: Ixodidae) Ticks: Ultra-Structural Evaluation." *Acta Tropica* 166:139–54. doi:[10.1016/j.actatropica.2016.11.017](https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.11.017).
- Oliveira, P. R., G. H. Bechara, and M. I. Camargo-Mathias. 2007. "*Amblyomma Triste* (Koch, 1844) (Acari: Ixodidae). Ovaries: An Ultrastructural Analysis." *Experimental Parasitology* 116 (4):407–13. doi:[10.1016/j.exppara.2007.02.006](https://doi.org/10.1016/j.exppara.2007.02.006).
- Oliveira, P. R., G. H. Bechara, M. A. M. Morales, and M. I. Camargo-Mathias. 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):1255–64. doi:[10.1016/j.fct.2009.02.019](https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.02.019).
- Oliveira, P. R., I. B. Calligaris, G. C. Roma, G. H. Bechara, and M. I. Camargo-Mathias. 2013. "Fluazuron-Induced Morphophysiological Changes in the Cuticle Formation and Midgut of *Rhipicephalus Sanguineus* Latreille, 1806 (Acari: Ixodidae) Nymphs." *Parasitology Research* 112 (1):45–58. doi:[10.1007/s00436-012-3103-7](https://doi.org/10.1007/s00436-012-3103-7).
- Oliveira, P. R., I. B. Calligaris, G. C. Roma, G. H. Bechara, M. A. Pizano, and M. I. Camargo-Mathias. 2012. "Potential of the Insect Growth Regulator, Fluazuron, in the Control of *Rhipicephalus Sanguineus* Nymphs (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): Determination of the LD95 and LD50." *Experimental Parasitology* 131 (1):35–39. doi:[10.1016/j.exppara.2012.02.023](https://doi.org/10.1016/j.exppara.2012.02.023).
- Oliveira, P. R., R. N. Remédio, G. H. Bechara, L. A. Anholeto, and M. I. Camargo-Mathias. 2016. "Dinotefuran-induced Morphophysiological Changes in the Ovaries and Midgut of Semi-engorged Females *Rhipicephalus Sanguineus* Latreille, 1806 (Acari: Ixodidae) Ticks." *Parasitology Research* 115 (2):829–49. doi:[10.1007/s00436-015-4814-3](https://doi.org/10.1007/s00436-015-4814-3).
- Otranto, D., and R. Wall. 2008. "New Strategies for the Control of Arthropod Vectors of Disease in Dogs and Cats." *Medical and Veterinary Entomology* 22 (4):291–302. doi:[10.1111/j.1365-2915.2008.00741.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2008.00741.x).
- Passos, T. M., L. H. M. Silva, L. M. Moreira, R. A. Zângaro, R. S. Santos, F. B. Fernandes, C. J. Lima, and A. B. Fernandes. 2014. "Comparative Analysis of Ozone and Ultrasound Effect on the Elimination of Giardia Spp. Cysts from Wastewater." *Ozone: Science and Engineering* 36 (2):138–43. doi:[10.1080/01919512.2013.864227](https://doi.org/10.1080/01919512.2013.864227).
- Peña Sisto, M., L. D. Del Mazo, S. F. González, M. I. A. Vallejo, and L. S. Toledo. 2015. "Eficacia Del Oleozon® En Pacientes Con Periodontitis Del Adulto TT - Effectiveness of the Oleozon® in Patients with Adults Periodontitis." *Medisan* 19(11):1330–37. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1029-30192015001100005.
- Pereira, C. P. M., P. R. Oliveira, K. C. S. Furquim, G. H. Bechara, and M. I. Camargo-Mathias. 2009. "Effects of Fipronil (Active Ingredient of Frontline®) on Salivary Gland Cells of *Rhipicephalus Sanguineus* Females (Latreille, 1806)(Acari: Ixodidae)." *Veterinary Parasitology* 166 (1–2):124–30. doi:[10.1016/j.vetpar.2009.08.015](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.08.015).

- Pereira, C. P. M., P. R. Oliveira, K. C. S. Furquim, G. H. Bechara, and M. I. Camargo-Mathias. 2011. "Fipronil-induced Cell Death in Salivary Glands of *Rhipicephalus Sanguineus* (Latreille, 1806)(Acari: Ixodidae) Semi-engorged Females." *Experimental Parasitology* 127 (2):481–89. doi:10.1016/j.exppara.2010.10.003.
- Pereira, M. C., A. E. Gasparotto, J. P. Jurgilas, L. A. C. Silva, M. C. Pereira, S. S. Silveira, T. N. Silva, A. Arnosti, and M. I. Camargo-Mathias. 2017. "Detrimental Effect of Deltamethrin on the Central Nervous System (Synganglion) of *Rhipicephalus Sanguineus* Ticks." *Experimental and Applied Acarology* 71 (2):159–69. doi:10.1007/s10493-017-0109-y.
- Remedio, R. N., P. H. Nunes, L. A. Anholeto, and M. I. Camargo-Mathias. 2014. "Morphological Alterations in the Synganglion and Integument of *Rhipicephalus Sanguineus* Ticks Exposed to Aqueous Extracts of Neem Leaves (*Azadirachta Indica* A. JUSS)." *Microscopy Research and Technique* 77 (12):989–98. doi:10.1002/jemt.22427.
- Remedio, R. N., P. H. Nunes, and M. I. Camargo-Mathias. 2015. "The Extensible Integument of *Rhipicephalus Sanguineus* Female Ticks in Different Feeding Stages: A Morphological Approach." *Acta Zoologica* 96 (3):319–27. doi:10.1111/azo.12079.
- Remondino, M., and L. Valdenassi. 2018. "Different Uses of Ozone: Environmental and Corporate Sustainability. Literature Review and Case Study." *Sustainability (Switzerland)*. doi:10.3390/su10124783.
- Roma, G. C., M. I. Camargo-Mathias, P. H. Nunes, and G. H. Bechara. 2014. "Changes in the Synganglion of *Rhipicephalus Sanguineus* (Latreille, 1806)(Acari: Ixodidae) Female Ticks Exposed to Permethrin." *An Ultrastructural Overview. Acta Tropica* 136:19–26. doi:10.1016/j.actatropica.2014.04.004.
- Roma, G. C., M. I. Camargo-Mathias, P. H. Nunes, R. N. Remédio, A. U. Faria, and G. H. Bechara. 2015. "Effects of Andiroba (*Carapa Guianensis*) Oil in Ticks: Ultrastructural Analysis of the Synganglion of *Rhipicephalus Sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae)." *Acta Tropica Part A*:7–15. doi:10.1016/j.actatropica.2014.06.018.
- Roma, G. C., M. I. Camargo-Mathias, P. R. Oliveira, K. C. S. Furquim, and G. H. Bechara. 2013. "Neurotoxic Action of Permethrin in *Rhipicephalus Sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) Female Ticks. Morphological and Cytochemical Evaluation of the Central Nervous System." *Veterinary Parasitology* 196 (3–4):482–91. doi:10.1016/j.vetpar.2013.02.025.
- Roma, G. C., K. C. S. Furquim, G. H. Bechara, and M. I. Camargo-Mathias. 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):287–99. doi:10.1007/s10493-010-9401-9.
- Rozado, A. F., L. R. A. Faroni, W. M. I. Urruchi, R. N. C. Guedes, and J. L. Paes. 2008. "Aplicação De Ozônio Contra *Sitophilus Zeamais* E *Tribolium Castaneum* Em Milho Armazenado." *Revista Brasileira De Engenharia Agrícola E Ambiental* 12(3):282–85. doi:10.1590/S1415-43662008000300009.
- Sechi, L. A., I. Lezcano, N. Nunez, M. Espim, I. Duprè, A. Pinna, P. Mollicotti, G. Fadda, and S. Zanetti. 2001. "Antibacterial Activity of Ozonized Sunflower Oil (Oleozon)." *Journal of Applied Microbiology* 90 (2):279–84. doi:10.1046/j.1365-2672.2001.01235.x.
- Soares, C. E. S., A. Weber, E. H. S. Moecke, C. K. Souza, M. G. R. Reiter, and V. M. Scussel. 2018. "Use of Ozone Gas as a Green Control Alternative to Beetles *Alphitobius Diaperinus* (Panzer)infestation in Aviary Bed Utilized in the Poultry Industry." *Chemical Engineering Transactions*. doi:10.3303/CET1864099.
- Sonenshine, D. E., and R. M. Roe. 2014. *Biology of Ticks*. 2^a. United States of America: Oxford University Press.
- Sousa, C. S., L. M. Torres, M. P. F. Azevedo, T. C. Camargo, K. U. Graziano, R. A. Lacerda, and R. N. T. Turrini. 2011. "Ozônio Na Esterilização De Produtos Para Assistência À Saúde: Revisão Integrativa Da Literatura." *Revista Da Escola De Enfermagem Da U S P*. doi:10.1590/S0080-62342011000500030.
- Subramanyam, B., E. Xinyi, S. Savoldelli, and B. Sehgal. 2017. "Efficacy of Ozone against *Rhyzopertha Dominica* Adults in Wheat." *Journal of Stored Products Research*. doi:10.1016/j.jspr.2016.12.002.
- Van Leeuwen, J. H. 2015. "Proposed OS&E Requirement: Measuring Ozone Dosage." *Ozone: Science & Engineering* 37 (2):191–92. doi:10.1080/01919512.2015.1006467.

Capítulo 4

Morphophysiological analysis of the salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* (Acari: Ixodidae) exposed to ozonated water: A control strategy. Medical and Veterinary Entomology, 2020. doi: 10.1111/mve.12472.

Abstract

The tick *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* has great medical and veterinary importance, mainly because the ability to transmit many diseases, causing harm to pets but also risks to public health. The blood spoliation and transmission of pathogens occur because of the immunosuppressive action of these ticks' saliva, a potent mixture of bioactive substances that is secreted by the salivary glands, one of the organs responsible for their biological success, and hence the target of studies for their control. Ozone has promise for use as an alternative acaricide, due to its proven efficiency in controlling agricultural and food pests, besides posing no risk of environmental contamination or to animal and human health. Therefore, this study evaluated the acaricidal potential of exposure of females of *R. sanguineus* s.l. to ozonated water at many concentrations and analyzed the morphophysiological alterations of the salivary glands, employing histological and light microscopic techniques. The results demonstrated that the ozonated water at the concentrations investigated caused severe alterations in the salivary glands, bringing a new perspective for control of *R. sanguineus* s.l., through an ecologically correct method due to the absence of harm to non-target organisms and the environment.

Keywords. ticks; control; salivary glands; ozone; morphology.

Morphophysiological analysis of the salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* (Acari: Ixodidae) exposed to ozonated water: A control strategy

M. R. ABREU¹ , I. DELALIBERA Jr.² , N. R. C. PEREIRA¹  and M. I. CAMARGO-MATHIAS ¹

¹Biology Department, Bioscience Institute, São Paulo State University “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Rio Claro, Brazil and

²Department of Entomology and Acarology, University of São Paulo, USP, Piracicaba, Brazil

Abstract. The tick *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* has great medical and veterinary importance, mainly because the ability to transmit many diseases, causing harm to pets but also risks to public health. The blood spoliation and transmission of pathogens occur because of the immunosuppressive action of these ticks' saliva, a potent mixture of bioactive substances that is secreted by the salivary glands, one of the organs responsible for their biological success, and hence the target of studies for their control. Ozone has promise for use as an alternative acaricide, due to its proven efficiency in controlling agricultural and food pests, besides posing no risk of environmental contamination or to animal and human health. Therefore, this study evaluated the acaricidal potential of exposure of females of *R. sanguineus* s.l. to ozonated water at many concentrations and analysed the morphophysiological alterations of the salivary glands, employing histological and light microscopic techniques. The results demonstrated that the ozonated water at the concentrations investigated caused severe alterations in the salivary glands, bringing a new perspective for control of *R. sanguineus* s.l., through an ecologically correct method due to the absence of harm to non-target organisms and the environment.

Key words. control, morphology, ozone, salivary glands, ticks.

Introduction

Rhipicephalus sanguineus sensu lato ticks have great medical and veterinary importance, mainly because its ability to transmit many pathogens to pets but also to humans (Dantas-Torres, 2010; Gray *et al.*, 2013; Szabo *et al.*, 2013; Dantas-Torres & Otranto, 2015).

Besides transmission of pathogens, these ticks also cause blood spoliation, both of which occur because of the immunosuppressive action of their saliva, which is a potent mixture of bioactive substances secreted by the salivary glands (Camargo-Mathias *et al.*, 2011), a complex organ composed of three types of acini, I, II and III (in females). The first is agranular (involved in the osmoregulation process) and the last two are granular (responsible for synthesis and secretion of the

bioactive compounds in the saliva (Camargo-Mathias, 2013, 2018). Besides types I, II and III, males also have type IV acini, a cellular type (Furquim *et al.*, 2010). It is believed that type IV acini are involved in the lubrication and transfer of the spermatophores during copulation, so that it only has a reproductive function (Sonenshine & Roe, 2014). Therefore, the salivary glands, together with the reproductive, digestive and nervous systems, are responsible for the biological success of these ectoparasites, so these glands have been the target of several studies aiming to control ticks (Nodari *et al.*, 2011, 2012a, 2012b; Remedio *et al.*, 2016).

At present, the most common strategy used specifically to control *R. sanguineus* s.l. is the application of synthetic chemical acaricides. Among these are fipronil, able to cause alterations in the reproductive system and salivary glands

(Oliveira *et al.*, 2007, 2009; Pereira *et al.*, 2009, 2011); permethrin, which causes degeneration of the synganglion and alterations in the salivary glands and reproductive system (Nodari *et al.*, 2011, 2012a; Roma *et al.*, 2011, 2013, 2014); fluzuron, which acts on the integument and midgut (Oliveira *et al.*, 2012, 2013, 2014); dinotefuran, which acts on the reproductive system of females (Oliveira *et al.*, 2016, 2017); and deltamethrin, which affects the synganglion and the reproductive system of females (Camargo-Mathias *et al.*, 2017; Pereira *et al.*, 2017). Despite their efficacy, the indiscriminate application of acaricides has several disadvantages, including toxicity to non-target organisms and environmental contamination (Camargo-Mathias, 2013, 2018).

In response to this scenario, studies have been conducted with acaricides obtained from natural sources, such as neem oil (*Azadirachtaindica*), which is effective against the ovaries and integument of *R. sanguineus* s.l. (Denardi *et al.*, 2012; Remedio *et al.*, 2014), andiroba (or crabwood) oil (*Carapaguianensis*) and thymol, both of which cause alterations in the ovaries of the same tick species (Matos *et al.*, 2014; Roma *et al.*, 2015), making them promising for control of ticks.

Besides the use of bioactive compounds extracted from plants or animals, another research line involves the use of ozone gas, formed by oxygen atoms separated by ultraviolet radiation or high-voltage electrical discharges and recombined with a dioxygen molecule (O_2), resulting in a molecule containing three oxygen atoms (O_3) (Majewski, 2012). Studies have demonstrated its action as an antimicrobial agent (Nagayoshi *et al.*, 2004; Moreira Fonseca *et al.*, 2015), disinfectant (Lopes, *et al.*, 2015), water treatment agent (Majewski, 2012), and against agricultural pests such as the beetles *Sitophilus zeamais* and *Tribolium castaneum* (Rozado *et al.*, 2008). Moreover, a recent study demonstrated that ozonized water could cause damage to the integument of *R. sanguineus* s.l., and therefore, it should be investigated as a new control strategy (Abreu *et al.*, 2020). A major advantage of using ozone is the absence of environmental contamination or risk to public health, since the residue is composed of oxygen atoms (Batakliiev *et al.*, 2014; Moreira *et al.*, 2017; Subramanyam *et al.*, 2017; Soares *et al.*, 2018).

The present study evaluated the acaricidal potential of ozonated water on semi-engorged females of *R. sanguineus* s.l., to shed light on the morphophysiological alterations in the salivary glands.

Material and methods

Ethics

The experimental procedures were approved by the Committee on Ethical Use of Animals (CEUA) of the Biosciences Institute of São Paulo State University (UNESP), Rio Clarocampus, under protocol no. 26/2018 no. 3997.

Ticks

Adult Females of *R. sanguineus* s.l. (tropical lineage) were obtained from a colony (Rio Claro, São Paulo) previously

established and maintained under controlled conditions (29 °C, 80% relative humidity and 12-h photoperiod) at the Bioterium of the Biology Department of UNESP, Rio Claro, São Paulo, Brazil. Ticks were fed on rabbits of the Botucatu Genetic Group, obtained from the Central Bioterium of UNESP, Botucatu, São Paulo, Brazil. They were kept in appropriate cages, with food and water *ad libitum*.

Rabbits were infested with the ticks as described elsewhere (Bechara *et al.*, 1995). Each chamber contained 25 tick pairs. The semi-engorged females were obtained after feeding for 4 days (period when the salivary glands are fully developed and active). The females were removed from the hosts using tweezers and used in the *in vivo* bioassay in the same day.

Exposure of ticks to ozone

Different concentrations of ozonated water were obtained from anozone generator (BRO3-Plus 1, Brasil Ozônio) and oxygen generator (Self-Contained O2 Generator, AirSep) with flow of 2 L/min, installed in a tank with 40 L of tap water. A digital sensor was attached to the tank containing the ozonated water to confirm concentrations. That procedure was carried out in the laboratory of the Brasil Ozônio company, located on the campus of the University of São Paulo (USP), in Butantã, SP, Brazil.

For the bioassays, the female ticks were allocated into five groups. In the control group (CG), ticks were only exposed to distilled water. In the groups 1 to 4 (G1-G4), ticks were exposed to ozonated water with different ozone concentrations (Van Leeuwen, 2015), as follows: G1, 0.75 mg/L; G2, 1.5 mg/L; G3, 2.25 mg/L; and G4, 3 mg/L.

The ticks (five per group) were immersed in glass recipients filled with ozonated water for 5 min according to Drummond *et al.* (1973). Subsequently, the ticks were dried on absorbent paper and transferred to labelled Petri dishes covered with PVC film. The Petri dishes were placed in an incubator under controlled conditions (29 °C, 80% relative humidity and 12-h photoperiod), during 24, 48 or 72 h. After the incubation period, the morphology of the salivary glands of ticks was evaluated under by light microscopy as described below.

Obtaining the salivary glands

After removal from the incubator, the female ticks were anaesthetized by thermal shock in a refrigerator (2 °C ± 2) and dissected in an HBSS buffer solution with Mg^{2+} and Ca^{2+} (NaCl 8 g, Na_2HPO_4 48 mg, KCl 400 mg, KH_2PO_4 60 mg, CaCl 140 mg, $MgSO_4$ 98 mg, d-glucose 1.6 g, penicillin G 100 U/mL, streptomycin 100 µg/mL, and distilled water 1 L) over ice. The removed salivary glands were placed in microtubes containing 100 µL of HBSS, which were sent to the Histology Laboratory of the Biology Department of UNESP, Rio Claro campus.

Morphological analysis

The morphology of the salivary glands of semi-engorged female brown dog ticks was previously described by Furquim

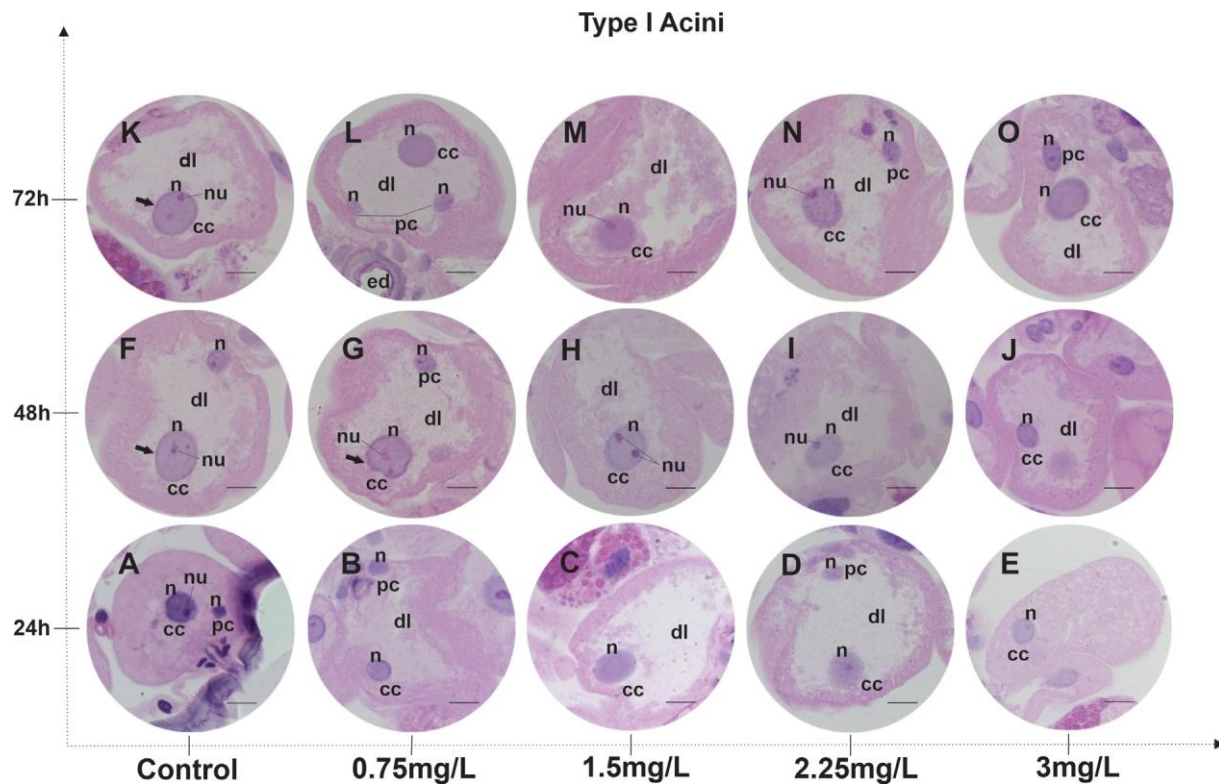


Fig. 1. Histological sections of the salivary glands (type I acini) of *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* females 24 (A-E), 48 (F-J) and 72 h (K-O) after exposure to distilled water (A, F and K) and ozonated water concentrations: 0.75 mg/L (B, G and L); 1.5 mg/L (C, H and M); 2.25 mg/L (D, I and N) and 3 mg/L (E, J and O), stained by HE. cc, central cells; pc, peripheral cells; dl, dilated lumen; ed., excretory duct; n, nucleus; nu, nucleoli; black arrow, chromatin marginalization. [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com].

et al. (2008a, 2008b), so in this work we used those descriptions as proxies for the control group to demonstrate the alterations that occurred in the treated groups.

Salivary glands were removed from tubes containing HBSS and fixed in 4% paraformaldehyde for 48 h in 1.5 mL micro-tubes. Then they were washed three times in sodium phosphatebuffer (0.1 M, pH 7.4) and dehydrated in a rising ethyl alcohol series of 70%, 80%, 90% and 95% (immersed for 30 min in each concentration). Then, they were embedded in historesin (LEICA) or 1 week, placed in plastic moulds containing resin plus hardener and put in an oven at 37 °C until the blocks hardened. After that, sections with thickness of 3 µm were sliced, mounted on glass slides (six sections/slide) and stored in an oven.

For staining, the slides were hydrated in distilled water for 1 min, immersed in hematoxylin for 7 min and washed in running water for 4 min. Then, slides were stained with aqueous eosin for 5 min and again washed in running water, and allowed to dry at room temperature. Slides were then dipped quickly in xylol and covered with Entellan (Merck) and a previously cleaned glass coverslip. Analysis and photo documentation were performed with a Leica DM750 bright-field photomicroscope, in the Biology Department of UNESP, Rio Claro campus.

Results

The description of the alterations in each type of acinus is depicted in Figs. 1-3 and Tables S1-S3. The different cell types are not identified, since this is not the purpose of this article.

Type I acini

The histological analyses of the salivary glands of the semi-engorged female ticks of the control group (exposed only to distilled water), showed that after 24 h of incubation the morphology of the type I acini was unchanged, with characteristics similar to those described in the literature (Fig. 1A), i.e., shape ranging from round to oval, composed of a central cell (large nucleus), along with other peripheral ones (smaller nuclei) and without the presence of granules in their cytoplasm (Fig. 1A). The nuclei were strongly stained by hematoxylin, enabling visualization of the nucleolus of the central cell (Fig. 1A). After 48 and 72 h, small alterations in the morphology of these acini were observed, i.e., they changed from rounded to irregular and also presented dilation of the lumen (after both times) (Fig. 1F,K). The central and peripheral cells had cytoplasm with apparent vacuolation, which was more intense after 72 h (Fig. 1K). The round nuclei contained evident nucleoli and the start of

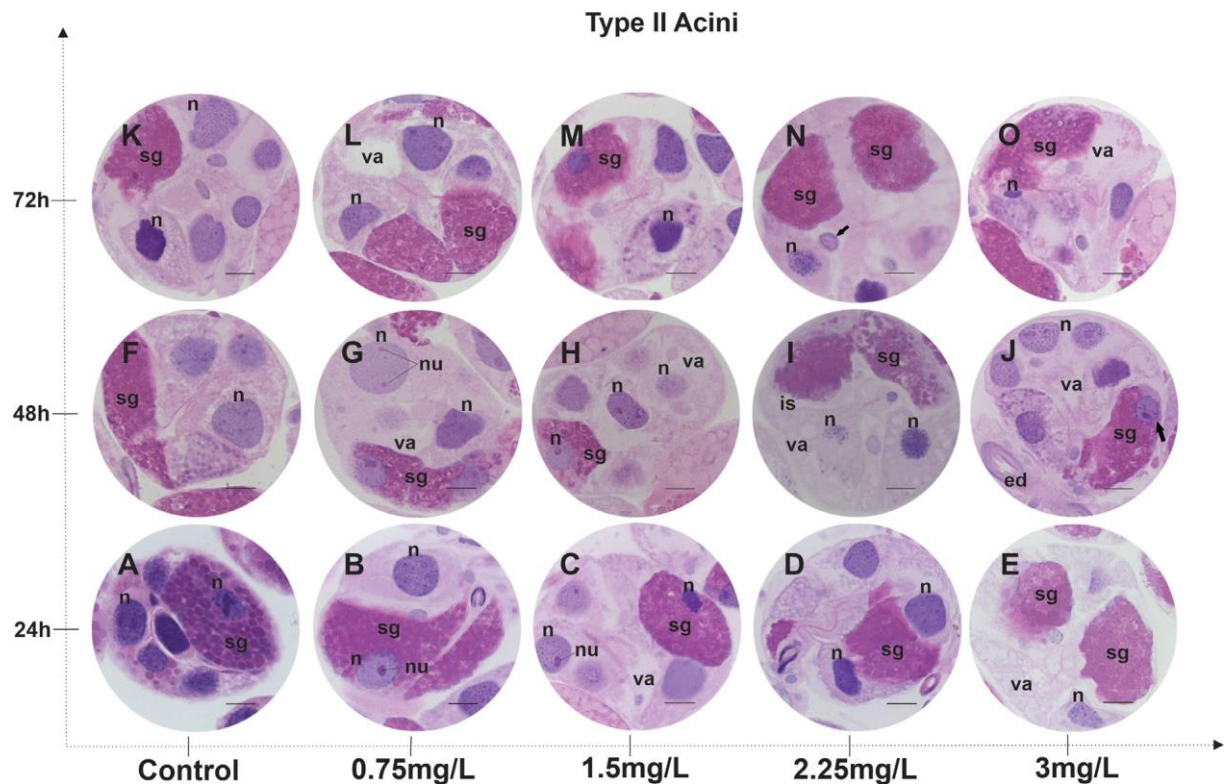


Fig. 2. Histological sections of the salivary glands (type II acini) of *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* females 24 (A-E), 48 (F-J) and 72 h (K-O) after exposure to distilled water (A, F and K) and ozonated water concentrations: 0.75 mg/L (B, G and L); 1.5 mg/L (C, H and M); 2.25 mg/L (D, I and N) and 3 mg/L (E, J and O), stained by HE. ed., excretory duct; is, intercellular space; n, nucleus; nu, nucleoli; sg, secretory granules; va, vacuolization; black arrow, chromatin marginalization. [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com].

chromatin marginalization was observed in the central cells (also after both times) (Fig. 1F,K).

The females exposed to ozonated water at 0.75 mg/L for 5 min and analysed after 24 h presented alterations both of shape and morphology of the cells of type I acini. The lumens were highly dilated in comparison to the females of the control group after the same interval (Fig. 1A). The central and peripheral cells contained heterogeneous cytoplasm (due to vacuolation) with round nuclei, where it was not always possible to visualize nucleoli (Fig. 1B). After 48 and 72 h, the acini had morphology similar to that observed in the control group (Fig. 1F,K) at the respective times (Fig. 1G,L).

The exposure of the female ticks to 1.5 mg/L for 5 min and analysed after 24 h showed changes in the shape of the type I acini from round to irregular, besides having significantly dilated lumens. The central cells contained vacuolated cytoplasm, where the nucleoli were not as evident. Another severe alteration observed was the absence of peripheral cells (Fig. 1C). After 48 and 72 h, no alterations were observed (Fig. 1H,M), so that the characteristics observed in the control groups at these times remained the same (Fig. 1F,K).

The exposure to 2.25 mg/L for 5 min and analysed after 24 h caused the type I acini to change from round to irregular, with dilated lumens, unlike what was observed in the control group for the same interval (Fig. 1A). It was possible to identify the central and peripheral cells, with round nuclei, weakly stained

by hematoxylin (Fig. 1D). After 48 and 72 h (Fig. 1I,N), no changes were observed in comparison to the corresponding control groups (Fig. 1F,K).

The exposure to 3 mg/L for 5 min altered the morphology of the type I acini after 24 h incubation (Fig. 1E). They were oval and only the central cells could be identified in them, with homogeneous cytoplasm, stained by eosin, but with much weaker intensity (Fig. 1E) than observed in the corresponding control group (Fig. 1A). The nuclei were round and weakly stained by hematoxylin (Fig. 1E). After 48 and 72 h, besides irregular shape, the type I acini presented severe lumen dilation, central cells with heterogeneous cytoplasm (vacuolated), peripheral cells with smaller nuclei, and absence of nucleoli (Fig. 1J,O).

Type II acini

The type II acini of the control group (females exposed only to distilled water) after 24 h exhibited unchanged morphology, similar to that reported in the literature, i.e., round shape, composed of secretory cells with cytoplasm filled with granules with varying size and colour and with nuclei strongly stained by hematoxylin (Fig. 2A). After 48 h, the type II acini maintained their morphological characteristics, with observance only of increased size of the nuclei of some secretory cells (Fig. 2F).

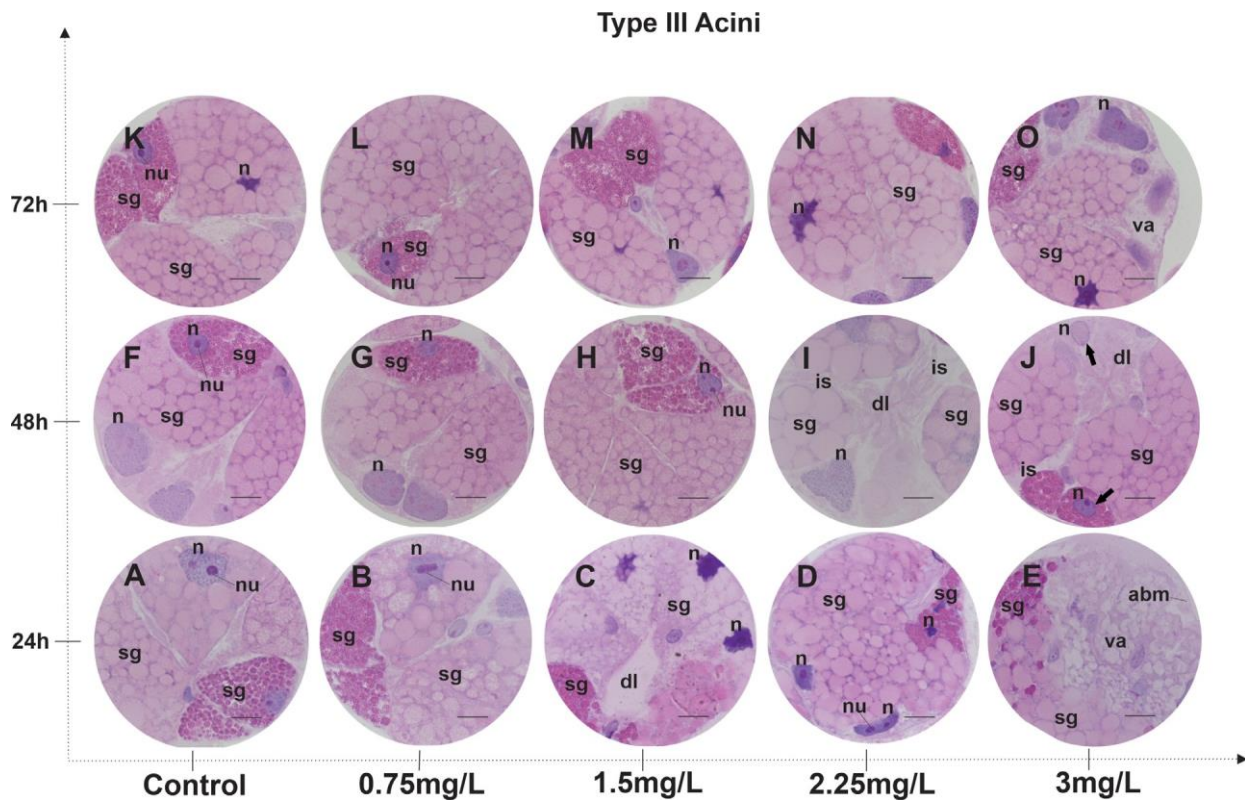


Fig. 3. Histological sections of the salivary glands (type III acini) of *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* females 24 (A-E), 48 (F-J) and 72 h (K-O) after exposure to distilled water (A, F and K) and ozonated water concentrations: 0.75 mg/L (B, G and L); 1.5 mg/L (C, H and M); 2.25 mg/L (D, I and N) and 3 mg/L (E, J and O), stained by HE. abm, acinar basement membrane; dl, dilatated lumen; is, intercellular space; n, nucleus; nu, nucleoli; sg, secretory granules; va, vacuolization; black arrow, chromatin marginalization. [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com].

After 72 h, the type II acini were irregular, in some cells it was possible to observe nuclear hypertrophy besides vacuolated cytoplasm, accompanied by strong staining by hematoxylin (Fig. 2K).

The exposure to 0.75 mg/L analyzed after 24 h caused some alterations in the type II acini, although the basic characteristics of integrity observed in the control group were preserved (Fig. 2A). Among the alterations was larger size of the nuclei of some cells, in some of which nucleoli could be visualized (Fig. 2B). After 48 h, although the type II acini remained round, vacuolation and cytoplasmic disorganization were observed in the secretory cells (Fig. 2G) in comparison with the corresponding control group (Fig. 2F). Some cells were also observed with hypertrophied nuclei (Fig. 2G). After 72 h, the type II acini presented the same morphological alterations (Fig. 2L) observed in the corresponding control group (Fig. 2K).

The exposure to 1.5 mg/L for 5 min and analysed after 24 h showed alterations in the morphology of the type II acini (Fig. 2A), namely, irregular shape and vacuolated cells, with granules dispersed in the cytoplasm. The nuclei of some cells were pyknotic, while others were hypertrophic (Fig. 2C). After 48 h, cells of the type II acini, besides showing cytoplasmic disorganization, had fragmented nuclei (Fig. 2H).

After 72 h of incubation, the cells of the type II acini presented vacuolated cytoplasm containing dispersed and disorganized secretory granules. The cell nuclei were also deformed (Fig. 2M).

The exposure to 2.25 mg/L for 5 min and analysed after 24 h altered the type II acini, which became irregular. Inside them, cells were observed with intense cytoplasmic disorganization, with dispersed secretory granules, besides the presence of hypertrophy and irregular nuclei (Fig. 2D). After 48 h (Fig. 2I), as well as 72 h (Fig. 2N), besides the loss of the original acinar shape, increased intercellular spaces were observed. After 72 h, besides the characteristics noted after 48 h (Fig. 2I), there was an increase in the frequency of cell nuclei with chromatin marginalization and fragmentation (Fig. 2N).

Regarding the exposure to 3 mg/L of ozonated water for 5 min, the type II acini showed intense morphological alterations after 24 h, consisting of total loss of their original shape and presence of cells with vacuolated cytoplasm containing disorganized secretory granules. Besides this, cells were observed with varying sizes and irregular shapes (Fig. 2E), unlike in the corresponding control group (Fig. 2A). After 48 h, the type II acini, besides having irregular shape, also contained cells with hypertrophic and/or fragmented nuclei (Fig. 2J). After 72 h, the type II acini were irregular, with vacuolated and disorganized cytoplasm. Besides this, the presence was noted of

pyknotic nuclei in cells that lost their boundaries, probably due to extrusion of the cytoplasmic content (Fig. 2O).

Type III acini

The type III acini of the females exposed only to distilled water (control group) analysed after the periods 24, 48 and 72 h had the typical morphology described in the literature, i.e., round shape and cells with cytoplasm replete with secretory granules, since like the type II acini, they have the function of secreting bioactive substances to compose the saliva (Fig. 3A). Specifically, after 72 h, some cells had nuclei intensely stained by hematoxylin (Fig. 3K).

For all incubation times (24, 48 and 72 h), exposure to 0.75 mg/L for 5 min did not change the morphology of type III acini (Fig. 3B,G,L).

The females exposed to ozonated water at 1.5 mg/L for 5 min and analysed after 24 h presented dilation of the lumens of the type III acini, as well as cells with disorganized secretory granules in the cytoplasm. The nuclei were strongly stained by hematoxylin, revealing intense pyknosis (Fig. 3C). After 48 and 72 h (Fig. 3H,M), no alterations were observed compared to the corresponding control groups (Fig. 3F,K), except that some secretory cells' nuclei were strongly stained by hematoxylin (Fig. 3H,M).

The type III acini of the group exposed to 2.25 mg/L for 5 min and analyzed after 24 h had cells with cytoplasm containing irregularly shaped secretory granules with different sizes (Fig. 3D), unlike observed in the control group (Fig. 3A). It was not possible to identify the cell limit. Some irregular nuclei were half-moon shaped and others presented intense pyknosis (Fig. 3D). After 48 and 72 h (Fig. 3I,N), the type III acini presented larger intercellular spaces along with dilated lumens and disorganized secretory granules, which were larger than those of the corresponding control groups (Fig. 3F,K). The nuclei were hypertrophic and the nucleoli were not observed (Fig. 3I,N).

After 24 h of incubation, the females exposed to 3 mg/L for 5 min suffered detachment of the acinar basal membrane. The cells presented intense cytoplasmic vacuolation and the nuclei were weakly stained by hematoxylin. The cell limit could not be identified (Fig. 3E). After 48 and 72 h, the acinar lumen was more enlarged, as were the intercellular spaces. The nuclei contained marginal chromatin (Fig. 3J,O).

Discussion

The results obtained in this study showed that ticks exposed only to distilled water did not suffer any alterations in the salivary glands at any of the intervals studied. Their morphology followed the pattern described by Furquim *et al.* (2008a, 2008b), who reported that as the females became engorged, the ovaries started to develop and the salivary glands began to degenerate due to the natural end of the secretory cycle. The absence of changes in the glandular tissue of the females of the control group indicated that distilled water had no morphophysiological

effect on the organ, thus confirming the validity of this group as a reference for interpreting the results of exposure to ozonated water.

The type I acini of the salivary glands of the ticks exposed to ozonated water at the different concentrations presented morphological changes compared to the control group, such as dilated lumen and cells with vacuolated cytoplasm, alterations that occurred after all three-time intervals analysed (24, 48 and 72 h). Nevertheless, the alterations were more evident at the concentrations of 1.5 and 2.25 mg/L after 24 h of incubation, since the acinar lumen was more dilated. This result is inline with that reported by Pereira *et al.* (2009), who also observed enlargement of the lumen of type I acini in *R. sanguineus* s.l. females exposed to fipronil, a synthetic acaricide with proven efficacy. Furthermore, when the same species was exposed to permethrin (a synthetic pyrethroid), this alteration (among others) also was observed in type I acini (Nodari *et al.*, 2012a). Our results indicate that exposure to ozonated water at concentrations of 1.5 and 2.25 mg/L caused osmotic stress in the type I acini, i.e., impaired their role in maintenance of the water balance by eliminating excess water, ions and toxic compounds from the haemolymph during ingestion of blood (Gray *et al.*, 2013; Yoder *et al.*, 2006). Since ozone is unstable in water, spontaneously decomposing and generating hydroxyl radicals considered to be the most reactive oxidizing agents in aqueous solutions ($O_3 + H_2O \cdot 2HO\cdot + O_2$) (Soares *et al.*, 2018), probably this overload of ions present in the ozonated water at the mentioned concentrations was responsible for the osmotic stress observed.

The granular acini of the females exposed to ozonated water underwent more significant morphological alterations with concentrations between 1.5 and 3 mg/L (G2, G3 and G4) after 24 h of incubation. These alterations consisted of loss of original shape of the acini, which became irregular, along with extensive vacuolation found in the cytoplasm of the secretory cells, which were more intense (dose dependent) as the ozonated water concentration increased. Also, at the highest concentration, there was loss of cellular limits. This set of data permits inferring that the cytoplasmic vacuolation added to the disorganization of the secretory granules indicates that the synthesis and storage of the secretions to compose the saliva are processes also impaired by exposure to ozonated water. Other studies of the morphophysiology of the salivary glands of ticks exposed to other compounds, such as that performed by Nodari *et al.* (2011, 2012a, 2012b), have also reported significant cytoplasmic vacuolation and disorganization of the granules in the secretory cells of type II acini, which according to the authors indicates that in defence against the action of the toxic product these cells could be isolating organelles or portions of the cytoplasm that are already damaged, in an attempt to maintain biological viability (Alberts, 2014). These reports led us to assume that the same pattern occurred here.

The exposure of the type II glandular acini to ozonated water at concentrations 1.5–3 mg/L caused not only changes in the cytoplasm but also in the cells' nuclei. The occurrence was noted of hypertrophy, pyknosis, chromatin marginalization and cell fragmentation, characteristics of the processes of cell death by apoptosis, which are commonly observed in cells exposed to toxic agents, leading to premature degeneration of

glandular tissue, culminating in loss of secretory function and thus hampering the tick's feeding before complete engorgement. Similar findings were reported by Nodari *et al.* (2011, 2012a) studying the behaviour of the salivary glands after exposure to permethrin, and also by Pereira *et al.* (2009) after exposure of *R. sanguineus* s.l. to fipronil.

The analysis of the type III acini showed the same types of morphophysiological alterations present in the type II acini, starting at the concentration of 2.25 mg/L, and intensifying at 3 mg/L, in both cases after 24 h of incubation. At the highest concentration, besides those alterations, there was total loss of cell limits, which left the acini irregular. Since type II and III acini are composed of cells that synthesize bioactive substances for the tick's saliva, as well as the substances that will compose the cement, responsible for adherence of the tick's mouth parts to the host (Sonenshine & Roe, 2014), any type of alteration of the cytoplasm that interferes in the synthesis of the granules and/or the nuclear integrity of the cells will result in physiological damage, interfering in the secretory activity and causing release of altered saliva. These alterations certainly would impair the tick's feeding, starting with the process of attachment to the host. Similar results were obtained by Pereira *et al.* (2009), who found that fipronil altered the shape of the cells forming the type II and III acini. Our results also are in line with those reported by Nodari *et al.* (2011, 2012b) studying the same organ of semi-engorged *R. sanguineus* s.l. females exposed to permethrin. Not only synthetic chemicals can alter the morphophysiology of ticks' salivary glands. Substances of natural origin, such as neem oil, can also alter the shape of type II and III acini, cause fusion of secretory granules and cytoplasmic disorganization in the cells of granular acini (Remedio *et al.*, 2016).

Conclusion

The findings obtained in this study show that ozonated water has potential similar to that observed in the leading acaricidal compounds in the veterinary market. They also indicate that ozonated water at the concentrations used here caused severe alterations in the salivary glands, bringing a new perspective for the control of *R. sanguineus* s.l.

Supporting Information

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

Table S1: Alterations in the type I acini of *R. sanguineus* sensu lato females exposed to ozonated water

Table S2: Alterations in the type II acini of *R. sanguineus* sensu lato females exposed to ozonated water.

Table S3: Alterations in the type III acini of *R. sanguineus* sensu lato females exposed to ozonated water.

Acknowledgements

The authors are grateful to FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), grant no. 2018/02999-9, CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) and EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa e Inovação Industrial) installed at ESALQ/USP, Piracicaba, Brazil, for the financial support.

The authors declare that they have no conflict of interest.

Data availability statement

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

References

- Abreu, M.R., Delalibera Junior, I., Pereira, N.R.C. & Camargo-Mathias, M.I. (2020) Exposure of Ticks *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae) to Ozonated Water: Integument Response. *Ozone: Science & Engineering*, **1**, 1–10. <https://doi.org/10.1080/01919512.2020.1727310>.
- Alberts, B. (2014). *Molecular Biology of the Cell*, 6th edn. Garland Science, Nova York.
- Batakliev, T., Georgiev, V., Anachkov, M., Rakovsky, S. & Rakovsky, S. (2014) Ozone decomposition. *Interdisciplinary Toxicology*, **7**, 2–59. <https://doi.org/10.2478/intox-2014-0008>.
- 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. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*, **4**, 61–66.
- Camargo-Mathias, M.I. (2013) *Guia básico de morfologia interna de carrapatos ixodídeos*. Editora Unesp, São Paulo.
- Camargo-Mathias, M.I. (2018) Inside the ticks. *Morphophysiology, Toxicology and Therapeutic Perspectives*. São Paulo, Editora Unesp.
- Camargo-Mathias, M.I., Furquim, K.C.S. & Nunes, P.H. (2011) Immunomodulatory effects of tick saliva. *Invertebrate Survival Journal*, **8**(2), 231–240.
- Camargo-Mathias, M.I., Pereira, N.R.C., Reis, C.S. *et al.* (2017) Deltamethrin as inductor agent of precocious ovarian degeneration in *Rhipicephalus sanguineus* s.l. (Acari: Ixodidae) ticks. *Experimental and Applied Acarology*, **72**, 161–169. <https://doi.org/10.1007/s10493-017-0144-8>.
- Dantas-Torres, F. (2010) Systematics and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Parasites & Vectors*, **3**, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2012.12.003>.
- Dantas-Torres, F. & Otranto, D. (2015) Further thoughts on the taxonomy and vector role of *Rhipicephalus sanguineus* group ticks. *Veterinary Parasitology*, **208**, 9–13. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.12.014>.
- Denardi, S.E., Bechara, G.H., Oliveira, P.R. & Camargo-Mathias, M.I. (2012) 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*, **36**, 56–67. <https://doi.org/10.3109/01913123.2011.588819>.
- Drummond, R.E.A., 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**, 130–133. <https://doi.org/10.1093/jee/66.1.130>.

