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

Ação dos acaricidas sintéticos: fluralaner (Bravecto®), afoxolaner (Nexgard®), sarolaner (Simparic®) e natural óleo ozonizado (Ozo3®) sobre as glândulas salivares de carrapatos *Rhipicephalus linnaei* (Acari: Ixodidae) e sobre o tecido hepático de coelhas simulando hospedeiros

EDUARDA CRISTINA DA VINHA

The background of the lower half of the page is a large, abstract geometric pattern. It consists of several overlapping triangles in shades of light blue and white, creating a complex, crystalline structure that resembles a stylized globe or a molecular model.

**Rio Claro- SP
2025**

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

Ação dos acaricidas sintéticos: fluralaner (Bravecto®), afoxolaner (Nexgard®), sarolaner (Simparic®) e natural óleo ozonizado (Ozo3®) sobre as glândulas salivares de carrapatos *Rhipicephalus linnaei* (Acari: Ixodidae) e sobre o tecido hepático de coelhas simulando hospedeiros

EDUARDA CRISTINA DA VINHA

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

Orientadora: Profa. Dra. Maria Izabel Souza Camargo

**Rio Claro – SP
2025**

V784a

Vinha, Eduarda Cristina da

Ação dos acaricidas sintéticos: fluralaner (Bravecto®), afoxolaner (Nexgard®), sarolaner (Simparic®) e natural óleo ozonizado (Ozo3®) sobre as glândulas salivares de carrapatos *Rhipicephalus linnaei* (Acari: Ixodidae) e sobre o tecido hepático de coelhas simulando hospedeiros / Eduarda Cristina da Vinha. -- Rio Claro, 2025

110 p. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Rio Claro

Orientadora: Maria Izabel Souza Camargo

1. *Rhipicephalus linnaei*. 2. Isoxazolinas. 3. Ozônio. 4. Fígado. 5. Urina análise. I. Título.

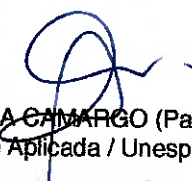
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Ação dos acaricidas sintéticos: fluralaner (Bravecto®), afoxolaner (Nexgard®), sarolaner (Simparic®) e natural óleo ozonizado (Ozo3®) sobre as glândulas salivares de carrapatos *Rhipicephalus linnaei* (Acari: Ixodidae) e sobre o tecido hepático de coelhas simulando hospedeiros

AUTORA: EDUARDA CRISTINA DA VINHA

ORIENTADORA: MARIA IZABEL SOUZA CAMARGO

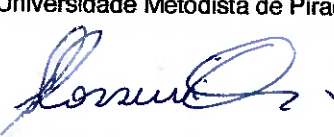
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Ciências Biológicas (Biologia Celular, Molecular e Microbiologia), área: Estrutura, Função e Produção de Biomoléculas pela Comissão Examinadora:



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



Profa. Dra. NATALIA RUBIO CLARET PEREIRA (Participação Presencial)
Departamento de Farmácia / Universidade Metodista de Piracicaba



Profa. Dra. SOLANGE APARECIDA ROSSINI DE OLIVEIRA (Participação Presencial)
Faculdades Integradas Einstein de Limeira

Rio Claro, 10 de janeiro de 2025

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, que me proporcionou a realização deste mestrado. Diante das minhas dificuldades e fraquezas, esteve sempre ao meu lado, a frente de tudo, abençoando, iluminando, abrindo caminhos e derrubando barreiras. Mas uma etapa concluída, mais uma página da minha história escrita.

Aos meus pais e irmão, em especial ao meu pai, expressar minha profunda gratidão por estar sempre disponível para me levar e buscar, muitas vezes abdicando de suas próprias atividades para que eu pudesse realizar meu sonho. À minha mãe, por estar ao meu lado nos momentos difíceis e de medos, sempre pronta para me ajudar e ensinar, sendo meu porto seguro e fonte constante de força e sabedoria. E meu irmão, por me alegrar, proporcionar momentos mais leves e descontraídos, ao longo desses dois anos.

Aos meus familiares pelo apoio incondicional e carinho durante toda a minha jornada. Em especial, agradeço à minha avó Neide (materna) por seu incentivo e suas orações; à minha tia Juliana Faci pelas trocas de informações e conversas; à minha prima Julia Faci, que demonstrou orgulho e por me apoiar a manter vivo o sonho na pesquisa; e ao meu primo Allan Magioli, por abrir sua casa e me acolher, permitindo adiantar minha pesquisa.

À minha orientadora, Prof^a. Dra. Maria Izabel Souza Camargo, pela orientação, paciência e puxões de orelha. Sua criatividade e visão profissional, bem como seus valiosos conselhos durante todo o processo de pesquisa, foram essenciais para os aprendizados que adquiri ao longo destes dois anos.

A Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, campus de Rio Claro, ao Instituto de Biociências e aos professores da Pós-graduação.

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

Agradeço ao meu grupo de pesquisa, aos membros do Brazilian Central of Studies in Ticks Morphology (BCSTM). A colaboração e a amizade de vocês foram essenciais durante as fases de pesquisa, desempenhando um papel importante no meu desenvolvimento no mestrado. Um agradecimento especial a Yousmel Alemán e Elisa Franzoni de Pierro, pelo apoio, troca de experiência e amizade. A Milena Rodrigues, Odaiza Silva, ao Eduardo Libano e Davy Sapatini por me auxiliarem em cada processo necessário do mestrado

Também em especial aos amigos e professores, Gerson de Mello Souza, técnico no Laboratório de Histologia do Departamento de Biologia Geral e Aplicada, pelas conversas, aprendizados, por me ensinar todos os protocolos de cada técnica, auxiliar nas realizações das

técnicas e pela nossa amizade. Minha sincera gratidão à Prof^a. Dra. Solange Aparecida Rossini de Oliveira, por me encaminhar para a vida acadêmica, confiar no meu potencial e abrir meus caminhos para alcançar este sonho e objetivo. Sua orientação e apoio foram fundamentais para que eu pudesse trilhar este caminho com confiança e determinação. À Marina Rodrigues de Abreu pelo incentivo, disponibilidade e por me ensinar sobre o mundo da histologia e para a realização deste trabalho.

Quero expressar minha sincera gratidão aos profissionais Dra. Simone Michaela Simon, M.Sc.Matheus Araújo de Alkimim e Joyce Novais Silva, que me ajudaram nas coletas de amostras e carrapatos para esta pesquisa. A colaboração de vocês foi essencial para o sucesso deste estudo, e sou muito grata pelo apoio e assistência prestados.

A todos meus amigos da faculdade, Wilton Silva, Mavila Rocha, Mayara dos Santos e Amanda Cerqueira, por todo o apoio, conversas e companheirismo ao longo desta jornada. Vocês tornaram os desafios mais leves, compartilharam momentos inesquecíveis e foram uma fonte constante de motivação e inspiração.

Aos amigos do CrossFit- Cosmópolis, agradeço por estarem sempre me incentivando e demonstrando admiração. A energia e o apoio de vocês foram fundamentais para manter minha motivação, ajudando a superar os desafios ao longo desta jornada.

Por fim, agradeço a todos que contribuíram de alguma forma para minha formação.

“Eu tentei 99 vezes e falhei, mas na centésima tentativa eu consegui, nunca desista de seus objetivos mesmo que esses pareçam impossíveis, a próxima tentativa pode ser a vitoriosa.”

Albert Einstein

RESUMO

Os carrapatos têm representado um problema zoonótico relevante nos últimos anos, no Brasil e no mundo. Além de espoliadores de seus hospedeiros eles são vetores de muitos patógenos para animais domésticos e mesmo para o homem. A espécie *R. linnaei* tem como hospedeiro preferencial o cão, e suas infestações podem trazer prejuízos não só para os mesmos, mas também para seus tutores. O sucesso de um processo de alimentação e de reprodução é imprescindível para a sobrevivência desses ectoparasitas, e controlá-los tem sido uma busca constante pelos estudiosos. Nessa direção a última geração de bases químicas que vem surgindo nesse mercado é a da classe das isoxazolininas, que atuam sobre o sistema nervoso da ectoparasita, causando nestas paralisias e morte. Como já foram comprovadamente eficientes no controle dos carrapatos, ficou ainda a questão de como esses compostos químicos atuam no organismo hospedeiro, visto poderem ser bioacumulativos e provocarem efeitos colaterais como hematúria, vômito e letargia. Além dos químicos sintéticos, observar como aqueles ditos naturais atuam sobre os carrapatos e sobre os hospedeiros também é um ponto importante. Nesse sentido testar o potencial do óleo ozonizado (Ozo3[®]) também foi aqui um dos objetivos. Os resultados obtidos mostraram que as isoxazolininas (Bravecto[®], Nexgard[®], Simparic[®]) provocaram tanto nos ectoparasitas quanto nos hospedeiros, alterações morfohistológicas importantes. No primeiro capítulo comparou-se os efeitos do Bravecto[®] e do Nexgard[®] sobre as glândulas salivares e verificou-se a ocorrência de alterações no formato dos ácinos, rompimento dos limites acinares e núcleo em picnose, sendo que para essas glândulas salivares o produto Nexgard[®] foi o que provocou os maiores danos. Na análise do tecido hepático de coelhas hospedeiras, observou-se que o Bravecto[®] foi o medicamento que causou as mais severas alterações que incluíram: desorganização dos hepatócitos, presença de esteatose massiva, vacuolização citoplasmática. Na exposição ao Nexgard[®], as alterações morfológicas no tecido hepático incluíram a presença de esteatose, porém de forma menos acentuada. Deste modo, embora o Bravecto[®] tenha causado os maiores danos no tecido hepático, o Nexgard[®] os causou nas glândulas salivares. No segundo capítulo investigou-se os efeitos do Simparic[®] (composto químico sintético) e do óleo de girassol ozonizado-Ozo3[®] (natural), sobre as glândulas salivares dos carrapatos e sobre o tecido hepático de coelhas hospedeiras. Os resultados mostraram que o Simparic[®] alterou nas glândulas salivares, as formas dos ácinos que passaram de arredondados para irregulares, bem como desorganizou nas células a distribuição dos grânulos secretores, devido a presença de vacuolização citoplasmática. Muitos dos ácinos observados estavam rompidos em função do produto tóxico. A exposição ao Ozo3[®] provocou

intensa vacuolização nas células acinares, muitas vezes as mesmas não podendo mais ser observadas. No tecido hepático o Simparic® alterou os hepatócitos, que apresentaram vacuolização citoplasmática e presença de gotículas lipídicas, além de congestão sanguínea intercelular. O Ozo3® no tecido hepático, desorganizou a estrutura dos cordões de hepatócitos, e provocou o surgimento de gotículas lipídicas no tecido. As análises clínicas mostraram alterações hematológicas e bioquímicas discretas, não estando as mesmas acima dos valores de referências ($p \leq 0.05$), exceto na urianálise, uma vez que todos os grupos apresentaram hematúria, com destaque ao grupo Simparic® (GS). Portanto, os resultados indicaram que (Ozo3®) provocou danos tanto nas glândulas salivares quanto no tecido hepático. Por sua vez, o Simparic® foi tóxico, efeito evidenciado pela presença de hematúria, salientando-se que a sua ação sobre as glândulas salivares e o tecido hepático foi menos acentuada. Esse estudo mostrou que esses compostos químicos para controle de carrapatos, tanto de origem sintética (Bravecto®, Nexgard® e Simparic®) quanto de origem natural (Ozo3®) foram eficientes como carrapaticidas, alterando a morfohistologia das glândulas salivares, degenerando-as precocemente, porém todos provocaram nas coelhas hospedeiras uma hepatotoxicidade severa.

Palavras-chaves: ectoparasitas, isoxazolinas, ozônio, glândulas salivares, fígado, urinálise

ABSTRACT

Ticks have represented a significant zoonotic problem in recent years, both in Brazil and worldwide. In addition to exploiting their hosts, they are vectors of many pathogens for domestic animals and even humans. The species *R. linnaei* has the dog as its preferred host, and their infestations can cause harm not only to the hosts but also to their owners. The success of a feeding and reproduction process is essential for the survival of these ectoparasites and controlling them has been a constant pursuit for researchers. In this context, the latest generation of chemical bases emerging in this market is the class of isoxazolines, which act on the nervous system of the ectoparasite, causing paralysis and death. While they have been proven efficient in tick control, the question remains of how these chemical compounds would act in the host as hematuria, vomiting, and lethargy. In addition to synthetic chemicals, observing how those deemed natural act on ticks and their hosts is also important. In this regard, testing the potential of ozonized oil (Ozo3[®]) was also one of the objectives. The results showed that isoxazolines (Bravecto[®], Nexgard[®], Simparic[®]) caused significant morphohistological alterations in both ectoparasites and hosts. In the first chapter, the effects of Bravecto[®] and Nexgard[®] on the salivary glands were compared, revealing alterations in the shape of the acini, rupture of acinar boundaries, and pycnotic nuclei, with Nexgard[®] causing the greatest damage these alterations, including disorganization of hepatocytes, massive steatosis, and cytoplasmic vacuolization. Exposure to Nexgard[®] resulted in hepatic tissue alterations, including the presence of steatosis, though less pronounced. Thus, although Bravecto[®] caused more significant damage to liver tissue, Nexgard[®] had a greater impact on the salivary glands. In the second chapter, the effects of Simparic[®] (synthetic chemical base) and ozonized sunflower oil- Ozo3[®] (natural) in the salivary glands of ticks and the liver tissue of host rabbits were investigated. The results showed that Simparic[®] altered the shapes of the acini in the salivary glands, changing from rounded to irregular, and disorganized the distribution of secretory granules in the cells due to cytoplasmic vacuolization. Many observed acini were ruptured due to the toxic product. Exposure to Ozo3[®] caused intense vacuolization in acinar cells, often making them unobservable. In the liver tissue, Simparic[®] caused alterations in hepatocytes, which presented cytoplasmic vacuolization and lipid droplets, in addition to intercellular blood congestion. Ozo3[®] in liver tissue disorganized the structure of hepatocytes cords and caused the appearance of lipid droplets in the tissue. Clinical analyses showed discrete hematological and biochemical alterations, not exceeding reference values ($p \leq 0.05$), except in urinalysis, as all groups presented hematuria, especially the Simparic[®] group (GS). Therefore, the results indicate that Ozo3[®] caused a more significant

impact on both the salivary glands and liver tissue. In turn, Simparic® exhibited toxicity evidenced by hematuria; however, its effects on the salivary glands and liver tissue were less pronounced. This study showed that these chemical compounds for tick control, both synthetics (Bravecto®, Nexgard®, Simparic®) and natural (Ozo3®), were efficient as tickicide, altering the morphohistology of the salivary glands and causing early degeneration, but all caused severe hepatotoxicity in the host rabbits.

Keywords: ectoparasites, isoxazoline, ozone, salivary glands, liver, urinalysis

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO GERAL	12
2. OBJETIVOS	17
2.1 Geral.....	17
2.2 Específicos	17
3.MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1 Equipamentos e locais de realização dos estudos	18
3.2 Obtenção dos carrapaticidas sintéticos (Isoxazolinás).....	18
3.3 Obtenção do carrapaticida natural	18
3.4 Obtenção das coelhas hospedeiras	18
3.5 Obtenção dos carrapatos	19
3.6 Infestação das coelhas com carrapatos <i>R. linnaei</i>	20
3.7 Coelhas hospedeiras infestadas pelos carrapatos <i>R. linnaei</i> e expostas aos carrapaticidas: fluralaner, afoxolaner, sarolaner e óleo ozonizado.	21
3.8 Análise clínica.....	21
3.8.1 Obtenção das amostras de sangue e de urina	21
3.8.1.1 Urianálise	22
3.8.1.2 Exames bioquímico e hematológico	22
3.8.1.2.1 Método de impedância.....	22
3.8.1.2.2 Citometria de fluxo (leitura óptica -laser)	22
3.8.1.2.3 Coloração com Panótico Rápido	23
3.9 Análise estatística	23
3. 10 Análise morfológicas	23
3.10.1 Glândulas salivares dos machos de <i>R. linnaei</i>	23
3.10.2 Obtenção das amostras dos fígado das coelhas	24
3.10.3 Histologia	24
3.10.3.1. Coloração pela hematoxilina de Harris-eosina aquosa (Junqueira; Junqueira, 1983).....	24
3.11 Histoquímica	25
3.11.1 Técnica do azul de bromofenol (Pearse, 1985) para detecção de proteínas totais .	25
3.11.2 Reação pelo PAS (Ácido Periódico de Schiff) (Junqueira; Junqueira, 1983) para detecção de polissacarídeos neutros	25
3.12 Análise das lâminas e fotodocumentação	25
3.13 Confeção dos esquemas	25
4. RESULTADOS	27
CAPÍTULO 1	28
CAPÍTULO 2	58

5. CONCLUSÃO.....	98
REFERÊNCIAS	100

1.INTRODUÇÃO GERAL

A batalha para se conseguir controlar os carrapatos, atualmente envolve diversas estratégias, as quais na sua grande maioria estão focadas no uso de produtos acaricidas sintéticos, caracterizados pela eficácia rápida (dentro de 48h), e pela capacidade de prevenir reinfestações. Segundo os autores, isso leva o mercado veterinário a buscar desenvolver e mesmo melhorar a eficiência dos compostos formulados a partir de bases químicas, para que se consiga efetividade no processo de controle (Otranto *et al.*, 2014).

Os carrapatos são artrópodes hematófagos, que tem distribuição global com destaque às regiões tropicais e subtropicais. Além de espoliarem o hospedeiro, os mesmos atuam como reservatórios de diversos patógenos que, transmitem doenças potencialmente letais aos hospedeiros (Parola, Raoult, 2001; Ali *et al.*, 2019; Guglielmone *et al.*, 2020 *apud* Obaid *et al.*, 2022, p. 1). Além da espoliação, os carrapatos provocam no hospedeiro muito desconforto, supressão imunológica, danos aos materiais derivados (couro, leite, carne), o que traz grande prejuízo econômico, principalmente à indústria agropecuária (Rodríguez, 2013), vindo reforçar a necessidade de se encontrar métodos de controle destes ectoparasitas, a fim de diminuir os impactos/prejuízos (Obaid *et al.*, 2022).

No Brasil, a transmissão de patógenos por ectoparasitas, incluindo os carrapatos, vêm sendo considerada um problema zoonótico com destaque especial para a espécie *Rhipicephalus linnaei*, popularmente conhecida como carrapato marrom do cão, que tem como hospedeiros preferenciais os canídeos, porém, podendo também parasitar outros alvos, como o próprio homem (Vale, 2023). Essa espécie já foi anteriormente denominada de *R. sanguineus*, e está associada à transmissão de patógenos como: *Babesia vogeli*; *B. canis*; *Hepatozoon canis*; *Erlichia canis*; *Rickettsia rickettsii*; *Anaplasma platys* (Andreotti *et al.*, 2022). Diferentemente de outras espécies do gênero, o *R. linnaei* tem hábito endófilo, ou seja, é frequentemente encontrado em ambientes fechados, escalando paredes, pisos e móveis em residências infestadas (Dantas-Torres, 2008; Dantas-Torres, 2010 *apud* Burgio *et al.*, 2016, p.2). Em 2022, a espécie *R. sanguineus* teve sua taxonomia revista, e atualmente é denominada de *R. linnaei*, uma vez que *R. sanguineus sensu lato* (sl) está sendo aceito como um complexo que engloba diversas espécies, sem uma definição morfológica (Šlapeta *et al.*, 2022).

O hábito alimentar da espécie *R. linnaei*, assim como dos ectoparasitas em geral, é hematófago e para tanto os mesmos introduzem seu hipostômio na pele do hospedeiro, causando lacerações graves acompanhadas de inflamação intensa, ato esse que possibilita que os mesmos, se fixem aos hospedeiros para se alimentarem, processo que abre uma porta de

entrada para os patógenos. Todo o processo de alimentação é dependente da produção de uma saliva eficiente, que mantém a lesão de alimentação aberta, além de burlar o sistema imune do hospedeiro, permitindo que o ectoparasita ali permaneça por um longo período (Oliveira *et al.*, 2020).

A produção de uma saliva eficiente está diretamente associada à plena atividade de síntese e de secreção das glândulas salivares dos carrapatos. As glândulas salivares são órgãos pares, localizados lateralmente no corpo do ectoparasita e são formadas por ácinos, os quais, dependendo da sua função podem ser classificados como granulares (suas células sintetizam e secretam bioativos), ou agranulares (responsáveis pelo processo de osmorregulação) (Furquim, *et al.* 2007; Abreu *et al.*, 2020).

As indústrias farmacêuticas da área veterinária têm colocado no mercado produtos carrapaticidas que podem ser administrados de diversas maneiras: tópica, oral e coleira, produtos que tem como bases diversos princípios ativos com níveis de eficácia e segurança satisfatórios. No caso da administração tópica podem ser citados os spots-ons (pipetas) e sprays, que tem efeito rápido e repelente (Beugnet; Franc, 2012 *apud* Sereno, 2023, p.27). A administração por via oral (comprimidos palatáveis e/ou mastigáveis) é a mais recente e, esses medicamentos também são os mais comercializados (Isadora; Marcy, 2019 *apud* Sereno, 2023, p.27). Nas coleiras, o princípio ativo se distribuirá na pele de forma lenta, porém com efeito prolongado (Taylor, 2001).

Diante da aquisição de resistência dos carrapatos, devido ao uso contínuo dos princípios ativos presentes nos produtos carrapaticidas, de tempos em tempos há a necessidade de se rever ou mesmo de se comercializar produtos com outras bases químicas. A partir dessa situação surge agora no mercado veterinário uma nova classe de ectoparasitocidas, as isoxazolinas, base de diversos produtos, com ação direta sobre o sistema nervoso do ectoparasita. Este grupo de fármaco, atua em nível sistêmico e com eficácia prolongada. As isoxazolinas, estão na composição de pelo menos seis medicamentos carrapaticidas, com especial destaque para: Afoxolaner (Nexgard®); Fluralaner (Bravecto®) e Sarolaner (Simparic®) (Ribeiro *et al.*, 2021). Esta classe de carrapaticida, vem demonstrando excelentes resultados contra várias espécies e, segundo os fabricantes apresentando poucos efeitos adversos em comparação com outros compostos (Zhou *et al.*, 2022 *apud* Mendoza-Roldan *et al.*, 2023, p.2).

O Afoxolaner tem como via de administração a oral, formulação mastigável com o nome comercial Nexgard®, projetado para controlar pulgas e carrapatos em cães, com ação média de 30 dias, além de ter sido a primeira das isoxazolinas no combate ao ectoparasitas (Mitchell *et al.*, 2014).

O Bravecto[®], formulado à partir do princípio ativo fluralaner, age como um acaricida/parasiticida, com baixa toxicidade ou mesmo atoxicidade para mamíferos (Ferreira *et al.*, 2021). Também é apresentado sob a forma de comprimidos, ou de pipeta para aplicação dérmica. Esse medicamento tem ação pelo período de 12 semanas, segundo o fabricante (Ferreira *et al.* 2021).

O Simparic[®], administrado também por via oral, mas com espectro de ação mais amplo (ácaros auriculares, pulgas, carrapatos, nematódeos gastrointestinais), tem como princípio ativo o sarolaner (Santos *et al.*, 2020) e segundo o fabricante sua ação persiste pelo período médio de 35 dias.

Muito embora esses compostos/medicamentos (Nexgard[®], Bravecto[®] e Simparic[®]) formulados à base de isoxazolinias tragam nas suas especificações que são seguros, pouco ainda se sabe como, os mesmos atuam no organismo dos hospedeiros. Algumas pesquisas que já foram anteriormente realizadas com essas moléculas químicas confirmaram que essa molécula pode provocar alterações no organismo do hospedeiro. Jia e colaboradores (2018), observaram que o fluralaner pode ser bioacumulado no organismo, informação essa obtida a partir de bioensaios com zebra-fish. Segundo Anchundia (2023) demonstrou que o fluralaner deixaria no ambiente resíduos sólidos, somando seus efeitos aos problemas já existentes de poluição ambiental.

O princípio ativo afoxolaner, segundo pesquisas recentes, provocaria hematuria, vômito, pele seca, diarreia e letargia em cães, quando aplicado em doses mensais de 2,5-4 mg/kg (Neves *et al.*, 2018; Vargas *et al.* 2024). O sarolaner por sua vez, em doses 2,6-5mg/kg mensais, segundo Cherni *et al.* (2016), provocaria alergias, dermatites, eritema, letargia e tosse.

Diante destas informações fica clara a necessidade de se desenvolver estudos com bioativos que, além de eficientes contra os ectoparasitas, também sejam ecologicamente, economicamente viáveis e, menos tóxicos aos hospedeiros. Nessa direção a utilização do ozônio com foco medicinal, já teve os primeiros resultados revelados durante a I Guerra Mundial quando Albert Wolf tratou com sucesso em soldados alemães feridas em putrefação, fraturas ósseas supuradas, fleimões e abscessos, devido às suas propriedades bactericida, fungicida e viricida, além do efeito desinfetante e esterilizante (Ferreira *et al.*, 2013).

Estudos anteriores mostraram que o O₃ (ozônio) em associação com óleos como veículos poderia se manter estável por mais tempo (mais de seis meses), e ainda se registrou que os mais utilizados seriam o: azeite de oliva, óleo de coco e de girassol (Penido *et al.*, 2010; Souza *et al.*, 2022). O óleo ozonizado tem propriedades cicatrizantes, além de ser um eficiente anti-inflamatório e antibiótico (Sanchez, 2008) e segundo Cabral (2020), e quando associado

ao Glucantime[®], funcionaria como um importante e potente antiparasitário. O ozônio também pode ser associado com a água e a água ozonizada teria potencial de agir contra microrganismos deteriorantes e patogênicos, muitos deles importantes na indústria alimentícia, inibindo a germinação de esporos de fungos como por exemplo os do *Penicillium expansum* e de *Mucor piriformis*, segundo Mari *et al.*, 2003 *apud* (Souza, 2016, p. 105).

Nos experimentos até agora realizados na área veterinária, podem ser citados aqueles desenvolvidos por Szabó *et al.* (2009), que avaliaram a ação do ozônio sobre massas de ovos, larvas, ninfas e fêmeas ingurgitadas do carrapato *R. linnaei*, muito embora, não tenham obtido o efeito acaricida desejado quando fizeram a exposição à mistura oxigênio-ozônio. Outros autores como Oliveira *et al.* (2014), fizeram uso do óleo de girassol ozonizado para tratar, via tópica, cães infestados por carrapatos dessa mesma espécie, obtendo como resultados além do efeito acaricida, também a melhora na cicatrização das lesões deixadas pelas picadas de fixação na pele dos hospedeiros. De acordo com Moreira e pesquisadores (2017), expuseram carrapatos diretamente ao ozônio e registaram efeito acaricida e ação oxidativa no exoesqueleto de *R. linnaei*, além de terem observado alterações morfofuncionais no sistema reprodutivo de teleóginas de *R. microplus*.

Estudos recentes conduzidos por Abreu *et al.* (2020; 2021) investigaram os efeitos do ozônio. Em seus bioensaios, expuseram fêmeas adultas de carrapatos *R. linnaei* in vivo e células de linhagem embrionária (RML-RSE e ISE6) in vitro à ação da água e do óleo ozonizado. Os resultados confirmaram os efeitos tóxicos, que foram detectados por meio de alterações morfofisiológicas nesses ectoparasitas.

Com base nas informações anteriormente expostas, no presente trabalho propôs-se realizar um estudo para verificar a ação do ozônio (associado ao óleo de girassol) tanto nos ectoparasitas (no caso *R. linnaei*, carrapato do cão), quanto nos hospedeiros dessas infestações (no caso, coelhas que simularam o hospedeiro). Para tanto, foram escolhidas para análises dos efeitos: a) as glândulas salivares dos carrapatos machos e b) o tecido hepático das coelhas.

Cabe salientar que, as pesquisas que são desenvolvidas com carrapatos, na sua grande maioria, tem como foco principal as fêmeas, visto que, as mesmas é que são as responsáveis pela oviposição e consequente geração dos novos indivíduos, além de serem as que provocam os maiores danos em função do parasitismo. Desta forma, pesquisas que analisem o que ocorre no sistema interno dos machos dos carrapatos não tem merecido tanta atenção, o que nos levou a propor o presente estudo. Ressalte-se a importância do macho no processo de reprodução dos carrapatos, bem como as diferenças de comportamentais encontradas entre os machos e as fêmeas quando estão infestando um hospedeiro. Os carrapatos machos, podem permanecer por

longos períodos no hospedeiro, e realizar vários repastos de sangue. Foi demonstrado que os machos previamente presos a um animal, podem se mover para outro hospedeiro ou para outro local no mesmo hospedeiro, e aí se alimentar. Embora a fêmea possa iniciar seu repasto sanguíneo no hospedeiro, mesmo na ausência de um macho, ela não ficará totalmente ingurgitada a menos que a cópula ocorra, demonstrando que, a presença do macho, é imprescindível para que o ciclo biológico da reprodução seja bem-sucedido (Dantas-Torres, 2010).

