

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS

DISSERTAÇÃO

**Caracterização Celular da Hemolinfa e Avaliação da Resposta
Celular Após Exposição *in vitro* ao Fluazuron de Fêmeas
Ingurgitadas de *Amblyomma sculptum***

Andressa Aparecida de Lima Reis

2020



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**CARACTERIZAÇÃO CELULAR DA HEMOLINFA E AVALIAÇÃO DA
RESPOSTA CELULAR APÓS EXPOSIÇÃO *IN VITRO* AO
FLUAZURON DE FÊMEAS INGURGITADAS DE *Amblyomma sculptum***

ANDRESSA APARECIDA DE LIMA REIS

Sob a Orientação do Professor

Dr. Fabio Barbour Scott

e Co-orientação do

Dr. Diefrey Ribeiro Campos

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Veterinárias**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Seropédica, RJ
Março de 2020

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

R375c REIS, Andressa Aparecida de Lima, 1987-
Caracterização celular da hemolinfa e avaliação da
resposta celular após exposição in vitro ao fluazuron
de fêmeas ingurgitadas de *Amblyomma sculptum*. /
Andressa Aparecida de Lima REIS. - Juiz de Fora, 2020.
54 f.: il.

Orientador: Fabio Barbour SCOTT.
Coorientador: Diefrey Ribeiro CAMPOS.
Dissertação(Mestrado). -- Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós Graduação em
Ciências Veterinárias, 2020.

1. Carrapatos. 2. Hemócitos. 3. Benzoilfenilureia.
4. Hemolinfa. 5. Fluazuron. I. SCOTT, Fabio Barbour,
1966-, orient. II. CAMPOS, Diefrey Ribeiro , 1988-
coorient. III Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro. Programa de Pós Graduação em Ciências
Veterinárias. IV. Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



ATA Nº 375/2023 - PPGCV (12.28.01.00.00.00.50)

Nº do Protocolo: 23083.005847/2023-16

Seropédica-RJ, 03 de fevereiro de 2023.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
ANDRESSA APARECIDA DE LIMA REIS

Tese submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre(a) em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 05/03/2020

Conforme deliberação número 001/2020 da PROPPG, de 30/06/2020, tendo em vista a implementação de trabalho remoto e durante a vigência do período de suspensão das atividades acadêmicas presenciais, em virtude das medidas adotadas para reduzir a propagação da pandemia de Covid-19, nas versões finais das teses e dissertações as assinaturas originais dos membros da banca examinadora poderão ser substituídas por documento(s) com assinaturas eletrônicas. Estas devem ser feitas na própria folha de assinaturas, através do SIPAC, ou do Sistema Eletrônico de Informações (SEI) e neste caso a folha com a assinatura deve constar como anexo ao final da tese/dissertação.

(Assinado digitalmente em 09/02/2023 11:18)

FABIO BARBOUR SCOTT

DeptPA (12.28.01.00.00.00.55)

Matrícula: ###736#0

(Assinado digitalmente em 08/02/2023 16:55)

LICIUS DE SÁ FREIRE

CPF: ###.###.367-##

(Assinado digitalmente em 07/02/2023 11:28)

BARBARA RAUTA DE AVELAR

CPF: ###.###.647-##

À minha mãe
Rosiléia Aparecida de Lima (*in memoriam*),
e ao meu pai
Jair Duque dos Reis (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

À Deus entreguei meu destino e todos meus sonhos e agradeço por me conceder força e saúde para seguir nessa jornada. Obrigada por toda proteção e por me guiar em cada decisão.

À memória de meu pai e minha mãe, que mesmo depois de terem partido, deixaram comigo todo o amor e seus ensinamentos que diariamente me guiam. Muito especialmente à minha mãe, que deixou plantado em meu coração a coragem para sempre seguir em frente. À vocês, pais, saudade e gratidão. “O essencial é invisível aos olhos”.

Aos meus irmãos e sobrinhos, por todo apoio e referência familiar. Ao meu irmão Fabrício Dayaham de Lima Reis, que sempre acreditou em meu potencial, obrigada pelo companheirismo diário e incentivo fundamental em minha vida.

À minha madrinha Maria Angélica Vidal, que mesmo com a distância nunca deixou de me aconselhar e apoiar minhas decisões, me ensinando que devemos correr atrás dos nossos sonhos sem nunca esquecer as pessoas que amamos e a minha afilhada Maria Caroline F. G. de Lima Reis, por me fazer entender o significado de amor incondicional. Te amo.

A todos meus amigos que sempre me apoiaram e estiveram presentes com palavras e gestos, e de modo especial à Karina Godet Figueiredo e Marcelly Leitão Dias, irmãs que Deus colocou em minha vida e se tornaram minha família. Obrigada por todo amor.

Ao meu companheiro de vida, Israel da Cunha Júnior, obrigado por cada gesto de carinho, pelas provas diárias de amor, por todo cuidado, apoio e compreensão nos momentos mais difíceis desta jornada.

À toda equipe do LQEPV e seus colaboradores, que com o passar dos dias se tornaram para mim uma família, em especial à Rayane Christine Pereira de Assis e com imenso carinho à Dona Rogéria Froes da Silva Lima, pela alegria diária e por todo cuidado e dedicação a todos nós.

Aos amigos que ganhei durante a jornada do mestrado, em especial e com muito carinho à minha amiga Marisa Beatriz da Silva Rocha pelo companheirismo inabalável, e a todos os professores, técnicos e estagiários que muito me ensinaram. Com certeza muitos de vocês farão parte da minha trajetória de agora em diante.

Aos residentes de Parasitologia Animal, Brena Gava Guimarães, Gabriel Alcides Capucho de Lima, Gabriela Pereira Salça de Almeida e So Yin Nak, obrigada pela amizade. Foi um prazer trabalhar com vocês.

À Cecília Lopes da Conceição pela parceria no setor de análises clínicas.

Agradeço à Letícia Vidal e Jéssica Fiorotti por todo carinho e ajuda voluntária.

Às meninas da administração do LQEPV, Jéssica Lobato, Aline Pereira e Rafaella Vizzoni e à todos do setor de farmacologia o meu obrigado. Nosso trabalho não seria possível sem vocês.

Ao meu querido orientador e exemplo profissional Fabio Barbour Scott por todo apoio e ensinamento, ao meu co-orientador Diefrey Ribeiro Campos, à Debora Azevedo Borges e Barbara Rauta de Avelar, por todo zelo, carinho, confiança e amizade. Obrigada pelas inúmeras contribuições e por transmitirem seus conhecimentos, facilitando essa experiência e tornando possível este trabalho.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, agradeço o financiamento desta pesquisa.

Também agradeço à Fundação de Apoio à Pesquisa Científica e Tecnológica da UFRRJ (FAPUR) pelo apoio e incentivo.

Agradeço aos animais, pacientes ou não. Vocês foram nossos maiores professores, nos ensinando mesmo sem palavras a ter paciência e humildade.

Por fim, agradeço ao meu amado companheiro felino Greg, pelo amor incondicional, por alegrar meus dias durante nossos 13 anos juntos e pela companhia durante as noites de estudo. Que você viva para sempre.

À todos vocês, o meu muito obrigado!

BIOGRAFIA

Andressa Aparecida de Lima Reis, filha de Rosiléia Aparecida de Lima e Jair Duque dos Reis, nasceu em 13 de junho de 1987 em Juiz de Fora – Minas Gerais, onde viveu até o ano de 2000. Estudou o Ensino Fundamental no Instituto Educacional Allan Kardec em Juiz de Fora. Logo após se mudou para o estado do Rio de Janeiro e terminou os estudos do ensino médio no Colégio Estadual Montebello Bondim em Muriqui – Mangaratiba. Em 2006 foi aprovada no vestibular em Medicina Veterinária e ingressou na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) em Seropédica – Rio de Janeiro. Durante a graduação, sempre se dedicou a Patologia Clínica Veterinária, fazendo estágios em laboratórios e clínicas. Em 2012 concluiu a graduação e ingressou no mercado de trabalho como Patologista Clínica. Em 2016, após prestar o concurso para Residência em área profissional da Saúde no programa de Residência em Medicina Veterinária com ênfase em Diagnóstico em Medicina Veterinária – Patologia Clínica Veterinária da UFRRJ e ser aprovada no processo seletivo, retornou a instituição sob tutoria da Professora Dr.^a Cristiane Divan Baldani durante dois anos. Em 2018, ao término da residência, foi aprovada no processo seletivo para Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro atuando como mestranda no Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária na mesma universidade sob a orientação do professor Dr. Fábio B. Scott. Desde agosto de 2019 é preceptora voluntária dos residentes de Diagnóstico em Parasitologia Animal do Programa de Residência em Área Profissional da Saúde da UFRRJ.

RESUMO

REIS, Andressa Aparecida de Lima. **Caracterização celular da hemolinfa e avaliação da resposta celular após exposição *in vitro* ao fluazuron de fêmeas ingurgitadas de *Amblyomma sculptum***. 2020. 40p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2020.