- Furquim, K.C.S., Bechara, G.H. & Camargo-Mathias, M.I. (2008a) Death by apoptosis in salivary glands of females of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). *Experimental Parasitology*, **119**, 152–163. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2008.01.021>.
- Furquim, K.C.S., Bechara, G.H. & Camargo-Mathias, M.I. (2008b) Degeneration of salivary glands of males of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari, Ixodidae). *Veterinary Parasitology*, **154**, 325–335. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.03.013>.
- Furquim, K.C.S., Bechara, G.H., & Camargo-Mathias, M.I. (2010). Morpho-histochemical characterization of salivary gland cells of males of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) at different feeding stages: description of new cell types. *Experimental and Applied Acarology*, **50**(1), 59.
- Gray, J., Dantas-Torres, F., Estrada-Peña, A. & Levin, M. (2013) Systematics and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Ticks and Tick-borne Diseases*, **4**, 171–180. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2012.12.003>.
- Lopes, M.S., Ferreira, J.R.F., Silva, K.B., Oliveira Bacelar Simplício, I., Lima, C.J. & Fernandes, A.B. (2015) Disinfection of corrugated tubing by ozone and ultrasound in mechanically ventilated tracheostomized patients. *The Journal of Hospital Infection*, **90**, 304–309. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2015.03.004>.
- Majewski, J. (2012) Methods for measuring ozone concentration in ozone-treated water. *Przegląd Elektrotechniczny (Electrical Review)*, **9**, 253–255.
- Matos, R.S., Melo, D.R., Monteiro, C.M.O. et al. (2014) Determination of the susceptibility of unengorged larvae and engorged females of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) to different methods of dissolving thymol. *Parasitology Research*, **113**, 669–673.
- Moreira Fonseca, P.M., Feitosa, L.S., Fernandes, A.B., Zangaro, R.A., Miyakawa, W. & Lima, C.J. (2015) Disinfection of dental instruments contaminated with *Streptococcus mutans* using Ozonated water alone or combined with ultrasound. *Ozone Science and Engineering*, **37**, 85–89. <https://doi.org/10.1080/01919512.2014.904740>.
- Moreira, L.H., Figueiredo, T.F.B., Alves, L.P. et al. (2017) Effect of ozone as Acaricide: action of the ozone on the cuticle and respiratory spiracle of tick *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato. *Ozone Science and Engineering*, **00**, 1–8. <https://doi.org/10.1080/01919512.2017.1403306>.
- Nagayoshi, M., Kitamura, C., Fukuizumi, T., Nishihara, T. & Terashita, M. (2004) Antimicrobial effect of ozonated water on bacteria invading dentinal tubules. *Journal of Endodontia*, **30**, 778–781. <https://doi.org/10.1097/00004770-200411000-00007>.
- Nodari, E.F., Roma, G.C., Furquim, K.C.S., Bechara, G.H. & Mathias, M.I.C. (2011) Cytotoxic effects of permethrin in salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) semi-engorged females. *Experimental Parasitology*, **128**, 151–158. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2011.02.003>.
- Nodari, E.F., Roma, G.C., Furquim, K.C.S., Bechara, G.H. & Camargo-Mathias, M.I. (2012a) Action of permethrin on *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) semi-engorged females: Morpho-physiological evaluation of salivary glands. *Ticks and Tick-borne Diseases*, **3**, 219–226. <https://doi.org/10.1002/jemt.22126>.
- Nodari, E.F., Roma, G.C., Furquim, K.C.S., Oliveira, P.R., Bechara, G.H. & Camargo-Mathias, M.I. (2012b) Degenerative process and cell death in salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) semi-engorged female exposed to the acaricide permethrin. *Microscopy Research and Technique*, **75**, 1012–1018. <https://doi.org/10.1002/jemt.22025>.
- Oliveira, P.R., Bechara, G.H. & Camargo-Mathias, M.I. (2007) *Amblyomma triste* (Koch, 1844) (Acari: Ixodidae) ovaries: An ultrastructural analysis. *Experimental Parasitology*, **116**, 407–413. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2007.02.006>.
- Oliveira, P.R., Bechara, G.H., Morales, M.A.M. & 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**, 1255–1264. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.02.019>.
- Oliveira, P.R., Calligaris, I.B., Roma, G.C., Bechara, G.H., Pizano, M.A. & Camargo-Mathias, M.I. (2012) Potential of the insect growth regulator, fluzazuron, in the control of *Rhipicephalus sanguineus* nymphs (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): determination of the LD95 and LD50. *Experimental Parasitology*, **131**, 35–39. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2012.02.023>.
- Oliveira, P.R., Calligaris, I.B., Roma, G.C., Bechara, G.H. & Camargo-Mathias, M.I. (2013) Fluzazuron-Induced Morpho-physiological Changes in the Cuticle Formation and Midgut of *Rhipicephalus sanguineus* Latreille, 1806 (Acari: Ixodidae) Nymphs. *Parasitology Research*, **112**, 45–58. <https://doi.org/10.1007/s00436-012-3103-7>.
- Oliveira, P.R., Calligaris, I.B., Nunes, P.H., Bechara, G.H. & Camargo-Mathias, M.I. (2014) Fluzazuron-induced morphological changes in *Rhipicephalus sanguineus* Latreille, 1806 (Acari: Ixodidae) nymphs: an ultra-structural evaluation of the cuticle formation and digestive processes. *Acta Tropica*, **133**, 45–55. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.01.008>.
- Oliveira, P.R., Remédio, R.N., Bechara, G.H., Anholeto, L.A. & Camargo-Mathias, M.I. (2016) Dinotefuran-induced morphophysiological changes in the ovaries and midgut of semi-engorged females *Rhipicephalus sanguineus* Latreille, 1806 (Acari: Ixodidae) ticks. *Parasitology Research*, **115**, 829–849. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4814-3>.
- Oliveira, P.R., Anholeto, L.A., Bechara, G.H. & Camargo-Mathias, M.I. (2017) Dinotefuran-induced morphophysiological changes in semi-engorged females *Rhipicephalus sanguineus* Latreille, 1806 (Acari: Ixodidae) ticks: ultra-structural evaluation. *Acta Tropica*, **166**, 139–154. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.11.017>.
- Pereira, C.P.M., Oliveira, P.R., Furquim, K.C.S., Bechara, G.H. & Camargo-Mathias, M.I. (2009) Effects of fipronil (active ingredient of Frontline®) on salivary gland cells of *Rhipicephalus sanguineus* females (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology*, **166**, 124–130. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.08.015>.
- Pereira, C.P.M., Oliveira, P.R., Furquim, K.C.S., Bechara, G.H. & Camargo-Mathias, M.I. (2011) Fipronil-induced cell death in salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) semi-engorged females. *Experimental Parasitology*, **127**, 481–489. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2010.10.003>.
- Pereira, M.C., Gasparotto, A.E., Jurgilas, J.P. et al. (2017) Detrimental effect of deltamethrin on the central nervous system (synganglion) of *Rhipicephalus sanguineus* ticks. *Experimental & Applied Acarology*, **71**, 159–169. <https://doi.org/10.1007/s10493-017-0109-y>.
- Remedio, R.N., Nunes, P.H., Anholeto, L.A., Oliveira, P.R. & Camargo-Mathias, M.I. (2014) 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**, 431–444. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-4200-6>.
- Remedio, R.N., Nunes, P.H., Anholeto, L.A., Oliveira, P.R., Sá, I.C.G. & Camargo-Mathias, M.I. (2016) Morphological alterations in salivary

- glands of *Rhipicephalus sanguineus* ticks (Acari: Ixodidae) exposed to neem seed oil with known azadirachtin concentration. *Micron*, **83**, 19–31. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2016.01.004>.
- 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 & Applied Acarology*, **53**, 287–299. <https://doi.org/10.1007/s10493-010-9401-9>.
- Roma, G.C., Camargo-Mathias, M.I., Oliveira, P.R., Furquim, K.C.S. & Bechara, G.H. (2013) Neurotoxic action of permethrin in *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) female ticks. Morphological and cytochemical evaluation of the central nervous system. *Veterinary Parasitology*, **196**, 482–491. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.02.025>.
- Roma, G.C., Camargo-Mathias, M.I., Nunes, P.H. & Bechara, G.H. (2014) Changes in the synganglion of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) female ticks exposed to permethrin: an ultrastructural overview. *Acta Tropica*, **136**, 19–26. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.04.004>.
- Roma, G.C., Camargo-Mathias, M.I., Nunes, P.H., Remédio, R.N., Faria, A.U. & Bechara, G.H. (2015) Effects of andiroba (*Carapa guianensis*) oil in ticks: ultrastructural analysis of the synganglion of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). *Acta Tropica*, **7–15**, 7–15. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.06.018>.
- Rozado, A.F., Faroni, L.R.A., Urruchi, W.M.I., Guedes, R.N.C. & Paes, J.L. (2008) Aplicação de ozônio contra *Sitophilus zeamais* e *Tribolium castaneum* em milho armazenado. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, **12**, 282–285. <https://doi.org/10.1590/S1415-43662008000300009>.
- Soares, C.E.S., Weber, A., Moecke, E.H.S., de Souza, C.K., Reiter, M.G.R. & Scussel, V.M. (2018) Use of ozone gas as a green control alternative to beetles *Alphitobius diaperinus* (panzer) infestation in aviary bed utilized in the poultry industry. *Chemical Engineering Transactions*, **64**, 589–594. <https://doi.org/10.3303/CET1864099>.
- Sonenshine, D.E. & Roe, R.M. (2014). *Biology of Ticks*, 2a edn. Oxford University Press, United States of America.
- Subramanyam, B., Xinyi, E., Savoldelli, S. & Sehgal, B. (2017) Efficacy of ozone against *Rhyzopertha Dominica* adults in wheat. *Journal of Stored Products Research*, **70**, 53–59. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2016.12.002>.
- Szabo, M.P.J., Pinter, A. & Labruna, M.B. (2013) Ecology, biology and distribution of spotted-fever tick vectors in Brazil. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, **3**, 27. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00027>.
- Van Leeuwen, J.H. (2015) Proposed OS&E requirement: measuring ozone dosage. *Ozone: Science & Engineering*, **37**, 191–192. <https://doi.org/10.1080/01919512.2015.1006467>.
- Yoder, J.A., Benoit, J.B., Rellinger, E.J. & Tank, J.L. (2006) Developmental profiles in tick water balance with a focus on the new Rocky Mountain spotted fever vector, *Rhipicephalus sanguineus*. *Medical and Veterinary Entomology*, **20**, 365–372. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2006.00642.x>.

Accepted 31 July 2020

Capítulo 5

Ozone as a potential acaricide: evaluation of reproductive parameters and detection of morphophysiological changes in reproductive tissue of female ticks of *Rhipicephalus sanguineus sensu lato*.

Marina Rodrigues de Abreu¹, Italo Delalibera Junior², Maria Izabel Camargo-Mathias^{1*}

¹Biology Department, Bioscience Institute, São Paulo State University “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Rio Claro, SP, Brazil. ²Department of Entomology and Acarology, University of São Paulo, USP, Piracicaba, SP, Brazil.

Abstract

Ticks of the species *Rhipicephalus sanguineus* s.l. (*R. linnaei*) are responsible for significant medical and veterinary importance diseases, several studies have sought to find effective control methods for this hematophagous. The indiscriminate use of these synthetic chemicals has caused enormous disadvantages, such as the selection of resistant tick strains, toxicity in non-target organisms, and environmental contamination through the generation and accumulation of residue. These factors stimulate the search for more sustainable control strategies, less harmful to animals and the environment while efficient. Studies addressing the actions of ozone have gained focus in the scientific world since it has the potential to act as antimicrobial, disinfectant, sterilizer, healing, and recently insecticide/acaricide for its ability to control agricultural pests. Furthermore, in previous studies used ozonated water applied in semi-engorged females, which caused morphophysiological changes in the salivary glands and the integument of *R. sanguineus* s.l. (*R. linnaei*) it was confirmed that the ozone could potentially act against ticks of this species (ABREU et al., 2020a,b). Thus, the present study aimed to evaluate the ozone has acaricidal potential against the species *R. sanguineus* s.l. (*R. linnaei*) after exposure (immersion) of engorged females in ozonated water (ozone 3mg/L). These bioassays accomplishment allowed us to affirm that ozonated water would have the potential to act as a dog tick control agent, since in addition to interfering with biological parameters, it also caused morphological damage, confirmed both histologically and histochemically, to the reproductive system and Gene's organ of the females exposed to it. **Palavras chave:** ticks, control, biological parameters, ovary, Gene's organ.

1. INTRODUCTION

Ticks of the species *Rhipicephalus sanguineus* s.l. are mandatory hematophagous ectoparasites and popularly known as "brown dog tick" for having the domestic dog as their primary host, although this species also parasitizes other vertebrates and even man (DANTAS-TORRES AND OTRANTO, 2015; GRAY et al., 2013). It has a wide geographical distribution mainly due to its preferred host dispersion, in addition to its ability to adapt to the most diverse and adverse environmental conditions, therefore considered cosmopolitan (DANTAS-TORRES, 2010; NAVA et al., 2018).

In addition to the damage these ectoparasites cause in harming the host, these animals also transmit numerous pathogens during their feedings, such as bacteria (*Rickettsia rickettsii*, *R. conorii*, and *Ehrlichia canis*) and protozoa (*Babesia vogeli* and *Hepatozoon canis*) responsible for significant medical and veterinary importance diseases (CUNHA et al., 2009; IPEK et al., 2020; LATROFA et al., 2014; SZABO et al., 2013). Therefore, this species has been posing a significant threat to pets and public health (CARDOSO et al., 2006; CUNHA et al., 2009).

Several studies have sought to find effective control methods for this hematophagous (CAMARGO-MATHIAS, 2018). Currently, the most common strategies to control *R. sanguineus* s.l. use synthetic chemical acaricides. Including fipronil, which effect was already demonstrated on the reproductive system and the salivary glands of *R. sanguineus* (OLIVEIRA et al., 2008, 2009; PEREIRA et al., 2011, 2009); permethrin that causes degeneration of the synganglion, changes in the salivary glands and the reproductive system in ticks of the same species (NODARI et al., 2011, 2012; ROMA et al., 2011, 2013, 2014); fluazuron that works on the integument and intestine (OLIVEIRA et al., 2012, 2013, 2014); dinotefuran that works on the female's reproductive system and the midgut (OLIVEIRA et al., 2016, 2017); and deltamethrin, reported to act in the synganglion and on the female reproductive system (CAMARGO-MATHIAS, 2017; PEREIRA et al., 2017).

The indiscriminate use of these synthetic chemicals has caused enormous disadvantages, such as the selection of resistant tick strains, toxicity in non-target organisms, and environmental contamination through the generation and accumulation of residue (BECKER et al., 2019). These associated factors stimulate the search for more sustainable control strategies, less harmful to animals and the environment while efficient. The use of natural bioactive agents, almost always derived from plants, has worked as acaricides and has shown to be relevant and promising (CAMARGO-MATHIAS, 2013, 2018).

These natural acaricides, which have active ingredients present in essential oils or plant extract, are currently the subject of many studies. At least in the laboratory, they have proved to be an alternative to control ticks of the species *R. sanguineus* s.l. successfully. For instance: neem oil (*Azadirachta indica*) that has demonstrated effects on ovaries (DENARDI et al., 2010a; 2010b; 2011; REMÉDIO et al., 2015), integument (REMÉDIO et al., 2014; LIMA de SOUZA et al. 2017), synganglion (REMÉDIO et al., 2014) and salivary glands of *R. sanguineus* (Remedy et al., 2015); andiroba oil (*Carapa guianensis*) that was able to cause changes in the ovaries (VENDRAMINI et al., 2012a; B; ROMA et al., 2013A) and in the synganglion in females of the same species (ROMA et al., 2013A; b; 2015); thymol, found in plants of Apiaceae, Lamiaceae and Verbenaceae, such as oregano and thyme, which in addition to causing changes in the ovaries, also worked on the salivary glands, the synganglion and the Gene's organ of the same species (MATOS et al., 2014, 2019, 2020); carvacrol, also found in the same plant families as thymol, was able to inhibit the ovarian development in females of *R. sanguineus* (LIMA de SOUZA et al., 2019); Acetylcarvacrol that also had an effect on the ovary and integument of these ticks (KONIG et al., 2020; OLIVEIRA et al., 2020); the spilantol, extracted from Jambu (*Acmella oleraceae*) has been shown to be effective on the ovaries and midgut of *R. sanguineus* (OLIVEIRA et al., 2019); castor oil esters (*Ricinus communis*) capable of altering the ovaries morphology (ARNOSTI et al., 2011b; SAMPIERI et al., 2012; 2013), and interfering with the morphology of the salivary glands (ARNOSTI et al., 2011A; CAMARGO-MATHIAS et al., 2016); and the ethanol extract of *Tagetes patula* L. that has demonstrated effectiveness on the ovary of ticks *R. sanguineus* (POLITI et al., 2015).

Also, more recent works carried out by Abreu et al. (2020a,b) seeking sustainable strategies to control dog ticks demonstrated that ozone could be employed as a "natural" acaricidal against this species. According to several other authors (FIGUEIREDO et al., 2018; MOREIRA et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2014), the ozone effectiveness against agricultural and food pests, such as *Rhyzopertha dominica* in wheat (SUBRAMANYAM et al., 2017), *Alphitobius diaperinus* on farms (SOARES et al., 2018), and *Ephestia kuehniella* in commercial flours and grains (MORAGLIO et al., 2018), have been confirmed by now. In addition, ozone has also been named in the literature as a crucial oxidizing agent and with a potential antimicrobial action against *Streptococcus mutans* and *Enterococcus faecalis* (MOREIRA FONSECA et al., 2015; NAGAYOSHI et al., 2004) in addition to disinfectant (LOPES et al., 2015), sterilizing (SOUSA et al., 2011), and healing actions (MENÉNDEZ et al., 2011; PEÑA SISTO et al., 2015; SECHI et al., 2001). Several industrial segments have already exploited

these properties, such as the food industry (GUZEL-SEYDIM et al., 2004), the sanitary in hospital environments disinfection (MARSON et al., 2016; SOUSA et al., 2011), and public health in water treatment (MAJEWSKI, 2012; PASSOS et al., 2014).

Ozone (O_3) is a gas resulting from the breakdown of the bonds between oxygen molecules (O_2) due to the ultraviolet radiation incidence and high voltage electrical discharges (MAJEWSKI, 2012). The oxygen atoms, when separated, recombine to form a new molecule with three oxygen atoms (O_3), considered unstable and rapidly degrading in atmospheric air, in response to temperature and pressure conditions (MOREIRA et al., 2017). When discussing pest control, the formation and release of residue that can accumulate either in the non-target organisms or the environment are essential. As for the ozone, the only residue generated is oxygen molecules that do not promote environmental or animal health contamination when used properly (BATAKLIEV et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2014; MOREIRA et al., 2017).

Thus, considering the properties previously indicated concerning the use of ozone, the present study aimed to evaluate whether ozone has acaricidal potential against the species *R. sanguineus* s.l., after exposure (immersion) of engorged females in ozonated water (ozone 3mg/L). The female ticks were evaluated comparatively (control females X exposed females) regarding ozone toxicity confirmation for the following biological parameters: weight of engorged females before oviposition, the weight of the egg mass, and larval hatching rate. Subsequently, morphological changes were also analyzed not only in the female reproductive system (ovary) but also in Gene's organ, responsible for the secretions that waterproof and protect the eggs and keep them aggregated after laying, using histology techniques (hematoxylin and eosin staining) and histochemistry (Schiff reagent and bromophenol blue) analyzed under light microscopy.

2. MATERIAL AND METHODS

All procedures performed here were approved by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA, Institute of Biosciences, UNESP – campus Rio Claro) Protocol No. 26/2018.

Ticks

This study used adult tick females of *R. sanguineus* s.l. obtained from a colony previously established by the BCSTM group (*Brazilian Central of Studies on Ticks Morphology*) and maintained under controlled conditions (29°C, 80% humidity and 12 hours photoperiod) at the Bioterium of the Department of General and Applied Biology of UNESP of Rio Claro, SP, Brazil.

The ticks artificial infestations (BECHARA et al., 1995) were carried out in host rabbits of the Botucatu Genetic Group, obtained from the Central Bioterium of UNESP, Botucatu, SP, Brazil, free from the previous contact with ectoparasite and any acaricide, and kept in restraint cages in a room of the Bioterium of the Department of General and Applied Biology of UNESP of Rio Claro, SP, fed *ad libitum*.

In order to obtain engorged females, 100 females and 50 males were allocated (since the female completes its engorgement only after copulation with the male) in each feeding chamber previously fixed in the shaved dorsal region of the host rabbits. Daily feeding observations were made until the total engorgement occurred to ensure that the females remained fixed. After that, the females were removed from the hosts with the aid of surgical pincers and were subsequently subjected to the immersion test (DRUMMOND et al., 1973) for further evaluation of biological parameters and morphology.

Obtaining ozonated water

It was obtained in the highest concentration (3mg /L) by using an ozone generator model BRO3-Plus 1 (Brasil Ozônio) and an oxygen generator PSA intensity model (AIRSEP), installed in a water tank supplied by SEMAE (Municipal Water and Sewage Service). A digital sensor attached to the ozonated water tank checked the concentration. The procedure was performed in the Laboratory of Pathology and Microbial Control, coordinated by Professor Dr. Italo Delalibera Junior, collaborator of this work, in the Department of Entomology and Acarology, USP ESALQ, Piracicaba, SP, Brazil.

***In vivo* bioessay: Immersion test and biological parameters**

To perform the bioassays, the female ticks of *R. sanguineus* s.l. were allocated in the following groups (5 females/triplicate group out of a total of 15 females/bioassay):

Control Group (**GC**) - engorged females exposed only to distilled water

Treatment Group (**GT**) - exposed to ozonated water at 3mg/L.

The females with homogeneous weight guaranteed by the analytical balance weighing were separated. Ozonated water at 3mg/L concentration was used in the biological parameters assay also based on previously obtained results, which signaled the occurrence of morphological changes both in the integument and in the salivary glands (ABREU et al., 2020 a; b).

For this purpose, the ticks were immersed in glass containers filled with 200 mL of ozonated water (**GT**) or distilled water (**GC**), following the protocol proposed by Drummond

et al. (1973). Five females were immersed for 5 minutes in each group and were dried on absorbent paper to remove excess liquid. Subsequently, they were weighed individually on an analytical balance, and then placed on Petri dishes (150 x 30mm) with a lid correctly identified for subsequent packaging in a BOD Eletrolab El 202 BOD (Biological Oxygen Demand) under controlled conditions ($28 \pm 1^\circ\text{C}$, 80% humidity, with a photoperiod of 12 hours). The control group was allocated to a second BOD, thus avoiding possible interference in the analysis.

The females of each group were monitored daily, including oviposition, to evaluate the biological parameters until they were all dead. The egg masses/female were weighed in an analytical balance, photo-documented under a stereomicroscope, and settled in a 10 mL plastic syringe with the distal end cut, sealed with cotton wool, and packaged in BODs under the same controlled conditions described above.

The study performed the following biological parameters analysis: a) weight of the engorged female before laying, b) weight of the egg mass, and c) hatching rate (% HR), values used to calculate the egg production index (EPI) (BENNETT, 1974) and control rate (DRUMMOND et al., 1973).

Statistical Analysis

The statistical analysis of the data and graphics were performed in the Graphpad Prism 8.0.1 software, using the "ANOVA" variance test followed by the Tukey test to obtain the data considered significant ($p < 0.05$).

Morphological Analysis

Obtaining the organs of *R. sanguineus* s. l. females

After exposure of the females to distilled water (Control Group) and ozonated water at a concentration of 3mg/L (Treatment Group), they were anesthetized by thermal shock in a refrigerator and sequentially dissected in HBSS buffer solution with Mg^{2+} and Ca^{2+} (NaCl 8g; Na_2HPO_4 48mg; KCl 400mg; KH_2PO_4 60mg; CaCl 140mg; MgSO_4 98mg; D-glucose 1,6 g; Penicillin G 100U/mL; Streptomycin 100 μg / mL distilled water 1 liter) in ice, where the organs (ovary and Gona's) were removed. After, the material was conditioned in microtubes containing 100 μL of HBSS and taken to the histology laboratory of the Department of General and Applied Biology of IB, UNESP, Rio Claro, SP, for morphological analysis.

Preparation of histological slides

After collecting the organs, they were fixed in 4% paraformaldehyde for 48 hours in 1.5 mL plastic microtubes. They were then washed three times with 0.1M sodium phosphate buffer, pH 7.4, and dehydrated in increasing series of 70%, 80%, 90%, and 95% ethyl alcohol (30 minutes baths each). Subsequently, they were soaked in Leica resin for a week, included in plastic molds containing resin and polymerizing, and kept in an oven at 37°C until the blocks got polymerized. After this process, the blocks were sectioned with a thickness of 3µm. The sections were collected in glass slides (eight sections/slide) and stored in an oven for subsequent staining.

A) Staining by hematoxylin and aqueous eosin (HE)

For staining, the slides were hydrated in distilled water for one minute, stained with hematoxylin for 10 minutes, and washed for four minutes in standing water and then in running water. Then they were stained by aqueous eosin for five minutes and again washed in running water. The slides were dried at room temperature until the mounting process.

B) Staining by bromophenol blue (protein detection)

For staining with bromophenol blue, the slides were subjected to the stain for one hour at room temperature and subsequently washed in running water for five minutes. Drying occurred at room temperature until the mounting process.

C) Reaction by Schiff Periodic Acid (PAS) (polysaccharides detection)

The slides were covered with 0.4% periodic acid at room temperature for 10 minutes to perform the PAS reaction. They were then washed in distilled water and subjected to Schiff's reagent in the dark for an hour. Subsequently, the slides were washed three times in sulfurous water in 1-minute baths each. Finally, they were washed in running water for 15 minutes and then dry at room temperature until the mounting process.

- Slides mounting and Photo-documentation

After drying, the slides were quickly dipped in xylol, covered with Entellan and a previously cleaned glass plate.

The permanent slides were analyzed and photo-documented in light field photo microscope Leica DM750 allocated in the Department of General and Applied Biology of UNESP of Rio Claro, SP.

3. RESULTS

Biological Parameters

The results obtained from the analysis of the biological parameter of *R. sanguineus* s.l. females exposed to ozonated water (ozone 3mg/L) were submitted to GraphPad Prism 8.0.1 software and are represented in Graph 1 on which we can observe: a) weight of the engorged female before laying, B) weight of the egg mass, c) hatching rate (%HR), d) egg production index (EPI) (Bennett, 1974), e) reduction of oviposition (Roulston et al., 1968), and f) control rate (Drummond et al., 1973). The values of the average and standard deviations of each parameter are presented in Table 1.

Figure 1 is also presented to better compare the results, showing the photographic documentation of the egg masses laid by the females allocated in the control group (Fig.1 A-D) and the treatment group (Fig. 1E-H).

A significant difference was detected when analyzing the weight of engorged females before oviposition of the treatment group (females exposed to ozonated water), which presented a higher weight (249.3 mg) when compared to those in the control group (exposed only to distilled water) (222.9 mg) (Table 1). These data suggest that exposure to ozonated water should stimulate higher egg production by females (Graph 1).

On the other hand, when analyzing the weight of the egg mass, as well as when calculating the egg production index ($EPI = (\text{egg mass} \times 100 / \text{female weight})$), the values were lower in the treatment group (98.8 mg and 39.8%) than in the control group (104.1 mg and 46.8%, respectively). However, these parameters did not show a significant difference (Chart 1). These same values were used to calculate the rate of reduction of oviposition ($RO = (\text{control EPI} - \text{treated EPI} / \text{control EPI} \times 100)$) and showed that there was a 39.8% reduction in the oviposition of females in the treatment group compared to those in the control group (Table 1), signalling that exposure to ozonated water interfered both in egg production and in the oviposition of females exposed to it.

In the larval hatching parameter, the data showed a significant difference between those allocated in the control group (97.3%) and those exposed to ozonated water (78.6%) (Chart 1), allowing us to infer that ozonated water was potentially inhibiting the viability of the eggs.

The control rate (C %) due to exposure to ozonated water and based on all the parameters analyzed here was 33.8% (Table 1).

Specifically, in Figure 1, it is clear the occurrence of morphological difference between the egg masses produced by the females of the control group (Fig.1A-D) and those of the group

exposed to ozonated water at the concentration of 3mg/L (Fig. 1E-H). In the latter (Fig.1E-H), it is noted that the eggs are disaggregated, besides having more intense brown coloration than those laid by the females of the control group (Fig. 1A-D). Also, morphologically these eggs laid by females exposed to ozonated water presented an opaque appearance, indicating the occurrence of dehydration (Fig.1E-H).

Table 01 – Average and standard deviation of a) weight of females before laying, B) weight of egg mass, c) egg production index and D) reduction of oviposition, e) larvae hatching rate, and F) control rate of *Rhipicephalus sanguineus* s.l. ticks exposed to ozonated water (3mg/L), under laboratory conditions (28±1°C and 80±10% UR). Averages that differed significantly by 5% (p<0.05) are represented by the letter a.

	Weight of females before laying (mg)	Weight of egg mass (mg)	Egg production index (EPI - %)	Reduction of oviposition (RO-%)	Larvae hatching rate (%)	Control rate (C%)
Control Group (CG)	222,9±2,3 ^a	104,1±5,2	46,8±2,3	0,0±0,0	97,3±3,7 ^a	0,0±0,0
Tratament Group (TG)	249,3±1,9 ^a	98,8±4,5	39,8±1,8	39,8±1,8	78,6±2,6 ^a	33,8±4,7

Table 02 – Histochemical analysis of proteins (bromophenol blue) present in the ovaries of *R. sanguineus* engorged females from the control and treatment groups (exposed to 3mg/ml ozonated water).

	Control Group (CG)			Tratament Group (TG)		
	Germinal Vesicle	Yolk Granules	Chorion	Germinal Vesicle	Yolk Granules	Chorion
Oocyte stage I	+	No granules	-	++	No granules	-
Oocyte stage II	+	++	+	+	+	+
Oocyte stage III	+	++	++	+	+	+
Oocyte stage IV	-	+++	++	-	++	+
Oocyte stage V	-	+++	+++	-	+	++

(-) negative / absent, (+) weakly positive, (++) moderately positive, (+++) strongly positive.

Table 03 – Histochemical analysis of polysaccharides (PAS) present in the ovaries of *R. sanguineus* engorged females from the control and treatment groups (exposed to 3 mg/ml ozonated water).

	Grupo Controle (GC)			Grupo Tratamento (GT)		
	Germinal Vesicle	Yolk Granules	Chorion	Germinal Vesicle	Yolk Granules	Chorion
Oocyte stage I	-	No granules	-	-	No granules	-
Oocyte stage II	-	+	+	-	++	-
Oocyte stage III	-	++	+	-	++	+
Oocyte stage IV	-	+++	++	-	++	+
Oocyte stage V	-	+++	++	-	++	+

(-) negative / absent, (+) weakly positive, (++) moderately positive, (+++) strongly positive.

Table 04 – Histochemical analysis of proteins (bromophenol blue) and polysaccharides (PAS) present in the tubular glands of *Gene's* organ of *R. sanguineus* engorged females from control and treatment groups (exposed to 3mg/ml ozonated water).

	Control Group (CG)		Tratament Group (TG)	
	Proteins (Bromophenol)	Polyssaccharides (PAS)	Proteins (Bromophenol)	Polyssaccharides (PAS)
Basal Membrane	+++	+	++	-
Cytoplasm	++	+	+	+
Nuclei	++	+++	+	+
Central Lumen	+	+	++	++

(-) negative / absent, (+) weakly positive, (++) moderately positive, (+++) strongly positive.

Graph 1. Biological parameters of *Rhipicephalus sanguineus* s.l. engorged females exposed to ozonated water (3mg/L). The values represent the average and the standard deviation. (*) For values that differ significantly by 5% ($p < 0.05$).

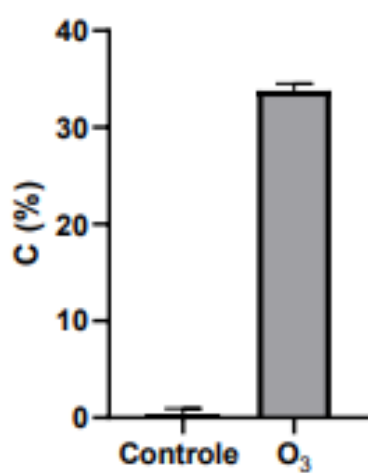
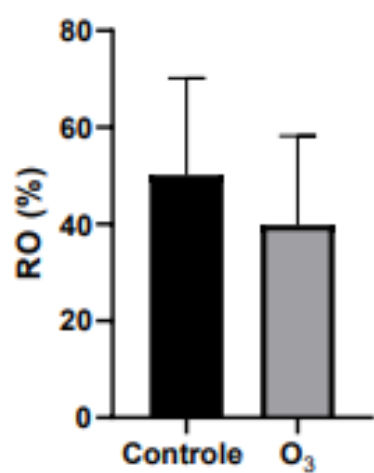
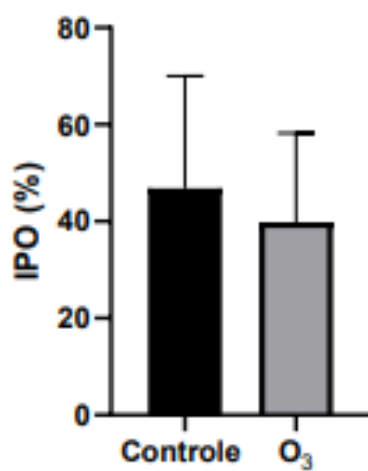
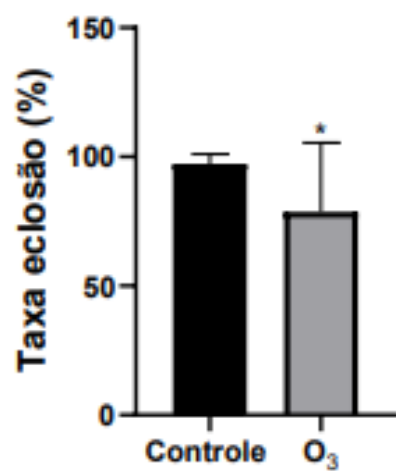
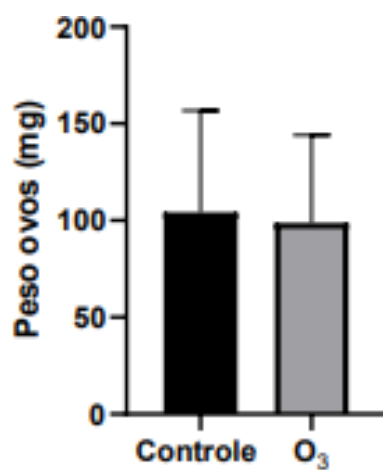
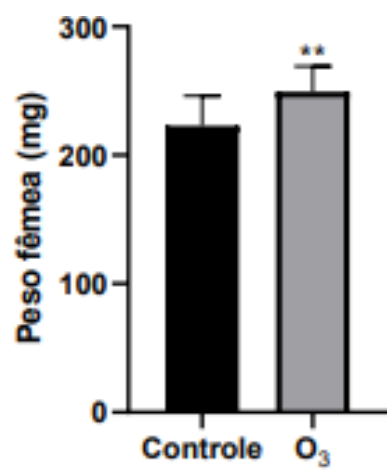


Figure 1 – Photomicrography of egg masses produced by *R. sanguineus* s.l. engorged females exposed to distilled water (Control Group) (A-D) and ozonated water at an ozone concentration of 3mg/L (Treatment Group O₃) (E-H).

Control

O₃

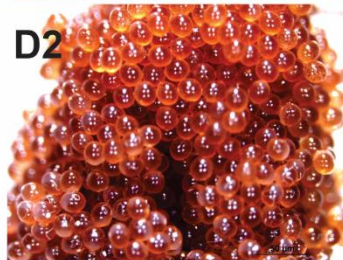
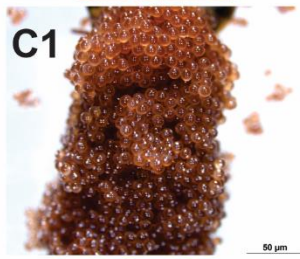
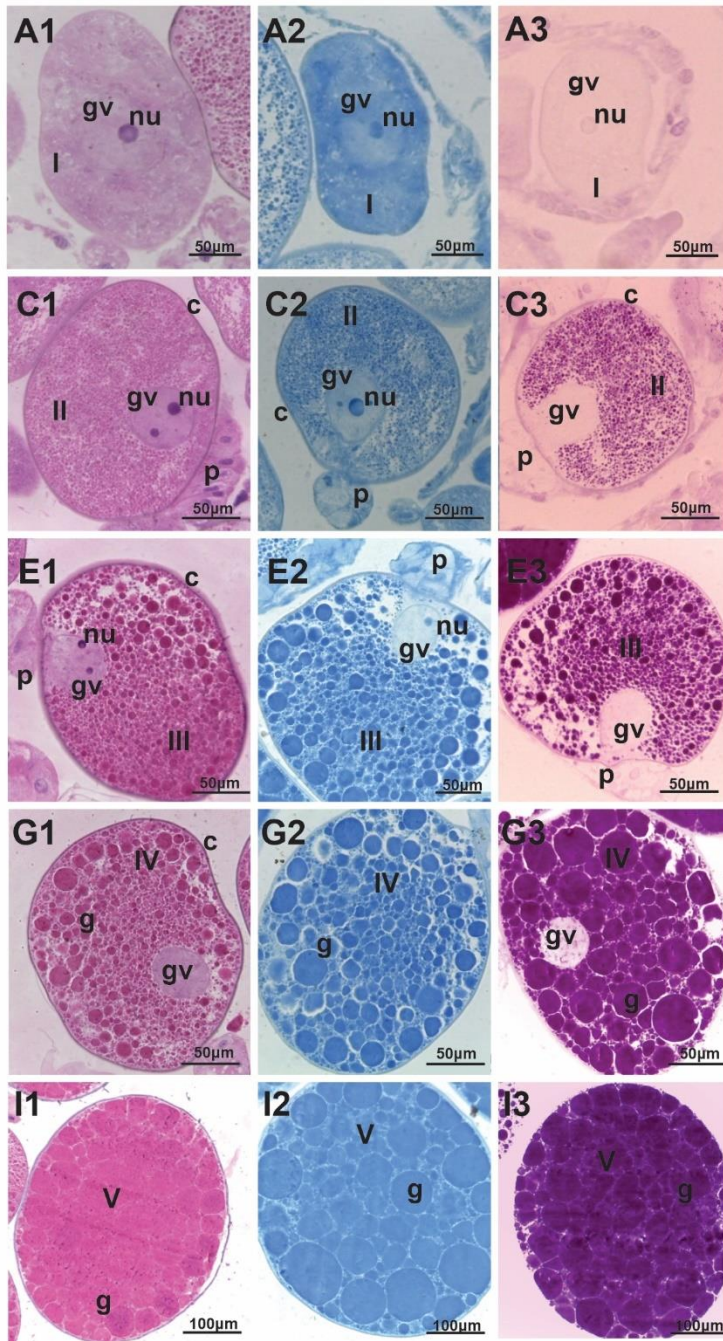


Figure 2 –Ovary histological sections of *R. sanguineus* s.l. engorged females exposed: to distilled water (Control Group) and ozonated water at an ozone concentration of 3mg/L (Treatment Group O₃).1- Staining with HE; 2-Bromophenol Blue; 3- PAS. **I**= oocyte stage I; **II**= oocyte stage II; **III**= oocyte stage III; **IV**= oocyte stage IV; **V**- oocyte stage V; **c**= chorion; **g**= yolk granules; **nu**= nucleolus; **p**= pedicel; **va**= vacuolation; **gv**= germinal vesicle; **big black arrow**= deformations in the chorion; **small black arrow**= weakly colored granules.

Control



O₃

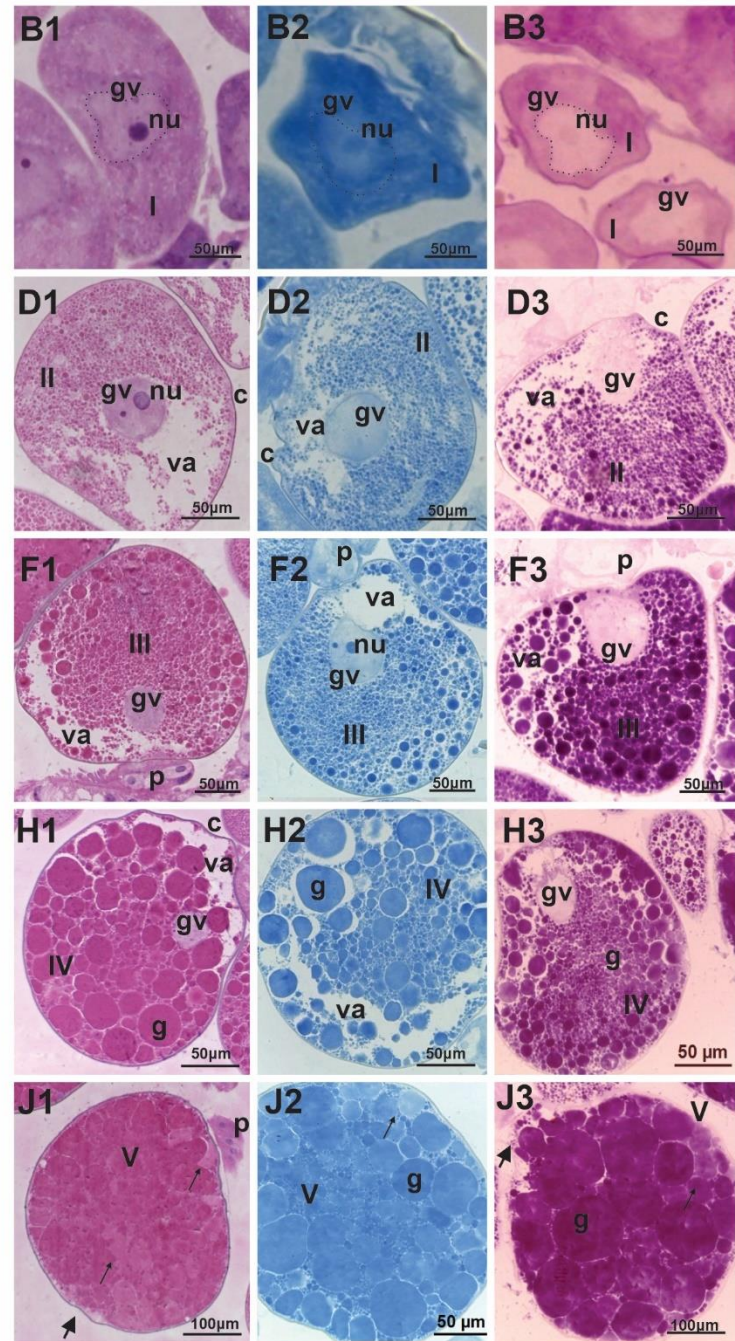
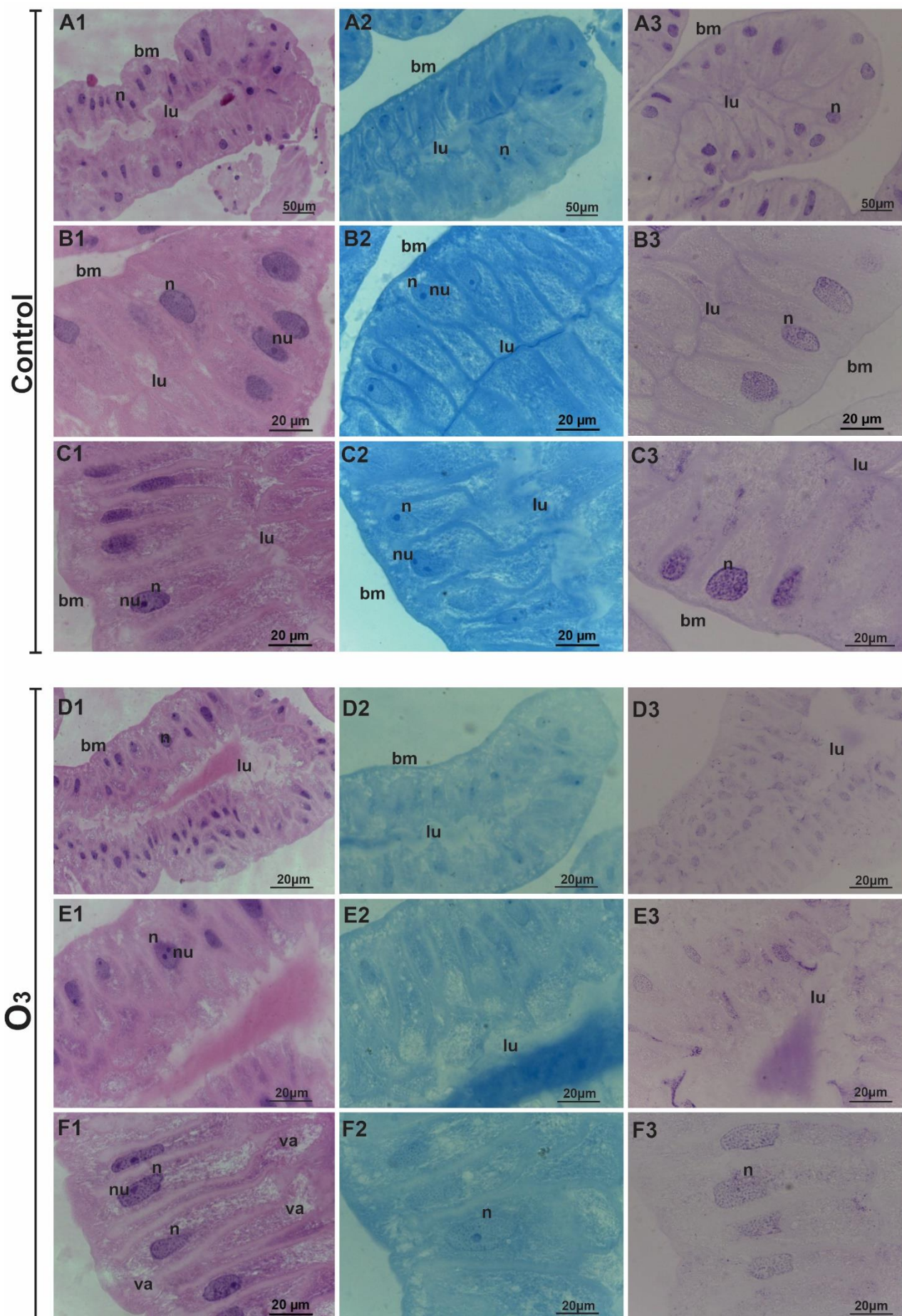


Figure 3 – Histological sections of the Gene's organ's tubular glands of *R. sanguineus* s.l. engorged females exposed: to distilled water (Control Group) (A-C) and ozonated water at an ozone concentration of 3mg/L (Treatment Group O₃) (D-F). 1- Staining with HE; 2- Bromophenol Blue; 3- PAS. **bm**= basal membrane; **lu**= lumen; **n**= nucleus; **nu**= nucleolus; **va**= vacuolation.



Morphological analysis

Histology of the ovary of *R. sanguineus* s.l. engorged females

A) Control Group

The obtained results from the histological analysis of the ovaries of *R. sanguineus* s.l. engorged females allocated in the control group corroborate those previously described by Oliveira et al. (2005) for this same species. Thus, the description of the characteristics of oocytes of *R. sanguineus* s.l. in the control group is cited below only for comparison purposes against those found in the treatment group:

Oocyte I

It is the smallest germ cell due to its stage of development, having an elliptical shape and housing the germinal vesicle (nucleus) in its cytoplasm, centrally located and with an evident nucleolus. Oocytes I present homogeneous cytoplasm since vitellogenesis is at the beginning and thus without the presence of large yolk granules (Fig.2 A1-3).

Oocyte II

It is a larger cell than the one in stage I, also elliptical and with the germinal vesicle located in the central region and with an evident nucleolus (Fig.2 C1). In addition to the larger size, this stage of development differs from stage I by the beginning of vitellogenesis, where small yolk granules can be observed. However, the general appearance of the cytoplasm of this oocyte is still homogeneous (Fig.2 C1-3).

Oocyte III

The cell has an intermediate size between the most immature stages (I and II) and the mature ones (IV and V). The shape ranges from elliptical to round, with the germinal vesicle still visible and occupying the cytoplasm portion near the pedicel. Yolk granulation can already be observed with more intensity since the granules present different sizes and colorations when subjected to histological techniques. It should be noted that the smaller ones prefer a location in the center and the larger ones in the cellular cortex (Fig.2 E1-3). Besides, at this stage, the cell boundary coloration of the oocytes suggests the first indications of chorion deposition (the external protective membrane that surrounds the mature oocyte and is responsible for protection against desiccation, mechanical shocks, predation, and gas exchange of the embryo with the environment) (Fig.2 E1-3).

Oocyte IV

In this stage, oocytes are larger cells than those in the previous stages, with a rounded shape and visible germinal vesicle, still in the cytoplasmic region near the pedicel cells. Yolk granulation is very evident and occupies the entire length of the cytoplasm (Fig.2 G1-3).

Oocyte V

The germ cell is more prominent and rounded in shape. Its cytoplasm is fully taken by yolk granules of different sizes and colorations, preventing the visualization of the germinal vesicle (Fig.2 I1-3). The chorion is already entirely deposited (Fig. 2 I1-3).

B) Treatment Group

The oocytes of *R. sanguineus* s.l. females exposed to 3mg/L ozonated water showed morphological changes, which are described below:

Oocyte I

There was an alteration in the shape of the cell that was previously elliptical, now becoming irregular. The cytoplasm of these cells was homogeneous and without yolk granules. However, it was more strongly stained by eosin when compared to control. As in the cell, morphological changes were also observed in the germinal vesicle, such as its shape. Nucleoli could be observed (Fig. 2 B1-B3).