No caso dos hospedeiros, outro objetivo que foi focado nesse estudo, foi o de realizar um estudo histopatológico do fígado dos mesmos quando expostos tanto aos medicamentos aqui analisados, quanto ao ozônio associado ao óleo de girassol, para controlar as infestações dos carrapatos. Novamente, aqui faz-se uma ressalva que quando os trabalhos enfocam o controle de carrapatos, pouco é mostrado de como os órgãos internos dos hospedeiros respondem a exposição aos produtos utilizados. No caso do fígado, o mesmo, é um órgão de suma importância para os vertebrados, visto realizar diversos processos metabólicos necessários para a manutenção da homeostasia, nutrição e defesa imunológica dos animais. Esse órgão atua na remoção e decomposição de substâncias tóxicas/potencialmente, tóxicas circulantes via sanguínea, regulando as taxas de glicose e de lipídios, realizando o armazenamento de certas vitaminas, ferro e de outros micronutrientes (Borley *et al.*, 2010). O hepatócito é a unidade funcional do fígado, células epiteliais que estão agrupadas em placas ou cordões hepáticos interconectados e permeados por capilares sinusoides, bem como pelas células de Kupffer (macrófagos hepáticos) com função fagocitária (Junqueira *et al.*, 2023). Ressalte-se que lesões hepáticas induzidas por drogas, tem chamado a atenção dos pesquisadores, devido às complicações decorrentes de tratamentos medicamentosos, que incluem a ruptura dos hepatócitos com consequente desorganização do tecido, o que inevitavelmente levará a uma desorganização na circulação sanguínea do órgão (Lessa, 2022). Trabalho recente desenvolvido por Sodelli *et al.* (2023), que expuseram coelhas hospedeiras de carrapatos *R. linnaei* ao Nexgard®, (químico sintético) e ao éster do óleo de mamona (químico natural), mostraram que tanto o fígado quanto o baço dos animais expostos apresentaram alterações morfohistológicas, embora os ésteres tenham provocado danos em menor intensidade, informações essas que reforçaram a necessidade de que pesquisas que tratem do controle de carrapatos, não se restrinjam a analisar as alterações que ocorrem apenas nos ectoparasitas, mas também aquelas que mostrem o que esses químicos (tanto sintéticos, quanto naturais) provocam no sistema dos hospedeiros, ditos organismos não alvos.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

O presente trabalho teve como objetivo comparar os efeitos da exposição de machos de carrapatos *Rhipicephalus linnaei* (via análise das glândulas salivares) e de coelhas hospedeiras (via análise do fígado) às bases carrapaticidas sintéticas: fluralaner componente do Bravecto®; afoxolaner do Nexgard®; sarolaner do Simparic®, bem como ao óleo ozonizado (Ozo3®) (carrapaticida natural). Além disso, realizou-se uma avaliação do sangue e da urina das coelhas expostas ao carrapaticida sintético sarolaner (Simparic®), bem como ao óleo ozonizado (Ozo3®) (natural) para verificar se os mesmos poderiam ter ação tóxica nas hospedeiras.

2.2 Específicos

- Avaliar se e como ocorreriam alterações morfohistológicas nas glândulas salivares dos machos de carrapatos *R. linnaei* após exposição aos carrapaticidas sintéticos anteriormente citados, bem como ao óleo ozonizado (natural), por meio da aplicação de técnicas histológica (HE) e histoquímicas (detecção de proteínas e de carboidratos);
- Avaliar histológica, histoquimicamente se os citados carrapaticidas sintéticos e o óleo ozonizado (natural) provocariam no tecido hepático das coelhas hospedeiras algum tipo de alteração que pudesse indicar hepatotoxicidade;
- Analisar o sangue (eritrócito, leucócito, eosinófilos, e enzimas hepáticas) e a urina (proteínas e hematúria microscópica-sangue oculto) das coelhas hospedeiras expostas aos carrapaticidas sintéticos sarolaner (Simparic®) e natural óleo ozonizado (Ozo3®), verificando se os parâmetros considerados como referência para coelhos da espécie *Oryctolagus cuniculus*, sofreriam alguma alteração que pudesse indicar toxicidade dos mesmos.

3.MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Equipamentos e locais de realização dos estudos

Foram utilizados equipamentos disponíveis nas dependências do Laboratório de Microscopia do Departamento de Biologia Geral e Aplicada, Instituto de Biociências-Unesp, Rio Claro, (SP). Nesta instituição está implantada a **Brazilian Central of Studies on Ticks Morphology** (BCSTM), onde são mantidas colônias de carrapatos, sob a coordenação da Profa. Dra. Maria Izabel Souza Camargo.

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA) da UNESP de Rio Claro- SP, parecer nº 22/2023, e cadastrada no Conselho de Gestão do Patrimônio Genético sob o nºA72E1CB.

3.2 Obtenção dos carrapaticidas sintéticos (Isoxazolinas)

Os carrapaticidas sintéticos utilizados foram: afoxolaner (Nexgard®), fluralaner (Bravecto®) e sarolaner (Simparic®), adquiridos comercialmente, e administrados via comprimidos às coelhas infestadas com *R. linnaei*.

3.3 Obtenção do carrapaticida natural

O carrapaticida natural utilizado foi o óleo de girassol ozonizado concentrado (Ozo3®), adquirido comercialmente, e administrado via tópica nas coelhas infestadas com *R. linnaei*.

3.4 Obtenção das coelhas hospedeiras

Utilizou-se 15 coelhas saudáveis do Grupo Genético Botucatu (3 coelhas/grupo), com peso entre 2,5 a 3 Kg, sem contato prévio com carrapatos ou com carrapaticidas, adquiridas do Biotério Central da Unesp/ Botucatu-SP e que foram alocadas em cinco grupos. Destaca-se que 3 grupos descritos nesse item da Metodologia Geral são referentes ao artigo que compõe o capítulo 1, a saber:

Controle (GC): foram infestadas com carrapatos machos e fêmeas, e não foram expostas aos acaricidas;

Fluralaner (Bravecto®) (GT1): foram infestadas com machos e fêmeas e expostas ao

Bravecto® via oral com administração de 1 comprimido contendo 112,5mg de fluralaner. Dose ideal para o peso do hospedeiro;

Afoxolaner (Nexgard®) (GT2): foram infestadas com machos e fêmeas e expostas ao Nexgard® via oral com administração de 1 comprimido contendo 11,3mg de afoxolaner. Dose ideal para o peso do hospedeiro;

e três deles são referentes ao artigo que compõe o capítulo 2, a saber:

Controle (GC): foram infestadas com carrapatos machos e fêmeas, e não foram expostas aos acaricidas

Sarolaner (Simparic®) (GS): foram infestadas com machos e fêmeas e expostas ao Simparic® via oral com administração de 1 comprimido contendo 10mg de sarolaner. Dose ideal para o peso do hospedeiro;

Óleo ozonizado (Ozo3®) (GO): foram infestadas com machos e fêmeas e expostas à 1mL ao Ozo3® por via tópica com aplicação de 1ml, contendo 9, 6 mg/mL de ozônio. Com base no trabalho de Castro (2023);

Outro destaque é que o **GC** foi utilizado como referência para os dois bioensaios.

As coelhas foram mantidas em gaiolas galvanizadas e receberam água e ração comercial *ad libitum*

3.5 Obtenção dos carrapatos

Os exemplares machos e fêmeas de *R. linnaei* foram fornecidos pela Dra. Simone Michaela Simon, do Instituto Butantã-SP, os quais foram colocados no interior de câmaras alimentadoras que foram coladas no dorso tosado das hospedeiras (Fig. 1).



Figura 1 (A-G): Fotografias demonstrando o passo a passo dos procedimentos realizados desde a tricotomia e colagem da câmara no dorso das coelhas hospedeiras (A-E), até a realização da infestação por *R. linnaei* (F-H) (Bechara, 1995; Hebling, 2011).

3.6 Infestação das coelhas com carrapatos *R. linnaei*

Foram colocados 25 casais de carrapatos *R. linnaei* em cada câmara alimentadora no dorso das coelhas, que aí permaneceram por um período de 7 dias, em sala do Biotério do Departamento de Biologia Geral e Aplicada do Instituto de Biociências da UNESP de Rio Claro, SP. Após esse período, apenas os machos foram coletados para análise das suas glândulas salivares. Cabe ressaltar que a escolha dos machos para o desenvolvimento desse trabalho deu-se em virtude de a maioria dos artigos publicados com essa temática, ter como foco as alterações

glandulares que ocorrem nas fêmeas desses ectoparasitas.

3.7 Coelhas hospedeiras infestadas pelos carrapatos *R. linnaei* e expostas aos carrapaticidas: fluralaner, afoxolaner, sarolaner e óleo ozonizado.

Após 7 dias de alimentação dos carrapatos nas coelhas, administrou-se às mesmas os químicos sintéticos: fluralaner, afoxolaner e sarolaner (comprimidos mastigáveis), dose única, segundo indicação do fabricante, obtidos dos carrapaticidas comercializados no mercado veterinário: Bravecto® (112,5mg), Nexgard® (11,3mg), Simparic® (10mg) respectivamente. Para tanto, exerceu-se uma leve pressão sobre os dois lados do osso mandibular das coelhas e na sequência colocou-se os comprimidos no interior da boca de cada uma delas.

Quanto ao Ozo3®, sua exposição foi tópica, aplicando 1mL, contendo 100 µg/mL de ozônio, no local da infestação, também por 7 dias, segundo protocolo de Castro (2023).

3.8 Análise clínica

Foram realizados exames laboratoriais com o objetivo de se observar se ocorreriam alterações bioquímicas, hematológicas e urinárias nas hospedeiras expostas tanto ao sarolaner (Simparic®) quanto ao Ozo3®.

3.8.1 Obtenção das amostras de sangue e de urina

A coleta do sangue das coelhas deu-se por punção jugular utilizando-se seringa de 3mL e agulha 25x 0,08mm (estéril). As amostras foram colocadas em tubos secos com gel separador e tubos de EDTA da marca Vacutainer®. Essa parte do trabalho foi realizada pelas médicas veterinárias Tamara Maria Franzin Julio, CRMV nº47670 e Tassiana Ferreira de Mello, CRMV nº02445.

A urina foi coletada com auxílio do equipamento de ultrassom Aplio MX (Toshiba®), para a localização da bexiga, e por meio de uma seringa de 5mL e agulha 25x 7 mm para coleta do líquido.

Os exames foram realizados nas dependências do Laboratório CEDIVET na cidade de Rio Claro- (SP) pelas médicas veterinárias Tamara Maria Franzin Julio, CRMV nº47670 e Tassiana Ferreira de Mello, CRMV nº02445.

A coleta das amostras de sangue foi realizada no:

- 1º dia antes da infestação dos carrapatos (**D0**);
- 4º dia após a infestação dos carrapatos (**D1**);
- 7º dia após a exposição aos acaricidas sintéticos e natural (**D2**).

3.8.1.1 Urianálise

As análises da urina das coelhas contemplaram a avaliação dos níveis de proteínas, utilizando-se fita reativa Uri-Color Check WAMA®. Já a contagem das hemácias foi realizada microscopicamente, com auxílio de câmara de Neubauer da marca Blaubrand®.

A coleta das urinas deu-se nos mesmos dias em foram realizadas as coletas do sangue.

3.8.1.2 Exames bioquímico e hematológico

Foi avaliado o nível das enzimas hepáticas TGO ou AST (aspartato aminotransferase) e TGP ou ALT (alanina aminotransferase), após a exposição das coelhas aos carrapaticidas. Para tanto foi utilizado o equipamento URI 8031 e os reagentes da marca Bioclin®, seguindo os protocolos do fabricante

A análise hematológica, para contagem de eritrócitos, leucócitos e eosinófilos se deu com o auxílio dos equipamentos URIT 5160 Vet e Mithyc 18, por meio do método de impedância, leitura óptica (laser) e microscopia (Coloração com Panótico Rápido).

3.8.1.2.1 Método de impedância

O método da impedância, é utilizado em aparelhos de automação para contar e medir células sanguíneas baseando-se nos impulsos elétricos gerados quando imersos em uma solução eletrolítica. A quantidade de impulsos corresponde ao número de células, e a intensidade do pulso está relacionada ao tamanho da célula. A contagem dos eritrócitos é feita no mesmo canal das plaquetas, diferenciando-as pelo volume ou índice de refração, ou através de fluorocromos. Este método permite a contagem de eritrócitos, leucócitos e plaquetas. (Diniz, 2015).

3.8.1.2.2 Citometria de fluxo (leitura óptica -laser)

A citometria de fluxo é uma técnica que direciona elementos celulares por uma tubulação delgada, onde são envoltos em um solvente e passam pelo ponto de análise. Utilizam-

se tecnologias como laser, corrente contínua para impedância e corrente em radiofrequência para quantificar e diferenciar as células. Nesta técnica, as células são suspensas e interceptadas individualmente por um feixe de luz (LASER), com a radiação desviada sendo reconhecida por fotossensores para formar características de complexidade e tamanho das células, expressas em um histograma. Este equipamento também apresenta inovações como o sistema de corrente direta e a ausência de foco hidrodinâmico. (Diniz, 2015).

3.8.1.2.3 Coloração com Panótico Rápido

O panótico é um kit de coloração rápida utilizado principalmente em hematologia e outros materiais biológicos evidenciando rapidamente a morfologia das células sanguíneas. O procedimento envolve preparar extensões sanguíneas (esfregaço) e submergir as lâminas em três soluções consecutivas. Primeiro, na solução nº 1, mantendo um movimento contínuo de cima para baixo ou para os lados durante 5 segundos (5 imersões de 1 segundo cada) e deixe escorrer bem. Em seguida, repita o processo com a solução nº 2, submergindo as lâminas e mantendo um movimento contínuo durante 5 segundos, deixando-as escorrer completamente. Por fim, repita novamente o procedimento com a solução nº 3. Após esses passos, lave as lâminas com água deionizada (preferencialmente tamponada a pH 7) e deixe-as secar ao ar na posição vertical (ABNT, 2019).

3.9 Análise estatística

As diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre as médias dos valores de eritrócitos, leucócitos, eosinófilos, TGP, TGO, hemácias e proteínas na urina, respectivamente, foram identificadas pela análise de variância unidirecional (One-Way), seguida do teste de comparação múltipla de Tukey (Minitab, LLC 22.1.0 para Windows).

3. 10 Análise morfológicas

3.10.1 Glândulas salivares dos machos de *R. linnaei*

Após coletados, os machos dos carrapatos foram levados ao Laboratório de Microscopia do Departamento de Biologia Geral e Aplicada da UNESP de Rio Claro para serem anestesiados por choque térmico à temperatura de 4°C, e dissecados em placas de Petri contendo solução

salina (7,5g de NaCl; 2,38g de Na₂HPO₄; 2,72g de KH₂PO₄; 1000mL de água destilada) sob gelo, para retirada das glândulas salivares e sua imediata fixação.

3.10.2 Obtenção das amostras dos fígado das coelhas

Após 15 dias da administração dos carrapaticidas sintéticos fluralaner (Bravecto[®]), afoxolaner (Nexgard[®]), sarolaner (Simparic[®]) e do carrapaticida natural óleo de girassol ozonizado (Ozo3[®]) realizou-se a eutanásia das coelhas hospedeiras, em sala do Biotério do Departamento de Biologia Geral e Aplicada do Instituto de Biociências da UNESP de Rio Claro, SP, pelos médicos veterinários Brunna Fernanda Arraez Alvez, CRMV n° 26756 e Gabriel Correa de Camargo, CRMV n° 52730, fazendo para tanto uso de superdosagem de analgésicos (300mg/kg de cloridrato ketamina e 30mg/kg de cloridrato xilazina), via intraperitoneal, para retirada do fígado. Tão logo retirado, o mesmo foi fragmentado e os fragmentos imediatamente imersos no fixador histológico.

3.10.3 Histologia

3.10.3.1. Coloração pela hematoxilina de Harris-eosina aquosa (Junqueira; Junqueira, 1983).

Depois de coletadas as glândulas salivares, bem como os fragmentos do fígado, o material foi imediatamente fixado em paraformaldeído 4% durante 48 horas. Na sequência foi lavado por três vezes em solução tampão fosfato de sódio (7,5g/L de NaCl; 2,38g/L de Na₂HPO₄ e 2,72 g/L de KH₂PO₄) 0.1M, pH 7,4 e posteriormente, desidratado em série crescente de álcool etílico 70%-95%, com banhos de 30 minutos cada. Após, foi embebido em historesina Leica por 5 dias, mantido em estufa 37° C e incluído em moldes plásticos contendo historesina mais polimerizador (Leica Historesin Kit[®]). Os blocos contendo o material foram seccionados com 3 µm de espessura em micrótomo Leica RM2265 (Leica[®]) e as secções foram recolhidas em lâminas de vidro previamente limpas, armazenadas em estufa e posteriormente coradas pela hematoxilina de Harris durante 10 minutos, com lavagem em água parada por 4 minutos e após, foram lavadas em água corrente. Depois, procedeu-se a coloração pela eosina aquosa por 5 minutos e novamente a lavagem em água corrente. As lâminas depois de coradas foram secas em temperatura ambiente até a montagem final para posterior análise e

fotodocumentação no Laboratório de Microscopia do Departamento de Biologia Geral e Aplicada do IB, Unesp de Rio Claro, SP.

3.11 Histoquímica

3.11.1 Técnica do azul de bromofenol (Pearse, 1985) para detecção de proteínas totais

Depois da coleta das glândulas salivares e dos fragmentos do fígado, e imediata fixação do material em paraformaldeído 4%, procedeu-se o processamento histoquímico para detecção de proteínas totais. As lâminas contendo as secções tanto das glândulas quanto do fígado foram submetidas ao corante azul de bromofenol por uma hora à temperatura ambiente. Na sequência foram lavadas por 5 minutos em água corrente e secas à temperatura ambiente. As mesmas foram montadas com Entellan entre lamínula.

3.11.2 Reação pelo PAS (Ácido Periódico de Schiff) (Junqueira; Junqueira, 1983) para detecção de polissacarídeos neutros

As secções das glândulas salivares e dos fígados, foram reidratadas por 1 minuto em água destilada e transferidas para solução de ácido periódico 0,4% por 10 minutos. Em seguida foram lavadas em água destilada por 1 minuto, e imersas por 1 hora no reagente de Schiff. Foram lavadas 3 vezes em água sulfurosa em banhos de 1 minuto cada. Por fim, foram lavadas em água corrente. Depois da reação ocorrida, as lâminas foram secas à temperatura ambiente até a montagem das mesmas com Entellan entre lamínula.

3.12 Análise das lâminas e fotodocumentação

Depois de montadas, as lâminas foram analisadas e fotodocumentadas em fotomicroscópio de luz de campo claro LEICA DM750 (Leica®) no Laboratório de Microscopia do Departamento de Biologia Geral e Aplicada da UNESP de Rio Claro, SP.

3.13 Confecção dos esquemas

Os esquemas foram confeccionados por Odaiza da Silva, a partir de imagens

histológicas, com auxílio dos programas Graphics Suite 2023 e Canva Create 2023.

4. RESULTADOS

Os resultados deste estudo são apresentados em dois capítulos, cada um composto por artigos submetidos ou em elaboração para submissão em periódicos internacionais, especializados e específicos da área de estudo.

Capítulo 1:

DA VINHA, EDUARDA CRISTINA; Pierro, Elisa Franzoni de; Sapatini, Davy; Silva, Odaiza da; Rodrigues, Milena de Lima; Camargo-Mathias, Maria Izabel. **Morphohistological study of the anti-tick action of synthetic chemicals fluralaner and afoxolaner (isoxazolines) on the salivary glands of male ticks *Rhipicephalus linnaei* (Acari: Ixodidae) and in the liver tissue of rabbits simulating hosts of these ectoparasites.**

Situação: Submetido na revista **International Journal of Acarology**. Status: Revisão por Pares

Capítulo 2:

DA VINHA, EDUARDA CRISTINA; Pierro, Elisa Franzoni de; Gainza, Yousmel Alemán; Silva, Odaiza da; Camargo-Mathias, Maria Izabel. **Avaliação morfohistológica e histoquímica dos efeitos dos carrapaticidas Simparic (sintético) e Óleo de Girassol Ozonizado (Ozo3®) sobre as glândulas salivares de carrapatos do cão e sobre o tecido hepático de coelhas simulando os hospedeiros.**

Situação: em preparação

CAPÍTULO 1

Morphohistological study of the anti-tick action of synthetic chemicals fluralaner and afoxolaner (isoxazolines) on the salivary glands of male ticks *Rhipicephalus linnaei* (Acari: Ixodidae) and in the liver tissue of rabbits simulating hosts of these ectoparasites

Eduarda Cristina Da Vinha^a, Elisa Franzoni de Pierro^a, Davy Sapatini^a, Odaiza da Silva^a, Milena de Lima Rodrigues^a, Maria Izabel Camargo-Mathias^{a*}

^aDepartment of General and Applied Biology. São Paulo State University Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro, São Paulo.

RESUMO

No Brasil, a transmissão de patógenos por ectoparasitas, incluindo os carrapatos, tem sido considerada um problema zoonótico relevante nos últimos anos. Destaca-se o carrapato da espécie *Rhipicephalus linnaei*, que tem como hospedeiros preferenciais os cães, mas que também pode parasitar humanos. Nas últimas décadas, os carrapaticidas de composição química sintética que vem sendo mais utilizados para o controle são formulados a partir das isoxazolinas, com ação neurotóxica. Entre os princípios ativos dessa classe de carrapaticidas estão o fluralaner (Bravecto[®]) e o afoxolaner (Nexgard[®]), ambos aqui testados para mostrar sua ação sobre as glândulas salivares dos carrapatos machos da espécie *Rhipicephalus linnaei*, bem como sobre o tecido hepático de coelhas que aqui foram utilizadas como modelos hospedeiros. Os resultados obtidos mostraram que ambos os compostos causaram alterações morfohistológicas tanto nas glândulas salivares dos carrapatos quanto no tecido hepático das hospedeiras, dados obtidos por meio do emprego de técnicas histológica e histoquímicas. Os danos causados nas glândulas salivares incluíram desde a alteração na forma dos ácinos que passaram de arredondados a ovalados ou até mesmo irregulares, até a desorganização das células acinares secretoras, cujo citoplasma, núcleo e conteúdos proteico e polissacarídico foram modificados pela presença desses químicos sintéticos. No tecido hepático das coelhas, as alterações morfohistológicas provocadas pela exposição aos mesmos, foram muito mais agressivas e culminaram no surgimento de uma esteatose significativa (células de gordura substituindo os hepatócitos) tanto no parênquima hepático quanto por entre os cordões de

hepatócitos, desorganizando assim a circulação sanguínea no órgão. Essas alterações aqui registradas evidenciam que mesmo que essas bases químicas com ação carrapaticida sejam consideradas de última geração e com eficiência comprovada no controle de carrapatos, as mesmas causam sérios prejuízos a um importante órgão dos hospedeiros, a saber, o fígado, responsável pela desintoxicação, além de ter no sistema, outras importantes funções.

Palavras-chave: Isoxazolinás, Fluralaner (Bravecto®), Afoxolaner (Nexgard®), fígado, glândula salivar, toxicologia

ABSTRACT

In Brazil, the transmission of pathogens by ectoparasites, including ticks, has become a significant zoonotic problem. The *Rhipicephalus linnaei* tick, which primarily parasitize dogs, can also affect humans. Over the last few decades, synthetic chemical tickicides, particularly isoxazolinés, have been widely used due to their neurotoxic action. This study evaluates the effects of two isoxazoline-based tick killers, fluralaner and afoxolaner, on the salivary glands of male ticks of the *R. linnaei* species, and on the liver tissue of rabbits, used as host models. The results demonstrated that both compounds induced morphohistological alterations in the ticks' salivary glands and the host liver tissue, analyzed through histological and histochemical techniques. The damage to the salivary glands included changes in acini shape, disorganization of secretory acinar cells, and modifications in protein and polysaccharide content. In rabbit liver tissue, exposure to these chemicals resulted in significant steatosis (fat cells replacing hepatocytes) in the hepatic parenchyma, disrupting blood circulation within the organ. These alterations indicate that while these isoxazolinés are effective for tick control, they also cause severe damage to the liver, a vital organ that is responsible for detoxification, as well as having other essential functions in the system of non-target individuals

Keywords: isoxazolinés, fluralaner, afoxolaner, liver, salivary gland, toxicology

1. INTRODUCTION

Climate change came with population growth and industrial development, increasing the number of disease vectors (mainly pathogens via arthropods) and generating the need to seek strategies for surveillance and control of these vectors in the sanitary and public health aspects. In Brazil, the transmission of pathogens by ectoparasites, including ticks, has been considered a relevant zoonotic problem in recent years. The species *Rhipicephalus linnaei*, popularly known as the brown dog tick, receives special attention. It is a hematophagous ectoparasite that has canids as its preferred host. However, it can parasitize other targets, such as humans (Vale, 2023).

Alkishe *et al.* (2020) evaluated the distribution potential of the tick *R. linnaei*, observing that this species occurred mainly in the United States, Brazil, Europe, North Africa, Asia, and Australia. In Brazil, Fonsêca *et al.* (2022) recorded information about dogs infected with pathogens transmitted by this species of ticks, namely *Babesia vogeli*, *B. canis*, *Hepatozoon canis*, *Ehrlichia canis*, *Rickettsia rickettsia*, and *Anaplasma platys* (Andreotti *et al.*, 2022).

The species of dog ticks were called *R. sanguineus* sensu lato (sl), and, after extensive taxonomic revision, *R. linnaei*, since *R. sanguineus* became a complex that encompasses several species (Šlapeta *et al.*, 2022). Molecular techniques were used in addition to the morphological characteristics that allowed this reclassification, which allowed differentiating the species from each other (Šlapeta *et al.*, 2022).

Biologically, the dog tick has a trioxene cycle; that is, it requires three hosts to complete all its stages of development. However, it can also be monoxene (where all stages of development feed on the same host), with the feeding period depending on each stage considered. The literature data record that females feed on their host for 5 to 10 days, while males do so for up to 15 days (Vale, 2023).

Ticks generally are scavengers of their hosts (blood and tissue) and transmit important pathologies. These arthropods and their pathogens have been expanding and breaking the old zoogeographic limits. However, what has most concerned researchers been the development of resistance to the chemicals used in their control (Fonsêca *et al.*, 2022). Thus, there is an urgent need to seek strategies to control this vector by formulating new veterinary products that are efficient and harmless to non-target organisms (Camargo-Mathias *et al.*, 2013).

A wide range of veterinary products is intended to eliminate fleas and ticks from companion animals- “pets”. The commercial products often used are applied in various ways, such as topically, orally, or through placing collars. Topical medications can be spots-ons

(pipettes) or sprays, which, according to their manufacturers, have quick and repellent effects against ectoparasites (Serenó, 2023). According to the cited author, those administered orally present the form of tablets that are palatable when chewed and are often found in the veterinary market. Collars contain the active principle against ectoparasites in their composition, which is slowly absorbed by the host animal's skin but with prolonged effect.

Because the veterinary market must constantly modify the chemical bases to formulate new products, this becomes a dynamic area of research. In the last decade (mid-2013), a new class of ectoparasiticides was launched on the market, known as the isoxazoline class (Serenó, 2023), namely, a group of drugs at the systemic level that acts on ectoparasites as an antagonist of chlorine (anionic) channels. Isoxazoline molecules act in a double mechanism of binding to chlorine channels antagonistically, triggered by the blockade of GABA (gamma-aminobutyric acid) neurotransmitter receptors and glutamate channel receptors of invertebrates, thus acting on the neuromuscular junction of parasites, causing their immediate death (Arruda, 2023). Incorporating chemical agents into the host system after exposure promotes muscle hyperexcitation in the ectoparasite, which causes paralysis and even death (Gonçalves *et al.*, 2021).

This class of anti-tick drugs known as isoxazolines has been dominating the global veterinary market. Currently, there are at least six widely marketed drugs in this category: afoxolaner (Nexgard®), esafoxolaner (Nexgard Combo®), fluralaner (Bravecto®), sarolaner (Simparic®), lotilaner (Credeli®), and tigolaner (Felpreva®) (Serenó, 2023). Among these, we selected afoxolaner, the first isoxazoline compound to be marketed. Afoxolaner is exclusively available in oral form and has been licensed by the European Union, for the control of fleas (*Ctenocephalides felis* and *C. canis*) and ticks (*Dermacentor*, *Rhipicephalus*, and *Amblyomma*). This study focuses on testing its efficacy.

The other compound selected was fluralaner, also formulated from the synthetic base isoxazoline, presented in oral and topical forms (Gonçalves *et al.*, 2021). This drug is recommended for use against ticks (*D. variabilis*, *R. sanguineus*, and *Amblyomma americanum*) and fleas (*C. felis*) and acts on the host system, persisting for up to 12 weeks (Serenó, 2023). In the United States, this drug has been approved by the Food and Drug Administration (FDA) for oral and transdermal use (TDRM) in dogs and cats. However, there has been no ban on its trade and use in other animal species (Enomoto *et al.*, 2024). The side effects for non-target organisms (including hosts) have already been attested in the case of the active ingredients afoxolaner and fluralaner, which were selected here for testing. However, they are rare or considered irrelevant (Ferro, 2023).

In general, when addressing the products for controlling ectoparasites, specifically ticks, many of the works developed to show the efficiency of their chemical bases (synthetic or natural) generally address the damage caused in the systems of these arthropods. There is little data on how these chemicals act on the system of so-called non-target organisms, including here the host and, in the case of “pet” animals, humans, since these companion animals are even considered part of families and when subjected to the action of these chemicals, they can also act against to their guardians. It should be noted that the studies developed to show how anti-ticks act on arthropod systems bring information that shows the occurrence of significant damage to the ovaries, integument (which lines and externally protects the body of the ectoparasite), salivary glands (whose role is to take the secretion produced in the acini to the oral cavity of the tick), and synganglion (nervous center of ticks). These damages are proven by applying histological and histochemical techniques (Roma *et al.*, 2010; Nodari *et al.*, 2012; Camargo-Mathias *et al.*, 2013).

Although it is necessary to control ticks, in this case, dog ticks, species *R. linnaei*, the products used have proven effective in this purpose, causing a lot of damage to ectoparasites and eliminating them. Most research focuses on females due to their high potential for oviposition and parasitism. However, it is often overlooked that males also play a crucial role in tick reproduction, as they locate potential females for mating and can mate with several. Without the presence of males, females cannot fertilize their eggs, significantly reducing the reproduction of new ticks (Sonenshine *et al.*, 2014). Furthermore, males are able to feed on multiple hosts, facilitating the entry of other pathogens causing injuries and inflammation in the hosts (Dantas-Torres, 2008).

The salivary glands of ticks play essential roles in their maintenance, survival and reproduction. They secrete crucial substances for attachment and feeding of the ticks, including enzymes and proteins that facilitate the digestion of the host’s blood components and anticoagulants that allow for efficient and prolonged feeding. For males, the secretion of these substances is vital as it contributes to adequate feeding, ensuring the energy needed for locomotion and mating (Sauer *et al.*, 2000).

