

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 06/01/2025.

**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 *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 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*.

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.

REMEDIIO, 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.

REMEDIIO, 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.

REMEDIIO, 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.

REMEDIIO, 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.