Oocyte II

They suffered even more severe changes since their size had suffered hypertrophy, and their shape had changed from elliptical/rounded to irregular (Fig.2 D1-D3). In the cytoplasm of these cells, the emergence of extensive vacuolated areas was noted mainly in the region around the germinal vesicle, which was close to the oocyte/pedicel contact (Fig.2 D1-D3). It can also be observed that the changes suffered by the oocyte caused deformations in the chorion (Fig.2 D2).

Oocyte III

The III oocytes had their rounded shape maintained, as well as the location of the germinal vesicle. However, it was noted that the yolk granules were irregularly distributed in

the cytoplasm. That is, as well as in the previous stage, extensive cytoplasmic vacuolation was observed, mainly in the cortex of the oocyte near the oocyte/pedicel contact (Fig.2 F1-3).

Oocyte IV

These cells had an irregular shape, marked mainly by deformations in the chorion (Fig.2 H1). The cytoplasm has shown vacuolation in several locations, including between the yolk granules, causing spacing between them (Fig.2 H1-3). The granules had a heterogeneous appearance, with different sizes and coloration, but with a predominance of small granules (smaller) than those found in the control group. The germinal vesicle also had its shape altered/irregular (Fig. 2 I1 and I3).

Oocyte V

The cells in this stage were irregular in shape and with an irregular chorion (Fig. 2 J1 and J3). The yolk granules had a hardly visible boundary, suggesting rupture and content overflow. Also, they reacted differently to the stain used due to change in their content, confirmed by histochemical analyses (Fig. 2 J1) (Tables 2 and 3).

Histochemistry of the ovary of *R. sanguineus* s.l. engorged females

The results concerning the histochemical analysis for detecting polysaccharides (PAS) and proteins (bromophenol blue) in the oocytes of *R. sanguineus* s.l. engorged females of the Control and Treatment groups (exposed to 3mg/L ozonated water) were summarized in Tables 2 and 3 to facilitate understanding and better comparison.

The *R. sanguineus* s.l. females from the control group had their oocytes in all stages positively marked for proteins and polysaccharides (Fig.2).

Differently, in the females' oocytes of the treatment group, variations in the intensity of the marking for proteins were observed using bromophenol blue stain (Fig.2). Specifically, oocyte I had its cytoplasm more strongly marked when compared with that of the control group indicating greater synthesis of protein granules at this stage. In the other stages, especially in the more mature oocytes (IV and V), the cytoplasmic granules and chorion had less reaction to the stain than the control, suggesting a change in the synthesis and distribution of yolk proteins (Table 2).

Regarding polysaccharides (PAS) (Fig.2), oocytes I and II of the treatment group showed strongly positive yolk granulation throughout the cytoplasm. On the contrary, in the

more mature stages (IV and V), the marking for SBP was weak in the yolk granules and the chorion, signaling changes in the synthesis and release of polysaccharide secretions as a result of exposure (Table 3).

Histology of Gene's organ of *R. sanguineus* s.l. engorged females

The Gene's organ morphology of *R. sanguineus* s.l. has been previously described by Matos et al. (2019). In this work, we use this author's description to compare the results obtained from the exposure of females to ozonated water (GT).

Although Gene's organ, according to Matos et al. (2019), is composed of tubular (tentacles) and accessory glands (acinar portion), only the tubular ones of the exposed females are histologically analyzed in this work. They are responsible for synthesizing and secreting lipoprotein compounds deposited on the eggs as soon as the laying occurs. Thus, they remain united and in a humid environment, avoiding or minimizing the loss of water, microorganisms' interaction, and other external environment adversities.

A) Control Group

Morphologically, Gene's organ's tubular glands (tentacles) have a simple epithelium of secretory cells (columnar) supported by a basal membrane. This epithelium is arranged to form a tube in the lumen of which secretions are released. The cellular boundaries of secretory cells can be easily distinguished (Fig.3 A1 and B1).

In the cytoplasm of these cells, most of the secretion granules, according to Matos et al. (2019), are lipid and therefore does not stain by HE (Fig.3 B1 and C1). In their apical portion, a narrowing is observed. According to Matos et al. (2019), it results in the formation of vesicles containing secretion that are subsequently released into the central lumen of each gland. The nuclei of these cells are oval and with an evident nucleolus (Fig. 3 A1, B1, and C1).

B) Treatment Group

In Gene's organs of females exposed to 3mg/L ozonated water, changes in the tubular gland were detected, which included: the epithelium disorganization (Fig.3 D1-3), which, under light microscopy, appears to have undergone stratification. The cells also have changed morphologically, especially in their size, consequently modifying the organization of the cells in the epithelium (Fig.3 E1). Intense vacuolation was observed in the cytoplasm, especially in the basal and apical regions of the cells (Fig.3 E1 and F1). The secretion present in the lumen

of the tubular glands was more intensely marked by eosin than that observed in the control group (Fig. 3D1).

Histochemistry of Gene's organ of *R. sanguineus* s.l. engorged females

The histochemical analysis results for detecting polysaccharides (PAS) and proteins (bromophenol blue) in Gene's organ of *R. sanguineus* s.l. engorged females referring to the control and treatment groups (exposed to 3mg / L ozonated water) were organized in Table (Table 4) for better understanding and comparison.

The Gene's organ's tubular glands histochemistry of females in the treatment group showed changes in these structures concerning protein and polysaccharide synthesis. The basal membrane where the secretory epithelium is supported, the cytoplasm, and the cell nuclei were weakly stained by both bromophenol blue (proteins) and PAS (polysaccharides) (Fig.3). However, due to the lumen diameter increase, there was also a more significant accumulation of secretion, being strongly stained when comparing these data with those of the control group (Fig.3 and Table 4).

4. DISCUSSION

Studies addressing the actions of ozone gas (O₃) have gained focus in the scientific world since it has the potential to act in various spectra such as antimicrobial, disinfectant, sterilizer, healing, and recently insecticide/acaricide for its ability to control agricultural pests (CAMPABADAL; MAIER; MASON, 2013; DA SOARES et al., 2018; GUZEL-SEYDIM; GREENE; SEYDIM, 2004; MOREIRA FONSECA et al., 2015; ROZADO et al., 2008; SUBRAMANYAM et al., 2017). Furthermore, in previous studies conducted by Abreu et al. (2020a, b), it was confirmed that this gas could potentially act against ticks of the species *R. sanguineus* s.l., popularly known as dog ticks. This last information comes from bioassays that used ozonated water applied in semi-engorged females, which caused morphophysiological changes in the salivary glands and the integument of this species (ABREU et al., 2020a,b). This information served as feedback for the evaluation of the biological parameters of *R. sanguineus* s.l. engorged females exposed to ozonated water (ozone 3mg/L), mainly focusing on the female reproductive system and Gene's organ. The latter is essential in synthesizing and releasing viscous secretions that protect females' eggs newly placed in the soil. The aim is to light data that would allow us to use this gas to ticks control in the medium-term future.

In general, the present work exposed engorged females of *R. sanguineus* s.l. to ozonated water, sought to obtain data on the following biological parameters: a) weight of the engorged female before laying, b) weight of the egg mass, c) larvae hatching rate, d) index of egg production, e) oviposition rate, and f) final control rate in addition to analyzing the morphophysiological changes in the ovary and Gene's organ of these females.

These bioassays accomplishment allowed us to affirm that ozonated water would have the potential to act as a dog tick control agent, since in addition to interfering with biological parameters, it also caused morphological damage, confirmed both histologically and histochemically, to the reproductive system and Gene's organ of the females exposed to it.

The biological parameters result of the Treatment Group showed that although the weight of the engorged females was significantly higher than those of the Control Group (249.3 ± 1.9) when the weight of the egg mass of these females was analyzed, it presented a lower value (98.8 ± 4.5) with a lower egg production index (39.8 ± 1.8) compared to the control (104.1 ± 5.2 ; 46.8 ± 2.3 , respectively). These data suggest that ozonated water changed the reproduction parameter in exposed females, confirmed by a 39.8% reduction in their oviposition rate. Other authors had already obtained data regarding the ozone action in tick females, such as Figueiredo et al. (2018), for example, who exposed *R. microplus* tick engorged females to ozone in the gaseous state and the concentration of 62mg/L, verifying that the mortality rate of females varied between 80 and 100%. According to the same authors, exposure to gas caused damage to ovarian and tegumentary tissues, which consequently caused a reduction in oviposition rates of these females.

The data presented here also confirmed that there was a significant drop in the larvae hatching rate in the Treatment Group (78.6 ± 2.6) when compared to those in the Control Group (97.3 ± 3.7), signaling that ozonated water would also reduce the number of viable eggs in the generation of a new individual. Studies carried out by other authors using insects as a model have also shown that ozone would have the ability to reduce the egg viability rate in some species. Moraglio et al. (2018) stated that ozone, in addition to causing a higher mortality rate in adults of the species *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae), also interfere in the time that the larvae would take to hatch since the same would be longer than when measured in a normal situation. Besides, the unviable eggs rate would be around 30% when females were exposed to ozone at the concentration of 50 ppm. From this perspective, other authors such as McDonough et al. (2011), who also carried out studies with other agricultural pests such as *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae), *Indianmeal moth* (*Plodia*

interpunctella (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae), *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) and *S. oryzae* (L.) (Coleoptera: Curculionidae) by exposing them to different ozone concentrations in distinct periods, recorded a drop in the hatching rate, as well as high mortality of adults and larvae of all these species. This data has led the authors to postulate that the higher the ozone gas concentration, the lower the time required for the insect's exposure to get 100% mortality/non-viability of the eggs, larvae, and adults.

The present study confirmed that the ozonated water acts on the performance of the biological parameters of *R. sanguineus* s.l. engorged females as a promising control agent by observing the decrease of the oviposition rate and the larvae hatching rate of exposed females. This data contradicts those obtained by Szabó et al. (2009) that, exposing engorged females of this same species to ozone in a gaseous state, they recorded absence of acaricidal action, since the gas did not negatively alter biological parameters such as weight of the egg mass, the weight of the engorged females before oviposition and larvae hatching rate. The data obtained by Szabó et al. (2009) resulted from using ozone gas in the concentration of 0.23 mg/L at a gaseous state. In the present study, ozone was used in a concentration of 3mg/L, diluted in water, which may have influenced the results. Consequently, the ozone concentration in the bioassays of Szabó et al. (2009) was not efficient in controlling this tick species. It should also be noted that ozone, when physically diluted in water, has part of its molecules decomposed in a matter of seconds, but part of them remains stable for up to a few hours. As a result of this molecular decomposition process, there would be the generation of a series of radicals with oxidizing potential, which would trigger biochemical reactions, data confirmed by performing bioassays both *in vivo* and *in vitro* (BOCCI; VIA, 2004).

Thus, the biological parameters that were evaluated after exposing engorged females of *R. sanguineus* s.l. to ozonated water at the concentration of 3mg/L demonstrated that ozonated water reached about 33.8% of ticks in the laboratory. This rate is still considered low when talking about control compared with the efficiency of synthetic commercial chemical acaricides commonly in the veterinary market. Other studies conducted with ticks exposed to other natural acaricides such as thymol, for example, also analyzing the biological parameters of females, resulting in a rate of control equal to 19.8% when applied thymol at the concentration of 5mg/mL and 98% when applied at the concentration of 20mg/mL (MATOS et al. 2020). These results corroborate the hypothesis here postulated that the use of ozone diluted in water would be a strategic option for tick control.

Simultaneously with the data obtained on biological parameters, the present study performed a morphohistochemical evaluation of the oocytes and Gene's organ of *R. sanguineus* engorged females exposed to 3mg/L ozonated water confirming the occurrence of changes due to exposure.

The females suffered morphological changes in the oocytes at all stages (I-V) in the treatment group. In the immature ones (I and II), the main changes have been the deformation of these germ cells and their nucleus (germinal vesicle). This data leads us to conclude that oxidative stress caused by exposure to ozone (3mg/L ozonated water) achieved these cells, most likely due to its vulnerability, since they would be more susceptible to the action of external agents upon the ovary, mainly due to the absence (in the case of the oocyte I), or at the beginning (in the oocyte II/III) of the chorion deposition. This protective membrane achieves a higher synthesis rate from stage IV. It would have the function, among others, to select/stop elements from entering the cells that may be harmful to the future embryo and, possibly, likely to cause structural damage to the cells. Similar results were found in other studies conducted by Oliveira et al. (2009, 2016), Roma et al. (2010), Vendramini et al. (2012), which analyzed oocytes from *R. sanguineus* exposed to synthetic acaricides such as fipronil, dinotefuran, permethrin, and the natural compound andiroba oil (*Carapa guianensis*), respectively.

In those females exposed to ozonated water, the oocytes in more advanced stages of development (III, IV, and V) underwent modifications that included change in the shape of the germ cell, which acquired an irregular contour, change in the chorion, changes in the form and content of the yolk granules, which went from rounded to irregular. It was also observed that they were immersed in an intensely vacuolized cytoplasm, mainly in the cortical region of the oocytes, next to the oocyte/pedicel connection. These changes indicated that, although chorion synthesis had already started (stages II/III) or even had already been terminated (stage V), ozone still caused damage in these cells.

The intense cytoplasmic vacuolation found in this work and according to literature, it could represent a cell strategy to optimize the process of turnover (recycling) of damaged portions of the cytoplasm (either by ozone or by another factor), of isolating organelles that were non-viable or even isolating the toxic compound or its metabolic remains. That way, the cell still had a chance to survive and generate a new individual (DENARDI et al., 2012).

In the available literature, records demonstrate that other acaricidal agents of a non-synthetic nature also acted on the oocytes of *R. sanguineus* females in these same stages of maturation, causing intense cytoplasmic vacuolation in these cells. Among these authors, we

can mention Matos et al. (2014), who exposed females of the same species to thymol; Lima de Souza et al. (2019), who exposed females of *R. sanguineus* to carvacrol; and Oliveira et al. (2019), who exposed them to jambu extract (*Acmella oleracea*). Also, according to Oliveira et al. (2007), the presence of these vacuoles in the cytoplasmic portion near the pedicel could be for the toxic agent, ozonated water, in this case, reaching the oocyte inside via pedicel cells, which primarily had the functions of attaching the oocytes to the ovary wall, and synthesizing part of the elements of the yolk. The pedicel cells would then transfer the yolk components of an exogenous source (from outside the oocyte/hemolymph) that, combined with those the oocyte itself synthesizes (endogenous source), would compose the final yolk (with protein, polysaccharide, and lipid elements) (ROMA et al., 2010). In the specific situation of exposure to ozonated water, these pedicel cells could be not so selectively intermediating the entry/exit of elements from the external medium (hemolymph) to the internal (cytoplasm) of the oocyte, and vice versa.

It was also observed that exposure to ozonated water altered the morphology and content of yolk granules. The same ones that previously had a rounded shape became irregular and smaller, suggesting interference in the cell synthesis/incorporation capacity of the main elements of the yolk due to exposure to ozonated water. These results corroborate Oliveira et al. (2019), who also observed changes in yolk granules in oocytes in stages III-V after exposure of *R. sanguineus* females to jambu extract (*Acmella oleracea*). According to the authors, these changes would impair fertilization success (OLIVEIRA et al. 2019).

Oocytes in stage V of development were the cells that suffered the most morphological changes due to exposure. Their yolk granules showed hardly visible boundaries, mainly suggesting that they were breaking or, in some situations, merging. This result was also observed by Vendramini et al. (2012a) when assessing the effects of *Carapa guianensis* (andiroba) on the ovary of *R. sanguineus* s.l. semi-engorged females. It led the authors to postulate that this phenomenon would be a cell strategy that, in an attempt to eliminate toxic substances from its interior, would also eliminate part of the substances that would be important for vitellogenesis, thus interfering in the process of embryonic development (VENDRAMINI et al. 2012).

As in yolk granules, also oocytes in more advanced stages of maturation, coming from females exposed to ozonated water, showed changes in the chorion, such as wrinkling due to its detachment from the cytoplasmic membrane. This change is of significant importance since the chorion role is directly linked to protecting the germ cell that spawns a new individual,

providing mechanical protection against shocks, invasion of microorganisms, dehydration, temperature variation, and predation (OLIVEIRA et al. 2008). By compromising this membrane, some of these functions are impaired, which undoubtedly hinder the passage of oocytes to the following stages of development and make them more vulnerable to environmental adversities.

Histochemically, the analyzes for the detection of polysaccharides (PAS) and proteins (bromophenol Blue) performed here confirmed changes in the protein and polysaccharide elements synthesis of the yolk, since oocytes in all stages of development and especially those in the most advanced stages (IV and V), had the cytoplasmic granules and the chorion reacting weakly to both the bromophenol blue stain (proteins) and PAS (polysaccharides), suggesting an alteration in the synthesis and distribution of yolk elements in the granules. Except for oocyte I, which showed a cytoplasm strongly marked by bromophenol blue and PAS, the data obtained here indicated a more remarkable presence/synthesis of protein and polysaccharide granules at this stage, which could have occurred due to the imbalance caused by the toxic agent (ozonated water). The histochemical data obtained confirm those of the studies carried out in ovaries of *R. sanguineus* exposed to synthetic acaricides. Such as dinotefuran, by Oliveira et al. (2016); permethrin, by Roma et al. (2011), in addition to other authors who exposed females of this same tick species to natural acaricides such as andiroba oil (*Carapa guianensis*) by Vendramini et al. (2012); thymol by Matos et al. (2014); jambu (*Acmella oleracea*) by Oliveira et al. (2019), and acetylcarvacrol by König et al. (2020).

When the morphophysiological analyses of Gene's organ were performed, it can be confirmed that the females of the treatment group, exposed to 3mg/L ozonated water, suffered changes in the morphology of their tubular glands. These glands had already been extensively studied by Matos et al. (2020), who recorded that they would be composed of a simple cylindrical epithelium formed by secretory cells that would delimit a central glandular lumen. According to the authors, this organ would be vital in the synthesis and secretion of lipoprotein compounds, which would be deposited on the eggs immediately after laying, so that they remained together and protected against water loss, the action of microorganisms, and other changes in the environment (MATOS et al., 2020).

Among the changes detected in the tubular glands of the exposed females, it was observed that the secretory epithelium underwent cellular disorganization and stratification, which could undoubtedly cause physiological changes in the secretory epithelial cells and interfere with the general function of the organ. Other works developed by Abreu et al. (2020)

involving the analysis of the integument of females of this same tick species exposed to ozonated water also showed that the integumentary epithelium in some areas of the body of exposed females would undergo stratification due to metaplasia. This phenomenon would mainly alter the function of basal epithelial cells, directly affecting the synthesis and secretion processes of cuticle compounds.

In addition to these changes in the glandular epithelium of Gene's organ, it was found that the cytoplasm of secretory cells presented intense vacuolation, especially in the basal and apical regions, suggesting that this would be a cell survival strategy by isolating toxic compounds and even damaged parts of the cytoplasm, packaging this material in autophagy vacuoles, a hypothesis that supports Dernardi et al. (2012). Other authors investigating the toxic action of natural acaricidal compounds in this same tick species found similar results, such as Remédio et al. (2014) and Lima de Souza et al. (2017). They observed cytoplasmic vacuolation in integument epithelial cells of *R. sanguineus* exposed to neem extract (*Azadirachta indica*). Oliveira et al. (2020) in epithelial cells in the integument of *R. sanguineus* exposed to acetylcarvacrol; and Matos et al. (2020), which even reported cytoplasmic vacuolation in the cells of Gene's organ's tubular glands of engorged females exposed to thymol, a bioactive found in plants such as thyme and oregano.

The results obtained here also demonstrated that exposure to ozonated water caused dilation in the lumen of Gene's organ's tubular glands with a concomitant increase in the staining intensity of the secretion present inside it, confirmed by the use of histochemical techniques for protein marking (bromophenol blue) and polysaccharides (PAS). The results showed a strong positive marking in the secretion accumulated in the glandular lumen and a weak positive marking in the secretory cells' basal membrane and cytoplasm, both for proteins and polysaccharides. These data indicate that despite the weak protein and polysaccharide marking in the secretory cells of the tubular glands, possibly due to structural and physiological damage caused to the epithelium, the cells were still efficient in the synthesis and release of the secretion, probably stimulated by the toxic substance in the system, which would justify its accumulation in the glandular lumen.

The data presented in this study demonstrate that ozonated water in the concentration of 3mg/L has the potential to cause not only morphophysiological changes in oocytes and Gene's organ's tubular glands in exposed females of *R. sanguineus* s.l. but also to its biological parameters (egg mass, egg production index and larval hatching rate), suggesting that the

changes reported here would bring significant impairment in the reproduction process of this ectoparasite (direct interference in oogenesis and the vitellogenesis dynamics).

Acknowledgments

The authors are grateful to FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), grant no. 2018/02999-9 and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) for the financial support.

Declaration of Interest Statement

The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

ABREU, M. R. et al. Exposure of Ticks *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari : Ixodidae) to Ozonated Water : Integument Response. **Ozone: Science & Engineering**, v. 00, n. 00, p. 1–10, 2020.

ABREU, M. R. Morphophysiological analysis of the salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari : Ixodidae) exposed to ozonated water : A control strategy. **Medical and Veterinary Entomology**, p. 1–9, 2020.

BATAKLIEV, T. et al. Ozone decomposition. **Interdisciplinary Toxicology**, v. 7, n. 2, 2014.

BOCCI, V.; VIA, A. Ozone as Janus : this controversial gas can be either toxic or medically useful. v. 13, n. February, p. 3–12, 2004.

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

CAMPABADAL, C. A.; MAIER, D. E.; MASON, L. J. Efficacy of fixed bed ozonation treatment to control insects in stored bulk grain. **Applied Engineering in Agriculture**, 2013.

CARDOSO, L. D. et al. Caracterização de *Rickettsia* spp. circulante em foco silencioso de febre maculosa brasileira no Município de Caratinga, Minas Gerais, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 22, n. 3, p. 495–501, 2006.

CUNHA, N. C. et al. First identification of natural infection of *Rickettsia rickettsii* in the *Rhipicephalus sanguineus* tick, in the State of Rio de Janeiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, p. 105–108, 2009.

SOARES, C. E. S. et al. Use of ozone gas as a green control alternative to beetles *Alphitobius diaperinus* (panzer)infestation in aviary bed utilized in the poultry industry. **Chemical Engineering Transactions**, 2018.

DANTAS-TORRES, F. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): From taxonomy to control. **Veterinary Parasitology**, 2008.

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

DANTAS-TORRES, F.; OTRANTO, D. Further thoughts on the taxonomy and vector role of *Rhipicephalus sanguineus* group ticks. **Veterinary Parasitology**, v. 208, n. 1–2, p. 9–13, 2015.

DENARDI, S. E. et al. 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**, 2012.

FIGUEIREDO, T. F. B. et al. Effect of Ozone on Engorged *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) Females During the Pre-Laying Period Effect of Ozone on Engorged *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) Females During the Pre-Laying Period. **Ozone: Science & Engineering**, v. 00, n. 00, p. 1–8, 2018.

GRAY, J. et al. Systematics and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. **Ticks and Tick-borne Diseases**, 2013.

GUZEL-SEYDIM, Z. B.; GREENE, A. K.; SEYDIM, A. C. Use of ozone in the food industry. **LWT - Food Science and Technology**, v. 37, n. 4, p. 453–460, 2004.

IPEK, A. et al. Molecular Evidence for Transstadial Transmission of *Ehrlichia canis* by *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato Under Field Conditions Molecular Evidence for Transstadial Transmission of *Ehrlichia canis* by *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato. v. 55, n. 2, p. 440–444, 2020.

LATROFA, M. S. et al. Molecular detection of tick-borne pathogens in *Rhipicephalus sanguineus* group ticks. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 5, n. 6, p. 943–946, 2014.

LOPES, M. S. et al. Disinfection of corrugated tubing by ozone and ultrasound in mechanically ventilated tracheostomized patients. **Journal of Hospital Infection**, v. 90, n. 4, p. 304–309, 2015.

MAJEWSKI, J. Methods for measuring ozone concentration in ozone-treated water. **Przegląd Elektrotechniczny (Electrical Review)**, n. 9, p. 253–255, 2012.

MARSON, R. F. et al. Use of Ozonated Water for Disinfecting Gastrointestinal Endoscopes. **Ozone: Science and Engineering**, v. 38, n. 5, p. 346–351, 2016.

MENÉNDEZ, S.; FALCÓN, L.; MAQUEIRA, Y. Therapeutic efficacy of topical OLEOZON ® in patients suffering from onychomycosis. **Mycoses**, v. 54, n. 5, p. 272–277, 2011.

MORAGLIO, S. T. et al. Effect of ozone gas against life stages of *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) in laboratory and a storehouse. **Journal of Stored Products Research**, 2018.

MOREIRA FONSECA, P. M. et al. Disinfection of Dental Instruments Contaminated with *Streptococcus mutans* Using Ozonated Water Alone or Combined with Ultrasound. **Ozone: Science and Engineering**, v. 37, n. 1, p. 85–89, 2015.

MOREIRA, L. H. et al. Effect of Ozone as Acaricide: Action of the Ozone on the Cuticle and Respiratory Spiracle of Tick *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato. **Ozone: Science & Engineering**, v. 00, n. 00, p. 1–8, 2017.

NAGAYOSHI, M. et al. Antimicrobial effect of ozonated water on bacteria invading dentinal tubules. **Journal of endodontia**, v. 30, n. 11, p. 778–781, 2004.

NAVA, S. et al. *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806): Neotype designation, morphological re-description of all parasitic stages and molecular characterization. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 9, n. 6, p. 1573–1585, 2018.

NODARI, E. F. et al. Cytotoxic effects of permethrin in salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) semi-engorged females. **Experimental Parasitology**, v. 128, n. 2, p. 151–158, 2011.

OLIVEIRA, P. R. DE et al. 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, H. H. et al. Uso de óleo ozonizado no tratamento tópico de infestação por carrapato em cão - Relato de caso. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 36, n. 4, p. 405–408, 2014.

OLIVEIRA, P. R. et al. Potential of the insect growth regulator, fluazuron, in the control of *Rhipicephalus sanguineus* nymphs (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): Determination of the LD95 and LD50. **Experimental Parasitology**, v. 131, n. 1, p. 35–39, 2012.

OLIVEIRA, P. R. et al. Dinotefuran-induced morphophysiological changes in semi-engorged females *Rhipicephalus sanguineus* Latreille, 1806 (Acari: Ixodidae) ticks: Ultrastructural evaluation. **Acta Tropica**, v. 166, p. 139–154, 2017.

OLIVEIRA, P. R.; BECHARA, G. H.; CAMARGO MATHIAS, M. I. *Amblyomma triste* (Koch, 1844) (Acari: Ixodidae). Ovaries: An ultrastructural analysis. **Experimental Parasitology**, v. 116, n. 4, p. 407–413, 2007.

PASSOS, T. M. et al. Comparative Analysis of Ozone and Ultrasound Effect on the Elimination of *Giardia* spp. Cysts from Wastewater. **Ozone: Science and Engineering**, v. 36, n. 2, p. 138–143, 2014.

PEÑA SISTO, M. et al. Eficacia del Oleozon® en pacientes con periodontitis del adulto TT - Effectiveness of the Oleozon® in patients with adults periodontitis. **Medisan**, v. 19, n. 11, p. 1330–1337, 2015.

PEREIRA, M. C. et al. Detrimental effect of deltamethrin on the central nervous system (synganglion) of *Rhipicephalus sanguineus* ticks. **Experimental and Applied Acarology**, v. 71, n. 2, p. 159–169, 2017.

REMEDIO, R. N. et al. Morphology of the midgut of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) adult ticks in different feeding stages. **Parasitology Research**, v. 112, n. 1, p. 415–425, 2013.

REMEDIO, R. N. et al. 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. 431–444, 2014.

ROMA, G. C. et al. Cytotoxic effects of permethrin in oocytes of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) fully engorged females: I. Direct or indirect action of the acaricide in germ cells? **Experimental and Applied Acarology**, v. 53, n. 3, p. 287–299, 2011.

ROMA, G. C. et al. Neurotoxic action of permethrin in *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) female ticks. Morphological and cytochemical evaluation of the central nervous system. **Veterinary Parasitology**, v. 196, n. 3–4, p. 482–491, 2013.

ROMA, G. C. et al. Effects of andiroba (*Carapa guianensis*) oil in ticks: Ultrastructural analysis of the synganglion of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). **Acta Tropica**, n. Part A, p. 7–15, 2015.

ROZADO, A. F. et al. Aplicação de ozônio contra *Sitophilus zeamais* e *Tribolium castaneum* em milho armazenado. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 12, n. 3, p. 282–285, 2008.

SECHI, L. A. et al. Antibacterial activity of ozonized sunflower oil (Oleozon). **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, n. 2, p. 279–284, 2001.

SOUSA, C. S. et al. Ozônio na esterilização de produtos para assistência à saúde: revisão

integrativa da literatura. **Revista da Escola de Enfermagem da U S P**, 2011.

SUBRAMANYAM, B. et al. Efficacy of ozone against *Rhyzopertha dominica* adults in wheat. **Journal of Stored Products Research**, 2017.

SZABO, M. P. J. et al. Ecology, biology and distribution of spotted-fever tick vectors in Brazil. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 3, n. July, p. 27, 2013.

VERISSIMO, C. J. Biological control of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in Brazil. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v. 11, n. 1, p. 14–23, 2015.

Capítulo 6

“Protocolo de cultivo primário de células de glândulas salivares de fêmeas de carrapatos *R. linnaei* semi-ingurgitadas”

Introdução

Devido a relevante importância econômica e sanitária dos carrapatos da espécie *R. linnaei*, visto serem vetores de patógenos causadores de diversas doenças em animais domésticos e humanos (DANTAS-TORRES; 2018), torna-se indispensável a busca por metodologias de controle desse ectoparasita. Nesse sentido, estudos relacionados a essa temática com foco na ação de substâncias acaricidas no nível tecidual e celular vem sendo amplamente desenvolvidos pelos pesquisadores do grupo BCSTM (Brazilian Central of Studies on Ticks Morphology) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP de Rio Claro – SP, através de bioensaios com os próprios carrapatos (ARNOSTI et al, 2011a, b; DENARDI et al., 2011, 2012; NODARI et al. 2011, 2012a, b; OLIVEIRA et al, 2008, 2009, 2012; PEREIRA et al., 2009, 2011; REMEDIO et al., 2014a, b; SAMPIERI et al., 2012, 2013). No entanto, trabalhos que abordem os efeitos destas substâncias sobre a cultura de células obtidas de carrapatos ainda são escassos apesar da versatilidade de possibilidades metodológicas acessíveis e a capacidade de esclarecimentos minuciosos que essa ferramenta pode oferecer sobre o controle desse ectoparasita.

A cultura de linhagens de células de carrapatos tem se expandido ao longo dos anos, e atualmente estima-se que existam mais de 40 linhagens estabelecidas a partir de 13 espécies de carrapatos ixodídeos de importância médico veterinária distribuídas por laboratórios de todo o mundo (BELL-SAKYI et. al., 2007). Sabe-se que esse procedimento pode contribuir grandemente com o entendimento de: a) biologia celular desses animais (desenvolvimento embrionário e tecidual, produção de secreções, etc.); b) relação ectoparasita-hospedeiro; c) interação vetor-patógeno; d) produção de vacinas; e e) elucidação de mecanismos de ação de acaricidas para controle desses animais (BELL-SAKYI et al., 2007; YUNKER; MEIBOS, 1979).

Além disso, a cultura de linhagens celulares de carrapatos contribui para a implementação das exigências do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal que solicita a consideração da redução do número de animais, bem como o desenvolvimento de alternativas para substituição dos mesmos em pesquisas (CONCEA, 2013), uma vez que os

carrapatos como ectoparasitas hematófagos necessitam alimentar-se em animais vertebrados (coelhos ou cães) para completar o seu processo de ingurgitamento e, portanto, seu ciclo biológico (ANDERSON; MAGNARELLI, 2008).

Diante desse panorama, o presente trabalho visou estabelecer um protocolo de cultivo de linhagem primária de células de glândulas salivares de fêmeas de carrapatos *R. sanguineus* l. s., como uma ferramenta multifacetária, para auxiliar no esclarecimento dos mecanismos celulares envolvidos no processo de exposição à substâncias acaricidas, mas também para futuros estudos sobre a composição da saliva dessa espécie, sua relação parasita-hospedeiro, e o desenvolvimento de novas vacinas.

Material

Reagentes

Gelatina em pó sem sabor (Cola atóxica)

Glicerina (Cola atóxica)

Óxido de zinco (Cola atóxica)

NaCl 8g (solução tampão HBSS)

Na₂HPO₄ 48mg (solução tampão HBSS)

KCl 400mg (solução tampão HBSS)

KH₂PO₄ 60mg (solução tampão HBSS)

CaCl 140mg (solução tampão HBSS)

MgSO₄ 98mg (solução tampão HBSS)

D-glucose 1,6g (solução tampão HBSS)

Penicilina G 100U/mL (solução tampão HBSS)

Streptomicina 100µg/mL (solução tampão HBSS)

Água destilada 1 Litro (solução tampão HBSS)

Enzima collagenase tipo II 50U/mL

Meio de cultura L-15 (Leibovitz) (meio L-15/MEM)

Meio de cultura MEM (Minimal Essential Medium) (meio L-15/MEM)

Tryptose phosphate broth (TPB) (meio L-15/MEM)

L-Glutamina 200mM (meio L-15/MEM)

Penicilina (10,000unidades) (meio L-15/MEM)

Streptomicina (10,000µg) (meio L-15/MEM)

Soro Fetal Bovino (meio L-15/MEM)

Azul de Tripan

Equipamentos

Câmara alimentadora (alimentação dos carrapatos)

Panela (preparo da cola atóxica)

Tubos coletores (manutenção dos carrapatos)

Microtesoura (dissecação dos carrapatos)

Pinça (dissecação dos carrapatos)

Placas de petri (dissecação dos carrapatos)

Microtubos de 100ml (cultura de células)

Tubo Falcon 15mL (cultura de células)

Cell strainer (cultura de células)

Ponteira (cultura de células)

Pipetas automática (cultura de células)

Câmara de Neubauer (cultura de células)

Lamínula de vidro (cultura de células)

Placas de cultivo de 6 poços (cultura de células)

Centrifuga (cultura de células)

Incubadora de células (cultura de células)

Microscópio invertido (cultura de células)

Microscópio de Luz (cultura de células)

Lupa (dissecação dos carrapatos)

Fluxo laminar vertical (cultura de células)

Incubadora BOD (manutenção dos carrapatos)

Agitador Magnético (preparo de soluções)

Banho Maria (preparo de soluções)

Geladeira (manutenção de soluções)

Composição de Reagentes

Cola Atóxica: Misture em uma panela 160mL água destilada e 100mL de glicerina, em seguida acrescente aos poucos 80g de gelatina sem sabor misturando até que a mistura esteja homogênea. Leve a panela ao banho maria até obter a consistência líquida, acrescente o óxido

de zinco e mexa até o ponto de cola (com fio) e deixe parada por 5 minutos. Desligue o banho maria e espere esfriar para aplicação. Armazene em temperatura ambiente.

Solução Tampão “Hanks' Balanced Salt solution” (HBSS): Adicione 8g de NaCl, 48mg de Na₂HPO₄, 400mg de KCl, 60mg de KH₂PO₄, 140mg de CaCl, 98mg de MgSO₄, 1,6g de D-glucose, 100µL de Penicilina G (100U/mL)/Streptomicina (100µg/mL), em 1 litro de água destilada, misture em agitador magnético por 10 minutos. Armazene à 4°C.

Meio de cultura L-15/MEM: Para obter 10mL de meio, em um fluxo laminar estéril coloque em um tubo Falcon de 15mL, 3,5mL de Meio de cultura L-15 (Leibovitz), 3,5mL de meio de cultura MEM (Minimal Essential Medium), 1mL de Tryptose phosphate broth (TPB), 100µL de L-Glutamina 200mM e 100µL Penicilina (10,000unidades)/ Streptomicina (10,000µg). Armazene à 4°C e adicione 20% de SFB (2mL) no momento do uso.

Procedimentos

Todos os procedimentos realizados nesse trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA, Instituto de Biociências, UNESP – campus Rio Claro) protocolo nº 26/2018.

Infestação dos carrapatos

1. Para infestação, são necessários aproximadamente 25 casais de carrapatos *R. sanguineus* l. s. adultos obtidos de colônia previamente estabelecida e mantida em estufa BOD em condições controladas (29°C, 80% de umidade e fotoperíodo de 12 horas), para cada coelha hospedeira (Grupo Genético Botucatu). As coelhas são obtidas do Biotério Central da UNESP de Botucatu, SP, e mantidas em gaiolas de contenção em sala do Biotério do Departamento de Biologia da UNESP de Rio Claro, SP, alimentadas com ração e água *ad libitum*.

2. Para infestação dos carrapatos nas coelhas, primeiramente tricotomize a região dorsal das coelhas hospedeiras para fixação de uma câmara alimentadora com cola à base de gelatina atóxica. No interior da câmara coloque os 25 casais de carrapatos (uma vez que a fêmea só completa seu ingurgitamento após a cópula com o macho), para que depois de 4 dias de alimentação se obtenha as fêmeas semi-ingurgitadas (período este em que as glândulas salivares se encontram plenamente desenvolvidas e ativas) (**Fig. 1A**).

3. Após o período de alimentação, retire as fêmeas dos hospedeiros pela região do hipostômio com auxílio de pinça cirúrgica fazendo movimentos circulares, e mantenha-as em tubos coletores com tampa furada para circulação de ar até serem encaminhadas para aquisição das glândulas salivares.

Obtenção das glândulas salivares

4. Para a retirada das glândulas salivares, anestesia com choque térmico em geladeira as fêmeas de carrapatos *R. sanguineus* l. s. semi-ingurgitadas, em seguida disseque-as sob lupa em placas de Petri (**Fig. 1B-C**) contendo solução tampão HBSS sobre gelo e remova delicadamente o par de glândulas salivares, armazenando-as em microtubos contendo 100µL de tampão HBSS gelado.

5. Em seguida, com auxílio de uma microtesoura e pinça fragmente todas as glândulas salivares.

6. Centrifugue os microtubos contendo as glândulas à 110 g por 3 minutos à 4°C.

7. Lave o pellet com tampão HBSS gelado por 3 vezes.

Digestão das glândulas salivares

8. Para digestão do tecido glandular, adicione 1mL da enzima collagenase tipo II (0,4mg/mL) no microtubo contendo as glândulas salivares (**Fig. 1D**), com auxílio de uma pipeta automática misture delicadamente para homogeneizar a solução e deixe em estufa incubadora por 3 horas à 37°C, agitando a cada 30 minutos.

9. Adicione 100µL de tampão HBSS em temperatura ambiente para inativar a enzima.

10. Centrifugue à 110g por 3 minutos à 4°C.

11. Em um fluxo laminar estéril, descarte o sobrenadante e ressuspenda o pellet em 3mL de meio L-15/MEM suplementado com 20% soro fetal bovino (SFB) em um tubo Falcon de 15mL.

12. Utilizando o “cell strainer” (poro de 40µm) filtre o conteúdo do tubo Falcon com auxílio de uma pipeta automática (**Fig. 1E**).

13. Aliquote 10µL da solução para contagem de células em câmara de Neubauer com Azul de Tripán (1:2) em microscópio de luz convencional (**Fig. 1F-G**).

14. Após a contagem, ajuste a suspensão para 1×10^6 células/mL em meio L-15/MEM suplementado com 20% SFB.

15. Transfira o conteúdo para placas de cultura de 6 poços (500 µL/poço) (**Fig. 1H**) e mantenha as placas em incubadora de células a 28 °C.

16. Diariamente observe as placas de cultivo sob microscópio invertido (**Fig. 1H-I**) para observação de aderência das células e condições de cultivo.

Tempo

Dia 1: Preparo das soluções (cola de gelatina atóxica e tampão HBSS)

Dia 2-5: Fixação da câmara alimentadora em coelhas hospedeiras e período de alimentação dos carrapatos (**Passos 1 e 2**)

Dia 5:

2-3 horas: Dissecção de carrapatos para obtenção das glândulas salivares (**Passos 3-4**)

15 min: Preparo das glândulas para digestão (**Passos 5-7**)

3 horas: Digestão do tecido glandular (**Passo 8**)

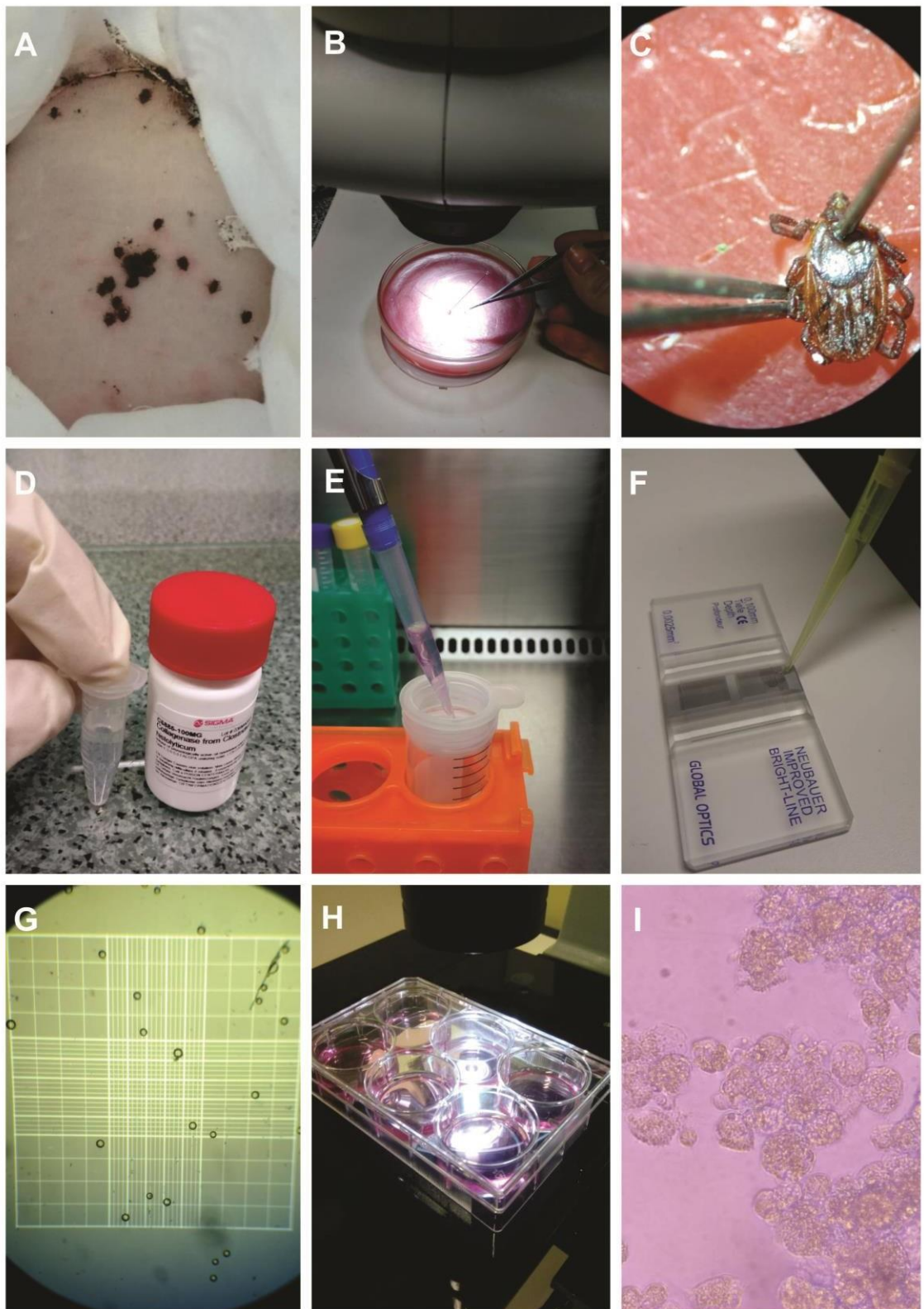
40 min: Preparo das células de glândulas salivares para cultivo celular (**Passos 9 -15**)

Dia 6-12: Observação e análise de condições de cultivo (**Passo 16**)

Tabela 1 - Solução de Problemas

Problema	Possível Causa	Solução
Contaminação por outros tipos celulares	Durante a obtenção das glândulas salivares pode-se colher fragmentos de outros órgãos, como por exemplo, traqueia ou intestino	Separar e limpar as glândulas salivares com auxílio da pinça cirúrgica antes de armazená-las nos microtubos com solução tampão HBSS.
Muitas células mortas durante a contagem de células em câmara de Neubauer com Azul de Tripán	Excesso de lavagem ou centrifugação podem lisar as células. Temperaturas elevadas também podem causar estresse as mesmas.	Ajustar a velocidade e temperatura da centrifugação e manter as células sempre em gelo até o momento da digestão com a enzima colagenase.
Células não aderidas após 24 horas de incubação	Contaminação do meio de cultura ou excesso de CO ₂	A troca do meio de cultivo deve ser realizada apenas 1 vez na semana, diminuindo a manipulação das células e portanto, sua contaminação. Além disso, a incubadora deve ser mantida a 28°C e sem injeção de CO ₂ .

Figura 1. **A:** Infestação dos carrapatos em câmara alimentadora fixada no dorso de coelha hospedeiro. **B-C:** Dissecção de carrapatos para obtenção de glândulas salivares. **D:** Digestão do tecido pela enzima collagenase tipo II. **E:** filtração em “*cell strainer*”. **F-G:** Contagem de células em câmara de Neubauer. **H:** Observação das placas de cultivo em microscópio invertido. **I:** Cultura de células da glândula salivar de carrapatos *R. sanguineus*



Resultados Antecipados

Após 7 dias de observações consecutivas sob microscópio invertido concluiu-se que a cultura primária de células de glândulas salivares de carrapatos *R. linnaei* mostrou-se promissora de acordo com a análise das condições de cultivo (**Fig. 1I**), ou seja, coloração do meio de cultura, aderência das células e quantidade de debris. Os próximos passos serão transferir as células para tubos de fundo achatado (já utilizado em cultura de outras linhagens de células de carrapatos), e mantê-las em condições de cultivo adequado até a realização de 10 passagens/repiques (considerado o período para o estabelecimento de uma linhagem primária) e futuramente, utiliza-las em bioensaios *in vitro*.

Agradecimentos

Agradecemos à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (processo nº 2018/02999-9) e CAPES/Brasil pelo suporte financeiro.

Capítulo 7

“Protocolo de testagem de compostos acaricidas em células embrionárias de carrapatos”

O presente trabalho visou estabelecer um protocolo de testagem de substâncias acaricidas em células embrionárias de carrapatos (usando como modelo células ISE6 de *Ixodes scapularis*), como uma ferramenta multifacetária para auxiliar no esclarecimento dos mecanismos celulares envolvidos no processo de exposição à essas substâncias e otimizar os testes de múltiplos compostos e concentrações.

Material

Reagentes

Meio de cultura L-15 (Leibovitz) (meio L15B300)

Água MilliQ (meio L-15B300)

Tryptose phosphate broth (TPB) (meio L15B300)

L-Glutamina 200mM (meio L15B300)

Lipoproteína 0,1% (meio L15B300)

Penicilina (10,000unidades) (meio L15B300)

Streptomicina (10,000µg) (meio L15B300)

Soro Fetal Bovino (meio L15B300)

Azul de Tripán

Materiais e Equipamentos

Câmara de Neubauer (contagem de células)

Lamínula de vidro (contagem de células)

Placas de cultivo de 24 poços (bioensaio)

Ponteiras graduadas de 2 e 5 mL (cultura de células e bioensaio)

Ponteiras de 200 e 1000 µL (cultura de células e bioensaio)

Suporte para tubos (cultura de células)

Tubos para cultura de células de face plana “Nunk” (cultura de células)

Tubo Falcon 15mL (cultura de células)

Incubadora de células (cultura de células)

Fluxo laminar horizontal (cultura de células)
Geladeira (manutenção de soluções)
Microscópio invertido (cultura de células)
Microscópio de Luz (contagem de células)
Pipetador automático (cultura de células e bioensaio)

Composição dos Reagentes

Meio de cultura L15B300: Para preparo de 10mL de meio em um fluxo laminar estéril, em um tubo Falcon de 15mL adicione 3 partes (6,15mL) de meio L15 (Leibovitz), para uma parte de água MilliQ (2,05mL), 1mL de Tryptose phosphate broth (TPB), 500 µL de Soro Fetal Bovino (SFB), 100µL de Lipoproteína (0,1%), 100µL de L-Glutamina 200mM e 100µL Penicilina (10,000unidades) / Streptomicina (10,000µg). Filtrar o meio em unidade filtrante com membrana 0,22m com auxílio de seringa. Armazene à 4°C, mas sempre que possível preparar no mesmo dia de uso.