O objetivo deste trabalho foi caracterizar quantitativamente e morfológicamente os hemócitos presentes na hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *A. sculptum* e avaliar a resposta imune celular deste após a exposição *in vitro* ao fluazuron. Para caracterização celular hemolinfática, a hemolinfa foi coletada através de uma perfuração da cutícula na parte dorsal e posteriormente colocada diretamente em lâmina de vidro para confecção dos esfregaços que foram corados por solução de Giemsa. Foi realizada a contagem diferencial de hemócitos com base na morfologia observada em microscópio óptico em aumento de 1000 vezes, através da identificação das 100 primeiras células encontradas no esfregaço corado. A avaliação dos tamanhos celulares e de suas estruturas foi realizada através da leitura das lâminas confeccionadas para contagem diferencial dos hemócitos com o auxílio de um Microscópio óptico Olympus modelo BX51 com luz polarizada, acoplado a uma câmera da mesma marca de modelo UC30. A contagem total de hemócitos foi realizada com auxílio de microscópio óptico e Câmara de Neubauer. Para avaliação da resposta celular após a exposição *in vitro* ao fluazuron foram realizados testes de imersão com as fêmeas ingurgitadas de *A. sculptum* nos grupos controle (com apenas os diluentes) e tratados (7,81, 250 e 4000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Foi coletada hemolinfa para contagem total e diferencial de hemócitos nos tempos de 24h e 48h após a imersão. A caracterização celular revelou que o carrapato *A. sculptum* apresenta média de 1024 céls/ μL e seis tipos celulares: prohemócitos, plasmatócitos, granulócitos, esferulócitos, adipohemócitos e oenocitóides que se distribuem de forma distinta na hemolinfa, onde o granulócito foi o tipo mais frequente. O fluazuron foi capaz de realizar alterações celulares no carrapato *A. sculptum* promovendo a diminuição dos hemócitos totais na concentração de 4000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ após 48h, assim como reduzir a frequência de granulócitos e aumentar a frequência de esferulócitos na contagem diferencial. Conclui-se que a partir da microscopia óptica foi possível determinar o valor médio do total de hemócitos circulantes, classificar morfológicamente seis tipos celulares: prohemócitos, plasmatócitos, granulócitos, esferulócitos, adipohemócitos e oenocitoides e determinar a frequência média de cada tipo na hemolinfa de *A. sculptum*. Além disso, o fluazuron foi capaz de promover alteração celular na hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *A. sculptum* após exposição *in vitro*.

Palavras-chave: hemócitos, carrapatos, benzoilfenilureia.

ABSTRACT

REIS, Andressa Aparecida de Lima. **Cellular characterization of hemolymph and evaluation of cell response after *in vitro* exposure to fluazuron from engorged females of *Amblyomma sculptum*.** 2020. 40p. Dissertation (Master in Veterinary Sciences). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2020.

The objective of this work was to characterize quantitatively and morphologically the hemocytes present in the hemolymph of engorged females of *A. sculptum* and to evaluate the cellular immune response of this after exposure *in vitro* to fluazuron. For hemolymphatic cell characterization, the hemolymph was collected through a cuticle perforation in the dorsal part and later placed directly on a glass slide to make the smears that were stained with Giemsa's solution. Differential hemocyte counts were performed based on the morphology observed in an optical microscope in 1000-fold magnification, by identifying the first 100 cells found in the stained smear. The evaluation of cell sizes and their structures was performed by reading the slides made for differential counting of hemocytes with the aid of an Olympus optical microscope model BX51 with polarized light, coupled to a camera of the same brand model UC30. The total hemocyte count was performed with the aid of an optical microscope and a Neubauer Chamber. To evaluate the cellular response after *in vitro* exposure to fluazuron, immersion tests were performed with the engorged females of *A. sculptum* in the control groups (with only the diluents) and treated (7.81, 250 and 4000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Hemolymph was collected for total and differential hemocyte counts at 24h and 48h after immersion. Cell characterization revealed that the *A. sculptum* tick has an average of 1024 cells / μL and six cell types: prohemocytes, plasmatocytes, granulocytes, spherulocytes, adipohemocytes and oenocytoids that are distributed differently in the hemolymph, where granulocyte was the most frequent type. Fluazuron was able to make cellular alterations in the tick *A. sculptum* promoting the reduction of total hemocytes in the concentration of 4000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ after 48h, as well as reducing the frequency of granulocytes and increasing the frequency of spherulocytes in the differential count. It was concluded that, using optical microscopy, it was possible to determine the average value of the total circulating hemocytes, to morphologically classify six cell types: prohemocytes, plasmatocytes, granulocytes, spherulocytes, adipohemocytes and oenocytoids and to determine the average frequency of each type in hemolymph *A. sculptum*. Furthermore, fluazuron was able to promote cellular alteration in the hemolymph of engorged females of *A. sculptum* after *in vitro* exposure.

Key words: hemocytes, ticks, benzoylphenylurea.

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 – Média do total de hemócitos de fêmeas ingurgitadas de <i>Amblyomma sculptum</i> . | 17 |
| Tabela 2 – Médias dos diâmetros maior e menor dos tipos celulares e de seus respectivos núcleos presentes na hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de <i>Amblyomma sculptum</i> . | 20 |
| Tabela 3 – Médias dos diâmetros maior e menor dos grânulos e esférulas dos tipos celulares granulócitos tipo I e esferócitos presentes na hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de <i>Amblyomma sculptum</i> . | 21 |
| Tabela 4 – Percentual médio dos tipos de hemócitos encontrados na hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de <i>Amblyomma sculptum</i> . | 21 |
| Tabela 5 - Peso médio das teleógina, postura e quenógina; Índice de nutrição, fecundidade e porcentagem de mortalidade de fêmeas ingurgitadas de <i>A. sculptum</i> expostas a diferentes concentrações de Fluazuron. | 22 |
| Tabela 6 – Percentual médio dos tipos de hemócitos encontrados na hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de <i>Amblyomma sculptum</i> após imersão em fluazuron nas concentrações de 7,81, 250 e 4000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ nos tempos de 24h e 48h. | 24 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 – Fases de vida parasitárias do carrapato <i>Amblyomma sculptum</i> . Fonte: Adaptado de tickencounter.org | 3 |
| Figura 2 – Ciclo biológico de <i>Amblyomma sculptum</i> . Fonte: Adaptado de JARDIM, 2014. | 5 |
| Figura 3 – Material utilizado para realização da coleta de hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de <i>Amblyomma sculptum</i> . (A) Capilar de vidro (CTechGlass®) de 0,3mm de diâmetro, tubo de scalp calibre 23, massa de modelar, ponteira com filtro para pipeta de 200µL e agulha de 0,3mm. (B) Dispositivo produzido pronto para coleta. | 13 |
| Figura 4 – Coleta da hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de <i>Amblyomma sculptum</i> . (A) Perfuração da cutícula na parte dorsal do carrapato. (B) Drenagem da hemolinfa com o auxílio do dispositivo produzido..... | 13 |
| Figura 5 – Hemócitos de hemolinfa recém-coletada de fêmeas ingurgitadas de <i>Amblyomma sculptum</i> para contagem em Câmara de Neubauer (Aumento de 400x) | 14 |
| Figura 6 – Tipos de hemócitos identificados na hemolinfa de <i>Amblyomma sculptum</i> . Microscopia óptica (Aumento de 1000x). Coloração Giemsa | 15 |
| Figura 7 – Prohemócitos presentes na hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de <i>Amblyomma sculptum</i> . Microscopia óptica (Aumento de 1000x). Coloração Giemsa | 17 |
| Figura 8 – Plasmatócitos presentes na hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de <i>Amblyomma sculptum</i> . Microscopia óptica (Aumento de 1000x). Coloração Giemsa..... | 18 |
| Figura 9 – Granulócitos Tipo I presentes na hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de <i>Amblyomma sculptum</i> . Microscopia óptica (Aumento de 1000x). Coloração Giemsa | 18 |
| Figura 10 – Granulócitos Tipo II presentes na hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de <i>Amblyomma sculptum</i> . Microscopia óptica (Aumento de 1000x). Coloração Giemsa..... | 19 |
| Figura 11 – Esferulócitos presentes na hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de <i>Amblyomma sculptum</i> . Microscopia óptica (Aumento de 1000x). Coloração Giemsa..... | 19 |
| Figura 12 – Adipohemócitos presentes na hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de <i>Amblyomma sculptum</i> . Microscopia óptica (Aumento de 1000x). Coloração Giemsa..... | 19 |
| Figura 13 – Oenocitoides presentes na hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de <i>Amblyomma sculptum</i> . Microscopia óptica (Aumento de 1000x). Coloração Giemsa..... | 20 |
| Figura 14 - Medidas dos tipos celulares presentes na hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de <i>Amblyomma sculptum</i> comparadas com as medidas descritas por outros autores em diferentes artrópodes. (PR) Prohemócitos; (PL) Plasmatócitos; (ES) Esferulócitos; (OE) Oenocitoides; (GR I) Granulócitos Tipo I; (GR II) Granulócitos Tipo II..... | 27 |