Many studies address the control theme, especially of pests (insects, ticks), concerning the exposure of several non-target animals, including hosts, to various chemical compounds, thus obtaining results showing what kind of damage they can suffer. Jia *et al.* (2018) is highlighted, having exposed *Danio rerio* (zebrafish) to fluralaner in various concentrations. The results show that, although fluralaner presents low toxicity, it can be rapidly (in short periods) accumulated in the organism of zebrafish.

Other studies exposed Dachshund dogs to the active ingredient afoxolaner and showed adverse effects such as vomiting, diarrhea, and lethargy (Neves *et al.*, 2018). The same authors also described the occurrence of hematuria after administration.

Although studies have exposed animals, potential hosts of ticks, to various active ingredients found in anti-ticks formulated with synthetic chemical bases, few works have tried to show the toxic potential of these chemicals on the organs of the hosts, such as the liver, considered the largest gland in mammals.

Morphologically, the liver is divided into lobes (Lessa, 2022) and is lined externally by a thin capsule of connective tissue that becomes thicker at the hilum, where the portal vein and hepatic artery penetrate the organ and where the hepatic ducts empty. The functional unit of the liver is the hepatocyte, cells that are arranged in plates or cords in the parenchyma of the organ, which are traversed in parallel by sinusoid capillaries (Junqueira *et al.*, 2023).

Biochemically, the liver plays an essential role in the homeostasis of the body, performing important functions such as regulating carbohydrate, protein, and lipid metabolism, glycolysis and gluconeogenesis, and substance storage (Lessa, 2022). The metabolism and degradation of drugs and toxins are important to highlight. They will mostly be converted into inactive forms by various reactions within hepatocytes. Drug-induced liver damage has gained attention in recent years due to complications arising from drug treatments that cause dysfunction in the organ for various reasons, including disruption of the hepatocytes and tissue disorganization that leads to interference in the blood circulation of the organ (Lessa, 2022).

Pilot work previously developed by Sodelli *et al.* (2023) with toxicity studies, including histological and biochemical analysis of the liver of rabbits exposed to afoxolaner, showed that this compound caused changes in liver tissue, such as the appearance of lipid droplets (steatosis) and vacuolation in the cytoplasm of hepatocytes, suggesting drug intoxication. This data is corroborated by the analysis of liver enzymes, which increased significantly.

Although it is necessary to control ticks, in this case, dog ticks *R. linnaei*, the products used have proven effective in this purpose, causing a lot of damage to ectoparasites and eliminating them. However, little is known about these products' effects on non-target organisms, including hosts. Literature presents quite scarce information, leaving gaps that must be filled with information of this nature. Cunha *et al.* (2017) previously addressed this type of problem, showing that anti-tick substances would act very aggressively on the organs of these animals, as shown in the thyroid analysis of mice exposed to an anti-tick formulated with a synthetic chemical base and another natural, from the bioactive compounds extracted from plants. Given that the thyroid is an important endocrine gland that regulates the entire body's

metabolism, it suffered severe morphological changes, ranging from a change in the composition of the colloid stored inside the thyroid follicles to the fusion of one or more follicles, which disrupted the gland's morphology and, consequently, its physiology.

Thus, faced with the problem of evaluating how anti-tick agents act in the organs of ectoparasites, here in the case of the salivary glands of dog ticks, and in the systems of so-called non-target organisms, here in the case of the liver of rabbits simulating the hosts, the present proposal aimed to bring to light histological and histochemical information on the action of the active ingredients fluralaner and afoxolaner, important chemical bases that are part of anti-tick drugs for veterinary use, to show that, although these products are effective against ticks, they bring liver damage to non-target organisms, in this case the hosts.

2. OBJECTIVES

2.1 General

The present project aimed to comparatively demonstrate the effects of exposing *Rhipicephalus linnaei* ticks to acaricides formulates from the synthetic chemical bases afoxolaner and fluralaner (analysis of salivary glands, organs involved in feeding), as well as detecting the occurrence of morphohistological alterations in the liver tissue of rabbits infested by same species of ticks.

2.2 Specific

- Evaluate the morphohistological alterations in the salivary glands of male ticks of the *R. linnaei* species after exposure to the aforementioned acaricides, using histological (HE) and histochemical techniques (protein detection with bromophenol blue and carbohydrates detection with PAS reaction) under light microscopy;
- Evaluate the toxic potential of these same acaricides on the liver tissue of rabbits exposed and infested by *R. linnaei* ticks, through the application of histological and histochemical techniques, to shed light on how they act on non-target organisms.

3. MATERIALS AND METHODS

3.1 Study locations

The equipment available in the Microscopy Laboratory of the Department of General and Applied Biology, Institute of Biosciences (IB)-Unesp, Rio Claro (SP) was used. This institution houses the Brazilian Central of Studies on Ticks Morphology (BCSTM), where tick colonies are maintained under the coordination of Prof. Dr. Maria Izabel Souza Camargo. This research was approved by the Animal Use Ethics Committee (CEUA) of UNESP Rio Claro-SP, nº. 22/2023, and registered with the Genetic Heritage Management Council under no. A72E1CB.

3.2 Acquisition of synthetic tick killers (Isoxazolines)

The synthetic tick killers used were afoxolaner (Nexgard®) and fluralaner (Bravecto®), which were commercially purchased and administered through tablets (oral) to the rabbits infested with *R. linnaei*.

3.3 Acquisition of host rabbits

Nine healthy rabbits of the Botucatu Genetic Group (3 rabbits/group), weighing between 2.5 to 3 kg, without previous contact with ticks or tick killers, were used. They were allocated into three groups:

- Control (GC): Infested with male and female ticks, not exposed to tick killers;
- Fluralaner (Bravecto®) (GT1): Infested and exposed to fluralaner orally;
- Afoxolaner (Nexgard®) (GT2): Infested and exposed to afoxolaner orally;

The rabbits were kept in galvanized cages and provided with water and commercial feed ad libitum.

3.4 Acquisition of ticks

The ticks were provided by Dr. Simone Michaela Simon from the Instituto Butantã-SP. The ticks were placed inside feeding chambers, according to Bechara et al. (1995), attached to

the shaven backs of the hosts (Fig. 1).



Figure 1 (A-H): Step-by-step procedures performed from the construction and attachment of the chamber on the back of the feed host rabbits (A-E) to the infestation by *R. linnaei* (F-H), according to Bechara (1995); Hebling (2011).

3.5 Infestation of rabbits with *R. linnaei* ticks

Twenty-five pairs of *R. linnaei* ticks were placed in each feeding chamber, where they remained for 7 days, in a room at the Bioterium of the Department of General and Applied Biology, Institute of Biosciences, UNESP, Rio Claro, SP. The males were then obtained for analysis of their salivary glands. It is worth noting that the choice of male ticks was due to most studies focusing on glandular changes that occur in the females of these ectoparasites.

3.6 Exposure of host rabbits infested with *R. linnaei* ticks to fluralaner and afoxolaner tick killers

After the ticks were attached to the dorsal region of the host rabbits and had fed for 7 days, the synthetic chemicals fluralaner and afoxolaner (chewable tablets) were administered orally in a single dose, as per the manufacturer's instructions. These were obtained from the tick killers available in the veterinary market, Bravecto® and Nexgard® respectively. To administer the tablets, slight pressure was applied on both sides of the rabbit's jawbone, and the tablet was placed inside the mouth.

3.7 Morphological Analyses

3.7.1 Salivary Glands of Male *R. linnaei* Ticks

The male *R. linnaei* ticks, after being collected from the backs of the host rabbits, were taken to the Microscopy Laboratory of the Department of General and Applied Biology, UNESP, Rio Claro, to be anesthetized by thermal shock at 4°C and dissected in Petri dishes containing saline solution (7.5g of NaCl; 2.38g of Na₂HPO₄; 2.72g of KH₂PO₄; 1000mL of distilled water) on ice to remove the salivary glands for immediate fixation.

3.7.2 Obtaining liver samples from rabbits

After 15 days of administering the synthetic acaricides, the host rabbits were euthanized in a room at the Bioterium of the Department of General and Applied Biology, Institute of Biosciences, UNESP, Rio Claro, SP, by veterinarian Brunna Fernanda Arraez Alvez, CRMV no. 59838, using an overdose of analgesics (300mg/kg of ketamine hydrochloride and 30mg/kg of xylazine hydrochloride) intraperitoneally to remove the liver. Once removed, the liver was fragmented, and the fragments were immediately immersed in a histological fixative.

3.7.3 Histology

3.7.3.1 Staining with Harris Hematoxylin and Aqueous Eosin (Junqueira; Junqueira, 1983)

After collecting the salivary glands of the ticks and the liver fragments of the host rabbits, they were immediately fixed in 4% paraformaldehyde for 48 hours. The material was then washed three times in sodium phosphate buffer solution (7.5g/L of NaCl; 2.38g/L of Na_2HPO_4 and 2.72g/L of KH_2PO_4) 0.1M, pH 7.4, and subsequently dehydrated in an ascending series of ethanol (70%-95%) with 30-minute baths each. After this stage, the material was embedded in Leica historesin for 5 days, kept in an incubator at 37°C, and included in plastic molds containing historesin plus polymerizer (Leica Historesin Kit[®]). The blocks containing the material were sectioned at 3 μm thickness with a Leica RM2265 microtome (Leica[®]), and the sections were collected on glass slides, stored in an incubator, and subsequently stained with hematoxylin for 10 minutes, washed in standing water for 4 minutes, and then washed in running water. The sections were then stained with aqueous eosin for 5 minutes and washed again in running water. The stained slides were air-dried at room temperature until final mounting for subsequent analysis and photodocumentation at the Microscopy Laboratory of the Department of General and Applied Biology, IB, UNESP, Rio Claro, SP.

3.8 Histochemistry

3.8.1 Bromophenol Blue technique (Pearse, 1985) for Total Protein Detection

After collecting and fixation in 4% paraformaldehyde, the salivary glands and liver fragments were subjected to histological and histochemical techniques. For proteins detection the material was stained by bromophenol blue for one hour at room temperature and then washed for 5 minutes in running water and air-dried at room temperature until mounting with Entellan between the slide and coverslip.

3.8.2 PAS Reaction (Periodic Acid-Schiff) (Junqueira; Junqueira, 1983) for Neutral Polysaccharide Detection

The slides containing the sections of the salivary glands and liver fragments were rehydrated for 1 minute in distilled water and transferred to a 0.4% periodic acid solution for 10 minutes. They were then washed in distilled water for 1 minute and immersed for 1 hour in Schiff reagent in the dark. The slides were washed three times in sulfur water in 1-minute baths each, and finally washed in running water. After the reaction, the slides were air-dried at room temperature until mounting with Entellan between the slide and coverslip.

4. RESULTS

4.1 Morphology of salivary glands of male ticks of the species *R. linnaei*

4.1.1 Control Group

The morphological results of the present study, which evaluated the salivary glands of male ticks of the species *R. linnaei*, showed preserved glandular tissue in the Control Group (CG). The glandular acini maintained their rounded morphology with intact cells, presenting integral morphology, well-defined cellular boundaries, well-labeled nuclei, and evident cytoplasmic granulation; in the case of secretory acini (the salivary glands in males are composed of acini classified from I to IV, with type I being agranular and II, III, and IV, granular), they are intact and strongly labeled (Figs. 2A, B, E, H). The structures of the acinar ducts, responsible for conducting the synthesized secretion in glandular cells, were also well preserved in the bioassays of the CG.

Application of histochemical techniques for protein detection showed the glandular acini preserved, with acinar cells and distinguishable boundaries (Fig. 2E). The secretory granules with protein content were homogeneously distributed in the cytoplasm of the cells and were evidenced by the strong positive labeling (Fig. 2E). The acini responsible for the synthesis and release of secretion of a non-exclusively protein nature was also labeled by bromophenol blue. The nucleus and nucleolus were labeled using the technique.

Still in the CG, as observed in the detection of proteins, the labeling for neutral polysaccharides showed the secretory cells with their limits and cytoplasmic granules preserved, which were strongly positive for PAS (Fig. 2H). The nuclei were not evidenced since the technique is not specific for labeling them.

4.1.2 Treatment Group 1 (TG1)

Exposure to the synthetic chemical compound fluralaner (TG1) significantly altered the morphology of tick salivary glands (Figs 2C, F, I). Unlike the CG (control group), the acini lost their regular rounded morphology, assuming oval and some atypical shapes (Figs. 2C, F, I). The acinar cells could not be individualized inside the acini because of the disruption of their cell boundaries (Figs. 2C, F, I). The nuclei presented severe alterations, marked pycnosis, decreased size, and chromatin dispersion. The cytoplasm of secretory acinar cells showed

severe morphological changes, with rupture of cytoplasmic granules (Fig. 2C). The contents of many of them were mixed, forming an amorphous mass that was strongly labeled by histological dye (Fig. 2C). Marked cytoplasmic vacuolation was observed in some cells, indicating irreversible damage to the physiology of the organ. In this group, only the glandular ducts were preserved since they were internally coated by a rigid cuticle, preventing the chemical compound's action (Fig. 2F).

TG1 salivary glands exposed to fluralaner were confirmed to have acinar disorganization when the protein detection technique was applied (Fig. 2F). The cytoplasm of the acinar cells showed intense alteration, with the absence of cytoplasmic granules, which were previously evidenced and individualized (Fig. 2F). Few irregular nuclei were observed scattered peripherally in the acinar cells, diverging from the usual morphology (Fig. 2F). The application of the PAS reaction for polysaccharide detection revealed weakly labeled acins and the absence of positive PAS granules in the cytoplasm (Fig. 2I), indicating the inhibition of polysaccharide synthesis in acinar cells.

4.1.3 Treatment Group 2 (TG2)

As in TG1, the salivary glands of ticks exposed to afoxolaner (TG2) also showed severe morphological changes in the tissue (Figs. 2D, G, J), but in greater intensity. The acinar morphology was compromised, with most of the acini changing from round to oval (Fig. 2D), containing acinar cells whose boundaries could not be defined in most of them (Figs. 2D, G, J). In addition, the cytoplasm showed the absence of secretory granules, forming amorphous and intensely stained masses, indicating their massive rupture (Figs. 2D, G, J). The cell nuclei were mostly pycnotic, with a total loss of rounded morphology. They were predominantly displaced to the periphery of the secretory cells (Figs. 2D, G, J), in contrast to normal morphology, where they are centrally located in the cells. As in the previous groups, the acinar ducts were also preserved.

The histochemical tests applied in this group showed acins strongly positive for proteins, although they had the acinar organization completely compromised (Fig. 2G). The cells could not be individualized. The cytoplasmic granules ruptured and formed a mass inside the cytoplasm, and the nuclei of the acinar cells also changed, some even suffering fragmentation (Fig. 2G), reinforcing the data obtained in histology. In the detection of polysaccharides by PAS, the results were very similar to those obtained in TG1, with weakly labeled acini (Figs. 2I, J).

Figure 2. Scheme (A) of the interior of a tick, showing the location of its salivary glands and histological section (B-J) of the salivary glands of *R. linnaei* male ticks from the Groups: Control-CG (not exposed to isoxazolines: **B, E, H**), Treated 1-TG1 (exposed to fluralaner: **C,F,I**), and Treated 2- TG2 (exposed to afoxolaner: **D,G,J**):

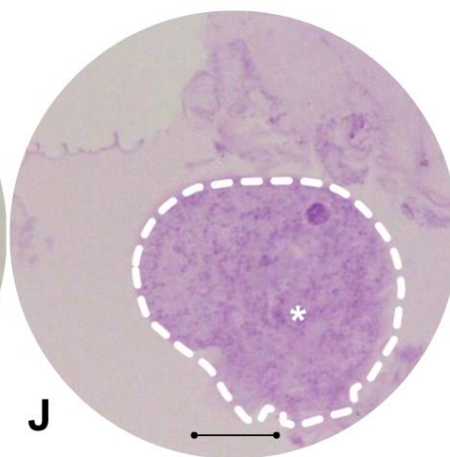
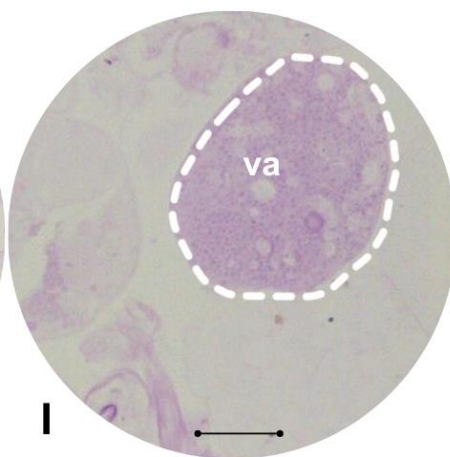
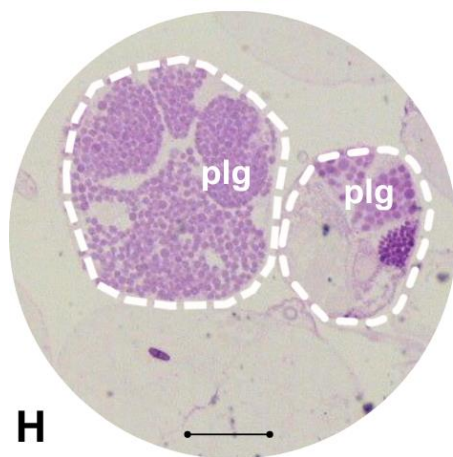
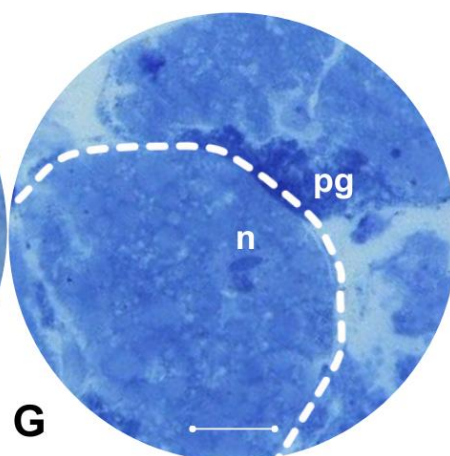
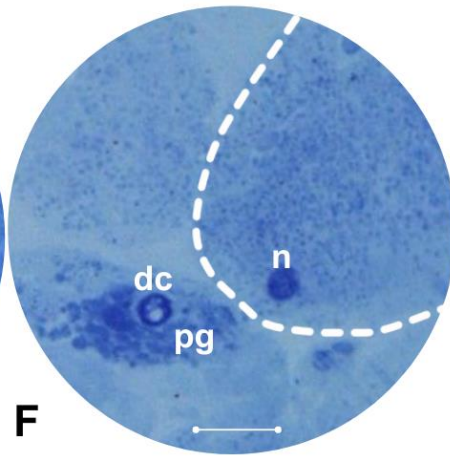
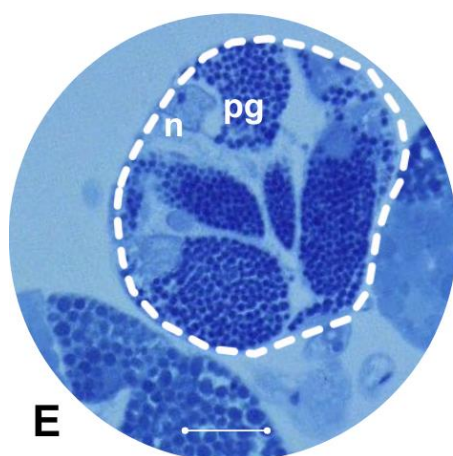
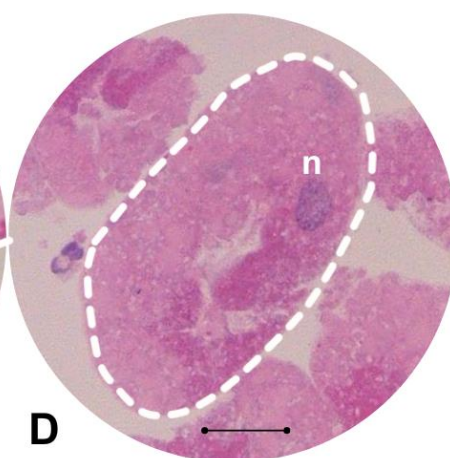
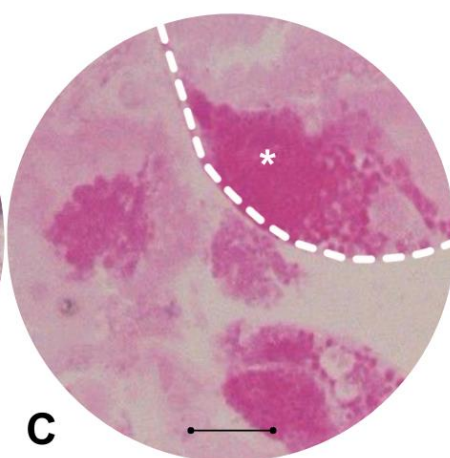
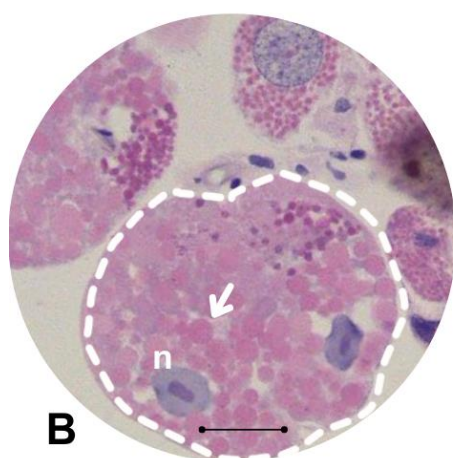
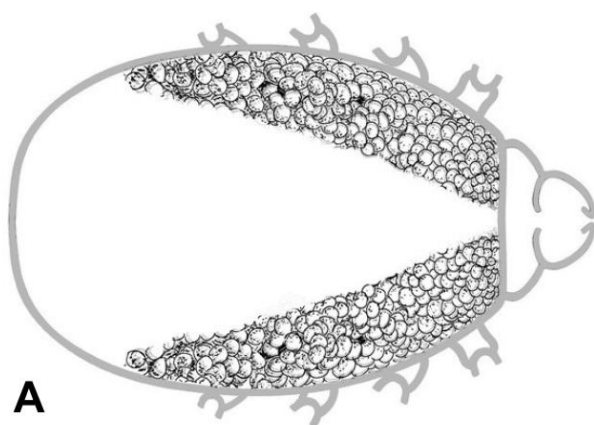
B-D= Stained by hematoxylin and eosin (HE);

E-G= Stained by bromophenol blue for total protein detection;

H-J= PAS reaction for detection of neutral polysaccharides;

Dashed line= acinus, **arrow**= secretory granule, **pg**= protein granule, **asterisk**= polysaccharides, **n**= nucleus, **plg**= polysaccharidic granulation, **va**= vacuole, **dc**= acinar duct.

Scale bar: B2-J2= 50µm.



4.2 Morphology of the Liver Tissue of Host Rabbits

4.2.1 Control Group

In the present work, we obtained liver tissue morphology (Fig. 3) results of the rabbit models of tick hosts, which were allocated in the different groups studied here to evaluate the effects of isoxazoline-based anti-ticks on the body of the host (non-target).

The liver tissue of the rabbits of the control group (CG), that is, those that were only infested with *R. linnaei* ticks and not exposed to the anti-ticks, showed a normal distribution of hepatocytes in the form of cords/plates, with intact cells, well-defined cell boundaries, and the presence of one or two nuclei in each of them (Fig. 3B).

The presence of Kupffer cells can be verified in the spaces between the hepatocyte cords, evidenced only by the elongated nuclei well-labeled by hematoxylin (Fig. 3B). This morphology is typically found in preserved livers, which was therefore expected for this group.

Histochemically, the detection of total proteins by bromophenol blue showed intense labeling throughout the cytoplasm of hepatocytes (Fig. 3E) and in their nuclei. Due to their well-defined limits, the cells could be individualized.

The detection of neutral polysaccharides showed regions with variation of polysaccharide labeling in hepatocytes of the liver of rabbits in the control group (CG) since some were well-labeled and others not (Figs. 3H). In other words, part of the hepatocytes was strongly positive to the PAS reaction, showing a cytoplasm full of polysaccharide granules, while others had little granulation and, consequently, weaker PAS labeling. It should be noted that the nuclei were not labeled due to the specificity of the histochemical technique.

3.2.2 Treatment Group 1 (TG1)

In this group, the rabbits' liver was exposed to fluralaner. The liver tissue of these rabbits was entirely disorganized, unlike what was observed in the rabbits of the control group (CG) (Figs. 3C, F).

Histology showed the massive presence of steatosis in several areas of the liver, represented by large, lodged lipid droplets that almost replaced the sites that hepatocytes should occupy in many regions (Figs. 3C, F).

The portions of liver tissue not affected by steatosis presented hepatocytes that lost their regular cubic shape, becoming amorphous and with poorly defined cell boundaries (Figs. 3C,

F, I). Like cell morphology, that of the nuclei was also altered, evidenced by the irregular arrangement of chromatin within them (Fig. 3C). Some Kupffer cell nuclei were observed, but at a lower intensity than that found in the liver of rabbits of the control group (CG) (Fig. 3C).

When the technique was applied to detect total proteins in the liver tissue of rabbits exposed to fluralaner, all regions, except those where steatosis prevailed, were strongly labeled by bromophenol blue. This made it difficult to visualize the nucleus of the cells and their boundaries (Fig. 3F). The nuclei that could be distinguished were smaller than those found in the control group.

Most cells (hepatocytes) reacted strongly to PAS in the liver of rabbits exposed to fluralaner, showing the presence of polysaccharide granules in their cytoplasm (Fig. 3I).

4.2.3 Treatment Group 2 (TG2)

As observed in the livers of rabbits exposed to fluralaner, those exposed to afoxolaner showed morphological changes in liver tissue (Fig.3D), but to a lesser extent. The structure of hepatocytes organized in cords or plates was lost due to the intense presence of fat droplets (steatosis) (Figs. 3D, J), but with a different distribution from that observed in TG1 (Figs. 3C-D).

In addition to being disorganized in the tissue, the hepatocytes were completely irregular, harboring nuclei that lost their original morphology in their cytoplasm (Fig.3D, G). These nuclei underwent alterations, such as pyknosis and highly condensed chromatin, indicative of cell death (Fig. 3D). It should also be noted that their size changed, with most being smaller. Between hepatocytes and steatosis regions, some elongated Kupffer cell nuclei, well-labeled by hematoxylin, were observed (Fig.3D).

The total protein detection technique showed strong and intense liver tissue labeling (Fig. 3G). Histology showed that lipoprotein complexes would occupy spaces that previously seemed to have been occupied only by lipid droplets due to the intensity of the observed staining (Fig. 3G). The nuclei were strongly labeled and could be individualized, emphasizing the presence of vacuolization in many of them.

Hepatocytes reacted strongly to the application of PAS of rabbits exposed to afoxolaner (Fig. 3J). This labeling was more intense than that observed in the control group (Fig. 3H) and treatment group 1 (Fig. 3I), demonstrating the presence of polysaccharide granules in the cytoplasm.

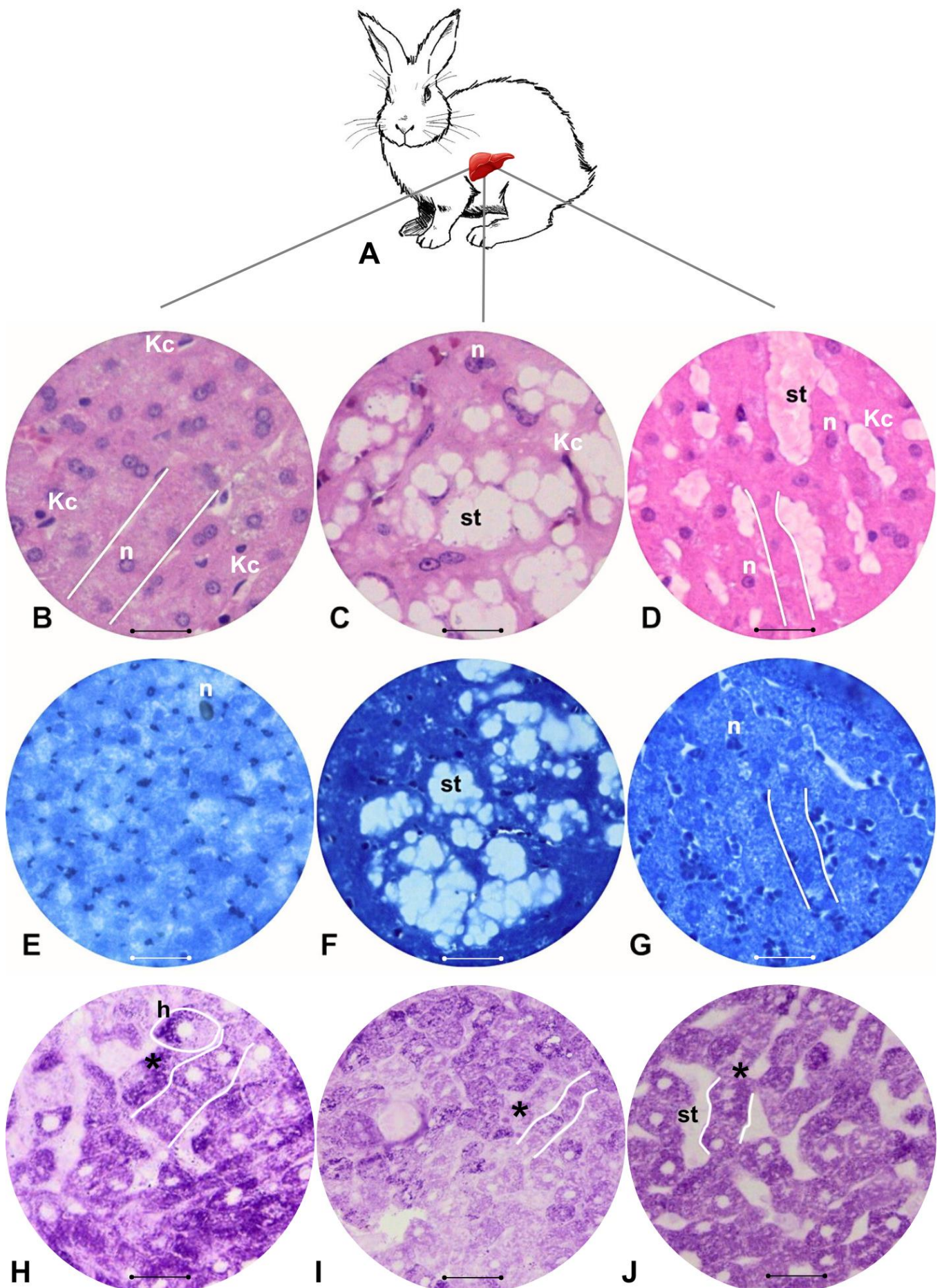
Figure 3. Scheme (**A**) of a tick-infested rabbit and histological sections (**B-J**) of the liver from the following groups: Control-GC (not exposed to isoxazolines: **B, E, H**), Treated 1-GT1 (exposed to fluralaner: **C, F, I**), Treated 2- GT2 (exposed to afoxolaner: **D, G, J**):

B-D= Stained by hematoxylin and eosin (HE);

E-G= Stained by bromophenol blue for total protein detection;

H-J= PAS reaction for detection of neutral polysaccharides;

Continuous lines = cord of hepatocytes, **st** = steatosis, **h**= hepatocyte, **asterisk**= polysaccharide, **n**= nucleus, **Kc**= Kupffer cell.