Procedimentos

Cultivo Celular

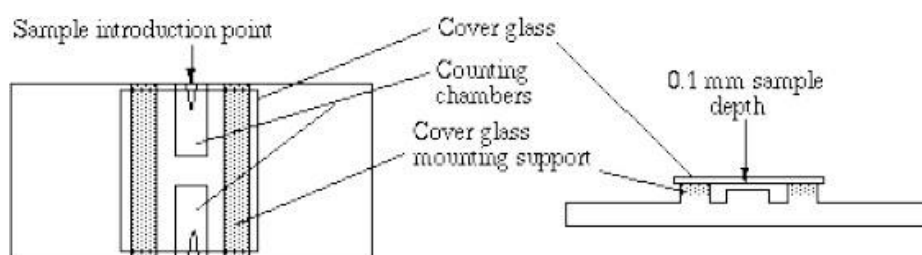
As células de linhagens embrionárias ISE6 (*Ixodes scapularis*) cedidas pela doutora Ana Domingos no IHMT NOVA, foram cultivadas em tubos para cultura de face plana com 2,2 mL de meio L15B300 (Munderloh et al., 1999), com troca de meio uma vez na semana e mantidas em incubadoras com temperatura controlada entre 28 à 32°C até o momento da realização dos bioensaios (**Figura 1A-C**).

Preparação das células

1. Preparar o fluxo laminar, limpando com álcool 70% toda a superfície e materiais que estejam nele. Ligar a luz UV por aproximadamente 20 minutos.
2. Retirar os tubos de cultivo da incubadora e ressuspender as células com movimentos de “*up and down*” com auxílio de uma pipeta graduada de 5 mL e pipetador automático. Para garantir que as células se soltem no fundo, deve-se raspar delicadamente com a ponta da pipeta.
3. Transferir as células em suspensão para um tubo Falcon de 15 mL e retirar uma alíquota para contagem de células.

Contagem de células

4. Limpar a câmara de Neubauer e a lamínula de vidro com álcool 70%.
5. Retirar uma alíquota da suspensão celular e colocar em um microtubo de 1,5 mL.
6. Em seguida adicionar do reagente Azul de Trypan e misturar às células (na proporção de 1:2) (**Figura 1D**).
7. Aliquotar 10 µL da solução para contagem de células em câmara de Neubauer com Azul de Tripan (1:2) (**Figura 1E**).
8. Submeter a câmara de Neubauer ao microscópio óptico de luz convencional e realizar a contagem da porcentagem de células vivas (aquelas não coradas de azul) (**Figura 1F**).



$$\text{Concentração (cell/}\mu\text{L)} = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ de células} \times 10}{\text{n}^{\circ} \text{ de quadrantes} \times \text{fator de diluição}}$$

Plaqueamento de células

9. Após a contagem, ajustar a suspensão de células para 1×10^6 células/mL em meio L15300 suplementado com 20% SFB.
10. Adicionar 500 µL de células em cada poço (5×10^5 célula/poço) da placa de 24 poços (**Figura 1G**).
11. Observar as células em microscópio invertido (**Figura 1H**).
12. Levar a placa à incubadora a 32°C até completa aderência (2-3 dias), e observar diariamente sob microscópio invertido para confirmação de aderência (**Figura 1I**).

Bioensaio: Exposição das células à agentes acaricidas

13. Após confirmação da aderência completa das células nos poços de cultivo, levar a placa ao fluxo laminar estéril previamente limpo com álcool 70% e UV.
14. Retirar o meio antigo de cada poço e completar com o meio novo para garantir a padronização do volume de 500 µL (evitando perda de volume que pode ocorrer por evaporação na estufa).

15. A placa deve ser dividida em 6 grupos com quadruplicatas, sendo um grupo controle negativo (contendo apenas meio de cultivo), um grupo controle positivo (contendo DMSO) e outros 4 grupos de exposição (contendo diferentes concentrações do composto).

16. Utilizar micropipeta e ponteira descartável para adicionar 50 µL de cada concentração do composto, meio de cultivo ou DMSO em cada poço.

17. A placa deve ser identificada na tampa e mantida em incubadora a 28-32°C durante 24 horas.

18. Após o período de exposição a placa deve ser retirada da incubadora e levada ao fluxo laminar novamente.

19. Desgrudar e homogeneizar as células de cada poço com movimentos de “up and down”.

20. Em seguida, aliquotar 10 µL de cada poço para contagem de células viáveis e 150 µL para análise morfológica em citocentrífuga.

Viabilidade Celular

21. Para contagem de células viáveis deve-se repetir os procedimentos descritos no item “contagem de células”, sendo a porcentagem de células viáveis definida por:

$$\text{Porcentagem de células viáveis (\%)} = (\text{n}^\circ \text{ de células vivas} / \text{Total de células}) \times 100$$

Análise Morfológica

22. Para a análise morfológica das células, preparar o kit com suporte, papel de filtro, lâmina limpa e identificada e encaixe de metal (**Figura 1J**).

23. Adicionar a alíquota de 150 µL da suspensão celular no funil do kit e levar à citocentrífuga a 4400rpm por 5 minutos (**Figura 1K**).

24. Cuidadosamente retirar as lamina dos kit e deixar secar em temperatura ambiente por aproximadamente 30 minutos.

25. Para coloração das lamina com Giensa, utilizar luva e o kit de coloração “Hemacolor® Rapid Staining Kit” seguindo as recomendações do fabricante (**Figura 1L**).

26. Após secagem das lamina, observar em microscopio optico de luz convencional e fotodocumentar.

Tempo

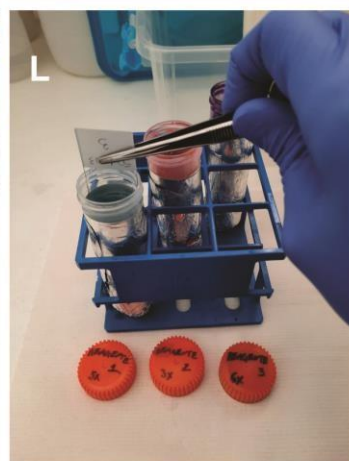
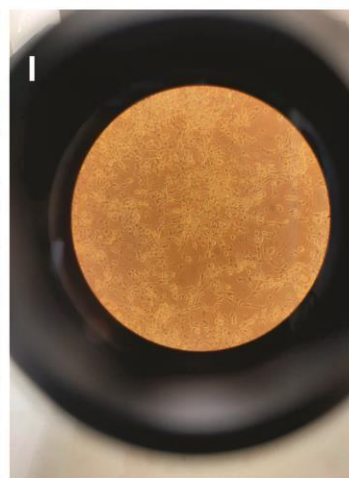
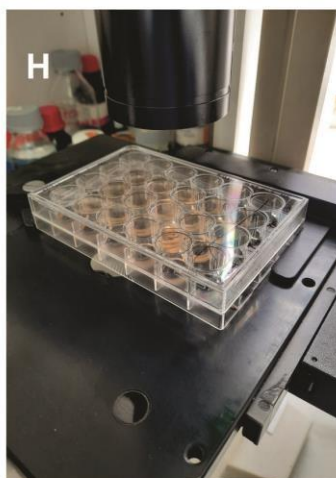
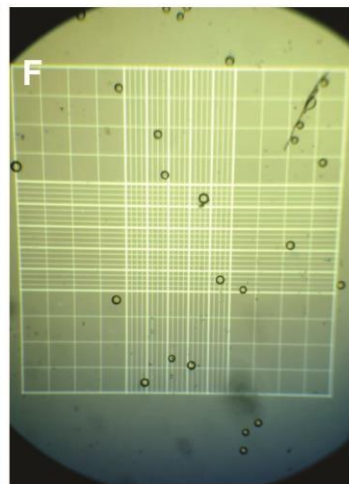
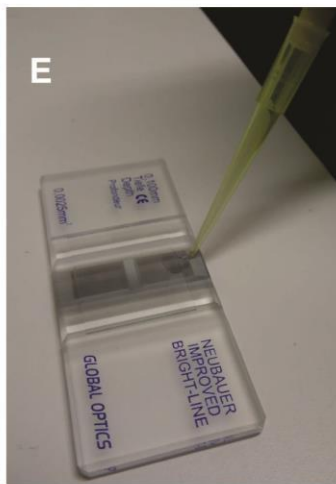
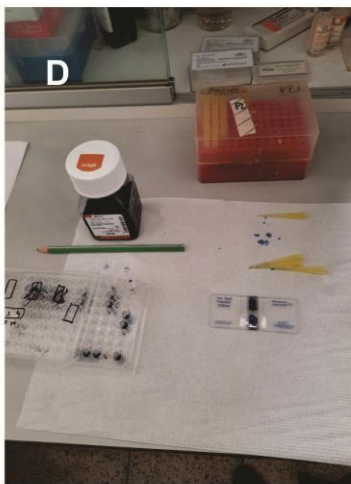
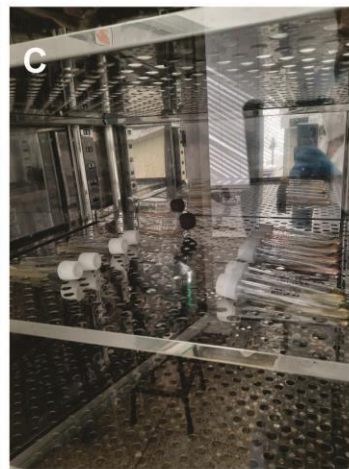
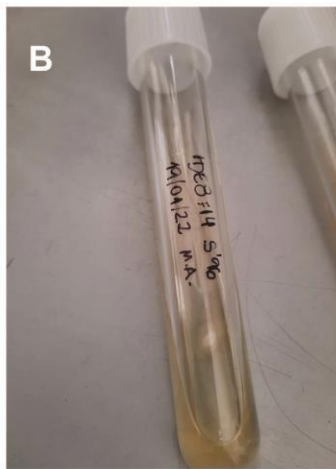
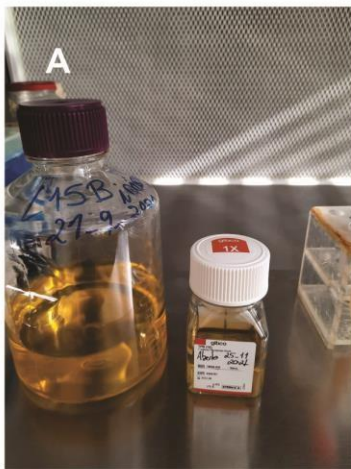
Dia 1: Preparo do meio de cultivo L15B300, contagem de células e plaqueamento;

Dia 2-4: Aderência das células (tempo variável);

Dia 5: Bioensaio de exposição ao composto acaricida;

Dia 6: Avaliação de viabilidade celular e análise morfológica.

Figura 1. **A:** Componentes do meio L15B300 (meio L15B e TPB); **B:** tudo de cultivo de face plana contendo as células ISE6 aderidas; **C:** incubadora com os tubos de cultivo; **D:** ensaio de viabilidade com Azul de Tripan; **E:** câmara de Neubauer; **F:** quadrantes para contagem da câmara de Neubauer sob microscópio de luz; **G:** placa de 24 poços com as células expostas ao composto e ao controle; **H:** placa de 24 poços sendo observada sob microscópio invertido para confirmar a adesão das células; **I:** células observadas em microscópio invertido; **J:** kit para uso em citocentrífuga contendo o suporte, lamina, papel filtro e presilha de metal; **K:** citocentrífuga; **L:** Coloração em Giensa.



Resultados Esperados

Após exposição de 24 horas das células às diferentes concentrações do composto acaricida, espera-se definir de acordo com a avaliação de viabilidade celular o valor da CL50 (concentração letal média), ou seja, da concentração que capaz de causar a mortalidade de 50% das células expostas, fazendo para tanto uso do software Graphpad Prism 6.0. Além disso, após a análise morfológica das células proceder a fotodocumentação das alterações celulares observadas em decorrência da exposição e comparar os resultados com aqueles obtidos das células não expostas.

Agradecimentos

Agradecemos à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (processo nº 2021/10773-3) pelo suporte financeiro. Às doutoras Ana Domingos e Sandra Antunes do IHMT pelo suporte técnico, e pela cessão das células e permissão para o uso de seu laboratório na execução desse protocolo.

Capítulo 8

**“Análise mitocondrial e viabilidade celular de células embrionárias de carrapatos
Rhipicephalus sanguineus lato sensu (RML-RSE) expostas ao ozônio”**

Marina Rodrigues de Abreu¹, Maria Izabel Camargo-Mathias^{1*}

¹Biology Department, Bioscience Institute, São Paulo State University “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Rio Claro, SP, Brazil.

*Corresponding author: maria.izabel@unesp.br

Biology Department, Bioscience Institute,
São Paulo State University “Júlio de Mesquita Filho”
UNESP, Rio Claro, SP, Brazil.

Tel: 55 19 3526 4151

Introdução

Os carrapatos da espécie *Rhipicephalus sanguineus* l.s., conhecidos popularmente como “carrapato marrom do cão” por ter esse vertebrado como seu hospedeiro principal, são ectoparasitas de importância médico-veterinária, uma vez que também são vetores de inúmeros patógenos, transferência que ocorre durante o seu processo de alimentação do carrapato no cão (DANTAS-TORRES, 2010). Dentre esse patógenos o mais frequentes são bactérias (*Rickettsia rickettsii*, *R. conorii* e *Ehrlichia canis*) e protozoários (*Babesia vogeli* e *Hepatozoon canis*) que causam doenças tanto nos animais quanto no homem (DANTAS-TORRES; OTRANTO, 2015; IPEK et al., 2020; SZABO et al., 2013).

Diversos estudos relacionados a essa temática e com foco na ação de substâncias acaricidas no nível tecidual e celular vem sendo desenvolvidos através de bioensaios com os próprios carrapatos (ARNOSTI et al, 2011a, b; DENARDI et al., 2011, 2012; NODARI et al. 2011, 2012a, b; OLIVEIRA et al, 2008, 2009, 2012; OLIVEIRA et al., 2020; PEREIRA et al., 2009, 2011; REMEDIO et al., 2014a, b; SAMPIERI et al., 2012, 2013). No entanto, ensaios que avaliem os efeitos destas substâncias sobre a cultura de células obtidas de carrapatos ainda são escassos, muito embora essa vertente metodológica seja mais acessível e de acordo com as normas éticas que reduzem o uso de animais nas pesquisas, além da possibilidade de se obter informações mais esclarecedoras e precisas sobre a ação de agentes químicos naturais ou sintéticos nas células, quando o enfoque é o controle de carrapatos (YUNKER; MEIBOS, 1979).

A cultura de linhagens de células de carrapatos tem se expandido ao longo dos anos, e atualmente estima-se que existam mais de 40 delas já estabelecidas e que se encontram distribuídas por laboratórios de todo o mundo, as quais foram obtidas a partir de 13 espécies de carrapatos ixodídeos de importância médico veterinária (BELL-SAKYI et. al., 2007). Estudos que fazem uso de culturas de células podem contribuir grandemente com o entendimento da biologia celular desses animais; desenvolvimento embrionário e tecidual; produção de secreções; relação ectoparasita-hospedeiro; interação vetor-patógeno; produção de vacinas; e elucidação de mecanismos de ação de acaricidas para controle desses ectoparasitas (BELL-SAKYI et al., 2007; BELL-SAKYI; PAXTON; MUNDERLOH, 2000; KALIL et al., 2017) devido ao fornecimento de informações mais precisas.

O controle de carrapatos tem sido realizado majoritariamente pelo uso de compostos químicos sintéticos comercializados livremente no mercado veterinário, os quais apesar de sua eficiência no combate ao ectoparasita, causam grandes prejuízos uma vez que o seu uso

indiscriminado promove o surgimento de linhagens resistentes de carrapatos, toxicidade nos animais não alvo, e contaminação ambiental (BECKER et al., 2019; EIDEN, AMANDA et al., 2020; MEKONNEN et al., 2002).

Nesse contexto, novas estratégias de controle vêm sendo buscadas, tais como o uso de óleos essenciais e de extratos de plantas que tenham ação acaricida, mas que apresentem menos risco à saúde animal e ao meio ambiente (OTRANTO; WALL, 2008). Dentre essas novas estratégias, está a utilização do ozônio que vem demonstrando potencial acaricida (ABREU et al., 2020a,b), além desse gás ter ações outras como de: antimicrobiótico, desinfetante, esterilizante, cicatrizante, e mesmo no controle de pragas agrícolas (CAMPABADAL; MAIER; MASON, 2013; MARSON et al., 2016; REMONDINO; VALDENASSI, 2018). O seu uso torna-se ainda mais interessante, por não deixar resíduos que possam contaminar tanto o ambiente como provocar toxicidade animais não alvos, incluindo os humanos (GUZEL-SEYDIM; GREENE; SEYDIM, 2004; MAJEWSKI, 2012; MOREIRA FONSECA et al., 2015; ROZADO et al., 2008).

Assim, de acordo com as informações expostas, o presente trabalho tem como objetivo trazer à luz informações sobre o potencial acaricida do ozônio, diluído em água (água ozonizada) sobre células embrionárias da linhagem RML-RSE fazendo para tanto o uso de técnicas de citometria de fluxo, na perspectiva de que o ozônio seja uma alternativa para o controle de carrapatos da espécie *R. sanguineus* l.s.

Material e Métodos

1. Cultivo Celular

As células de linhagens embrionárias (RML-RSE) foram gentilmente cedidas pela professora Dra. Lesley Bell-Sakyi coordenadora do “Tick Cell Biobank” da Universidade de Liverpool, Liverpool, UK, colaboradora desse trabalho, as quais foram mantidas em tubos para cultura de face plana com meio L-15/MEM (Meio de cultura L-15 (Leibovitz) - 35mL, meio de cultura MEM (Minimal Essential Medium) - 35mL, Tryptose phosphate broth (TPB) - 10mL, L-Glutamina 200mM - 1mL e Penicilina (10.000 unidades)/ Streptomicina (10.000µg) - 1mL) suplementado com 20% de Soro Fetal Bovino (SFB), em incubadoras à 28°C até o momento da realização dos bioensaios *in vitro*.

2. Obtenção da água ozonizada concentração de 3mg/L

Utilizou-se um gerador de ozônio modelo BRO3-Plus 1 (Brasil Ozônio) e um de oxigênio PSA modelo Intensity (AIRSEP), instalados num tanque de água servida pela SEMAE (Serviço Municipal de Água e Esgoto). A exposição das fêmeas dos carrapatos à concentração de 3mg/L de água ozonizada foi utilizada para a avaliação dos parâmetros biológicos, visto que resultados previamente obtidos, mostraram ser essa a concentração mais eficaz na produção das alterações morfológicas tanto no integumento quanto nas glândulas salivares o (Abreu et al., 2020a,b). A concentração foi aqui confirmada por sensor digital acoplado ao tanque de água ozonizada, procedimento que foi realizado no Laboratório de Patologia e Controle Microbiano, coordenado pelo Professor Dr. Ítalo Delalibera Junior, colaborador desse trabalho, e localizado no Departamento de Entomologia e Acarologia, USP, ESALQ, Piracicaba, SP, Brasil.

3. Exposição das células embrionárias (RML-RSE) ao ozônio

A exposição *in vitro* à água ozonizada foi realizada na linhagem de células embrionárias RML-RSE de carrapatos *R. sanguineus* l. s. cultivadas em tubos para cultura de face plana contendo meio de cultura L-15/MEM durante 24 horas em incubadora a 28°C.

O DMSO (dimetilsulfóxido - $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$) foi utilizado nesse bioensaio como controle positivo, pela suas propriedades antioxidativas e também pela sua toxicidade moderada em culturas células já bem conhecida, que induz uma morte celular diferente da apoptótica, a necrótica. Como controle negativo foi utilizado água destilada

As células foram divididas nos seguintes grupos:

Grupo Controle Negativo - GCN (expostas somente a água destilada);

Grupo Controle Positivo- GCP (expostas ao DMSO);

Grupo Ozônio- GO (expostas a 3mg/L de ozônio);

Posteriormente, foram adicionados 50 µL de água destilada no grupo **GCN**, 50 µL de DMSO no grupo **GCP** e 50 µL da de água ozonizada (3mg/L) no **GO**. Os tubos foram levados de volta à incubação nas mesmas condições de cultura descritas anteriormente, nos períodos de 24 e 48 horas, para posterior análise das células em citometria de fluxo.

4. Citometria de Fluxo (MUSE)

Os bioensaios *in vitro* foram realizados utilizando o equipamento de Citometria de Fluxo/Analisador e Contador Celular MUSE™ (Merck – Millipore) e o kit *Muse Caspase 3/7 Assay Kit* e o *Muse MitoPotential Kit* (Merck®, Kenilworth, NJ, USA).

As células da linhagem embrionária (RML-RSE) expostas ao ozônio (água ozonizada) na concentração de 3mg/L e aos períodos de 24 e 48 horas foram processadas para análise no citômetro de fluxo/cell analyzer MUSE™ segundo orientações do fabricante para obtenção dos dados de viabilidade celular e de alterações mitocondriais.

Para tanto, as células das linhagens embrionárias (RML-RSE) dos grupos expostos foram desprendidas do fundo do tubo com auxílio de uma pipeta automática e movimentos delicados de “*flush*”, em seguida, a suspensão de 300 µL de células foram acondicionadas em tubos eppendorfs e centrifugadas por 5 minutos a 1500 rpm e 28°C. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 1200 µL de HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution) para a realização da leitura e quantificação do número total de células (células/mL) pelo equipamento MUSE™. Posteriormente as amostras foram encaminhadas para as etapas do protocolo de cada kit.

a) Viabilidade celular (Ensaio de Caspases 3/7)

O ensaio de viabilidade celular através do Kit *Muse Caspase 3/7 Assay Kit* foi realizado para obtenção da porcentagem de células vivas e apoptóticas de cada grupo.

Para este ensaio, foi aplicado o protocolo de marcação das células segundo indicação do fabricante do kit, onde amostras das células após contagem (procedimento descrito no item anterior), foram colhidas e ressuspendidas em 600 µL tampão de ensaio (1X Assay Buffer BA). Na sequência, alíquotas de 50 µL de células de cada situação (grupos controles e grupos de exposição) foram incubadas com 5 µL de solução *MUSE™ Caspase-3/7 Reagent* durante 30 minutos a 37°C. Após esse período, foram adicionados às amostras 150 µL do reagente MUSE™ Caspase 7-AAD, as quais permaneceram nestas condições por 5 minutos em temperatura ambiente e protegido de luz. Ao final deste período cada amostra foi levada para análise pelo equipamento MUSE™.

A porcentagem de células vivas e apoptóticas foi determinada por meio do software próprio do analisador de células MUSE™ e transformado em histogramas que representam o número de eventos em função da fluorescência.

b) Alterações mitocondriais

Para esse ensaio foi utilizado o kit MUSE™ MitoPotential Kit e aplicado o protocolo de marcação das células segundo indicação do fabricante para obtenção da porcentagem de células com alterações mitocondriais. Desse modo, após a contagem de células, essas foram

ressuspendidas em 600 μ L tampão de ensaio (1X Assay Buffer BA). Em seguida foram realizadas alíquotas de 100 μ L de células de cada situação (grupos controles e grupos de exposição) em tubos eppendorfs e adicionados 95 μ L da solução *MUSE™ Mitopotential Working* e incubadas durante 20 minutos a 37°C. Após esse processo, foram adicionados às amostras 5 μ L do reagente *MUSE™ Mitopotential 7-AAD* e incubadas por mais 5 minutos em temperatura ambiente e protegido de luz. Ao final deste período, cada amostra foi levada para análise pelo equipamento *MUSE™*.

A porcentagem de células vivas ou mortas com membrana despolarizada também foi determinada pelo software do próprio *MUSE™*, que gerou histogramas que representam o número de eventos em função da fluorescência.

5. Análise Estatística

A análise estatística dos dados e a confecção dos gráficos foram realizadas no software Graphpad Prism 8.0.1, utilizado o teste de variância “ANOVA” seguido do teste de Tukey para obtenção dos dados considerados significativos ($p < 0,05$).

Resultados

Viabilidade Celular (Caspase 3/7)

Para as análises de viabilidade celular utilizou-se o software do *MUSE™* por meio do kit *Muse Caspase 3/7 Kit* (Merck®, Kenilworth, NJ, USA), composto principalmente por dois reagentes que emitem fluorescência que permitem distinguir células vivas, células em diferentes estágios de apoptose (inicial ou tardia) e células necróticas, via dois importantes parâmetros: a integridade da membrana plasmática (reagente 7-AAD) e a ativação de caspases efetoras 3 e 7 (reagente Caspase-3/7).

Os resultados das análises foram expressos em histogramas (Fig. 1 e 2) que mostram a porcentagem de células em cada estágio: a) células viáveis (Live), células não marcadas pelos reagentes, ou seja, (-) Caspase-3/7 e (-) 7-AAD; b) células apoptóticas (Apoptotic), marcadas apenas pelo reagente de ativação de caspases, (+) Caspase-3/7 e (-) 7-AAD; c) células em apoptose tardia/necróticas (Apoptotic/Dead), ou seja, marcadas por ambos, (+) Caspase-3/7 e (+) 7-AAD as quais podem ser tanto as células em apoptose tardia quanto as necróticas; e d) células necróticas (Dead) marcadas somente pelo reagente de integridade de membrana, (-) Caspase-3/7 e (+) 7-AAD.

Os dados apresentados (Gráficos 1 e 2) e obtidos pelo software GraphPad Prism 8.0.1. mostram no Gráfico 1 a análise de viabilidade celular no período após 24 horas e o 2 a análise da viabilidade celular após 48 horas de exposição aos estímulos.

No Gráfico 1, as análises revelaram resultados que já eram esperados devido à exposição das células ao DMSO, observando-se diminuição significativa na porcentagem de células viáveis (78,6% viáveis), bem como aumento significativo na porcentagem de células em apoptose tardia/necróticas (14,1%) e, das necróticas (7,1%), todos os resultados em comparação ao grupo controle negativo (GCN) (células expostas apenas à água destilada) (Gráfico 1). O DMSO por ser um composto tóxico para as células em cultura foi aqui utilizado como controle positivo para morte celular.

Ainda no período de 24 horas, as células expostas à água ozonizada (3mg/L de ozônio) apesar de não terem apresentado diferenças significativas em relação ao grupo controle GCN, tiveram a porcentagem de células viáveis diminuída (86%), assim como observou-se aumento nas porcentagens das células em apoptose tardia ou necróticas (8,4%) e as necróticas (5,2%), em comparação ao grupo controle GCN (Gráfico 1). Além disso, notou-se aumento na porcentagem de células apoptóticas quando comparado as células expostas ao DMSO (Gráfico 1).

No Gráfico 2, encontram-se os dados obtidos das análises realizadas após 48 horas de exposição das células aos estímulos. Observou-se que as células expostas ao DMSO mostraram diferença significativa principalmente em relação ao aumento da porcentagem de células necróticas (7,9%), do mesmo modo que as células expostas à água ozonizada (4,2%) quando comparadas ao grupo controle (GCN).

Alterações mitocondriais

As alterações mitocondriais também foram analisadas através do software do MUSETM utilizando o kit *Muse MitoPotential Kit* (Merck®, Kenilworth, NJ, USA), por meio do uso de reagentes que emitem fluorescência e permitem diagnosticar: o potencial de membrana mitocondrial (reagente MitoPotential) e a permeabilidade da membrana plasmática (reagente 7-AAD), o que possibilita a distinção entre células vivas, mortas e com membrana despolarizada. Ressalte-se que o potencial de membrana mitocondrial leva ao acúmulo do reagente fluorescente MitoPotential dentro da membrana interna de mitocôndrias intactas, fazendo com que essas emitam alta fluorescência durante a leitura MUSETM, e células com mitocôndrias despolarizadas tem a emissão de fluorescência diminuída. O reagente 7-AAD é

utilizado como um indicador de integridade estrutural da membrana plasmática e de morte celular, visto que o mesmo é expulso das células vivas saudáveis ou em apoptose inicial, porém fica acumulado no interior das células mortas.

Dessa forma, e em resumo, os resultados das análises foram reproduzidos em histogramas (Fig. 3 e 4) demonstrando quais foram as porcentagens de células a) vivas com membrana mitocondrial despolarizada (Depolarized Live), não marcadas pelos reagentes, ou seja, (-) MitoPotential e (-) 7-AAD; b) vivas com membrana mitocondrial intacta (Live), marcadas apenas pelo reagente de potencial de membrana mitocondrial, (+) MitoPotential e (-) 7-AAD; c) mortas com membrana mitocondrial despolarizada (Depolarized Dead), marcadas por ambos os reagentes, (+) MitoPotential e (+) 7-AAD; d) mortas com membrana mitocondrial intacta (Dead) marcadas somente pelo marcador de integridade de membrana plasmática, (-) MitoPotential e (+) 7-AAD.

Depois de os resultados terem sido analisados estatisticamente, pode-se verificar no Gráfico 3 as alterações mitocondriais no período após 24 horas e no Gráfico 4 após 48 horas de exposição das células aos estímulos.

No Gráfico 3 observa-se que exposição ao DMSO diminuiu significativamente a porcentagem de células viáveis (74,9%), assim como aumentou a porcentagem de células mortas (14,3%) em comparação aquelas do GCN, resultado esse já esperado, uma vez que o DMSO é tóxico para células em culturas.

Aquelas células que foram expostas à água ozonizada (3mg/L) e analisadas após 24 horas não apresentaram valores de porcentagem significativos em relação ao grupo controle (GCN), apesar de ter havido aumento na porcentagem de células despolarizadas mortas (6,6%) e de células mortas (12,2%) em relação ao mesmo grupo controle (Gráfico 3).

No Gráfico 4, observa-se os resultados das análises realizadas após 48 horas de exposição das células aos estímulos. A exposição ao DMSO diminuiu significativamente a porcentagem de células vivas (67,5%), assim como aumentou a de células mortas com membrana despolarizada (14,8%) em relação ao grupo controle (GCN).

Já a exposição à água ozonizada (3mg/L) nesse mesmo período (48 horas), resultou num aumento significativo de células mortas (21%) em relação ao grupo controle GCN (Gráfico 4).

Gráfico 1: Marcação de Caspases-3/7 para a determinação da viabilidade das células de linhagem embrionária (RML-RSE) de carrapatos *R. sanguineus* dos grupos controle negativo (expostas à água destilada) e positivo (DMSO) e do grupo exposto à água ozonizada (3mg/L) após 24 horas da exposição. Os valores correspondem as médias $\pm$ SEM (Standard Error of the Mean) dos dados obtidos nos histogramas do software do MUSETM. (*) Dados estatisticamente significativos ($p < 0.05$) em comparação ao grupo controle negativo.

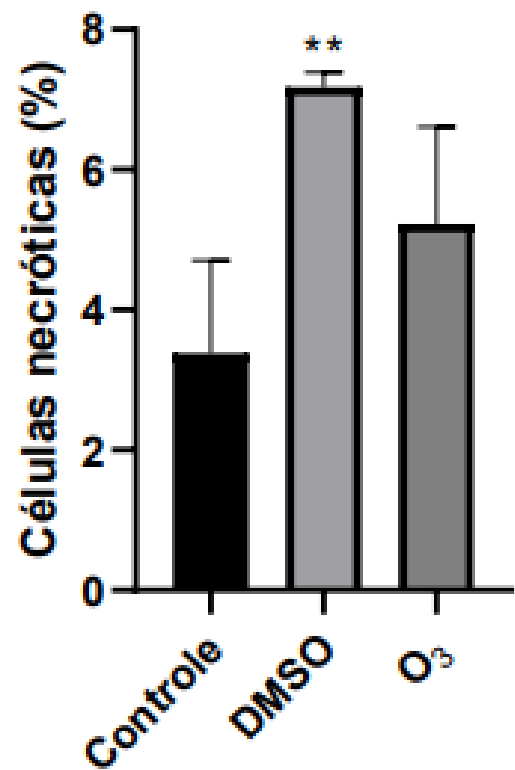
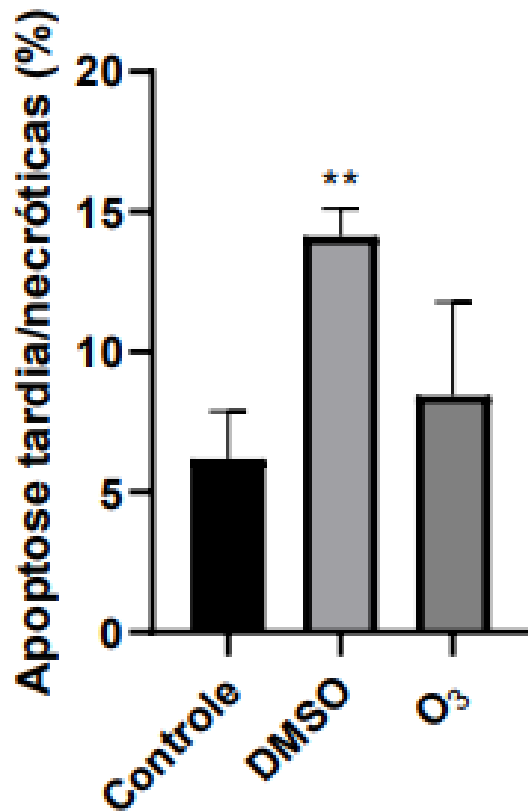
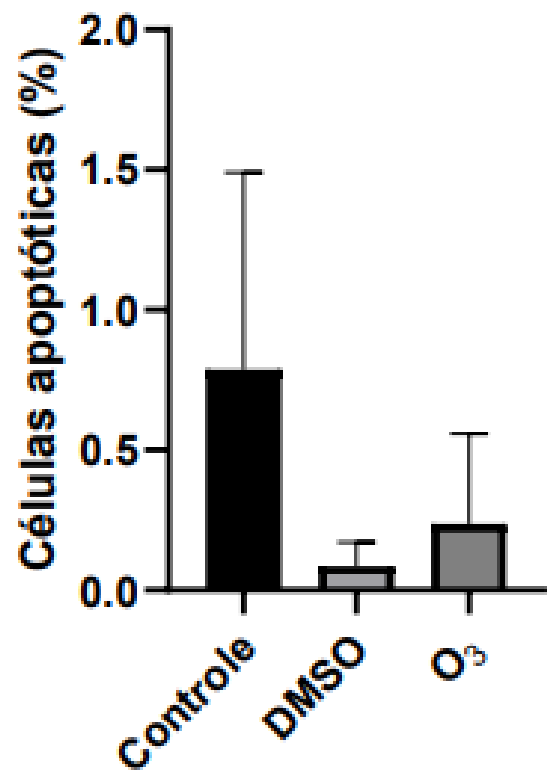
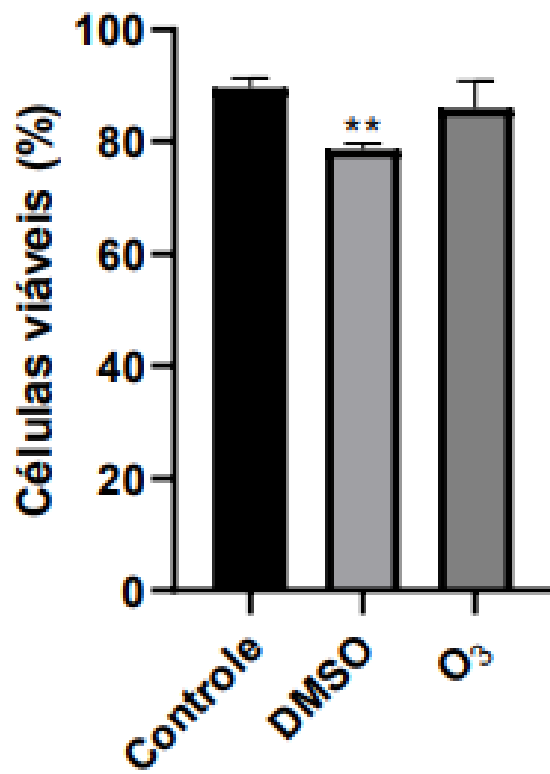


Gráfico 2: Marcação de Caspases-3/7 para a determinação da viabilidade das células de linhagem embrionária (RML-RSE) de carrapatos *R. sanguineus* dos grupos controles negativo (expostas à água destilada) e positivo (DMSO) e do grupo exposto à água ozonizada (3mg/L) após 48 horas da exposição. Os valores correspondem as médias $\pm$ SEM (Standard Error of the Mean) dos dados obtidos nos histogramas do software do MUSETM. (*) Dados estatisticamente significativos ($p < 0.05$) em comparação ao grupo controle negativo.

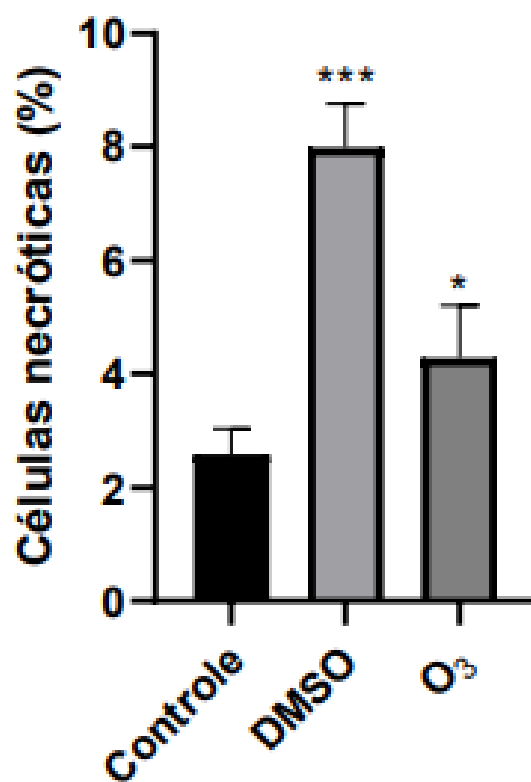
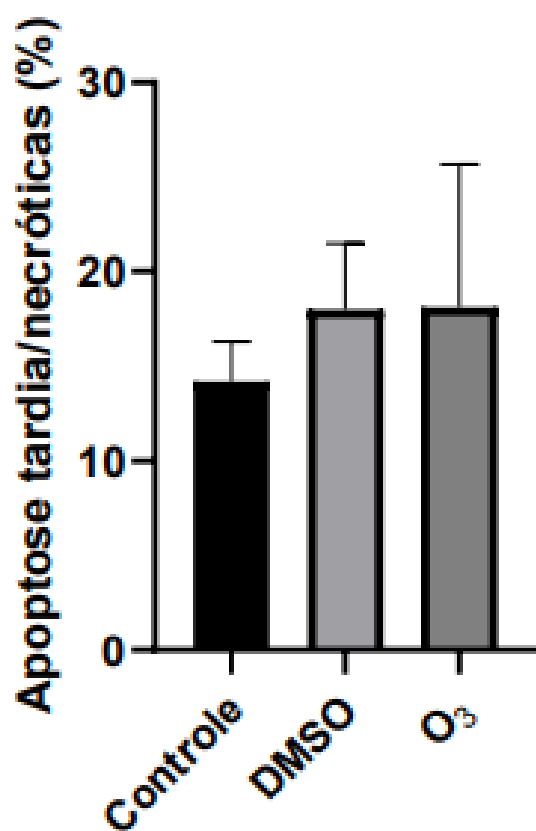
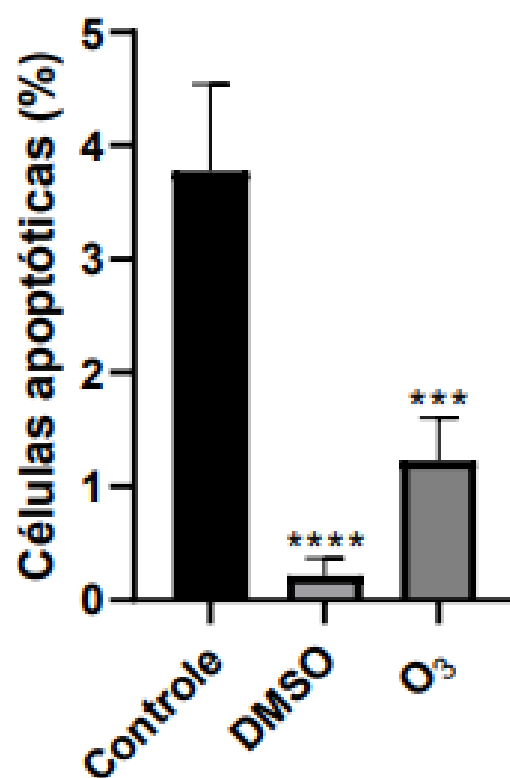
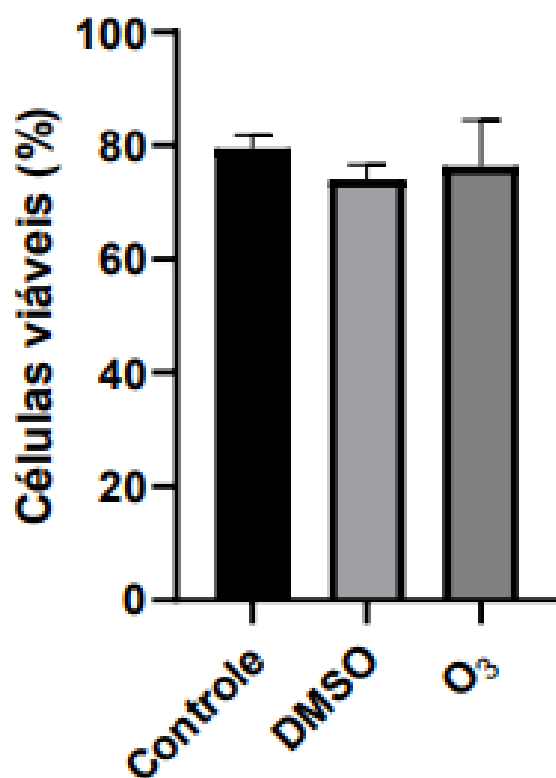


Gráfico 3: Marcação de alterações mitocondriais para a determinação da viabilidade e despolarização de membrana mitocondrial das células de linhagem embrionária (RML-RSE) de carrapatos *R. sanguineus* dos grupos controles negativo (expostas à água destilada) e positivo (DMSO) e do grupo exposto à água ozonizada (3mg/L) após 24 horas da exposição. Os valores correspondem as médias $\pm$ SEM (Standard Error of the Mean) dos dados obtidos nos histogramas do software do MUSETM. (*) Dados estatisticamente significativos ($p < 0.05$) em comparação ao grupo controle negativo.

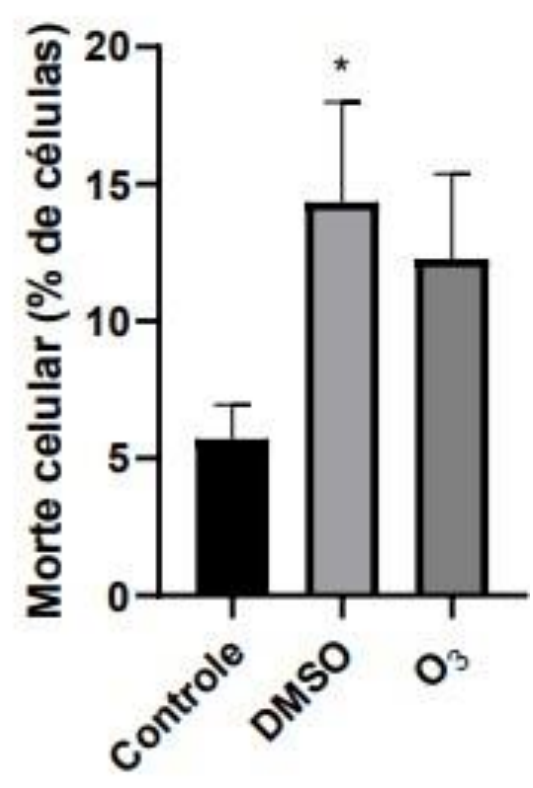
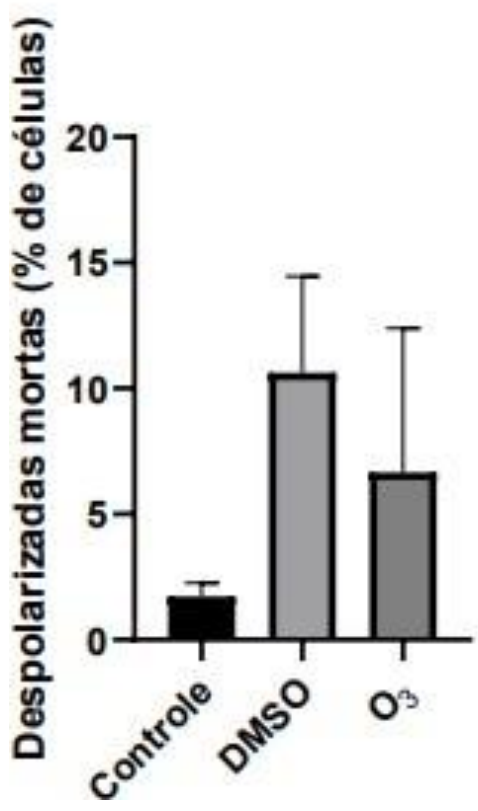
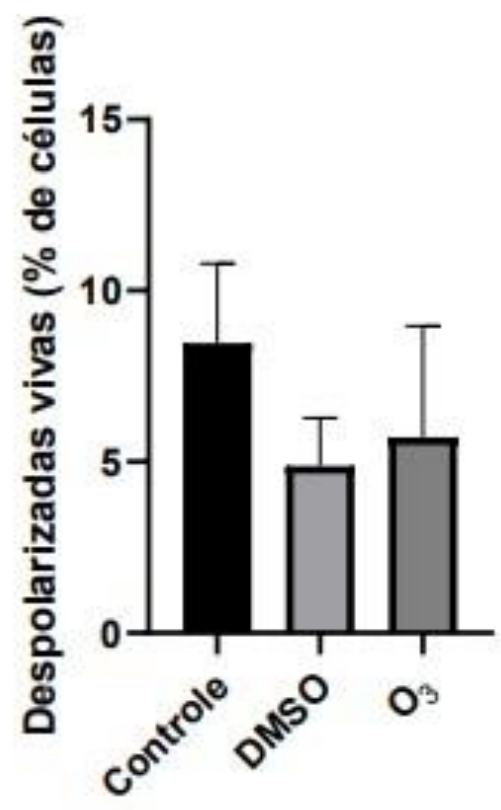
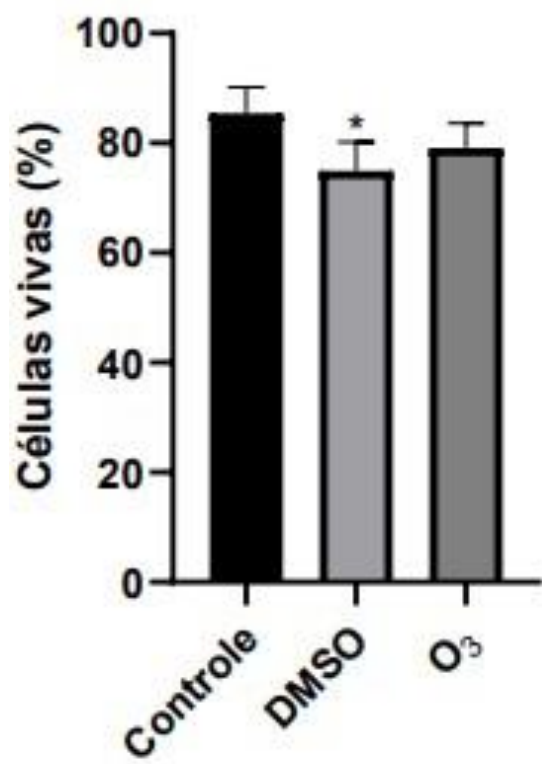


Gráfico 4: Marcação de alterações mitocondriais para a determinação da viabilidade e despolarização de membrana mitocondrial das células de linhagem embrionária (RML-RSE) de carrapatos *R. sanguineus* dos grupos controles negativo (expostas à água destilada) e positivo (DMSO) e do grupo exposto à água ozonizada (3mg/L) após 48 horas da exposição. Os valores correspondem as médias $\pm$ SEM (Standard Error of the Mean) dos dados obtidos nos histogramas do software do MUSETM. (*) Dados estatisticamente significativos ($p < 0.05$) em comparação ao grupo controle negativo.