SUMÁRIO

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 2 | REVISÃO DE LITERATURA..... | 3 |
| 2.1 | O carrapato <i>Amblyomma sculptum</i> | 3 |
| 2.2 | Ciclo Biológico do carrapato <i>Amblyomma sculptum</i> | 4 |
| 2.3 | Importância de <i>Amblyomma sculptum</i> | 5 |
| 2.4 | Controle..... | 6 |
| 2.5 | Reguladores de Crescimento de Insetos (Insect Growth Regulators - IGR's)..... | 7 |
| 2.6 | Fluazuron..... | 7 |
| 2.7 | Sistema Imunológico dos Carrapatos..... | 8 |
| 2.8 | Hemolinfa, hemócitos e resposta imune celular..... | 9 |
| 2.9 | Alterações celulares em artrópodes expostos a agentes patológicos..... | 10 |
| 3 | MATERIAL E MÉTODOS..... | 12 |
| 3.1 | Local..... | 12 |
| 3.2 | Procedência das Fêmeas Ingurgitadas de <i>Amblyomma sculptum</i> | 12 |
| 3.3 | Caracterização da hemolinfa..... | 12 |
| 3.3.1 | Determinação dos grupos experimentais..... | 12 |
| 3.3.2 | Coleta de Hemolinfa..... | 12 |
| 3.3.3 | Contagem total de hemócitos..... | 13 |
| 3.3.4 | Contagem diferencial de hemócitos..... | 14 |
| 3.3.5 | Avaliação dos tamanhos celulares e seus componentes..... | 15 |
| 3.4 | Obtenção da Formulação de Fluazuron..... | 15 |
| 3.5 | Teste de Imersão de Fêmeas ingurgitadas (AIT)..... | 15 |
| 3.6 | Avaliação da resposta celular das fêmeas ingurgitadas ao fluazuron..... | 16 |
| 3.6.1 | Determinação dos grupos experimentais..... | 16 |
| 3.6.2 | Exposição das fêmeas ingurgitadas ao fluazuron..... | 16 |
| 3.6.3 | Coleta de hemolinfa..... | 16 |
| 3.6.4 | Contagem total de hemócitos..... | 16 |
| 3.6.5 | Contagem diferencial de hemócitos..... | 16 |
| 3.7 | Análise estatística..... | 16 |
| 4 | RESULTADOS..... | 17 |
| 4.1 | Caracterização celular..... | 17 |
| 4.1.1 | Quantificação total dos hemócitos..... | 17 |

| | | |
|-------|--|----|
| 4.1.2 | Classificação e avaliação celular | 17 |
| 4.1.3 | Contagem diferencial dos hemócitos | 21 |
| 4.2 | Teste de Imersão de Fêmeas ingurgitadas (AIT) | 21 |
| 4.3 | Avaliação da Resposta Celular das Fêmeas Ingurgitadas ao Fluazuron | 22 |
| 4.3.1 | Quantificação total de hemócitos..... | 22 |
| 4.3.2 | Contagem diferencial de hemócitos..... | 22 |
| 5 | DISCUSSÃO..... | 25 |
| 5.1 | Caracterização celular..... | 25 |
| 5.2 | Teste de Imersão de fêmeas ingurgitadas e Avaliação da resposta celular das ao Fluazuron | 28 |
| 6 | CONCLUSÃO..... | 29 |
| 7 | CONSIDERAÇÕES FINAIS | 30 |
| 8 | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 31 |
| 9 | ANEXO | 40 |
| 9.1 | Certificado de aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Veterinária da Universidade Federal do Rio de Janeiro..... | 40 |

1 INTRODUÇÃO

Com ampla distribuição geográfica no Brasil e no mundo os carrapatos são responsáveis por causarem grandes prejuízos na medicina veterinária e humana. São capazes de parasitar aves, répteis, anfíbio e mamíferos, inclusive o homem.

O carrapato *Amblyomma cajennense* possui baixa especificidade em relação aos seus hospedeiros, ou seja, pode parasitar diversas espécies incluindo o homem e apresenta grande importância na saúde pública, sendo protagonista em diversos estudos científicos. Antes de 2014 era considerado uma única espécie, porém atualmente é considerado um complexo de seis espécies: *A. cajennense*, *A. mixtum*, *A. sculptum*, *A. tonelliae*, *A. interandinum* e *A. patinoi*. É conhecido popularmente como “carrapato-do-cavalo” ou “carrapato-estrela”, mas sua larva pode ser chamada de “micuim” e a fêmea ingurgitada de “rodoleiro”.

Amblyomma sculptum possui grande importância na medicina veterinária pois são capazes de causar lesões cutâneas que predisõem a miíases e infecções secundárias em seus hospedeiros, além de estresse, espoliação sanguínea e consequente anemia, inoculação de toxinas e transmissão de patógenos, podendo levar o hospedeiro a morte. Também são responsáveis por grandes prejuízos econômicos na pecuária, pois com a hematofagia intensa causam danos permanentes ao couro dos animais.

A indústria equina possui o maior rebanho da América Latina e mobiliza bilhões de reais por ano, porém a criação de equinos vai além dos lucros na economia, pois atuam nas áreas de educação, recreação e exercem papel importante na área da saúde. Desde 1989 a equoterapia passou a ser considerada prática medicinal reconhecida oficialmente como recurso terapêutico. Neste contexto, *Amblyomma sculptum* apresenta grande importância, pois tem como principais hospedeiros equinos de áreas suburbanas e rurais representando grande importância econômica e social por causar prejuízos na equinocultura e por estar ligado diretamente a transmissão de doenças aos humanos, despertado o interesse na saúde pública.

Este artrópode está envolvido na transmissão da bactéria *Borrelia burgdoferi*, que provoca doença de Lyme em humanos, e é o principal transmissor da bactéria *Rickettsia rickettsii*, reconhecida como sendo principal vetor da Febre Maculosa Brasileira (FMB), doença que possui alta letalidade em humanos. Qualquer fase deste carrapato (larva, ninfa e adulto) é capaz de transmitir essa bactéria através da picada durante o repasto sanguíneo e sua capacidade de transmissão transovariana o torna simultaneamente vetor e reservatório do agente dessa doença.

Através de um controle estratégico de ectoparasitas a fim de reduzir o número de carrapatos nos animais e no ambiente pode-se obter um efetivo controle da FMB. A fase adulta dos carrapatos é mais resistente aos carrapaticidas enquanto estágios mais imaturos (larvas e ninfas) são mais sensíveis, porém uma ação que interrompa o ciclo nas fases mais jovens do carrapato irá consequentemente agir de forma direta na formação da fase adulta. O controle destes artrópodes não deve se limitar ao uso de acaricidas em animais. É necessário o controle de ambientes considerados infestados por *A. sculptum* e o manejo adequado da fauna silvestre, como pequenos mamíferos, que podem atuar como hospedeiros, tornando-se mantenedores e dispersores de carrapatos no ambiente.

O controle químico destes artrópodes no hospedeiro tem sido realizado através da aplicação de inúmeros princípios ativos com atividade acaricida, pertencentes a grupamentos químicos como os dos carbamatos, organofosforados, piretróides, amidinas, fenilpirazóis, lactonas macrocíclicas, e as benzoilfenilureias. As benzoilfenilureias representa um grupo de reguladores de crescimento de insetos que atuam de forma a interromper o ciclo evolutivo do carrapato e vem sendo usados como alternativa para o controle desses ixodídeos. O fluazuron é um exemplo de reguladores de crescimento de insetos e tem a capacidade de interferir na

produção de quitina do artrópode (substância que possibilita o endurecimento da cutícula dos carrapatos) impedindo que os carrapatos mudem de fase e cresçam e se reproduzam, controlando a população. Esse composto já vem sendo usado amplamente, para o controle do carrapato do boi, *Rhipicephalus microplus*.

O uso incorreto e indiscriminado de acaricidas está diretamente relacionado com o aparecimento de populações de carrapatos resistentes. As informações sobre a resposta imune inata em carrapatos é bastante fragmentada e permite apenas comparações com outras espécies de invertebrados, especialmente artrópodes, no entanto, mesmo esses dados dispersos indicam que os carrapatos possuem mecanismos de defesa contra infecções, patógenos e acaricidas

A hemolinfa, um fluido que irriga e nutre seus tecidos dos carrapatos, contém hemócitos e numerosas proteínas em sua composição e possui grande importância na imunidade inata. Os hemócitos constituem a parte celular da hemolinfa dos carrapatos. Estes apresentam diversas funções, como defesa do organismo e transporte de substâncias como hormônios, enzimas e compostos orgânicos a serem excretados.

Através de estudos que buscam elucidar o papel da resposta celular na imunidade dos carrapatos busca-se esclarecimentos a fim de entender de forma detalhada a imunologia e fisiologia envolvida nos mecanismos de controle e resistência. Desta forma se fazem necessários estudos que busquem maiores esclarecimentos sobre a resposta imunológica destes ácaros.

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi caracterizar quantitativamente e morfológicamente os hemócitos presentes na hemolinfa de fêmeas ingurgitadas do carrapato *A. sculptum* e avaliar a resposta imune celular deste carrapato após a exposição *in vitro* ao fluazuron.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O carrapato *Amblyomma sculptum*

Os carrapatos são ectoparasitas hematófagos da classe Arachnida capazes de parasitar anfíbios, répteis, aves e mamíferos, incluindo o homem (MARTINS et al., 2015). Mundialmente, mais de 900 espécies de carrapatos são conhecidas e estão classificadas em três distintas famílias: Argasidae, Ixodidae e Nuttalliellidae (GUGLIELMONE; NAVA, 2014). As famílias Argasidae e Ixodidae, conhecidas como carrapatos “moles” e carrapatos “duros”, respectivamente, possuem ampla distribuição geográfica e estão presentes inclusive no Brasil. Já a presença da família Nuttalliellidae se limita ao continente africano (MANS et al., 2011).

