



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS - RIO CLARO



CIÊNCIAS BIOLÓGICAS INTEGRAL

CAROLINA PARGA MARTINS PEREIRA

**ANÁLISE DOS EFEITOS DO FIPRONIL
(INGREDIENTE ATIVO DO FRONTLINE[®]) NAS
CÉLULAS DAS GLÂNDULAS SALIVARES DE
FÊMEAS DE *Rhipicephalus sanguineus*
(Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae)**

Rio Claro
2009

CAROLINA PARGA MARTINS PEREIRA

ANÁLISE DOS EFEITOS DO FIPRONIL (INGREDIENTE ATIVO DO FRONTLINE®) NAS CÉLULAS DAS GLÂNDULAS SALIVARES DE FÊMEAS DE *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae)

Orientadora: PROFa. DRa. MARIA IZABEL CAMARGO MATHIAS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Câmpus de Rio Claro, para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas

Rio Claro
2009

595.42 Pereira, Carolina Parga Martins
P436a Análise dos efeitos do fipronil (ingrediente ativo do Frontline) nas células das glândulas salivares de fêmeas de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) / Carolina Parga Martins Pereira. - Rio Claro : [s.n.], 2009
18 f. : il., fots. + Comitê de Ética

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Maria Izabel Camargo Mathias

1. Ácaro. 2. Fipronil. 3. Glândula salivar. 4. Carrapato. 5. Acaricida. 6. Efeito citotóxico. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP

*Dedico a todos aqueles que participaram da conclusão desta etapa da
longa jornada de construção do saber científico*

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço aos meus queridos pais Alberto Carlos Pereira Filho e Cláudia Parga Martins Pereira pelo apoio e força em toda a minha trajetória de vida, principalmente nos passos da minha formação. Muito obrigada pelo incentivo, pelos conselhos, pelo conforto, pelas palavras de carinho, pelas brigas e por acreditarem a cada dia no meu crescimento pessoal e profissional. Agradeço, principalmente, pela formação do meu caráter e dos meus valores, que foram fundamentais nesta etapa da minha vida. Sem dúvidas, todas as minhas conquistas não seriam possíveis sem vocês, sendo esta a materialização de uma das mais importantes. Vocês são meus maiores exemplos de vida! Amo muito vocês!!!

Agradeço aos meus irmãos, Leonardo e Rafaela, pelas noites em claro discutindo assuntos referentes à vida, pelas palhaçadas, pelas discussões, pelo colo nos momentos difíceis, por me mostrarem que o amor supera qualquer distância e por sempre estarem presentes nesses anos, compartilhando todos os momentos.

Agradeço a uma pessoa muito especial na minha vida, Thiago Novais Sailer, por ter me mostrado o real significado do amor, por me erguer quando desanimava no meio do caminho, por ser a minha ilha de paz e tranquilidade, por ser meu companheiro de todas as horas, por sempre caminhar ao meu lado na jornada da vida e por ser a minha fonte de inspiração. Agradeço a você por ter me acompanhado e influenciado no meu crescimento, por sempre me ajudar a aprender com as quedas e a enxergar o valor dos pequenos gestos. Amo muito você, meu lindo!!!

Agradeço muito aos meus avós, tios, primos e a minha querida madrinha Isabella pelo apoio, pelo incentivo e por terem acreditado nas minhas conquistas. Em especial, agradeço a minha avó Sylvia por ter enraizado os meus valores, por ter me dado forças, por ter me ajudado no meu enriquecimento intelectual, por ser exemplo de mulher de fibra e de perseverança, e por todo o seu amor e carinho. Amo muito você, minha avozinha!!

Agradeço aos meus grandes amigos e pais postíços Débora Freitas e Rodrigo Avelaira pelas conversas intermináveis, pelos almoços nas tardes de domingo, pelo companheirismo, por terem me ajudado nos momentos difíceis, pelos inúmeros momentos de risadas, pelos conselhos, pelos choros e por terem me mostrado o verdadeiro significado da palavra amizade. Sem vocês, este trabalho não teria se iniciado, afinal, comecei a apreciar a histologia graças a vocês. Obrigada por tudo!!! Amo vocês!!!

Agradeço às integrantes da Tra-la-lá, Aline Campos, Tamie Nezu, Vanessa Jó Girão (Jó), Gabizinha e Rudá, por me ensinarem o quão árduo e ao mesmo tempo gratificante

é a convivência. Agradeço à Aline por ter me mostrado que sempre devemos encarar a vida com muita alegria, mas sem perder a seriedade e por ter me mostrado que tentar é recompensador e necessário. Obrigada por ter me ensinado a respeitar as minhas limitações e a ser mais paciente, menos desesperada, mais compreensiva, menos exigente comigo mesma e mais autêntica. A convivência com você foi muito enriquecedora e divertida. Com certeza, você fez MUITA diferença na minha vida. Hoje, posso falar que somos irmãs de valores e princípios. Agradeço à Tamie Nezu pelos conselhos, pelas conversas, pelas “brincas”, pela alegria, pelas brincadeiras e por ter contribuído muito na construção do meu ser. Agradeço à Jô por ter me ensinado quão difícil e quão maravilhoso é ser mãe jovem, por ter me mostrado o valor da responsabilidade e por ter me mostrado que às vezes é necessário se calar. Agradeço à Gabizinha e ao Rudá pelo amor incondicional e pela pureza.

Agradeço ao meu querido amigo Raphael B. de Souza (Bairral) por ter me acompanhado em todos os momentos, por ser meu ponto de apoio em várias situações, pelas risadas, pelas conversas, pelos choros, pelos desabafos, pelas brigas e por me ensinar que a tolerância em demasia pode ser prejudicial a nós mesmos. Agradeço também ao meu querido amigo Fábio Perin de Sá (Quase Nada) por me ensinar a enxergar a beleza que existe nas pequenas coisas, pela sinceridade, pelo carinho, por me mostrar que cada um tem uma visão diferente das situações e que por mais difícil que seja é necessário respeitá-las.

Agradeço ao Carlos Gussoni (Pássaro) pelas aulas, por despertar minha paixão pela ciência e por passar a enxergar as aves com outros olhos. Agradeço aos amigos Cris, Juliana, Coró, Batata, Pam, Regina, Jesus, Henrique, Remédio, Laura Honda, Nelore e Dino por terem me proporcionado momentos tão divertidos ao longo desses quatro anos. Lembrarei de vocês com um imenso carinho e espero que não percamos o contato.

Agradeço a todos os meus colegas do 4º CBI 2009 por me ensinarem que conviver com a diversidade e pluralidade de opiniões é uma constante construção. Apesar das divergências, tenho-os com muito apreço e me lembrarei de todos os momentos bons vividos nesses quatro anos.

Meu agradecimento especial à minha amiga e orientadora Maria Izabel Camargo Mathias por ter me acompanhado e me ensinado os primeiros passos da pesquisa científica. Muito obrigada pelo apoio, pelos conselhos, pela seriedade, pela firmeza, por sempre acreditar no meu potencial e por tornar esse trabalho possível. Sempre me lembrarei de você com muito carinho e admiração.

Agradeço ao Prof. Dr. Gervásio Henrique Bechara por ter me enviado os espécimes para a realização desse trabalho, mas principalmente pela atenção e presteza.

Agradeço à Patrícia Rosa de Oliveira por ter me ajudado na realização desse trabalho, pela atenção, pelo carinho, por sempre está disponível e disposta a me ajudar independente do horário, pelas conversas, pelo apoio e pela paciência.

Agradeço à Karim Christina Scopinho Furquim por tornar esse trabalho possível, por ter me ajudado em tudo que eu precisei, pelas brincadeiras, pela seriedade, pelas conversas, pelo apoio e por acreditar nas minhas conquistas.

Agradeço aos técnicos Gerson, Mônica e Antônio por terem me ensinado a metodologia necessária para a realização desse trabalho, pela paciência e disposição.

Agradeço à FAPESP pelo auxílio financeiro concedido para a realização dessa pesquisa.

Agradeço a Profa. Dra. Carmem Silvia Fontanetti Christofolletti pelas conversas, pela dedicação, pela atenção, pela seriedade, pela alegria e por ser um exemplo de docente. Tenho um imenso carinho por você!!

Agradeço a todos os funcionários da Unesp que participaram direta ou indiretamente da minha formação. Em especial, agradeço ao corpo docente (meus professores ou não) pelos conhecimentos compartilhados, pelas conversas construtivas e por contribuírem na minha formação pessoal e acadêmica.

Finalmente, agradeço a todas as pessoas que, por ventura, eu possa ter me esquecido de citar, mas que acrescentaram peças importantes no meu crescimento ao longo desses quatro anos.

Muito obrigada!!!

“A viagem nunca termina, o itinerário é recomposto a cada estação e o destino final é sempre desconhecido”.
Zygmunt Bauman

SUMÁRIO

	PÁGINA
RESUMO.....	8
1. INTRODUÇÃO.....	9
2. OBJETIVOS.....	14
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1.Obtenção das fêmeas de carrapatos <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	15
3.2.Ensaio com Fipronil (nº CAS: 120068-37-3).....	16
4. RESULTADOS.....	17
Capítulo 1.....	18
5. DISCUSSÃO.....	25
6. CONCLUSÃO.....	29
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30
8. ANEXO.....	37

RESUMO

O presente estudo analisou os efeitos da substância química fipronil, ingrediente ativo do Frontline® (acaricida e inseticida), nas glândulas salivares de fêmeas em jejum e semi-ingurgitadas de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus*. As fêmeas em jejum foram expostas apenas à concentração de 1ppm do composto e as semi-ingurgitadas foram expostas a três concentrações de 1ppm, 5ppm e 10ppm (foi utilizada água destilada como controle). Os resultados histológicos e histoquímicos revelaram ação significativa desse composto, alterando morfofisiologicamente o tecido glandular dos indivíduos em jejum e semi-ingurgitados. Nas fêmeas em jejum, verificaram-se mudanças morfológicas nos ácinos do tipo I, como aumento do tamanho e do diâmetro do seu lúmen. Estas mudanças, provavelmente, estejam relacionadas à função excretora, apontando para os ácinos I como sendo os responsáveis pela eliminação do sistema deste xenobiótico ao qual o parasita foi exposto. Naquelas semi-ingurgitadas, o composto não interferiu no processo de morte que, nestes indivíduos, é por meio de apoptose. Nas fêmeas semi, no entanto, o fipronil acelerou o processo de degeneração das glândulas salivares, que se intensificou (danos mais acentuados) à medida que aumentaram as concentrações do produto. Os dados aqui apresentados deixaram clara a interferência dessa substância no processo de ingurgitamento das fêmeas de *R. sanguineus*, o que conseqüentemente poderia refletir no seu processo reprodutivo, diminuindo ou mesmo cessando a postura de ovos e provocando menores perdas de sangue nos hospedeiros, reduzindo assim, a transmissão de patógenos veiculados por estas glândulas.

1. INTRODUÇÃO

Os Acari são constituídos pelos ácaros e carrapatos, com indivíduos variando de pequenos a microscópicos e apresentando cabeça, tórax e abdômen fundidos e não segmentado (RUPPERT et al., 2005).

Os carrapatos são classificados em duas famílias maiores: a Ixodidae e a Argasidae, sendo que a primeira caracteriza-se pela presença de peças bucais (hipostômio incluso) inseridas em uma depressão na borda anterior do corpo dos indivíduos, bem como pela presença de um escudo quitinoso, que nos machos recobre quase toda a superfície dorsal e, nas fêmeas, não vai além da metade ou do terço da área dorsal do corpo dos indivíduos não alimentados. A segunda família caracteriza-se pela ausência do escudo e pela presença das peças bucais localizadas na face inferior, o que explica o fato desses carrapatos consumirem menor quantidade de sangue quando comparados àqueles pertencentes à primeira família (WALKER, 1994; WALL; SHEARER, 1997).