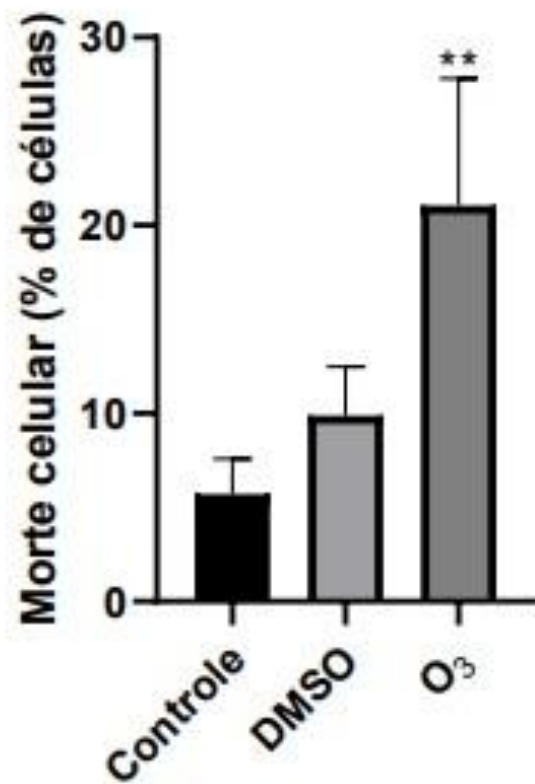
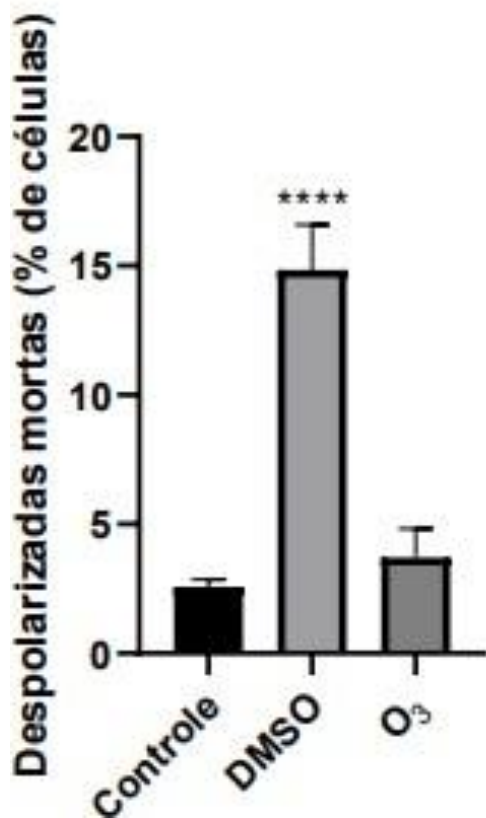
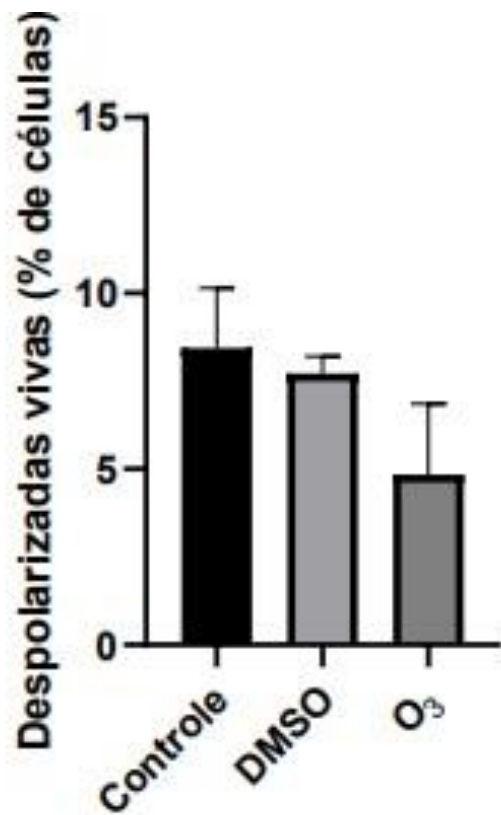
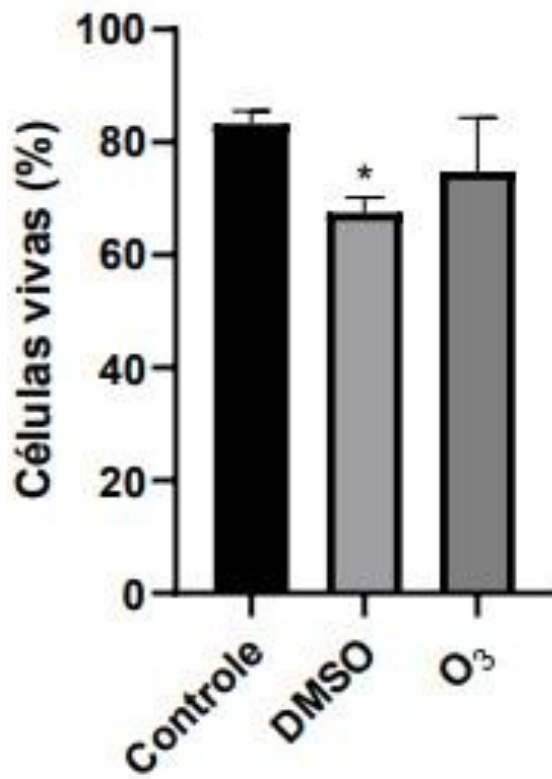
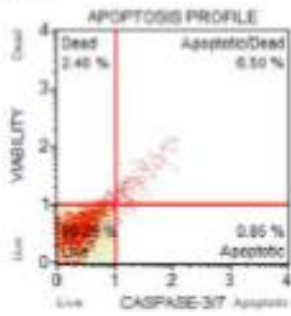
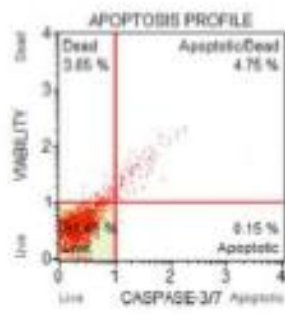


Figura 1: Histogramas representativos do ensaio realizado com o kit MUSE™ Caspase 3/7 em células de linhagem embrionária (RML-RSE) de carrapatos *R. sanguineus* dos grupos controles negativo (expostas à água destilada) e positivo (DMSO) e do grupo exposto à água ozonizada (3mg/L) após 24 horas da exposição. Teste realizado em quadruplicatas. Os quadrantes apresentam a porcentagem de células viáveis (Live), células apoptóticas (Apoptotic), células em apoptose tardia (Apoptotic/Dead) e células necróticas (Dead), em função da fluorescência. A1-4: Controle; B1-4: DMSO; C1-4: 3mg/L.

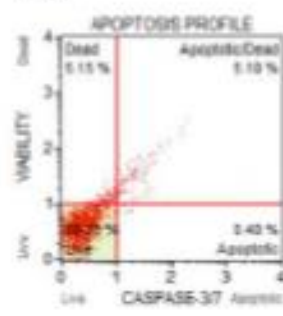
A1



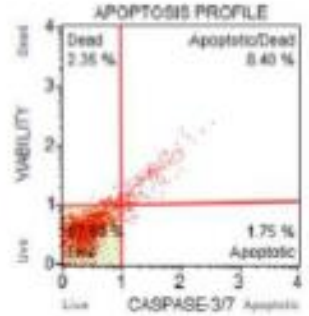
A2



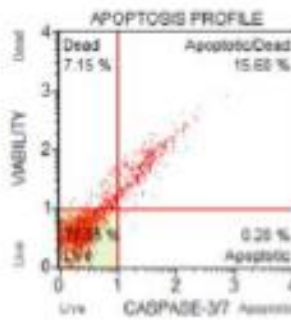
A3



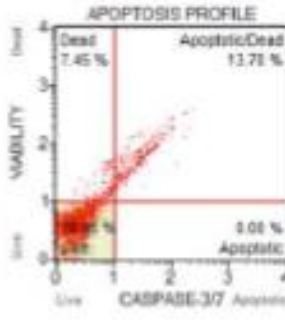
A4



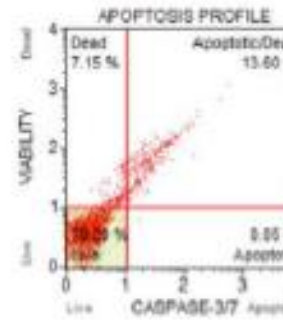
B1



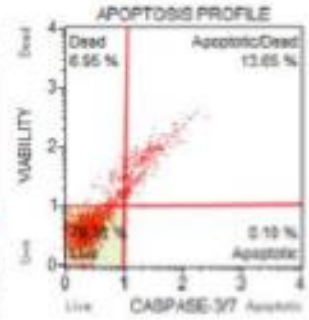
B2



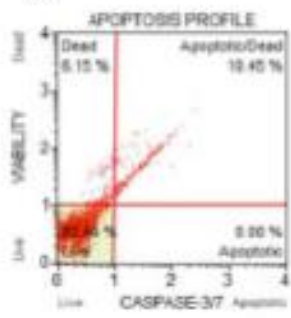
B3



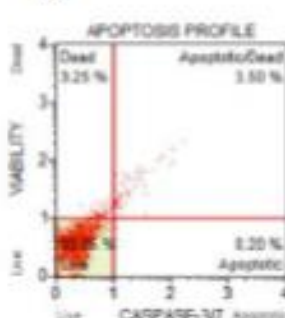
B4



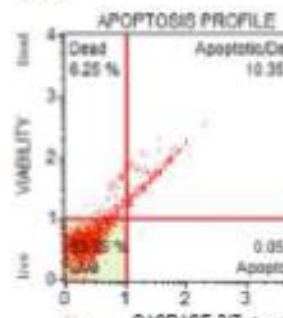
C1



C2



C3



C4

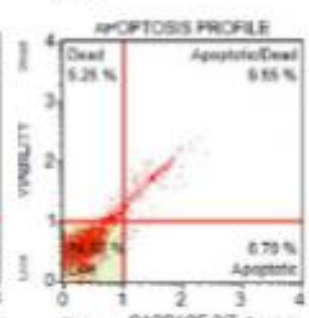
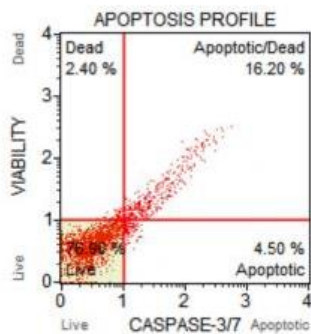
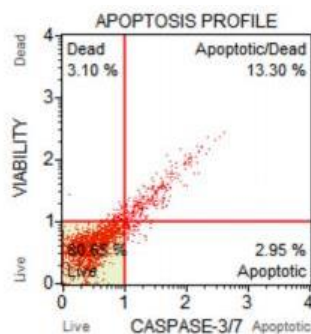


Figura 2: Histogramas representativos do ensaio realizado com o kit MUSE™ Caspase 3/7 em células de linhagem embrionária (RML-RSE) de carrapatos *R. sanguineus* dos grupos controles negativo (expostas à água destilada) e positivo (DMSO) e do grupo exposto à água ozonizada (3mg/L) após 48 horas da exposição. Teste realizado em quadruplicatas. Os quadrantes apresentam a porcentagem de células viáveis (Live), células apoptóticas (Apoptotic), células em apoptose tardia/necróticas (Apoptotic/Dead) e células necróticas (Dead), em função da fluorescência. A1-4: Controle; B1-4: DMSO; C1-4: 3mg/L.

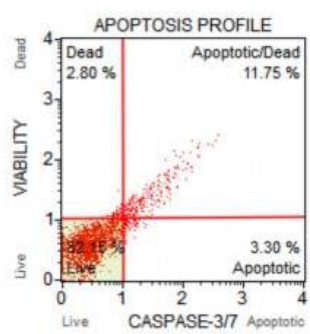
A1



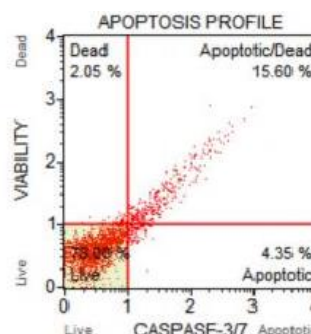
A2



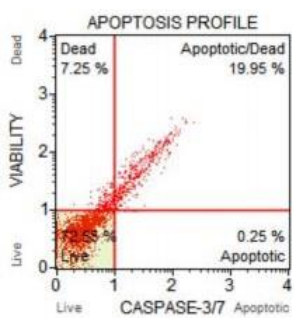
A3



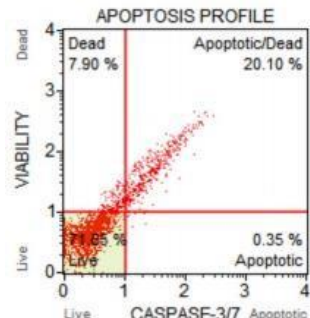
A4



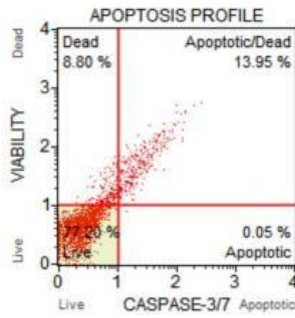
B1



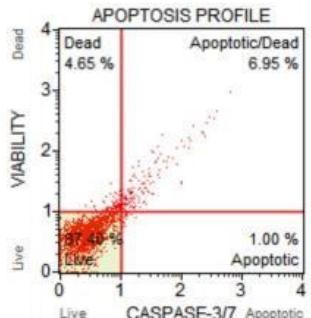
B2



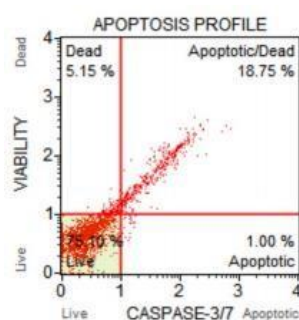
B3



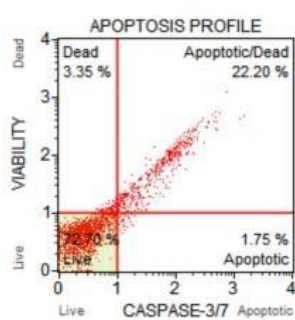
B4



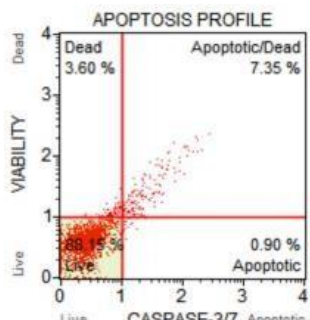
C1



C2



C3



C4

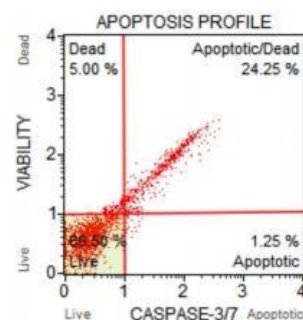


Figura 3: Histogramas representativos do ensaio realizado com o kit MUSE TM MitoPotential em células de linhagem embrionária (RML-RSE) de carrapatos *R. sanguineus* dos grupos controles negativo (expostas à água destilada) e positivo (DMSO) e do grupo exposto à água ozonizada (3mg/L) após 24 horas da exposição. Teste realizado em quadruplicatas. Os quadrantes apresentam a porcentagem de células vivas (Live), células vivas com membrana mitocondrial despolarizadas (Depolarized Live), células mortas com membrana mitocondrial despolarizadas (Depolarized Dead) e células mortas com membrana mitocondrial intacta (Dead), em função da fluorescência. A1-4: Controle; B1-4: DMSO; C1-4: 3mg/L.

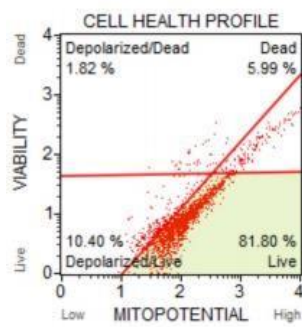
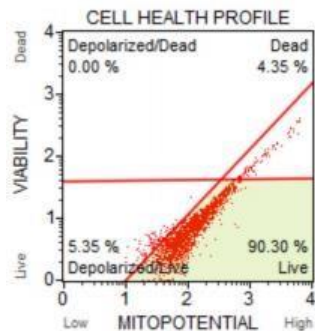
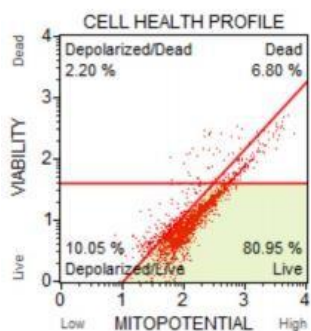
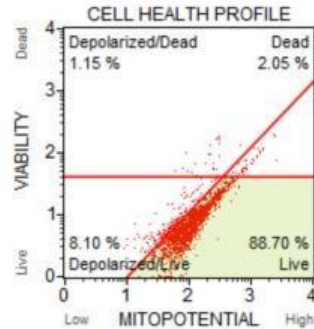
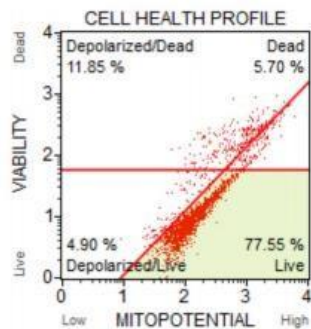
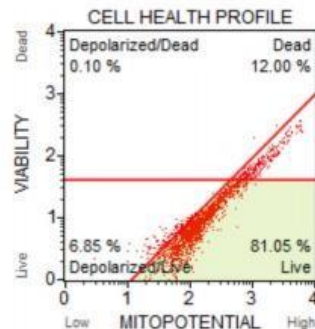
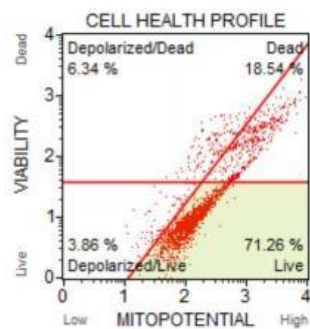
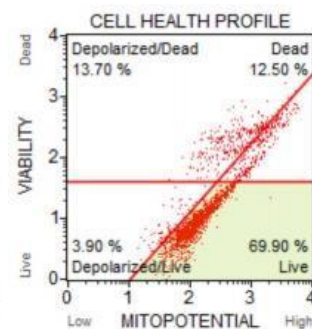
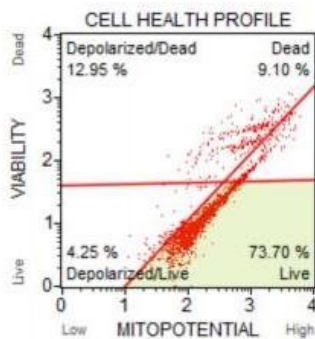
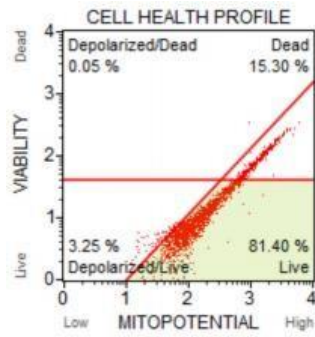
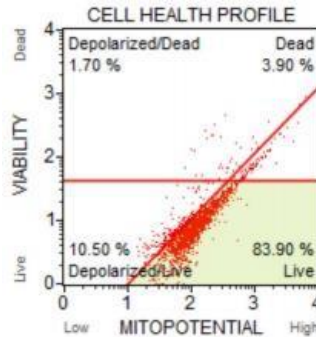
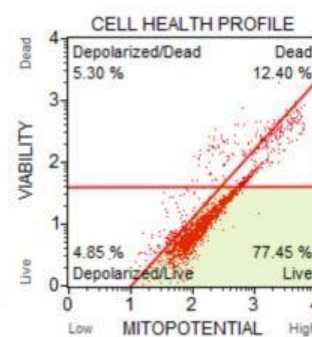
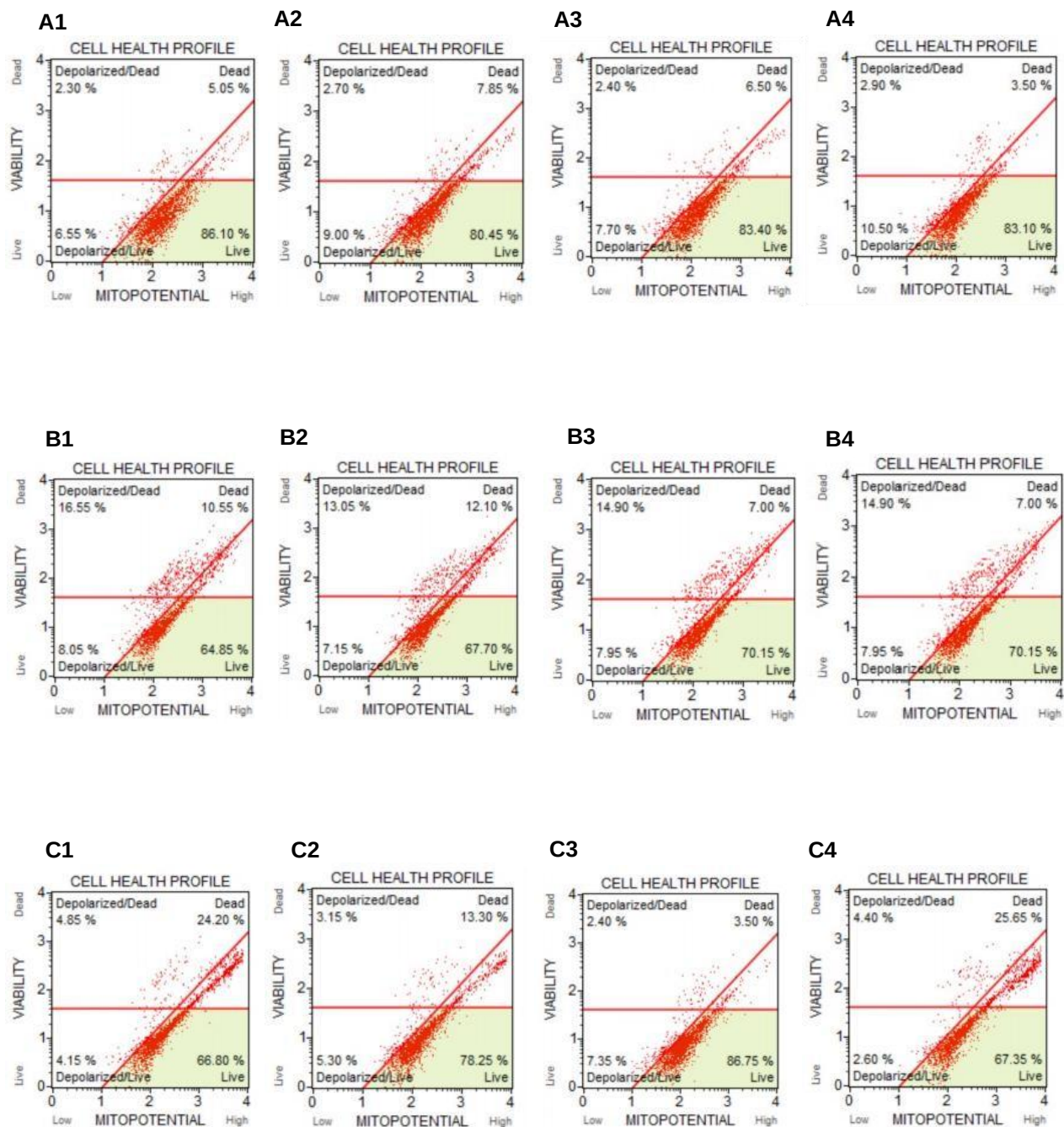
A1**A2****A3****A4****B1****B2****B3****B4****C1****C2****C3****C4**

Figura 4: Histogramas representativos do ensaio realizado com o kit MUSE TM MitoPotential em células de linhagem embrionária (RML-RSE) de carrapatos *R. sanguineus* dos grupos controles negativo (expostas à água destilada) e positivo (DMSO) e do grupo exposto à água ozonizada (3mg/L) após 48 horas da exposição. Teste realizado em quadruplicatas. Os quadrantes apresentam a porcentagem de células vivas (Live), células vivas com membrana mitocondrial despolarizadas (Depolarized Live), células mortas com membrana mitocondrial despolarizadas (Depolarized Dead) e células mortas com membrana mitocondrial intacta (Dead), em função da fluorescência. A1-4: Controle; B1-4: DMSO; C1-4: 3mg/L.



Discussão Parcial

A importância médico-veterinária dos carrapatos da espécie *R. sanguineus* l.s. é indiscutível, por serem considerados vetores de patógenos de grande risco aos animais domésticos, como os cães (seu principal hospedeiro), bem como à saúde pública, por transmitir doenças até mesmo aos seres humanos (Dantas-Torres and Otranto, 2015; Ipek et al., 2020). Dessa forma, justifica-se a crescente necessidade de controle desse ectoparasita, bem como a busca por compostos alternativos e naturais, uma vez que os já comumente comercializados no mercado veterinário tem como bases químicas moléculas sintéticas que frequentemente causam danos e toxicidade tanto à saúde dos animais não alvos quanto ao próprio meio ambiente (Camargo-Mathias, 2018).

Nessa busca, dados de estudos recentemente desenvolvidos mostraram que o ozônio teria propriedades potenciais para atuar como agente antimicrobiótico, desinfetante, esterilizante, cicatrizante, e também atuaria no controle de pragas agrícolas (Campabadal et al., 2013; da Soares et al., 2018; Guzel-Seydim et al., 2004; Moreira Fonseca et al., 2015; Rozado et al., 2008; Subramanyam et al., 2017). Dados atuais também mostraram seu potencial acaricida contra carrapatos da espécie *R. sanguineus* l.s., visto ter provocado alterações morfofisiológicas nos tecidos de glândulas salivares e do integumento de fêmeas semi-ingurgitadas que foram expostas a diferentes concentrações de água ozonizada (Abreu et al., 2020a,b). Na trilha desses resultados é que o presente estudo teve como objetivo trazer à luz informações sobre os efeitos desse gás diluído em água na concentração de 3mg/L para entender como as células de carrapatos *R. sanguineus* l.s. reagiriam em resposta a essa exposição.

Para a obtenção dos resultados, células da linhagem embrionária de carrapatos *R. sanguineus* l.s. (RML-RSE) foram expostas a água ozonizada (3mg/L de ozônio), para posteriormente terem os dados comparados aqueles das células dos grupos controles negativo (células expostas somente a água destilada) e positivo (células expostas ao DMSO). Essas células foram também analisadas em resposta a ativação das caspases 3 e 7 e em resposta as alterações mitocondriais, por meio da aplicação de técnicas de citometria de fluxo (MUSE™ Cell Analyzer).

A literatura descreve que as caspases são proteínas do grupo de cisteínas-proteases que tem papel fundamental na morte celular programada em resposta a sinais pró-apoptóticos (Mccomb et al., 2019). Enquanto algumas caspases agem iniciando a cascata de eventos intracelulares, outras, as chamadas “caspases efetoras” atuam num momento posterior do processo, clivando proteínas estruturais durante a formação dos corpos apoptóticos, e por esse

motivo, podem ser consideradas uma marca registrada dos eventos apoptóticos (McComb et al., 2019).

No presente estudo foram apresentados resultados da marcação de caspases 3/7, que nas células expostas à água ozonizada (3mg/L de ozônio) apesar de não terem sido encontradas diferenças significativas em relação ao grupo controle (GCN) após 24 horas de exposição, teve a porcentagem de células viáveis diminuída (86%), e teve as porcentagens de células em apoptose tardia e/ou necróticas (8,4%) e das necróticas (5,2%) aumentadas. O mesmo ocorreu na avaliação após 48 horas de exposição, sendo que nesse período, as células necróticas tiveram um aumento significativo (4,2%).

O maior número de células em estágio de morte, principalmente necróticas, observado nas culturas onde as células foram expostas à água ozonizada, poderia ser explicado pelo fato do ozônio ser um potente oxidante, ou seja, uma molécula instável, que em contato com qualquer doador de elétron dentro da célula geraria estresse oxidativo e resultaria em um aumento das moléculas reativas de oxigênio (EROs) (Grootvelt et al., 2004a). Como já conhecido, as EROs, quando em excesso no interior da célula, podem causar danos severos aos componentes celulares tais como membranas, proteínas, e até mesmo ao material genético, o que consequentemente provoca alteração no metabolismo das mesmas e as induz a entrar em morte por apoptose ou por necrose. Estudos anteriores desenvolvidos por Baysan et al. (2000), as propriedades do ozônio em inativar bactérias e fungos, se apoiaria na sua capacidade de causar danos não só às membranas celulares, mas também aos componentes citoplasmáticos, devido a oxidação dos ácidos graxos e dos peptídeos (Küçükgül et al., 2019), o que, no presente trabalho poderia estar ocorrendo e resultando no aumento de células necróticas.

As informações aqui obtidas em relação a observação de alterações mitocondriais nas células expostas a à água ozonizada, quando submetidas a análise estatística forneceram dados não significativos quando focou-se a despolarização de membrana mitocondrial. Foi apenas registrado no período de 48 horas de exposição um aumento significativo de células mortas e com a membrana mitocondrial intacta. A perda do potencial transmembrana mitocondrial segundo alguns estudos, está associada aos estágios iniciais da apoptose (Krysko et al., 2001). Existem ainda registros que afirmam que colapso desse potencial coincida com a abertura dos poros de permeabilidade mitocondrial, o que levaria à liberação de citocromo C no citoplasma, e iniciaria assim os eventos da cascata apoptótica dependente de caspases (Hearps et al., 2002). Então, a ocorrência da despolarização da membrana mitocondrial poderia estar relacionada com os eventos da apoptose, além de ser um indicador confiável de disfunção mitocondrial (Krysko

et al., 2001). Como no presente estudo não foi observada despolarização de membrana mitocondrial nas células expostas à água ozonizada, pode-se inferir que o aumento na porcentagem de morte celular tenha ocorrido devido a necrose o que corroboraria os resultados obtidos nas análises das marcações das caspases 3 e 7, visto o aumento significativo de células necróticas.

Características de morte celular em tecidos de carrapatos *R. sanguineus* l.s., a saber em glândulas salivares e em integumento, já haviam sido relatadas por Abreu et al. (2020 a,b) que mostraram através de análise morfológica, indícios da ocorrência de danos celulares devido a exposição a água ozonizada em diferentes concentrações. Os resultados desses estudos mostraram alterações celulares na forma (provavelmente devido os danos da membrana plasmática), no surgimento de vacuolização citoplasmática, além de alterações nucleares como presença de núcleos picnóticos e fragmentação nuclear, confirmando os dados aqui obtidos quando se analisou células de linhagens obtidas da mesma espécie de carrapatos. Inferiu-se também que a água ozonizada ofereceu toxicidade para células em cultura, embora esses dados estatisticamente não tenham sido significantes. Outros estudos (Küçükgül et al., 2019) que investigaram o potencial do ozônio em causar apoptose quando da exposição de linhagens celulares de macrófagos isoladas de peixes (*Oncorhynchus mykiss*) ao gás, mostraram que apesar do ozônio provocar estresse oxidativo, com consequente ocorrência de morte celular, ainda que em concentrações menores (àquelas consideradas terapêuticas) ele não seria tóxico e, ao contrário poderia até mesmo atuar como protetor, uma vez que ativaria o sistema imune.

A observação de altos valores no desvio padrão obtidos nas análises estatísticas realizadas no presente estudo, vem reforçar a necessidade de repetição dos bioensaios de citometria de fluxo para poder-se afirmar se a água ozonizada atua como acaricida sobre linhagens de células oriundas de carrapatos. No entanto, ressalte-se que as análises morfológicas (ovário e órgão de Gené) aqui apresentadas indicam que o ozônio (água ozonizada na concentração 3mg/L) mostrou grande potencial como acaricida natural para essa espécie de carrapatos.

Agradecimentos

Agradecemos à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (processo nº 2018/02999-9), a CAPES/Brasil e a unidade EMBRAPPII (Empresa Brasileira de Pesquisa e Inovação Industrial) instalada na ESALQ/USP de Piracicaba, pelo suporte financeiro.

Referencias

ABREU, M. R. et al. Exposure of Ticks *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari : Ixodidae) to Ozonated Water : Integument Response. **Ozone: Science & Engineering**, v. 00, n. 00, p. 1–10, 2020.

ABREU, M. R. et al. Morphophysiological analysis of the salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari : Ixodidae) exposed to ozonated water : A control strategy. **Medical and Veterinary Entomology**, p. 1–9, 2020.

BECKER, S. et al. Resistance to deltamethrin, fipronil and ivermectin in the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* sensu stricto, Latreille (Acari: Ixodidae). **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 10, n. 5, p. 1046–1050, 2019.

BELL-SAKYI, L. et al. Tick cell lines: tools for tick and tick-borne disease research **Trends in Parasitology**, 2007.

BELL-SAKYI, L.; PAXTON, E. A.; MUNDERLOH, U. G. Growth of *Cowdria ruminantium* , the Causative Agent of Heartwater , in a Tick Cell Line. v. 38, n. 3, p. 1238–1240, 2000.

CAMPABADAL, C. A.; MAIER, D. E.; MASON, L. J. Efficacy of fixed bed ozonation treatment to control insects in stored bulk grain. **Applied Engineering in Agriculture**, 2013.

SOARES, C. E. S. et al. Use of ozone gas as a green control alternative to beetles *alphitobius diaperinus* (panzer)infestation in aviary bed utilized in the poultry industry. **Chemical Engineering Transactions**, 2018.

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

DANTAS-TORRES, F.; OTRANTO, D. Further thoughts on the taxonomy and vector role of *Rhipicephalus sanguineus* group ticks. **Veterinary Parasitology**, v. 208, n. 1–2, p. 9–13, 2015.

EIDEN, A. L. et al. Detection of Permethrin Resistance and Fipronil Tolerance in *Rhipicephalus sanguineus* (Acari : Ixodidae) in the United States. **Journal of Medical Entomology**, v. 52, n. 3, p. 429–436, 2020.

GUZEL-SEYDIM, Z. B.; GREENE, A. K.; SEYDIM, A. C. Use of ozone in the food industry. **LWT - Food Science and Technology**, v. 37, n. 4, p. 453–460, 2004.

HEARPS, A. C. et al. Mitochondrial cytochrome c release precedes transmembrane depolarisation and caspase-3 activation during ceramide-induced apoptosis of Jurkat T cells. v. 7, n. 5, p. 387–394, 2002.

IPEK, A. et al. Molecular Evidence for Transstadial Transmission of *Ehrlichia canis* by *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* Under Field Conditions Molecular Evidence for Transstadial Transmission of *Ehrlichia canis* by *Rhipicephalus sanguineus sensu lato*. v. 55, n. 2, p. 440–444, 2020.

KALIL, S. P. et al. Immune-related redox metabolism of embryonic cells of the tick *Rhipicephalus microplus* (BME26) in response to infection with *Anaplasma marginale*. p. 1–10, 2017.

KRYSKO, D. V et al. Mitochondrial Transmembrane Potential Changes Support the Concept of Mitochondrial Heterogeneity During Apoptosis. v. 49, n. 10, p. 1277–1284, 2001.

KÜÇÜKGÜL, A. et al. Investigation of the anti-apoptotic activity of ozone therapy in rainbow trout macrophages infected with *Yersinia ruckeri*. p. 771–783, 2019.

MARSON, R. F. et al. Use of Ozonated Water for Disinfecting Gastrointestinal Endoscopes. **Ozone: Science and Engineering**, v. 38, n. 5, p. 346–351, 2016.

MCCOMB, S. et al. Efficient apoptosis requires feedback amplification of upstream apoptotic signals by effector caspase-3 or -7. p. 1–12, 2019.

MEKONNEN, S. et al. Acaricide resistance profiles of single- and multi-host ticks from

communal and commercial farming areas in the Eastern Cape and North-West Provinces of South Africa. **The Onderstepoort journal of veterinary research**, v. 69, n. 2, p. 99–105, 2002.

MOREIRA FONSECA, P. M. et al. Disinfection of Dental Instruments Contaminated with *Streptococcus mutans* Using Ozonated Water Alone or Combined with Ultrasound. **Ozone: Science and Engineering**, v. 37, n. 1, p. 85–89, 2015.

OTRANTO, D.; WALL, R. New strategies for the control of arthropod vectors of disease in dogs and cats. **Med Vet Entomol**, v. 22, n. 4, p. 291–302, 2008.

REMONDINO, M.; VALDENASSI, L. Different uses of ozone: Environmental and corporate sustainability. Literature review and case study. **Sustainability (Switzerland)**, 2018.

ROZADO, A. F. et al. Aplicação de ozônio contra *Sitophilus zeamais* e *Tribolium castaneum* em milho armazenado. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 12, n. 3, p. 282–285, 2008.

SUBRAMANYAM, B. et al. Efficacy of ozone against *Rhyzopertha dominica* adults in wheat. **Journal of Stored Products Research**, 2017.

SZABO, M. P. J. et al. Ecology, biology and distribution of spotted-fever tick vectors in Brazil. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 3, n. July, p. 27, 2013.

YUNKER, C. E.; MEIBOS, H. Culture of embryonic tick cells (Acari: Ixodidae). **Tissue Culture Association Manual**, v. 5, n. 1, p. 1015–1017, 1979.

Capítulo 9

“Avaliação *in vitro* da atividade acaricida do ozônio sobre células de linhagem embrionária de carrapatos (RSE8 e IDE8) infectadas e não infectadas com *Ehrlichia canis*”

Resumo do Projeto de Pesquisa

A espécie *Rhipicephalus sanguineus* l.s. popularmente conhecida como “carrapato do cão”, tem grande importância médico veterinária, pois, além de espoliar seus hospedeiros, pode ser vetora de agentes patogênicos que afetam os animais domésticos e os seres humanos, incluindo a bactéria intracelular *Ehrlichia canis*, responsável pela Erliquiose Monocítica Canina (EMC), uma das mais importantes na área veterinária. Inúmeros estudos vêm sendo conduzidos na busca de métodos eficazes de controle desse carrapato priorizando-se além da segurança dos animais não alvos, a saúde humana, a minimização na geração de resíduos ambientais, porém enfatizando que os mesmos devem ser eficientes contra o ectoparasita. Nesse contexto, o ozônio, um agente oxidante e que pode ser utilizado sob várias formulações (dissolvido em água, óleo, etc) tem-se mostrado ser um potencial acaricida sobre a espécie *R. sanguineus* l.s. (in vivo), visto que testes de exposição com água ozonizada alterou morfofisiologicamente o integumento, as glândulas salivares, os ovários e o órgão de Gené de fêmeas desta espécie de carrapatos. Apesar dos resultados animadores e obtidos em laboratório, ainda restam questões a serem respondidas referentes ao efeito acaricida do ozônio a níveis celular e molecular. Para tanto, o presente estudo propôs avaliar do potencial de ação acaricida do ozônio (óleo de girassol ozonizado) sobre linhagens celulares embrionárias de carrapatos infectadas e não infectadas com *E. canis* com o objetivo de se esclarecer os mecanismos celulares e moleculares que resultam dessa exposição, inclusive sobre os patógenos transmitidos por esses carrapatos, fazendo para tanto análises de qPCR para genes de estresse celular e apoptose (GST e Caspases1/3), bem como a realização de análises morfológicas das células sob microscopia de luz para análise da infecção.

Palavras chave: carrapatos, cultivo celular, ozônio, controle, acaricida, morfologia.

INTRODUÇÃO

Carrapatos são ectoparasitas obrigatórios pertencentes ao Filo Arthropoda, Classe Arachnida, Subclasse Acari, Ordem Parasiformes, Subordem Ixodida (Barker and Murrell, 2008). Atualmente estão divididos em três famílias: Nuttalliellidae, Argasidae e Ixodidae, sendo esta última composta pelo maior número de espécies, com grande importância econômica e médico-veterinária (NAVA et al., 2015).

A família Ixodidae, abriga os “carrapatos de corpo duro” (do inglês “*hard ticks*”), os quais apresentam um escudo dorsal quitinoso, que nos machos recobre quase toda a sua superfície dorsal e nas fêmeas apenas a sua metade anterior, possibilitando assim a expansão do corpo durante o processo de ingurgitamento, e conferindo-lhes um dimorfismo sexual na fase adulta (Guglielmone et al., 2014).

A espécie *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato é popularmente conhecida como “carrapato marrom do cão”, visto terem o cão doméstico como seu hospedeiro preferencial, embora possam parasitar também outros vertebrados, incluindo humanos (DANTAS-TORRES AND OTRANTO, 2015; GRAY et al., 2013). Essa espécie possui grande importância médico veterinária por ser considerada vetor de inúmeros patógenos, como bactérias (*Anaplasma* spp, *Borrelia* spp, *Rickettsia rickettsii*, *R. conorii* e *Ehrlichia canis*) e protozoários (*Babesia vogeli* e *Hepatozoon canis*) (CUNHA et al., 2009; IPEK et al., 2020; LATROFA et al., 2014; SZABO et al., 2013).

Já a espécie *Ixodes scapularis* conhecida com carrapato de patas negras (“*blacklegged tick*”), é o principal vetor da doença de Lyme (*Borrelia burgdorferi* sensu stricto e *Borrelia mayonii*), mas também transmissor de outras bactérias (*Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia miyamotoi*, e *E. muris eauclarensis*), protozoários (*Babesia microti*), e vírus (Powassan) que são responsáveis por enfermidades em humanos (EISEN, 2018). Apesar disso, o ser humano é apenas um hospedeiro acidental dessa espécie que durante os estágios imaturos costumam parasitar animais selvagens, incluindo roedores, pássaros, lagomorfos e ungulados, e no estágio adulto tem como principais hospedeiros os mamíferos, principalmente o veado da espécie *Odocoileus virginianus* (OLIVER et al., 2021).

Ambas espécies são trioxenas, ou seja, necessitam de três hospedeiros para completar seu ciclo de vida e chegar à fase adulta reprodutiva (não necessariamente o mesmo indivíduo e nem em indivíduos da mesma espécie) (Guglielmone et al., 2014). Além disso, trata-se de carrapatos de ingurgitamento lento, o que significa que as fêmeas permanecem fixadas nos hospedeiros se alimentando por um longo período (cerca de 7 a 10 dias) para completar seu ingurgitamento e iniciar a oviposição (SONESHINE; ROE, 2014). Some-se a isso, o fato dessas

espécies vetoras também serem consideradas reservatórios de patógenos, por oferecerem condições para que se mantenham ativos por gerações, acarretando no compartilhamento de patógenos que podem ser transmitidos pela via transovariana (da fêmea ingurgitada para a prole) ou pela transtadial (de um estágio de vida para o outro) (AKTAS; OZUBEK, 2018; IPEK et al., 2020).

Outro fator que contribui para a transmissão de patógenos por carrapatos é a sua saliva, fonte riquíssima de bioativos contendo mais de 2.000 proteínas (TIRLONI et al., 2020) incluindo moléculas multifuncionais com as mais diversas funções, inclusive com potencial de modular os sistemas imune-inflamatório e hemostático dos hospedeiros (Abreu et al., 2019), garantindo assim, não só o sucesso biológico desses ectoparasitas, mas também o de ser importante vetor de patógenos (Kazimírová and Štibrániová, 2013). A participação dos bioativos da saliva produzida pelos carrapatos, por meio da sua ação imunomoduladora no hospedeiro, facilitaria a transmissão de patógenos durante a sua alimentação, uma vez que as barreiras imunológicas estariam afetadas (Camargo-Mathias et al., 2011; Kotál et al., 2015).

Todos esses aspectos biológicos selecionados e refinados ao longo de anos contribuíram para que essas espécies se tornassem grandes vetoras e responsáveis pela transmissão de doenças de importância médica e veterinária (MELCHIOR, et al. 2020).

A *Ehrlichia canis*, bactéria intracelular Gram negativa da família Anaplasmataceae, ordem Rickettsiales (DUMLER et al. 2001), atua como agente etiológico da doença Erliquiose monocítica canina, invadindo monócitos e macrófagos, multiplicando-se e desenvolvendo-se no interior dessas células, levando o organismo a complicações multissistêmicas e até mesmo à morte (BOUZA-MORA et al., 2017). Essa doença é considerada uma das mais importantes na medicina veterinária, pois afeta cães e outros canídeos, podendo também afetar seres humanos (HARRUS e WANER, 2011; ANDRIĆ, 2014). Portanto, essa espécie representa grande preocupação não apenas pelos prejuízos causados aos animais de estimação, mas também à saúde pública (CARDOSO et al., 2006; CUNHA et al., 2009).

Diante do exposto e da relevância médico e veterinária dessas espécies de carrapatos, torna-se crucial a busca por estratégias que auxiliem no controle destes e consequentemente dos patógenos por eles transmitidos. Nesse aspecto, os acaricidas químicos sintéticos vem representando a maior parcela utilizada para o controle parasitário, e apesar da sua comprovada eficiência e ampla comercialização no mercado de produtos veterinários, sabe-se atualmente dos malefícios e riscos causados pelo uso indiscriminado dos mesmos (BECKER et al., 2019a), acarretando em sérios prejuízos econômicos e sanitários, o que ainda e além de tudo pode

culminar na seleção de linhagens resistentes de carrapatos às bases químicas utilizadas. Isso acarreta também na necessidade de se formular frequentemente novos produtos com outras bases, ou então de se aumentar as doses daqueles que já seriam rotineiramente utilizados, o que acaba por intensificar o risco de toxicidade dos animais considerados não-alvos e aumenta a contaminação ambiental derivada do acúmulo de resíduos provenientes destes compostos químicos (EIDEN et al., 2017, 2020).

Dessa forma, novas estratégias de controle que além de eficientes contra os carrapatos, ainda apresentem menos risco à saúde animal e ao meio ambiente são urgentes, e por esse motivo, alguns métodos alternativos, como o uso de óleos essenciais e extratos de plantas com ação acaricida tem chamado a atenção (OTRANTO; WALL, 2008). Além desses bioativos derivados de plantas, outra alternativa que vem sendo atualmente avaliada é a utilização do ozônio como potencial acaricida contra carrapatos *R. sanguineus* l.s. (ABREU et al., 2020a, b).

O ozônio é descrito na literatura como um agente oxidante com potencial de ação antimicrobiana contra *Streptococcus mutans* e *Enterococcus faecalis* (MOREIRA FONSECA et al., 2015; NAGAYOSHI et al., 2004), ação desinfetante (LOPES et al., 2015), esterilizante (SOUSA et al., 2011) e cicatrizante (MENÉNDEZ ET AL., 2011; PEÑA SISTO et al., 2015; SECHI et al., 2001), sendo suas propriedades já amplamente exploradas na desinfecção de ambientes hospitalares (MARSON et al., 2016; SOUSA et al., 2011), no tratamento de água (MAJEWSKI, 2012; PASSOS et al., 2014), e até em procedimentos terapêuticos em animais e humanos (OLIVEIRA et al., 2014; MENÉNDEZ et al., 2011). Estudos recentes já demonstraram a sua eficácia também contra pragas agrícolas e alimentícias, como o *Rhyzopertha dominica* no trigo (SUBRAMANYAM et al., 2017), *Alphitobius diaperinus* em granjas (SOARES et al., 2018), e *Ephestia kuehniella* em farinhas e grãos comerciais (MORAGLIO et al., 2018).

Levando-se em consideração as propriedades já exploradas do ozônio (tanto como gás, água e óleo ozonizados) (MRSON et al., 2016; MENÉNDEZ; FALCÓN; MAQUEIRA, 2011; NAGAYOSHI et al., 2004; SECHI et al., 2001) vem sendo testada a hipótese de sua ação como agente acaricida para o controle de carrapatos, tendo sido já relatado em estudos recentes sua capacidade de causar alterações na superfície do integumento e na placa espiracular (respiratória) de *R. sanguineus* (MOREIRA et al., 2017), concomitante à capacidade cicatrizante de feridas provocadas na pele dos hospedeiros pelos carrapatos (OLIVEIRA et al., 2014).