Com cerca de 720 espécies reconhecidas, os carrapatos da família Ixodidae são considerados de grande importância, pois além de estarem distribuídos por vários continentes possuem alta capacidade reprodutiva, são capazes de transmitir agentes patogênicos aos seus hospedeiros causando grandes prejuízos na medicina veterinária e humana (FURLONG, 2005; BARROS; BATESTTI, 2006).

Pertencente à família Ixodidae, *Amblyomma cajennense*, inicialmente considerado uma espécie, possui baixa especificidade e pode parasitar várias espécies de hospedeiros, apresentando grande importância na saúde pública. Possui três fases evolutivas, larva, ninfa e adulto (Figura 1) e conhecido por diversos nomes populares como “micuim”, “carrapato estrela” e “rodoleiro”, sendo mais conhecido como “carrapato-do-cavalo” (LABRUNA, 2009).



Figura 1 – Fases de vida parasitárias do carrapato *Amblyomma sculptum*. Fonte: Adaptado de tickencounter.org

Devido recentes descrições morfológicas, moleculares e biológicas o táxon *A. cajennense*, passou a ser considerado um complexo (*A. cajennense sensu lato*) de seis espécies: *A. mixtum*, *A. sculptum*, *A. tonelliae*, *A. interandinum*, *A. patinoi* e *A. cajennense sensu stricto*. Outro importante aspecto na identificação das espécies deste complexo são as distintas distribuições geográficas (LABRUNA et al., 2011; MASTROPAOLO et al., 2011; BEATI et al., 2013; NAVA et al., 2014). Na região Amazônica da América do Sul, incluindo o Brasil, é encontrado o *A. cajennense s.s.* As espécies *A. interandinum* e *A. patinoi* são encontradas no Peru e na Colômbia respectivamente. Na Argentina, Bolívia e Paraguai está presente a espécie *A. tonelliae*. *A. mixtum* é encontrado desde os Estados Unidos o Equador. Com relevante distribuição nacional, *A. sculptum* é encontrado em áreas peri-amazônicas no Brasil (Rio de Janeiro, Espírito Santo, Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Pernambuco, Piauí,

Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Goiás) além da Argentina, Bolívia, Paraguai. Assim, as duas únicas espécies encontradas no Brasil são *A. cajennense* s.s. e *A. sculptum* (NAVA et al., 2014).

Um estudo publicado por Estrada-Pena e colaboradores (2014), reforça a ideia de distribuição geográfica em relação às espécies, onde através de modelagem ambiental com alterações como vegetação e temperatura evidenciou padrões preferenciais divergentes entre os carrapatos do complexo *A. cajennense*.

2.2 Ciclo Biológico do carrapato *Amblyomma sculptum*

O carrapato *A. sculptum* necessita de três hospedeiros para completar seu ciclo, sendo trióxeno (Figura 2). Além disso, possui baixa especificidade parasitária, ou seja, pode parasitar mais de uma espécie diferente durante o seu ciclo (heteróximo) (COSTA; BOTELHO, 2011).

O início do ciclo biológico desta espécie se dá quando os ovos, no ambiente, eclodem, dando origem a larvas que irão esperar por um hospedeiro em potencial. Normalmente se observa um aglomerado de larvas nas extremidades de folhas, arbustos e gramíneas. Estas deixam o ambiente quando encontram um hospedeiro, se fixam no animal e realizam o repasto durante três a seis dias. Após a alimentação, as larvas se encontram ingurgitadas, se desprendem do hospedeiro retornando ao ambiente e buscando um local seguro, adequado e favorável para seguir para próxima fase do ciclo.

Após desprender de seu hospedeiro, leva um período de 14 a 21 dias para realizar a ecdise, ou seja, o processo de muda, fazendo com que passe para o estágio de ninfa. Neste momento deixam de ter três pares de patas e passam a ter quatro pares. As ninfas não alimentadas presentes no ambiente também necessitam de um hospedeiro para se alimentar. Diferentes das larvas, que ficam no ambiente apenas aguardando a passagem de um hospedeiro em potencial, as ninfas apresentam comportamento de ataque, onde realizam busca ativa de curta distância para realização do repasto sanguíneo. Após encontrarem um novo hospedeiro se alimentam permanecendo fixadas por um período de quatro a sete dias. Ao finalizar o repasto sanguíneo se desprendem do hospedeiro, caem ao solo, se abrigando por, aproximadamente, 23 a 25 dias para realização da ecdise.

Ao término da muda as ninfas se tornam adultos não alimentados. Nesta fase os carrapatos permanecem com quatro pares de patas, mas diferente das larvas e ninfas, há dimorfismo sexual. Os adultos não alimentados buscam de forma ativa um novo hospedeiro, acasalam e realizam repasto sanguíneo. Após sete a 10 dias, as fêmeas alimentadas (teleóginas), se desprendem do hospedeiro e no ambiente buscam um local seguro e favorável para realização da oviposição. Em condições ideais de umidade e temperatura realizam a postura dos ovos e morrem (quenóginas). Decorrendo aproximadamente 30 dias os ovos eclodem libertando as larvas para o ambiente, dando início a um novo ciclo de vida desse carrapato (LABRUNA et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2003; PEREIRA; LABRUNA, 2008; GUEDES; LEITE, 2008; CABRERA; LABRUNA, 2009).

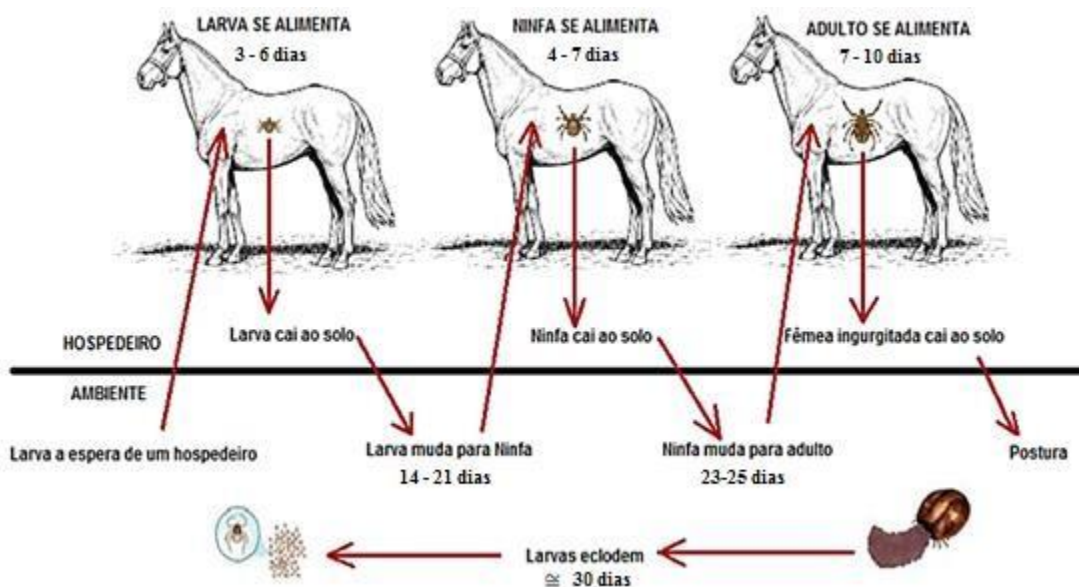


Figura 2 – Ciclo biológico de *Amblyomma sculptum*. Fonte: Adaptado de JARDIM, 2014.

2.3 Importância de *Amblyomma sculptum*

Amblyomma sculptum possui grande importância na saúde pública, pois exerce um papel de participação ativa na transmissão de doenças aos humanos devido à capacidade de transmitir agentes patogênicos (RODRIGUES et al., 2015; MORAES-FILHO, 2017). Além de estar envolvido na transmissão da bactéria *Borrelia burgdoferi* que provoca doença de Lyme (SHINJO et al., 2009), este carrapato é o principal transmissor da bactéria *Rickettsia rickettsii*, causadora da Febre Maculosa Brasileira (FMB) doença que possui alta letalidade (LABRUNA, 2009).

Em termos epidemiológicos, esta espécie pode ser de forma simultânea vetor e reservatório do agente da FMB, pois possui capacidade de transmissão transovariana à sua progênie e pode transmitir a bactéria *R. rickettsii* através da picada em qualquer estágio de vida (larva, ninfa e adulto) (DEL FIORI et al., 2010). A alta letalidade da FMB se associa ao perfil de seus sintomas, considerados inespecíficos. Febre alta, mialgia intensa, cefaleia, prostração, petéquias, hemorragias e exantema máculo-papular são sinais clínicos semelhantes de outras enfermidades e dificultam o diagnóstico desta doença. Conhecer essas enfermidades que se apresentam de forma semelhante à FMB é de suma importância para investigação de diagnósticos diferenciais e identificação precoce da doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018).

De acordo com os dados do Ministério da Saúde, foram notificados 1940 casos confirmados de FMB entre os anos 2000 até agosto de 2018, onde 155 desses casos foram no estado do Rio de Janeiro. A doença foi incluída na Lista Nacional de Doenças de Notificação Compulsória em 2001 pela Portaria GM/MS (Gabinete do Ministro/Ministério da Saúde) nº 1.943, mas acredita-se que ainda se trata de uma enfermidade subnotificada. Neste período foram 6015 óbitos confirmados por FMB no Brasil e 50 no estado do Rio de Janeiro.

O estabelecimento da FMB numa determinada área depende, além das condições ambientais favoráveis, da presença de pelo menos uma espécie de hospedeiro primário do carrapato *A. sculptum*, ou seja, para ocorrer a doença, a presença de equinos, antas, capivaras ou suçueiros silvestres é indispensável (LABRUNA, 2013).