Segundo estudos realizados por Harwood e James (1979), os carrapatos atuam como vetores de vírus, bactérias, rickettsias e protozoários, provocando doenças nos animais domésticos, silvestres, nas aves e no homem. Eles possuem elevada eficiência no seu sistema sensorial em detectar odor, vibração e mudanças de temperatura (SONENSHINE, 1991).

No processo de fixação do carrapato no seu hospedeiro, o hipostômio penetra lentamente na pele e a saliva atua na digestão dos tecidos ao redor do canal de penetração causando ruptura dos vasos capilares e linfáticos. Os carrapatos alimentam-se por sucção, alternada com a eliminação da saliva produzida pelas glândulas salivares. O ingurgitamento é lento no início do “fluxo” sanguíneo e acelerado no final, sendo que o maior volume de saliva é eliminado no final do processo (BALASHOV, 1972; RIBEIRO, 1987).

Alguns autores acreditam que as secreções salivares veiculam substâncias tóxicas, causadoras de uma variedade de distúrbios, incluindo paralisias graves e até mesmo fatais (ZUMPT e GLAJCHEN, 1950; NEITZ et al., 1969). Estudos de Sauer et al. (1999) afirmaram que a saliva teria em sua composição fármacos que inibiriam os mecanismos de defesa do hospedeiro, em resposta a fixação do carrapato. Essas substâncias seriam uma variedade de compostos anti-agregação de plaquetas, os quais evitariam a coagulação sanguínea. Jones et al. (1989), por sua vez, verificaram a presença de imunomoduladores na saliva de carrapatos,

de modo que patógenos, aí existentes, se tornariam mais infecciosos, aumentando a eficácia na transmissão de microrganismos patogênicos para os hospedeiros.

No aparelho bucal dos carrapatos adultos desemboca um par de glândulas salivares, contendo cerca de 1400 ácidos (WALKER et al., 1985). Várias descrições histológicas de glândulas salivares têm sido realizadas nas diferentes espécies de carrapatos ixodídeos (FURQUIM, 2007; FURQUIM et al., 2008), registrando três tipos de ácidos nas fêmeas e quatro nos machos (WALKER et al., 1985; FAWCET et al., 1986; COONS; ALBERTI, 1999).

Segundo a literatura, os ácidos do tipo I são agranulares e possuem função osmoregulatória, estando situados ao longo do ducto salivar principal, enquanto os demais (II, III, IV) contêm células granulares distribuídas ao longo de um sistema ramificado de ductos intralobulares e são responsáveis pela secreção de produtos relacionados com a fixação do carrapato ao hospedeiro (WALKER et al., 1985), com a digestão de tecidos (LAVOPIERRE; RIEK, 1955; WALKER et al., 1985), com a inibição dos mecanismos de defesa do hospedeiro como a coagulação sanguínea e com a reação inflamatória (NUTTAL; STRICKLAND, 1908; KÜNSBERG, 1911; PAWLOWSKY; CHODUKIN, 1929; WALKER et al., 1985; BOWMAN et al., 1997; RIBEIRO; MATHER, 1998; PAESEN et al., 1999). Os ácidos secretores têm a função de produzir substâncias que reduzem a defesa do hospedeiro (RIBEIRO et al., 1985), dentre elas, as quinases que catalisam a bradicinina, responsável em parte pela ausência da dor no hospedeiro (RIBEIRO, 1987).

Dentro da família Ixodidae, a espécie cosmopolita *Rhipicephalus sanguineus*, merece destaque. Os indivíduos que a compõem são popularmente conhecidos como “carrapatos do cão”, apresentando coloração marrom-avermelhada (FLECHTMANN, 1973).

Todos os vertebrados superiores estão sujeitos ao seu ataque, contudo o carrapato *R. sanguineus*, tem o cão como seu hospedeiro preferencial (WALKER, 1994), porém pode ainda ser encontrado em gatos e coelhos, e tem se tornado, hoje, uma das chamadas “pragas urbanas”. Além disso, dados da literatura têm demonstrado que ele pode atacar búfalos, camelos, bovinos, cabras, cavalos, ovelhas, morcegos, répteis e várias aves que freqüentam o solo (FLECHTMANN, 1973).

Apesar dessa diversidade, os cães são os únicos hospedeiros dos três estágios parasitários do carrapato (larva, ninfa e adulto), sendo assim um fator incondicional para o estabelecimento da população de *R. sanguineus* (SZABÓ et al., 1995).

Alguns dos métodos adotados para o controle de carrapatos em geral são: vacinas, sprays acaricidas (drogas que são utilizadas topicamente) (PETER; BROSSARD, 1998; BECHARA, 2003), uso de predadores naturais como a garça vaqueira *Egretta bis* (ALVES-BRANCO et al., 1983) e parasitas como bactérias *Escherichia coli*, *Cedecea lapagei* e *Enterobacter agglomerans* (LIPA, 1971; BRUM, 1988), controle biológico com o emprego de fungos entomopatogênicos como o *Metarhizium anisopliae* (BITTENCOURT et al., 1994; DA COSTA et al., 2002; GARCIA et al., 2005), o uso de feromônios (DEBRUYNE; GUERIN, 1994) e, no caso dos bovinos, a rotação de pastagens (LIPA, 1971). Também utiliza-se o controle climático (LIPA, 1971) e o cruzamento genético de diferentes raças de gado visando um aumento natural da resistência (PETER; BROSSARD, 1998).

Outros estudos têm abordado o controle imunológico, por meio da identificação, isolamento e síntese de antígenos que provoquem respostas imune, produção de anticorpos, processos estes que permitem o desenvolvimento de vacinas (TELLAM et al., 1992; WILLADSEN, 1997).

Entretanto, um dos métodos mais eficazes no controle de carrapatos ainda é o químico, visto que o imunológico e o biológico possuem função complementar. Contudo, o controle químico é dispendioso, devido ao alto custo com a aquisição de produtos, de instalações e de mão-de-obra adequada para a sua aplicação (PRUETT, 1999; NOLAN, 1985).

Uma das maiores preocupações quanto ao uso de princípios químicos no combate aos carrapatos é a contaminação da carne, do leite, do meio ambiente, como por exemplo, o solo e os rios por meio do descarte dos seus resíduos (NOLAN, 1985; PRUETT, 1999). Ainda que seja resolvido o problema da contaminação ambiental, um outro problema ainda persiste, ou seja, a seleção de populações de carrapatos resistentes aos diferentes compostos (CRAMPTON et al., 1999).

Hoje em dia, novos acaricidas estão sendo testados no mercado, entre eles aqueles que possuem as lactonas macrocíclicas como princípio ativo, que agem como bloqueadores da estimulação neural e o flurazuron e o fipronil (esse último, ingrediente ativo do acaricida Frontline[®]), que atuam como inibidores do desenvolvimento em animais domésticos (TAYLOR, 2001). Como são drogas relativamente novas no mercado, nenhum caso relevante de resistência foi ainda registrado (SABATINI et al., 2001), entretanto não se conhece bem todas as conseqüências de sua utilização (BAHIA, 1995).

O fipronil é uma droga que pertence ao grupo químico fenil pirazol formulada pela indústria química transnacional Rhône-Poulenc Agro (1987). Nos EUA, este produto é

encontrado sob diversas formas que variam desde iscas para controle de formigas até *sprays* para controle de carrapatos e de pulgas (Frontline[®]) (PENALIGGON, 1997; HUGNET et al., 1999; HIGGINS et al., 2001).

As pesquisas sobre a toxicidade do fipronil como aquela denominada Locustox concluíram que este agente químico seria relativamente tóxico aos invertebrados testados (insetos de solo) (TILLMAN; MULROONEY, 1997). Segundo esses autores, pesquisas realizadas no Senegal mostraram ainda que a toxicidade do fipronil em organismos não alvo é baixa. Em contrapartida, Soares e Busoli (2000) descreveram que esta droga apresentaria alta toxicidade em parasitóides, quando utilizada em agroecossistemas.

Experimentos com vertebrados mostraram que o fipronil seria uma droga rapidamente metabolizada por ratos e que seus resíduos ficariam acumulados nos tecidos, particularmente no adiposo, em níveis significativos mesmo após uma semana da sua administração (HUGNET et al., 1999). Com relação aos danos causados pelo fipronil à saúde humana (LYONS, 2000), experimentos com ratos de ambos os sexos mostraram um aumento significativo de células da tireóide, com conseqüente formação de tumores, portanto, apresentando alto potencial carcinogênico. Lyons (2000) descreveu que a exposição de fetos de animais ao fipronil por um determinado intervalo de tempo poderia causar sérios efeitos sobre o desenvolvimento desses indivíduos, e que, após o nascimento, seriam observadas seqüelas, como dificuldade de aprender, diminuição dos reflexos, esterilidade, além do aumento da susceptibilidade ao câncer e a outras doenças.

Por outro lado, experimentos realizados com artrópodes demonstraram que esse composto apresentaria ação neurotóxica. Segundo Rauh et al. (1990), Sattelle (1990) e Cole et al. (1993), o fipronil impediria a ligação do ácido gama aminobutírico (GABA), um neurotransmissor, aos seus receptores específicos, o que bloquearia a entrada de íons cálcio na célula, provocando a superexcitação, convulsão e paralisia do indivíduo.

Além disso, estudos recentes realizados por Oliveira et al. (2008 e 2009) demonstraram a susceptibilidade das células reprodutivas de fêmeas de *R. sanguineus* à diferentes concentrações de fipronil (1ppm, 5ppm e 10ppm), onde foi possível observar alterações na quantidade e no tamanho dos cinco tipos de ovócitos, bem como a ocorrência de desorganização celular, com presença de vacuolização citoplasmática. Tais alterações ocorreram de forma gradual, ou seja, à medida que a concentração de fipronil foi aumentada, o processo degenerativo foi mais acentuado.

O processo de degeneração natural do tecido glandular de fêmeas de *R. sanguineus* em diferentes estágios de ingurgitamento foi elucidado por Furquim et al. (2008).

Esse estudo indicou que a degeneração natural do tecido da glândula salivar ocorreria por apoptose atípica, exibindo características da apoptose clássica combinada com autofagia. Esse tipo de morte celular afetaria primeiramente os ácinos granulares, sendo que os do tipo III seriam os primeiros a serem comprometidos, e posteriormente os ácinos I (agranulares). Além disso, o processo degenerativo intensificar-se-ia à medida que o estágio de alimentação progredisse.

2. OBJETIVOS

Diante das informações acima expostas, considerando a grande utilização do fipronil, ingrediente ativo do acaricida Frontline[®] dentro da área veterinária, o pouco conhecimento da sua atuação nas células, suas potencialidades toxicológicas e quais seriam os mecanismos que as células utilizariam para reparar estes danos, o presente estudo teve como objetivo:

a) Submeter fêmeas adultas em jejum de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* à concentração de 1ppm de fipronil e submeter fêmeas adultas semi-ingurgitadas da mesma espécie às concentrações de 1ppm, 5ppm e 10 ppm de fipronil baseadas na DL₅₀ de 10ppm obtidas por meio de estudo piloto realizado por Oliveira et al. (2008), para que por meio da utilização de técnicas histológicas e histoquímicas fosse possível analisar os efeitos desta substância nas células das glândulas salivares.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Obtenção das Fêmeas de Carrapatos *Rhipicephalus sanguineus*

Para o presente estudo utilizou-se 90 indivíduos que foram distribuídos em: **Grupo 1 (controle)** – 15 fêmeas em jejum; **Grupo 2** – 15 fêmeas em jejum submetidas à concentração de 1ppm de fipronil ; **Grupo 3 (controle)** – 15 fêmeas semi-ingurgitadas; **Grupo 4** – 15 fêmeas semi-ingurgitadas submetidas à 1ppm de fipronil; **Grupo 5** – 15 fêmeas semi-ingurgitadas submetidas à 5 ppm de fipronil e **Grupo 6** – 15 fêmeas semi-ingurgitadas submetidas à 10 ppm de fipronil (**Tabela 1**).