Nesse sentido, o projeto inicial de doutorado onde esse projeto está vinculado propôs testar o potencial acaricida do ozônio em carrapatos *R. sanguineus* l.s. *in vivo* e em culturas de

células de linhagem embrionárias (RML-15 e RML-RSE) *in vitro* estabelecendo-se assim um comparativo entre os efeitos provocados por esse composto nos diferentes modelos celulares e teciduais, fazendo para tanto o uso de técnicas de citometria de fluxo e microscopias: de luz, eletrônica de transmissão e confocal a laser.

Trabalhos prévios desenvolvidos por Abreu et al. (2020a, b) e que testaram o potencial acaricida deste diluído em água (água ozonizada), uma vez que a diluição do ozônio em água possibilitaria maior estabilidade de suas moléculas, aumentando o potencial de reações responsáveis por gerar radicais oxidantes que estariam envolvidos no desencadeamento de reações bioquímicas tanto *in vivo* quanto *in vitro* (Bocci and Via, 2004). Os estudos realizados em laboratório por meio de testes de imersão de fêmeas dessa espécie de carrapatos no estágio de semi ingurgitamento forneceram resultados que comprovaram que danos e alterações morfofisiológicas ocorreram no integumento e nas glândulas salivares quando da exposição das mesmas nas concentrações de 0,75, 1,5, 2,25 e 3mg/L de água ozonizada (ABREU et al., 2020a, b).

A análise microscópica do integumento das fêmeas expostas à água ozonizada apontou para alterações principalmente na camada de células que compõem o epitélio, cuja função é sintetizar e secretar todos os componentes que comporão as diversas camadas do integumento (cutícula) (Abreu et al., 2020a). As alterações incluíram metaplasia, ou seja, as células originalmente cúbicas passaram para a forma cilíndrica, o que sugeriu que as mesmas intensificaram a sua função na tentativa de secretar componentes cuticulares (via espessamento da cutícula) para provavelmente aumentar a barreira protetora dos carrapatos impedindo assim que o composto penetrasse no interior do corpo (Abreu et al., 2020a). Na maior concentração (3mg/L) testada por Abreu et al. (2020a), observou-se que as alterações foram ainda mais severas, uma vez que a camada epitelial, antes única (simples) tornou-se estratificada, ou seja, o aumento do número de camadas celulares, pode ter agido como estratégia de proteção do interior do corpo dos carrapatos contra a ação do ozônio.

Abreu et al. (2020b) também analisaram as glândulas salivares de fêmeas da mesma espécie que foram expostas a água ozonizada nas mesmas concentrações anteriormente citadas. Desse estudo foram obtidos resultados mostrando que os ácinos glandulares também seriam alterados e passariam a apresentar características diferentes daquelas encontradas nos indivíduos controle, tais como: dilatação do lúmen do ácino I, vacuolização citoplasmática e modificações nucleares como marginalização da cromatina, picnose e fragmentação nuclear das células dos ácinos II e III, além do surgimento de grânulos irregulares no interior das células

desses ácidos, sinalizando que a água ozonizada causaria danos irreversíveis nos tecidos glandulares e interferiria no processo de ingurgitamento, inibindo-o, e consequentemente interferindo no sucesso do processo reprodutivo e na geração da prole, (ABREU, 2020b).

Além disso, dados ainda não publicados (enviados em relatórios científicos anteriores) demonstraram alterações morfofisiológicas nos ovários e no órgão de Gené de fêmeas ingurgitadas dessa mesma espécie submetidas as mesmas concentrações de água ozonizada. Essas alterações relevantes, interfeririam no sucesso do processo reprodutivo e na geração da prole, o que foi confirmado pela avaliação dos parâmetros biológicos, quando os dados mostraram redução na taxa de oviposição e no índice de produção de ovos, bem como na diminuição da eclosão de larvas nos grupos expostos a essa substância.

Mesmo com essas recentes descobertas sobre o potencial acaricida do ozônio, ainda há muito o que se esclarecer, inclusive elucidando quais são os mecanismos de ação desse composto nas células dos ectoparasitas, tanto aquelas não infectadas quanto as infectadas por patógenos.

Nesse sentido, estudos com foco na ação de substâncias acaricidas, preferencialmente de origem natural, em níveis tecidual e celular, vem sendo desenvolvidos por meio de bioensaios conduzidos em laboratório (ABREU et al., 2020a, 2020b; CAMARGO-MATHIAS et al., 2016, 2017, 2018; KONIG et al., 2019; LIMA DE SOUZA et al., 2017, 2020; MATOS et al., 2018, 2019, 2020; OLIVEIRA et al., 2018, 2019; OLIVEIRA et al. 2020; REMEDIO et al., 2016; SABADIN et al., 2017). Apesar dos resultados bastante animadores que vem sendo encontrados, ainda há escassez de trabalhos que abordem os efeitos destas substâncias naturais sobre cultura de células de carrapatos (*in vitro*), metodologia que vem sendo cada vez mais adotada para se entender os mecanismos de ação de muitas substâncias, em virtude das novas condutas que se referem ao uso de animais em experimentos em laboratório (MUNDERLOH, 2000; KALIL et al., 2017).

O cultivo de linhagens de células de carrapatos vem se expandindo ao longo dos anos, e estima-se que existam mais de 60 linhagens já estabelecidas, de 16 espécies de carrapatos ixodídeos de importância médica veterinária, prática que vem sendo conduzida em diversos laboratórios de pesquisa ao redor do mundo (BELL-SAKYI et al., 2018), visto essa ferramenta representar a possibilidade de obter conhecimentos mais específicos sobre: a) biologia celular desses animais (desenvolvimento embrionário e tecidual, produção de secreções, etc.); b) mais sobre a relação ectoparasita-hospedeiro; c) sobre a interação vetor-patógeno; d) na produção de vacinas; e e) na elucidação de mecanismos de ação de acaricidas para controle desses

ectoparasitas (BELL-SAKYI et al., 2007; YUNKER; MEIBOS, 1979). Além disso e como já foi reforçado anteriormente, a aplicação dessas técnicas cumprem as exigências do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal que orienta que haja redução do número de animais em laboratório, bem como estimula que sejam desenvolvidos métodos outros que substituam os mesmos nas pesquisas (CONCEA, 2013). Isso também é posto em destaque, visto que os carrapatos por serem ectoparasitas hematófagos necessitam dos animais vertebrados (hospedeiros) para se alimentar e completar, portanto, o seu ciclo biológico (ANDERSON; MAGNARELLI, 2008).

Portanto, para complementar esse trabalho de doutorado, que visa entender quais os efeitos do ozônio como acaricida em carrapatos da espécie *R. sanguineus* l. s. que já obteve relevantes resultados, inclusive publicados, este projeto propôs a realização de bioensaios *in vitro* utilizando-se células de linhagens embrionárias (RSE8 e IDE8), para estabelecimento de um protocolo de testagem dessas linhagens em relação à substâncias acaricidas, bem como a realização de análises moleculares dessas mesmas células expostas ao ozônio avaliando os mecanismos que estariam envolvidos para que a ação acaricida seja completamente entendida e que a mesma possa ser utilizada num futuro próximo como uma estratégia de controle.

OBJETIVOS

O presente projeto de pesquisa teve como objetivos:

- I. Estabelecer um protocolo padrão de testagem de compostos acaricidas utilizando como modelo as células de linhagens embrionárias de carrapatos, testando o potencial acaricida do ozônio (óleo ozonizado) sobre a cultura dessas linhagens celulares.
- II. Analisar os efeitos desse composto *in vitro*, investigando expressões de genes relacionados ao estresse e morte celular (GST e Caspases 1 e 3) após a exposição das células (ISE6) a esse composto.
- III. Verificar os efeitos diretos e indiretos desse composto sobre os patógenos transmitidos por carrapatos dessas espécies, infectando as linhagens de células com *Ehrlichia canis* (Spain 105 strain) e realizando análise morfológica e de qPCR após a exposição ao ozônio (óleo ozonizado).

MATERIAL E MÉTODOS

Óleo ozonizado (Oleozon®)

Devido à grande instabilidade do ozônio, o presente projeto propôs que esse composto fosse levado para o Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT) da Universidade NOVA de Lisboa, Portugal, local onde foi realizado esse estágio BEPE, sob a forma de óleo ozonizado, utilizando como base o óleo de girassol. Para garantir a estabilidade do composto, optou-se pela utilização do Oleozon, produto comercial composto por óleo de girassol ozonizado para a realização dos bioensaios *in vitro*.

Cultivo Celular

As células de linhagens embrionárias ISE6 e IDE8 (*Ixodes scapularis*), RS8 (*R. sanguineus*), e HLE/LULS42 (*Hyalomma lusitanicum*) cedidas pela Dra. Ana Domingos no IHMT-NOVA, Lisboa, foram cultivadas em tubos para cultura de face plana com 2,2 mL de meio L15B300 (MUNDERLOH et al., 1999), L-15B (MUNDERLOH AND KURTTI, 1989), e L15/L15B (MUNDERLOH AND KURTTI, 1989), respectivamente, com troca de meio uma vez/semana e mantidas em incubadoras com temperatura controlada entre 28 à 32°C até o momento da realização dos bioensaios.

Foram cultivadas também células de cão DH82 em meio de cultivo DMEM suplementado com 20% de Soro Fetal Bovino (SFB) sem antibióticos em frascos de cultivo 75cm² em incubadora de CO₂ com temperatura controlada de 35 a 37°C, para que servissem como reservatório para o crescimento de *E. canis* e serem utilizadas posteriormente para a infecção em novas linhagens de células de carrapato.

Cultivo de *E. canis*

E. canis (Spain 105) previamente isolada do sangue de um cão naturalmente infectado e mantida através da linhagem de células de cão DH82 e IDE8 (ZWEYGARTH et al., 2014) foram criopreservadas (10% de DMSO) em nitrogênio e também cedidas pela Dra. Ana Domingos para obtenção da infecção de novas linhagem celulares.

As células IDE8 infectadas com *E. canis* foram mantidas por 3 semanas para crescimento das bactérias em meio L-15B suplementado com 10% de tryptose phosphate broth (TPB), 5% de Soro Fetal Bovino (SFB), 0.1% concentrado de lipoproteína bovina (MP Biomedicals), 0.1% NaHCO₃ e 10 mM HEPES, sem antibióticos (ECM) (ZWEYGARTH et al., 2014).

Infecção de células de carrapato por *E. canis*

A partir da terceira semana as células IDE8 infectadas com *E. canis* foram destacadas através de movimentos de “*up-and-down*” e raspagem do fundo com auxílio de micropipeta de 2mL. A suspensão de células foi centrifugada a 200x g por 5 minutos em temperatura ambiente, em seguida as células foram ressuspensas em 500µL de Tripsina (500µL/mL de PBS) e incubadas a 37°C por 20 minutos. Na sequência, o volume original foi completado (2-5mL) com meio ECM (L-15B sem antibióticos), e a suspensão passou por agulha 26G por 10 vezes para ruptura mecânica das células e liberação das bactérias intracelulares. Centrifugou-se a suspensão de células em 1500 x g a 5 minutos e a alíquota de 500mL do sobrenadante contendo as bactérias foi transferido para cada tubo de cultura de células de ISE6 e DH82 previamente estabelecidas.

Essas células infectadas com *E. canis* foram mantidas continuamente em tubos de face plana selados contendo 2,2mL de meio L-15B sem antibióticos à 32°C (ISE6) ou em frasco de 75cm² com meio DMEM suplementado com 20% de SFB sem antibióticos a 35°C (DH82) e o meio trocada uma vez por semana. Essas células foram analisadas semanalmente para identificação de infecção através de análise morfológica de lâminas citocentrifugadas em CitoSpin e coradas com Giensa (FERROLHO et al., 2016) para avaliação em microscópio de luz convencional.

Todos os experimentos seguiram as normas e diretrizes de biossegurança do IHMT-NOVA, Lisboa, Portugal.

Confirmação molecular da infecção de *E. canis* (qPCR) Extração de RNA e DNA

A extração de DNA e RNA foi realizada seguindo o protocolo Tri Reagent® (Sigma–Aldrich). A preparação das amostras iniciou-se centrifugando-as a 12000 x g por 10 minutos a 5°C, em seguida o sobrenadante foi descartado e foram adicionados 250 µL de Tri Reagent® deixando reagir por 5 minutos em temperatura ambiente. A separação das fases foi realizada adicionando 50 µL de clorofórmio, invertendo por 15 segundos e deixando a temperatura ambiente por 15 minutos antes de centrifugar a 12000 x g por mais 15 minutos a temperatura de 5°C.

Para isolamento do RNA, foi retirada cuidadosamente a fase aquosa da amostra e transferida para um novo microtubo de 1,5 mL onde foram adicionados 125 µL de 2-propanol e deixado a temperatura ambiente por 10 minutos. A seguir, o microtubo foi centrifugado a 12 000 x g a 5°C por 10 minutos para precipitação do RNA. O sobrenadante foi retirado e foram adicionados 250 µL de etanol 75% e centrifugado a 7500 x g por 5 minutos a temperatura de

5°C. Depois retirou-se o etanol e deixou-se secar a amostra em temperatura ambiente por 10 minutos e o pellet foi ressuspensão em SDS 0,5% e armazenado em 2-8°C. A confirmação da extração e concentração da amostra foi realizada utilizando equipamento Nanodrop 1000 Spectrophotometer da Thermo Fisher Scientific.

Síntese de cDNA

Para a produção de cDNA a partir do RNA isolado de cada amostra foi utilizado o kit da BioRad “Script cDNA Synthesis Kit” seguindo o protocolo do fabricante. Após adicionar os componentes do kit (água sem nuclease, 5x Script Reaction Mix, Script reverse transcriptase e o RNA) totalizando 20 µL de solução, a mesma foi colocada em termociclador T100™ Thermal Cycler com ciclos de 5 minutos a 25°C, 20 minutos a 46°C e 1 minuto a 95°C. A concentração de cDNA foi confirmada através da utilização do equipamento Nanodrop 1000 Spectrophotometer da Thermo Fisher Scientific.

qPCR para análise de infecção por *E. canis*

A PCR foi conduzida utilizando o protocolo para Real Time TaqMan Probe para identificação do gene dsb de *E. canis*, utilizando primers Dsb-300 e Dsb-728 (Doyle, 2005). Uma reação de 10 µL foi preparada com 5 µL de Mix PCR Buffer, 0,8 µL de cada primer a 10 µM, 0,8 µL da sonda dsb (Probe), 2 µL de cDNA e água sem nuclease para completar o volume. A PCR foi realizada em equipamento de PCR Real Time “CFX Connect Real Time System” (Bio-Rad, CA, USA) em 45 ciclos com condições de 5 minutos de 95°C, 15 segundos a 95°C e 1 minuto de 60°C cada.

Exposição das células

A exposição *in vitro* das células embrionárias de carrapatos (ISE6) foi realizada em placas de 24 poços, para tanto, as células dos tubos de face plana contendo meio de cultura L-15B300 foram ressuspensas com auxílio de pipeta graduada e pipetador automático com movimentos de “*up and down*” até que todas as células fossem desgrudadas do tubo. Em seguida, uma alíquota de células foi retirada para contagem em câmara de Neubauer e suspensão foi ajustada para concentração de 1×10^6 células/mL e foram adicionados 500 µL de células em cada poço (5×10^5 células/poço). As células foram mantidas em incubadora a 32°C até completa aderência (2-3 dias).

Para exposição das células a placa de 24 poços foi dividida da seguinte forma: **Grupo Controle Negativo - GCN** (células expostas somente a meio L-15B300); **Grupo Controle**

Positivo- GCP (células expostas ao DMSO); **Grupo Ozônio 50 µL/mL- GO50** (células expostas ao óleo ozonizado na concentração de 50 µL/mL); e **Grupos Ozônio 100 µL/mL- GO100** (células expostas ao óleo ozonizado na concentração de 100 µL/mL).

Essas diferentes concentrações de óleo ozonizado foram definidas através de LC50 (a concentração mínima do composto capaz de induzir 50% de morte das células) obtida através da análise de viabilidade celular.

O DMSO (dimetilsulfóxido - $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$) foi utilizado nesse bioensaio como controle positivo, pela suas propriedades já bem conhecidas sobre toxicidade moderada em culturas células, induzindo morte celular. Como controle negativo foi utilizado apenas meio de cultivo L-15B300.

Foram adicionados 50 µL de meio L-15B300 no grupo **GCN**, 50 µL de DMSO no grupo **GCP**, 50 µL e 100 µL do óleo ozonizado nos grupos **GO50** e **GO100** (respectivamente). Os tubos foram incubados nas mesmas condições de cultura a 32°C, durante 24 horas e levados para análises dos resultados.

Viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada após 24 horas da exposição das células ao meio de cultivo (L15B-300), ao DMSO e ao óleo ozonizado nas concentrações 50 e 100 µL/mL (concentrações essas definidas após ensaio piloto com diferentes concentrações com o intuito de se estabelecer a concentração mínima do composto capaz de induzir 50% de morte das células LC50) através de contagem de células vivas utilizando o método de Azul de Tripán (1:2) em Câmara de Neubauer. Os dados de viabilidade obtidos foram analisados e a confecção de gráficos foram realizados no software Graphpad Prism 6.0, utilizado o teste de variância “ANOVA”, seguido do teste de Tukey, sendo os valores de $p < 0,05$ considerados significativos.

Análise molecular da exposição ao ozônio (qPCR)

Análises de PCR quantitativo foram realizadas para avaliação de genes associados a estresse e morte celular (GST, Caspases 1 e 3) após a exposição das células de carrapato (ISE6) ao óleo ozonizado e comparado com os grupos controle. Esta técnica foi realizada no IHMT NOVA sob a supervisão da Doutora Sandra Antunes.

O RNA das células foi extraído utilizando TriReagent (Sigma–Aldrich), a concentração das amostras foi avaliada usando o equipamento Nanodrop 1000 Thermo Fisher Scientific de acordo com as instruções do fabricante. Para a síntese de cDNA foi utilizado o kit “iScript™

cDNA Synthesis Kit” (Bio-Rad) em um equipamento T100 Thermal Cycler (Bio-Rad), assim como descrito anteriormente.

Para realização do qPCR para avaliação da expressão gênica de genes relacionados ao estresse e morte celular foram escolhidos os genes GST (relacionado ao estresse oxidativo), Caspase 1 (relacionada a processos pro-inflamatórios e a morte celular por piroptose) e Caspase 3 (diretamente relacionada a morte celular por apoptose).

Os ensaios foram realizados em triplicatas utilizando o kit iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix (BioRad) seguindo o protocolo do fabricante. Uma reação de 10 µL foi preparada utilizando 5 µL de Mix para PCR Buffer, 0,5 µL de cada primer, 1 µL de cDNA e água livre de nucleases até completar o volume. As reações foram conduzidas em termociclador CFX Connect Real-Time System (Bio-Rad, CA, USA), em 45 ciclos com temperatura de anelamento e extensão a 60°C e com inserção da melt curve 55-95°C, sendo 0,5°C a cada 0,05 minutos. Uma curva padrão com diluições em série foi incluída para determinar a eficiência de amplificação através da inclinação da curva padrão. Os primers utilizados foram CASP1, CASP3 e GST. Os primers foram desenhados utilizando-se da plataforma Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) e bases de dados como o Genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/). Foram também utilizados os genes de referência: R13A e 16S para normalização da expressão relativa. Os produtos foram purificados com kit “NZYGelpure kit” (NZYTech), corrido em gel de agarose e sequenciados.

A análise dos resultados foi realizada com recurso ao CFX Manager™ version 3.1 (Bio-Rad, CA, USA) que utiliza o método de Pfaff, sendo que $p > 0,05$ define uma diferença estatisticamente significativa. Assim, os valores de expressão diferencial foram calculados com as eficiências de amplificação e a derivação do Cq de uma amostra versus uma amostra controle.

Análise morfológica das células/patógenos

Para monitoramento morfológico da infecção bactéria e para análise morfológica após a exposição ao óleo ozonizado, esfregaços de células preparado em citocentrifuga CitoSpin, utilizando uma alíquota de 150 µL da suspensão celular, centrifugando a 4400 rpm durante 5 minutos, foram posteriormente corados com Giemsa (Hemacolor Rapid Staining Kit) e examinados em fotomicroscópio comparando aos grupos controle negativo e positivo.

RESULTADOS

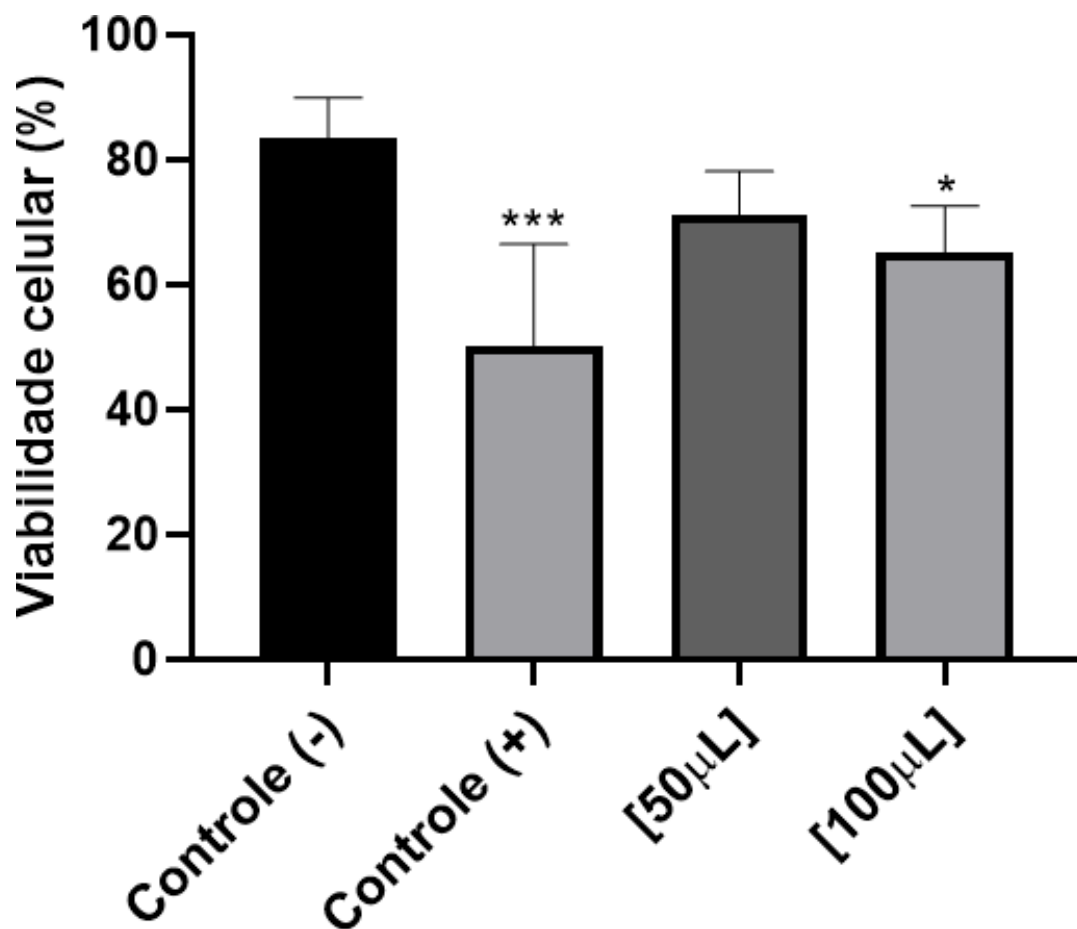
Viabilidade celular

Os resultados da avaliação da viabilidade celular das células expostas ao meio de cultivo, DMSO e óleo ozonizado 50 e 100 $\mu\text{L/mL}$ foram apresentados em formato de tabela a seguir (Tabela 1).

Tabela 01 – Média e desvio padrão da viabilidade celular (em porcentagem) dos grupos Controle Meio, Controle DMSO, Grupo Exposto a 50 µL e a 100 µL do óleo ozonizado, em condições de cultivo (32±1°C). Médias que diferiram significativamente em 5% (p<0.05) estão representadas pela letra a.

	Grupo Controle Meio (-)	Grupo Controle DMSO (+)	Grupo Exposto 50 µL/mL O₃	Grupo Exposto 100 µL/mL O₃
Viabilidade Celular (%)	83,56±5,6	50,31±14,5 ^a	71,31±6,1	65,23±6,59 ^a

Gráfico 01. Viabilidade celular de células embrionárias de *Ixodes scapularis* (ISE6) expostas ao óleo ozonizado (50 e 100µL/mL) ou não (Controle Meio e DMSO). Os valores representam a média e o desvio padrão. (*) Para valores que diferem significativamente 5% ($p < 0.05$).



Análise Morfológica das células ISE6

A) Células ISE6 expostas ao meio de cultivo (L15B300)

Os resultados da análise morfológica das células expostas somente ao meio de cultivo e coradas com Giensa mostraram as mesmas com aspecto normal, com formatos variando de arredondados à fusiformes (semelhante a fibroblastos) e tamanhos heterogêneos (Fig. 1 A1-5). O citoplasma dessas células apresentou-se repleto de vesículas citoplasmáticas (Fig. 1 A1-3) e os núcleos arredondados em sua maioria, não sendo possível observar o nucléolo (Fig. 1 A1-5). Além disso, também foi possível observar células com intensa divisão celular, confirmando que as mesmas estavam em plena atividade celular (Fig. 1 A1 e A5).

B) Células ISE6 expostas a concentração de 50 µL/mL

As células expostas ao óleo ozonizado na concentração de 50 µL/mL apresentaram morfologia semelhante ao grupo anterior, ou seja, células com tamanhos e formatos heterogêneos, com citoplasma repleto de vesículas citoplasmáticas e núcleos, em sua maioria, arredondados (Fig. 1 B1-5). Pode-se observar também células em divisão celular (Fig. 1 B1 e B3). No entanto, nesse grupo já é possível notar a presença de algumas células em processo de morte, com os núcleos intensamente corados (picnóticos) ou rompidos, principalmente aquelas em contato com as gotículas de óleo (Fig. 1 B2-4).

C) Células ISE6 expostas a concentração de 100 µL/mL

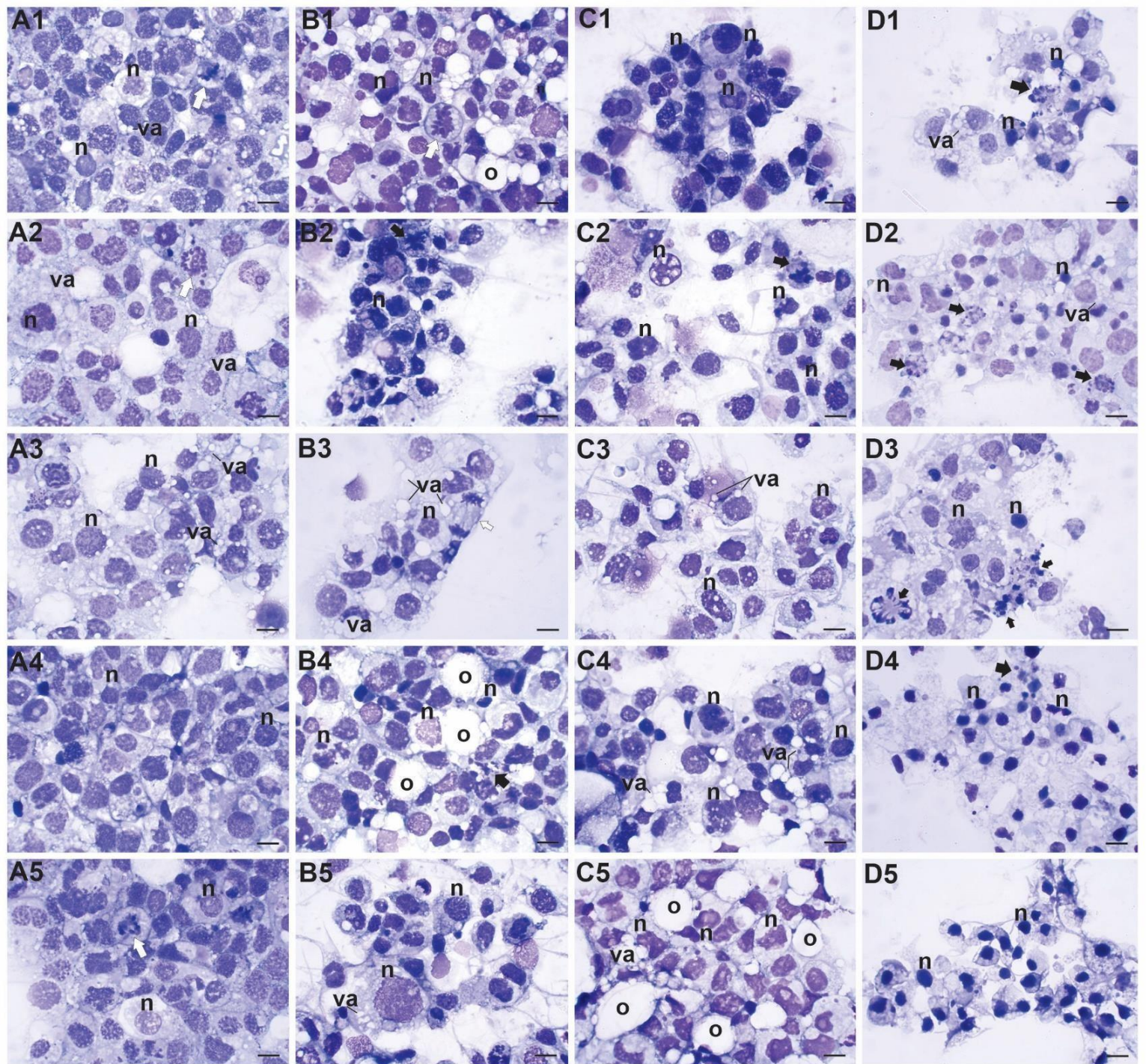
A morfologia das células expostas ao óleo ozonizado na concentração de 100 µL/mL sofreu alterações mais evidentes, tais como: a) maior presença de células com forma fusiforme (Fig. 1 C1-2); b) citoplasma com vacúolos citoplasmáticos (Fig. 1 C3-5); c) núcleos intensamente corados, com formatos irregulares, vacuolizados ou rompidos (Fig. 1 C1-5).

D) Células ISE6 expostas ao DMSO

Como já era esperado as células expostas ao DMSO apresentaram severas alterações morfológicas, típicas de morte celular, devido a esse composto ser conhecido por seu efeito citotóxico e tendo sido aqui utilizado como controle positivo, além de fator de comparação.

Concluindo, a análise morfológica mostrou muitas células em processo de morte celular, com vacúolos citoplasmáticos (Fig. 1 D1-2), núcleos picnóticos, com formatos irregulares ou fragmentados (Fig. 1 D1-5), podendo se observar inclusive alguns fragmentos de núcleos dispersos e que extrapolaram o citoplasma, apresentando-se como uma massa amorfa (Fig. 1 D1 e D3).

Figura 1 – Fotomicrografias de células embrionárias de *Ixodes scapularis* (ISE6) expostas: ao meio de cultura L15B300 (Grupo Controle Negativo) (A1-5); ao óleo ozonizado [50µL/mL] (B1-5); [100µL/mL] (C1-5); e ao DMSO (Grupo Controle Positivo) (D1-5). **n**= núcleo; **o**= gotículas de óleo; **va**= vacúolos; **seta escura**= fragmentos de núcleo; **seta branca**= divisão celular;



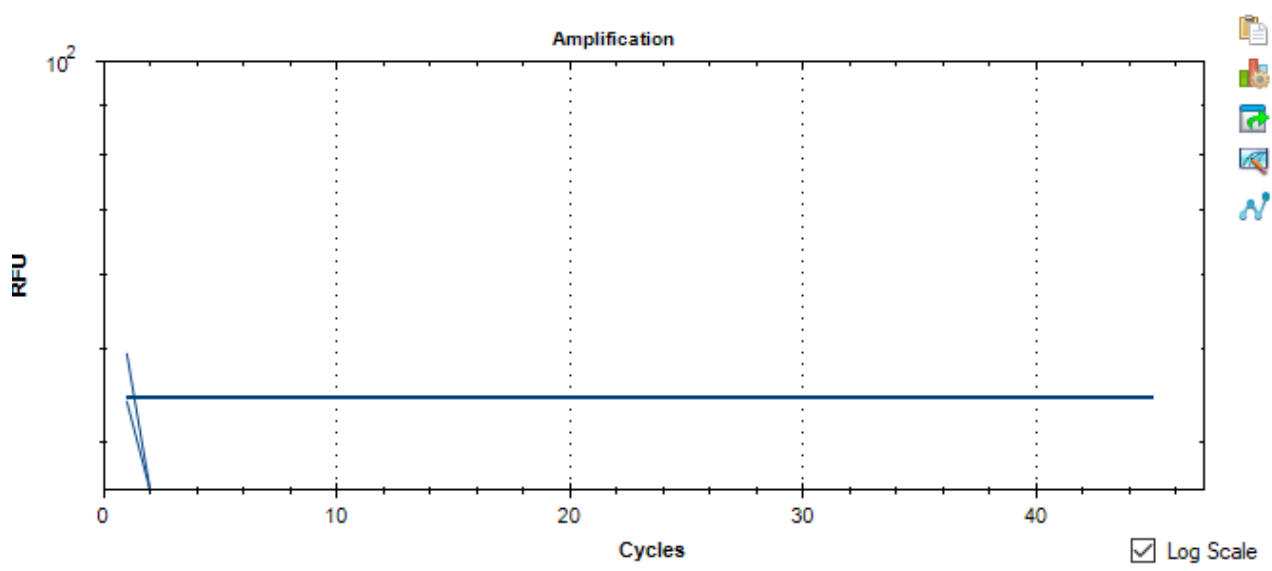
Confirmação molecular da infecção de *E. canis* (qPCR)

Os resultados do RT-qPCR TaqMan Probe realizado para identificação do gene *dsb* de *E. canis*, utilizando primers Dsb-300 e Dsb-728 (Doyle, 2005) não apresentou amplificação do gene em nenhuma das linhagens celulares supostamente infectadas por *E. canis* como apresentado na **Tabela 2** e no **Gráfico 2**, que mostra a reta em azul demonstrando a não amplificação do gene, a curva de amplificação padrão foi de $E = 62,1\%$.

Tabela 2. Identificação de infecção das linhagens celulares (ISE6, J774 e DH82) por *E. canis*.

N/A= não amplificado.

Amostra	Cq	Sq
ISE6	N/A	N/A
ISE6 <i>E.canis</i>	N/A	N/A
J774 <i>E.canis</i>	N/A	N/A
DH82 <i>E.canis</i>	N/A	N/A
Controle negativo	N/A	N/A
Controle Positivo	22,71	117439,35891

Grafico 2: Amplificação nula do gene dsb de *E. canis* nas linhagens celulares (ISE6, J774 e DH82).

Desenho dos primers

Os primers 16S e R13A foram utilizados nesse estudo como genes de referência para normalização dos dados e estavam armazenados em freezer -20°C sob posse da Profa. Dra. Ana Domingos no IHMT, porém os primers GST, CASP1 e CASP3 foram desenhados no software Primer3 Plus com auxílio de sequências adquiridas no <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> e solicitados para uso nesse estudo.

GST - *Ixodes scapularis*

ACTGGAACATCAGGGCCTTG GCCCAGTTCTGCCGAAACGTGCTCGTGTACA
AGGGCGTGCACTTCGAGGACAAGCAGTACAAGTTCGGGCGGCCCCAGACTTTG
ACCGCTCGGACTGGCTCAAGGAGAAGTTCACGCTGGGCCTGGAGTTTCCCAACCT
GCCGTA CTT CAT

Primer F: ACTGGAACATCAGGGCCTTG

Primer R: ATGAAGTACGGCAGGTTGGG

Product Size: 172bp

T.m.: 60.0 C

Caspase 1- *Ixodes scapularis*

CTTTACCTTGTGGGGAGCGT ATAGTCTGGATTCCTTTTTTGAAAAAGCGAC
GAGCACA A CTTAGCCTCGAAGACAGCCTCCGAGGAATGACTTGAGCAATTCAGG
CTTAGTACTGTTTTGCTTAGACCGTTATTCTGGCAGCCTCCCTAGTTATGCTAGTA
TTACACCAACCGGCACTCTTTTG

Primer F: CTTTACCTTGTGGGGAGCGT

Primer R: CAAAAGAGTGCCGGTTGGTG

Product Size: 184bp

T.m.: 60.0 C

Caspase 3- *Ixodes scapularis*

CTTGTGACACACTCGTCGGA AAACCAAAACTCTTTTTCATCGACGCTTTTG
GTGGCGAACCAATCGGCCACACGGTGGATGGTATCAAAGAAGGGGAGGGTGAGT
GCTCAAGAATTCCAGAGCTTGCAGACTTCTTCTTCGCGT

Primer F: CTTGTGACACACTCGTCGGA

Primer R: ACGCGAAGAAGAAGTCTGCA

Product Size: 144bp

T.m.: 60.0 C

Os primers foram testados em RT-PCR e o produto de PCR foi extraído e corrido em gel de agarose (**Figura 2**), além disso, os produtos de PCR também foram sequenciados, e a sequência foi comparada na plataforma BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para confirmação da autenticidade, antes de serem utilizados nos ensaios desse estudo (Figuras 4, 5 e 6).

Figura 2. Gel de agarose com as bandas dos produtos de PCR dos primers CASP1, CASP3 e GST.

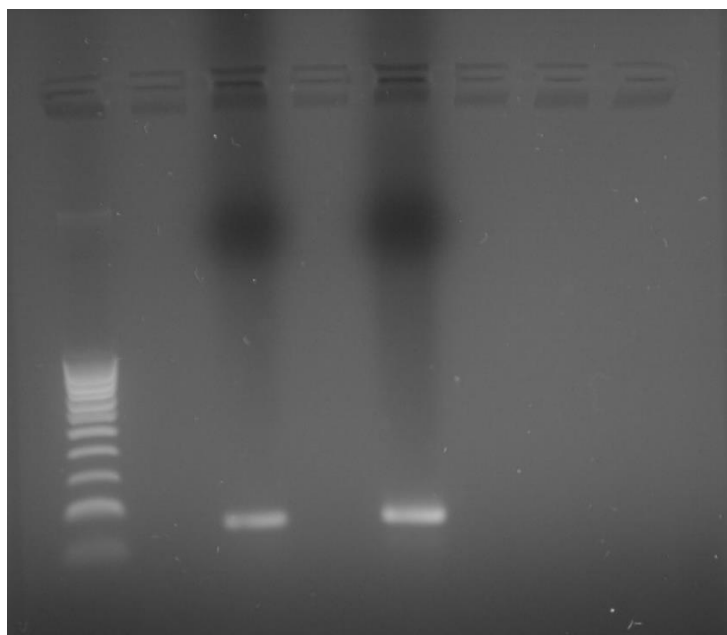


Tabela 3. Lista de primers usados nesse estudo: GST (Glutathione S-transferase), CASP1 (Caspase 1) e CASP3 (Caspase 3).

Espécie	Gene	Primers (F; R; 5'-3')	Produto Amplificado (Pb)	Descrição	Gene ID (NCBI)
<i>Ixodes scapularis</i>	GST	F: ACTGGAACATCAGGGCCTTG R: ATGAAGTACGGCAGGTTGGG	172pb	Isoenzima associada a estresse oxidativo	LOC8032802
<i>Ixodes scapularis</i>	CASP1	F: CTTTACCTTGTGGGGAGCGT R: CAAAAGAGTGCCGGTTGGTG	184pb	Enzima associada a inflamação e piroptose	LOC8040312
<i>Ixodes scapularis</i>	CASP3	F: CTTGTGACACACTCGTCGGA R: ACGCGAAGAAGAAGTCTGCA	144pb	Enzima associada a cascata de apoptose	LOC115330648

Análise molecular da exposição ao ozônio (qPCR)

Os resultados da análise molecular de RT-qPCR foram apresentados na **Tabela 4** e **Gráfico 3** e demonstraram que, como esperado, os genes de referência utilizados para normalização dos dados (R13A e 16S) não sofreram alterações significativas em sua regulação quando comparados os grupos Controle Negativo (células expostas somente ao meio decultivo), Controle Positivo (expostas ao DMSO) e as células expostas ao óleo ozonizado nas concentrações de 50 e 100 $\mu\text{L/mL}$. Porém, o 16S apresentou baixa amplificação em todos os grupos.

A análise do RT-PCR da Caspase 1, enzima relacionada a inflamação e piroptose, mostrou que a regulação gênica dessa enzima nas células expostas somente ao meio de cultivo (Grupo Controle Negativo), não apresentou mudanças na sua expressão, bem como não houve alteração significativa na regulação gênica das células expostas ao óleo ozonizado nas concentrações de 50 e 100 $\mu\text{L/mL}$. Somente as células expostas ao DMSO apresentaram regulação gênica significativamente aumentada do gene da Caspase 1 (4,95333) (**Tabela 4**).

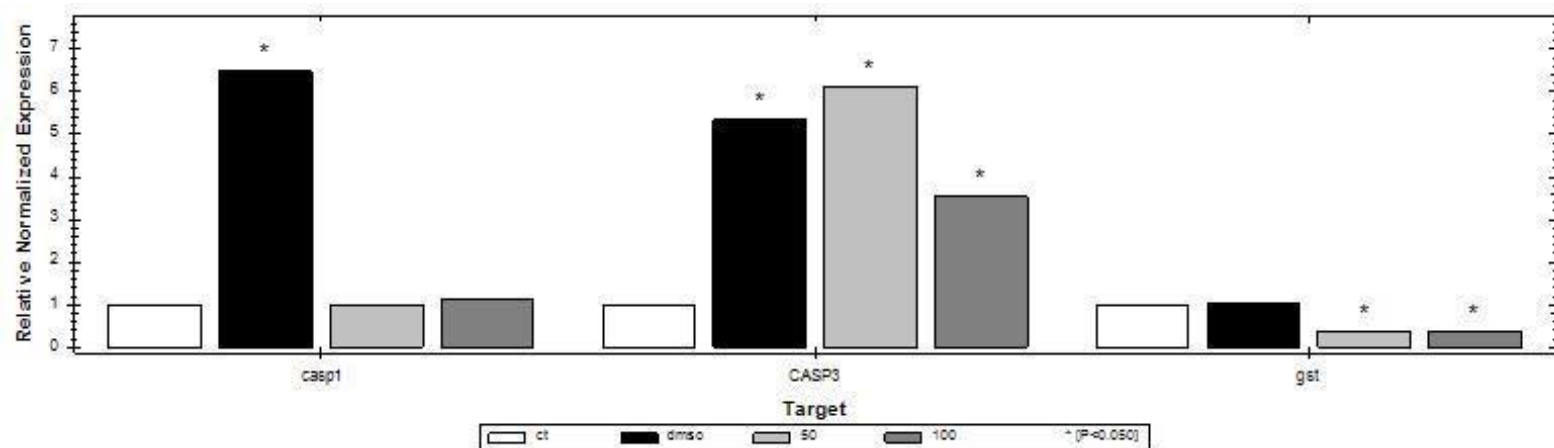
Já a análise do RT-PCR da Caspase 3, enzima fundamental na ativação da cascata de apoptose, demonstrou alterações em sua regulação gênica nos demais grupos comparados ao Controle Negativo (células expostas somente ao meio de cultivo), que por sua vez, não apresentou mudança na sua regulação. Tanto as células expostas ao DMSO, quanto aquelas expostas ao óleo ozonizado nas concentrações de 50 e 100 $\mu\text{L/mL}$ mostraram aumento na regulação gênica da Caspase 3 (5.33476; 6.12415; 3.54145; respectivamente) (**Tabela 4**).

A enzima GST não apresentou alterações significativas em sua regulação gênica quando analisado o RT-PCR das células expostas ao meio de cultivo (Grupo Controle Negativo). No entanto, as células expostas ao DMSO apresentaram aumento na regulação da GST (1,54772) comparado ao controle. Enquanto as células expostas ao óleo ozonizado nas concentrações 50 e 100 $\mu\text{L/mL}$ mostraram diminuição significativa da regulação gênica da GST (-1,54786 e -1,44049, respectivamente) (**Tabela 4**).

Tabela 4: Dados de expressão genica dos genes CASP1, CASP3, GST, R13A e 16S.

Target	Sample	Mean cq	Mean efficiency corrected cq	Normalized expression	Relative normalized expression	Regulation	Compared to regulation threshold	P-value	Exceeds p-value threshold
CASP1	Controle	32,72	36,66	0,00024	1,00000	1,00000	No change	N/A	No
CASP1	DMSO	31,58	35,39	0,00119	4,95333	4,95333	Up regulated	0,000703	No
CASP1	50 µL	34,62	38,79	0,00014	0,58402	-1,71226	No change	0,126879	Yes
CASP1	100 µL	34,16	38,28	0,00024	1,00090	1,00090	No change	0,722441	Yes
CASP3	Controle	36,19	36,19	0,00033	1,00000	1,00000	No change	N/A	No
CASP3	DMSO	34,68	34,68	0,00175	5,33476	5,33476	Up regulated	0,005119	No
CASP3	50 µL	34,90	34,90	0,00201	6,12415	6,12415	Up regulated	0,005433	No
CASP3	100 µL	35,89	35,89	0,00116	3,54145	3,54145	Up regulated	0,001044	No
GST	Controle	32,18	31,74	0,00728	1,00000	1,00000	No change	N/A	No
GST	DMSO	32,59	32,14	0,01127	1,54772	1,54772	Up regulated	0,018107	No
GST	50 µL	34,19	33,72	0,00471	0,64605	-1,54786	Down regulated	0,031321	No
GST	100 µL	34,35	33,88	0,00506	0,69421	-1,44049	Down regulated	0,099012	Yes
R13	Controle	24,52	24,64	N/A	N/A	N/A	No change	N/A	No
R13	DMSO	25,55	25,67	N/A	N/A	N/A	No change	0,025104	No
R13	50 µL	25,87	25,99	N/A	N/A	N/A	No change	0,094021	Yes
R13	100 µL	26,13	26,26	N/A	N/A	N/A	No change	0,083048	Yes
16S	Controle	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	No change	N/A	No
16S	DMSO	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	No change	N/A	No
16S	50 µL	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	No change	N/A	No
16S	100 µL	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	No change	N/A	No

Gráfico 3: Expressão gênica dos genes de Caspase 1 e 3 e GST comparados aos genes regulatórios R13A e 16S.



DISCUSSÃO

A relevância econômica e sanitária dos carrapatos da família Ixodidae, visto seu papel como vetores de patógenos causadores de diversas doenças em animais domésticos e humanos, vem tornando indispensável a busca por metodologias de controle desses ectoparasitas que sejam eficazes e seguras (DANTAS-TORRES; OTRANTO, 2015). Estudos relacionados a essa temática com foco na ação de substâncias acaricidas nos níveis tecidual e celular vem sendo amplamente desenvolvidos através de bioensaios com os próprios carrapatos (ABREU et al., 2020a, 2020b; CAMARGO-MATHIAS et al., 2016, 2017, 2018; KONIG et al., 2019; LIMA DE SOUZA et al., 2017, 2020; MATOS et al., 2018, 2019, 2020; NODARI et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2016a, 2016b, 2018, 2019; OLIVEIRA et al. 2020; PEREIRA et al., 2017; REMEDIO et al., 2016; SABADIN et al., 2017). No entanto, trabalhos que abordem os efeitos destas substâncias sobre a cultura de células de carrapatos ainda são escassos apesar da versatilidade de possibilidades metodológicas acessíveis e a capacidade de esclarecimentos minuciosos que essa ferramenta de pesquisa pode oferecer (MUNDERLOH, 2000; KALIL et al., 2017).

O projeto de doutorado financiado pela FAPESP (processo nº 2018/02999-9) o qual originou a solicitação da BEPE em questão, já obteve resultados demonstrando em laboratório o potencial acaricida da água ozonizada contra carrapatos da espécie *R. sanguineus* l.s., uma vez que ele provocou nos ectoparasitas: alterações morfofisiológicas nos tecidos das glândulas salivares e do integumento de fêmeas semi-ingurgitadas expostas a diferentes concentrações de água ozonizada (ABREU et al., 2020 a,b); b) alteração nos parâmetros reprodutivos de fêmeas desta mesma espécie (dados apresentados no 2º e no 3º Relatórios já encaminhados aFAPESP); c) gerou informações preliminares sobre os seus efeitos sobre os processos de mortecelular e de alteração mitocondrial das linhagens de células embrionárias (RML-RSE), resultado obtido via aplicação da técnica de citometria de fluxo (2º Relatório FAPESP); d) e interferiu na dinâmica da vitelogênese de fêmeas dessa mesma espécie de carrapatos, alterandomorfologicamente o ovário. Por fim ainda, alterou a dinâmica da produção e secreção das glândulas tubulares do órgão Gené (3º Relatório FAPESP), resultados estes que foram bastante animadores e alcançaram o objetivo proposto no presente trabalho, qual seja o de elucidar a ação do ozônio (óleo ozonizado) sobre células embrionárias de carrapatos, investigando seus efeitos sobre a viabilidade celular e morfofisiologia dessas células, bem como na regulação de genes relacionados à morte celular e ao estresse oxidativo (Caspases 1 e 3 e GST).