5. DISCUSSION

The current veterinary market has been proving effective concerning the search for strategies efficient for controlling ticks, important ectoparasites that, throughout evolution, have been adapting to circumvent the hosts' responses. In recent decades, the anti-ticks formulated based on synthetic chemicals have dominated this market and the class of isoxazolines, substances that have neurotoxic action and cause the immediate death of ectoparasites (Gonçalves *et al.*, 2021). The efficacy of its control is demonstrated by drugs formulated with afoxolaner, such as Nexgard[®], and fluralaner, as found in Bravecto[®].

The ticks *R. linnaei*, familiarly called "brown dog tick", have gained prominence for parasitizing companion animals, most of which are part of families living with humans. In addition to overcoming zoogeographic barriers and parasitizing their preferred hosts, these ectoparasites transmit pathogens, such as *Babesia vogeli*; *Hepatozoon canis*; *Ehrlichia canis*; *R. rickettsia spp* (Fonsêca *et al.*, 2022). These factors highlight the need for new methods, mainly due to the development of drug resistance.

The investigation into the toxicity of these substances used to combat ticks mostly uses their exposure to various chemical compounds of synthetic and natural origin (extracted from plants or other animals). The efficiency of these synthetic chemicals used to control ectoparasites stems from the fact that their active ingredients alter the tissue and cellular organization of several organs that are essential for the survival of ectoparasites, such as: salivary glands (Pereira *et al.*, 2009), ovaries (Souza, 2019), testicles (Anholeto *et al.*, 2020), Gené and singanglio organ (Matos *et al.*, 2019), digestive system (Caperucci *et al.*, 2010), and the integument (Souza, 2019). In addition, the effects of these compounds can also be noted in the systems of non-target organisms, including the hosts (Cunha *et al.*, 2017; Sodelli *et al.*, 2023; Marques *et al.*, 2019).

Although the results of many studies have provided important information demonstrating how chemical compounds for control act on ectoparasites, interfering with their ability to feed and reproduce, little is still known about how these products act on the hosts (non-target organisms), which are indirectly exposed to these substances.

Thus, bringing to light answers to these questions has stimulated the development of this research, focusing on the damage caused by synthetic chemicals formulated from the active ingredients fluralaner and afoxolaner on the salivary glands of ectoparasites *R. linnaei* and on the liver tissue of the host (non-target organism). This work used rabbits as a model since these animals have anatomical, physiological, and immunological similarities to dogs (Mapara *et al.*,

2012).

The bioassays provided information on significant morphological changes in the salivary glands of male ticks and host rabbits' livers, which were severely affected morphologically and histochemically after exposure to isoxazolines.

Changes were observed in the salivary glands of ectoparasites exposed to these products, in the glandular acini, which underwent extensive disorganization, and in the cells that make them up. The acini lost their original rounded shape, and there was a rupture and fusion of the cytoplasmic granules and their contents in the secretory cells, in addition to the presence of pyknotic nuclei and marked cytoplasmic vacuolation. These morphological alterations indicated that the chemical compounds used to control ticks damaged and destructured the salivary glands, altering the acinar physiology and even culminating in the rupture of the acini, which would be irreversible and prevent the ectoparasite from feeding due to the lack of production of efficient saliva. Toxicity studies conducted with other compounds used for tick control also brought similar results in this same organ, such as those that exposed the ectoparasite to neem oil (*Azadirachta indica*) (Remédio *et al.*, 2016) and fipronil (Frontline®) (Pereira *et al.*, 2009).

Despite the significant extent of the damage caused to the morphology of the salivary glands of the exposed ectoparasites, the acinar duct system remained practically intact. This was due to their internal coating by rigid chitin, which preserves the integrity of the secretion (saliva) produced/synthesized in the acinar cells so that it arrives intact in the tick's oral cavity, thus preserving all its bioactive properties (Furquim, 2008).

Changes in protein synthesis and secretion were observed when histochemical tests were conducted to detect proteins in the salivary glands of ticks exposed to both chemical compounds tested here. In the case of fluralaner, the results of the tests suggested a decrease or even a possible interruption in the synthesis of cytoplasmic granules of a protein nature, probably due to the presence of the chemical compound in the ectoparasite system since this granulation was no longer observed inside the acinar cells. In the case of exposure to afoxolaner, although the changes in the salivary glands were also quite severe, it was still possible to observe the presence of protein granules in some secretory cells, still with a certain morphological integrity. The changes observed in the present study are consistent with findings from various other studies conducted by different authors, which exposed ectoparasites to other types of anti-tick treatments, such as the study performed by Matos *et al.* (2019), who exposed them to different concentrations of thymol (monoterpene present in plants) and verified that some acini presented cytoplasmic vacuolation close to the nucleus, in addition to the presence of ruptured secretory

granules, giving the cell cytoplasm with an amorphous aspect.

Regarding the application of histochemical tests for polysaccharide detection, it was found that both active ingredients interfered in the synthesis and secretion of polysaccharides since PAS weakly labeled the glandular acini in most acinar cells. Most of the salivary gland cells of ticks exposed to afoxolaner showed weak PAS labeling, and some did not yet react to the test, which allowed us to infer that the synthesis and secretion/accumulation of polysaccharides was interrupted/decreased as a result of the toxic product in the ectoparasite system. A study conducted by Nodari *et al.* (2012) also evaluated histochemically the presence of polysaccharides in the salivary glands of this same species of ticks. They also observed a reduction in the synthesis of proteins and polysaccharides in the acinar cells of the salivary glands of females of *R. linnaei* exposed to the synthetic chemical permethrin (Advantage® Max3). These authors suggested that the chemical compounds used in tick control would accelerate the degeneration of glandular tissue, preventing them from succeeding in their feeding process, with consequent death of the ectoparasite.

In the present work, morpho-histological and histochemical analyses of the liver of the tick *R. linnaei* host rabbits were also performed after exposure to the synthetic anti-ticks fluralaner and afoxolaner. The results showed significant changes in the tissue, emphasizing the action of fluralaner, which caused extensive steatosis in the liver, which occupied a large part of the liver parenchyma and, in many regions, took the space that should be occupied by hepatocytes. In the case of exposure to afoxolaner, although the hepatocytes were still arranged in cords or plates, the presence of lipid droplets was also marked, establishing the presence of intense steatosis, that is, an abnormal accumulation of triglycerides in and outside the hepatocytes, probably caused by drug action due to exposure to the active ingredient. Steatosis causes inflammation in the liver tissue accompanied by fibrosis, which can develop into cirrhosis and cause liver failure (Idilman *et al.*, 2016) if the toxic chemical compound (chronic exposure) continues circulating in the animal's system.

In addition to the marked steatosis observed in the liver tissue of rabbits exposed to both chemical compounds, when comparing the histological results of the exposed animals with those of the unexposed (control), it was observed that the former presented severe disorganization of the hepatic cords, in addition to the morphological alteration in the hepatocytes, such as cytoplasmic vacuolation, presence of pycnotic nucleus, and marginalized chromatin. These data reinforce those obtained by Ferreira *et al.* (2011), who exposed mice to different dosages of fipronil. They reported that the liver tissue had undergone cellular disorganization and that hepatocytes showed cytoplasmic alterations and hypertrophy since

hepatocytes with increased size were observed. These authors also performed ultrastructural analyses of this material. They verified that this hypertrophy would be due to a significant increase in the number of mitochondria and the cisterns of the rough endoplasmic reticulum. According to them, these changes would have the function of inactivating the effects of toxic substances to which the organisms were exposed. Other authors like Cunha *et al.* (2017), who evaluated the liver tissue of female mice *Mus musculus* after exposure by spraying the acaricides fipronil (synthetic chemical) and thymol (natural chemical), also observed disorganization of hepatocytes and cytoplasmic vacuolation in this tissue. These authors inferred that the observed cytoplasmic vacuolation would probably be a strategy adopted by the cells of the exposed organism to eliminate and neutralize damaged cytoplasmic regions and inactive organelles, involving them in autophagic vacuoles, which would later undergo digestion, thus preserving the functionality of the remaining cytoplasm (Ferreira, 2020).

Histochemical tests were also applied to detect proteins and polysaccharides in the liver tissue of rabbits exposed to afoxolaner and fluralaner. The results confirmed that exposure to both compounds caused steatosis, although distributed differently in the liver tissues due to the action of each chemical compound. In the case of exposure to afoxolaner, steatosis occupied the spaces between the hepatocyte cords, while exposure to fluralaner caused steatosis that occupied a large part of the liver parenchyma. The protein detection test showed positive labeling throughout the liver parenchyma of rabbits exposed to afoxolaner, signaling that proteins were still being synthesized in most hepatocytes. Although protein labeling was also strongly positive in the case of rabbits exposed to fluralaner, it can only be observed between the regions occupied by the lipid resulting from steatosis, which reinforced the toxicity of this chemical compound. In a comparative study previously performed by Sodelli *et al.* (2023), who exposed rabbit tick host models to afoxolaner (synthetic chemical) and castor oil esters (natural chemical), the authors also observed the presence of positive labeling for protein in liver tissue, although the result obtained for the group exposed to esters was less intense. In the present study, the labeling for proteins in the liver tissue of the exposed rabbits was strongly positive in all groups, including the control one, since the liver is a site of synthesis and secretion of important proteins that, among other functions, is responsible for the detoxification of the body.

In the PAS histochemical test for the detection of polysaccharides in the liver tissue of rabbits exposed to both chemical compounds tested here, the results showed that the labeling for polysaccharides was weaker in the exposure to fluralaner than that observed in the liver tissue of rabbits exposed to afoxolaner since PAS strongly labeled the hepatocytes of the latter.

According to literature data, strongly labeling polysaccharides in liver tissue would indicate toxicity (Lima, 2013).

In addition, lipid droplets' occupation of the spaces between the hepatocyte cords was confirmed in this exposure to afoxolaner, which identified the presence of drug-induced hepatic steatosis. When conducting a histological and histochemical study addressing the action of different dosages of “açaí” oil to determine its cytotoxic potential on the liver tissue of rats, Marques *et al.* (2019) verified that there was a dose-dependence relationship since each time the dose of the chemical compound was increased, a greater number of liver tissue cells lost their integrity. According to the data obtained in the present study, afoxolaner presented the lowest toxicity to the liver tissue of the rabbits tested compared to the results of exposure to fluralaner.

Thus, the results presented in this work demonstrate comparatively that even the active ingredients considered state-of-the-art and that are the chemical basis of drugs used and widely marketed in the veterinary market to control ticks and despite their efficiency in combating these ectoparasites, they also cause severe damage, many of them irreversible, to non-target organisms, which include the hosts. The application of histological and histochemical techniques showed that exposure to these drugs, formulated from the chemical bases of the class of isoxazolines, damages one of the organs, considered vital and responsible for the detoxification of the mammalian system, namely the liver, causing in the same damages that can be irreversible.

6. CONCLUSION

Based on the results of this study, it is concluded that the synthetic acaricides fluralaner (Bravecto®) and afoxolaner (Nexgard®) (isoxazolines) cause histological and histochemical changes in the salivary glands of male ticks and the liver of rabbits, simulating host models. In the salivary glands, they accelerate the degeneration process and reduce/inhibit the synthesis of polysaccharides and proteins, with afoxolaner (Nexgard®) causing the most significant morphohistological changes in *R. linnaei* ticks. In rabbits, exposure to these substances caused varying degrees of hepatotoxicity, characterized by extensive steatosis and alterations in the synthesis/secretion of proteins and polysaccharides by hepatocytes. Fluralaner (Bravecto®) resulted in more severe hepatic steatosis than afoxolaner (Nexgard®). Although effective in combating ticks, isoxazolines cause severe liver damage in host organisms.

References

- Alkishe A, *et al.* 2020. Recognizing sources of uncertainty in disease vector ecological niche models: an example with the tick *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato. *Perspect Ecol Conserv.* 18:91-102. doi: 10.1016/j.pecon.2020.03.002.
- Andreotti R, *et al.* 2022. Ticks of importance to One Health and animal production in Brazil. 1st ed. Campo Grande: Embrapa. Available from: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1146291/ticks-of-importance-to-one-health-and-animal-production-in-brazil>.
- Anholeto LA, *et al.* 2020. Ação do extrato etanólico bruto de *Acmella Oleracea* em carrapatos *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae): avaliação ultraestrutural do sistema reprodutor masculino. [Action of the crude ethanolic extract of *Acmella Oleracea* on *Amblyomma cajennense* ticks (Acari: Ixodidae): ultrastructural evaluation of the male reproductive system]. In: Silveira M, Silva E, Lima RA, editors. *Biodiversidade e Biotecnologia no Brasil*. 2nd ed. Rio Branco: Strictu sensu Editora. p. 71-89. Portuguese. doi:10.35170/ss.ed.9786586283297.05.
- Arruda BMCG. 2023. Eficácia do Fluralaner transdermal no tratamento de *Lynxacarus radovskyi* (Acari: Listrophoridae) em gatos naturalmente infestados [dissertation]. Seropédica: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Available from: <https://rima.ufrj.br/jspui/handle/20.500.14407/15846>.
- Bechara, G. H. *et al.* *Rhipicephalus sanguineus* tick in Brazil: feeding and reproductive aspects under laboratorial conditions. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 4, n. 2, p. 61-66, jan. 1995. Disponível em: <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/19970500056>. Acesso em: 26 out. 2024.
- Camargo-Mathias MI, *et al.* 2013. Guia básico de morfologia interna de carrapatos. [Basic Guide to Internal Morphology of Tick]. Portuguese. Rio Claro: Unesp. <https://editoraunesp.com.br/catalogo?criterio=+Inside+ticks+Morphophysiology%2C+toxicology+and+therapeutic+perspectives>
- Caperucci D, *et al.* 2010. Ultrastructure features of the midgut of the female adult *Amblyomma cajennense* ticks Fabricius, 1787 (Acari: Ixodidae) in several feeding stages and subjected to three infestations. *Micron*. 41:710-721. doi: 10.1016/j.micron.2010.05.015.
- Cunha ELR, *et al.* 2017. Histopathological changes in the liver and thyroid of mice (*Mus musculus*) caused by the acaricides: fipronil and thymol. *J Histol Histopa.* 4:9-17. doi:10.7243/2055-091x-4-9.
- Dantas-Torres F. 2008. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: ixodidae). *Vet Parasitol.* 152(3-4):173-185. doi: 10.1016/j.vetpar.2007.12.030. Available from: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304401707006838?casa_token=irzEQRBwFAQAAAAA:RnNXekjoxB_iaNzhTRcS_RAECHxQ562S5P94cD484HSm7s7ILF4icuny4m_WcHZ4ExpvUKj4N3U7. Accessed 2024 Jul 12.
- Enomoto H, *et al.* 2024. Residue, distribution, and depletion of fluralaner in egg following a single intravenous and transdermal administration in healthy shaver hens: fluralaner residue in

egg. Poult Sci. 103:103843-103853. doi: 10.1016/j.psj.2024.103843.

Ferreira M, *et al.* 2011. Action of the chemical agent fipronil (active ingredient of acaricide Frontline®) on the liver of mice: an ultrastructural analysis. Microscopy Research and Technique. 75(2): 197-205. doi.org/10.1002/jemt.21043.

Ferreira SCR. 2020. Efeitos histopatológicos em fígado de pregado (*Scophthalmus maximus*) exposto cronicamente a concentrações ambientalmente realísticas de metais pesados. [Histopathological effects on the liver of turbot (*Scophthalmus maximus*) chronically exposed to environmentally realistic concentrations of heavy metals]. [dissertation]. Portuguese. Porto (PT): Universidade Fernando Pessoa. <https://bdigital.ufp.pt/handle/10284/9327>.

Ferro MCR. 2023. Relatório de Estágio Curricular: realizado no âmbito do mestrado integrado em ciências farmacêuticas. [Internship Report: conducted within the scope of the integrated master's degree in pharmaceutical sciences] [Report]. Portuguese. Porto (PT): Universidade do Porto. <https://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/10216/149063/2/620767.pdf>.

Fonsêca ADV, *et al.* 2022. Occurrence of tick-borne pathogens in dogs in a coastal region of the state of Ceará, northeastern Brazil. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária. 31(1):1-15. doi.org/10.1590/s1984-29612022010.

Furquim KCS, Bechara GH, Mathias-Camargo MI. 2008. Death by apoptosis in salivary glands of females of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). Experimental Parasitology. 119(2):152-163. doi.org/10.1016/j.exppara.2008.01.021.

Gonçalves IL, *et al.* 2021. Discovery, development, chemical diversity and design of isoxazoline-based insecticides. Bioorganic & Medicinal Chemistry. 30:115934-115946. doi.org/10.1016/j.bmc.2020.

Hebling, L. M. G. F. *et al.* Estudo dos efeitos de extratos de glândulas salivares de fêmeas de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) na resposta imunológica de hospedeiros pós inoculados. 2011. 117 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biologia Celular e Molecular, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Rio Claro, 2011. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/items/98122541-b790-40e4-bfa2-57baec2ec48a>.

Idilman IS, *et al.* 2016. Hepatic Steatosis: etiology, patterns, and quantification. Seminars In Ultrasound, CT and MRI. 37(6): 501-510. doi.org/10.1053/j.sult.2016.08.003.

Jia ZQ, *et al.* 2018. Acute toxicity, bioconcentration, elimination and antioxidant effects of fluralaner in zebrafish, *Danio rerio*. Environmental Pollution. 232:183-190. doi.org/10.1016/j.envpol.2017.09.032.

Junqueira LCU, Carneiro J. 2023. Histologia Básica: texto e atlas. 14ª ed. Rio de Janeiro (RJ): Guanabara.

Junqueira LCU, Junqueira LMMS. 1983. Técnicas básicas de citologia e histologia. São Paulo (SP): Santos.

Lessa MCS. 2022. Avaliação do fígado de ratos *Wistar* expostos de forma aguda ao herbicida bupiridílico diquat [Evaluation of the liver of Wistar rats acutely exposed to the bipyridyl herbicide diquat]. [Undergraduate Thesis]. Portuguese. Ouro Preto (MG): Universidade Federal

de Ouro Preto. <https://monografias.ufop.br/handle/35400000/4645>.

Lima FF de. 2013. Dieta hiperlipídica e/ou rica em sacarose em camundongos suíços: metabolismo de carboidratos, fígado e tecido adiposo [High-fat and/or high-sucrose diet in Swiss mice: carbohydrate metabolism, liver, and adipose tissue. [Dissertation]. Portuguese. Rio de Janeiro (RJ): Universidade do Estado do Rio de Janeiro. <https://www.bdt.d.uerj.br:8443/handle/1/7851>.

Mapara M, Thomas B, Bhat KM. 2012. Rabbit as an animal model for experimental research. Dental Research Journal. 9(2):111-118. doi.org/10.4103/1735-3327.92960.

Marques ES, et al. 2019. Cytotoxic effects of *Euterpe oleraceae* fruit oil (açai) in rat liver and thyroid tissues. Revista Brasileira de Farmacognosia. 29(1):54-61. doi.org/10.1016/j.bjp.2018.12.001.

Matos RS, et al. 2019. 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. 10(2): 314-320. doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.11.003.

Neves KR, et al. 2018. Hematúria associada à administração de ectoparasiticida à base de afoxolaner – relato de caso [anais]. XX Encontro Pós-Graduação (enpos)-semana 33 integradas UFPEL. Pelotas (RS): Universidade Federal de Pelotas. <https://wp.ufpel.edu.br/enpos/anais/anais-2018/>.

Nodari EF, et al. 2012. Degenerative process and cell death in salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) semi-engorged female exposed to the acaricide permethrin. Microscopy Research and Technique. 75(8):1012-1018. doi.org/10.1002/jemt.22025.

Pearse AGE. 1985. Histochemistry theoretical and applied. 3ª ed. Livingstone, Churchill.

Pereira CPM, et al. 2009. Effects of fipronil (active ingredient of Frontline®) on salivary gland cells of *Rhipicephalus sanguineus* females (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). Veterinary Parasitology. 166(1-2): 124-130. doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.08.015.

Remedio RN, et al. 2016. Morphological alterations in salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus* ticks (Acari: Ixodidae) exposed to neem seed oil with known *Azadirachta indica* concentration. Micron. 83: 19-31. doi.org/10.1016/j.micron.2016.01.004.

Roma GC, et al. 2010. Permethrin-induced ultrastructural changes in oocytes of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) semi-engorged females. Ticks And Tick-Borne Diseases. 1(2):113-123. doi.org/10.1016/j.ttbdis.2010.05.004.

Sauer JR, et al. 2000. Salivary glands in ixodid ticks: control and mechanism of secretion. J Insect Physiol. 46(7):1069-1078. [doi:10.1016/S0022-1910\(99\)00210-3](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(99)00210-3). Available from: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022191099002103?casa_token=V_2nmC30FbMAAAAA:NtLWyi7uSAW38ObR0tLLG0kGJP3fK7vK2BZZGcUn_Ym9QocYnmP2Gbd9zxmCYPouOjyS3RV4rMbD. Accessed 2024 Jul 12.

Sereno ASF. 2023. Relatório final de estágio curricular em prática veterinária, realizado junto

a Boehringer Ingelheim Saúde Animal Ltda em São Paulo – SP: revisão de literatura: uso de isoxazolinas como alternativa ao controle de ectoparasitas de animais de companhia [Final Internship Report in Veterinary Practice, conducted at Boehringer Ingelheim Animal Health Ltda in São Paulo – SP: literature review: use of isoxazolinas as an alternative for controlling ectoparasites in companion animals] [undergraduate thesis]. Portuguese. Jaboticabal (SP): Universidade Estadual Paulista. <https://repositorio.unesp.br/items/8ae52051-787f-4b5b-be2b-2700a97bad6e>.

Šlapeta J, *et al.* 2022. *Rhipicephalus linnaei* (Audouin, 1826) recognized as the “tropical lineage” of the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato: neotype designation, redescription, and establishment of morphological and molecular reference. Ticks And Tick-Borne Diseases. 13(1): 102024-102037.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2022.102024.

Sodelli LF, *et al.* 2023. Liver and spleen of hosts of *Rhipicephalus linnaei* exposed to synthetic (afoxolaner) and natural acaricides (esters from castor oil). A comparative clinical morphological study. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária. 32(1):1-13. doi.org/10.1590/s1984-29612023041.

Sonenshine DE, *et al.* 2014. Biology of Ticks. 2nd ed. New York: Oxford University Press. 2 vols. Available from: <https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=gck4AAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=SONENSHINE,+Daniel+E.+Biology+of+Ticks&ots=TdjAgzbR9b&sig=cFrPMNEPnZrcJshnUNpfZbpgMU8#v=onepage&q=SONENSHINE%2C%20Daniel%20E.%20Biology%20of%20Ticks&f=false>. Accessed 2024 Jul 12.

Souza JRL, 2019. Avaliação dos efeitos subletais do carvacrol na morfologia do integumento e do ovário de fêmeas de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (s.l.) (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) [dissertação] [Evaluation of the sublethal effects of carvacrol on the morphology of the integument and ovary of female *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (s.l.) ticks (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae)] [dissertation]. Portuguese. Rio Claro (SP): Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. <https://repositorio.unesp.br/server/api/core/bitstreams/ec1ac7d5-c8ea-4129-8ad1-be93755bed08/content>.

Vale TL. 2023. Controle dos parasitos do cão e avaliação do efeito carrapaticida do carvacrol [dissertação] [Control of dog parasites and evaluation of the acaricidal effect of carvacrol] [dissertation]. Portuguese. São Luís (MA): Universidade Federal do Maranhão. <http://www.tedeabc.ufma.br:8080/jspui/handle/tede/4746>.

CAPÍTULO 2

Avaliação morfohistológica e histoquímica dos efeitos dos carrapaticidas Simparic® (sintético) e Óleo de Girassol Ozonizado (Ozo3®) sobre as glândulas salivares de carrapatos do cão e sobre o tecido hepático de coelhas simulando hospedeiros

Eduarda Cristina Da Vinha^a, Elisa Franzoni de Pierro^a, Yousmel Alemán Gainza^a, Odaiza da Silva^a, Maria Izabel Camargo-Mathias^{a*}

^aDepartamento de Biologia Geral e Aplicada. Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), campus de Rio Claro, São Paulo, Brasil.

RESUMO

Os carrapatos têm representado um problema zoonótico relevante nos últimos anos, pois, além de espoliadores de seus hospedeiros, são vetores de muitos patógenos para animais domésticos e mesmo para o homem. A espécie *R. linnaei* tem como hospedeiro preferencial o cão, e suas infestações podem trazer prejuízos, não só para os mesmos, mas também para seus tutores. Para controlar os ectoparasitas a última geração de composto químico sintético é a classe das isoxazolinas e, dentre aqueles considerados naturais, pode ser aqui citado o ozônio, cujas propriedades incluem ser: bactericida, fungicida e esterilizante, e mais recentemente, sendo um interessante carrapaticida. No presente trabalho se investigou os efeitos dos carrapaticidas Simparic® (composto químico sintético) e do óleo de girassol ozonizado-Ozo3® (natural), sobre as glândulas salivares de carrapatos machos da espécie *R. linnaei* e sobre o tecido hepático de coelhas (modelos hospedeiros), para avaliar se e como alterações morfohistológicas e histoquímicas ocorreriam nos mesmos diante da exposição. Os resultados mostraram que o Simparic® alterou nas glândulas salivares, as formas dos ácinos que, de arredondados, passaram para irregulares, bem como desorganizou a distribuição dos grânulos secretores nas células, devido a presença de vacuolização citoplasmática. Muitos dos ácinos observados estavam rompidos em função do produto tóxico. A exposição ao Ozo3® provocou alterações que, além da intensa vacuolização nas células acinares, muitas vezes as mesmas não puderam mais serem observadas. No tecido hepático das coelhas, o Simparic® provocou alteração nos hepatócitos, notadas por vacuolização citoplasmática e presença de gotículas lipídicas, além de congestão sanguínea. O Ozo3® no tecido hepático, desorganizou a estrutura dos cordões de hepatócitos, e também provocou o surgimento de gotículas lipídicas no tecido. As análises clínicas, revelaram mostraram alterações hematológicas e bioquímicas discretas, não estando as mesmas acima dos

valores de referências ($p \leq 0.05$), exceto na urinálise, uma vez que todos os grupos estudados apresentaram hematúria, com destaque ao grupo Simparic[®], que teve a maior alteração. Os resultados indicam que o óleo ozonizado (Ozo3[®]) que causou um impacto mais significativo tanto nas glândulas salivares quanto no tecido hepático. O Simparic[®] (2,6-5mg/kg) também apresentou toxicidade, devido a presença de hematúria, todavia, os efeitos nas glândulas salivares e no tecido hepático foram menos extensos em comparação aos causados pelo óleo ozonizado. Esse estudo mostrou que os compostos químicos propostos para controle de carrapatos, tanto de origem sintética (Simparic[®]) quanto de origem natural (Ozo3[®]), foram eficientes como carrapaticidas, alterando a morfohistologia das glândulas salivares, degenerando-as precocemente, porém, ambos provocaram hepatotoxicidade nas coelhas hospedeiras.

Palavra-chave: *Rhipicephalus linnaei*, sarolaner, óleo ozonizado, glândula salivar, fígado, urinálise

ABSTRACT

Ticks have represented a significant zoonotic problem in recent years, as in addition to exploiting their host, they are vectors of many pathogens for domestic animals and even humans. The species *R. linnaei* has the dog as its preferred host, and their infestations can cause harm not only to them but also to their owners. To control ectoparasites, the latest generation of synthetic chemical compounds is the class of isoxazolines, and among those considered natural, ozone can be cited, whose properties include being bactericidal, fungicidal and sterilizing, and more recently, an interesting acaricide. In the present work, the effects of the acaricides Simparic® (synthetic chemical base) and ozonized sunflower oil- Ozo3® (Natural) were investigated on the salivary glands of male ticks of the species *R. linnaei* and on the liver tissue of rabbits (host models) to evaluate if and how morphohistological and histochemical alterations would occur upon exposure. The results showed that Simparic® altered the shapes of the acini in the salivary glands, changing from rounded to irregular, and disorganized the distribution of secretory granules in the cells due to cytoplasmic vacuolization. Many of the observed acini were ruptured due to the toxic product. Exposure to Ozo3® caused alterations including intense vacuolization in the acinar cells, often making them unobservable. In the liver tissue of the rabbits, Simparic® caused changes in hepatocytes, which presented cytoplasmic vacuolization and the presence of lipid droplets, in addition to blood congestion. Ozo3® in the liver tissue disorganized the structure of hepatocyte cords and also caused the appearance of lipid droplets in the tissue. Clinical analyses revealed slight hematological and biochemical alterations, not exceeding, reference values ($p \leq 0.05$), except in urinalysis, as all group presented hematuria, with the Simparic® group showing the most significant alteration. The results indicate that ozonated oil (Ozo®) caused a more significant impact on both the salivary glands and liver tissue. Simparic® (2,6-5mg/kg) also showed toxicity due to the presence of hematuria; however, the effects on the salivary glands and liver tissue were less extensive compared to those caused by ozonated oil. This study showed that these chemical compounds for tick control, both synthetic (Simparic®) and natural (Ozo3®), were efficient as acaricides, altering the morphohistology of the salivary glands and causing early degeneration. However, both caused hepatotoxicity in the host rabbits.