Na medicina veterinária este ixodídeo também exerce papel de grande importância, pois devido seus hábitos alimentares são capazes de causar intensas lesões cutâneas em seu

hospedeiro que podem predispor a miíases e infecções secundárias. Além de causar grande estresse aos animais no momento do repasto sanguíneo, a espoliação pode resultar em anemia e conforme for a condição clínica do hospedeiro, este pode ser levado a morte. Alguns autores ainda sugerem que, devido evidências epidemiológicas, *A. sculptum* é capaz de transmitir *Theileria equi*, agente causador da piroplasmose ou teileriose equina (PECKLE et al., 2013).

Possuindo o maior rebanho da América Latina, a indústria equina brasileira movimentava 16 bilhões de reais por ano com 5,8 milhões de cabeças de cavalos (MAPA, 2016; ANUALPEC, 2017). Esta indústria é responsável por gerar empregos diretos e indiretos (cerca de 3,2 milhões de pessoas empregadas) e ainda movimentava o mercado nacional de medicamentos veterinários que vem crescendo a cada ano uma vez que o investimento mundial neste segmento concentra-se em países latino-americanos. O Brasil possui faturamento de cerca de 8,0 bilhões de dólares no mercado de medicamentos veterinários, ficando atrás apenas dos Estados Unidos. Do total do faturamento nacional, 5% se concentram em produtos para equinos e 25 % em produtos da classe terapêutica de antiparasitários (MAPA, 2016).

Os equinos também exercem um importante papel em práticas medicinais com atividades interdisciplinares nas áreas de saúde, educação e lazer (ANDE, 2012). A equoterapia foi reconhecida como recurso terapêutico em 1989 na Granja do Torto em Brasília, onde, nos dias atuais, funciona a sede da Associação Nacional de Equoterapia (FRAZÃO, 2001). Neste contexto, o carrapato *A. sculptum* exerce papel direto quando se trata dos prejuízos econômicos na equinocultura.

Os danos físicos ao couro dos animais resultante da picada durante a hematofagia, redução da produção de leite, perda de peso, redução da natalidade, além dos gastos com antiparasitários são exemplos de dispêndios que podem ser gerados. Gastos com manejo, medicamentos, acompanhamento clínico veterinário e mão de obra são questões importantes relacionadas aos gastos empregados pelo agronegócio (GUGLIELMONE et al., 2006; MAPA, 2016).

2.4 Controle

O controle de *A. sculptum* tem consequências não só na medicina veterinária, mas também na humana, pois causará impacto direto no controle da FMB e na saúde pública. Para esse controle é necessário reduzir o número de ectoparasitos tanto nos animais, quanto no ambiente. As fases de larva e ninfa dos carrapatos são mais sensíveis aos acaricidas do que a fase adulta. Assim, antiparasitários que agem sobre os estágios imaturos gera consequentemente a redução da quantidade de carrapatos na fase adulta no futuro. Ainda neste raciocínio, os carrapaticidas com eficácia frente a adultos de carrapatos terão também eficácia para larvas e ninfas. É de suma importância também a realização do controle ambiental de locais infestados por *A. sculptum*, visto que a presença de fauna silvestre pode dispersar carrapatos principalmente nas fases imaturas devido à baixa especificidade deste artrópode outros animais além do cavalo podem atuar como hospedeiro (RODRIGUES et al., 2015).

Em 2011 o Governo do Estado de São Paulo publicou um informe técnico que discute as abordagens para o controle desta espécie. O material cita a intervenção na população parasitária de ectoparasitas dando maior importância aos hospedeiros primários e a intervenção ambiental para os locais com cobertura vegetal e que apresentam condições adequadas e favoráveis para o desenvolvimento de carrapatos durante os estágios de vida livre. Para o controle no ambiente o informe recomenda a retirada das condições favoráveis que compõe o microclima necessário para esses artrópodes utilizando roçadeiras mecânicas no solo e manejo da pastagem durante o verão. Para o controle do carrapato *A. sculptum* que

estão na fase parasitária, a aplicação de acaricidas químicos em animais é recomendada quando há participação de equinos como hospedeiros primários.

A realização do controle estratégico é recomendada devido às particularidades do seu ciclo (trioxeno anual). Os banhos de aspersão acaricida devem ser realizados nos períodos de atividade dos estágios imaturos do ectoparasito (larvas e ninfas) em um intervalo de sete a 10 dias (LABRUNA et al., 2014).

O controle de infestações por ectoparasitos em animais é realizado em sua maioria pelo uso de produtos químicos, sendo essas as seis classes predominantes no mercado: carbamatos, organofosforados, piretroides, fenilpirazóis, lactonas macrocíclicas, e as benzoilfenilureias (ANDREOTTI, 2010). Dentre as classes de acaricidas químicos mais utilizados em equinos no Brasil estão organofosforados, piretroides e associações utilizando o método de aspersão (CUNHA et al., 2007; FREITAS et al., 2011).

Dentre as classes de produtos químicos está a benzoilfenilureia, que pertence ao grupo de inibidores do crescimento dos insetos, e que age realizando a inibição da síntese de quitina. O fluazuron é um representante desta classe (ANDREOTTI, 2010; TAYLOR et al., 2014).

2.5 Reguladores de Crescimento de Insetos (Insect Growth Regulators - IGR's)

Os IGR's não agem como acaricidas, ou seja, eles não matam os artrópodes-alvo pois atuam no processo de crescimento e desenvolvimento dos insetos e são classificados de acordo com sua ação que pode ser: inibidores da síntese de quitina, inibidores da deposição de quitina e análogos do hormônio juvenil (TAYLOR et al., 2014). Esses mecanismos de ação justificam a grande segurança dos IGR's em mamíferos, pois esses não apresentam hormônios juvenis, estruturas quitinosas ou receptores para estas moléculas, agindo apenas sobre os artrópodes (BOWMAN, 2003).

Por terem a capacidade de interferir diretamente sobre a quitina, que é um aminopolissacarídeo que compõe a cutícula de artrópodes, esta classe atua nas fases de muda dos carrapatos dos estágios de larva e ninfa, pois ao entrar em contato com o composto, os carrapatos se tornam incapazes de completar a ecdise, morrendo durante o processo. Além disso, é capaz de agir no desenvolvimento embrionário e nos parâmetros reprodutivos, tais como a postura, onde ocorre o desenvolvimento do embrião, porém a larva não se torna capaz de emergir (TAYLOR, 2001; GRAF et al., 2004).

Devido seu mecanismo de ação há necessidade de um maior tempo de exposição. Assim, a associação de IGR's com outras bases químicas de acaricidas ou inseticidas é recomendada para realização de um controle eficaz (TAYLOR, 2001).

2.6 Fluazuron

Representante da classe das benzoilfenilureias, o fluazuron foi o primeiro IGR a ser registrado para o uso no controle de carrapatos ixodídeos, apresentando excelente eficácia contra esses artrópodes (BULL et al., 1996). Contudo, este IGR apresenta baixa eficácia contra insetos, se comportando de forma atípica dentro da classe das benzoilfenilureias (GRAF, 1993).

A ação do fluazuron vem sendo estudada em diversos trabalhos na busca de elucidar os mecanismos pelos quais ocorre a inibição da quitina e de outras estruturas quitinosas (COHEN, 2001; SCOTT et al., 2002). A quitina possibilita a formação e endurecimento da cutícula dos carrapatos, com a ação de seus dos inibidores, a ecdise e crescimento das fases evolutivas do carrapato se tornam ineficazes e os mesmos não são capazes de se desenvolverem (FURLONG, 2007). Acredita-se que através da inibição de enzimas

específicas responsáveis pela conversão da glicose em frutose-6-fosfato no início do processo da síntese da quitina, o fluazuron age bloqueando a formação cutânea e desenvolvimento do artrópode (KEMP et al., 1990; PALLI-RETNAKARAN, 1999).

O fluazuron já é utilizado para o controle do carrapato em bovinos *Rhipicephalus microplus* (TAYLOR, 2001). É considerado seguro para mamíferos, com baixa toxicidade, elevada especificidade, alta eficácia em baixas concentrações, efeito prolongado e ação residual (HINK et al., 1991; GRAF et al., 2004). Age principalmente sobre larvas e ninfas (MACIEL et al., 2016). Fêmeas desde carrapato em contato com o fluazuron apresentam ingurgitamento incompleto e originam ovos que geram larvas não viáveis (GHANIM, 2011). Este fato foi observado no estudo realizado por Bull et al. (1996) onde bovinos foram tratados com fluazuron e as teleóginas recuperadas apresentaram redução na postura, os ovos gerados resultaram em larvas não viáveis, além do não desenvolvimento das fases imaturas resultando na morte de larvas e ninfas.

Apesar da sua eficácia frente *R. microplus*, cepas resistentes ao fluazuron já foram relatadas no Brasil e Uruguai (RECK et al., 2014; COURE et al., 2017). Uma estratégia utilizada como saída para a questão da resistência é a utilização do fluazuron associado a outros princípios ativos. Estudos que associaram fluazuron com abamectina (COELHO et al., 2015) e fluazuron com fipronil (LOPES et al., 2017) em bovinos, encontraram alta eficácia carrapaticida sobre esta espécie.