Assim sendo, o primeiro objetivo desse projeto BEPE foi estabelecer um protocolo padrão de testagem de compostos acaricidas utilizando como modelo as células de linhagens embrionárias de carrapatos, o que foi feito utilizando células da espécie de carrapatos *Ixodes scapularis* (ISE6), mais aptas ao processo de plaqueamento celular, e o óleo de girassol ozonizado como potencial acaricida natural, apresentado em formato de protocolo na seção anterior. Ressalte-se que linhagens de células de carrapatos já vêm sendo amplamente utilizadas em estudos que visam o controle desses ectoparasitas, principalmente no que diz respeito à resistência a acaricidas sintéticos como por exemplo o amitraz, fipronil, ivermectina e permetrina, buscando ainda os genes associados a essa resistência, bem como tentando elucidar os mecanismos que poderiam auxiliar com novas informações a temática que trata sobre a produção de vacinas (AL-ROFAAI AND BELL-SAKYI, 2020).

A revisão da literatura para esse assunto, no entanto, não trouxe muitas informações, visto o número de estudos ser bastante reduzido sob essa óptica, bem como enfatizando-se que o estabelecimento de um protocolo padrão para testagem de acaricidas sobre células de linhagem embrionária de carrapatos foi inédito e fruto dessa parceria entre laboratório brasileiro e português, o que foi possível apenas pelo suporte financeiro conferido pela FAPESP. O estabelecimento desse protocolo, certamente contribuirá para que trabalhos desenvolvidos nessa área de pesquisa sejam mais acessíveis para um público nem sempre tão especializado, como por exemplo alunos de IC e de MS que iniciam esses estudos na sua carreira acadêmica. Ademais, esse protocolo vem colaborar com a diminuição do uso de animais nas pesquisas iniciais de teste de produtos acaricidas, visto que os carrapatos por serem ectoparasitas hematófagos necessitam dos animais vertebrados para se alimentar e completar o seu ciclo biológico (ANDERSON; MAGNARELLI, 2008).

O segundo objetivo desse projeto foi o de avaliar os efeitos do ozônio (óleo ozonizado) *in vitro*, investigando sua ação sobre a viabilidade das células de carrapato, com estudo voltado para morfologia e para regulação da expressão de genes relacionados ao estresse e morte celular (GST e Caspases 1 e 3) após a exposição a esse composto.

Os resultados obtidos mostraram que tanto DMSO quanto o óleo ozonizado na concentração de 100µL/mL foram capazes de causar morte significativa das células expostas a eles quando comparou-se com o Controle Negativo (células expostas somente ao meio de cultivo L15B300). O DMSO é conhecidamente um composto tóxico para as células em cultura e foi utilizado no presente estudo como controle positivo para a morte celular (AWAN et al., 2020). Já o óleo ozonizado na maior concentração (100µL/mL) agiu como citotóxico para as

células a ele expostas, provavelmente devido as propriedades oxidantes do ozônio, que por ser uma molécula instável, quando em contato com qualquer doador de elétron dentro da célula gera estresse oxidativo, resultando em aumento das moléculas reativas de oxigênio (EROs) (GROOTVELT et al., 2004a). Como sabido, as EROs, quando em excesso, podem causar danos severos aos componentes celulares como membranas, proteínas, e até mesmo ao material genético, alterando o metabolismo das células e até induzindo-as a morte (KÜÇÜKGÜL et al., 2019).

Os dados de viabilidade celular que foram aqui obtidos corroboraram os achados da análise da morfologia das células expostas ao mesmo composto, uma vez que as maiores alterações morfológicas nas células deveu-se a exposição a maior concentração do óleo ozonizado (100µL/mL), incluindo: a) maior presença de células com forma fusiforme; b) citoplasma com vacúolos citoplasmáticos; e c) núcleos intensamente corados, com formatos irregulares, vacuolizados ou rompidos; características essas típicas de morte celular programada (apoptose), muito semelhantes inclusive as observadas nas células expostas ao DMSO (Grupo Controle Negativo). Alterações celulares semelhantes também foram observadas na exposição a menor concentração do óleo ozonizado (50µL/mL) porém em menor intensidade. Segundo Baysan et al. (2000), o ozônio causaria danos às membranas celulares e aos componentes citoplasmáticos, resultado da oxidação dos ácidos graxos e dos peptídeos que compõem a membrana plasmática celular, o que justificaria o aumento de alterações celulares no núcleo e no citoplasma dessas células a ele expostas. A presença de vacúolos no citoplasma de células de organismos expostos a agentes estressores, é um indicativo de que o mecanismo de defesa celular foi ativado, e as células passaram a isolar organelas inativadas e/ou porções danificadas do citoplasma, em vacúolos, os quais seriam posteriormente digeridos, estratégia essa que permitiria que as células preservassem o seu sistema interno (Alberts, 2010). Essas características de morte celular também foram relatadas por Abreu et al. (2020a,b), onde os autores registraram através de análise morfológica dos tecidos de glândula salivar e integumento de carrapatos *R. sanguineus* l.s., indícios de danos celulares causados pela exposição ao ozônio (água ozonizada) em diferentes concentrações, resultando em alteração do forma celular (provavelmente devido as danos da membrana plasmática), vacuolização citoplasmática, e alterações nucleares como fragmentação nuclear e núcleos picnóticos, dados esses corroborados pelos dados obtidos nesse ensaio com linhagens celulares da mesma espécie.

A análise de regulação gênica também corroborou esses dados, uma vez que observou-se aumento da regulação da Caspase 3 nas células expostas ao óleo ozonizado nas concentrações

de 50 e 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$. As caspases são proteínas pertencentes ao grupo de cisteínas-proteases que possuem papel fundamental na morte celular programada em resposta a sinais pró-apoptóticos (MCCOMB et al., 2019). Enquanto algumas caspases agem iniciando a cascata de eventos intracelulares, outras chamadas “caspases efetoras” agem posteriormente na clivagem de proteínas estruturais durante a formação dos corpos apoptóticos, como no caso das caspases efetoras 3, e por esse motivo, podem ser consideradas uma marca registrada da apoptose (MCCOMB et al., 2019). Dessa forma, confirmaram-se os resultados prévios que mostraram que o óleo ozonizado, principalmente na concentração de 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$, causaria a morte por apoptose nas células de linhagem de carrapatos (ISE6) a ele expostos.

Ressalta-se, no entanto, que o ensaio de análise de regulação gênica (com os genes GST, Caspase 1 e 3) precisaria ser repetido, uma vez que para uma análise adequada se faz necessário o uso de pelo menos dois genes de referência, como os utilizados nesse estudo (R13A e 16S). No entanto, devido a não amplificação esperada pelo gene 16S, os resultados da análise de regulação gênica dos outros genes aqui propostos, confirmando-se a necessidade de repetição do bioensaio.

E finalmente, o terceiro objetivo desse trabalho foi verificar os efeitos diretos e indiretos do ozônio (óleo ozonizado) sobre os patógenos transmitidos por carrapatos Ixodidae, por meio da análise morfológica e de qPCR antes e depois da exposição. Para tanto, foram realizados protocolos de infecção por *Ehrlichia canis* Spain 105 strain em 4 linhagens celulares: duas de carrapato (ISE6 e IDE8) e de mamíferos (J774 e DH82) que serviriam de reservatório para infecção posterior em linhagens de carrapatos. Porém, como demonstrado pelos resultados, não houve sucesso na infecção de nenhuma das linhagens celulares, vide gráfico de amplificação de genes de *E. canis* durante a RT-qPCR, mesmo quando repetido o protocolo de infecção. Isso pode ter ocorrido devido ao fato das células infectadas com *E. canis* Spain 105 strain terem sido descongeladas e desde então não apresentaram bom desempenho, como por exemplo, boa aderência, crescimento e divisão celular esperados, o que pode ter comprometido o uso dessas células no protocolo de infecção. No entanto, não havia tempo hábil para descongelamento de outras linhagens infectadas nem de realização de novos protocolos de infecção, por se tratar de um período de estágio de apenas 3 meses e esses serem procedimentos demasiadamente longos e demorados. Porém, mesmo com a obtenção desse resultado, todos os procedimentos técnicos foram realizados seguindo o cronograma e a realização tanto do protocolo de infecção, quanto da avaliação da infecção por meio de qPCR, foram de grande importância na aquisição de conhecimento e experiência.

Assim, de acordo com os dados aqui discutidos pode-se concluir que a realização do estágio BEPE foi de grande aprendizado e vivência de novas metodologias e técnicas moleculares, assim como de conhecimentos de cultivo celular, e ainda auxiliou na aquisição de mais respostas as questões já levantadas durante o projeto de doutorado acerca do ozônio como possível estratégia de controle de carrapatos, complementando os resultados já obtidos, esclarecendo seu efeito sobre a viabilidade celular, morfologia e regulação genica de células (ISE6) a ele expostas.

REFERÊNCIAS

ABREU, M. R. et al. Salivary Glands of Female Ticks *Rhipicephalus sanguineus* Like a Potential Source of Molecules with Inhibitory Action: In vivo study with Walker 256 Tumor Cells. **Journal of Pharmaceutical Care & Health Systems**, v. 01, n. 04, p. 1–8, 2014.

ABREU, M. R. et al. Exposure of Ticks *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari : Ixodidae) to Ozonated Water : Integument Response Exposure of Ticks *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari : Ixodidae) to Ozonated Water : Integument Response. **Ozone: Science & Engineering**, v. x, n. 00, p. 1–10, 2020a.

ABREU, M. R. et al. Morphophysiological analysis of the salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari : Ixodidae) exposed to ozonated water : A control strategy. **Medical and Veterinary Entomology**, p. 1–9, 2020b.

ABREU, M. R. et al. Immunomodulatory and morphophysiological effects of *Rhipicephalus sanguineus* s . l . (Acari : Ixodidae) salivary gland extracts. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 207, p. 36–45, 2019.

AKTAS, M.; OZUBEK, S. Molecular evidence for trans-stadial transmission of *Anaplasma platys* by *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato under field conditions. **Medical and Veterinary Entomology**, p. 78–83, 2018.

ALBERTS, B., 2010. Bruce Alberts - **Biologia Molecular da Célula**, 5ª Edição (Artmed).pdf.

ALZOHAIKY, M. A. Therapeutics Role of *Azadirachta indica* (Neem) and Their Active Constituents in Diseases Prevention and Treatment. v. 2016, 2016.

ANDERSON, J. F.; MAGNARELLI, L. A. Biology of Ticks. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 22, n. 2, p. 195–215, 2008.

ARAUJO, A. M. et al. Determination of the LC50 of selamectin (active principle of the antiparasitic Revolution®, Pfizer) applied on engorged female of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). **International Journal of Acarology**, v. 38, n. 4, p. 277-281, 2012.

ARAÚJO, L. X. et al. Synergism of thymol, carvacrol and eugenol in larvae of the cattle tick, *Rhipicephalus microplus*, and brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 30, n. 4, p. 377–382, 2016.

ARNOSTI, A. et al. Effects of *Ricinus communis* oil esters on salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille , 1806) (Acari : Ixodidae). **Experimental Parasitology**, v. 127, p. 569–574, 2011a.

ARNOSTI, A. et al. Effects of ricinoleic acid esters from castor oil of *Ricinus communis* on the vitellogenesis of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille , 1806) (Acari : Ixodidae) ticks. **Experimental Parasitology**, v. 127, p. 575–580, 2011b.

BAGGOTT, D. et al. Efficacy of a novel combination of fipronil, amitraz and (S)-methoprene for treatment and control of tick species infesting dogs in Europe. **Veterinary Parasitology**, v. 179, n. 4, p. 330–334, 2011.

BARKER, S. C.; MURRELL, A. Systematics and evolution of ticks with a list of valid genus and species names. **Ticks: Biology, Disease and Control**, v. 129 Suppl, n. February, p. 1–39, 2008.

BATAKLIEV, T. et al. Ozone decomposition. **Interdisciplinary Toxicology**, v. 7, n. 2, 2014.

BECKER, S. et al. Resistance to deltamethrin , fipronil and ivermectin in the brown dog tick , *Rhipicephalus sanguineus sensu stricto* , Latreille (Acari : Ixodidae). **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 10, n. 5, p. 1046–1050, 2019.

BELL-SAKYI, L. et al. Tick cell lines: tools for tick and tick-borne disease research **Trends in Parasitology**, v. 23, n. 9, p. 450-457, 2007.

BELL-SAKYI, L.; PAXTON, E. A.; MUNDERLOH, U. G. Growth of *Cowdria ruminantium* , the Causative Agent of Heartwater , in a Tick Cell Line. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 3, p. 1238-1240, 2000.

BOCCI, V.; VIA, A. Ozone as Janus : this controversial gas can be either toxic or medically useful. **Mediators of inflammation**, v. 13,p. 3-12, 2004.

BOZZATTO, V. et al. Morphological alterations of epidermis of rabbits infested by *R. sanguineus* ticks and exposed to Selamectin (active principle of Pfizer Revolution ® acaricide): A confocal microscopy study. **Acta Histochemica**, v. 116, n. 3, p. 534–538, 2014.

BOZZATTO, V.; OLIVEIRA, P. R. DE; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Histopathology of the tegument of rabbits infested by *Rhipicephalus sanguineus* (ACARI : IXODIDAE) ticks and exposed to selamectin (active principle of acaricide Revolution ® , Pfizer). p. 2551–2560, 2013.

CALLIGARIS, I. B. et al. Action of the Insect Growth Regulator Fluazuron , The Active Ingredient of the Acaricide Acatak V , in *Rhipicephalus sanguineus* Nymphs (Latreille , 1806) (Acari : Ixodidae). **Microscopy Research and Technique**, v. 1185, n. June, p. 1177–1185, 2013.

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

CAMARGO-MATHIAS, M. I. **Guia básico de morfologia interna de carrapatos**

ixodídeos. São Paulo: Editora Unesp, 2013.

CAMARGO-MATHIAS, M. I. et al. Esters from castor oil : interfering with the salivary gland secretory cycle of *Rhipicephalus sanguineus* ticks (Acari : Ixodidae). v. 2, p. 66–72, 2016.

CAMARGO-MATHIAS, M. I. et al. Deltamethrin as inductor agent of precocious ovarian degeneration in *Rhipicephalus sanguineus* s.l. (Acari: Ixodidae) ticks. **Experimental and Applied Acarology**, v. 72, n. 2, p. 161–169, 2017.

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

CAMPABADAL, C. A.; MAIER, D. E.; MASON, L. J. Efficacy of fixed bed ozonation treatment to control insects in stored bulk grain. **Applied Engineering in Agriculture**, v. 29, n. 5, p. 693-704, 2013.

CARDOSO, L. D. et al. Caracterização de *Rickettsia* spp. circulante em foco silencioso de febre maculosa brasileira no Município de Caratinga, Minas Gerais, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 22, n. 3, p. 495–501, 2006.

COELHO, L. et al. Combination of thymol and eugenol for the control of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato: Evaluation of synergism on immature stages and formulation development. **Veterinary Parasitology**, v. 277, n. August 2019, p. 108989, 2020.

CUNHA, N. C. et al. First identification of natural infection of *Rickettsia rickettsii* in the *Rhipicephalus sanguineus* tick, in the State of Rio de Janeiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, p. 105–108, 2009.

DA SOARES, C. E. S. et al. Use of ozone gas as a green control alternative to beetles *Alphitobius diaperinus* (panzer) infestation in aviary bed utilized in the poultry industry. **Chemical Engineering Transactions**, v. 64, p. 589-594, 2018.

DAMASCENO, S. R. B. et al. Acetylcarvacrol, a derivative of carvacrol , reduces nociceptive and inflammatory response in mice. **Life Sciences**, v. 94, n. 1, p. 58–66, 2014.

DANTAS-TORRES, F. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille,1806) (Acari: Ixodidae): From taxonomy to control. **Veterinary Parasitology**, v. 152, n. 3-4, p. 173-185, 2008.

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

DANTAS-TORRES, F.; OTRANTO, D. Further thoughts on the taxonomy and vector role of *Rhipicephalus sanguineus* group ticks. **Veterinary Parasitology**, v. 208, n. 1–2, p. 9–13, 2015.

DANTAS-TORRES, F. et al. Biological compatibility between two temperate lineages of brown dog ticks, *Rhipicephalus sanguineus* (sensu lato). **Parasites and Vectors**, v. 11, n. 1, p. 1–10, 2018.

DENARDI, S. E. et al. *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. 462–470, 2010.

DENARDI, S. E. et al. 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.

DUBEY, S. et al. Phytochemistry, pharmacology and toxicology of *Spilanthes acmella*: A Review. **Advances in Pharmacological Sciences**, v. 2013, p. 423750, 2013.

EIDEN, A. L. et al. Determination of metabolic resistance mechanisms in pyrethroid-resistant and fipronil-tolerant brown dog ticks. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 31, p. 243–251, 2017.

EIDEN, A. L. et al. Detection of Permethrin Resistance and Fipronil Tolerance in *Rhipicephalus sanguineus* (Acari : Ixodidae) in the United States. **Journal of Medical Entomology**, v. 52, n. 3, p. 429–436, 2020.

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.

FIGUEIREDO, T. F. B. et al. Effect of Ozone on Engorged *Rhipicephalus microplus* (Acari : Ixodidae) Females During the Pre- Laying Period Effect of Ozone on Engorged *Rhipicephalus microplus* (Acari : Ixodidae) Females During the Pre-Laying Period. **Ozone: Science & Engineering**, v. 00, n. 00, p. 1–8, 2018.

GRAY, J. et al. Systematics and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 4, n. 3, p. 171-180, 2013.

GUGLIELMONE, A. A. et al. **The hard ticks of the world: (Acari: Ixodida: Ixodidae)**. New York: Springer, 2014.

GUZEL-SEYDIM, Z. B.; GREENE, A. K.; SEYDIM, A. C. Use of ozone in the food industry. **LWT - Food Science and Technology**, v. 37, n. 4, p. 453–460, 2004.

HEARPS, A. C. et al. Mitochondrial cytochrome c release precedes transmembrane depolarisation and caspase-3 activation during ceramide-induced apoptosis of Jurkat T cells. **Apoptosis**, v. 7, n. 5, p. 387–394, 2002.

HOUSEMAN, R. M. **Guide to Ticks and Tick-borne Diseases**. Missouri: University of Missouri, 2013.

IPEK, A. et al. Molecular Evidence for Transstadial Transmission of *Ehrlichia canis* by *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato Under Field Conditions. **Journal of medical entomology**, v. 55, n. 2, p. 440-444, 2018.

KALIL, S. P. et al. Immune-related redox metabolism of embryonic cells of the tick

Rhipicephalus microplus (BME26) in response to infection with *Anaplasma marginale*. p. 1–10, 2017.

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, n. August, p. 43, 2013.

KONIG, I. F. M. et al. Low concentrations of acetylcarvacrol induce drastic morphological damages in ovaries of surviving *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato ticks (Acari: Ixodidae). **Micron**, v. 129, n. November 2019, p. 102780, 2020.

KOTÁL, J. et al. Modulation of host immunity by tick saliva. **Journal of Proteomics**, v. 128, p. 58–68, 2015.

KRYSKO, D. V et al. Mitochondrial Transmembrane Potential Changes Support the Concept of Mitochondrial Heterogeneity During Apoptosis. v. 49, n. 10, p. 1277–1284, 2001.

KÜÇÜKGÜL, A. et al. Investigation of the anti-apoptotic activity of ozone therapy in rainbow trout macrophages infected with *Yersinia ruckeri*. p. 771–783, 2019.

LATROFA, M. S. et al. Molecular detection of tick-borne pathogens in *Rhipicephalus sanguineus* group ticks. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 5, n. 6, p. 943–946, 2014.

LIMA DE SOUZA, J. R. et al. The effects of neem oil (*Azadirachta indica* A. JUSS) enriched with different concentrations of azadirachtin on the integument of semi-engorged *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae) females. **Microscopy Research and Technique**, v. 80, n. 8, p. 838–844, 2017.

LIMA DE SOUZA, J. R. et al. Effects of carvacrol on oocyte development in semi-engorged *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato females ticks (Acari: Ixodidae). **Micron**, v. 116, n. June 2018, p. 66–72, 2019.

LOPES, M. S. et al. Disinfection of corrugated tubing by ozone andultrasound in

mechanically ventilated tracheostomized patients. **Journal of Hospital Infection**, v. 90, n. 4, p. 304–309, 2015.

LOPES, T. et al. Evaluation of synergism and development of a formulation with thymol, carvacrol and eugenol for *Rhipicephalus microplus* control. **Experimental Parasitology**, v. 207, n. May, p. 107774, 2019.

MAJEWSKI, J. Methods for measuring ozone concentration in ozone-treated water. **Przegląd Elektrotechniczny (Electrical Review)**, n. 9, p. 253–255, 2012.

MARSON, R. F. et al. Use of Ozonated Water for Disinfecting Gastrointestinal Endoscopes. **Ozone: Science and Engineering**, v. 38, n. 5, p. 346–351, 2016.

MATOS, R. DA S. et al. Histopathological study of ovaries of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) exposed to different thymol concentrations. **Parasitology Research**, v. 113, n. 12, p. 4555–4565, 2014a.

MATOS, R. S. et al. 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. 669–673, 2014b.

MATOS, R. S. et al. Thymol action on cells and tissues of the synganglia and salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato females (Acari: Ixodidae). **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 10, n. 2, p. 314–320, 2019.

MATOS, R. S. et al. Thymol: Effects on reproductive biology and Gene's organ morphology in *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato engorged females (Acari: Ixodidae). **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 11, n. 1, p. 101308, 2020.

MCCOMB, S. et al. Efficient apoptosis requires feedback amplification of upstream apoptotic signals by effector caspase-3 or -7. p. 1–12, 2019.

MEKONNEN, S. et al. Acaricide resistance profiles of single- and multi-host ticks from

communal and commercial farming areas in the Eastern Cape and North-West Provinces of South Africa. **The Onderstepoort journal of veterinary research**, v. 69, n. 2, p. 99–105, 2002.

MENÉNDEZ, S.; FALCÓN, L.; MAQUEIRA, Y. Therapeutic efficacy of topical OLEOZON ® in patients suffering from onychomycosis. **Mycoses**, v. 54, n. 5, p. 272–277, 2011.

MORAGLIO, S. T. et al. Effect of ozone gas against life stages of *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) in laboratory and a storehouse. **Journal of Stored Products Research**, 2018.

MOREIRA FONSECA, P. M. et al. Disinfection of Dental Instruments Contaminated with *Streptococcus mutans* Using Ozonated Water Alone or Combined with Ultrasound. **Ozone: Science and Engineering**, v. 37, n. 1, p. 85–89, 2015.

MOREIRA, L. H. et al. Effect of Ozone as Acaricide: Action of the Ozone on the Cuticle and Respiratory Spiracle of Tick *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato. **Ozone: Science & Engineering**, v. 00, n. 00, p. 1–8, 2017.

MUNDERLOH, Ulrike G.; KURTTI, Timothy J. Formulation of medium for tick cell culture. **Experimental & applied acarology**, v. 7, n. 3, p. 219-229, 1989.

MUNDERLOH, Ulrike G. et al. Invasion and intracellular development of the human granulocytic ehrlichiosis agent in tick cell culture. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 8, p. 2518-2524, 1999.

NAGAYOSHI, M. et al. Antimicrobial effect of ozonated water on bacteria invading dentinal tubules. **Journal of endodontia**, v. 30, n. 11, p. 778–781, 2004.

NAVA, S. et al. The taxonomic status of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806). **Veterinary Parasitology**, v. 208, n. 1–2, p. 2–8, 2015.

NAVA, S. et al. *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806): Neotype designation, morphological re-description of all parasitic stages and molecular characterization. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 9, n. 6, p. 1573–1585, 2018.

NODARI, E. F. et al. Cytotoxic effects of permethrin in salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) semi-engorged females. **Experimental Parasitology**, v. 128, n. 2, p. 151–158, 2011.

NODARI, E. F. et al. Action of permethrin on *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) semi-engorged females: Morpho-physiological evaluation of salivary glands. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 3, n. 4, p. 219–226, 2012a.

NODARI, E. F. et al. Degenerative process and cell death in salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) semi-engorged female exposed to the acaricide permethrin. **Microscopy Research and Technique**, v. 75, n. 8, p. 1012–1018, 2012b.

NODARI, E. F. et al. Morpho-ultrastructural alterations in the salivary glands of semi-engorged *Rhipicephalus sanguineus* s.l. females subjected to permethrin . **Emergent Life Sciences Research**, v. 3, p. 18–31, 2017.

OLIVEIRA, M. V. S. et al. Sublethal concentrations of acetylcarvacrol affect reproduction and integument morphology in the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari : Ixodidae). **Experimental and Applied Acarology**, n. 0123456789, 2020.

OLIVEIRA, P. R. et al. 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 LC50. **Experimental parasitology**, v. 127, n. 2, p. 418-422, 2011.

OLIVEIRA, P. R. et al. Potential of the insect growth regulator, fluazuron, in the control of *Rhipicephalus sanguineus* nymphs (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): Determination of the LD 95 and LD 50. **Experimental Parasitology**, v. 131, n. 1, p. 35–39, 2012a.

OLIVEIRA, P. R. DE et al. Fluazuron-induced morphophysiological changes in the cuticle formation and midgut of *Rhipicephalus sanguineus* Latreille , 1806 (Acari : Ixodidae) nymphs. p. 45–58, 2013.

OLIVEIRA, P. R. et al. Fluazuron-induced morphological changes in *Rhipicephalus sanguineus* Latreille, 1806 (Acari: Ixodidae) nymphs: An ultra-structural evaluation of the cuticle formation and digestive processes. **Acta Tropica**, v. 133, n. 1, p. 45–55, 2014.

OLIVEIRA, P. R. et al. 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. et al. 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, 2016b.

OLIVEIRA, P. R. et al. Dinotefuran-induced morphophysiological changes in semi-engorged females *Rhipicephalus sanguineus* Latreille, 1806 (Acari: Ixodidae) ticks: Ultra-structural evaluation. **Acta Tropica**, v. 166, p. 139–154, 2017a.

OLIVEIRA, P. R. et al. 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. et al. Cytotoxic effects of extract of *Acmella oleracea* in the ovaries and midgut of *Rhipicephalus sanguineus* Latreille, 1806 (Acari: Ixodidae) female ticks. **Journal of Microscopy and Ultrastructure**, v. 7, n. 1, p. 28, 2019.

OTRANTO, D.; WALL, R. New strategies for the control of arthropod vectors of disease in dogs and cats. **Med Vet Entomol**, v. 22, n. 4, p. 291–302, 2008.

PASSOS, T. M. et al. Comparative Analysis of Ozone and Ultrasound Effect on the

Elimination of *Giardia* spp. Cysts from Wastewater. **Ozone: Science and Engineering**, v. 36, n. 2, p. 138–143, 2014.

PEÑA SISTO, M. et al. Eficacia del Oleozon® en pacientes con periodontitis del adulto TT - Effectiveness of the Oleozon® in patients with adults periodontitis. **Medisan**, v. 19, n. 11, p. 1330–1337, 2015.

PEREIRA, C. P. M. et al. Fipronil-induced cell death in salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806)(Acari: Ixodidae) semi-engorged females. **Experimental parasitology**, v. 127, n. 2, p. 481-489, 2011.

PEREIRA, M. C. et al. Detrimental effect of deltamethrin on the central nervous system (synganglion) of *Rhipicephalus sanguineus* ticks. **Experimental and Applied Acarology**, v. 71, n. 2, p. 159–169, 2017.

POLITI, F. A. S. et al. Acaricidal activity of ethanolic extract from aerial parts of *Tagetes patula* L. (Asteraceae) against larvae and engorged adult females of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille , 1806). **Parasites & vectors**, p. 1–11, 2012.

POLITI, F. A. S. et al. Action of ethanolic extract from aerial parts of *Tagetes patula* L. (Asteraceae) on hatchability and embryogenesis of *Rhipicephalus sanguineus* eggs (Acari : Ixodidae). **Industrial Crops & Products**, v. 67, p. 55–61, 2015.

RAMSEWAK, R. Bioactive N-isobutylamides from the flower buds of *Spilanthes acmella*. **Phytochemistry**, v. 51, n. 6, p. 729–732, jul. 1999.

REMEDIÓ, R. N. et al. Morphology of the midgut of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) adult ticks in different feeding stages. **Parasitology Research**, v. 112, n. 1, p. 415–425, 2013.

REMEDIÓ, R. N. et al. Morphological alterations in the synganglion and integument of *Rhipicephalus sanguineus* ticks exposed to aqueous extracts of neem leaves (*Azadirachta indica* A. JUSS). **Microscopy Research and Technique**, v. 77, n. 12, p. 989–998, 2014.

REMEDIO, R. N. et al. 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. 431–444, 2015.

REMEDIO, R. N. et al. Morphological alterations in salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus* ticks (Acari: Ixodidae) exposed to neem seed oil with known azadirachtin concentration. **Micron**, v. 83, p. 19–31, 2016.

REMONDINO, M.; VALDENASSI, L. Different uses of ozone: Environmental and corporate sustainability. Literature review and case study. **Sustainability (Switzerland)**, 2018.

ROMA, G. C. et al. 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. 269–272, 2009.

ROMA, G. C. et al. Permethrin-induced morphological changes in oocytes of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) semi-engorged females. **Food and chemical toxicology**, v. 48, n. 3, p. 825–30, 2010.

ROMA, G. C. et al. Cytotoxic effects of permethrin in oocytes of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) fully engorged females: I. Direct or indirect action of the acaricide in germ cells? **Experimental and Applied Acarology**, v. 53, n. 3, p. 287–299, 2011.

ROMA, G. C. et al. Neurotoxic action of permethrin in *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) female ticks. Morphological and cytochemical evaluation of the central nervous system. **Veterinary Parasitology**, v. 196, n. 3–4, p. 482–491, 2013a.

ROMA, G. C. et al. Morphological and cytochemical changes in synganglion of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) female ticks from exposure of andiroba oil (*Carapa guianensis*). **Microscopy Research and Technique**, v. 76, n. 7, p. 687–696, 2013b.

ROMA, G. C. et al. Action of andiroba oil and permethrin on the central nervous and reproductive systems of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806)(Acari: Ixodidae) ticks females. A confocal study. **Research in veterinary science**, v. 95, n. 2, p. 529-536, 2013c.

ROMA, G. C. et al. Changes in the synganglion of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) female ticks exposed to permethrin: An ultrastructural overview. **Acta Tropica**, v. 136, n. 1, p. 19–26, 2014.

ROMA, G. C. et al. Effects of andiroba (*Carapa guianensis*) oil in ticks: Ultrastructural analysis of the synganglion of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). **Acta Tropica**, n. Part A, p. 7–15, 2015.

ROZADO, A. F. et al. Aplicação de ozônio contra *Sitophilus zeamais* e *Tribolium castaneum* em milho armazenado. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 12, n. 3, p. 282–285, 2008.

SAMPIERI, B. R. et al. Ultrastructural changes in the ovary cells of engorged *Rhipicephalus sanguineus* female ticks treated with esters of ricinoleic acid from castor oil (*Ricinus communis*). v. 690, n. December 2011, p. 683–690, 2012.

SAMPIERI, B. R. et al. 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**, v. 191, n. 3–4, p. 315–322, 2013.

SANCHES, G. S. et al. Molecular, biological, and morphometric comparisons between different geographical populations of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 215, p. 78–87, 2016.

SECHI, L. A. et al. Antibacterial activity of ozonized sunflower oil (Oleozone). **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, n. 2, p. 279–284, 2001.

SOARES, J. F. et al. Experimental infection of the tick *Amblyomma cajennense*,

Cayenne tick, with *Rickettsia rickettsii*, the agent of Rocky Mountain spotted fever. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 26, n. 2, p. 139–151, 2012.

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

SOUSA, C. S. et al. Ozônio na esterilização de produtos para assistência à saúde: revisão integrativa da literatura. **Revista da Escola de Enfermagem da U S P**, 2011.

SUBRAMANYAM, B. et al. Efficacy of ozone against *Rhyzopertha dominica* adults in wheat. **Journal of Stored Products Research**, v. 70, p. 53-59, 2017.

SZABO, M. P. J. et al. Ecology, biology and distribution of spotted-fever tick vectors in Brazil. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 3, n. July, p. 27, 2013.

VENDRAMINI, M. C. R. et al. Action of andiroba oil (*Carapa guianensis*) on *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) semi-engorged females: Morphophysiological evaluation of reproductive system. **Microscopy Research and Technique**, v. 75, n. 12, p. 1745–1754, 2012a.

VENDRAMINI, M. C. R. et al. 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, 2012b.

VERISSIMO, C. J. Biological control of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in Brazil. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v. 11, n. 1, p. 14–23, 2015.

5. DISCUSSÃO GERAL

A importância médico e veterinária da espécie *R. sanguineus* l.s. (*R. linnaei*) é indiscutível, uma vez que esses carrapatos são vetores de diversos patógenos responsáveis pelo desenvolvimento de doenças em animais, como os cães (seu principal hospedeiro), mas também em humanos (DANTAS-TORRES; OTRANTO, 2015; IPEK et al., 2020). Dessa forma, o estudo desse ectoparasita pode auxiliar no melhor entendimento das relações patógeno-vetor-hospedeiro e no controle de inúmeras doenças infecciosas, além de minimizar os danos veterinários e prejuízos econômicos por eles causados (NICHOLSON et al., 2019).

De maneira geral, o mercado veterinário tem sido dominado por produtos acaricidas que têm como base princípios ativos sintéticos (OLIVEIRA et al., 2017; MEKONNEN et al., 2002; PETER; BROSSARD, 1998). Contudo, estudos que busquem alternativas de controle mais limpas e sustentáveis e que não provoquem tantos danos aos organismos não alvos e nem ao meio ambiente são urgentes (OLIVEIRA et al., 2018; DENARDI et al., 2012; REMEDIO et al., 2014). Na busca por novas estratégias de controle, o ozônio diluído em água (água ozonizada) e em óleo (óleo ozonizado) tem ganhado foco em diversas pesquisas (DA SOARES et al., 2018; MORAGLIO et al., 2018; REMONDINO; VALDENASSI, 2018; ROZADO et al., 2008; SUBRAMANYAM et al., 2017) e vem sendo apontado como um potencial acaricida (DE OLIVEIRA et al., 2014; FERNANDO et al., 2018; MOREIRA et al., 2017). Além disso, o ozônio se torna atrativo, visto que trata-se de uma molécula inócua e libera como resíduo apenas o oxigênio (BATAKLIEV et al., 2014; MOREIRA et al., 2017).

Nesse contexto, o presente trabalho propôs avaliar a ação do ozônio (sob a forma de água ozonizada e de óleo ozonizado) sobre fêmeas adultas de carrapatos *R. sanguineus* l. s. “linhagem tropical” (*R. linnaei*) *in vivo* por meio da análise morfológica de integumento, glândula salivar, ovário e órgão de Gené, avaliando também a ocorrência de possíveis alterações nos parâmetros biológicos das mesmas após a exposição. Simultaneamente avaliou-se o efeito da exposição de células de linhagem embrionária de carrapatos (da mesma espécie) em cultura (*in vitro*) expostas não só a água, mas também ao óleo ozonizado, morfológica e molecularmente.

Os resultados aqui obtidos demonstraram que a água ozonizada causou alterações tanto nos parâmetros biológicos reprodutivos quanto na morfologia celular/tecidual de todos os órgãos avaliados: integumento, glândulas salivares, ovário e órgão de Gené.

O integumento de fêmeas de carrapatos *R. sanguineus* l.s. (*R. linnaei*) semi-ingurgitadas expostas a água ozonizada nas concentrações (0,75; 1,5; 2,25 e 3mg/L) sofreu alterações que incluíram o seu espessamento acompanhado de variação na intensidade de marcação desse órgão quando aplicado o corante hematoxilina. A camada subcuticular do integumento foi a mais fortemente positiva na concentração 2,25mg/L e no tempo de 48 horas e teve a marcação mais fraca na concentração de 3mg/L e no tempo de 24 horas, sugerindo que essas alterações seriam de fato o resultado da ação da água ozonizada. Além disso, a água ozonizada teve potencial de ultrapassar a barreira cuticular (extremamente espessa e que tem como função evitar perda e entrada de elementos do interior para o exterior do animal e vice-versa) e chegou até a camada epitelial, visto a metaplasia observada, onde o epitélio antes simples e cubico passou a ser cilíndrico, pavimentoso e chegando até mesmo à forma estratificada após as exposições às diferentes concentrações de água ozonizada. As maiores alterações foram observadas na exposição as concentrações de 0,75ppm nos tempos de 24 e 48 horas e de 2,25ppm no tempo de 48 horas, enfatizando que células e núcleos do tecido epitelial sofreram um considerável achatamento, além do que os núcleos se tornaram picnóticos e os limites celulares ficaram pouco distintos.

Segundo Junqueira e Carneiro (2017) quando ocorre mudança na morfologia do epitélio devido a ação de agentes externos concomitantemente há uma alteração na fisiologia do mesmo, que neste caso, teria suas células que originalmente atuariam na síntese e secreção doselementos da cutícula e passariam a ter uma função mais parecida com a de revestimento (no caso da alteração para epitélio pavimentoso). Além dessas alterações, foi verificada a instalação de processos de morte celular, por meio da observação de alterações nos núcleos celulares, tais como picnose, o que diminuiria ou mesmo inibiria a síntese e a secreção dos componentes cuticulares deixando consequentemente o indivíduo com uma cutícula menos espessa, mais fragilizada e, portanto, mais vulnerável as alterações do ambiente externo, o que inclusive traria prejuízos para os principais processos biológicos do ectoparasita, além de deixa-lo mais suscetível as intempéries. Portanto, as alterações morfológicas e consequentemente as fisiológicas no epitélio cuticular, teria provocado alterações na dinâmica do ciclo secretor e da deposição dos elementos cuticulares do integumento.

Dados registrados por Remédio et al. (2014) que também observaram a ocorrência de alterações na camada subcuticular do integumento de fêmeas de carrapatos *R. sanguineus* l.s. (*R. linnaei*) expostas ao óleo de neem (*Azadirachta indica* a. Juss), comprovaram a toxicidade desse acaricida natural. Assim como Oliveira et al. (2013) indicaram que o inibidor de

crescimento de artrópodes, fluazuron, presente em formulações acaricidas comerciais, inibiu a síntese e deposição de substâncias que comporiam a cutícula de ninfas de carrapatos *R. sanguineus* l.s. (*R. linnaei*). Segundo esses autores, haveria uma deposição anormal das camadas do integumento (subcutícula e cutícula) devido a ação do acaricida, o que provocaria alterações na dinâmica da secreção de polissacarídeos, interferindo diretamente na elasticidade e na impermeabilidade da cutícula e acarretando em prejuízos nos processos de ecdise, de alimentação e mesmo de reprodução desses indivíduos (OLIVEIRA et al., 2013).

A exposição a água ozonizada na concentração de 2,25ppm foi a que mais provocou danos, visto que: a) causou um espessamento da subcutícula, b) alterou a morfologia do epitélio cuticular que passou de simples cúbico para simples pavimentoso, c) intensificou o processo de vacuolização citoplasmática, d) alterou a morfologia nuclear (núcleos picnóticos) das células epiteliais (característica de morte) e e) desorganizou os limites entre as células epiteliais. O conjunto dessas alterações sugeriram que a água ozonizada nessa concentração foi tóxica e provocou a morte das células epiteliais, acarretando em prejuízos na dinâmica da sua fisiologia e consequentemente causando danos irreversíveis ao integumento.

Os efeitos da exposição das glândulas salivares de fêmeas semi-ingurgitadas de carrapatos *R. sanguineus* l.s. (*R. linnaei*) a água ozonizada na concentração de 2,25mg/mL e no tempo de 24 horas alteraram células e tecidos do órgão. As células dos ácinos do tipo I sofreram vacuolização do citoplasma, bem como o ácino como um todo teve seu lúmen dilatado, resultado que corroborou aquele obtido por Pereira et al. (2009) que também observaram um aumento do lúmen dos ácinos I em fêmeas de *R. sanguineus* l.s. (*R. linnaei*) expostas ao fipronil, acaricida sintético de comprovada eficácia. Ademais, quando a mesma espécie foi exposta a permetrina (piretróide sintético) essa alteração (além de outras) nos ácinos I também foi observada (NODARI et al., 2012a). Fisiologicamente as células dos ácinos I são as responsáveis por eliminar todo excesso de água, íons, e compostos tóxicos da hemolinfa durante a ingestão de sangue (GRAY et al., 2013; YODER et al., 2006). Assim, esses dados sinalizaram que a exposição a água ozonizada nessa concentração logo após 24 horas, provocaria um estresse osmótico nos ácinos I, e interferiria na eficiência do processo de manutenção do balanço hídrico do ectoparasita.

As alterações morfo/fisiológicas continuaram ocorrendo também nos ácinos granulares (II e III) das glândulas salivares nas fêmeas expostas a água ozonizada. As alterações mais significativas ocorreram no intervalo de concentrações que compreendeu entre 1,5 a 3mg/L e no tempo de 24 horas após a exposição, quando verificou-se perda da forma original

(arredondada) dos ácinos que passaram a irregulares, além da extensa vacuolização encontrada no citoplasma das células secretoras, alterações estas que foram dose dependente, ou seja, foram aumentando à medida que a concentração da água ozonizada foi maior. Enfatize-se ainda que na maior concentração (3mg/L) houve inclusive a perda dos limites celulares. Este conjunto de alterações, ou seja, a vacuolização citoplasmática somada a desorganização dos grânulos secretores no interior do citoplasma, sinalizou que a síntese e o armazenamento de secreção para compor a saliva final seriam processos que estariam comprometidos devido a ação da água ozonizada. Outros trabalhos que abordaram a morfofisiologia das glândulas salivares de carrapatos que foram expostos a outros compostos tóxicos, como os estudados por Nodari et al. (2011;2012a,b) também registraram a ocorrência de significativa vacuolização citoplasmática e desorganização dos grânulos secretores armazenados no citoplasma das células dos ácinos II, o que segundo os autores, seria uma forma de defesa da célula contra a ação do produto tóxico, por meio do isolamento de organelas ou de porções do citoplasma já danificadas pelo produto tóxico, podendo mantê-las com essa estratégia, ainda biologicamente viáveis (ALBERTS, 2017; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Além disso, foram observadas alterações nucleares nas células acinares secretoras, tais como: hipertrofia, picnose nuclear, marginalização cromatínica e fragmentação, características de processos de morte celular por apoptose, comumente observadas em células que foram expostas a agentes tóxicos, acarretando na degeneração precoce do tecido glandular. Uma vez que os ácinos II e III são formados por células que sintetizam os bioativos da saliva dos carrapatos, além das substâncias que comporão o cemento, responsável pela aderência do aparelho bucal do ectoparasita à pele do hospedeiro (SONENSHINE; ROE, 2014), qualquer tipo de alteração celular que interfira nesses processos, resultaria em prejuízos fisiológicos, ou seja, interfeririam na atividade secretora celular acarretando na liberação de uma saliva alterada e menos eficiente, com consequente prejuízo ao processo alimentar do ectoparasita.

Resultados semelhantes aos aqui descritos foram obtidos por Pereira et al. (2009) que estudaram a glândula salivar de fêmeas da mesma espécie de carrapatos expostas ao fipronil quando as autoras verificaram que este químico alteraria a forma acinar e mesmo o formato das células dos ácinos III. Os resultados aqui obtidos também corroboraram aqueles de Nodari et al. (2011, 2012b) quando estudaram esse mesmo órgão em fêmeas semi-ingurgitadas de *R. sanguineus* l.s. (*R. linnaei*) expostas a permetrina. Há ainda que se reportar que não só os químicos sintéticos teriam potencial para alterar a morfofisiologia das glândulas salivares dos carrapatos, mas também aqueles de origem natural como o óleo de neem que alterou a forma

dos ácinos II e III, provocou a fusão de grânulos secretores, além de ter desorganizado o citoplasma das células secretoras dos ácinos granulares (REMEDIIO et al., 2016). Portanto, ficou evidenciado no presente trabalho que a água ozonizada no intervalo de concentrações que variou de 1,5-3mg/L, provocaria severas alterações nas glândulas salivares, além de confirmar que o tempo ideal para exposição seria o de 24 horas, período esse quando os maiores danos ocorreriam nas glândulas salivares.

O estudo morfohistoquímico do ovário de fêmeas ingurgitadas de *R. sanguineus* l.s. (*R. linnaei*) expostas à 3mg/L de água ozonizada mostrou a ocorrência de alterações morfológicas nos ovócitos em todos os estágios de desenvolvimento (I-V), sendo que naqueles imaturos (I e II), as principais alterações foram a deformação destas células germinativas, bem como de seu núcleo (vesícula germinativa), dados que permitiram postular que o estresse oxidativo causado pela exposição a água ozonizada à 3mg/L atingiu estas células provavelmente devido a maior fragilidade das mesmas, uma vez que estas estariam mais suscetíveis a ação de agentes externos ao ovário principalmente devido à ausência (no caso do ovócito I) ou ao início da deposição (no ovócito II) do cório, membrana protetora, que atinge maior taxa de síntese a partir do estágio III e teria como função, além de outras, selecionar/barrar a entrada nas células de substâncias que pudessem ser prejudiciais ao futuro embrião e que eventualmente viessem a causar danos estruturais nas mesmas. Resultados semelhantes foram encontrados em outros estudos conduzidos por Oliveira et al. (2009, 2016), Roma et al. (2010), Vendramini et al. (2012), que analisaram ovócitos de *R. sanguineus* l.s. (*R. linnaei*) expostos a acaricidas sintéticos (fipronil, dinotefuran, permetrina) e natural (óleo de andiroba/*Carapa guianensis*), respectivamente.

Nas fêmeas expostas a água ozonizada, os ovócitos em estágios mais avançados de desenvolvimento (III, IV e V) passaram por modificações que incluíram: a) alteração no formato celular b) deformações no cório, c) alterações na forma e no conteúdo dos grânulos de vitelo, os quais passaram de arredondados para irregulares e ainda, observou-se que os mesmos estavam mergulhados em um citoplasma intensamente vacuolizado, principalmente na região cortical dos ovócitos, e principalmente naquela região próxima ao contato ovócito/pedicelo. Essas alterações indicaram que, apesar da síntese do cório já ter iniciado (estágios II/III) ou mesmo já ter sido encerrada (estágio V), ainda assim a água ozonizada provocou danos celulares.

A intensa vacuolização citoplasmática anteriormente discutida poderia representar uma estratégia da célula no sentido de otimizar o processo de “turnover” (reciclagem) de porções

danificadas do citoplasma (seja pela água ozonizada ou por outro fator), de isolar organelas que estivessem inviáveis ou mesmo isolar o composto tóxico ou seus restos metabólicos para que a célula tivesse ainda uma chance de sobreviver e de gerar um novo indivíduo (DENARDI et al., 2012).

Na literatura disponível existem registros demonstrando que outros agentes acaricidas de natureza não sintética também agiram sobre os ovócitos de fêmeas de *R. sanguineus* l.s. (*R. linnaei*) nesses mesmos estágios de desenvolvimento, e que provocaram nestas células intensa vacuolização citoplasmática. Dentre esses autores podem ser citados Matos et al. (2014) que expuseram fêmeas da mesma espécie ao timol; Lima de Souza et al. (2019) que expuseram fêmeas de *R. sanguineus* ao carvacrol; e Oliveira et al. (2019) que as expuseram ao extrato de jambu (*Acmella oleracea*). Além disso, segundo Oliveira et al. (2007) a presença desses vacúolos na porção citoplasmática próxima ao pedicelo poderia ser justificada pelo fato do agente tóxico, aqui no caso a água ozonizada, ter atingido o interior do ovócito via células do pedicelo, as quais primariamente teriam as funções de prender os ovócitos à parede do ovário, mas além dessa, a de sintetizar parte dos elementos do vitelo (origem exógena). As células do pedicelo fariam então a transferência dos componentes vitelogênicos (da hemolinfa) que, junto àqueles sintetizados pelo próprio ovócito (origem endógena) comporiam o vitelo final (com elementos proteicos, polissacarídicos e lipídicos) (ROMA et al., 2010). Na situação específica de exposição a água ozonizada, essas células do pedicelo poderiam estar intermediando de forma não tão seletiva a entrada/saída de elementos do meio externo (hemolinfa) para o interno (citoplasma) do ovócito, e vice-versa.