Tabela 1: Distribuição das fêmeas em **jejum** e **semi-ingurgitadas** de *Rhipicephalus sanguineus* nos grupos controle e de tratamento.

GRUPO 1 (CONTROLE)	GRUPO 2	GRUPO 3 (CONTROLE)	GRUPO 4	GRUPO 5	GRUPO 6
- 15 fêmeas; - jejum ; - água destilada;	- 15 fêmeas; - jejum ; - 1ppm fipronil;	- 15 fêmeas; - semi- ingurgitadas ; - água destilada;	- 15 fêmeas; - semi- ingurgitadas ; - 1ppm fipronil;	- 15 fêmeas; - semi- ingurgitadas ; - 5ppm fipronil;	- 15 fêmeas; - semi- ingurgitadas ; - 10ppm fipronil;

As fêmeas em jejum foram obtidas a partir de colônia mantida em condições controladas (29° C, 80% de umidade e fotoperíodo de 12 h) em estufa BOD, enquanto que, para a obtenção das fêmeas semi-ingurgitadas, 50 casais de *R. sanguineus* em jejum foram utilizados em duas infestações (25 casais/infestação). Todo o procedimento de infestação foi realizado em hospedeiros (coelhos New Zealand White) virgens de infestação, segundo metodologia descrita por Bechara et al. (1995).

Para a realização dos experimentos foram utilizados os equipamentos disponíveis nas dependências do Laboratório de Histologia do Departamento de Biologia do I.B.-UNESP- Campus de Rio Claro, SP, Brasil.

3.2. Ensaio com Fipronil (n° CAS: 120068-37-3)

As concentrações de fipronil, ou (RS)-5-amino-1-(2,6-dichloro- α,α,α -trifluoro-p-tolyl)-4-trifluoro methylsulfinylpyrazole-3-carbonitrile, que foram utilizadas basearam-se na DL₅₀ de 10ppm determinada por Oliveira et al. (2008). As doses corresponderam a 10% da DL₅₀ (1ppm), 50% da DL₅₀ (5ppm) e a própria DL₅₀ (10ppm). Os grupos controle (1 e 3) foram expostos apenas ao placebo (água destilada).

As 90 fêmeas de *R. sanguineus*, após lavadas com água corrente em peneira, foram secas com papel absorvente macio. Em seguida, 60 delas (grupos 2, 4, 5 e 6) permaneceram imersas durante 3 minutos em placas de Petri contendo as diferentes concentrações de Fipronil. As 30 fêmeas dos grupos controle (1 e 3) foram imersas em água destilada por 3 minutos. Logo após, foram secas com papel absorvente e colocadas em incubadora durante 7 dias.

Então, todos os carrapatos foram anestesiados, por meio de choque térmico e dissecados, sob lupa, em placas de Petri contendo solução fisiológica (NaCl 7.5 g/L, Na₂HPO₄ 238 g/L e KH₂PO₄ 272 g/L) para a remoção das glândulas salivares.

Em seguida, as glândulas salivares das fêmeas dos grupos controle e de tratamento foram fixadas por 24 h em paraformaldeído 4%, desidratadas em álcool etílico, embebidas e incluídas em resina Leica. Posteriormente, o material foi seccionado em micrótomo e então as lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina e submetidas à técnica histoquímica do azul de bromofenol (PEARSE, 1985) para a detecção de proteínas. As glândulas salivares submetidas à técnica histoquímica do PAS (MCMANUS, 1946), para a detecção de polissacarídeos, foram fixadas em Bouin aquoso por 6 h e seccionadas em micrótomo. Posteriormente, as lâminas contendo as secções foram montadas com bálsamo do Canadá e examinadas e fotografadas em microscópio de luz MOTIC BA 300.

Para o seu desenvolvimento, este projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UNIARARAS/SP/Brasil e obteve o protocolo n°010/2009 com a devida aprovação (segue cópia em anexo).

4. RESULTADOS

Os resultados estão sendo apresentados sob a forma de capítulo que corresponde a um artigo publicado no Periódico Veterinary Parasitology.

Capítulo 1:

Título: Effects of fipronil (active ingredient of Frontline[®]) on salivary gland cells of *Rhipicephalus sanguineus* females (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae)

Autores: Carolina Parga Martins Pereira; Patrícia Rosa de Oliveira; Karim Christina Scopinho Furquim; Gervásio Henrique Bechara e Maria Izabel Camargo Mathias.

Periódico: Veterinary Parasitology

Situação: publicado on-line D.O.I: 10.1016/j.vetpar.2009.08.015

Contents lists available at [ScienceDirect](http://www.sciencedirect.com)

Veterinary Parasitology

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

Effects of fipronil (active ingredient of Frontline[®]) on salivary gland cells of *Rhipicephalus sanguineus* females (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae)

C.P.M. Pereira^a, P.R. Oliveira^a, K.C.S. Furquim^a, G.H. Bechara^b, M.I. Camargo-Mathias^{a,*}^a Departamento de Biologia – I.B. – UNESP, Av. 24 A, n° 1515 – Cx. Postal 199, CEP: 13506-900, Rio Claro, SP, Brazil^b Departamento de Patologia Veterinária – FCAV – UNESP, Via de Acesso Prof. Paulo Castellane, s/n – CEP: 14884-900, Jaboticabal, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 January 2009

Received in revised form 11 August 2009

Accepted 15 August 2009

Keywords:

Rhipicephalus sanguineus

Fipronil

Tick

Acaricide

Cytotoxic effect

Salivary gland

ABSTRACT

The present study analyzed the effects of the chemical compound fipronil, active ingredient of Frontline[®] (acaricide and insecticide), on the salivary glands of unfed and semi-engorged female *Rhipicephalus sanguineus* tick. Unfed females were only exposed to the concentration of 1 ppm of fipronil, while semi-engorged females were treated with fipronil in three concentrations: 1 ppm, 5 ppm, and 10 ppm (distilled water was used as control). The histological and histochemical results revealed significant changes caused by this compound in the morphology and physiology of the gland tissue of unfed and semi-engorged females. In unfed females, the morphological changes in type I acini were characterized by an increase in size and diameter of the lumen. These changes are probably associated with the excretory function, indicating that type I acini might be responsible for eliminating this xenobiotic from the system of the parasite. In semi-engorged females, fipronil did not interfere in the cell death, which in these individuals occurred by apoptosis. However, it accelerated salivary gland degeneration, as the extent of damage increased along with the concentrations of the product. Our results clearly showed that fipronil interferes with the process of engorgement in females that consequently is reflected in the reproductive process, decreasing or even halting egg laying, and resulting in less blood losses for the hosts and reducing the transmission of pathogens through these glands.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Ticks are considered the most important group among arthropods from a medical and veterinary perspective, as these are vectors of diseases that infest domestic and wild animals, as well as man (Sonenshine, 1991).

Among members of the family Ixodidae, *Rhipicephalus sanguineus*, the brown dog tick, is the main vector of several pathogens, such as the agents of canine babesiosis (Flechtmann, 1973); hepatozoonosis (O'dwyer and Mas-sard, 2001) and ehrlichiosis (Flechtmann, 1973); tularemia in humans, and possibly the transmission of the pathogen

of the visceral leishmaniosis (Blanc and Caminopetros, 1930; Coutinho et al., 2005).

In ticks, a pair of salivary glands opens onto the buccal apparatus and, in adults, contains approximately 1400 acini (Walker et al., 1985). Many histological studies have described the salivary glands of females of different ixodid ticks, reporting the presence of three types of acini: I, II, and III (Walker et al., 1985; Fawcett et al., 1986; Coons and Alberti, 1999). Type I acini are agranular, located along the common excretory salivary duct, and play an osmoregulatory role. Type II and III acini contain granular cells distributed along a system of intermediary ducts with branches and are responsible for the secretion of compounds that act in the: (a) attachment of the tick to the host (Walker et al., 1985), (b) digestion of tissues (Lavoipierre and Riek, 1955; Walker et al., 1985) and (c) inhibition of the defense mechanisms of the host (blood coagulation

* Corresponding author. Tel.: +55 19 35264135.

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

and inflammatory reaction) (Nuttall and Strickland, 1908; Künsberg, 1911; Pawlowsky and Chodukin, 1929; Walker et al., 1985; Bowman et al., 1997; Ribeiro and Mather, 1998; Paesen et al., 1999).

Currently, chemical control with acaricides is the most efficient method against ticks, because immunological and biological ones still play a supplemental role. New acaricides in the market are being tested, including those containing macrocyclic lactones as active ingredients that block interneuronal stimulation (flurazuron and fipronil, the later the active ingredient of Frontline[®]) and act as development inhibitors (Taylor, 2001). Fipronil is a phenylpyrazole compound and a component of Frontline, produced by the transnational corporation Rhône-Poulenc Agro in 1987 (Taylor, 2001). In the USA, fipronil is available in forms that varying from baits for ant to sprays for tick and flea controls (Penaliggon, 1997). However, little is known about the effects of this acaricide on the physiology of ectoparasites and their hosts.

Thus, since fipronil has been widely used in the control of ticks and results on its toxicity are still contradictory, the present study aimed at detecting possible alterations caused by this compound in the cells and the glandular tissue of ectoparasites, using histological and histochemical techniques in salivary glands of unfed and semi-engorged female ticks of *R. sanguineus* exposed to different concentrations of fipronil.

2. Material and methods

2.1. Female ticks of *R. sanguineus*

A total of 90 ticks were divided into: group 1 (control): 15 unfed females; group 2: 15 unfed females treated with 1 ppm of Fipronil; group 3 (control): 15 semi-engorged females (with 6 days of feeding in the host); group 4: 15 semi-engorged females treated with 1 ppm of Fipronil; group 5: 15 semi-engorged females treated with 5 ppm of Fipronil, and group 6: 15 semi-engorged females treated with 10 ppm of Fipronil. A complete description of all treatments is presented in Table 1.

Unfed females were obtained from a colony maintained under controlled conditions (29° C, 80% humidity and 12-h photoperiod) in BOD incubator. To obtain semi-engorged females, 50 unfed couples of *R. sanguineus* were used in 2 infestations (25 couples/infestation). The entire procedure of infestation was conducted in naive hosts (New Zealand White rabbits), according to the methods described by Bechara et al. (1995).

Experiments were conducted with equipment available at the facilities of the laboratories of Histology of the Biology Department of the I.B.- UNESP- Rio Claro Campus, São Paulo State, Brazil.

2.2. Assay with fipronil (#CAS: 120068-37-3)

The concentrations of fipronil, or (RS)-5-amino-1-(2,6-dichloro- α,α,α -trifluoro-p-tolyl)-4-trifluoro methylsulfinylpyrazole-3-carbonitrile, here tested are based on the LD₅₀ of 10 ppm determined by Oliveira et al. (2008). The doses correspond to 10% of the LD₅₀ (1 ppm), 50% of LD₅₀ (5 ppm), and LD₅₀ (10 ppm). The control groups (groups 1 and 3) were exposed only to placebo (distilled water).

The 90 females of *R. sanguineus* were washed with tap water in a colander and dried with soft absorbent paper. After this procedure, 60 females (groups 2, 4, 5, and 6) were immersed during 3 min in Petri dishes containing different concentrations of fipronil. The 30 females of the control group (1 and 3) were immersed in distilled water for 3 min. Ticks were then dried with absorbent paper and placed in the incubator for 7 days.