Além de *R. microplus*, estudos sobre a eficácia do fluazuron frente a diferentes fases de *R. sanguineus* vem sendo realizados. Em um estudo onde coelhos tratados com fluazuron e infestados artificialmente com larvas, ninfas e adultos não alimentados, observou-se aumento do período de pré-postura, diminuição no peso da massa de ovos, aumento no período de incubação dos ovos, diminuição do índice de eficiência reprodutiva, inibição do processo de ecdises entre os estágios de larva para ninfa e de ninfa para adulto (MELO, 2007). Cães também foram tratados com fluazuron e infestados artificialmente com larvas, ninfas e adultos não alimentados de *R. sanguineus* em um estudo de Vieira (2012) que observou inibição das mudas de larva para ninfa e de ninfa para adulto. O autor ainda relata que o fluazuron apresentou baixa eficácia sobre a fase adulta do carrapato.

Estudos relacionados aos efeitos do fluazuron e outros IGR's frente às diferentes fases evolutivas de *A. sculptum* ainda são escassos. Um estudo a campo realizado por Brites-Neto et al. (2017) avalia a eficácia de uma associação de alfa-cipermetrina e flufenoxuron em ambiente infestado por *A. sculptum* e *A. dubitatum*, tratado por pulverização. O estudo relevou redução de 70% da infestação da fase adulta e 97% dos estágios imaturos (ninfas e larvas) com efeito por dois meses após única aplicação. O Flufenoxuron, assim como o fluazuron, é um IGR da classe das benzoilfenilureias que age inibindo a síntese de quitina (CORREIA, 2003). Conseguir correlacionar resultados e informação sobre a ação de diferentes IGR's pode ser um ponto de partida para melhor elucidação sobre os efeitos do fluazuron no carrapato *A. sculptum*.

Gaudêncio et al. (2016) ressaltam a importância dos estudos voltados ao mecanismo de ação e aos efeitos secundários ainda não explorados que o fluazuron pode provocar no metabolismo e sistema imune dos carrapatos.

2.7 Sistema Imunológico dos Carrapatos

As informações sobre a resposta imune inata em carrapatos são bastante fragmentadas e permite apenas comparações com outras espécies de invertebrados, no entanto, mesmo esses dados indicam estes ectoparasitos possuem mecanismos de defesa contra infecções e patógenos (SONENSHINE; HYNES, 2008) e é de fundamental importância para a realização do controle eficaz deste parasito (ANGELO, 2010).

O sistema imune dos invertebrados, incluindo os carrapatos, age através das barreiras passivas ou físicas (tegumento, trato digestivo e glândulas salivais), resposta celular (mediada pelos hemócitos) e reações humorais, se diferenciando do sistema de defesa dos vertebrados pela falta de imunoglobulinas. As imunoglobulinas permitem uma imunidade de alta especificidade contra agentes patogênicos, especificidade esta ausente nos invertebrados (KARP, 1990; STRAND, 2008), porém Schmid-Hempel (2005) relata que os invertebrados são capazes de realizar uma resposta de defesa semelhante à memória imunológica, fenômeno descrito como “immune priming”.

2.8 Hemolinfa, hemócitos e resposta imune celular

Caracterizada como fluido aquoso, a hemolinfa circula na hemocele de artrópodes e é composta por íons, moléculas e células. A parte líquida da hemolinfa (plasma) é constituída por sais, açúcares, proteínas e hormônios. A composição da hemolinfa pode variar de acordo com as espécies e de acordo com a fase evolutiva do artrópode. É responsável por funções fundamentais para a homeostase do organismo como lubrificação, transporte, armazenamento, proteção (fagocitose, encapsulação, desintoxicação, coagulação, cicatrizar lesões e fatores protetores não celulares) e formação de outros tecidos. (CHAPMAN 1998; GULLAN; CRANSTON, 2008; TRIPLEHORN; JONNSON, 2011).

A hemolinfa contém hemócitos e numerosas proteínas em sua composição e possui grande importância na imunidade inata (SONENSHINE; ROE, 2014). Os hemócitos constituem a parte celular da hemolinfa dos carrapatos. Estes apresentam diversas funções, como defesa do organismo e transporte de substâncias como hormônios, enzimas e compostos orgânicos a serem excretados (SONENSHINE; ROE, 2014).

Em artrópodes, os hemócitos são classificados em nove tipos celulares, porém nem todos os tipos podem ser encontrados em uma mesma espécie. Prohemócitos, granulócitos, esferulócitos, plasmatócitos e oenocitoides são os tipos mais comumente encontrados, além dos coagulócitos, adipohemócitos, verminócitos e podócitos (JONES, 1962). Para o método de classificação, Jones (1962), considerou aspectos como o tamanho, a forma, o número e afinidade tintorial de suas inclusões e coloração do citoplasma, assim como diferenças comportamentais na habilidade de divisão, rapidez de degranulação ou vacuolização de suas inclusões, na sua fragilidade, no desenvolvimento de projeções citoplasmáticas e sua adesão às superfícies. Todas essas características podem variar de acordo com a espécie e fase evolutiva.

Os prohemócitos, segundo Sonenshine (1991), são células de hemolinfa das quais todos os outros tipos celulares se diferenciam. São pouco frequentes na hemolinfa dos artrópodes e representam menos de 5% da população total (MANACHINI et al., 2011). São células arredondadas ou ovais com um núcleo central grande em relação ao citoplasma, que se apresenta homogêneo e livre de inclusões e vacúolos (GIANOTTI & CAETANO, 1990). São os menores tipos celulares observados na hemolinfa, variando, por exemplo, de cinco a 10µm em *Ectemnaspis rorotaense* e *Ectemnaspis trombetense* (SILVA, 2014), cinco a 7µm em *Aedes albopictus* (ARAÚJO, 2011) e aproximadamente 8µm em *R. sanguineus* (FEITOSA, 2015).

Os plasmatócitos são responsáveis pela resposta fagocitária, nodulação e encapsulamento de patógenos (PEREIRA et al., 2001). Este tipo celular se apresenta de forma polimórfica podendo ser fusiforme e caracteriza-se pelas grandes projeções da membrana com núcleo geralmente pequeno e excêntrico. O citoplasma pode apresentar granulações e vacúolos (BOMBONATO; GREGÓRIO, 1995; SILVA, 2006). Seu tamanho pode variar, por exemplo, de 45 e 55µm em *E. rorotaense* e *E. trombetense* (SILVA, 2014), nove a 40µm em *A. albopictus* (ARAÚJO, 2011) e aproximadamente 13µm em *R.*

sanguineus (FEITOSA, 2015).

Os granulócitos também possuem função fagocitária, nodulação e encapsulamento de patógenos (PEREIRA et al. 2001). O encapsulamento de patógenos e/ou estruturas é a reação de defesa celular mais comum em artrópodes, onde os granulócitos e plasmócitos envolvem o material estranho causando sua inativação (CRUZ-LANDIM, 2009; KOPÁČEK et al., 2010). Esta célula apresenta forma elíptica a arredondada com núcleo centralizado acompanhando o formato da célula ou acêntrico. Uma grande quantidade de grânulos de diferentes tamanhos está presente no citoplasma podendo dificultar a visualização de outras estruturas. Pode apresentar vacúolos citoplasmáticos e apresenta tamanho aproximado de 20µm (FEITOSA, 2015). De acordo com o tamanho pode-se encontrar dois grupos: Tipo I e Tipo II, como descreve Costa (2013) que classificou em *R. sanguineus*, células que medem até 16µm como granulócitos do tipo I e células com diâmetro superior a 16µm como granulócito tipo II. Em *E. rorotaense* e *E. trombetense* pode variar de 20 a 25 µm (SILVA, 2014).

Os esferulócitos são células de formato oval a arredondado onde vários esférulos de diversos tamanhos que podem encobrir o núcleo se apresentam no citoplasma, podendo ou não deformar a superfície celular. Alguns vacúolos também podem ser encontrados no citoplasma (FALLEIROS et al., 2003; GIULIANINI et al., 2003; NEGREIRO et al., 2009). Em insetos, os esferulócitos são responsáveis por originar componentes cuticulares, mas são escassas as publicações relacionadas à função deste tipo celular (LANOT et al., 2001; LAVINE et al., 2002). Os tamanhos se diferem de acordo com as espécies estudadas. Silva (2014) descreveu esferulócitos com tamanho entre 10 e 15µm em *E. rorotaense* e *E. trombetense*. Costa (2013) e Feitosa (2015) descrevem células com tamanho aproximando de 18µm e 20µm respectivamente, ambos em *R. sanguineus*.

Já os oenocitoides são descritos como grandes células arredondadas com citoplasma apresentando grânulos eosinofílicos de tamanho pequeno e dispersos. Também apresenta núcleo pequeno e excêntrico. Está envolvida na produção de melanina, pois possui substâncias precursoras da fenoloxidase que possui um importante papel na melanização da hemolinfa. Não possui atividade fagocitária. Carneiro e Daemon (1997) descrevem que esse tipo celular pode apresentar tamanho de até 26x23µm em *R. sanguineus* (GIANOTTI; CAETANO, 1990; CARNEIRO; DAEMON, 1997).

O número de hemócitos circulantes na hemolinfa dos artrópodes assim como a distribuição dos tipos celulares age diretamente na imunidade e pode diminuir consideravelmente na presença de uma infecção (RUSSO et al., 2001).