Foi aqui também observado que a exposição a água ozonizada alterou a morfologia e conteúdo dos grânulos de vitelo. Os mesmos que antes tinham a forma arredondada passaram a ser irregulares e menores, sugerindo que houve interferência na capacidade de síntese/incorporação celular dos principais elementos do vitelo, devido a exposição, corroborando Oliveira et al. (2019), que também observaram alterações nos grânulos de vitelo em ovócitos nos estágios III-V após a exposição de fêmeas de *R. sanguineus* l.s. (*R. linnaei*) ao extrato de jambu (*Acmella oleracea*). Segundo os autores, essas alterações inviabilizariam o sucesso da fertilização (OLIVEIRA et al. 2019).

Apesar destas células já estarem com o cório totalmente depositado, se não em fase final de deposição, os ovócitos no estágio V de desenvolvimento foram as que mais alterações morfológicas sofreram devido a exposição. Seus grânulos de vitelo apresentaram limite pouco visível, sugerindo principalmente que os mesmos estivessem se rompendo ou, em algumas

situações, se fundindo, resultado este que também foi observado por Vendramini et al. (2012a) quando avaliaram os efeitos do óleo de *Carapa guianensis* (andiroba) sobre o ovário de fêmeas de carrapatos *R. sanguineus* l.s. (*R. linnaei*) semi ingurgitadas levando as autoras a postularem que esse fenômeno seria uma estratégia da célula que, na tentativa de eliminar as substâncias tóxicas do seu interior, acabariam eliminando também parte das substâncias que seriam importantes para a vitelogênese, interferindo assim no processo de desenvolvimento embrionário (VENDRAMINI et al. 2012).

Assim como nos grânulos de vitelo, também observou-se nos ovócitos em estágios mais avançados de desenvolvimento, oriundos de fêmeas expostas a água ozonizada, que também o cório passou por modificações severas que incluíram enrugamento devido ao descolamento deste da membrana plasmática. Sabe-se que o papel do cório está diretamente ligado a proteção da célula germinativa que dará origem a um novo indivíduo, conferindo-lhe proteção mecânica contra choques, invasão de microrganismos, desidratação, variação de temperatura e predação (OLIVEIRA et al. 2008). Com o comprometimento dessa membrana, algumas dessas funções ficariam prejudicadas o que certamente prejudicaria a passagem dos ovócitos para os próximos estágios de desenvolvimento, além de torna-los mais vulneráveis as adversidades do ambiente.

Histoquímicamente as análises para a detecção de polissacarídeos (PAS) e de proteínas (azul de bromofenol) aqui realizadas, confirmaram a presença de alterações na síntese dos elementos proteicos e polissacarídicos do vitelo, uma vez que ovócitos em todos os estágios de desenvolvimento e principalmente aqueles nos estágios mais desenvolvidos (IV e V), tiveram os grânulos vitelogênicos e o cório reagindo fracamente tanto ao corante azul de bromofenol (proteínas) quanto ao PAS (polissacarídeos), sugerindo alteração na síntese e distribuição dos elementos vitelogênicos nos grânulos. O ovócito I, mostrou um citoplasma fortemente marcado pelo azul de bromofenol e pelo PAS, indicando maior presença/síntese de elementos proteicos e polissacarídicos nesse estágio de desenvolvimento, o que poderia ter se dado devido a desregulação causada pelo ozônio (água ozonizada). Esses dados histoquímicos corroboraram aqueles obtidos em ovários de *R. sanguineus* l.s. (*R. linnaei*) expostos a acaricidas sintéticos, tais como o dinotefuran, por Oliveira et al. (2016), a permetrina, por Roma et al. (2011); além de outros autores que expuseram fêmeas dessa mesma espécie de carrapatos a acaricidas naturais como: ao óleo de andiroba (*Carapa guianensis*) por Vendramini et al. (2012), ao timol por Matos et al. (2014), ao jambu (*Acmella oleracea*) por Oliveira et al. (2019) e ao acetilcarvacrol por König et al. (2020).

A morfohistologia pós exposição a água ozonizada do órgão de Gené, confirmou que as fêmeas de carrapatos expostas à 3mg/L de água ozonizada, tiveram as glândulas tubulares desse órgão alteradas. Essas glândulas, já haviam sido extensamente estudadas por Matos et al. (2020) que registraram que as mesmas seriam compostas por um epitélio simples cilíndrico, formado por células secretoras que delimitariam um lúmen glandular central. Segundo as autoras, esse órgão teria importância na síntese e secreção de compostos lipoprotéicos, os quais seriam depositados sobre os ovos imediatamente após a postura, para que os mesmos se mantivessem unidos e protegidos contra a perda de água, ação de microrganismos, e mudanças outras decorrentes do ambiente (MATOS et al., 2020).

Dentre essas alterações observadas nas glândulas tubulares das fêmeas expostas ao ozônio (água ozonizada), notou-se a presença de um epitélio secretor desorganizado, que passou de simples a estratificado, o que certamente acarretou em mudanças fisiológicas nestas células e interferiu na função geral do órgão. Esse processo de metaplasia devido a ação de agentes externos ao organismos também foi demonstrado anteriormente, no presente trabalho, quando analisado o integumento de fêmeas dessa mesma espécie de carrapatos também expostas a água ozonizada (ABREU et al. 2020), onde o epitélio tegumentar em determinadas regiões do corpo passaria de simples para estratificado, fenômeno que alteraria principalmente a função das células epiteliais basais afetando diretamente nos processos de síntese e secreção dos compostos da cutícula.

Ainda no órgão de Gené, verificou-se que o citoplasma das células secretoras das glândulas tubulares apresentou intensa vacuolização, principalmente nas regiões basal e apical, sugerindo que esta seria uma estratégia de sobrevivência celular ao isolar compostos tóxicos e até mesmo partes danificadas do citoplasma, acondicionando esse material em vacúolos autofágicos, corroborando hipótese de Dernardi et al., (2012). Outros autores que também investigaram a ação tóxica de compostos acaricidas naturais nesta mesma espécie de carrapatos, encontraram resultados semelhantes, como Remédio et al. (2014) e Lima de Souza et al. (2017) que observaram vacuolização citoplasmática em células epiteliais do integumento de *R. sanguineus* l.s. (*R. linnaei*) quando da exposição dos carrapatos ao extrato de neem (*Azadirachta indica*); Oliveira et al. (2020) em células epiteliais no integumento de *R. sanguineus* l.s. (*R. linnaei*) expostos ao acetilcarvacrol; e Matos et al. (2020) que inclusive relatou vacuolização citoplasmática nas células das glândulas tubulares do órgão de Gené de fêmeas ingurgitadas expostas ao timol, bioativo encontrado em plantas como o tomilho e o orégano.

Os resultados aqui obtidos também demonstraram que a exposição a água ozonizada provocou dilatação no lúmen das glândulas tubulares do órgão de Gené, com concomitante aumento da intensidade da coloração da secreção presente no interior do mesmo. Houve marcação fortemente positiva na secreção acumulada no lúmen glandular, e fracamente positiva na membrana basal e no citoplasma das células secretoras das glândulas tubulares, tanto para as proteínas quanto para os polissacarídeos, sinalizando que apesar dessa fraca marcação proteica e polissacarídica, as células ainda foram eficientes na síntese e liberação da secreção (encontrada no lúmen da glândula tubular), provavelmente estimuladas pela substância tóxica no sistema, que ao causar danos estruturais e fisiológicos no epitélio, também alteraria o padrão secretor dessas glândulas.

Simultaneamente à análise morfológica do ovário e do órgão de Gené, foi realizada também a avaliação dos parâmetros biológicos de fêmeas de *R. sanguineus* l.s. (*R. linnaei*) ingurgitadas expostas à água ozonizada na concentração de 3mg/L para se obter: a) peso da fêmea ingurgitada antes da postura, b) peso da massa de ovos, c) percentual de eclosão das larvas, d) índice de produção de ovos, e) taxa de oviposição, e f) percentual de controle final.

Os resultados mostraram que apesar do peso das fêmeas ingurgitadas expostas ter sido significativamente maior do que o daquelas do controle ($249,3 \pm 1,9$), quando foi analisado o peso da massa de ovos, este apresentou um valor menor ($98,8 \pm 4,5$) com um menor índice de produção de ovos ($39,8 \pm 1,8$) em relação ao controle ($104,1 \pm 5,2$; $46,8 \pm 2,3$, respectivamente), sugerindo que a água ozonizada alterou o parâmetro reprodução nas fêmeas expostas, confirmado pela redução de 39,8% na taxa de oviposição das mesmas. Outros autores já haviam obtido dados em relação a atuação do ozônio em fêmeas de carrapato, como Figueiredo et al. (2018), que expuseram fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* ao ozônio em estado gasoso e na concentração de 62mg/L, verificando que a taxa de mortalidade das fêmeas variou entre 80 e 100%. Ainda segundo os mesmos autores a exposição ao gás provocou danos nos tecidos ovariano e tegumentar, o que, consequentemente provocou uma redução nas taxas de oviposição destas fêmeas.

Os dados também confirmaram que houve queda significativa na taxa de eclosão de larvas no Grupo Tratamento ($78,6 \pm 2,6$) quando comparado ao Grupo Controle ($97,3 \pm 3,7$), sinalizando a redução também no número de ovos viáveis e na geração de um novo indivíduo. Estudos realizados por outros autores utilizando insetos como modelo, também demonstraram que o ozônio teria capacidade de reduzir a taxa de viabilidade de ovos em algumas espécies. Moraglio et al. (2018) afirmaram que o ozônio além de aumentar a taxa de mortalidade em

adultos da espécie *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae), também interferiria no tempo que as larvas levariam para eclodir, visto que o mesmo seria maior do que quando mensurado em situação normal. Além disso, a taxa de ovos inviáveis estaria ao redor de 30% quando as fêmeas fossem expostas ao ozônio na concentração de 50 ppm. Sob essa perspectiva outros autores como McDonough et al. (2011) que também conduziram estudos com outras pragas agrícolas como o *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae), *Indianmeal moth* (*Plodia interpunctella* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae), *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) e *S. oryzae* (L) (Coleoptera: Curculionidae) expondo-as à diferentes concentrações de ozônio em períodos de tempo distintos, registraram queda na taxa de eclosão, assim como alta mortalidade de adultos e de larvas em todas estas espécies, levando os autores a postularem que quanto maior a concentração do ozônio gasoso, menor seria o tempo necessário de exposição dos insetos ao mesmo para que se conseguisse alcançar 100% de inviabilidade/mortalidade dos ovos, larvas e adultos.

No presente estudo confirmou-se a ação da água ozonizada sobre o desempenho dos parâmetros biológicos de fêmeas ingurgitadas de *R. sanguineus* l.s. (*R. linnaei*), abrindo a perspectiva de ser este um promissor agente de controle, visto ter reduzido a taxa de oviposição e a taxa de eclosão de larvas das fêmeas expostas. Apesar destes resultados aqui obtidos, aqueles registrados por Szabó et al. (2009) mostraram outra direção. Os autores expuseram fêmeas ingurgitadas dessa mesma espécie, ao ozônio em estado gasoso e não observaram ação acaricida, uma vez que o gás não alterou negativamente parâmetros biológicos como: peso da massa de ovos, peso das fêmeas ingurgitadas antes da oviposição e taxa de eclosão de larvas. Provavelmente esses dados obtidos por Szabó et al. (2009) decorreriam do fato de que esses autores fizeram uso do ozônio na concentração de 0,23mg/L e em estado gasoso, e no presente estudo utilizou-se a concentração de 3mg/L de ozônio diluído em água. Ressalte-se ainda que o ozônio quando diluído fisicamente na água, tem parte das suas moléculas decompostas em questão de segundos, porém, parte delas permanece estável até mesmo por algumas horas. Em decorrência desse processo de decomposição molecular haveria então a geração de uma série de radicais com potencial oxidante, que desencadeariam reações bioquímicas, confirmadas por meio da realização de bioensaios tanto *in vivo* quanto *in vitro* (BOCCI; VIA, 2004).

Assim, os parâmetros biológicos aqui avaliados após a exposição de fêmeas ingurgitadas de *R. sanguineus* l.s. (*R. linnaei*) a água ozonizada na concentração de 3mg/L permitiram demonstrar em laboratório, que a água ozonizada agiu sobre a taxa de controle dos carrapatos na porcentagem de 33,8%. Muito embora essa taxa seja ainda considerada baixa

quando se fala em controle efetivo, quando comparada com a eficiência dos acaricidas químicos sintéticos comumente comercializados no mercado veterinário, outros estudos com outros acaricidas naturais como o timol, por exemplo, resultaram em taxa de controle igual a 19,8% com o timol na concentração de 5mg/mL e de 98% quando na concentração de 20mg/mL (MATOS et al. 2020), ou seja, talvez o ozônio em maiores concentrações provocaria uma maior taxa de mortalidade. Os dados aqui obtidos, no entanto, já sinalizaram que o ozônio pode ser considerado um potencial acaricida natural, visto sua ação ter atingido não só os parâmetros biológicos aqui estudados, mas aqueles morfológicos nos órgãos dos carrapatos aqui analisados, sinalizando que os danos provocados interfeririam na biologia dos ectoparasitas, principalmente nos processos de alimentação, ingurgitamento e reprodução (interferência direta na ovogênese e na dinâmica da vitelogênese).

Além dos estudos *in vivo*, esse trabalho realizou também ensaios *in vitro* utilizando células embrionárias de carrapatos da espécie *R. sanguineus* l.s. O bioensaio realizado com células da linhagem embrionária de carrapatos *R. sanguineus* l.s. (RML-RSE) expostas a água ozonizada (3mg/L de ozônio), foi realizado para comparação dos dados obtidos com aqueles das células dos grupos controle negativo (células expostas somente a água destilada) e positivo (células expostas ao DMSO). As células foram também analisadas em resposta a ativação das caspases 3 e 7 e em resposta as alterações mitocondriais, por meio da aplicação de técnicas de citometria de fluxo (MUSE™ Cell Analyzer).

A literatura descreve que as caspases são proteínas do grupo de cisteínas-proteases que tem papel fundamental na morte celular programada em resposta a sinais pró-apoptóticos (MCCOMB et al., 2019). Enquanto algumas caspases agem iniciando a cascata de eventos intracelulares, outras, as chamadas “caspases efetoras” atuam num momento posterior do processo, clivando proteínas estruturais durante a formação dos corpos apoptóticos, e por esse motivo, podem ser consideradas marca registrada dos eventos apoptóticos (MCCOMB et al., 2019).

No presente estudo as células expostas à água ozonizada (3mg/L de ozônio) após 24 horas não apresentaram alterações significativas na marcação de caspases 3/7, no entanto, houve diminuição de células viáveis (86%), assim como aumento das porcentagens de células em apoptose tardia e/ou necróticas. O mesmo ocorreu na avaliação após 48 horas de exposição, sendo que nesse período, as células necróticas tiveram um aumento significativo (4,2%) em comparação ao controle.

O registro do grande número de células que estavam em processo de morte devido a exposição a água ozonizada, principalmente as necróticas, provavelmente deveu-se ao fato de o ozônio ser um potente oxidante, ou seja, uma molécula instável, que em contato com qualquer doador de elétron dentro da célula geraria estresse oxidativo e resultaria no aumento das moléculas reativas de oxigênio (EROs) (GROOTVELT et al., 2004a). Como já conhecido, as EROs, quando em excesso no interior da célula, podem causar danos severos aos componentes celulares tais como membranas, proteínas, e até mesmo ao material genético, o que consequentemente provoca alteração no metabolismo das mesmas e as induz a entrar em morte ou por apoptose ou por necrose. Estudos anteriores desenvolvidos por Baysan et al. (2000), mostraram que as propriedades do ozônio em inativar bactérias e fungos, seria devido a sua capacidade de causar danos não só às membranas celulares, mas também aos componentes citoplasmáticos, devido a oxidação dos ácidos graxos e dos peptídeos (KÜÇÜKGÜL et al., 2019), o que, no presente trabalho poderia estar ocorrendo.

As alterações mitocondriais nas células expostas a à água ozonizada foram também aqui registradas. As análises estatísticas mostraram que os dados obtidos não foram significativos quando focou-se a despolarização de membrana mitocondrial. Ressalte-se, no entanto, que no período de 48 horas de exposição houve um aumento significativo de células mortas, porém com a membrana mitocondrial intacta. A perda do potencial transmembrana mitocondrial estaria associada aos estágios iniciais da apoptose (KRYSKO et al., 2001). Outros autores ainda afirmaram que colapso do potencial transmembrana mitocondrial coincidiria com a abertura dos poros de permeabilidade, o que levaria à liberação de citocromo C no citoplasma, e iniciaria assim os eventos da cascata apoptótica dependente de caspases (HEARPS et al., 2002). Assim, a despolarização da membrana mitocondrial estaria relacionada com os eventos da apoptose, além de indicar a disfunção mitocondrial (KRYSKO et al., 2001).

Como nessa avaliação em citometria de fluxo não foi observada significativa despolarização de membrana mitocondrial nem nas marcações das caspases 3 e 7 nas células expostas à água ozonizada, concluiu-se que essa concentração de água ozonizada não tenha sido suficiente para causar aumento na porcentagem de morte celular nas células dessalinagem embrionária de carrapatos nas condições utilizadas.

Por outro lado, os ensaios realizados ao longo do estágio BEPE (IHMT- Lisboa, Portugal) com células embrionárias de carrapatos mostraram resultados diferentes. O primeiro objetivo desse estágio foi estabelecer um protocolo padrão de testagem de compostos acaricidas, utilizando como modelo células de linhagens embrionárias de carrapatos, no caso,

da espécie *Ixodes scapularis* (ISE6), uma vez que estas células se mostraram mais aptas ao processo de plaqueamento celular. Cabe aqui enfatizar que o uso de linhagens de células de carrapatos em estudos que visam o controle de ectoparasitas já tem se tornado comum, principalmente no aspecto da resistência a acaricidas sintéticos (amitraz, fipronil, ivermectina e permetrina), fazendo parte da busca pelos genes associados a essa resistência, bem como tentando elucidar os mecanismos que auxiliariam com a obtenção de novas informações a temática que trata da produção de vacinas (AL-ROFAAI AND BELL-SAKYI, 2020). A literatura sob esse ponto de vista, no entanto, ainda é escassa, e assim, se estabelecer protocolos que possam servir de padrão para testagem de acaricidas fazendo uso de células de linhagem embrionária de carrapatos foi um dos resultados muito positivos que a parceria entre pesquisadores dos laboratórios brasileiro e português, permitiu e o que também só foi possível com o suporte financeiro conferido pela FAPESP. O estabelecimento desse protocolo, certamente contribuirá na obtenção de importantes informações que auxiliem no entendimento de certos processos celulares, principalmente abordando aspectos toxicológicos. Ademais, o estabelecimento desse protocolo atende as normas éticas no sentido de que diminuem o uso de animais nos testes com produtos acaricidas, uma vez que os carrapatos por serem ectoparasitas hematófagos necessitam dos animais vertebrados para se alimentar e completar o seu ciclo biológico (ANDERSON; MAGNARELLI, 2008).

Outro objetivo que foi planejado quando se solicitou o estágio BEPE foi o de avaliar os efeitos do ozônio, sob a forma de óleo ozonizado *in vitro*, sobre a viabilidade das células de carrapato (ISE6), agora abordando os aspectos morfológicos e da regulação da expressão de genes relacionados ao estresse e morte celular (GST e caspases 1 e 3) após a exposição a esse composto.

Os resultados obtidos mostraram que tanto DMSO quanto o óleo ozonizado na concentração de 100µL/mL foram capazes de causar morte significativa das células expostas a eles quando se comparou com o Controle Negativo (células expostas somente ao meio de cultivo L15B300). O DMSO é conhecidamente tóxico para células em cultura e foi aqui utilizado como controle positivo para a morte celular (AWAN et al., 2020). O óleo ozonizado quando na maior concentração (100µL/mL) foi citotóxico para as células a ele expostas, provavelmente devido as propriedades oxidantes do ozônio, que por ser uma molécula instável, quando em contato com qualquer doador de elétron dentro da célula gera estresse oxidativo, resultando em aumento das moléculas reativas de oxigênio (EROs) (GROOTVELT et al., 2004a).

Quanto à viabilidade celular, os dados aqui obtidos corroboraram os achados da análise da morfologia das células expostas ao mesmo composto, uma vez que as maiores alterações morfológicas foram decorrentes da exposição a maior concentração do óleo ozonizado (100µL/mL), e incluiu: a) maior presença de células com forma fusiforme; b) citoplasma com vacúolos citoplasmáticos; e c) núcleos com formatos irregulares e intensamente corados, além de vacuolizados ou rompidos; características essas típicas de morte celular programada (apoptose), e também muito semelhantes as observadas nas células expostas ao DMSO (Grupo Controle Negativo). Alterações celulares semelhantes também foram observadas na exposição das células a menor concentração do óleo ozonizado (50µL/mL), porém de forma menos intensa. Segundo Baysan et al. (2000), o ozônio causaria danos às membranas celulares e aos componentes citoplasmáticos, resultado da oxidação dos ácidos graxos e dos peptídeos que compõem a membrana celular, justificando a extensão das alterações tanto no núcleo quanto no citoplasma das células expostas. A vacuolização citoplasmática observada, como já discutido anteriormente, é característica comum em células de organismos expostos a agentes estressores, sendo um indicativo de que o mecanismo de defesa celular foi ativado, e as células isolaram organelas e/ou porções do citoplasma danificados, em vacúolos, que posteriormente seriam digeridos (ALBERTS, 2017).

Os últimos dados citados corroboraram aqueles obtidos da análise de regulação gênica, uma vez que observou-se aumento da regulação da caspase 3 nas células expostas ao óleo ozonizado nas concentrações de 50 e 100 µL/mL. As caspases são proteínas pertencentes ao grupo de cisteínas-proteases que desempenham papel fundamental na morte celular programada em resposta a sinais pró-apoptóticos (MCCOMB et al., 2019). Enquanto algumas caspases agem iniciando a cascata de eventos intracelulares, outras chamadas “caspases efetoras” agem posteriormente na clivagem de proteínas estruturais durante a formação dos corpos apoptóticos, como no caso das caspases efetoras 3 (MCCOMB et al., 2019). Ao final, confirmaram-se os resultados previamente obtidos que mostraram que o óleo ozonizado, principalmente na concentração de 100 µL/mL, causaria a morte celular por apoptose nas culturas de células de linhagem de carrapatos (ISE6) a ele expostos.

Ainda, pretendeu-se verificar os efeitos diretos e indiretos do ozônio (óleo ozonizado) sobre os patógenos transmitidos por carrapatos Ixodidae, o que se deu por meio da análise morfológica e de qPCR antes e depois da exposição. Para obtenção dos resultados foram realizados protocolos de infecção por *Ehrlichia canis* Spain 105 strain em 4 linhagens celulares: duas de carrapato (ISE6 e IDE8) e duas de mamíferos (J774 e DH82) que serviram de

reservatório para infecção posterior em linhagens de carrapatos. Porém, infelizmente e principalmente devido ao curto tempo disponível, não se obteve sucesso na infecção das linhagens celulares, conforme mostra o gráfico de amplificação de genes de *E. canis* durante a RT-qPCR.

Finalmente, todos os dados apresentados e discutidos no presente estudo, mostraram que o ozônio tanto na forma de água ozonizada quanto na de óleo ozonizado pode ser considerado um potencial acaricida natural com ação positiva em carrapatos da espécie *R. sanguineus* l.s. (*R. linnaei*), provocando nestes toxicidade, confirmada pelas alterações encontradas tanto nos órgãos internos como no externo desses ectoparasitas (glândulas salivares, ovário, órgão de Gené e integumento), bem como alterando a dinâmica: a) dos parâmetros biológicos reprodutivos e morfológicos, b) da viabilidade celular e c) da expressão gênica de células embrionárias de carrapatos.

6. REFERÊNCIAS

ABREU, M. R. et al. Salivary Glands of Female Ticks *Rhipicephalus sanguineus* Like a Potential Source of Molecules with Inhibitory Action: In vivo study with Walker 256 Tumor Cells. **Journal of Pharmaceutical Care & Health Systems**, v. 01, n. 04, p. 1–8, 2014.

ABREU, M. R. et al. Exposure of Ticks *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari : Ixodidae) to Ozonated Water : Integument Response Exposure of Ticks *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari : Ixodidae) to Ozonated Water : Integument Response. **Ozone: Science & Engineering**, v. x, n. 00, p. 1–10, 2020a.

ABREU, M. R. et al. Morphophysiological analysis of the salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari : Ixodidae) exposed to ozonated water : A control strategy. **Medical and Veterinary Entomology**, p. 1–9, 2020b.

ABREU, M. R. et al. Immunomodulatory and morphophysiological effects of *Rhipicephalus sanguineus* s . l . (Acari : Ixodidae) salivary gland extracts. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 207, p. 36–45, 2019.

AKTAS, M.; OZUBEK, S. Molecular evidence for trans-stadial transmission of *Anaplasma platys* by *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato under field conditions. **Medical and Veterinary Entomology**, p. 78–83, 2018.

ALZOHAIYRY, M. A. Therapeutics Role of *Azadirachta indica* (Neem) and Their Active Constituents in Diseases Prevention and Treatment. v. 2016, 2016.

ANDERSON, J. F.; MAGNARELLI, L. A. Biology of Ticks. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 22, n. 2, p. 195–215, 2008.

ARAUJO, A. M. et al. Determination of the LC50 of selamectin (active principle of the antiparasitic Revolution®, Pfizer) applied on engorged female of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). **International Journal of Acarology**, v. 38, n. 4, p. 277–281, 2012.

ARAÚJO, L. X. et al. Synergism of thymol, carvacrol and eugenol in larvae of the cattle tick, *Rhipicephalus microplus*, and brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 30, n. 4, p. 377–382, 2016.

ARNOSTI, A. et al. Effects of *Ricinus communis* oil esters on salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille , 1806) (Acari : Ixodidae). **Experimental Parasitology**, v. 127, p. 569–574, 2011a.

ARNOSTI, A. et al. Effects of ricinoleic acid esters from castor oil of *Ricinus communis* on the vitellogenesis of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille , 1806) (Acari : Ixodidae) ticks. **Experimental Parasitology**, v. 127, p. 575–580, 2011b.

BAGGOTT, D. et al. Efficacy of a novel combination of fipronil, amitraz and (S)-methoprene for treatment and control of tick species infesting dogs in Europe. **Veterinary Parasitology**, v. 179, n. 4, p. 330–334, 2011.

BARKER, S. C.; MURRELL, A. Systematics and evolution of ticks with a list of valid genus and species names. **Ticks: Biology, Disease and Control**, v. 129 Suppl, n. February, p. 1–39, 2008.

BATAKLIEV, T. et al. Ozone decomposition. **Interdisciplinary Toxicology**, v. 7, n. 2, 2014.

BECKER, S. et al. Resistance to deltamethrin , fipronil and ivermectin in the brown dog tick , *Rhipicephalus sanguineus sensu stricto* , Latreille (Acari : Ixodidae). **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 10, n. 5, p. 1046–1050, 2019.

BELL-SAKYI, L. et al. Tick cell lines: tools for tick and tick-borne disease research **Trends in Parasitology**, v. 23, n. 9, p. 450-457, 2007.

BELL-SAKYI, L.; PAXTON, E. A.; MUNDERLOH, U. G. Growth of *Cowdria ruminantium* , the Causative Agent of Heartwater , in a Tick Cell Line. **Journal of Clinical**

Microbiology, v. 38, n. 3, p. 1238-1240, 2000.

BOCCI, V.; VIA, A. Ozone as Janus : this controversial gas can be either toxic or medically useful. **Mediators of inflammation**, v. 13,p. 3-12, 2004.

BOZZATTO, V. et al. Morphological alterations of epidermis of rabbits infested by *R. sanguineus* ticks and exposed to Selamectin (active principle of Pfizer Revolution ® acaricide): A confocal microscopy study. **Acta Histochemica**, v. 116, n. 3, p. 534–538, 2014.

BOZZATTO, V.; OLIVEIRA, P. R. DE; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Histopathology of the tegument of rabbits infested by *Rhipicephalus sanguineus* (ACARI : IXODIDAE) ticks and exposed to selamectin (active principle of acaricide Revolution ® , Pfizer). p. 2551–2560, 2013.

CALLIGARIS, I. B. et al. Action of the Insect Growth Regulator Fluazuron , The Active Ingredient of the Acaricide Acatak V , in *Rhipicephalus sanguineus* Nymphs (Latreille , 1806) (Acari : Ixodidae). **Microscopy Research and Technique**, v. 1185, n. June, p. 1177–1185, 2013.

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

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

CAMARGO-MATHIAS, M. I. et al. Esters from castor oil : interfering with the salivary gland secretory cycle of *Rhipicephalus sanguineus* ticks (Acari : Ixodidae). v. 2, p. 66–72, 2016.

CAMARGO-MATHIAS, M. I. et al. Deltamethrin as inductor agent of precocious ovarian degeneration in *Rhipicephalus sanguineus* s.l. (Acari: Ixodidae) ticks. **Experimental and Applied Acarology**, v. 72, n. 2, p. 161–169, 2017.

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

CAMPABADAL, C. A.; MAIER, D. E.; MASON, L. J. Efficacy of fixed bed ozonation treatment to control insects in stored bulk grain. **Applied Engineering in Agriculture**, v. 29, n. 5, p. 693-704, 2013.

CARDOSO, L. D. et al. Caracterização de *Rickettsia* spp. circulante em foco silencioso de febre maculosa brasileira no Município de Caratinga, Minas Gerais, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 22, n. 3, p. 495–501, 2006.

COELHO, L. et al. Combination of thymol and eugenol for the control of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato: Evaluation of synergism on immature stages and formulation development. **Veterinary Parasitology**, v. 277, n. August 2019, p. 108989, 2020.

CUNHA, N. C. et al. First identification of natural infection of *Rickettsia rickettsii* in the *Rhipicephalus sanguineus* tick, in the State of Rio de Janeiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, p. 105–108, 2009.

DA SOARES, C. E. S. et al. Use of ozone gas as a green control alternative to beetles *Alphitobius diaperinus* (panzer) infestation in aviary bed utilized in the poultry industry. **Chemical Engineering Transactions**, v. 64, p. 589-594, 2018.

DAMASCENO, S. R. B. et al. Acetylcarvacrol, a derivative of carvacrol , reduces nociceptive and inflammatory response in mice. **Life Sciences**, v. 94, n. 1, p. 58–66, 2014.

DANTAS-TORRES, F. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille,1806) (Acari: Ixodidae): From taxonomy to control. **Veterinary Parasitology**, v. 152, n. 3-4, p. 173-185, 2008.

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

DANTAS-TORRES, F.; OTRANTO, D. Further thoughts on the taxonomy and vector role of *Rhipicephalus sanguineus* group ticks. **Veterinary Parasitology**, v. 208, n. 1–2, p. 9–13, 2015.

DANTAS-TORRES, F. et al. Biological compatibility between two temperate lineages of brown dog ticks, *Rhipicephalus sanguineus* (sensu lato). **Parasites and Vectors**, v. 11, n. 1, p. 1–10, 2018.

DENARDI, S. E. et al. *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. 462–470, 2010.

DENARDI, S. E. et al. 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.

DRUMMOND, R.E.A., 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, 130–133. [https:// doi.org/10.1093/jee/66.1.130](https://doi.org/10.1093/jee/66.1.130).

DUBEY, S. et al. Phytochemistry, pharmacology and toxicology of *Spilanthes acmella*: A Review. **Advances in Pharmacological Sciences**, v. 2013, p. 423750, 2013.

EIDEN, A. L. et al. Determination of metabolic resistance mechanisms in pyrethroid-resistant and fipronil-tolerant brown dog ticks. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 31, p. 243–251, 2017.

EIDEN, A. L. et al. Detection of Permethrin Resistance and Fipronil Tolerance in *Rhipicephalus sanguineus* (Acari : Ixodidae) in the United States. **Journal of Medical Entomology**, v. 52, n. 3, p. 429–436, 2020.

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.

FIGUEIREDO, T. F. B. et al. Effect of Ozone on Engorged *Rhipicephalus microplus* (Acari : Ixodidae) Females During the Pre- Laying Period Effect of Ozone on Engorged *Rhipicephalus microplus* (Acari : Ixodidae) Females During the Pre-Laying Period. **Ozone:**

Science & Engineering, v. 00, n. 00, p. 1–8, 2018.

GRAY, J. et al. Systematics and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 4, n. 3, p. 171-180, 2013.

GUGLIELMONE, A. A. et al. **The hard ticks of the world: (Acari: Ixodida: Ixodidae)**. New York: Springer, 2014.

GUZEL-SEYDIM, Z. B.; GREENE, A. K.; SEYDIM, A. C. Use of ozone in the food industry. **LWT - Food Science and Technology**, v. 37, n. 4, p. 453–460, 2004.

HEARPS, A. C. et al. Mitochondrial cytochrome c release precedes transmembrane depolarisation and caspase-3 activation during ceramide-induced apoptosis of Jurkat T cells. **Apoptosis**, v. 7, n. 5, p. 387–394, 2002.

HOUSEMAN, R. M. **Guide to Ticks and Tick-borne Diseases**. Missouri: University of Missouri, 2013.

IPEK, A. et al. Molecular Evidence for Transstadial Transmission of *Ehrlichia canis* by *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato Under Field Conditions. **Journal of medical entomology**, v. 55, n. 2, p. 440-444, 2018.

KALIL, S. P. et al. Immune-related redox metabolism of embryonic cells of the tick *Rhipicephalus microplus* (BME26) in response to infection with *Anaplasma marginale*. p. 1–10, 2017.

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, n. August, p. 43, 2013.

KONIG, I. F. M. et al. Low concentrations of acetylcarvacrol induce drastic morphological damages in ovaries of surviving *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato ticks (Acari: Ixodidae). **Micron**, v. 129, n. November 2019, p. 102780, 2020.

KOTÁL, J. et al. Modulation of host immunity by tick saliva. **Journal of Proteomics**, v. 128, p. 58–68, 2015.

KRYSKO, D. V et al. Mitochondrial Transmembrane Potential Changes Support the Concept of Mitochondrial Heterogeneity During Apoptosis. v. 49, n. 10, p. 1277–1284, 2001.

KÜÇÜKGÜL, A. et al. Investigation of the anti-apoptotic activity of ozone therapy in rainbow trout macrophages infected with *Yersinia ruckeri*. p. 771–783, 2019.

LATROFA, M. S. et al. Molecular detection of tick-borne pathogens in *Rhipicephalus sanguineus* group ticks. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 5, n. 6, p. 943–946, 2014.

LIMA DE SOUZA, J. R. et al. The effects of neem oil (*Azadirachta indica* A. JUSS) enriched with different concentrations of azadirachtin on the integument of semi-engorged *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae) females. **Microscopy Research and Technique**, v. 80, n. 8, p. 838–844, 2017.

LIMA DE SOUZA, J. R. et al. Effects of carvacrol on oocyte development in semi-engorged *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato females ticks (Acari: Ixodidae). **Micron**, v. 116, n. June 2018, p. 66–72, 2019.

LOPES, M. S. et al. Disinfection of corrugated tubing by ozone and ultrasound in mechanically ventilated tracheostomized patients. **Journal of Hospital Infection**, v. 90, n. 4, p. 304–309, 2015.

LOPES, T. et al. Evaluation of synergism and development of a formulation with thymol, carvacrol and eugenol for *Rhipicephalus microplus* control. **Experimental Parasitology**, v. 207, n. May, p. 107774, 2019.

MAJEWSKI, J. Methods for measuring ozone concentration in ozone-treated water. **Przegląd Elektrotechniczny (Electrical Review)**, n. 9, p. 253–255, 2012.

MARSON, R. F. et al. Use of Ozonated Water for Disinfecting Gastrointestinal Endoscopes. **Ozone: Science and Engineering**, v. 38, n. 5, p. 346–351, 2016.

MATOS, R. DA S. et al. Histopathological study of ovaries of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) exposed to different thymol concentrations. **Parasitology Research**, v. 113, n. 12, p. 4555–4565, 2014a.

MATOS, R. S. et al. 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. 669–673, 2014b.

MATOS, R. S. et al. Thymol action on cells and tissues of the synganglia and salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato females (Acari: Ixodidae). **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 10, n. 2, p. 314–320, 2019.

MATOS, R. S. et al. Thymol: Effects on reproductive biology and Gene's organ morphology in *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato engorged females (Acari: Ixodidae). **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 11, n. 1, p. 101308, 2020.

MCCOMB, S. et al. Efficient apoptosis requires feedback amplification of upstream apoptotic signals by effector caspase-3 or -7. p. 1–12, 2019.

MEKONNEN, S. et al. Acaricide resistance profiles of single- and multi-host ticks from communal and commercial farming areas in the Eastern Cape and North-West Provinces of South Africa. **The Onderstepoort journal of veterinary research**, v. 69, n. 2, p. 99–105, 2002.

MENÉNDEZ, S.; FALCÓN, L.; MAQUEIRA, Y. Therapeutic efficacy of topical OLEOZON ® in patients suffering from onychomycosis. **Mycoses**, v. 54, n. 5, p. 272–277, 2011.

MORAGLIO, S. T. et al. Effect of ozone gas against life stages of *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) in laboratory and a storehouse. **Journal of Stored Products**

Research, 2018.

MOREIRA FONSECA, P. M. et al. Disinfection of Dental Instruments Contaminated with *Streptococcus mutans* Using Ozonated Water Alone or Combined with Ultrasound. **Ozone: Science and Engineering**, v. 37, n. 1, p. 85–89, 2015.

MOREIRA, L. H. et al. Effect of Ozone as Acaricide: Action of the Ozone on the Cuticle and Respiratory Spiracle of Tick *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato. **Ozone: Science & Engineering**, v. 00, n. 00, p. 1–8, 2017.

NAGAYOSHI, M. et al. Antimicrobial effect of ozonated water on bacteria invading dentinal tubules. **Journal of endodontia**, v. 30, n. 11, p. 778–781, 2004.

NAVA, S. et al. The taxonomic status of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806). **Veterinary Parasitology**, v. 208, n. 1–2, p. 2–8, 2015.

NAVA, S. et al. *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806): Neotype designation, morphological re-description of all parasitic stages and molecular characterization. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 9, n. 6, p. 1573–1585, 2018.

NODARI, E. F. et al. Cytotoxic effects of permethrin in salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) semi-engorged females. **Experimental Parasitology**, v. 128, n. 2, p. 151–158, 2011.

NODARI, E. F. et al. Action of permethrin on *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) semi-engorged females: Morpho-physiological evaluation of salivary glands. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 3, n. 4, p. 219–226, 2012a.

NODARI, E. F. et al. Degenerative process and cell death in salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) semi-engorged female exposed to the acaricide permethrin. **Microscopy Research and Technique**, v. 75, n. 8, p. 1012–1018, 2012b.

NODARI, E. F. et al. Morpho-ultrastructural alterations in the salivary glands of semi-

engorged *Rhipicephalus sanguineus* s.l. females subjected to permethrin . **Emergent Life Sciences Research**, v. 3, p. 18–31, 2017.

OLIVEIRA, M. V. S. et al. Sublethal concentrations of acetylcarvacrol affect reproduction and integument morphology in the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari : Ixodidae). **Experimental and Applied Acarology**, n. 0123456789, 2020.

OLIVEIRA, P. R. et al. 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 LC50. **Experimental parasitology**, v. 127, n. 2, p. 418-422, 2011.

OLIVEIRA, P. R. et al. Potential of the insect growth regulator, fluazuron, in the control of *Rhipicephalus sanguineus* nymphs (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): Determination of the LD 95 and LD 50. **Experimental Parasitology**, v. 131, n. 1, p. 35–39, 2012a.

OLIVEIRA, P. R. DE et al. Fluazuron-induced morphophysiological changes in the cuticle formation and midgut of *Rhipicephalus sanguineus* Latreille , 1806 (Acari : Ixodidae) nymphs. p. 45–58, 2013.

OLIVEIRA, P. R. et al. Fluazuron-induced morphological changes in *Rhipicephalus sanguineus* Latreille, 1806 (Acari: Ixodidae) nymphs: An ultra-structural evaluation of the cuticle formation and digestive processes. **Acta Tropica**, v. 133, n. 1, p. 45–55, 2014.

OLIVEIRA, P. R. et al. 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. et al. 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, 2016b.

OLIVEIRA, P. R. et al. Dinotefuran-induced morphophysiological changes in semi-

engorged females *Rhipicephalus sanguineus* Latreille, 1806 (Acari: Ixodidae) ticks: Ultrastructural evaluation. **Acta Tropica**, v. 166, p. 139–154, 2017a.

OLIVEIRA, P. R. et al. 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. et al. Cytotoxic effects of extract of *Acmella oleracea* in the ovaries and midgut of *Rhipicephalus sanguineus* Latreille, 1806 (Acari: Ixodidae) female ticks. **Journal of Microscopy and Ultrastructure**, v. 7, n. 1, p. 28, 2019.

OTRANTO, D.; WALL, R. New strategies for the control of arthropod vectors of disease in dogs and cats. **Med Vet Entomol**, v. 22, n. 4, p. 291–302, 2008.

PASSOS, T. M. et al. Comparative Analysis of Ozone and Ultrasound Effect on the Elimination of *Giardia* spp. Cysts from Wastewater. **Ozone: Science and Engineering**, v. 36, n. 2, p. 138–143, 2014.

PEÑA SISTO, M. et al. Eficacia del Oleozon® en pacientes con periodontitis del adulto TT - Effectiveness of the Oleozon® in patients with adults periodontitis. **Medisan**, v. 19, n. 11, p. 1330–1337, 2015.

PEREIRA, C. P. M. et al. Fipronil-induced cell death in salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806)(Acari: Ixodidae) semi-engorged females. **Experimental parasitology**, v. 127, n. 2, p. 481-489, 2011.

PEREIRA, M. C. et al. Detrimental effect of deltamethrin on the central nervous system (synganglion) of *Rhipicephalus sanguineus* ticks. **Experimental and Applied Acarology**, v. 71, n. 2, p. 159–169, 2017.

POLITI, F. A. S. et al. Acaricidal activity of ethanolic extract from aerial parts of *Tagetes patula* L. (Asteraceae) against larvae and engorged adult females of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille , 1806). **Parasites & vectors**, p. 1–11, 2012.

POLITI, F. A. S. et al. Action of ethanolic extract from aerial parts of *Tagetes patula* L . (Asteraceae) on hatchability and embryogenesis of *Rhipicephalus sanguineus* eggs (Acari : Ixodidae). **Industrial Crops & Products**, v. 67, p. 55–61, 2015.

RAMSEWAK, R. Bioactive N-isobutylamides from the flower buds of *Spilanthes acmella*. **Phytochemistry**, v. 51, n. 6, p. 729–732, jul. 1999.

REMEDIO, R. N. et al. Morphology of the midgut of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) adult ticks in different feeding stages. **Parasitology Research**, v. 112, n. 1, p. 415–425, 2013.

REMEDIO, R. N. et al. Morphological alterations in the synganglion and integument of *Rhipicephalus sanguineus* ticks exposed to aqueous extracts of neem leaves (*Azadirachta indica* A. JUSS). **Microscopy Research and Technique**, v. 77, n. 12, p. 989–998, 2014.

REMEDIO, R. N. et al. 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. 431–444, 2015.

REMEDIO, R. N. et al. Morphological alterations in salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus* ticks (Acari: Ixodidae) exposed to neem seed oil with known azadirachtin concentration. **Micron**, v. 83, p. 19–31, 2016.

REMONDINO, M.; VALDENASSI, L. Different uses of ozone: Environmental and corporate sustainability. Literature review and case study. **Sustainability (Switzerland)**, 2018.

ROMA, G. C. et al. 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. 269–272, 2009.

ROMA, G. C. et al. Permethrin-induced morphological changes in oocytes of

Rhipicephalus sanguineus (Acari: Ixodidae) semi-engorged females. **Food and chemical toxicology**, v. 48, n. 3, p. 825–30, 2010.

ROMA, G. C. et al. Cytotoxic effects of permethrin in oocytes of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) fully engorged females: I. Direct or indirect action of the acaricide in germ cells? **Experimental and Applied Acarology**, v. 53, n. 3, p. 287–299, 2011.

ROMA, G. C. et al. Neurotoxic action of permethrin in *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) female ticks. Morphological and cytochemical evaluation of the central nervous system. **Veterinary Parasitology**, v. 196, n. 3–4, p. 482–491, 2013a.

ROMA, G. C. et al. Morphological and cytochemical changes in synganglion of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) female ticks from exposure of andiroba oil (*Carapa guianensis*). **Microscopy Research and Technique**, v. 76, n. 7, p. 687–696, 2013b.

ROMA, G. C. et al. Action of andiroba oil and permethrin on the central nervous and reproductive systems of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806)(Acari: Ixodidae) ticks females. A confocal study. **Research in veterinary science**, v. 95, n. 2, p. 529-536, 2013c.

ROMA, G. C. et al. Changes in the synganglion of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) female ticks exposed to permethrin: An ultrastructural overview. **Acta Tropica**, v. 136, n. 1, p. 19–26, 2014.

ROMA, G. C. et al. Effects of andiroba (*Carapa guianensis*) oil in ticks: Ultrastructural analysis of the synganglion of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). **Acta Tropica**, n. Part A, p. 7–15, 2015.

ROZADO, A. F. et al. Aplicação de ozônio contra *Sitophilus zeamais* e *Tribolium castaneum* em milho armazenado. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 12, n. 3, p. 282–285, 2008.

SAMPIERI, B. R. et al. Ultrastructural changes in the ovary cells of engorged

Rhipicephalus sanguineus female ticks treated with esters of ricinoleic acid from castor oil (*Ricinus communis*). v. 690, n. December 2011, p. 683–690, 2012.

SAMPIERI, B. R. et al. 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**, v. 191, n. 3–4, p. 315–322, 2013.

SANCHES, G. S. et al. Molecular, biological, and morphometric comparisons between different geographical populations of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 215, p. 78–87, 2016.

SECHI, L. A. et al. Antibacterial activity of ozonized sunflower oil (Oleozone). **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, n. 2, p. 279–284, 2001.

ŠLAPETA J, HALLIDAY B, CHANDRA S, ALANAZI AD, ABDEL-SHAIFY S. *Rhipicephalus linnaei* (Audouin, 1826) recognised as the "tropical lineage" of the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato: Neotype designation, redescription, and establishment of morphological and molecular reference. **Ticks Tick Borne Dis.** 2022 Aug 9;13(6):102024. doi: 10.1016/j.ttbdis.2022.102024. Epub ahead of print. PMID: 36063755.

SOARES, J. F. et al. Experimental infection of the tick *Amblyomma cajennense*, Cayenne tick, with *Rickettsia rickettsii*, the agent of Rocky Mountain spotted fever. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 26, n. 2, p. 139–151, 2012.

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

SOUSA, C. S. et al. Ozônio na esterilização de produtos para assistência à saúde: revisão integrativa da literatura. **Revista da Escola de Enfermagem da U S P**, 2011.

SUBRAMANYAM, B. et al. Efficacy of ozone against *Rhyzopertha dominica* adults in wheat. **Journal of Stored Products Research**, v. 70, p. 53-59, 2017.

SZABO, M. P. J. et al. Ecology, biology and distribution of spotted-fever tick vectors in Brazil. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 3, n. July, p. 27, 2013.

VENDRAMINI, M. C. R. et al. Action of andiroba oil (*Carapa guianensis*) on *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) semi-engorged females: Morphophysiological evaluation of reproductive system. **Microscopy Research and Technique**, v. 75, n. 12, p. 1745–1754, 2012a.

VENDRAMINI, M. C. R. et al. 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, 2012b.

VERISSIMO, C. J. Biological control of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in Brazil. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v. 11, n. 1, p. 14–23, 2015.

YUNKER, C. E.; MEIBOS, H. Culture of embryonic tick cells (Acari:Ixodidae). **Tissue Culture Association Manual**, v. 5, n. 1, p. 1015–1017, 1979.