Upon the completion of treatment, all ticks were anesthetized by thermal shock and dissected under microscope in Petri dishes containing saline solution (NaCl 7.5 g/L, Na₂HPO₄ 238 g/L e KH₂PO₄ 272 g/L) to remove the salivary glands.

Salivary glands of females of the control and treatment groups were fixed with 4% paraformaldehyde for 24 h, dehydrated in ethyl alcohol, and embedded in Leica resin. Later the material was sectioned with microtome and slides containing sections were stained with hematoxylin and eosin, and prepared for the histochemical technique of bromophenol blue (Pearse, 1985) for detection of proteins. The salivary glands prepared for the histochemical technique PAS (Mcmanus, 1946), for detection of polysaccharides were fixed in aqueous Bouin for 6 h and sectioned with microtome glass. Slides with stained sections were mounted with Canada balsam, and examined and photographed with light microscope MOTIC BA 300.

3. Results

3.1. Unfed females (0.0321 g)

3.1.1. Group 1 (control)

The salivary glands of individuals of this group exhibit type I, II, and III acini with intact cells with their typical round shape. Type II acini are granular while type II and III are granular.

Type I acini are slightly more oval-shaped than the remaining acini and consist of a large central cell with an evident nucleus and many smaller and peripheral cells (Fig. 1A and C).

Types II and III acini are spherical, and type II acini are smaller than type III acini, which are composed of different types of secretory cells with several granules of various sizes in the cytoplasm (Fig. 1A–E).

Table 1

Distribution of unfed and semi-engorged females of *Rhipicephalus sanguineus* in the control and treatment groups.

Group 1 (control)	Group 2	Group 3 (control)	Group 4	Group 5	Group 6
15 females	15 females	15 females	15 females	15 females	15 females
Unfed	Unfed	Semi-engorged	Semi-engorged	Semi-engorged	Semi-engorged
Distilled water	1 ppm fipronil	Distilled water	1 ppm fipronil	5 ppm fipronil	10 ppm fipronil

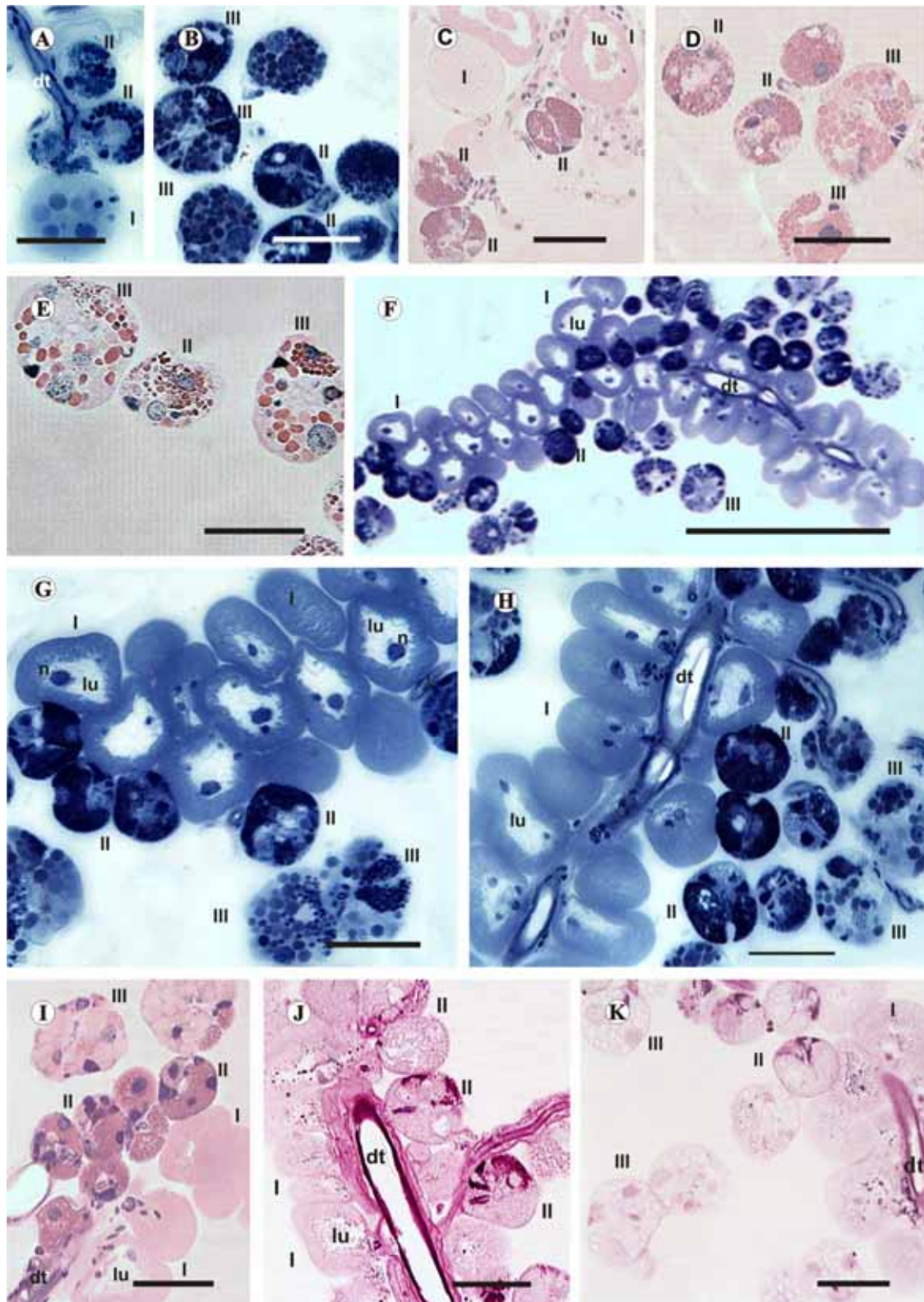


Fig. 1. Histological sections of salivary glands of unfed females of *Rhipicephalus sanguineus*. Control Group: (A) and (B) intact acini stained with bromophenol blue. Note in (A), the acini I (I) and II (II) and in B, the acini II (II) and III (III). (C)–(E) acini I (I), II (II) and III (III) stained with hematoxylin-eosin. Observe = (C), acini I (I) and II (II); (D) and (E), acini II (II) and III (III). (F)–(K). Group treated with 1 ppm of fipronil. (F)–(H) = acini I (I), II (II) and III (III) stained with bromophenol blue. Note the acini I (I) with dilated lumen (lu). I = acini I (I), II (II) and III (III) stained with hematoxylin-eosin. Observe in I, acini I (I) with dilated lumen (lu). (J) and

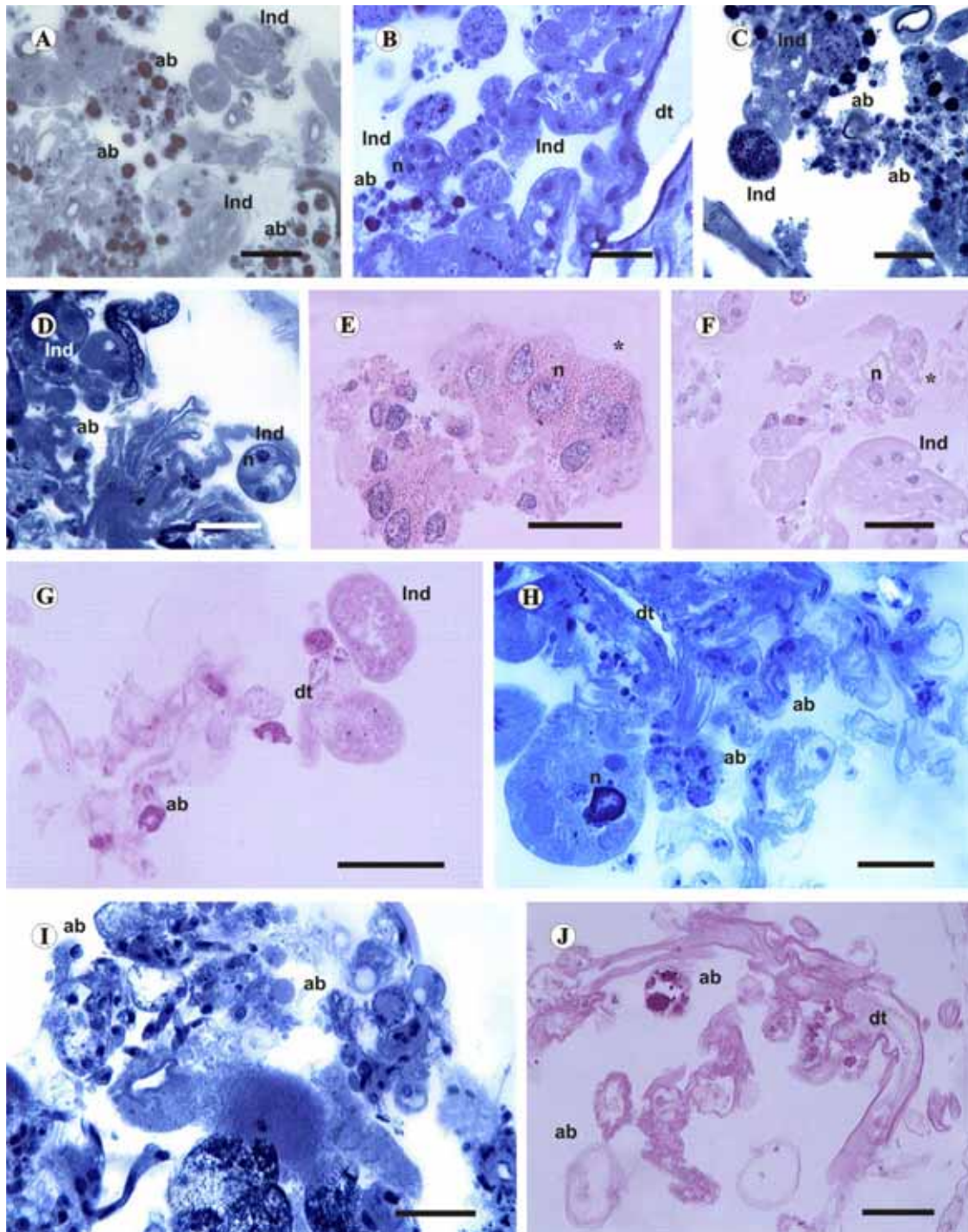


Fig. 2. Histological sections of salivary glands of semi-engorged females of *Rhipicephalus sanguineus*. (A)–(G). Control Group. (A)–(D) = degenerated acini stained with bromophenol blue. Note in A, apoptotic bodies (ab) and Indeterminate acini (Ind). (E) and (F) = Indeterminate acinus (Ind) in fragmentation process (*) stained with hematoxylin-eosin. (G) = Indeterminate acinus (Ind) and apoptotic bodies (ab) reacted by PAS. (H)–(J). Group treated with 1 ppm of fipronil. (H)–(I) = apoptotic bodies (ab) stained with bromophenol blue. (J) = apoptotic bodies (ab) reacted by PAS. dt = duct; n = nucleus; * acini in fragmentation process. Bars: A–J = 5 μ m. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

(K) = acini I (I), II (II) and III (III) reacted by PAS. In J, the acini I (I) show dilated lumen (lu). dt = duct; n = acini I cell nuclei. Bars: (A)–(E) and (G)–(K) = 5 μ m; (F) = 25 μ m. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

3.1.2. Group 2 (1 ppm)

Individuals exposed to the concentration of 1 ppm of fipronil exhibit salivary glands with few morphological alterations compared to those of individuals of group 1.

Altered acini are those of type I that now have an increased lumen; the morphology of granular acini (II and III) remains similar to those of the previous group (Fig. 1F–K).