2.9 Alterações celulares em artrópodes expostos a agentes patológicos

Apesar de serem escassas informações relacionadas à competência do sistema imunológico dos carrapatos, muitos estudos voltados para a área agrícola revelam alterações diretas na hemolinfa de insetos frente a agentes adversos (HAMI et al., 2005). A traça da farinha do Mediterrâneo, também conhecida como traça-da-farinha, *Ephestia kuehniella* é uma das principais pragas em produtos armazenados em todo o mundo. Ghasem et al. (2014) investigaram a atividade reguladora do crescimento e os efeitos hematológicos do piriproxifen e metoxifenoazida em larvas de *E. kuehniella*. Os resultados indicaram que a proporção de plasmatócitos diminuiu à medida que as doses de piriproxifen aumentaram, enquanto, o nível de granulócitos foi aumentado. Por outro lado, doses subletais de metoxifenoazida causaram a diminuição dos granulócitos.

Huang et al. (2015) realizaram um estudo que avaliou os efeitos da exposição ao hexaflumuron na imunidade hemocitária do quinto instar de larvas de *Mythimna separata*, conhecida como lagarta dos cereais. O número médio de hemócitos totais diminuiu

significativamente e houve alterações nas contagens proporcionais de hemócitos, com diminuição de granulócitos e um aumento de plasmatócitos (dois tipos celulares presentes no hemolinfa).

Outro IGR que também é alvo de estudo na área agrícola por ser capaz de alterar a imunidade celular dos insetos é o piriproxifen, um análogo do hormônio juvenil. Um estudo realizado por Sezer e Ozalp em 2015, avaliou os efeitos do piriproxifen na contagem total e morfologia de pupas da *Galleria mellonella*, uma traça da família Pyralidae. Uma diminuição significativa foi observada na contagem total de hemócitos além de diferentes níveis de deformações em quase todos os tipos de hemócitos. Os autores descreveram aumento da vacuolização em granulócitos, perda de pseudópode nos plasmatócitos tornando-se redondos, rarefação no citoplasma, forçando o núcleo através da membrana celular. Tais alterações demonstram a capacidade deste IGR de agir sobre o sistema imune da traça, realizando alterações celulares que podem comprometer a imunidade.

Considerando alterações na resposta imune celular e variações dos tipos celulares observados na hemolinfa de carrapatos, Silva et al. (2006) observaram acentuada diminuição dos hemócitos circulantes, resultando na ausência de células da hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* expostos ao fungo *Metarhizium anisopliae*. Essas alterações indicam a capacidade de um agente patogênico natural agir sobre o sistema imune do carrapato.

Alves (2019) realizou um estudo que avaliou a hemolinfa de fêmeas ingurgitadas do carrapato *R. microplus* após a exposição ao fluazuron, nos tempos de 24 e 48 horas. A contagem total de hemócitos foi menor no grupo tratado tanto em 24 quanto em 48 horas e houve diminuição das contagens de granulócitos e aumento das contagens de esferulócitos em ambos os tempos de análise quando comparado ao grupo controle.

O estudo dos efeitos que agentes patogênicos, naturais ou químicos, apresentam sobre os parâmetros biológicos e resposta imune dos carrapatos é de suma importância para o entendimento do desenvolvimento de resistência a princípios ativos e para realização do manejo integrado para controle desses ectoparasitas. Porém, no cenário científico, poucas são as publicações que relatam a eficácia e resistência de *A. sculptum* aos acaricidas e/ou IGR's. Dentro deste contexto se fazem necessários estudos que investiguem a resposta imune deste carrapato. Além disso, o conhecimento das alterações na hemolinfa dos artrópodes diante exposição a antiparasitários pode fornecer informações valiosas para o delineamento de novas opções de controle.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local

O estudo foi realizado no Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária (LQEPV), do Departamento de Parasitologia Animal (DPA), Instituto de Medicina Veterinária (IV), localizado na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), município de Seropédica – RJ.

3.2 Procedência das Fêmeas Ingurgitadas de *Amblyomma sculptum*

As fêmeas adultas e ingurgitadas de *A. sculptum* foram provenientes da colônia laboratorial do carrapato mantida em coelhos nas dependências do LQEPV (CEUA/UFRRJ 7699190418).

Os carrapatos foram higienizados em água corrente, secos com papel toalha e acondicionados em placa de Petri (de 15 a 20 teleóginas por placa) e encubados em câmara climatizada tipo B.O.D. (Biochemical Oxygen Demand) com temperatura e umidade controladas a $27,0^{\circ}\text{C} \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ e $80\% \pm 10\%$ de umidade relativa, respectivamente.

3.3 Caracterização da hemolinfa

3.3.1 Determinação dos grupos experimentais

Foram formados dois grupos de acordo com os procedimentos realizados para a caracterização da hemolinfa, sendo um destinado para contagem total dos hemócitos e outro destinado para contagem diferencial e avaliação dos tamanhos e tipos celulares e suas estruturas. Cada grupo foi formado por 50 fêmeas ingurgitadas. As teleóginas foram selecionadas pelo critério estabelecido de peso médio de 0,6g por carrapato.

3.3.2 Coleta de Hemolinfa

A hemolinfa foi coletada através de uma perfuração da cutícula na parte dorsal do carrapato com agulha de 0,3mm de diâmetro, seguida de uma leve pressão exercida sobre o carrapato para facilitar a drenagem. Após a perfuração, a hemolinfa foi coletada com o auxílio de um dispositivo produzido a partir de um tubo capilar de vidro (CTechGlass[®]) de 0,3mm de diâmetro acoplado a um tubo de scalp calibre 23 e massa de modelar junto a ponteira com filtro para pipeta de 200 μL (Figuras 3 e 4), adaptado de ANGELO et al., (2010). A hemolinfa recém-coletada foi utilizada para realização da contagem total e diferencial dos hemócitos dos grupos controle e tratados.

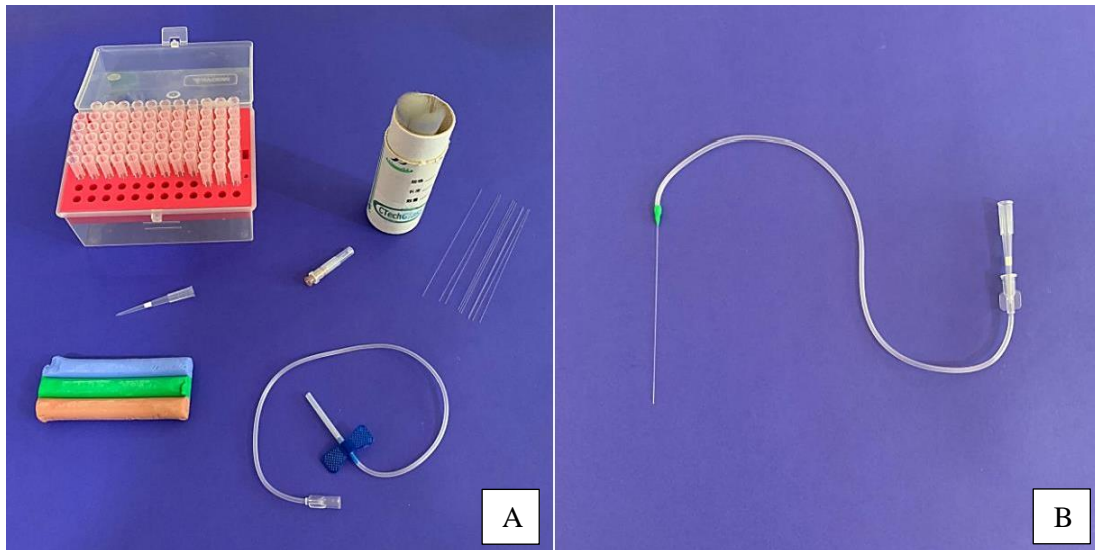


Figura 3 – Material utilizado para realização da coleta de hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Amblyomma sculptum*. (A) Capilar de vidro (CTechGlass®) de 0,3mm de diâmetro, tubo de scalp calibre 23, massa de modelar, ponteira com filtro para pipeta de 200µL e agulha de 0,3mm. (B) Dispositivo produzido pronto para coleta.

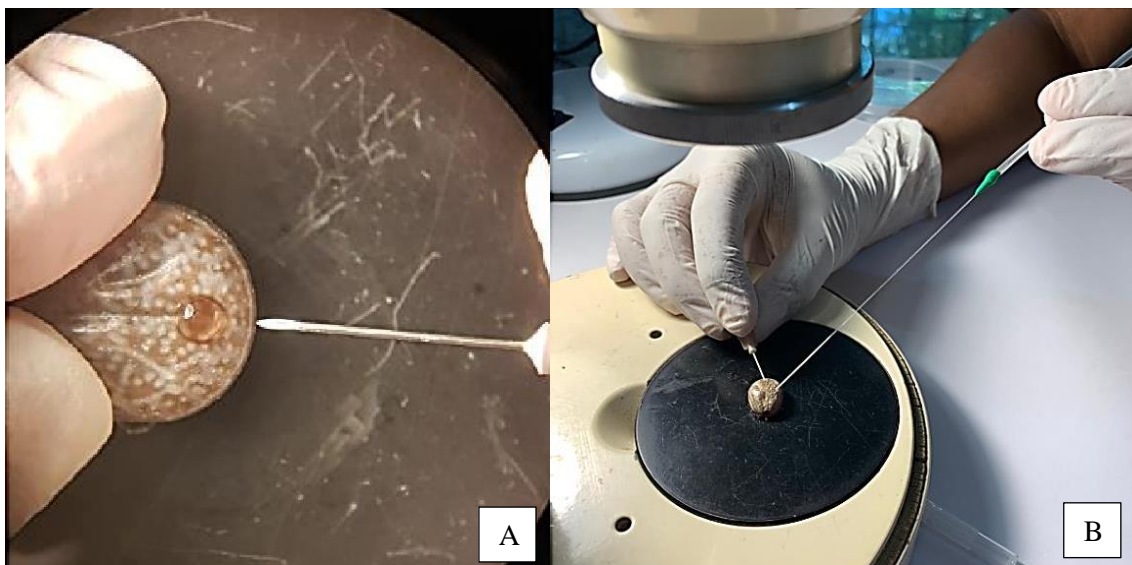


Figura 4 – Coleta da hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Amblyomma sculptum*. (A) Perfuração da cutícula na parte dorsal do carrapato. (B) Drenagem da hemolinfa com o auxílio do dispositivo produzido.