Keywords: *Rhipicephalus linnaei*, sarolaner, ozonized oil, salivary gland, liver, urinalysis

1.INTRODUÇÃO

Os carrapatos da espécie *Rhipicephalus linnaei*, popularmente conhecidos como “carrapatos marrons do cão”, têm como hospedeiros preferenciais os canídeos, porém, podem também parasitar outros alvos como o próprio homem (Vale, 2023). O *R. linnaei* (Audoin, 1826), uma linhagem tropical de *R. sanguineus s.l* (Šlapeta *et al.*, 2022), está amplamente distribuído, apresentando importância médica veterinária, pois, além de provocar no hospedeiro muito desconforto, supressão imunológica, e frequentes lesões cutâneas, (Andreotti *et al.*, 2016) os mesmos são vetores de diversas doenças (Šlapeta *et al.*, 2022), como *Ehrlichia canis* (erliquiose); *Rickettsia rickettsii*, entre outras hemoparasitoses (Fonseca *et al.*, 2022). A importância do *R. linnaei* também reside no fato de ser relevante epidemiológica e sanitariamente falando, o que leva os estudiosos a buscarem desenvolver, ou mesmo melhorar as estratégias já existentes de controle desses ectoparasitas (Andreotti *et al.*, 2016).

Para uma alimentação eficiente, carrapatos de forma geral precisam produzir uma saliva potente que tenha na sua composição bioativos, sintetizados e secretados pelas células/ácinos (estes últimos descritos como estruturas arredondadas e interconectadas por um sistema de ductos) das suas glândulas salivares, órgãos pares, que liberarão a saliva final para o hipóstomio, a qual será introduzida no corpo do hospedeiro, via inserção dessa estrutura na pele do mesmo. Dessa forma o perfeito funcionamento dessas glândulas é que permitirá que os ectoparasitas tenham sucesso no seu processo de alimentação e consequentemente no de reprodução o que garantirá a geração da prole, salientando que uma degeneração precoce desses órgãos traria um prejuízo enorme aos carrapatos (Furquim, *et al.* 2007; Camargo-Mathias *et al.*, 2018; Abreu *et al.*, 2020).

Diante deste cenário, atualmente as estratégias de controle desses ectoparasitas tem englobado o uso de carrapaticidas químicos sintéticos, os quais são apresentados no mercado veterinário sob diversas formulações como: comprimidos mastigáveis/ palatáveis, spots-ons (pipetas), sprays, e coleiras, intensamente comercializados devido à sua rápida eficácia e capacidade de prevenir reinfestações (Otranto *et al.*, 2014). No entanto, o uso contínuo desses produtos químicos tem causado diversos problemas que incluem aqueles no nível ambiental, bem como tem levado ao surgimento de cepas de carrapatos resistentes, ou seja, que não mais respondem aos compostos químicos, o que leva a indústria farmacêutica veterinária a estar em constante busca de novas formulações. Trabalhos que já foram anteriormente desenvolvidos, como o de Koc *et al.* (2021) por exemplo, detectaram resistência em *R. linnaei* quando estes foram expostos à permetrina, ao fipronil, bem como ao clorpirifós-metil. Essas informações

reforçaram a necessidade das indústrias veterinárias investirem na descoberta de novos fármacos que fossem eficazes, seguros e de fácil administração, o que recentemente culminou com a comercialização de uma classe de medicamentos veterinários para controle de carrapatos que tem a isoxazolinas como a molécula ativa das suas formulações (Serenio, 2023).

As isoxazolinas surgiram em meados de 2013, classe de fármaco com ação acaricida/carrapaticida neurotóxica, visto que suas moléculas bloqueiam os canais de cloro e de glutamato e os receptores neurotransmissores do GABA (ácido gama aminobutírico) dos invertebrados, resultando em hiperexcitação muscular, paralisia e, conseqüentemente, na morte imediata dos mesmos (Arruda, 2023). Atualmente, estão disponíveis no mercado veterinário várias opções de medicamentos formulados com isoxazolinas, incluindo: afoxolaner, esafoxolaner, fluralaner, sarolaner, lotilaner e tigolaner (Serenio, 2023), ressaltando-se que no presente trabalho, o medicamento teste escolhido foi o Simparic[®] (sarolaner), carrapaticida e inseticida, disponível na forma de comprimido mastigável e que vem demonstrando eficácia contra pulgas, carrapatos e ácaros (Andriotti, 2020), com persistência no sistema por aproximadamente um mês após a administração da dose única via oral (Scott *et al.*, 2017). Embora considerado seguro, poucas informações estão disponíveis sobre seus efeitos nos hospedeiros, e segundo Cherni *et al.* (2016), esse medicamento poderia provocar o surgimento de dermatite, eritema e mesmo letargia nos animais a ele expostos.

Diante da problemática dos efeitos colaterais causados pelo uso de produtos químicos sintéticos para o controle de carrapatos, atualmente tem-se buscado a extração de bioativos encontrados em plantas, os quais tem-se mostrado potentes carrapaticidas, em testes de laboratório realizados com extratos brutos ou óleos essenciais (Camargo-Mathias *et al.*, 2018). Além desses bioativos pesquisas que testaram o potencial carrapaticida do ozônio, mostraram ser esse uma alternativa promissora (Figueiredo, 2022; Abreu *et al.*, 2021).

O ozônio já vem sendo utilizado com fins medicinais desde a I Guerra Mundial, quando Albert Wolf obteve sucesso no tratamento de feridas infectadas em soldados alemães, visto as suas propriedades bactericida, fungicida e viricida, desinfetante e esterilizante (Ferreira *et al.*, 2013). O O₃ além de ser um agente terapêutico no tratamento de diversas doenças, ele é economicamente acessível (Campos *et al.*, 2007 *apud* Souza *et al.*, 2022, p.9). A associação do O₃ ao azeite de oliva, ao óleo de coco e ao óleo de girassol, permanece estável por um período de aproximadamente seis meses (Penido *et al.*, 2010 *apud* Souza *et al.*, 2022, p.9).

Pesquisas realizadas por diversos autores já demonstraram que o ozônio administrado no controle de *R. linnaei* foi eficaz como carrapaticida, especialmente quando associado ao óleo de girassol (Oliveira *et al.*, 2014). Segundo Abreu *et al.* (2021) também demonstraram os efeitos

tóxicos do ozônio quando associado a água e ao óleo, em bioensaios *in vivo* e *in vitro* com fêmeas adultas dessa espécie de carrapatos, bem como com células embrionárias das linhagens RML-RSE e ISE6, resultados que revelaram alterações biológicas e morfológicas nesses modelos. Cabe ainda ressaltar que o ozônio quando utilizado corretamente, quase não deixa resíduos no ambiente e não traz prejuízos aos animais ditos não alvos, além de contribuir com o não surgimento de resistência nos ectoparasitas (Figueiredo, 2022).

Quando o enfoque do controle de carrapatos recai sobre os efeitos dos produtos químicos sobre o sistema do próprio hospedeiro, poucas informações são encontradas sobre a toxicidade dos mesmos nos organismos não alvos. Desta forma, foi também objetivo do presente trabalho analisar o tecido hepático das coelhas hospedeiras expostas ao sarolaner (Simparic®) e ao óleo de girassol ozonizado (Ozo3®), visto ser o fígado um órgão essencial para os vertebrados, por realizar diversos processos metabólicos necessários para a manutenção da homeostase, nutrição e desintoxicação do animal, atuando na remoção e decomposição destas substâncias potencialmente tóxicas e circulantes na corrente sanguínea, bem como atuando no equilíbrio metabólico (Borley *et al.*, 2010). O fígado tem como sua unidade funcional o hepatócito, organizado em cordões/placas que estão interconectados e permeados por capilares sinusoides, bem como pelas células de Kupffer (macrófagos hepáticos) com função fagocitária (Junqueira *et al.*, 2023), informações estas que tornam esse órgão um excelente biomarcador para se detectar a ocorrência de toxicidade em função da exposição à produtos químicos de diversas naturezas.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

O presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos da exposição de machos de carrapatos *Rhipicephalus linnaei* (via análise das glândulas salivares), e de coelhas hospedeiras (via análise do fígado) às bases carrapaticidas: sintética- sarolaner componente do medicamento de uso veterinário Simparic[®], e natural- óleo ozonizado (Ozo3[®]) que já teve comprovada sua ação. Além disso, propôs-se a realizar a análise do sangue e da urina das coelhas expostas a esses mesmos carrapaticidas para investigar se esses poderiam atuar como agentes tóxicos ao sistema do hospedeiro.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar possíveis alterações morfohistológicas nas glândulas salivares dos machos de carrapatos *R. linnaei* após exposição ao carrapaticida sintético anteriormente citado e ao óleo ozonizado (natural), por meio da aplicação de técnicas histológica (HE) e histoquímicas (detecção de proteínas totais- azul de bromofenol e de polissacarídeos neutros- PAS);
- Avaliar histológica e histoquimicamente, utilizando as mesmas técnicas citadas no item anterior, a ação dos mesmos carrapaticidas (sintético e natural) sobre o tecido hepático das coelhas hospedeiras;
- Analisar o sangue (eritrócito, leucócito, eosinófilos, e enzimas hepáticas) e a urina (proteínas e hematúria microscópica) das coelhas hospedeiras expostas aos mesmos carrapaticidas para verificar se ocorreriam alterações nos parâmetros considerados como referência para coelhos da espécie *Oryctolagus cuniculus*, que pudessem indicar toxicidade.

3.MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Equipamentos e locais de realização dos estudos

Foram utilizados equipamentos disponíveis nas dependências do Laboratório de Microscopia do Departamento de Biologia Geral e Aplicada, Instituto de Biociências-Unesp, Rio Claro, (SP). Nesta instituição está implantada a **Brazilian Central of Studies on Ticks Morphology** (BCSTM), onde são mantidas colônias de carrapatos, sob a coordenação da Profa. Dra. Maria Izabel Souza Camargo.

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA) da UNESP de Rio Claro- SP, parecer nº 22/2023, e cadastrada no Conselho de Gestão do Patrimônio Genético sob o nºA72E1CB.

3.2 Obtenção do carrapaticida sintético (Isoxazolina)

O carrapaticida sintético utilizado foi o sarolaner (Simparic®), adquirido comercialmente, e administrado via comprimido às coelhas infestadas com *R. linnaei*.

3.3 Obtenção do carrapaticida natural

O carrapaticida natural utilizado foi o óleo de girassol ozonizado concentrado da marca Ozo3®, adquirido comercialmente, e administrado via tópica nas coelhas infestadas com *R. linnaei*.

3.4 Obtenção das coelhas hospedeiras

Utilizou-se 9 coelhas saudáveis do Grupo Genético Botucatu (3 coelhas/grupo), com peso entre 2,5 a 3 Kg, sem contato prévio com carrapatos ou com carrapaticidas, adquiridas do Biotério Central da Unesp/ Botucatu-SP e que foram alocadas em três grupos.

Controle (GC): foram infestadas com carrapatos machos e fêmeas, e não foram expostas aos acaricidas;

Sarolaner (Simparic®) (GS): foram infestadas com machos e fêmeas e expostas ao Simparic® via oral com administração de 1 comprimido contendo 10mg de sarolaner. Dose ideal para o peso do hospedeiro;

Óleo ozonizado (Ozo3[®]) (GO): foram infestadas com machos e fêmeas e expostas à 1mL ao Ozo3[®] por via tópica com aplicação de 1ml, contendo 9,6 mg/mL de ozônio, com base no trabalho de Castro (2023);

As coelhas foram mantidas em gaiolas galvanizadas e receberam água e ração comercial *ad libitum*

3.5 Obtenção dos Carrapatos

Os exemplares machos e fêmeas de *R. linnaei* foram fornecidos pela Dra. Simone Michaela Simon, do Instituto Butantã-SP, os quais foram colocados no interior de câmaras alimentadoras que foram coladas no dorso tosado das hospedeiras (Fig. 1).



Figura 1 (A-G): Fotografias demonstrando o passo a passo dos procedimentos realizados desde a tricotomia e colagem da câmara no dorso das coelhas hospedeiras (A-E), até a realização da infestação por *R. linnaei* (F-H) (Bechara, 1995; Hebling, 2011).

3.6 Infestação das coelhas com carrapatos *R. linnaei*

Foram colocados 25 casais de carrapatos *R. linnaei* em cada câmara alimentadora no dorso das coelhas, que aí permaneceram por um período de 7 dias, em sala do Biotério do Departamento de Biologia Geral e Aplicada do Instituto de Biociências da UNESP de Rio Claro, SP. Após esse período, apenas os machos foram coletados para análise das suas glândulas salivares. Cabe ressaltar que a escolha dos machos para o desenvolvimento desse trabalho deu-se em virtude de a maioria dos artigos publicados com essa temática, ter como foco as alterações glandulares que ocorrem nas fêmeas desses ectoparasitas.

3.7 Coelhas hospedeiras infestadas pelos carrapatos *R. linnaei* e expostas aos carrapaticidas: sarolaner e óleo ozonizado.

Após 7 dias de alimentação dos carrapatos nas coelhas, administrou-se às mesmas o químico sintético: sarolaner (comprimido mastigável), dose única, segundo indicação do fabricante, obtido do carrapaticida comercializado no mercado veterinário, Simparic® (10mg) respectivamente. Para tanto, exerceu-se uma leve pressão sobre os dois lados do osso mandibular das coelhas e na sequência colocou-se os comprimidos no interior da boca de cada uma delas.

Quanto ao Ozo3®, sua exposição foi tópica, aplicando 1mL, contendo 100 µg/mL de ozônio, no local da infestação, também por 7 dias, segundo protocolo de Castro (2023).

3.8 Análise clínica

Foram realizados exames laboratoriais com o objetivo de se observar se ocorreriam alterações bioquímicas, hematológicas e urinárias nas hospedeiras expostas tanto ao Sarolaner (Simparic®) quanto ao Ozo3®.

3.8.1 Obtenção das amostras de sangue e de urina

A coleta do sangue das coelhas deu-se por punção jugular utilizando-se seringa de 3mL e agulha 25x 0,08mm (estéril). As amostras foram colocadas em tubos secos com gel separador e tubos de EDTA da marca Vacutainer®. Essa parte do trabalho foi realizada pelas médicas veterinárias Tamara Maria Franzin Julio, CRMV nº47670 e Tassiana Ferreira de Mello, CRMV nº02445.

A urina foi coletada com auxílio do equipamento de ultrassom Aplio MX (Toshiba®), para a localização da bexiga, e por meio de uma seringa de 5mL e agulha 25x 7 mm para coleta do líquido.

Os exames foram realizados nas dependências do Laboratório CEDIVET na cidade de Rio Claro- (SP) pelas médicas veterinárias Tamara Maria Franzin Julio, CRMV nº47670 e Tassiana Ferreira de Mello, CRMV nº02445.

A coleta das amostras de sangue foi realizada no:

1º dia antes da infestação dos carrapatos (**D0**);

4º dia após a infestação dos carrapatos (**D1**);

7º dia após a exposição aos acaricidas sintéticos e natural (**D2**).

3.8.1.1 Urianálise

As análises da urina das coelhas contemplaram a avaliação dos níveis de proteínas, utilizando-se fita reativa Uri-Color Check WAMA®. Já a contagem das hemácias foi realizada microscopicamente, com auxílio de câmara de Neubauer da marca Blaubrand®.

A coleta da urina deu-se nos mesmos dias em que foram realizadas as coletas do sangue.

3.8.1.2 Exames bioquímico e hematológico

Foi avaliado o nível das enzimas hepáticas TGO ou AST (aspartato aminotransferase) e TGP ou ALT (alanina aminotransferase), após a exposição das coelhas aos carrapaticidas. Para tanto foi utilizado o equipamento URI 8031 e os reagentes da marca Bioclin®, seguindo os protocolos do fabricante

A análise hematológica, para contagem de eritrócitos, leucócitos e eosinófilos se deu com o auxílio dos equipamentos URIT 5160 Vet e Mithyc 18, por meio do método de impedância, citometria de fluxo (leitura óptica -laser) e microscopia (Coloração com Panótico Rápido).

3.8.1.2.1 Método de impedância

A contagem dos eritrócitos é feita no mesmo canal da contagem das plaquetas, sendo diferenciadas pelo volume ou pelo volume de índice de refração associados, ou por meio de fluorocromos. Em aparelhos hematológicos, as células sanguíneas são contadas e medidas com base nos impulsos elétricos gerados quando imersas em um meio condutor (solução eletrolítica). As células são orientadas em um fluxo laminar e interceptadas uma a uma por uma corrente elétrica. A quantidade de pulsos obtidos corresponde ao número de células contadas e a intensidade do pulso elétrico está relacionada ao tamanho da célula. Este método permite a contagem de eritrócitos, leucócitos e plaquetas. (Diniz, 2015).

3.8.1.2.2 Citometria de fluxo (leitura óptica -laser)

A citometria de fluxo é uma técnica que direciona elementos celulares por uma tubulação delgada, onde são envoltos em um solvente e passam pelo ponto de análise. Utiliza-se tecnologias como laser, corrente contínua para impedância e corrente em radiofrequência para quantificar e diferenciar as células. Nesta técnica, as células são suspensas e interceptadas individualmente por um feixe de luz (LASER), com a radiação desviada sendo reconhecida por fotossensores para formar características de complexidade e tamanho das células, expressas em um histograma. Este equipamento também apresenta inovações como o sistema de corrente direta e a ausência de foco hidrodinâmico. (Diniz, 2015).

3.8.1.2.3 Coloração com Panótico Rápido

O panótico é um kit de coloração rápida utilizado principalmente em hematologia e outros materiais biológicos evidenciando rapidamente a morfologia das células sanguíneas. O procedimento envolve preparar extensões sanguíneas (esfregaço) e submergir as lâminas em três soluções consecutivas. Primeiro, na solução nº 1, mantendo um movimento contínuo de cima para baixo ou para os lados durante 5 segundos (5 imersões de 1 segundo cada) e deixe escorrer bem. Em seguida, repita o processo com a solução nº 2, submergindo as lâminas e mantendo um movimento contínuo durante 5 segundos, deixando-as escorrer completamente. Por fim, repita novamente o procedimento com a solução nº 3. Após esses passos, lave as lâminas com água deionizada (preferencialmente tamponada a pH 7) e deixe-as secar ao ar na posição vertical (ABNT, 2015).

3.9 Análise estatística

As diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre as médias dos valores de eritrócitos, leucócitos, eosinófilos, TGP, TGO, hemácias e proteínas respectivamente, foram identificadas pela análise de variância unidirecional (One-Way), seguida do teste de comparação múltipla de Tukey (Minitab, LLC 22.1.0 para Windows).

3. 10 Análises morfológicas

3.10.1 Glândulas salivares dos machos de *R. linnaei*

Após coletados, os machos dos carrapatos, foram levados ao Laboratório de Microscopia do Departamento de Biologia Geral e Aplicada da UNESP de Rio Claro para serem anestesiados por choque térmico à temperatura de 4°C, e dissecados em placas de Petri contendo solução salina (7,5g de NaCl; 2,38g de Na₂HPO₄; 2,72g de KH₂PO₄; 1000mL de água destilada) sob gelo, para retirada das glândulas salivares e sua imediata fixação.

3.10.2 Obtenção das amostras dos fígado das coelhas

Após 15 dias da administração do carrapaticida sintético sarolaner (Simparic[®]) e do carrapaticida natural óleo de girassol ozonizado (Ozo3[®]) realizou-se a eutanásia das coelhas hospedeiras, em sala do Biotério do Departamento de Biologia Geral e Aplicada do Instituto de Biociências da UNESP de Rio Claro, SP, pelos médicos veterinários Brunna Fernanda Arraez Alvez, CRMV nº 26756 e Gabriel Correa de Camargo, CRMV nº 52730, fazendo para tanto uso de superdosagem de analgésicos (300mg/kg de cloridrato ketamina e 30mg/kg de cloridrato xilazina), via intraperitoneal, para retirada do fígado. Tão logo retirado, o mesmo foi fragmentado e os fragmentos imediatamente imersos no fixador histológico.

3.10.3 Histologia

3.10.3.1 Coloração pela hematoxilina de Harris-eosina aquosa (Junqueira; Junqueira, 1983).

Depois de coletadas as glândulas salivares, bem como os fragmentos do fígado, o

material foi imediatamente fixado em paraformaldeído 4% durante 48 horas. Na sequência foi lavado por três vezes em solução tampão fosfato de sódio (7,5g/L de NaCl; 2,38g/L de Na₂HPO₄ e 2,72 g/L de KH₂PO₄) 0.1M, pH 7,4) e posteriormente, desidratado em série crescente de álcool etílico 70%-95%, com banhos de 30 minutos cada. Após, foi embebido em historesina Leica por 5 dias, mantido em estufa 37° C e incluído em moldes plásticos contendo historesina mais polimerizador (Leica Historesin Kit[®]). Os blocos contendo o material foram seccionados com 3 µm de espessura em micrótomo Leica RM2265 (Leica[®]) e as secções foram recolhidas em lâminas de vidro previamente limpas, armazenadas em estufa e posteriormente coradas pela hematoxilina de Harris durante 10 minutos, com lavagem em água parada por 4 minutos e após, foram lavadas em água corrente. Depois, procedeu-se a coloração pela eosina aquosa por 5 minutos e novamente a lavagem em água corrente. As lâminas depois de coradas foram secas em temperatura ambiente até a montagem final para posterior análise e fotodocumentação no Laboratório de Microscopia do Departamento de Biologia Geral e Aplicada do IB, Unesp de Rio Claro, SP.

3.11 Histoquímica

3.11.1 Técnica de azul de bromofenol (Pearse, 1985) para detecção de proteínas totais

Depois da coleta das glândulas salivares e dos fragmentos do fígado, e imediata fixação do material em paraformaldeído 4%, procedeu-se o processamento histoquímico para detecção de proteínas totais. As lâminas contendo as secções tanto das glândulas quanto do fígado foram submetidas ao corante azul de bromofenol por uma hora à temperatura ambiente. Na sequência foram lavadas por 5 minutos em água corrente e secas à temperatura ambiente. As mesmas foram montadas com Entellan entre lamínula.

3.11.2 Reação pelo PAS (Ácido Periódico de Schiff) (Junqueira; Junqueira, 1983) para detecção de polissacarídeos neutros

As secções das glândulas salivares e dos fígados, foram reidratadas por 1 minuto em água destilada e transferidas para solução de ácido periódico 0,4% por 10 minutos. Em seguida foram lavadas em água destilada por 1 minuto, e imersas por 1 hora no reagente de Schiff. Foram lavadas 3 vezes em água sulfurosa em banhos de 1 minuto cada. Por fim, foram lavadas em água corrente. Depois da reação ocorrida, as lâminas foram secas à temperatura ambiente

até a montagem das mesmas com Entellan entre lamínula.

3.12 Análise das Lâminas e Fotodocumentação

Depois de montadas, as lâminas foram analisadas e fotodocumentadas em fotomicroscópio de luz de campo claro LEICA DM750 (Leica®) no Laboratório de Microscopia do Departamento de Biologia Geral e Aplicada da UNESP de Rio Claro, SP.

3.13 Confeção dos esquemas

Os esquemas foram confeccionados por Odaiza da Silva, a partir de imagens histológicas, com auxílio dos programas Graphics Suite 2023 e Canva Create 2023.

4. RESULTADOS

4.1 Análise hematológica

Os dados hematológicos obtidos das coelhas dos grupos: controle (**GC**), exposto ao Sarolaner (**GS**) e exposto ao óleo de girassol ozonizado (**GO**) estão dispostos nas Tabelas: 1 (eritrócitos), 2 (leucócitos) e 3 (eosinófilos) juntamente com os respectivos valores de referência.

Em todos os grupos analisados verificou-se que os valores de eritrócitos, leucócitos e eosinófilos muito embora estivessem dentro dos parâmetros de referência estabelecidos por Meredith et al. (2016), tiveram diferenças significativas entre os grupos e entre os dias da realização dos bioensaios (Tabelas 1-3)

Os valores médios de eritrócitos no GS foram os mais significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) dos outros grupos aqui testados. No D0, os valores de GC e GO estavam próximos, enquanto os do GS foram mais altos. No D1, todos os grupos apresentaram uma redução nos níveis de eritrócitos, com o GO mostrando redução mais acentuada. No D2, os níveis de eritrócitos de todos os grupos sofreram um aumento, sendo que no GS esse aumento foi maior (Tabela 1).

No caso dos leucócitos, no D0, o GO apresentou o maior nível de leucócitos, estando os GS e GC próximos. No D1, todos os grupos tiveram um aumento nos níveis de leucócitos, sendo que o GS apresentou o maior valor. No D2, em todos os grupos os níveis de leucócitos aumentaram, e o GC apresentou uma discreta redução em relação ao D1 (Tabela 2).

Para os eosinófilos verificou-se que no D0 os níveis de todos os grupos estavam próximos. No D1, somente o GS apresentou um aumento. No D2, todos os grupos tiveram uma elevação dos valores, com o GS apresentando o maior valor entre os grupos (Tabela 3).

Tabela 1. Dados dos Eritrócitos das coelhas expostas ao sarolaner (Simparic®) e ao óleo ozonizado (Ozo3®). $10^{12}/L = \times 10^{12}$ por litros. N° (amostra)= 3 por grupo. **D0**= 1° dia antes da infestação por carrapatos *R. linnaei*; **D1**= 4° dia de infestação; **D2** =7° dia após a coleta dos carrapatos e administração das medicações.

Letras maiúsculas na mesma coluna indicam diferenças estatísticas entre os grupos de tratamento para um mesmo dia de coleta; letras minúsculas nas mesmas filas indicam diferenças significativas entre os dias de coleta no mesmo grupo Anova One-way e Tukey, com $p \leq 0.05$ como nível de significância.

Grupos	D0	D1	D2	Referência
Grupo Controle (GC)	$5,11 \pm 0,35^{Ba}$	$5,06 \pm 0,16^{Ca}$	$6,01 \pm 0,18^{Ba}$	
Sarolaner (Simparic®) (GS)	$6,33 \pm 0,34^{ABa}$	$5,86 \pm 0,18^{Ba}$	$6,16 \pm 0,25^{ABa}$	5,1 a $7,6 \cdot 10^{12}/L$
Óleo Ozonizado (Ozo3®) (GO)	$5,73 \pm 0,31^{ABa}$	$5,36 \pm 0,14^{BCa}$	$5,70 \pm 0,12^{Ba}$	
Referência: (Meredith <i>et al.</i> , 2016)				

Tabela 2. Dados dos Leucócitos das coelhas expostas ao sarolaner (Simparic®) e ao óleo ozonizado (Ozo3®). $10^9/L = \times 10^9$ por litros. N° (amostra)= 3 por grupo. **D0**= 1° dia antes da infestação por carrapatos *R. linnaei*; **D1**= 4° dia de infestação; **D2** =7° dia após a coleta dos carrapatos e administração das medicações.

Letras maiúsculas na mesma coluna indicam diferenças estatísticas entre os grupos de tratamento para um mesmo dia de coleta; letras minúsculas nas mesmas filas indicam diferenças significativas entre os dias de coleta no mesmo grupo Anova One-way e Tukey, com $p \leq 0.05$ como nível de significância.

Grupos	D0	D1	D2	Referência
Grupo Controle (GC)	$5,80 \pm 0,35^{ABb}$	$7,07 \pm 0,18^{Aa}$	$7,03 \pm 0,23^{Aa}$	
Sarolaner (Simparic®) (GS)	$5,90 \pm 0,35^{ABa}$	$8,64 \pm 1,68^{Aa}$	$8,90 \pm 1,76^{Aa}$	5,2 a $12,5 \cdot 10^9/L$
Óleo Ozonizado (Ozo3®) (GO)	$6,80 \pm 0,35^{Aa}$	$6,83 \pm 0,43^{Aa}$	$8,80 \pm 1,62^{Aa}$	
Referência: (Meredith <i>et al.</i> , 2016)				

Tabela 3. Dados dos Eosinófilos das coelhas expostas ao sarolaner (Simparic®) e óleo ozonizado (Ozo3®). % = porcentagem de eosinófilos presentes nos leucócitos totais. N° (amostra)= 3 por grupo. **D0**= 1º dia antes da infestação com carrapatos *R. linnaei*; **D1**= 4º dia de infestação; **D2** =7º dia após a coleta dos carrapatos e administração das medicações.

Letras maiúsculas na mesma coluna indicam diferenças estatísticas entre os grupos de tratamento para um mesmo dia de coleta; letras minúsculas nas mesmas filas indicam diferenças significativas entre os dias de coleta no mesmo grupo Anova One-way e Tukey, com $p \leq 0.05$ como nível de significância.

Grupos	D0	D1	D2	Referência
Grupo Controle (GC)	0,00 ± 0,00 ^{Aa}	0,00 ± 0,00 ^{Aa}	0,67 ± 0,00 ^{Aa}	
Sarolaner (Simparic®) (GS)	0,00 ± 0,00 ^{Aa}	0,67 ± 0,00 ^{Aa}	2,00 ± 0,00 ^{Aa}	1 a 4%
Óleo Ozonizado (Ozo3®) (GO)	0,00 ± 0,00 ^{Aa}	0,00 ± 0,00 ^{Aa}	0,67 ± 0,00 ^{Aa}	
Referência: (Meredith <i>et al.</i> , 2016)				

4.2 Análise Bioquímica

Os dados bioquímicos das enzimas AST ou TGO (aspartato aminotransferase) e ALT ou TGP (alanina aminotransferase) obtidos das coelhas dos grupos: controle (**GC**), exposto ao Sarolaner (**GS**) e exposto ao óleo de girassol ozonizado (**GO**) estão dispostos nas tabelas: 4 (TGO) e 5 (TGP) juntamente com os respectivos valores de referência.