3.2. Semi-engorged females (0.1462 g)

3.2.1. Group 3 (control)

The histological and histochemical techniques used revealed that the tissue is disorganized with characteristics of degeneration, due to the feeding stage, as the process of gland degeneration naturally occurs as the feeding period comes to an end. Thus, the identification of the observed acini is difficult, and are termed as **undetermined** or indeterminate acini.

Confirming the degeneration process, several apoptotic bodies are observed, as a result of the fragmentation of acini (Fig. 2A–G).

3.2.2. Group 4 (1 ppm)

The salivary glands of individuals treated with this concentration of fipronil exhibited several histological alterations compared to the normal specimens observed in individuals of group 3.

The degeneration process is clearly more advanced, and only a few irregular shaped and disorganized acini with cells exhibiting intense vacuolation remain. In addition, a mass composed of cell remnants and parts of the duct system are observed (Fig. 2H–J).

3.2.3. Group 5 (5 ppm)

In this group, salivary glands exhibit even more prominent histological changes compared to those of individuals of the previous group.

The few acini observed are still round-shaped, surrounded by many apoptotic bodies. Although the shape of acini is remains intact, inside, an extensive cytoplasmic vacuolation is observed.

In addition, several acini are ruptured, releasing their contents, including secretion, directly into the body cavity of the tick (Fig. 3A and B).

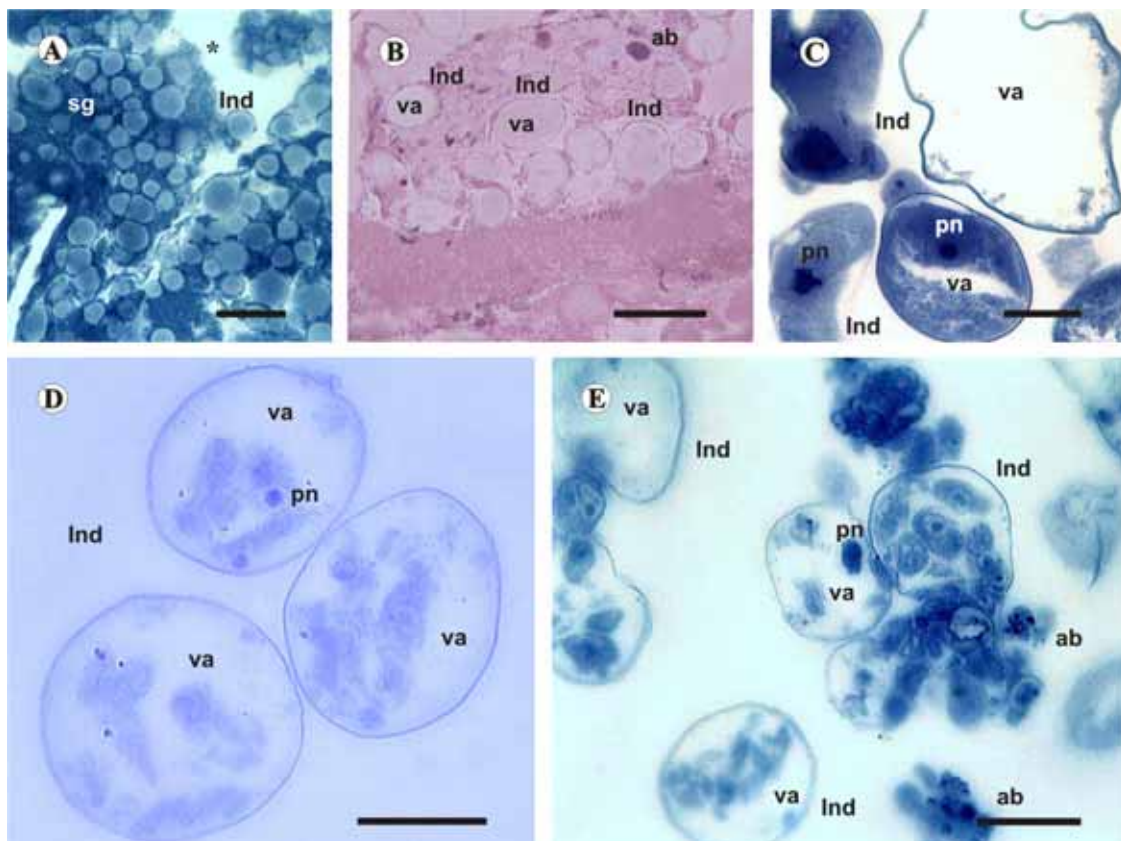


Fig. 3. Histological sections of salivary glands of semi-engorged females of *Rhipicephalus sanguineus*. (A) and (B). Group treated with 5 ppm of fipronil. (A) = Indeterminate acini (Ind) in fragmentation process (*) stained with bromophenol blue. (B) Indeterminate acini (Ind) and apoptotic bodies (ab) reacted by PAS. (C)–(E). Group treated with 10 ppm of fipronil. Indeterminate acini (Ind) stained with bromophenol blue. sg = glandular secretion; va = vacuole; pn = picnotic nuclei of indeterminate acinus. Bars: A–E = 5 μ m. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

3.2.4. Group 6 (10 ppm)

The histological changes observed in the salivary glands of these individuals are the most severe among treatments.

Few glandular acini exhibiting intense vacuolation remain. The boundaries of these acini are intact, although the boundaries of cells are no longer visible.

Inside acini, picnotic and/or fragmented nuclei are observed.

In individuals of this group, a larger amount of apoptotic bodies is observed compared to those of individuals of previous groups (Fig. 3C–E).

4. Discussion

The present study revealed severe changes undergone by salivary glands of unfed and semi-engorged females (six days of feeding) of the tick *R. sanguineus* treated with different concentrations of fipronil (active ingredient of Frontline[®] acaricide). The choice of phase of this period justify by the full activity of the ovary and salivary glands. This work showed through histological and histochemical techniques that fipronil does not modify the nature of the gland secretion or the type of cell death, rather it interferes in the morpho-physiology of the acinus, as well as accelerates the process of gland degeneration.

Thus, the effects of fipronil on individuals of group 2 (unfed females treated with 1 ppm) were strictly observed in type I acini. The changes observed were characterized by alterations in the size and shape of acinus, and mainly an increase of the lumen. However, no changes were observed in types II and III acini.

Little is known about the actual role of type I acini in ticks. The available information in the literature is scarce and contradictory. Some authors report a possible role in the water balance of unfed ticks (Binnigton, 1978; Walker et al., 1985), while others suggest that type I acini might be involved in osmoregulation (excretory function) (Balashov, 1972; Coons and Roshdy, 1973), similarly to type III acini during the rapid engorgement of the ectoparasite (Kaufman and Sauer, 1982; Fawcett et al., 1986; Sonenshine, 1991).

The results obtained in the present study showing the morphological changes observed in type I acini, as well as in their cells, suggest that these structures might be involved in the elimination of fipronil, toxic substance to the tick, present in the circulating hemolymph that needs to be eliminated from the system. Thus, the increase in lumen diameter suggests a role in osmoregulation of type I acini, via salivation, thus removing the toxic compound from the hemolymph.

According to the literature, type III acini could also play a role in osmoregulation. In this study, this probably did not occur in unfed females since: (1) the diameter of the lumen remained unchanged, (2) cells **d** and **e** were filled with secretion, suggesting that it would be released only when ticks attached to the host (cement cone formation) (Binnigton, 1978; Walker et al., 1985; Gill and Walker, 1987) and (3) cells presented a pyramidal shape (secretory), a characteristic that is usually lost when type III acini have an osmoregulatory role, (in this case, they instead would exhibit dilated lumen, squamous cells, and little secretion) (Binnigton, 1978).

In semi-engorged females, the results clearly showed that individuals of group 3 (control) were undergoing the final stages of the feeding process. These stages were characterized by disorganization of the gland tissue where the different types of acini could no longer be identified and were termed **undetermined**, in addition to large amounts of apoptotic bodies. This supports the reported by Furquim et al. (2008), which described that the salivary glands of *R. sanguineus* females have a well-defined secretory cycle, marked by a phase of secretion production and released, followed by the degeneration of the gland characterized by the presence of **undetermined** acini and apoptotic bodies.

The salivary glands of females of group 4, treated with the concentration of 1 ppm, exhibited several alterations compared to those of individuals of group 3, thus showing considerable damage caused by fipronil in the gland tissue. The damage became more extensive as the concentrations of fipronil increased, culminating in the glands of individuals treated with fipronil at a concentration of 10 ppm. These data corroborate those reported by Oliveira et al. (2008) that examined the ovary of females of this species exposed to the same concentrations of fipronil and also observed a gradual increase in cell changes proportional to the concentration increase of this compound.

The gland tissue of individuals of groups 3, 4, 5, and 6 underwent degenerative changes, which occurred naturally in group 3 and were caused by fipronil in groups 4, 5, and 6. In addition to disorganization of the tissue, the presence of several apoptotic bodies, considered one of the main indicators of apoptotic death, were observed (Kerr et al., 1995; Häcker, 2000). These data corroborate those reported by Furquim et al. (2008) that examined the salivary glands of this tick and observed that apoptosis is the type of death that occurs during the natural degeneration of salivary glands of *R. sanguineus* females.

Also, in the acinar cells of the glands of the individuals of these groups, intense vacuolation of the cytoplasm was observed, which characterizes autophagic cell death in degenerative processes (Clarke, 1990; Bowen, 1993; Zakeri et al., 1995). The data reported in this study, as well as those obtained by Furquim et al. (2008), in *R. sanguineus* females, do not characterize the occurrence of two types of cell death during the degeneration process of the gland, rather an atypical apoptotic death, where fragmentation (apoptosis) and vacuolation (autophagy) are involved.

In females of groups 4–6, this paper show clearly that regardless of the concentration of fipronil, the salivary glands underwent apoptosis, although in increasing intensity, showing that fipronil accelerates the apoptotic process.

Reports on the use of fipronil are abundant in the literature and have revealed that it is a compound widely used in the control of ectoparasites (Penaliggon, 1997), with neurotoxic effects (Rauh et al., 1990; Sattelle, 1990; Cole et al., 1993). Recent studies on the ovaries of *R. sanguineus* treated with the same concentrations of fipronil described in the present study demonstrated that this compound, in addition to a neurotoxic action, also affects the reproductive cycle of females, interfering in the: (a) size and shape of oocytes, (b) constitution of oocytes

(vacuolation), (c) rupture of yolk granules, and (d) rupture of the membrane of the oocyte, thus making these germ cells inviable (Oliveira et al., 2008).

The present study revealed that fipronil, besides affect the nervous system and the ovaries, accelerates gland degeneration, preventing females from finishing the feeding process, which is reflected in the reproductive process and decrease or even halt egg laying (Bowman and Sauer, 2004). Early gland degeneration probably results in less blood losses for the hosts and reduces the transmission of pathogens through these parasites.

In conclusion, the results described in this report supplement the studies performed by Oliveira et al. (2008), clearly showing that fipronil acts in the feeding process, as well as the in the reproduction of the ectoparasite. Whether it acts independently in both systems or only on salivary glands and indirectly on ovaries (organs dependent on the feeding process through salivary glands) remains to be answered.

Acknowledgments

This research has been supported by FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), Grants n° 05/59208-3, 07/58633-8 and 07/59020-0, and CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), Grant n° 308733/2006-1. The authors thank Gerson Mello Souza for the technical support. Part of this work has been facilitated through the Integrated Consortium on Ticks and Tick-Borne Diseases (ICTD-3) supported by the European Union under contract number 510561-INCO.

References

- Balashov, Yu. S., 1972. Bloodsucking ticks (Ixodoidea)- vectors of diseases of man and animals, vol. 8. Miscellaneous Publications of the Entomological Society of America, Lanham, pp. 161–376.
- Bechara, G.H., Szabó, M.P.J., Ferreira, B.R., Garcia, M.V., 1995. *Rhipicephalus sanguineus* tick in Brazil: feeding and reproductive aspects under laboratorial conditions, Brazil. *J. Vet. Parasitol.* 4, 61–66.
- Binnigton, K.C., 1978. Sequential Changes in Salivary Gland Structure During Attachment and Feeding of the Cattle Tick *Boophilus microplus*, vol. 8. International Journal for Parasitology, Oxford, pp. 97–115.
- Blanc, G., Caminopetros, J., 1930. La transmission du Kala-Azar méditerranéen en par une tique: *Rhipicephalus sanguineus*. *C. R. Acad. Sci.* 191, 1162–1164.
- Bowen, I.D., Morgan, S.M., Mullarkey, K., 1993. Cell death in the salivary glands of metamorphosing *Calliphora vomitoria*. *Cell Biol. Int.* 17 (1), 13–34.
- Bowman, A.S., Coons, L.B., Needham, G.R., Sauer, J.R., 1997. Tick saliva: recent advances and implications for vector competence. *Med. Vet. Entomol.* 11, 277–285.
- Bowman, A.S., Sauer, J.R., 2004. Tick salivary glands: function, physiology and future. *Parasitology* 129, S67–S81.
- Clarke, P.G.H., 1990. Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anatomy Embryol.* 181, 195–213.
- Cole, L.M., Nicholso, R.A., Casida, J.E., 1993. Action of phenylpyrazole insecticides at the GABA-gated chloride channel. *Pestic. Biochem. Physiol.* 46, 47–54.
- Coons, L.B., Alberti, G., 1999. The Acari-ticks. In: Harrison, F.W., Foelix, R. (Eds.), *Microscopic Anatomy of Invertebrates. Chelicerate Arthropoda*, vol. 8B. Wiley-Liss, New York, pp. 267–514.
- Coons, L.B., Roshdy, M., 1973. Fine structure of the salivary glands of unfed *Dermacentor variabilis*. *J. Parasitol.* 59, 900–912.
- Coutinho, M.T., Bueno, L.L., Sterzik, A., Fujiwara, R.T., Botelho, J.R., De Maria, M., Genaro, O., Linardi, P.M., 2005. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. *Vet. Parasitol.* 128, 149–155.
- Fawcett, D.W., Binnigton, K., Voigt, W.P., 1986. The cell biology of the ixodid tick salivary gland. In: Sauer, J.R., Hairf J.A. (Eds.), *Morphology, Biology and Behavioral Biology of ticks*. Ellis Horwood Ltd., Chichester, England, pp. 22–45.
- Flechtmann, C.H.W., 1973. *Ácaros de importância médico-veterinária*. Livraria Nobel S.A., São Paulo, p. 180.
- Furquim, K.C.S., Bechara, G.H., Camargo-Mathias, M.I., 2008. Death by apoptosis in salivary glands of females of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). *Exp. Parasitol.* 119, 152–163.
- Gill, H.S.; Walker, A.R., 1987. The salivary glands of *Hyalomma anatolicum anatolicum*: nature of salivary gland components and their role in tick attachment and feeding. *Int. J. Parasitol.* Oxford. 18, 1, 83–93.
- Häcker, G., 2000. The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res.* 301, 5–17.
- Kaufman, W.R., Sauer, J.R., 1982. Ion and water balance in feeding ticks: mechanism of tick excretion. In: Obenchain, F.D., Galun, R. (Eds.), *Physiology of Ticks*. Pergamon Press, Oxford, pp. 213–243.
- Kerr, J.F.R., Gobé, G.C., Winterford, C.M., Harmon, B., 1995. Anatomical methods in cell death. In: Schwartz, L.M., Osborne, B.A. (Eds.), *Cell Death*. Academic Press, San Diego, pp. 1–27.
- Künsberg, K.V., 1911. Eine Anticoagulindrüse bei Zecken. *Zool. Anz.* 38, 263–268.
- Lavoipierre, M.M.J., Riek, R.F., 1955. Observations on the feeding habits of argasid ticks and effect of their bites on laboratory animals, together with a note on the production of coxal fluid by several of the species studied. *Ann. Trop. Med. Parasit.* 49, 96–113.
- Mcmanus, J.F.A., 1946. Histological Demonstration of Mucin after Periodic Acid, vol. 158. Nature, London, p. 202.
- Nuttall, G.H.F., Strickland, C., 1908. On the presence of an anticoagulin in the salivary glands and intestines of *Argas persicus*. *Parasitology* 1, 300–310.
- O'dwyer, L.H., Massard, C.L., 2001. Aspectos gerais da hepatozoonose canina. *Clin. Vet.* 31, 34–40.
- Oliveira, P.R., Bechara, G.H., Camargo-Mathias, M.I., 2008. Evaluation of cytotoxic effects of fipronil on ovaries of semi-engorged *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) tick female. *Food Chem. Toxicol.* 46, 2459–2465.
- Paesen, G.C., Adams, P.L., Harlos, K., Nuttall, P.A., Stuart, D.I., 1999. Tick histamine-binding proteins: isolation, cloning and three-dimensional structure. *Mol. Cell* 3, 661–671.
- Pawlowsky, E.N., Chodukin, N.J., 1929. Ueber die Antikoaguline und andere wirksame Bestandteile der Zecke *Ornithodoros papillipes*. *Bir. Z. Parasitenk.* 2, 90–96.
- Pearse, A.G.E., 1985. *Histochemistry theoretical and applied*. Churchill Livingstone, 2nd ed., 449 p.
- Penaliggon, J., 1997. Getting to grips with fleas on pet dogs and cats. *Pestic. Outlook* 8, 19–23.
- Rauh, J.J., Lummis, S.C., Sattelle, D.B., 1990. Pharmacological and biochemical properties of insect GABA receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 8, 325–329.
- Ribeiro, J.M.C., Mather, T.N., 1998. *Ixodes scapularis*: salivary kininase activity is a metallo-dipeptidyl carboxypeptidase. *Exp. Parasitol.* 89, 213–221.
- Sattelle, D.B., 1990. GABA receptors of insects. *Adv. Insect Physiol.* 22, 1–113.
- Sonenshine, D.E., 1991. The female reproductive system. In: Sonenshine, D.E. (Ed.), *Biology of Ticks*. Oxford University Press, New York, pp. 280–304.
- Taylor, M.A., 2001. Recent developments in ectoparasiticides. *Vet. J.* 161, 253–268.
- Walker, A., Fletcher, J.D., Gill, H.S., 1985. Structural and histochemical changes in the salivary glands of *Rhipicephalus appendiculatus* during feeding. *Int. J. Parasitol.* 15 (1), 81–100.
- Zakeri, Z., Bursch, W., Tenniswood, M., Lockshin, R.A., 1995. Cell death: programmed, apoptosis, necrosis, or other? *Cell Death Differentiation* 2, 87–96.

5. DISCUSSÃO

O presente estudo revelou, por meio de análises histológicas e histoquímicas, as severas alterações que ocorrem nas glândulas salivares de fêmeas em jejum e semi-ingurgitadas de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* quando submetidas a diferentes concentrações de Fipronil (ingrediente ativo do Frontline®). Além disso, este trabalho mostrou que o fipronil não modifica a natureza da secreção glandular nem a forma das células morrerem, mas sim interfere na morfo-fisiologia acinar, bem como acelera o processo de degeneração glandular.

Neste sentido os indivíduos do **grupo 2** (fêmeas em jejum submetidas a 1ppm), sofreram a ação deste composto estritamente nos ácinos glandulares do tipo I, sendo as modificações observadas relacionadas ao tamanho do ácino, seu formato e principalmente ao aumento do lúmen, não sendo, no entanto, observadas modificações nos dos tipos II e III.

Pouco se conhece sobre a real função dos ácinos do tipo I dos carrapatos, sendo que as informações presentes na literatura, além de escassas, são contraditórias. Alguns autores relataram uma possível atuação no balanço hídrico do carrapato no período de jejum (BINNINGTON, 1978; WALKER et al., 1985), enquanto outros afirmaram que os ácinos tipo I poderiam estar envolvidos com a osmorregulação (função excretora) (BALASHOV, 1972; COONS; ROSHDY, 1973), assim como agem os do tipo III na fase de rápido ingurgitamento do ectoparasita (KAUFMAN; SAUER, 1982; FAWCETT et al., 1986; SONENSHINE, 1991).

Os dados obtidos no presente trabalho, mostrando as mudanças morfológicas observadas nos ácinos do tipo I, bem como nas suas células, permitiram sugerir que estas estruturas possivelmente estivessem agindo na eliminação do fipronil, substância tóxica ao carrapato e que encontrando-se disponível na hemolinfa circulante, deveria ser eliminada do sistema. Dessa forma, confirmar-se-ia a função dos ácinos I de agentes osmorreguladores, ou seja, os mesmos estariam, via salivação, retirando o composto tóxico da hemolinfa, hipótese esta comprovada pela observação do aumento do diâmetro do lúmen.

Ainda nestas fêmeas do **grupo 2** houve aumento e modificação da forma dos ácinos I quando comparados àqueles dos indivíduos do **grupo 1**, deformidade esta que provavelmente foi provocada também pelo aumento do seu lúmen.

Segundo os dados da literatura para a função dos ácinos do tipo III sugeriu-se inclusive um envolvimento destes com a osmorregulação. Nas fêmeas em jejum aqui estudadas, isto não ocorreu, visto que: a) o diâmetro do lúmen do ácino permaneceu inalterado, b) as células **d** e **e** estavam repletas de secreção, indicando que a mesma seria eliminada somente no momento em que o carrapato se fixasse ao hospedeiro (formação do cone de cimento) (BINNINGTON, 1978; WALKER et al., 1985; GILL; WALKER, 1987) e c) suas células apresentaram forma piramidal (secretora), característica esta que seria perdida no momento em que o ácino III assumisse a função osmorreguladora (apresentaria então: lúmen dilatado, células escamosas e pouca secreção) (BINNINGTON, 1978).

Nas fêmeas na condição alimentar de semi-ingurgitadas ficou claro neste estudo que os indivíduos do **grupo 3** (controle) estavam em estágios finais do processo de alimentação, devido à desorganização do seu tecido glandular, e onde não foi mais possível distinguir os diferentes tipos de ácinos, que por isto foram aqui denominados de **Indeterminados**, somando-se a isso o grande número de corpos apoptóticos visualizados. Tal fato vem corroborar as informações de Furquim et al. (2008) que relataram que as glândulas salivares de fêmeas de *R. sanguineus* apresentariam ciclo secretor bem definido, marcado por uma fase de produção e outra de liberação de secreção, seguida posteriormente da degeneração do órgão, a qual seria caracterizada pela presença de ácinos **Indeterminados** e de corpos apoptóticos.

As glândulas salivares das fêmeas do **grupo 4**, estas submetidas à concentração de 1ppm, apresentaram severas alterações em relação àquelas dos indivíduos do **grupo 3**, demonstrando assim, significativos danos provocados pelo fipronil no tecido glandular, danos estes que se intensificaram, culminando nas glândulas dos indivíduos submetidos à 10 ppm. Esses dados corroboram aqueles de Oliveira et al. (2008), que estudando ovários de fêmeas da mesma espécie submetidas às mesmas concentrações de fipronil também verificaram um aumento gradual das alterações celulares proporcionais ao aumento de concentração do composto químico.