Todos os valores encontrados para AST (TGO) e ALT (TGP) estavam dentro dos parâmetros de referência estabelecidos por Meredith et al. (2016), porém algumas diferenças significativas foram observadas entre os grupos e os dias da realização do bioensaio.

Os valores médios de AST (TGO), no D0, em todos os grupos foram próximos. No D1, todos os grupos apresentaram um aumento discreto, e no D2, todos tiveram seus níveis reduzidos, sendo que o GO foi onde se observou a maior redução (Tabela 4).

No D0, os valores médios de ALT (TGP) de todos os grupos estavam próximos. No D1, apenas o grupo óleo ozonizado (GO) apresentou uma redução, enquanto o GC e GS elevaram seus níveis de ALT (TGP), com destaque ao grupo GS que teve o maior valor. No D2, todos os grupos apresentaram uma redução nos níveis da enzima ALT (TGP) (Tabela 5).

Tabela 4. Dados da enzima aspartato aminotransferase AST (TGO) obtidos das coelhas expostas ao sarolaner e ao óleo de girassol ozonizado. U/L= Unidade por litro. N° (amostra)= 3 por grupo. **D0**= 1 dia antes do contato com carrapato *R. linnaei*; **D1**= 4° dia de infestação; **D2**=7° dia após a coleta dos carrapatos e administração da medicação.

Letras maiúsculas na mesma coluna indicam diferenças estatísticas entre os grupos de tratamento para um mesmo dia de coleta; letras minúsculas nas mesmas filas indicam diferenças significativas entre os dias de coleta no mesmo grupo Anova One-way e Tukey, com $p \leq 0.05$ como nível de significância.

Grupos	D0	D1	D2	Referências
Grupo Controle (GC)	37,70 ± 1,20 ^{Aa}	43,67 ± 1,12 ^{Aa}	31,67 ± 1,20 ^{Aa}	
Sarolaner (Simparic®) (GS)	35,33 ± 1,62 ^{Aa}	37,67 ± 1,14 ^{Aa}	33,33 ± 2,00 ^{Aa}	10-78 UI/L
Óleo Ozonizado (Ozo3®) (GO)	34,67 ± 1,62 ^{Aa}	35,33 ± 1,15 ^{Aa}	24,00 ± 1,00 ^{Aa}	
Referência: (Meredith <i>et al.</i> , 2016)				

Tabela 5. Dados obtidos da enzima alanina aminotransferase ALT (TGP) das coelhas expostas ao sarolaner e óleo de girassol ozonizado. U/L= Unidade por litro. N° (amostra)= 3 por grupo. **D0**= 1 dia antes do contato com carrapato *R. linnaei*; **D1**= 4° dia de infestação; **D2**=7° dia após a coleta dos carrapatos e administração da medicação.

Letras maiúsculas na mesma coluna indicam diferenças estatísticas entre os grupos de tratamento para um mesmo dia de coleta; letras minúsculas nas mesmas filas indicam diferenças significativas entre os dias de coleta no mesmo grupo Anova One-way e Tukey, com $p \leq 0.05$ como nível de significância.

Grupos	D0	D1	D2	Referência
Grupo Controle (GC)	56,33 ± 1,62 ^{Aa}	58,70 ± 1,65 ^{Aa}	50,00 ± 1,60 ^{Aa}	
Sarolaner (Simparic®) (GS)	63,67 ± 1,20 ^{Aa}	64,30 ± 1,20 ^{Aa}	58,67 ± 1,20 ^{Aa}	27,4- 72,2 UI/L
Óleo Ozonizado (Ozo3®) (GO)	62,67 ± 1,20 ^{Aa}	53,30 ± 1,62 ^{Aa}	51,33 ± 1,83 ^{Aa}	
Referência: (Meredith <i>et al.</i> , 2016)				

4.3 Urianálise

Os dados obtidos da presença de hemácias e de proteínas na urina das coelhas dos grupos **GC**, **GS** e **GO** estão dispostos nas Tabelas: 6 (Hemácia) e 7 (Proteínas) com os respectivos valores de referências.

Os valores médios das hemácias na urina de todos os grupos apresentaram níveis acima dos valores de referência, com destaque para o grupo Sarolaner (GS), que apresentou o maior valor entre os grupos.

No D0, o GO apresentou valor maior que o dos outros grupos, enquanto os GC e GS estavam dentro dos valores de referência. No D1, houve um aumento dos níveis de hemácias em todos os grupos. No D2, o GS teve um aumento ($p \leq 0,05$), enquanto o GC e GO tiveram uma redução dos valores de hemácias (Tabela 6).

Os valores médios de proteínas na urina no D0, não sofreram alterações. No D1 os níveis do GC aumentaram, os do GS reduziram, e do GO não se alterou. No D2, todos os grupos apresentaram redução nos níveis de proteínas (Tabela 7).

Tabela 6. Dados obtidos da presença das hemácias na urina das coelhas expostas aos carrapaticidas sarolaner e óleo de girassol ozonizado. Campos= hemácias encontradas por campo. N° (amostra)= 3 por grupo. **D0**= 1° dia antes do contato com carrapato *R. linnaei*; **D1**= 4° dia de infestação; **D2**= 7° dia após a coleta dos carrapatos e administração das medicações.

Letras maiúsculas na mesma coluna indicam diferenças estatísticas entre os grupos de tratamento para um mesmo dia de coleta; letras minúsculas nas mesmas filas indicam diferenças significativas entre os dias de coleta no mesmo grupo Anova One-way e Tukey, com $p \leq 0,05$ como nível de significância.

Grupos	D0	D1	D2	Referência
Grupo Controle (GC)	0,33 ± 0,30 ^{Aa}	1,33 ± 0,88 ^{Aa}	1,00 ± 0,58 ^{Aa}	
Sarolaner (Simparic®) (GS)	0,33 ± 0,30 ^{Aa}	1,67 ± 1,20 ^{Aa}	2,33 ± 0,88 ^{ABa}	ausente
Óleo Ozonizado (Ozo3®) (GO)	1,33 ± 1,31 ^{Aa}	1,33 ± 0,88 ^{Aa}	1,00 ± 0,00 ^{Aa}	

Referência: (Meredith *et al.*, 2016)

Tabela 7. Dados obtidos da presença das proteínas encontradas na urina das coelhas expostas aos carrapaticidas sarolaner e óleo de girassol ozonizado. Mg/dL= miligrama por decilitro. N° (amostra)= 3 por grupo. **D0**= 1° dia antes do contato com carrapato *R. linnaei*; **D1**= 4° dia de infestação; **D2**= 7° dia após a coleta dos carrapatos e administração das medicações.

Letras maiúsculas na mesma coluna indicam diferenças estatísticas entre os grupos de tratamento para um mesmo dia de coleta; letras minúsculas nas mesmas filas indicam diferenças significativas entre os dias de coleta no mesmo grupo Anova One-way e Tukey, com $p \leq 0,05$ como nível de significância.

Grupos	D0	D1	D2	Referência
Grupo Controle (GC)	16,67 ± 0,43 ^{Db}	23,33 ± 1,11 ^{Aa}	16,67 ± 0,33 ^{Cb}	
Sarolaner (Simparic®) (GS)	26,67 ± 1,01 ^{Ba}	23,33 ± 1,11 ^{Ab}	23,33 ± 0,55 ^{Bb}	59mg/dL
Óleo Ozonizado (Ozo3®) (GO)	23,33 ± 1,01 ^{Ca}	23,33 ± 1,11 ^{Aa}	16,67 ± 0,33 ^{Cb}	

Referência: (Meredith *et al.* 2016)

4.4 Morfologia

4.4.1 Glândulas salivares de carrapatos machos da espécie *R. linnaei*

4.4.1.1 Grupo Controle

Os resultados morfohistológicos obtidos no presente estudo, que avaliou as glândulas salivares dos carrapatos machos da espécie *R. linnaei*, que não foram expostos a nenhum dos carrapaticidas aqui estudados, mostraram tecido glandular preservado no Grupo Controle (**GC**), com ácinos glandulares com sua morfologia arredondada típica e com células apresentando limites bem definidos. Nos ácinos granulares, as células secretoras mostraram citoplasma preservado, inclusive os grânulos aí presentes originários da síntese dessas células, também estavam íntegros (Figs. 2A, B, E). Ainda nas células verificou-se que núcleos e nucléolos, os quais foram bem-marcados pela HE também se encontravam preservados (Fig. 2E).

Na aplicação da técnica histoquímica para detecção de proteínas, pode-se confirmar essa integridade do tecido glandular e das suas células. Os ácinos mantiveram-se preservados, apresentando no seu interior células secretoras fortemente marcadas para esse elemento químico. As granulações apresentaram forte positividade (Fig. 2H), e distribuídas homogeneamente pelo citoplasma.

Ainda no **GC**, a técnica histoquímica para detecção de polissacarídeos neutros, também mostrou células secretoras com seus limites preservados, com grânulos PAS fortemente positivos, distribuídos por todo citoplasma (Fig. 2K).

4.4.1.2 Grupo Sarolaner (Simparic®) (GS)

A histologia aplicada nas glândulas salivares dos carrapatos machos da espécie *R. linnaei* que foram expostas ao sarolaner (**GS**), mostrou alterações nos ácinos, os quais originalmente teriam a forma arredondada e que após a exposição passaram a irregulares (Figs. 2A, C, F).

As células secretoras presentes no interior dos ácinos granulares exibiram desorganização dos grânulos secretores, devido a presença de vacuolização citoplasmática (Fig. 2C, F). Pode-se ainda notar que alguns ácinos pareciam estar sendo rompidos, e consequentemente tendo seu conteúdo extravasado (Fig. 2C). Os núcleos das células secretoras também sofreram alterações, mostrando certa picnose, e ainda, muitas vezes não sendo mais

observados, bem como seus nucléolos, reforçando a toxicidade do medicamento para o ectoparasita (Fig. 2F).

A técnica do azul de bromofenol, confirmou esses dados, e deixou evidente a desorganização tanto acinar quanto citoplasmática, bem como a presença de muitos vacúolos (Fig. 2I).

Para a detecção de polissacarídeos esse mesmo cenário foi observado, e a técnica evidenciou apenas algumas células acinares com forte marcação PAS positiva, ao contrário do observado no GC (Fig. 2L).

4.4.1.3 Grupo Ozo3[®] (óleo de girassol ozonizado) (GO)

Nesse grupo todas as técnicas empregadas deixaram claro que a aplicação do óleo de girassol ozonizado, alterou significativamente as glândulas salivares dos ectoparasitas (Figs. 2A, D,G). Por meio da histologia pode-se observar que os limites das células acinares não puderam mais ser identificados, devido a extensão dos danos provocados pela exposição. Além disso, intensa vacuolização citoplasmática, se instalou no interior do ácino e das células, além de núcleos e nucléolos também terem sido alterados (Fig.2 D, G).

A técnica histoquímica para detecção de proteínas confirmou os dados histológicos e mostrou que apenas algumas células ainda apresentaram forte positividade ao corante aplicado (Fig. 2J). A técnica para detecção de polissacarídeos, mostrou ausência de células secretoras abrigando no seu citoplasma grânulos polissacarídicos, tendo sido detectados apenas restos celulares com alguma marcação positiva (Fig. 2M).

Figura 2: Esquema ilustrativo (**A**) mostrando a morfologia de parte de uma glândula salivar de carrapato e secções histológicas (**B-M**) das glândulas dos carrapatos machos da espécie *R. linnaei* expostos ao sarolaner (Simparic[®]) (**GS**) (**C,F,I,L**) e ao óleo ozonizado Ozo3[®] (**GO**) (**D,G,J,M**), bem como do grupo controle (**GC**) (**B,E,H,K**).

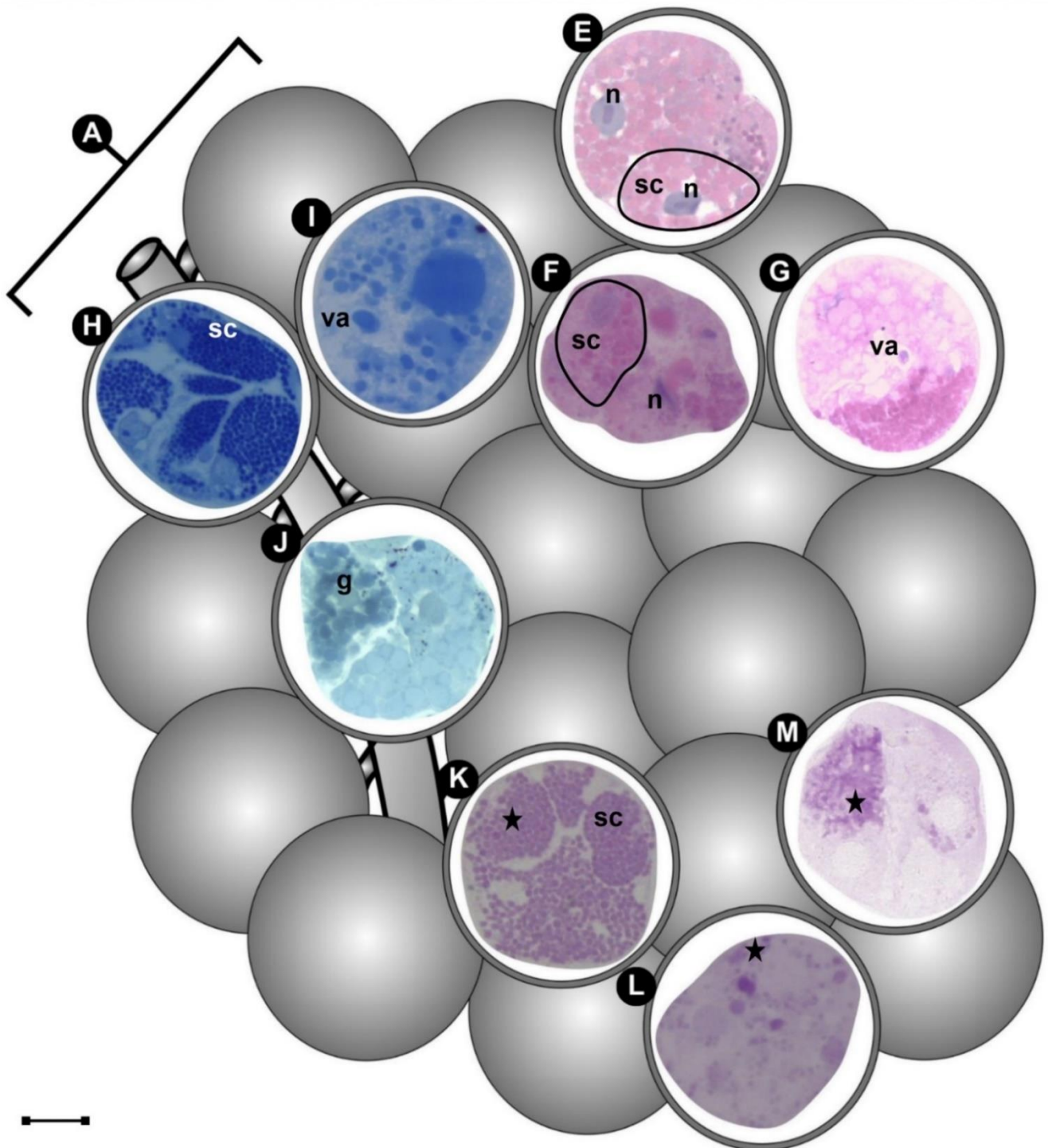
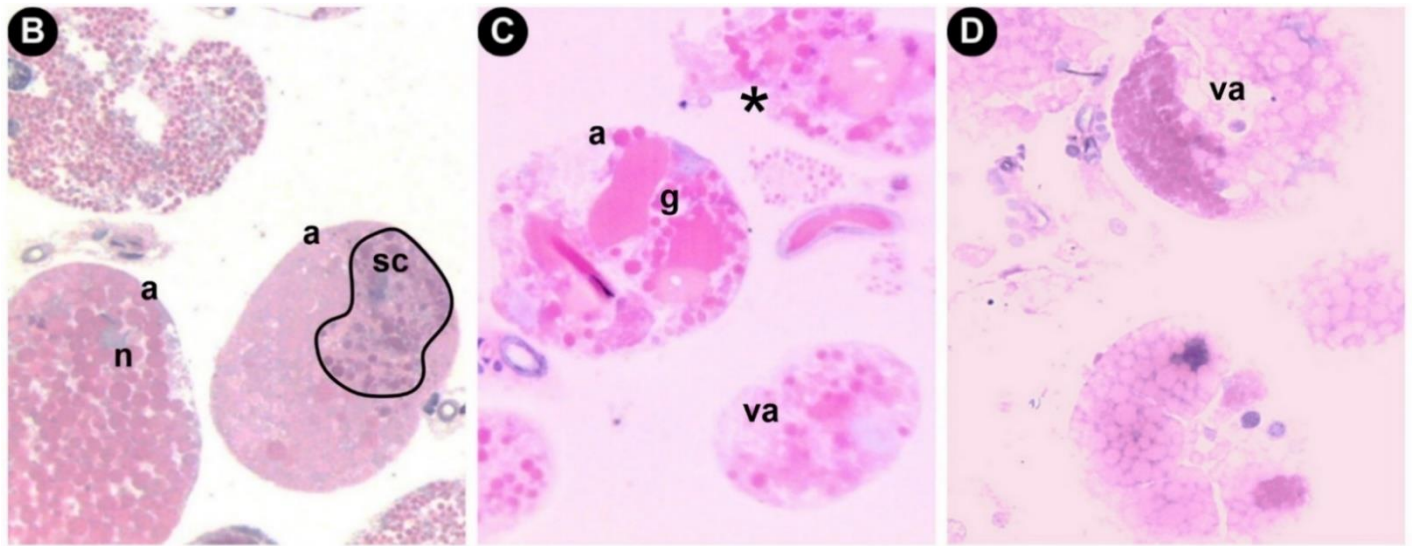
B-G = hematoxilina-eosina para verificação da organização geral do tecido;

H-J= azul de bromofenol para detecção/marcação de proteínas totais;

K-M = reação pelo PAS para detecção/marcação de polissacarídeos neutros;

a= ácino, **n**= núcleo, **sc**= célula secretora, **g**= grânulos secretores, **va**= vacuolização citoplasmática, **asterisco**= ácino rompido, **estrela**= grânulos polissacarídicos.

Barra de escala = 50 µm.



4.4.2 Histologia do fígado das coelhas hospedeiras

Nessa etapa do trabalho foram analisados os resultados obtidos da histologia e da histoquímica do tecido hepático das coelhas hospedeiras, tanto expostas aos carrapaticidas quanto as não expostas (para fins de comparação). As mesmas foram para tanto distribuídas em 3 grupos, a saber: **GC** (Controle), **GS** (expostas ao Sarolaner- Simparic®) e **GO** (expostas ao Óleo Ozonizado (Ozo3®).

4.4.2 .1 Grupo Controle (GC)

Os resultados histológicos mostraram que o tecido hepático dessas coelhas, como já era esperado, apresentou-se íntegro, com distribuição regular dos hepatócitos em cordões/placas (Fig. 3A). Os hepatócitos estavam com seus limites celulares bem definidos, além da presença de um ou dois núcleos, arredondados, com cromatina dispersa, em cada um deles (Fig. 3A).

Entre os cordões de hepatócitos, pode-se verificar a presença de células de Kupffer, as quais foram evidenciadas pelos seus núcleos alongados e fortemente marcados pela hematoxilina (Fig. 3A).

A aplicação do teste histoquímico para detecção de proteínas totais, confirmou essa organização mostrada pela histologia, deixando evidente a forte marcação no citoplasma e no núcleo dos hepatócitos (Fig. 3D). Os núcleos das células de Kupffer também foram fortemente marcados (Fig. 3D).

A aplicação do teste histoquímico PAS para detecção de polissacarídeos neutros, mostrou no tecido hepático marcação heterogênea no citoplasma dos hepatócitos, ou seja, alguns deles se apresentaram mais fortemente marcados do que outros, configuração típica desse tipo de tecido (Fig. 3G). Devido a especificidade da técnica, nem os núcleos dos hepatócitos e nem os das células de Kupffer foram evidenciados.

4.4.2.2 Grupo Sarolaner (Simparic®) (GS)

O resultado histológico para o tecido hepático das coelhas expostas ao sarolaner, evidenciou a distribuição em cordões de hepatócitos que ainda puderam ser distinguidos (Fig. 3B), no entanto, observou-se que os hepatócitos, na sua grande maioria apresentou citoplasma totalmente vacuolizado (Fig. 3B), e ainda, além da vacuolização alguns deles apresentaram gotículas lipídicas dispersas pela célula (Fig. 3B). Os núcleos dos mesmos estavam

aparentemente íntegros e com cromatina dispersa (Fig. 3B). Os núcleos das células de Kupffer puderam ser evidenciados por entre os cordões de hepatócitos e com forte marcação positiva para hematoxilina (Fig. 3B). Nesse grupo pode-se observar que houve maior presença de células sanguíneas por entre os cordões hepáticos (leve congestão sanguínea) (Fig. 3B)

A aplicação da técnica para detecção de proteínas, deixou ainda mais evidente nesse grupo, a extensa vacuolização citoplasmática encontrada nos hepatócitos (Fig. 3E), contrariando o que foi obtido no **GC** e confirmando que o químico sintético agrediu de forma significativa o tecido hepático. Não foram observados os núcleos das células de Kupffer.

A técnica para detecção de polissacarídeos neutros (PAS), evidenciou que, também, ao contrário do observado no **GC**, nesse grupo, os hepatócitos reagiram com mais forte positividade, indicando a grande ocupação do citoplasma dos mesmos pela granulação polissacarídica (Fig. 3H).

4.4.2.3 Grupo Ozo3® (Óleo Ozonizado) (GO)

Os resultados histológicos encontrados para o tecido hepático das coelhas expostas ao óleo ozonizado (Ozo3®) revelaram que esse composto provocou uma total desorganização do tecido (Fig. 3C). Cordões/placas de hepatócitos não puderam mais ser observados, assim como os limites celulares dos hepatócitos (Fig. 3C), os quais perderam sua forma original cúbica e passaram a ser totalmente irregulares e com citoplasma completamente vacuolizado (Fig. 3C), vacuolização esta que também pode ser observada por entre os hepatócitos (Fig. 3C). Os núcleos dos hepatócitos também foram severamente alterados e notou-se que a cromatina não estava mais dispersa e sim totalmente aderida à membrana interna dos mesmos, caracterizando a marginalização cromatínica, indicativo de células que estão em processo de morte (Fig. 3C). Alguns núcleos de células de Kupffer puderam ainda ser observados, porém os mesmos estavam com tamanho reduzido quando comparados aos do **GC** (Fig. 3C)

A técnica histoquímica para detecção de proteínas, além de confirmar os resultados histológicos com relação a desorganização tecidual e a vacuolização tanto intra quanto intercelular, também deixou evidente que em muitos dos hepatócitos os núcleos estavam completamente irregulares e outros ainda picnóticos (Fig. 3F), resultados que deixaram claro a toxicidade do óleo ozonizado.

A técnica para detecção de polissacarídeos, ao contrário do observado nos grupos **GC** e **GS**, mostrou fraca positividade dos hepatócitos para o PAS, evidenciando o pouco acúmulo de polissacarídeos no citoplasma dessas células (Fig. 3I), e ainda em algumas delas até mesmo

com a ausência dos mesmos.

Figura 3: Secções histológicas (**A-I**) do fígado de coelhas do grupo controle **GC (A,D,G)**, do grupo exposto ao Simparic[®] **GS (B,E,H)** e do grupo exposto ao Ozo3[®] **GO (C,F,I)**.

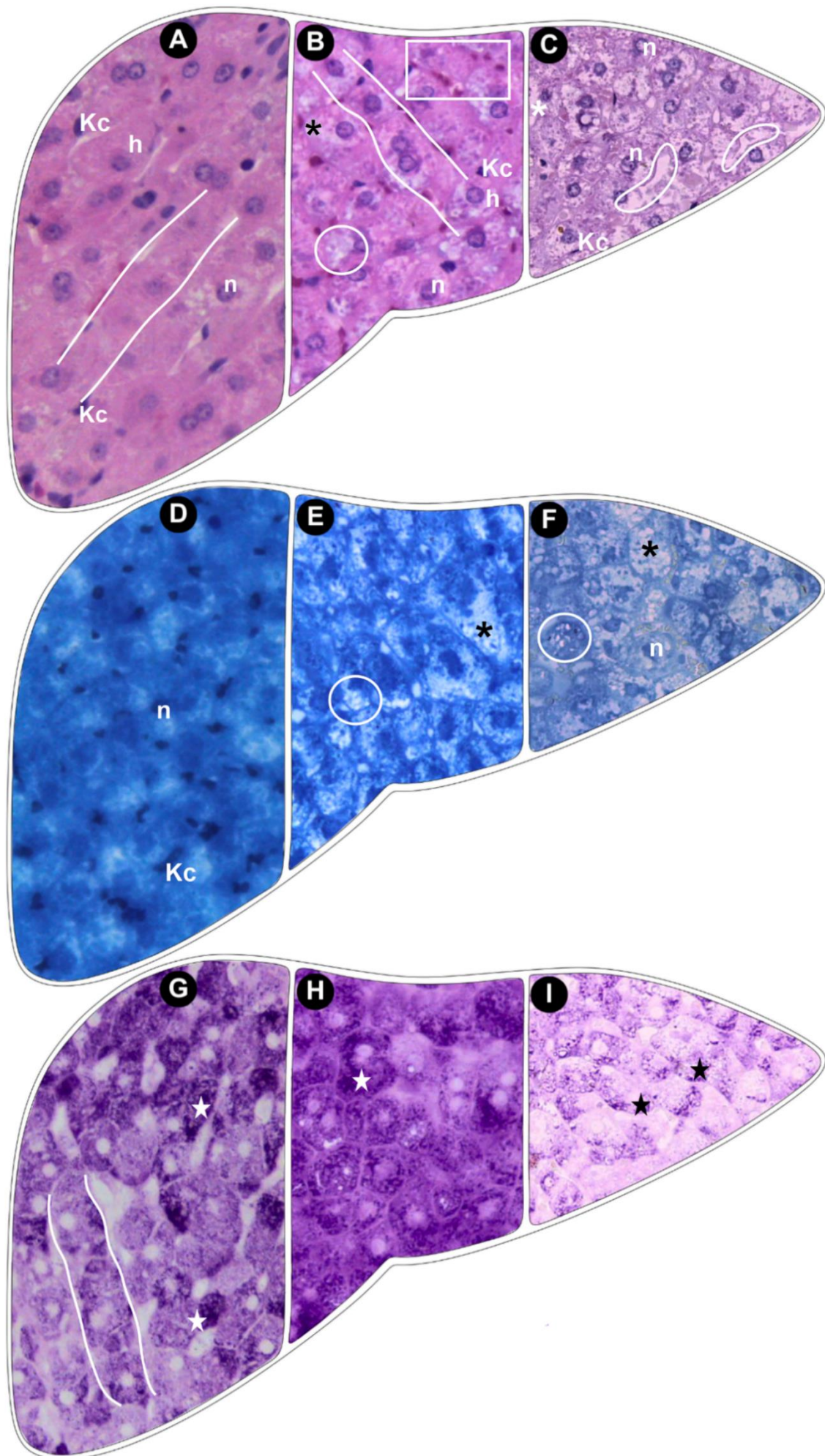
A-C= hematoxilina-eosina para verificação da organização geral do tecido;

D-F= azul de bromofenol para detecção/marcação de proteínas totais;

G-I= reação pelo PAS para detecção/marcação de polissacarídeos neutros;

h= hepatócitos, **n**= núcleo de hepatócitos, **Kc**= células de Kupffer, **asteriscos**= vacuolização citoplasmática, **retângulo**= congestão sanguínea, **linhas**= cordões de hepatócitos, **estrela**= polissacarídeos, **círculo**= gotículas de lipídios no citoplasma do hepatócito, **traçado oval**= vacuolização intercelular.

Barra de escala = 50 µm.



5. DISCUSSÃO

O *Rhipicephalus linnaei*, popularmente conhecido como “carrapato marrom do cão”, é um ectoparasita que têm ganhado destaque por parasitar animais de companhia que convivem intimamente com os seres humanos. Esses carrapatos têm ultrapassado as barreiras zoogeográficas e, além de espoliadores dos seus hospedeiros, são também transmissores de diversos patógenos de importância médico veterinária (Schnittger *et al.*, 2012 *apud* Fonsêca *et al.*, 2022, p.2), o que leva os pesquisadores a buscarem novas estratégias que contribuam para o controle dos mesmos. No cenário atual, o que vem sendo utilizado no controle desses artrópodes são os produtos químicos formulados a partir de bases de natureza sintética, e alguns ainda sendo formulados a partir de bioativos extraídos ou de plantas ou mesmo de outros animais (Andreotti *et al.*, 2016).

Nesse sentido, muitos autores têm desenvolvido estudos com essa temática. Aqueles de Koc *et al.* (2021), já demonstraram que o *R. linnaei* vem apresentando resistência a medicamentos com bases químicas sintéticas como a permetrina, o fipronil, e clorpirifós-metil, Eiden *et al.* (2015). Uma vez que há uma problemática que aborda a aquisição de resistência aos produtos químicos aplicados no controle, por parte dos carrapatos, isso obriga os fabricantes de produtos veterinários que a determinados intervalos de tempo esses compostos sejam substituídos por outros, mais eficientes (Garcia *et al.*, 2021).

Diante disso, nos últimos anos, vem sendo estudada uma nova classe de fármacos para uso no controle de pragas de animais, conhecida como isoxazolina, cuja ação no carrapato é de caráter neurotóxico (Gonçalves *et al.*, 2021), podendo aqui ser citado (além de muitos outros) o Simparic[®], o qual tem como composto ativo o sarolaner.

Os estudos de maneira geral que tratam da eficácia desses produtos, sob o aspecto morfológico, tanto nos carrapatos quanto nos hospedeiros, ainda são escassos (Camargo-Mathias *et al.*, 2013, 2018, 2024), assim como também são escassos aqueles estudos que tenham como objetivo expor tanto ectoparasita quanto hospedeiro a produtos químicos que tenham sido formulados com bases naturais (extratos e óleos essenciais extraídos de bioativos de plantas).