O tecido glandular dos indivíduos dos **grupos 3, 4, 5 e 6** que sofreram alterações degenerativas, os do **grupo 3** naturalmente e os dos **grupos 4, 5 e 6** por ação do fipronil, apresentaram além da desorganização do tecido, a presença de muitos corpos apoptóticos, estes considerados como um dos principais indicadores da ocorrência de morte por apoptose (KERR et al., 1995; HÄCKER, 2000). Estes dados corroboraram aqueles de Furquim et al. (2008) que estudaram as glândulas salivares da mesma espécie de carrapato e estabeleceram

que a apoptose seria o tipo de morte que ocorreria durante a degeneração natural das glândulas salivares de fêmeas de *R. sanguineus*.

Além disso, nas células dos ácinos das glândulas dos indivíduos destes mesmos grupos também observou-se ocorrência de intensa vacuolização citoplasmática, característica que, em processos degenerativos definem a morte celular autofágica (CLARKE, 1990; BOWEN, 1993; ZAKERI et al., 1995). Estes dados aqui descritos, assim como aqueles relatados por Furquim et al. (2008), em fêmeas de *R. sanguineus*, não caracterizariam a ocorrência de dois tipos de morte celular durante o processo degenerativo glandular, mas sim a ocorrência de morte apoptótica atípica, onde estariam envolvidos eventos de fragmentação (apoptose) e de vacuolização (autofagia).

Ainda nestas fêmeas dos **grupos 4, 5 e 6**, o presente trabalho deixou claro que, independente da concentração do composto fipronil, as glândulas salivares sempre sofreram apoptose embora em intensidade crescente, mostrando dessa forma que o fipronil acelera de fato o processo apoptótico.

Relatos sobre a utilização do fipronil são abundantes na literatura e revelam que ele é um composto amplamente utilizado no controle também de ectoparasitas (PENALIGGON, 1997), com ação neurotóxica (RAUH et al., 1990; SATTELLE, 1990; COLE et al., 1993). Estudos recentes com ovários de *R. sanguineus* submetidos as mesmas concentrações de fipronil aqui descritas demonstraram que o mesmo, além da ação neurotóxica relatada, age também no ciclo reprodutivo destas fêmeas, interferindo: a) no tamanho e na forma dos ovócitos, b) na constituição dos ovócitos (vacuolização), c) no rompimento dos grânulos de vitelo e d) no rompimento da membrana do ovócito, tudo isso culminando na inviabilização destas células germinativas (OLIVEIRA et al., 2008).

Diante das informações acima colocadas, o presente estudo estabeleceu que o composto fipronil acelera a degeneração glandular, impossibilitando as fêmeas de concluírem o processo alimentar, o que refletiu no processo reprodutivo, diminuindo ou mesmo cessando a postura de ovos (BOWMAN; SAUER, 2004). Além disso, a ocorrência precoce da degeneração glandular provocaria menores perdas de sangue nos hospedeiros e reduziria a transmissão de biopatógenos veiculados por estas glândulas.

Concluindo, os dados aqui apresentados tornam-se de extrema importância, visto que complementam o trabalho desenvolvido por Oliveira et al. (2008), deixando claro que o composto age também no processo alimentar, além de agir no reprodutivo do ectoparasita. Se atua independentemente em ambos os sistemas ou se atua apenas nas glândulas salivares

promovendo indiretamente alterações nos ovários (órgãos dependentes do processo alimentar via glândula salivar), fica ainda por ser estabelecido.

CONCLUSÕES

1. Os ácinos glandulares do tipo I das fêmeas em jejum de *R. sanguineus* submetidas a 1ppm de fipronil sofreram alterações relacionadas ao tamanho do ácino, seu formato e ao aumento do lúmen. Estas mudanças morfológicas confirmam a função do ácino I de agentes osmorreguladores.

2. As glândulas salivares das fêmeas de *R. sanguineus* na condição alimentar de semi-ingurgitamento encontram-se em estágio final do processo de alimentação, que é caracterizada pela degeneração natural do órgão. Esta, por sua vez, é determinada pela desorganização do tecido, pela presença de corpos apoptóticos e pela presença de ácinos **Indeterminados**.

3. O composto químico fipronil não altera a natureza da secreção glandular e nem modifica o tipo de morte celular no processo de degeneração natural das glândulas salivares de fêmeas semi-ingurgitadas de *R. sanguineus*.

4. O aumento gradual das alterações celulares das glândulas salivares de fêmeas semi-ingurgitadas, provocadas pela ação do fipronil, é proporcional ao aumento da concentração do produto.

5. O processo degenerativo glandular das fêmeas semi-ingurgitadas de *R. sanguineus* é caracterizado pela ocorrência de morte celular atípica, onde estão envolvidos eventos de fragmentação (apoptose) e de vacuolização (autofagia), não pela ocorrência de dois tipos de morte celular.

6. A aceleração do processo de degeneração celular das glândulas salivares, por meio da ação do fipronil, impossibilita a finalização do processo alimentar de *R. sanguineus*, provocando menores perdas de sangue nos hospedeiros e reduzindo a transmissão de patógenos.

7. O término precoce do processo alimentar de fêmeas de *R. sanguineus* compromete a reprodução, promovendo a redução ou mesmo a interrupção da postura de ovos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES-BRANCO, F.P.; ECHEVARRIA, F.A.M.; SIQUEIRA, A.S. Garça vaqueira *Egretta íbis* e o controle biológico do carrapato *Boophilus microplus*. **Comunicado Técnico da EMBRAPA**, v.1, p.1-4, 1983.

BAHIA. **Manual de Normas e Procedimentos Técnicos Para Vigilância da Saúde do Trabalhador**. Secretaria da Saúde do Estado da Bahia. Departamento de Vigilância da Saúde. Centro de Estudos da Saúde do Trabalhador. Bahia, p.20-31, 1995.

BALASHOV, Y. S. A translation of bloodsucking ticks (Ixodidae) vectors of diseases of man and animals. **Miscellaneous Publications of the Entomological Society of America** v. 8, p.159-376, 1972.

BALASHOV, Y. S. **An Atlas of Ixodid Tick Ultrastructure**. In: RAKHEL, A. S.; HOOGSTRAAL, I. I. (ed). Entomological Society of America (Special Publication), ed: Lanham. 1983. 289p.

BECHARA, G.H. Carrapatos prejudicam carne. **Jornal da UNESP**, São Paulo, n.175, p. 5. 2003.

BECHARA, G. H.; SZABÓ, M. P. J.; FERREIRA, B. R.; GARCIA, M.V. *Rhipicephalus sanguineus* tick in Brazil: feeding and reproductive aspects under laboratorial conditions. Brazil. **J. Vet. Parasitol.** v. 4, p. 61-66. 1995.

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

BITTENCOURT, V.R.E.P.; MASSARD,C.L.; LIMA, A.F. Ação do fungo *Metarhizium anisopliae* em ovos e larvas do carrapato *Boophilus microplus*. **Rev. Univ. Rur., Ser. Ciên. Vida**, v.16, n 1-2, p.41-47. 1994.

BOWEN, I. D.; MORGAN, S. M.; MULLARKEY, K. Cell death in the salivary glands of metamorphosing *Calliphora vomitoria*. **Cell Biology International**, v. 17, n.1, p. 13-34. 1993.

BOWMAN, A.S.; COONS, L.B.; NEEDHAM, G.R.; SAUER, J.R. Tick saliva: recent advances and implications for vector competence. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 11, p. 277-285. 1997.

BOWMAN, A. S.; SAUER, J. R. Tick salivary glands: function, physiology and future. **Parasitology**, v.129, p. S67-S81. 2004.

BRUM, J.G.W. **Infecção em teleóginas de *Boophilus microplus* (Acari:Ixodidae) por *Cedecea lapagei***. Tese (Doutor em Ciências). Instituto de Biologia. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, R.J., 1988. 200f.

CLARKE, P.G.H. Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. **Anatomy and Embryology**, v. 181, p. 195-213. 1990.

COLE, L.M.; NICHOLSON, R.A.; CASIDA, J.E. Action of phenylpyrazole insecticides at the GABA-gated chloride channel. **Pestic. Biochem. Physiol.**, v. 46, p. 47-54. 1993.

COONS, L.B.; ALBERTI, G. The Acari-ticks. In: F.W. HARRISON & R. FOELIX (Eds). **Microscopic Anatomy of Invertebrates**. Chelicerate Arthropoda. Wiley-Liss, New York, v.8B, p.267-514. 1999.

COONS, L. B.; L'AMOUREAUX, W. J. Developmental changes in the salivary glands of male and female *Dermacentor variabilis* (Say) during feeding. In: BOROVSKY, D.; SPIELMAN, A. (ed). **Host Regulated Delevopmental Mechanisms in Vector Arthropods**, v. 2, University of Florida- IFAS, Vero Beach, p. 86-92. 1986.

COONS, L.B.; ROSHDY, M. Fine structure of the salivary glands of unfed *Dermacentor variabilis*. **Journal of Parasitology**, v. 59, p. 900-912. 1973.

CRAMPTON, A.L.; BAXTER, G.D.; BARKER, S.C. Identification and characterization of a cytochrome P450 gene and processed pseudogene from an arachnid: the cattle tick, *Boophilus microplus*. **Insect Biochemical and Molecular Biology**, v. 29, p. 377-384, 1999.

DA COSTA, G.L.; SARQUIS, M.I.; DE MORAES, A.M.; BITTENCOURT, V.R. Isolation of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* from *Boophilus microplus* tick (Canestrini, 1887), in Rio de Janeiro State, Brazil. **Mycopathologia**, v. 154, p. 207-209, 2002.

DEBRUYNE, M.; GUERIN, P.M. Isolation of 2,6-Dichlorophenol from the cattle tick *Boophilus microplus*. Receptor cell responses but no evidence for a behavioral response. **Journal Insect. Phys.**, v. 40, p.143-154, 1994.

DENARDI, S. E.; CAMARGO-MATHIAS, M. I.; BECHARA, G. H. *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae): Salivary gland cells of partially engorged females ticks and the production of lipid by their mitochondria. **Experimental Parasitology**, v.113, p. 30-35. 2006.

FAWCETT, D.W.; BINNINGTON, K.; VOIGT, W.P. The cell biology of the ixodid tick salivary gland. In: J. R. SAUER & J.A. HAIR (Eds.), **Morphology, Biology and Behavioral Biology of Ticks**, Ellis Horwood ltd., Chichester, England, p. 22-45. 1986.

FLECHTMANN, C.H.W. **Ácaros de importância médico-veterinária**. São Paulo: Livraria Nobel S.A., 1973. 180p.

FURQUIM, K. C. S. **Estudo das glândulas salivares de fêmeas e machos de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus***. 2007. 237f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas)- Instituto de Biociências, Universidade Estadual "Júlio de Mesquita Filho", Rio Claro, 2007.

FURQUIM, K. C. S.; BECHARA, G. H.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Death by apoptosis in salivary glands of females of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). **Experimental Parasitology**, v.119, p. 152-163. 2008.

FURQUIM, K. C. S.; BECHARA, G. H.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Morpho-histochemical characterization of salivary gland cells of males of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) at different feeding stages: description of new cell types. **Exp. Appl. Acarol**, 12p, 2009. DOI: 10.1007/s10493-009-9282-y.

FURQUIM, K. C. S.; BECHARA, G. H.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Description of cell degenerative changes and of new cell types in *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) females salivary glands. **Veterinary Parasitology**, (no prelo).

GAEDE, H.; KNULLE, W. On the mechanism of water vapour sorption from unsaturated atmospheres by ticks. **The Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 200, p. 1491-98. 1997.

GARCIA, M.V.; MONTEIRO, A.C.; SZABÓ, M.P.J.; PRETTE, N.; BECHARA, G.H. Mechanism of infection and colonization of *Rhipicephalus sanguineus* eggs by *Metarhizium anisopliae* as revealed by scanning electron microscopy and histopathology. **Braz. J. Microbiol.**, v.36, p. 368-372, 2005.

GILL, H. S.; WALKER, A. R. The salivary glands of *Hyalomma anatolicum anatolicum*: nature of salivary gland components and their role in tick attachment and feeding. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v.18, n. 1, p. 83-93. 1987.

HÄCKER, G. The morphology of apoptosis. **Cell and Tissue Research**, v. 301, p. 5-17. 2000.

HARWOOD, R.F.; JAMES, M.T. **Entomology in human and animal health**. 7. ed., New York: Macmillan Publishin Co., 1979. 548p.

HIGGINS, R.A.; SLODERBECK, P.E.; BROOKS, H.L. **Field corn insect management for 2001**. Kansas State University, February 2001. 24p.

HUGNET, C.; CADORE, J.L.; BOURDOISEAU, G. Use of fipronil spray (0,25%) for the treatment of *Damalinia equi* [*Wereckiella equi*] infestation]. **Pratique Veterinaire Equine**, v. 31, n.12, p. 65-68, 1999.

JONES, L. D.; HODGSON, E.; NUTTALL, P. A. Enhancement of virus transmission by tick salivary glands. **Journal of General Virology**, v. 70, p. 1895-98. 1989.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 524p.

KAUFMAN, W. R.; SAUER, J. R. Ion and water balance in feeding ticks: mechanism of tick excretion. In: F. D. Obenchain and R. Galun (Eds.), **Physiology of ticks**. Pergamon Press, Oxford, pp. 213-243. 1982.

- KERR, J. F. R.; GOBÉ, G. C.; WINTERFORD, C. M.; HARMON, B. Anatomical methods in cell death. In: L. M. Schwartz and B. A. Osborne (Eds), **Cell Death**. Academic Press, San Diego, pp. 1-27. 1995.
- KÜNSBERG, K.V. Eine Anticoagulindrüse bei Zecken. **Zool. Anz.** v. 38, p. 263-268. 1911.
- LAVOPIERRE, M.M.J.; RIEK, R.F. Observations on the feeding habits of argasid ticks and effect of their bites on laboratory animals, together with a note on the production of coxal fluid by several of the species studied. **Ann. Trop. Med. Parasit.**, v. 49, p. 96-113. 1955.
- LIPA, J.J. Microbial control of mites and ticks. In: BURGESS, H.D.; HUSSEY, N.W. (Eds). **Microbial control of insects and mites**. 2.ed. London: Academic, 1971.p.357-374.
- LYONS, G. **Mixed messages: pesticides that confuse hormones**. Pesticide Action Network UK, p.1-6, 2000.
- MCMANUS, J. F. A. Histological demonstration of mucin after periodic acid. **Nature**, London, v. 158, p. 202. 1946.
- MARZOUK, A. S.; DARWISH, Z. E. Changes in the salivary glands of female *Hyalomma (Hyalomma) dromedarii* during and after feeding. **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**, Cairo, v. 24, n.1, p. 39-57. 1994.
- NEEDHAM, G. R.; TEEL, P. D. Water balance by ticks between bloodmeals. In: SAUER, J. R.; HAIR, J. A. (ed). **Morphology, physiology and behavioral biology of ticks**. Ellis Horwood, Chichester, p. 100-151. 1986.
- NEITZ, A. W. H.; HOWELL, C. J.; POTGIETER, D. J. J. Purification of a toxic component in the oral secretion of sand tampan, *Ornithodoros savignyi* Audoin (1827). **J. South Afr. Chem. Inst.** v. 22, p. 5142-49. 1969.
- NOLAN, J. Mechanisms of resistance to chemicals in arthropod parasites of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**, v. 18, p.155-166, 1985.
- NUNES, P. H.; BECHARA, G. H.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Morphological changes in the salivary glands of *Amblyomma cajennense* females (Acari: Ixodidae) in different feeding stages on rabbits at first infestation. **Exp. Appl. Acarol**, v. 45, p. 199-209. 2008.
- NUTTALL, G.H.F.; STRICKLAND, C. On the presence of an anticoagulin in the salivary glands and intestines of *Argas persicus*. **Parasitology**, v.1, p. 300-310. 1908.
- OLIVEIRA, P. R.; BECHARA, G. H.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Evaluation of cytotoxic effects of fipronil on ovaries of semi-engorged *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) tick female. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 2459-2465. 2008.
- OLIVEIRA, P. R.; BECHARA, G. H.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Action of the chemical agent fipronil on the reproductive process of semi-engorged females of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). Ultrastructural evaluation of ovary cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, p. 1255-1264. 2009.

- OLIVIERI, J. A.; SERRA-FREIRE, N. M. Structure of the salivary glands of the unfed female tick *Amblyomma cajennense* (Fabricius) (Acarina: Ixodidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 87, suppl. I, p. 167-174. 1992.
- PAESEN, G.C.; ADAMS, P.L.; HARLOS, K.; NUTTALL, P.A.; STUART, D.I. Tick histamine-binding proteins: isolation, cloning and three-dimensional structure. **Molecular Cell**, v. 3, p.661-671. 1999.
- PAWLOWSKY, E.N.; CHODUKIN, N.J. Ueber die Antikoaguline und Andere Wirksame Bestandteile der Zecke *Ornithodoros papillipes*. **Bir. Z. Parasitenk**, v.2, p.90-96. 1929.
- PEARSE, A.G.E. **Histochemistry theoretical and applied**. Churchill Livingstone, 2 ed., 1985. 449p.
- PENALIGGON, J. Getting to grips with fleas on pet dogs and cats. **Pesticide Outlook**, v. 8, n. 4, p.19-23, 1997.
- PETER, O.; BROSSARD, M. Tick control. **Medicine et maladies infectieuses**, v. 28, p.383-386, 1998.
- PRUETT, J.H. Immunological control of arthropods ectoparasites – a review. **International Journal for Parasitology**, v.29, p. 25-32, 1999.
- RAUH, J.J.; LUMMIS, S.C.; SATTELLE, D.B. Pharmacological and biochemical properties of insect GABA receptors. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 8, p. 325–329. 1990.
- RIBEIRO, J.M.C. Role of saliva in blood-feeding by arthropods. **Annals of Review Entomology**, v.32, p.463-478. 1987.
- RIBEIRO, J.M.C.; MAKOUL, G.T.; LEVINE, J; ROBINSON, D.R.;SPILMAN, A. Antihemostatic, antiinflammatory and immunosuppressive properties of the saliva of tick, *Ixodes dammini*. **Journal of Experimental Medicine**, v.161, p.332-344. 1985.
- RIBEIRO, J.M.C.; MATHER, T.N. *Ixodes scapularis*: salivary kininase activity is a metallo-dipeptidyl carboxypeptidase. **Experimental Parasitology** v. 89, p.213-221. 1998.
- RUPPERT, E. E.; FOX, R. S.; BARNES, R. D. **Zoologia dos Invertebrados: uma abordagem funcional-evolutiva**. 7ª edição. São Paulo: Editora Roca, 2005. 1168p.
- SABATINI, G.A.; KEMP, D.H.; HUGHES, S.; NARI, A.; HANSEN, J. Tests to determine LC50 and discriminating doses for macrocyclic lactones against the cattle tick, *Boophilus microplus*. **Veterinary Parasitology**, v.95, p.53-62, 2001.
- SAUER, J. R.; ESSENBERG, R. C.; BOWMAN, S. Salivary glands in ixodid ticks: control e mechanism of secretion. **Journal of Insect Physiology**, v. 46, p. 1069-78. 1999.
- SATTELLE, D.B. GABA receptors of insects. **Adv. Insect Physiol.**, v. 22, p. 1-113. 1990.

- SIGAL, M. D.; NEEDHAM, G. R.; MACHIN, J. Hyperosmotic oral fluid secretion during active water vapour absorption and during dissection induced storage-excretion by the unfed tick *Amblyomma americanum*. **The Journal Experimental Biology**, v. 157, p. 585-91. 1991.
- SILVEIRA, J. A. G.; PASSOS, L. M. F.; RIBEIRO, M. F. B. Population dynamics of *Rhipicephalus sanguineus* (Latrielle, 1806) in Belo Horizonte, Minas Gerais state, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 161, p. 270-275.
- SOARES, J. J.; BUSOLI, A.C. Efeito de inseticidas em insetos predadores em culturas de algodão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, n.9, p.1889-1894, 2000.
- SONENSHINE, D.E. The female reproductive system. In: SONENSHINE, D.E. (Ed.). **Biology of ticks**. New York: Oxford University Press, p. 280-304. 1991.
- SZABÓ, M. P. J.; MUKAI, L. S.; ROSA, P. C. S. Differences in the acquired resistance of dogs, hamsters, and guinea pigs to repeated infestations with adult ticks *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.** v. 32, p.43-50, 1995.
- TATCHELL, R. J. A modified method for obtaining tick oral secretion. **The Journal of Parasitology**, v. 53, p.1106-1107. 1967.
- TAYLOR, M.A. Recent developments in ectoparasiticides. **The Veterinary Journal**, v.161, p. 253-268, 2001.
- TELLAM, R.L.; SMITH, D.; KEMP, D.H. Vaccination against ticks. In: YOUNG, W.K. (Ed.). **Animal parasite control using biotechnology**. Boca Raton: CRC Press, 1992. p. 303-331.
- TILLMAN, P.G.; MULROONEY, J.E. **Tolerance of natural enemies to selected insecticides applied at ultra low volumes**. In: HERZOG, G.A.; HARDEE (chairs), D.A.; OTTENS, R.J. 1997.
- TILL, W. M. A contribution to the anatomy and histology of the brown ear tick *Rhipicephalus appendiculatus* Neumann. **Memoirs of the Entomological Society of Southern African**, Pretoria, v. 26, p.1-124. 1961.
- WALKER, A. **Arthropods of domestic animals: A guide to preliminary identification**. London: Chapman & Hall, 1994. p.25-29.
- WALKER, A.; FLETCHER, J.D.; GILL, H.S. Structural and histochemical changes in the salivary glands of *Rhipicephalus appendiculatus* during feeding. **International Journal of Parasitology**, v. 15, n. 1, p.81-100. 1985.
- WALL, R.; SHEARER, D. **Veterinary Entomology**. London: Chapman & Hall, 1997, p.43-139.
- WILLADSEN, P. Novel vaccines for ectoparasites. **Veterinary Parasitology**, v. 71, p.209-222, 1997.

ZAKERI, Z.; BURSCH, W.; TENNISWOOD, M.; LOCKSHIN, R. A. Cell death: programmed, apoptosis, necrosis, or other? **Cell Death and Differentiation** v. 2, p. 87-96. 1995.

ZUMPT, F.; GLAJCHEN, D. Tick paralysis in man. **S. Afr. Med. J.** v. 24, p. 1092-94. 1950.

Carolina Parga Martins Pereira
Orientada

Prof^{da}. Dra. Maria Izabel Camargo Mathias
Orientadora

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA E MÉRITO CIENTÍFICO - UNIARARAS

Fone: 1935431400

Parecer N° 010/2009


IDENTIFICAÇÃO DO PROJETO

Título: Análise dos efeitos do fipronil (ingrediente ativo no Frontline®) nas células das glândulas salivares de fêmeas de *Rhipicephalus sanguineus* (LATREILLE, 1806) (ACARI: IXODIDAE)

Pesquisador Responsável: Profa. Dra. Maria Izabel Camargo Mathias

Parecer: O Comitê de Ética em Pesquisa e Mérito Científico - Uniararas, após acatar os pareceres dos membros / relatores previamente designados para o presente caso e atendendo os dispositivos das resoluções 196/96, resolve aprovar, sem pendências o protocolo supracitado.

Decisão Homologada na reunião do dia 10/02/2009.



Professor Doutor Frederico Tadeu Deloroso
COORDENADOR DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA E
MÉRITO CIENTÍFICO - UNIARARAS