Sob a ótica dos produtos que não sejam sintéticos, além de outros, também o ozônio vem ganhando destaque pelas suas propriedades de: antioxidante, cicatrizante, antimicrobiano (Abreu *et al.*, 2021), além de em trabalhos anteriores já se ter confirmada a ação do mesmo como carrapaticida (Abreu *et al.*, 2020; 2021).

Desta forma, no presente trabalho realizou-se um estudo morfohistológico e histoquímico para verificar se e quais seriam as alterações que a exposição de carrapatos *R.*

linnaei, bem como de coelhas simulando hospedeiros, sofreriam em decorrência da presença do carrapaticida sintético Simparic[®], bem como do Ozo3[®]. Para tanto foram estudadas as glândulas salivares (dos carrapatos) e o tecido hepático (das coelhas hospedeiras).

Os resultados aqui obtidos demonstraram que ambos os produtos tiveram ação tanto nos carrapatos quanto nos hospedeiros. Para efeitos de comparação realizou-se um bioensaio que abrigou tanto carrapatos quanto hospedeiro num Grupo Controle (GC), no qual, como já era esperado, não foram observadas alterações morfológicas nem nas glândulas salivares e nem no tecido hepático, corroborando outros autores (Furquim *et al.*, 2008; Junqueira *et al.*, 2023).

Ao contrário do observado no GC, as glândulas salivares dos carrapatos expostos ao Simparic[®] (GS), apresentaram alterações significativas, que abrangeram mudanças na forma original dos ácinos, anteriormente arredondados e que passaram a irregulares, podendo ainda os mesmos estarem rompidos devido a ação do medicamento, rompimento esse que permitiu o extravasamento do conteúdo citoplasmático das células secretoras (grânulos), dados que corroboraram aqueles encontrados por Nodari *et al.* (2011), ao exporem fêmeas semi-ingurgitadas de *R. linnaei* a diferentes concentrações de permetrina (ingrediente ativo do acaricida Advantage Max3 Bayer), bem como corroborando Pereira *et al.* (2011), que também observaram essas mesmas alterações ao exporem carrapatos dessa mesma espécie ao fipronil. Esses resultados também deixaram claro que a presença do produto tóxico no sistema dos carrapatos, induz as glândulas salivares dos mesmos a sofrerem uma degeneração precoce, situação essa que inibiria ou mesmo impediria que o ectoparasita concluísse o seu processo de alimentação com sucesso o que consequentemente, traria prejuízos no processo reprodutivo, interferindo na geração de novos indivíduos.

A exposição das coelhas hospedeiras ao Simparic[®] (GS) mostrou que o tecido hepático das mesmas sofreu alteração, muito embora a organização do tecido em placas/cordões de hepatócitos tenha sido preservada. No entanto observou-se nas células a presença de vacuolização, bem como de gotículas lipídicas, além de pequenas regiões apresentando uma leve congestão sanguínea. Estudos que foram realizados com a exposição de outros animais a outros produtos químicos, como aqueles de Sayim (2007) que expos ratos *Wistar* albinos ao inseticida dimetoato, também obtiveram resultados que mostraram a ocorrência de alterações morfológicas (além da redução de peso do próprio animal), no tecido hepático, tal como a presença de congestão e de áreas com presença de necrose.

No bioensaio que fez a exposição dos carrapatos ao óleo de girassol ozonizado (Ozo3[®]) (GO), observou-se que as glândulas salivares sofreram alterações ainda mais drásticas do que aquela observadas no GS, uma vez que os ácinos glandulares nesse grupo muitas vezes não

puderam ser observados, devido ao rompimento de suas células em consequência da exposição. Trabalhos desenvolvidos por outros autores como o de Abreu *et al.* (2021), que expuseram fêmeas semi-ingurgitadas de carrapatos *R. linnaei* *in vivo* e *in vitro* ao ozônio (associado a água e ao óleo) observaram que tanto a água quanto o óleo provocaram alterações morfológicas no tecido glandular, e os autores concluíram que a síntese e secreção ficaram comprometidas devido a ação do ozônio, dados esses que foram corroborados pelo presente trabalho.

A análise morfohistológica do fígado das coelhas hospedeiras de carrapatos *R. linnaei*, após exposição ao óleo ozonizado (Ozo3®) mostrou que também esses animais foram afetados pelo carrapaticida, e ainda os mesmos sofreram alterações que foram mais severas do que aquelas observadas no GS, visto ter havido uma completa desorganização do tecido, bem como uma desorganização nos próprios hepatócitos, os quais perderam suas formas originais, tiveram seu citoplasma vacuolizado, bem como a cromatina de seus núcleos completamente marginalizada, indicando que essas células estariam entrando em processo de morte. Segundo Erel *et al.* (2024) que também realizaram experimentos com exposição de animais ao ozônio, ocorreram alterações histológicas como: edema e infiltração de polimorfonucleares, confirmando que o ozônio traria prejuízos para a saúde hepática, muito embora sendo eficiente na degeneração das glândulas salivares, provocando nos ectoparasitas um efeito carrapaticida, o que alertou para que o seu uso fosse controlado e monitorado.

No presente trabalho também foram realizados exames hematológicos, bioquímicos e da urina, das coelhas hospedeiras expostas tanto ao Simparic® (GS) quanto ao óleo ozonizado Ozo3® (GO) e os dados obtidos revelaram que os níveis das enzimas aspartato aminotransferase (AST ou TGO) e da alanina aminotransferase (ALT ou TGP) nos GS e GO permaneceram próximos aos encontrados no GC ($p \leq 0.05$) e dentro dos parâmetros de referência estabelecidos por Meredith *et al.* (2016). Bhardwaj *et al.* (2010) realizaram um estudo sobre a toxicidade da imidacloprida (base inseticida utilizada em culturas agrícolas) sobre fêmeas adultas de *Rattus norvegicus*, que receberam doses diárias de 5, 10 e 20 mg/kg, e os resultados foram conclusivos no sentido de que as doses menores não alteraram nem o tecido nem os níveis das enzimas hepáticas, e a maior provocou necrose focal, núcleos celulares inchados, lesões citoplasmáticas e aumento no peso do fígado, alterações essas diretamente associadas ao aumento da atividade da AST (TGO) e da ALT (TGP).

Quando se realizou aqui a análise da presença de proteínas e hemácias na urina observou-se a ocorrência de alterações em ambos os grupos testados. Os valores médios das hemácias ficaram acima do valor de referência ($p \leq 0.05$), principalmente no GS, indicando hematúria. Esse dado foi contrário aquele obtido por Raina *et al.* (2015) que, mostraram que a

exposição de ratos Wistar a diferentes doses do extrato metanólico/aquoso de *Ocimum*, não alterou os parâmetros normais da urinálise. No presente estudo, as proteínas nos GS e GO, tiveram os valores próximos aos do GC, porém, outros trabalhos desenvolvidos por outros autores (Neves *et al.*, 2018) que expuseram cachorros Dachshund ao afoxolaner, revelaram a ocorrência de hematúria, dado esse que foi corroborado pelo presente estudo, que permitiu concluir que as isoxazolinias provocariam alterações no sistema excretor dos animais a elas expostas. No GO, os valores médios das hemácias estiveram acima do valor de referência ($p \leq 0.05$), mas próximos do GC. Segundo Meredith *et al.* (2016), embora com pouca frequência, e em estudos não toxicológicos é possível observar a presença de hemácias na urina, provavelmente oriundas de inflamação ou de irritação da mucosa das diferentes vias urinárias. Ao contrário, naqueles estudos abordando toxicologia como no caso de Sodelli *et al.* (2019) que expuseram coelhas a ração enriquecida com o carrapaticida oriundo dos ésteres do óleo de mamona, não foi detectada presença de hemácias na urina.

6.CONCLUSÃO

Os dados obtidos no presente estudo permitiram concluir que:

1. A base química sarolaner e o óleo ozonizado agiram como potenciais carrapaticidas sobre machos da espécie *Rhipicephalus linnaei*.
2. As alterações morfológicas decorrentes da exposição dos carrapatos aos compostos químicos tanto sintéticos quanto natural provocaram nas glândulas salivares degeneração precoce.
3. O óleo ozonizado (Ozo3[®]) foi o que provocou as maiores alterações no tecido hepático e nas células das glândulas salivares.
4. Nos animais expostos aos compostos químicos sintéticos (sarolaner) e natural (óleo ozonizado), foram detectados diferentes graus de danos hepáticos.
5. O carrapaticida natural óleo ozonizado (Ozo3[®]) foi o que provocou os danos hepáticos mais severos.
6. O óleo ozonizado foi o carrapaticida mais agressivo para o tecido hepático do hospedeiro e para a glândula salivar do ectoparasita, enquanto o sarolaner (Simparic[®]) provocou as menores alterações na glândula salivar, além de ter sido menos hepatotóxico.

REFERÊNCIAS

- ABNT. NBR ISO 15223-1: COLORAÇÃO PANÓTICO RÁPIDO. Pinhais: Laborclin Produtos Para Laboratórios Ltda, 2019. Disponível em: <https://cdn.media.interlabdist.com.br/uploads/2021/01/620529-COLORACAO-PANOTICO-RAPIDO-CONJ-3x500mL-2019.pdf>. Acesso em: 14 nov. 2024.
- ABREU, M. R. *et al.* Exposure of Ticks *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: ixodidae) to ozonated water. **Ozone: Science & Engineering**, [S.L.], v. 42, n. 6, p. 507-516, 21 fev. 2020. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/01919512.2020.1727310>. Disponível em: https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01919512.2020.1727310?casa_token=l9Vx7mLerlEAAAAA:i2QX_FZtOwmaCgEyi21Hi8jLlLqOu_Iaib7UsJbo9rxaomEZR6BDQikY-WsZR9GrVHCHkp-ju4YcqA. Acesso em: 26 out. 2024.
- ABREU, M. R. *et al.* Morphophysiological analysis of the salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: ixodidae) exposed to ozonated water. **Medical And Veterinary Entomology**, [S.L.], v. 35, n. 1, p. 88-96, 25 ago. 2021. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/mve.12472>. Disponível em: https://resjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/mve.12472?casa_token=az9-V_vNyOsAAAAA%3AOE9_rx7k9JwrZVsNpBA6OruTsDWst250RvqFrrpkrBr-RSp4GrjBd-mYr4ycCu-juNjsVjaeDVy7_kjL. Acesso em: 22 out. 2024.
- ANDREOTTI, R. *et al.* **Carrapatos: protocolos e técnicas para estudo**. Campo Grande: Embrapa, 2016. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/196905/1/Carrapatos-protocolos-e-tecnicas.pdf>. Acesso em: 26 out. 2024.
- ANDRIOTTI, P. A. **Eficácia do Sarolaner no tratamento de míases em cães causadas por *Dermatobia hominis* (Diptera: Cutebridae)**. 2020. 41 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (Patologia e Ciências Clínicas), Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2020. Disponível em: <https://tede.ufrj.br/handle/jspui/6319>. Acesso em: 22 out. 2024.
- ARRUDA, B. M. C. G. **Eficácia do Fluralaner transdermal no tratamento de *Lynxacarus radovskyi* (Acari: Listrophoridae) em gatos naturalmente infestados**. 2023. 39 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Veterinárias, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2023. Disponível em: <https://rima.ufrj.br/jspui/handle/20.500.14407/15846>. Acesso em: 13 jun. 2024.
- AUDOUIN, J. U.A. Explication sommaire des planches de polypes de l'Egypte et de la Syrie, publiées par Jules-Cesar Savigny. **Descr Égypte Hist Nat**, NN, Paris, v. 1, n. 1, p. 1-9, maio 1826. Kaiserslautern (?)/Heidelberg (?): NN. <http://dx.doi.org/10.11588/DIGLIT.472>. Disponível em: <https://digi.ub.uni-heidelberg.de/diglit/cpg242>. Acesso em: 26 out. 2024.
- BECHARA, G. H. *et al.* *Rhipicephalus sanguineus* tick in Brazil: feeding and reproductive aspects under laboratorial conditions. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 4, n. 2, p. 61-66, jan. 1995. Disponível em: <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/19970500056>. Acesso em: 26 out. 2024.
- BHARDWAJ, S. *et al.* A 90 days oral toxicity of imidacloprid in female rats: morphological,

biochemical and histopathological evaluations. **Food And Chemical Toxicology**, [S.L.], v. 48, n. 5, p. 1185-1190, maio 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2010.02.009>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20146932/>. Acesso em: 22 out. 2024.

BORLEY, N. R. *et al.* **Anatomia**: a base anatômica da prática clínica. 40. ed. London: Elsevier, 2010. 1583 p.

CAMARGO-MATHIAS, M. I. *et al.* **Guia básico de morfologia interna de carrapatos ixodídeos**. Rio Claro: Unesp, 2013. Disponível em: <https://editoraunesp.com.br/catalogo?criterio=+Inside+ticks+Morphophysiology%2C+toxicology+and+therapeutic+perspectives>. Acesso em: 14 jun. 2024.

CAMARGO-MATHIAS, M. I. *et al.* *Cannabis sativa* (Linnaeus, 1753): the use of its extract against *Rhipicephalus linnaei* (Audouin, 1826) ticks. **Veterinary Parasitology**, [S.L.], v. 332, p. 110314, dez. 2024. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2024.110314>. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401724002036?casa_token=5SJtn9cjjfQAAAAA:hFNYl1K77sCsKdOsPTrZdasb4-GE_UIg6xOwou-70kmP3ZDZG0zUJiV3ixK6f1qpN3IAa4Gv8Uq-. Acesso em: 26 out. 2024.

CAMARGO- MATHIAS, M. I. *et al.* Inside ticks: morphophysiology, toxicology and therapeutic perspectives. **Editora Unesp**, [S.L.], v. 1, n. 1, p. 1-203, jul. 2018. Editora UNESP. <http://dx.doi.org/10.7476/9788595462861>. Disponível em: <https://books.scielo.org/id/xz2k6>. Acesso em: 26 out. 2024.

CASTRO, R. A. **Ozonização como tecnologia para o controle de carrapatos**. 2023. 105 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Biomédica, Universidade Anhembi Morumbi, São José dos Campos, 2023. Disponível em: https://portal.anhembi.br/wp-content/uploads/2023/07/Tese_Raphael.Andrade.de_.Castro-26.06.2023.pdf. Acesso em: 26 out. 2024.

DINIZ, Cryslyne Clara Espínola. **A AUTOMAÇÃO NO HEMOGRAMA E SUA EVOLUÇÃO**. 2015. 86 f. TCC (Graduação) - Curso de Farmácia, Universidade Federal de Campina Grande, Cuité, 2015. Disponível em: <http://dspace.sti.ufcg.edu.br:8080/xmlui/handle/riufcg/9145>. Acesso em: 15 nov. 2024.

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**, [S.L.], v. 52, n. 3, p. 429-436, 5 mar. 2015. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jme/tjv005>. Disponível em: <https://academic.oup.com/jme/article-abstract/52/3/429/1006846?login=false>. Acesso em: 26 out. 2024.

EREL, S. *et al.* Evaluation of the Efficacy of Ozone Therapy on Liver Tissue in the Treatment of Sepsis in Rats with Cecal Perforation. **Medicina**, [S.L.], v. 60, n. 9, p. 1552-1566, 22 set. 2024. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/medicina60091552>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1648-9144/60/9/1552>. Acesso em: 29 out. 2024.

CHERNI, J. A. *et al.* Efficacy and safety of sarolaner (Simparic[®]) against fleas on dogs presented as veterinary patients in the United States. **Veterinary Parasitology**, [S.L.], v. 222,

n. 1, p. 43-48, maio 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.12.022>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401715301072>. Acesso em: 28 maio 2024.

FERREIRA, S. *et al.* Ozone therapy in infection control in oral surgery. **Revista Odontológica de Araçatuba**, Araçatuba, v. 34, n. 1, p. 36-38, jun. 2013. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/items/b117c169-3665-4f93-a71e-ca550da3849e>. Acesso em: 28 maio 2024.

FIGUEIREDO, T. F. B. **Técnica de ozonização: efeitos sobre os parâmetros biológicos e análise lipídica do corpo gorduroso de *Rhipicephalus B. microplus***. 2022. 55 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Biomédica, Universidade Anhembi Morumbi, São José dos Campos, 2022. Disponível em: <https://portal.anhembi.br/wp-content/uploads/2023/06/Tese-Doutorado-Thaylon-Versao-Final.pdf>. Acesso em: 28 maio 2024.

FONSÊCA, A. D. V. *et al.* Occurrence of tick-borne pathogens in dogs in a coastal region of the state of Ceará, northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, [S.L.], v. 31, n. 1, p. 1-15, 30 jan. 2022. FapUNIFESP (SciELO). DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/s1984-29612022010>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbpv/a/BPMMR4GZBxBTrNcgXCQCmzs/?lang=en>. Acesso em: 28 maio 2024.

FURQUIM, K. C. S. *et al.* Death by apoptosis in salivary glands of females of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). **Experimental Parasitology**, [S.L.], v. 119, n. 1, p. 152-163, maio 2008. Elsevier BV. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2008.01.021>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014489408000337?via%3Dihub>. Acesso em: 23 jun. 2024

FURQUIM, K. C. S. **Estudo das glândulas salivares de fêmeas e de machos de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari, Ixodidae): caracterização do ciclo secretor com ênfase no processo de degeneração**. 2007. 265 f. Tese (Doutorado) - Curso de Biologia Celular e Molecular, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Rio Claro, 2007. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/items/eb9f638f-c2fb-4b37-ab14-24043f4f5afa>. Acesso em: 14 out. 2024.

GARCIA, R. S. *et al.* Principais falhas no controle do carrapato *Rhipicephalus microplus*. In: V COLÓQUIO ESTADUAL DE PESQUISA MULTIDISCIPLINAR, III CONGRESSO NACIONAL DE PESQUISA MULTIDISCIPLINAR E II FEIRA DE EMPREENDEDORISMO DA UNIFIMES, 3., 2021, Mineiro. **Anais Colóquio Estadual de Pesquisa Multidisciplinar (ISSN-2527-2500) & Congresso Nacional de Pesquisa Multidisciplinar**. Mineiros: Unifimes, 2021. p. 1-5. Disponível em: <https://publicacoes.unifimes.edu.br/index.php/coloquio/article/view/1005>. Acesso em: 26 out. 2024.

GONÇALVES, I. L. *et al.* Discovery, development, chemical diversity and design of isoxazoline-based insecticides. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 30, n. 1, p. 115934-115946, jan. 2021. Elsevier BV. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2020.115934>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0968089620307641>.

Acesso em: 28 maio 2024.

HEBLING, L. M. G. F. *et al.* **Estudo dos efeitos de extratos de glândulas salivares de fêmeas de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) na resposta imunológica de hospedeiros pós inoculados.** 2011. 117 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biologia Celular e Molecular, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Rio Claro, 2011. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/items/98122541-b790-40e4-bfa2-57baec2ec48a>. Acesso em: 02 jul. 2024.

JUNQUEIRA, L. C. U. *et al.* **Histologia Básica: texto e atlas.** 14. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2023. 592 p

JUNQUEIRA, L.C. U.; JUNQUEIRA, L. M. M. S. Técnicas básicas de citologia e histologia. São Paulo: Santos, 1983. p. 123.

KOC, S. *et al.* The first study on fipronil, chlorpyrifos-methyl and permethrin resistance in *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato ticks from Turkey. **International Journal Of Tropical Insect Science**, [S.L.], v. 42, n. 1, p. 597-602, 9 jun. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s42690-021-00578-5>.

LABORCLIN. **NBR ISO 15223-1: COLORAÇÃO PANÓTICO RÁPIDO.** Pinhais: Laborclin Produtos Para Laboratórios Ltda, 2015. Disponível em: <https://cdn.media.interlabdist.com.br/uploads/2021/01/620529-COLORACAO-PANOTICO-RAPIDO-CONJ-3x500mL-2019.pdf>. Acesso em: 14 nov. 2024.

MEREDITH, A. *et al.* Rabbit Medicine. In: WESCHE, Petra. **Clinical pathology.** Quedgeley: Bsava, 2016. p. 124-132.

NEVES, K. R. *et al.* Hematúria associada à administração de ectoparasiticida à base de afoxolaner – relato de caso. In: XX Encontro Pós-Graduação (enpos)-semana integradas UFPEL, 20., 2018, Pelotas. **Anais [...].** Pelotas: UFPEL, 2018. p. 1-4. Disponível em: <https://wp.ufpel.edu.br/enpos/anais/anais-2018/>. Acesso em: 28 maio 2024.

NODARI, E. F. *et al.* Cytotoxic effects of permethrin in salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: ixodidae) semi-engorged females. **Experimental Parasitology**, [S.L.], v. 128, n. 2, p. 151-158, jun. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2011.02.003>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21352824/>. Acesso em: 26 out. 2024.

OLIVEIRA, H. H. *et al.* Uso de óleo ozonizado no tratamento tópico de infestação por carrapato em cão - Relato de caso. **Brazilian Journal Of Veterinary Medicine**, S.I, v. 36, n. 4, p. 405-408, dez. 2014. Disponível em: <https://bjvm.org.br/BJVM/article/view/567>. Acesso em: 28 maio 2024

OTRANTO, D. *et al.* Editorial. **Veterinary Parasitology**, [S.L.], v. 201, n. 3-4, p. 177-178, abr. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.02.029>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401714001022?via%3Dihub>. Acesso em: 14 out. 2024.

PEARSE, A.G.E., Histochemistry theoretical and applied. 3. ed. Livingstone: Churchill, 1985.

p.214.

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**, [S.L.], v. 127, n. 2, p. 481-489, fev. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2010.10.003>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S001448941000322X#s0070>. Acesso em: 22 out. 2024.

RAINA, P. *et al.* Evaluation of subacute toxicity of methanolic/aqueous preparation of aerial parts of *Ocimum sanctum* in Wistar rats: clinical, haematological, biochemical and histopathological studies. **Journal Of Ethnopharmacology**, [S.L.], v. 175, p. 509-517, dez. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2015.10.015>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26456329/>. Acesso em: 26 out. 2024.

SAYIM, F. Dimethoate-induced biochemical and histopathological changes in the liver of rats. **Experimental And Toxicologic Pathology**, [S.L.], v. 59, n. 3-4, p. 237-243, nov. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.etp.2007.05.008>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0940299307000607?via%3Dihub#aeap-section-id15>. Acesso em: 29 out. 2024.

SCOTT, F. *et al.* Efficacy of sarolaner (Simparic™) against induced infestations of *Amblyomma cajennense* on dogs. **Parasites & Vectors**, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 1-5, 17 ago. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-017-2324-0>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5559851/>. Acesso em: 26 out. 2024.

SERENO, A. S. F. **Relatório final de estágio curricular em prática veterinária, realizado junto a Boehringer ingelheim saúde animal ltda em São Paulo – SP: revisão de literatura: uso de isoxazolinas como alternativa ao controle de ectoparasitas de animais de companhia.** Jaboticaba: Unesp, 2023. 64 p. Trabalho apresentado à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP, Câmpus de Jaboticabal, para graduação em Medicina Veterinária. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/items/8ae52051-787f-4b5b-be2b-2700a97bad6e>. Acesso em: 28 maio 2024

ŠLAPETA, J. *et al.* *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 And Tick-Borne Diseases**, [S.L.], v. 13, n. 6, p. 102024-102037, nov. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2022.102024>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1877959X22001261?via%3Dihub>. Acesso em: 28 maio 2024.

SODELLI, L. F. **Avaliação bioquímica e morfohistológica de coelhas expostas a acaricida obtido a partir do ácido ricinoléico do óleo de mamona.** 2019. 46 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular)., Universidade Estadual Paulista (Unesp), Rio Claro, 2019. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/server/api/core/bitstreams/2c11e833-74cc-4583-ad96-954c3956a011/content>. Acesso em: 26 out. 2024.

SOUZA, R. C. de *et al.* Utilização do Óleo de Girassol Ozonizado no Tratamento Tópico de

Ferida por Farmacodermia em Cão: relato de caso. **Uniciências**, [S.L.], v. 26, n. 1, p. 08-11, 23 jun. 2022. Editora e Distribuidora Educacional. <http://dx.doi.org/10.17921/1415-5141.2022v26n1p08-11>. Disponível em: <https://uniciencias.pgsscogna.com.br/uniciencias/article/view/9631>. Acesso em: 28 maio 2024.

VALE, T. L. **Controle dos parasitos do cão e avaliação do efeito carrapaticida do carvacrol**. 2023. 117 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2023. Disponível em: <http://www.tedebr.ufma.br:8080/jspui/handle/tede/4746>. Acesso em: 25 maio 2024.

5. CONCLUSÃO

Os dados obtidos no presente estudo permitiram concluir que:

1. As bases químicas fluralaner, afoxolaner, sarolaner e óleo ozonizado agiram como potenciais carrapaticidas sobre machos da espécie *Rhipicephalus linnaei*.
2. As alterações morfológicas decorrentes da exposição dos carrapatos aos compostos químicos tanto sintéticas, quanto natural, provocaram degeneração precoce nas glândulas salivares.
3. O afoxolaner (composto ativo do Nexgard®) provocou as maiores alterações no tecido e nas células das glândulas salivares.
4. O fluralaner, afoxolaner e sarolaner, também provocaram alterações morfológicas nas glândulas salivares dos carrapatos machos da espécie *R. linnaei*, porém com danos em menor intensidade.
5. Nos fígados dos animais expostos às bases químicas sintéticas (fluralaner, afoxolaner e sarolaner) e natural (óleo ozonizado), foram detectados diferentes graus de danos hepáticos que foram desde vacuolização, congestão sanguínea até esteatose hepática em diversos graus.
6. O carrapaticida natural óleo ozonizado (Ozo3®) foi o que provocou os danos hepáticos mais severos em nível morfológico, desde desorganização tecidual até em gotículas lipídicas.
7. Comparando-se as ações do fluralaner (Bravecto®) e do óleo ozonizado (Ozo3®) no tecido hepático, ambos foram tóxicos e causaram esteatose hepática.
8. Dentre as isoxazolininas testadas, aquela com maior eficiência sobre os carrapatos machos *R. linnaei* foi o afoxolaner (Nexgard®) e a menos agressiva para o tecido hepático foi o sarolaner (Simparic®).

9. O sarolaner (Simparic[®]) provocou hematúria nos animais expostos, porém foi menos hepatotóxico que o óleo ozonizado.

10. O óleo ozonizado foi o carrapaticida mais agressivo para o tecido hepático, mas não foi o que mais causou alterações nas glândulas salivares dos carrapatos machos.

11. Os carrapaticidas, tanto sintéticos quanto naturais, induziram alterações histológicas significativas. No entanto, não foram observados danos biológicos, pois não houve mortalidade dos machos

REFERÊNCIAS

ABNT. NBR ISO 15223-1: COLORAÇÃO PANÓTICO RÁPIDO. Pinhais: Laborclin Produtos Para Laboratórios Ltda, 2019. Disponível em: <https://cdn.media.interlabdist.com.br/uploads/2021/01/620529-COLORACAO-PANOTICO-RAPIDO-CONJ-3x500mL-2019.pdf>. Acesso em: 14 nov. 2024.

ABREU, M. R. *et al.* Exposure of Ticks *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: ixodidae) to ozonated water. **Ozone: Science & Engineering**, [S.L.], v. 42, n. 6, p. 507-516, 21 fev. 2020. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/01919512.2020.1727310>. Disponível em: https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01919512.2020.1727310?casa_token=l9Vx7mLerlEAAAAA:i2QX_FZtOwmaCgEyi21Hi8jLLqOu_Iaib7UsJbo9rxaomEZR6BDQikY-WsZR9GrVHCHkp-ju4YcqA. Acesso em: 26 out. 2024.

ABREU, M. R. *et al.* Morphophysiological analysis of the salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: ixodidae) exposed to ozonated water. **Medical And Veterinary Entomology**, [S.L.], v. 35, n. 1, p. 88-96, 25 ago. 2021. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/mve.12472>. Disponível em: https://resjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/mve.12472?casa_token=az9-V_vNyOsAAAAA%3AOE9_rx7k9JwrZVsNpBA6OruTsDWst250RvqFrrpkrBr-RSp4GrjBd-mYr4ycCu-juNjsVjaeDVy7_kjL. Acesso em: 22 out. 2024.

ALKISHE, A. *et al.* Recognizing sources of uncertainty in disease vector ecological niche models: an example with the tick *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato. **Perspectives in Ecology and Conservation**, [S.L.], v. 18, n. 2, p. 91-102, abr. 2020. Elsevier BV. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pecon.2020.03.002>. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/342409928_Recognizing_sources_of_uncertainty_in_disease_vector_ecological_niche_models_An_example_with_the_tick_Rhipicephalus_sanguineus_sensu_lato/figures?lo=1. Acesso em: 25 maio 2024.

ANCHUNDIA., J. C. C. **Evaluación de la macrofauna de lechos de *Eisenia foetida* (lombriz roja californiana) sometida a la descomposición de excretas de caninos tratados con fluralaner**. 2023. 108 f. TCC (Graduação) - Curso de Engenharia Zootecnista, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo Facultad de Ciencias Pecuarias, Riobamba, 2023. Disponível em: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/20914>. Acesso em: 14 out. 2024.

ANDREOTTI, R. *et al.* **Carrapatos: protocolos e técnicas para estudo**. Campo Grande: Embrapa, 2016. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/196905/1/Carrapatos-protocolos-e-tecnicas.pdf>. Acesso em: 26 out. 2024.

ANDREOTTI, R. *et al.* **Ticks of importance to One Health and animal production in Brazil**. Campo Grande: Embrapa, 2022. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1146291/ticks-of-importance-to-one-health-and-animal-production-in-brazil>. Acesso em: 28 maio 2024.

ANDRIOTTI, P. A. **Eficácia do Sarolaner no tratamento de miíases em cães causadas por *Dermatobia hominis* (Diptera: Cutebriidae)**. 2020. 41 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (Patologia e Ciências Clínicas), Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2020. Disponível

em: <https://tede.ufrj.br/handle/jspui/6319>. Acesso em: 22 out. 2024.

ANHOLETO, L. A. *et al.* Ação do extrato etanólico bruto de *Acmella Oleracea* em carrapatos *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae): avaliação ultraestrutural do sistema reprodutor masculino. In: SILVEIRA, M. *et al.* **Biodiversidade e Biotecnologia no Brasil**. 2. ed. Rio Branco: Strictu sensu Editora, 2020. Cap. 5, p. 71-89. Disponível em: <https://sseditora.com.br/wp-content/uploads/biodiversidade-e-biotecnologia-no-brasil-2.pdf>. Acesso em: 20 jun. 2024.

ARRUDA, B. M.C.G. **Eficácia do Fluralaner transdermal no tratamento de *Lynxacarus radovskyi* (Acari: Listrophoridae) em gatos naturalmente infestados**. 2023. 39 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Veterinárias, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2023. Disponível em: <https://rima.ufrj.br/jspui/handle/20.500.14407/15846>. Acesso em: 13 jun. 2024.

AUDOUIN, J. U.A. Explication sommaire des planches de polypes de l'Egypte et de la Syrie, publiées par Jules-Cesar Savigny. **Descr Égypte Hist Nat**,: NN, Paris, v. 1, n. 1, p. 1-9, maio 1826. Kaiserslautern (?)/Heidelberg (?): NN. <http://dx.doi.org/10.11588/DIGLIT.472>. Disponível em: <https://digi.ub.uni-heidelberg.de/diglit/cpg242>. Acesso em: 26 out. 2024.

BECHARA, G. H. *et al.* *Rhipicephalus sanguineus* tick in Brazil: feeding and reproductive aspects under laboratorial conditions. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 4, n. 2, p. 61-66, jan. 1995. Disponível em: <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/19970500056>. Acesso em: 26 out. 2024.

BHARDWAJ, S. *et al.* A 90 days oral toxicity of imidacloprid in female rats: morphological, biochemical and histopathological evaluations. **Food And Chemical Toxicology**, [S.L.], v. 48, n. 5, p. 1185-1190, maio 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2010.02.009>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20146932/>. Acesso em: 22 out. 2024.

BORLEY, N. R. *et al.* **Anatomia: a base anatômica da prática clínica**. 40. ed. London: Elsevier, 2010. 1583 p.

BURGIO, F. *et al.* A comparative laboratory trial evaluating the immediate efficacy of fluralaner, afoxolaner, sarolaner and imidacloprid + permethrin against adult *Rhipicephalus sanguineus* (sensu lato) ticks attached to dogs. **Parasites & Vectors**, [S.L.], v. 9, n. 1, p. 1-6, dez. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-016-1900-z>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5135746/>. Acesso em: 14 out. 2024.

CABRAL, I. L. *et al.* Aqueous ozone therapy improves the standard treatment of leishmaniasis lesions in animals leading to local and systemic alterations. **Parasitology Research**, [S.L.], v. 119, n. 12, p. 4243-4253, 13 out. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-020-06925-8>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00436-020-06925-8#citeas>. Acesso em: 22 out. 2024.

CAMARGO-MATHIAS, M. I. *et al.* **Guia básico de morfologia interna de carrapatos ixodídeos**. Rio Claro: Unesp, 2013. Disponível em: <https://editoraunesp.com.br/catalogo?criterio=+Inside+ticks+Morphophysiology%2C+toxicol>

ogy+and+therapeutic+perspectives. Acesso em: 14 jun. 2024.

CAMARGO-MATHIAS, M. I. *et al.* *Cannabis sativa* (Linnaeus, 1753): the use of its extract against *Rhipicephalus linnaei* (audouin, 1826) ticks. **Veterinary Parasitology**, [S.L.], v. 332, p. 110314, dez. 2024. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2024.110314>. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401724002036?casa_token=5SJtn9cjjfQAAAAA:hFNYl1K77sCsKdOsPTrZdasb4-GE_UIg6xOwou-70kmP3ZDZG0zUJiV3ixK6f1qpN3IAa4Gv8Uq-. Acesso em: 26 out. 2024.

CAMARGO- MATHIAS, M. I. *et al.* Inside ticks: morphophysiology, toxicology and therapeutic perspectives. **Editora Unesp**, [S.L.], v. 1, n. 1, p. 1-203, jul. 2018. Editora UNESP. <http://dx.doi.org/10.7476/9788595462861>. Disponível em: <https://books.scielo.org/id/xz2k6>. Acesso em: 26 out. 2024.

CAPERUCCI, D. *et al.* Ultrastructure features of the midgut of the female adult *Amblyomma cajennense* ticks Fabricius, 1787 (Acari: Ixodidae) in several feeding stages and subjected to three infestations. **Micron**, [S.L.], v. 41, n. 7, p. 710-721, out. 2010. Elsevier BV. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micron.2010.05.015>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0968432810001368>. Acesso em: 22 jun. 2024.

CASTRO, R. A. **Ozonização como tecnologia para o controle de carrapato**S. 2023. 105 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Biomédica, Universidade Anhembí Morumbi, São José dos Campos, 2023. Disponível em: https://portal.anhembibm.com.br/wp-content/uploads/2023/07/Tese_Raphael.Andrade.de_Castro-26.06.2023.pdf. Acesso em: 26 out. 2024.

CHERNI, J. A. *et al.* Efficacy and safety of sarolaner (Simparic[®]) against fleas on dogs presented as veterinary patients in the United States. **Veterinary Parasitology**, [S.L.], v. 222, n. 1, p. 43-48, maio 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.12.022>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401715301072>. Acesso em: 28 maio 2024.

CUNHA, E. L. R. *et al.* Histopathological changes in the liver and thyroid of mice (*Mus musculus*) caused by the acaricides: fipronil and thymol. **Journal Of Histology and Histopathology**, [S.L.], v. 4, n. 1, p. 9-17, jan. 2017. Herbert Publications PVT LTD. DOI: <http://dx.doi.org/10.7243/2055-091x-4-9>. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/319854909_Histopathological_changes_in_the_liver_and_thyroid_of_mice_Mus_musculus_caused_by_the_acaricides_fipronil_and_thymol. Acesso em: 22 jun. 2024.

DANTAS-TORRES, F. Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. **Parasites & Vectors**, [S.L.], v. 3, n. 1, p. 26, 2010. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/1756-3305-3-26>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1186/1756-3305-3-26>. Acesso em: 26 out. 2024.

DANTAS-TORRES, F. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: ixodidae). **Veterinary Parasitology**, [S.L.], v. 152, n. 3-4, p. 173-185, abr. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.12.030>. Disponível em:

https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304401707006838?casa_token=irzEQRBwFAQAAAAA:RnNXekjoxB_iaNzhTRcS_RAECHxQ562S5P94cD484HSm7s7ILF4icuny4m_WcHZ4ExpvUKj4N3U7. Acesso em: 12 jul. 2024.

DINIZ, Cryslyne Clara Espínola. **A automação no hemograma e sua evolução**. 2015. 86 f. TCC (Graduação) - Curso de Farmácia, Universidade Federal de Campina Grande, Cuité, 2015. Disponível em: <http://dspace.sti.ufcg.edu.br:8080/xmlui/handle/riufcg/9145>. Acesso em: 15 nov. 2024.

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**, [S.L.], v. 52, n. 3, p. 429-436, 5 mar. 2015. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jme/tjv005>. Disponível em: <https://academic.oup.com/jme/article-abstract/52/3/429/1006846?login=false>. Acesso em: 26 out. 2024.

ENOMOTO, H. *et al.* Residue, distribution, and depletion of fluralaner in egg following a single intravenous and transdermal administration in healthy shaver hens: fluralaner residue in egg. **Poultry Science**, [S.L.], v. 103, n. 7, p. 103843-103853, fev. 2024. Elsevier BV. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.psj.2024.103843>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S003257912400422X>. Acesso em: 28 maio 2024.

EREL, S. *et al.* Evaluation of the Efficacy of Ozone Therapy on Liver Tissue in the Treatment of Sepsis in Rats with Cecal Perforation. **Medicina**, [S.L.], v. 60, n. 9, p. 1552-1566, 22 set. 2024. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/medicina60091552>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1648-9144/60/9/1552>. Acesso em: 29 out. 2024.

FERREIRA, L. S. Alterações histológicas e bioquímicas em larvas de *Culex quinquefasciatus* após a exposição a potenciais pesticidas. 2021. 69 f. Tese (Doutorado) - Curso de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de São João del Rei, Divinópolis, 2021. Disponível em: <https://www.ufsj.edu.br/portal2-repositorio/File/pmbqbm/PMBqBM/Publicacoes/Teses/Tese%20Lorena%20Sales%20Ferreira.pdf>. Acesso em: 07 fev. 2023.

FERREIRA, M. *et al.* Action of the chemical agent fipronil (active ingredient of acaricide Frontline®) on the liver of mice: an ultrastructural analysis. **Microscopy Research and Technique**, [S.L.], v. 75, n. 2, p. 197-205, 14 Jul. 2011. Wiley. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/jemt.21043>. Disponível em: <https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jemt.21043#:~:text=Results%20showed%20that%20the%20animals%20exposed%20to%20fipronil,have%20the%20function%20of%20inactivating%20the%20toxic%20metabolites>. Acesso em: 22 jun. 2024

FERREIRA, S. *et al.* Ozone therapy in infection control in oral surgery. **Revista Odontológica de Araçatuba**, Araçatuba, v. 34, n. 1, p. 36-38, jun. 2013. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/items/b117c169-3665-4f93-a71e-ca550da3849e>. Acesso em: 28 maio 2024.

FERREIRA, S. C. R. **Efeitos histopatológicos em fígado de pregado (*Scophthalmus maximus*) exposto cronicamente a concentrações ambientalmente realísticas de metais pesados**. 2020. 56 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Faculdade de Ciências da Saúde,

Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2020. Disponível em: <https://bdigital.ufp.pt/handle/10284/9327>. Acesso em: 28 jun. 2024.

FERRO, M. C. R. **Relatório de Estágio Curricular**: realizado no âmbito do mestrado integrado em ciências farmacêuticas. Porto: U. Porto, 2023. 92 p. Disponível em: <https://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/10216/149063/2/620767.pdf>. Acesso em: 22 maio 2024.

FIGUEIREDO, T. F. B. **Técnica de ozonização: efeitos sobre os parâmetros biológicos e análise lipídica do corpo gorduroso de *Rhipicephalus B. microplus***. 2022. 55 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Biomédica, Universidade Anhembi Morumbi, São José dos Campos, 2022. Disponível em: <https://portal.anhembi.br/wp-content/uploads/2023/06/Tese-Doutorado-Thaylon-Versao-Final.pdf>. Acesso em: 28 maio 2024.

FONSÊCA, A. D. V. *et al.* Occurrence of tick-borne pathogens in dogs in a coastal region of the state of Ceará, northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, [S.L.], v. 31, n. 1, p. 1-15, 30 jan. 2022. FapUNIFESP (SciELO). DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/s1984-29612022010>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbpv/a/BPMMR4GZBxBTrNcgXCQCmzs/?lang=en>. Acesso em: 28 maio 2024.

FURQUIM, K. C. S. *et al.* Death by apoptosis in salivary glands of females of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). **Experimental Parasitology**, [S.L.], v. 119, n. 1, p. 152-163, maio 2008. Elsevier BV. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2008.01.021>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014489408000337?via%3Dihub>. Acesso em: 23 jun. 2024

FURQUIM, K. C. S. **Estudo das glândulas salivares de fêmeas e de machos de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari, Ixodidae): caracterização do ciclo secretor com ênfase no processo de degeneração**. 2007. 265 f. Tese (Doutorado) - Curso de Biologia Celular e Molecular, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Rio Claro, 2007. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/items/eb9f638f-c2fb-4b37-ab14-24043f4f5afa>. Acesso em: 14 out. 2024.

GARCIA, R. S. *et al.* Principais falhas no controle do carrapato *Rhipicephalus microplus*. In: V COLÓQUIO ESTADUAL DE PESQUISA MULTIDISCIPLINAR, III CONGRESSO NACIONAL DE PESQUISA MULTIDISCIPLINAR E II FEIRA DE EMPREENDEDORISMO DA UNIFIMES, 3., 2021, Mineiro. **Anais Colóquio Estadual de Pesquisa Multidisciplinar (ISSN-2527-2500) & Congresso Nacional de Pesquisa Multidisciplinar**. Mineiros: Unifimes, 2021. p. 1-5. Disponível em: <https://publicacoes.unifimes.edu.br/index.php/coloquio/article/view/1005>. Acesso em: 26 out. 2024.

GONÇALVES, I. L. *et al.* Discovery, development, chemical diversity and design of isoxazoline-based insecticides. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 30, n. 1, p. 115934-115946, jan. 2021. Elsevier BV. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2020.115934>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0968089620307641>. Acesso em: 28 maio 2024.

HEBLING, L. M. G.s F. *et al.* **Estudo dos efeitos de extratos de glândulas salivares de fêmeas de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) na resposta imunológica de hospedeiros pós inoculados.** 2011. 117 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biologia Celular e Molecular, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Rio Claro, 2011. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/items/98122541-b790-40e4-bfa2-57baec2ec48a>. Acesso em: 02 jul. 2024.

IDILMAN, I. S. *et al.* Hepatic Steatosis: etiology, patterns, and quantification. **Seminars In Ultrasound, Ct and Mri**, [S.L.], v. 37, n. 6, p. 501-510, dez. 2016. Elsevier BV. DOI: <http://dx.doi.org/10.1053/j.sult.2016.08.003>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27986169/>. Acesso em: 22 jun. 2024.

JIA, Z.Q. *et al.* Acute toxicity, bioconcentration, elimination and antioxidant effects of fluralaner in zebrafish, *Danio rerio*. **Environmental Pollution**, [S.L.], v. 232, n. 1, p. 183-190, jan. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2017.09.032>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0269749117326015#sec3>. Acesso em: 28 maio 2024.

JUNQUEIRA, L. C. U. *et al.* **Histologia Básica: texto e atlas.** 14. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2023. 592 p

JUNQUEIRA, L. C. U.; JUNQUEIRA, L. M. M. S. Técnicas básicas de citologia e histologia. São Paulo: Santos, 1983. p. 123.

KOC, S. *et al.* The first study on fipronil, chlorpyrifos-methyl and permethrin resistance in *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato ticks from Turkey. **International Journal Of Tropical Insect Science**, [S.L.], v. 42, n. 1, p. 597-602, 9 jun. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s42690-021-00578-5>.

LABORCLIN. **NBR ISO 15223-1: COLORAÇÃO PANÓTICO RÁPIDO.** Pinhais: Laborclin Produtos Para Laboratórios Ltda, 2015. Disponível em: <https://cdn.media.interlabdist.com.br/uploads/2021/01/620529-COLORACAO-PANOTICO-RAPIDO-CONJ-3x500mL-2019.pdf>. Acesso em: 14 nov. 2024.

LESSA, M. C. S. **Avaliação do fígado de ratos wistar expostos de forma aguda ao herbicida bipiridílico diquat.** 2022. 38 f. TCC (Graduação) - Curso de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2022. Disponível em: <https://monografias.ufop.br/handle/35400000/4645>. Acesso em: 13 jun. 2024.

LIMA, F. F. **Dieta hiperlipídica e/ou rica em sacarose em camundongos suíços: metabolismo de carboidratos, fígado e tecido adiposo.** 2013. 86 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biologia Humana, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013. Disponível em: <https://www.bdt.d.uerj.br:8443/handle/1/7851>. Acesso em: 22 jun. 2024.

LOPES, A. C. S. **Cristalúria em coelhos.** 2010. 76 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Medicina Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2010. Disponível em: <https://www.repository.utl.pt/handle/10400.5/2663>. Acesso em: 26 out. 2024.

MAPARA, M. *et al.* Coelho como modelo animal para pesquisa experimental. **Dental**

Research Journal, Manipal, v. 9, n. 1, p. 111-118, jan. 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3283968/>. Acesso em: 22 jun. 2024.

MARQUES, E. S. *et al.* Cytotoxic effects of *Euterpe oleraceae* fruit oil (açaí) in rat liver and thyroid tissues. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [S.L.], v. 29, n. 1, p. 54-61, jan. 2019. Springer Science and Business Media LLC. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjp.2018.12.001>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbfar/a/VsSxz4nK7XG9CDV7nkQ4ztL/>. Acesso em: 22 jun. 2024.

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**, [S.L.], v. 10, n. 2, p. 314-320, fev. 2019. Elsevier BV. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.11.003>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1877959X18302450?via%3Dihub>. Acesso em: 22 jun. 2024.

MENDOZA-ROLDAN, J. A. *et al.* Afoxolaner (NexGard®) in pet snakes for the treatment and control of *Ophionyssus natricis* (Mesostigmata: macronyssidae). **Parasites & Vectors**, [S.L.], v. 16, n. 1, p. 2-12, 6 jan. 2023. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-022-05611-1>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9825044/>. Acesso em: 15 out. 2024.

MEREDITH, A. *et al.* Rabbit Medicine. In: WESCHE, Petra. **Clinical pathology**. Quedgeley: Bsava, 2016. p. 124-132.

MITCHELL, E. B. *et al.* Efficacy of afoxolaner against *Ixodes scapularis* ticks in dogs. **Veterinary Parasitology**, [S.L.], v. 201, n. 3-4, p. 223-225, abr. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.02.015>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401714000880#sec0005>. Acesso em: 15 out. 2024.

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**, [S.L.], v. 40, n. 3, p. 183-190, 27 nov. 2017. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/01919512.2017.1403306>. Disponível em: https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01919512.2017.1403306?casa_token=aOhtwk bjuTgAAAAA:TpCDdYHA2_oImE6YEkwEnmegMJMNu29iscqNuw6dhLRanCuZmdVCz54bYvR5Suh-wZvf5Ds8yPhJw&casa_token=HN21skUGdiQAAAAA:G5wWDL-tfBe41xaCFKMTkSSqFWItpmcIB8TlJOEbldyY4FxBU5O387XBL_48IY04Dfc2UFm6XZar eg. Acesso em: 22 out. 2024.

NEVES, K. R. *et al.* Hematúria associada à administração de ectoparasiticida à base de afoxolaner – relato de caso. In: XX Encontro Pós-Graduação (enpos)-semana integradas UFPEL, 20., 2018, Pelotas. **Anais [...]**. Pelotas: UFPEL, 2018. p. 1-4. Disponível em: <https://wp.ufpel.edu.br/enpos/anais/anais-2018/>. Acesso em: 28 maio 2024.

NODARI, E. F. *et al.* Cytotoxic effects of permethrin in salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: ixodidae) semi-engorged females. **Experimental Parasitology**, [S.L.], v. 128, n. 2, p. 151-158, jun. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2011.02.003>. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21352824/>. Acesso em: 26 out. 2024.

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**, [S.L.], v. 75, n. 8, p. 1012-1018, 10 mar. 2012. Wiley. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/jemt.22025>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22407742/>. Acesso em: 15 jun. 2024.

OBAID, M. K. *et al.* Acaricides Resistance in Ticks: selection, diagnosis, mechanisms, and mitigation. **Frontiers In Cellular And Infection Microbiology**, [S.L.], v. 12, n. 1, p. 1-20, 6 jul. 2022. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fcimb.2022.941831>. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/cellular-and-infection-microbiology/articles/10.3389/fcimb.2022.941831/full>. Acesso em: 14 out. 2024.

OLIVEIRA, H. H. *et al.* Uso de óleo ozonizado no tratamento tópico de infestação por carrapato em cão - Relato de caso. **Brazilian Journal Of Veterinary Medicine**, S.I, v. 36, n. 4, p. 405-408, dez. 2014. Disponível em: <https://bjvm.org.br/BJVM/article/view/567>. Acesso em: 28 maio 2024.

OLIVEIRA, S. C. *et al.* Uso da planta. **Brazilian Journal Of Development**, [S.L.], v. 6, n. 4, p. 22688-22713, 2020. Brazilian Journal of Development. <http://dx.doi.org/10.34117/bjdv6n4-436>. Disponível em: <https://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/BRJD/article/view/9427/7953>. Acesso em: 26 out. 2024.

OTRANTO, D. *et al.* Editorial. **Veterinary Parasitology**, [S.L.], v. 201, n. 3-4, p. 177-178, abr. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.02.029>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401714001022?via%3Dihub>. Acesso em: 14 out. 2024.

PEARSE, A.G.E., Histochemistry theoretical and applied. 3. ed. Livingstone: Churchill, 1985. p.214.

PEREIRA, C.P.M. *et al.* Effects of fipronil (active ingredient of Frontline®) on salivary gland cells of *Rhipicephalus sanguineus* females (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, [S.L.], v. 166, n. 1-2, p. 124-130, dez. 2009. Elsevier BV. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.08.015>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401709005020#aep-section-id16>. Acesso em: 18 jun. 2024.

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**, [S.L.], v. 127, n. 2, p. 481-489, fev. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2010.10.003>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S001448941000322X#s0070>. Acesso em: 22 out. 2024.

PENIDO, Bruno Rocha; LIMA, Camila de Aguiar; FERREIRA, Luiz Fernando Lucas. Aplicações da ozonioterapia na clínica veterinária. **Pubvet**, [S.L.], v. 4, n. 40, p. 145-168, 1 dez. 2010. Editora MV Valero. <http://dx.doi.org/10.31533/pubvet.v04n40e145>. Disponível em:

<https://ojs.pubvet.com.br/index.php/revista/article/view/2436>. Acesso em: 23 out. 2024.

RAINA, P. *et al.* Evaluation of subacute toxicity of methanolic/aqueous preparation of aerial parts of *Ocimum sanctum* in Wistar rats: clinical, haematological, biochemical and histopathological studies. **Journal Of Ethnopharmacology**, [S.L.], v. 175, p. 509-517, dez. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2015.10.015>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26456329/>. Acesso em: 26 out. 2024.

REMEDIO, R.N. *et al.* Morphological alterations in salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus* ticks (Acari: Ixodidae) exposed to neem seed oil with known *Azadirachta indica* concentration. **Micron**, [S.L.], v. 83, p. 19-31, abr. 2016. Elsevier BV. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micron.2016.01.004>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096843281630004X?via%3Dihub#sec0010>. Acesso em: 22 jun. 2024.

RIBEIRO, H. S. *et al.* Vaccine approaches applied to controlling dog ticks. **Ticks And Tick-Borne Diseases**, [S.L.], v. 12, n. 3, p. 101631, maio 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2020.101631>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1877959X2030501X?via%3Dihub>. Acesso em: 14 out. 2024.

RODRÍGUEZ, L. C. M. **Resposta de linfonodos de bovinos mestiços inoculados a campo com a vacina recombinante rSBm7462® anti *Rhipicephalus (Boophilus) microplus***. 2013. 60 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2013. Disponível em: <https://locus.ufv.br/server/api/core/bitstreams/5ac2d075-2eec-4e9f-9c8c-c2611a9d1a8e/content>. Acesso em: 26 out. 2024.

ROMA, G. C. *et al.* Permethrin-induced ultrastructural changes in oocytes of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) semi-engorged females. **Ticks And Tick-Borne Diseases**, [S.L.], v. 1, n. 3, p. 113-123, set. 2010. Elsevier BV. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2010.05.004>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1877959X10000518?via%3Dihub>. Acesso em: 13 jun. 2024.

SANCHEZ, C. M. S. **A utilização do óleo ozonizado para o tratamento tópico de lesões em porquinho da índia (*Cavia porcellus*) -relato de caso**. 2008. 38 f. TCC (Graduação) - Curso de Curso de Medicina Veterinária, Centro de Ciências da Saúde e Biológicas, Universidade Castelo Branco, Itatiba, 2008. Disponível em: http://www.polivet-itapetininga.vet.br/mhav/tbo/Oleo_ozonizado.pdf. Acesso em: 26 out. 2024.

SANTOS, B. C. M. *et al.* Relatório de Estágio Profissionalizante. Porto: Universidade de Porto, 2020. Disponível em: <https://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/10216/129528/2/424501.pdf>. Acesso em: 07 fev. 2023.

SAUER, J.R. *et al.* Salivary glands in ixodid ticks: control and mechanism of secretion. **Journal Of Insect Physiology**, [S.L.], v. 46, n. 7, p. 1069-1078, jul. 2000. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0022-1910\(99\)00210-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0022-1910(99)00210-3). Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022191099002103?casa_token=V_2nmC30FbMAAAAA:NtLWyi7uSAW38ObR0tLLG0kGJP3fK7vK2BZZGcUn_Ym9QocYnmP2Gbd9zxmCYPouOjyS3RV4rMbD. Acesso em: 12 jul. 2024.

SAYIM, F. Dimethoate-induced biochemical and histopathological changes in the liver of rats. **Experimental And Toxicologic Pathology**, [S.L.], v. 59, n. 3-4, p. 237-243, nov. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.etp.2007.05.008>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0940299307000607?via%3Dihub#aep-section-id15>. Acesso em: 29 out. 2024.

SCOTT, F. *et al.* Efficacy of sarolaner (Simparic™) against induced infestations of *Amblyomma cajennense* on dogs. **Parasites & Vectors**, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 1-5, 17 ago. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-017-2324-0>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5559851/>. Acesso em: 26 out. 2024.

SERENO, A. S. F. **Relatório final de estágio curricular em prática veterinária, realizado junto a Boehringer ingelheim saúde animal ltda em São Paulo – SP: revisão de literatura: uso de isoxazolinas como alternativa ao controle de ectoparasitas de animais de companhia**. Jaboticaba: Unesp, 2023. 64 p. Trabalho apresentado à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP, Câmpus de Jaboticabal, para graduação em Medicina Veterinária. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/items/8ae52051-787f-4b5b-be2b-2700a97bad6e>. Acesso em: 28 maio 2024.

ŠLAPETA, J. *et al.* *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 And Tick-Borne Diseases**, [S.L.], v. 13, n. 6, p. 102024-102037, nov. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2022.102024>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1877959X22001261?via%3Dihub>. Acesso em: 28 maio 2024.

SODELLI, L. F. **Avaliação bioquímica e morfohistológica de coelhas expostas a acaricida obtido a partir do ácido ricinoléico do óleo de mamona**. 2019. 46 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular), Universidade Estadual Paulista (Unesp), Rio Claro, 2019. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/server/api/core/bitstreams/2c11e833-74cc-4583-ad96-954c3956a011/content>. Acesso em: 26 out. 2024.

SODELLI, L. F. *et al.* Liver and spleen of hosts of *Rhipicephalus linnaei* exposed to synthetic (afoxolaner) and natural acaricides (esters from castor oil). A comparative clinical-morphological study. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, [S.L.], v. 32, n. 3, p. 1-13, maio 2023. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1984-29612023041>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbpv/a/ngb7tBRjkyFNpFFfPxXZvSJ/>. Acesso em: 12 jun. 2024

SONENSHINE, D. E. *et al.* **Biology of Ticks**. 2. ed. New York: Oxford University Press, 2014. 2 v. Disponível em: <https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=gck4AAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=SONENSHINE,+Daniel+E.+Biology+of+Ticks&ots=TdjAgzbr9b&sig=cFrPMNEPnZrcJshnUNpfZbpgmMU8#v=onepage&q=SONENSHINE%2C%20Daniel%20E.%20Biology%20of%20Ticks&f=false>. Acesso em: 12 jul. 2024

SOUZA, J. R. L. **Avaliação dos efeitos subletais do carvacrol na morfologia do**

integumento e do ovário de fêmeas de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (s.l.) (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). 2019. 31 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro, 2019. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/server/api/core/bitstreams/ec1ac7d5-c8ea-4129-8ad1-be93755bed08/content>. Acesso em: 20 jun. 2024.

SOUZA, R. C. *et al.* Utilização do Óleo de Girassol Ozonizado no Tratamento Tópico de Ferida por Farmacodermia em Cão: relato de caso. **Uniciências**, [S.L.], v. 26, n. 1, p. 08-11, 23 jun. 2022. Editora e Distribuidora Educacional. <http://dx.doi.org/10.17921/1415-5141.2022v26n1p08-11>. Disponível em: <https://uniciencias.pgsscogna.com.br/uniciencias/article/view/9631>. Acesso em: 28 maio 2024.

SOUZA, S. M. O. **Estudo da interferência de substratos orgânicos na ação do ozônio sobre microrganismos deteriorantes, benéficos e patogênicos.** 2016. 134 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Animais, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2016. Disponível em: <http://icts.unb.br/jspui/handle/10482/23292>. Acesso em: 26 out. 2024.

SZABÓ, M. P. J. *et al.* Efeito acaricida da mistura oxigênio - ozônio sobre o carrapato *Rhipicephalus sanguineus*. **Periódicos Brasileiros em Medicina Veterinária e Zootecnia**, Uberlândia, v. 15, n. 2, p. 43-50, dez. 2009. Periódico. Disponível em: [https://bvs-vet.org.br/vetindex/periodicos/veterinaria-noticias/15-\(2009\)-2/efeito-acaricida-da-mistura-oxigenio---ozonio-sobre-o-carrapato-rhipic/](https://bvs-vet.org.br/vetindex/periodicos/veterinaria-noticias/15-(2009)-2/efeito-acaricida-da-mistura-oxigenio---ozonio-sobre-o-carrapato-rhipic/). Acesso em: 29 maio 2024.

TAYLOR, M.A. Recent Developments in Ectoparasitocides. **The Veterinary Journal**, [S.L.], v. 161, n. 3, p. 253-268, maio 2001. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1053/tvj.2000.0549>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11352483/>. Acesso em: 15 out. 2024.

VALE, T. L. **Controle dos parasitos do cão e avaliação do efeito carrapaticida do carvacrol.** 2023. 117 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2023. Disponível em: <http://www.tedebr.ufma.br:8080/jspui/handle/tede/4746>. Acesso em: 25 maio 2024.

VARGAS, G. V. *et al.* **Estudio comparativo del efecto larvicida del afoxolaner (Nexgard®) y sarolaner (Simparica®) en el tratamiento de miasis en caninos en Santo Domingo, D.N.** 2024. 81 f. Tese (Doutorado) - Curso de Medicina Veterinaria, Universidad Pedro Henríquez Ureña, Santo Domingo, 2024. Disponível em: <https://repositorio.unphu.edu.do/handle/123456789/5576>. Acesso em: 14 out. 2024.