3.3.3 Contagem total de hemócitos

A contagem total de hemócitos foi realizada a partir de 10µL em Câmara de Neubauer Global Melhorada Espelhada NEW OPTICS® e com auxílio de microscópio óptico em aumento de 100x (ALVES, 2019). Foram realizadas 50 leituras de contagem total de hemócitos. Cada leitura foi referente a uma fêmea ingurgitada, com total de 50 leituras.

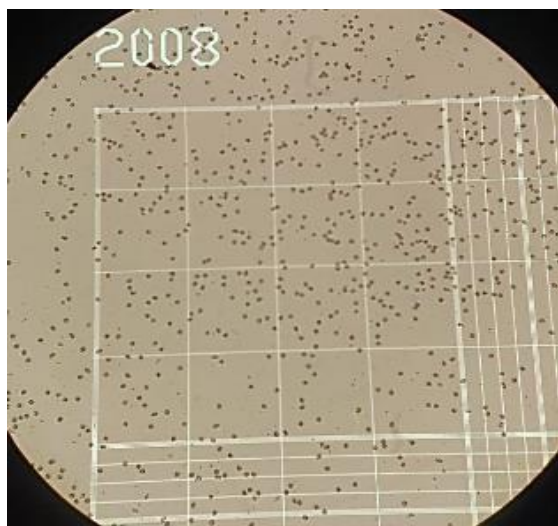


Figura 5 – Hemócitos de hemolinfa recém-coletada de fêmeas ingurgitadas de *Amblyomma sculptum* para contagem em Câmara de Neubauer (Aumento de 400x).

3.3.4 Contagem diferencial de hemócitos

Para a quantificação diferencial dos hemócitos, uma gota de hemolinfa foi colocada diretamente em lâmina de vidro e, a partir desta, foi confeccionado um esfregaço que foi seco ao ar, fixado em metanol por três minutos. Este foi corado em solução de Giemsa a 10% por aproximadamente 30 minutos, adaptado de SILVA (2006). Em seguida o material foi lavado em água destilada para retirar o excesso de corante e as lâminas foram depositadas em estante para secagem.

Foram confeccionados 50 esfregaços em lâmina de microscopia para contagem diferencial de hemócitos. Cada esfregaço foi referente a uma fêmea ingurgitada.

A contagem diferencial de hemócitos foi feita com base na morfologia observada em microscópio óptico em aumento de 1000x, através da identificação das 100 primeiras células encontradas no esfregaço corado (SILVA et al., 2006).

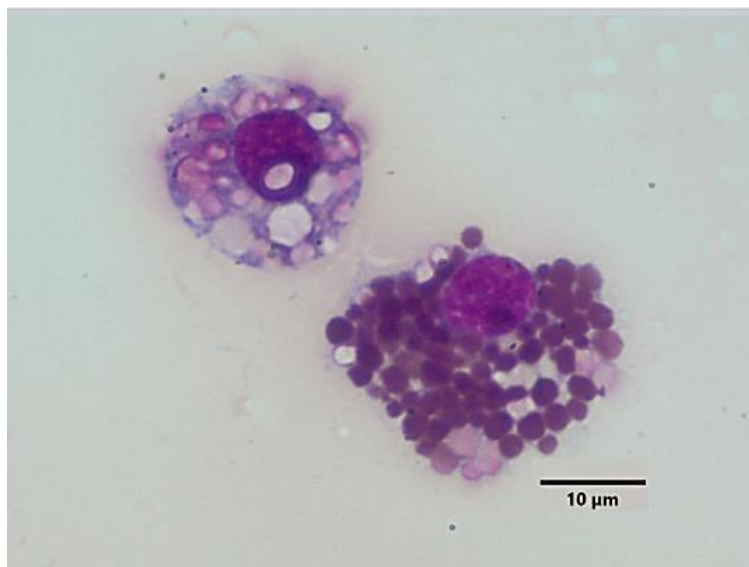


Figura 6 – Tipos de hemócitos identificados na hemolinfa de *Amblyomma sculptum*. Microscopia óptica (Aumento de 1000x). Coloração Giemsa.

3.3.5 Avaliação dos tamanhos celulares e seus componentes

A avaliação dos tamanhos celulares e de seus componentes foi realizada através da leitura das lâminas confeccionadas para contagem diferencial dos hemócitos. Com o auxílio de um Microscópio óptico Olympus modelo BX51 com luz polarizada, acoplado a uma câmera da mesma marca modelo UC30, 50 exemplares de cada tipo de hemócitos, caracterizados através da morfologia, foram avaliados. As células foram fotografadas e foram realizadas as medidas de diâmetro maior e diâmetro menor de cada tipo celular e núcleo celular, assim como dos grânulos, esferas e vacúolos, quando presentes.

3.4 Obtenção da Formulação de Fluazuron

Para a execução do teste *in vitro*, foram utilizadas as concentrações de 7,81, 250, 500, 2000 e 4000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ utilizando veículo composto de 0,8% de DMSO, 0,25% de acetona, 0,04% de Triton X, 0,81% de N-metil Pirrolidona e qsp. 100% de água. O veículo foi utilizado com controle negativo. Para a avaliação da resposta celular após a exposição *in vitro* ao fluazuron foram utilizadas as concentrações de 7,81, 250, 4000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e o veículo como controle negativo.

3.5 Teste de Imersão de Fêmeas ingurgitadas (AIT)

Para o teste de imersão de adulto, 5 fêmeas ingurgitadas com peso médio de 1,9g foram utilizadas em cada grupo (7,81, 250, 500, 2000 e 4000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e controle) em duas repetições. As fêmeas ingurgitadas foram imersas por um minuto conforme descrito na Food and Agriculture Organization (FAO, 2004). Após esse tempo elas foram secas, pesadas, fixadas individualmente em placa de petri, identificadas de acordo com cada grupo de concentração e incubadas em câmara climatizada tipo B.O.D. (Biochemical Oxygen Demand) a $27,0 \pm 1,0^\circ\text{C}$ e $80\% \pm 10\%$ UR. Após 25 dias foram pesadas as posturas e em 35 dias foram avaliadas as respectivas eclosões. A eficiência reprodutiva e a eficácia foram calculadas de acordo com Drummond et al. (1973).

3.6 Avaliação da resposta celular das fêmeas ingurgitadas ao fluazuron

3.6.1 Determinação dos grupos experimentais

Com base nos resultados do AIT, três concentrações foram selecionadas para a avaliação da resposta celular das fêmeas ingurgitadas ao fluazuron (7,81, 250 e 4000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Os grupos foram formados de acordo com o tratamento do estudo e tempo de análise (24 e 48h pós-exposição ao tratamento), sendo dois grupos controles (24h e 48h), dois grupos tratados com fluazuron 7,81 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (24h e 48h), dois grupos tratados com fluazuron 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (24h e 48h) e dois grupos tratados com fluazuron 4000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (24h e 48h). Cada grupo foi formado por 3 teleóginas que foram selecionadas pelo critério estabelecido de peso médio de 1,9g por grupo. Foram feitas 10 repetições de cada grupo para as quantificações celulares, utilizando o total de 240 fêmeas ingurgitadas.

3.6.2 Exposição das fêmeas ingurgitadas ao fluazuron

Foi realizado teste de imersão seguindo o Guia de Manejo Integrado e Controle de Pragas em Ruminantes, preconizado pela FAO (2004). O teste consiste em manter as fêmeas ingurgitadas em contato com a solução por um minuto. Após esse tempo foram secas em papel toalha e acondicionadas em placa de petri e incubadas em câmara climatizada tipo B.O.D. (Biochemical Oxygen Demand) com temperatura e umidade relativa adequadas ($27,0^{\circ}\text{C} \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ e $80\% \pm 10\%$ UR). Os intervalos de coleta da hemolinfa para avaliação celular foram de 24 e 48 horas após a imersão para todos os grupos (controle e tratados).

3.6.3 Coleta de hemolinfa

A hemolinfa foi coletada de acordo com o item 3.3.2. A hemolinfa recém-coletada foi utilizada para realização da contagem total e diferencial dos hemócitos dos grupos controle e tratados.

3.6.4 Contagem total de hemócitos

A contagem total de hemócitos foi realizada de acordo com o item 3.3.3. Foram realizadas 10 repetições de contagem para cada grupo (controle e tratados, em cada tempo de avaliação).

3.6.5 Contagem diferencial de hemócitos

Para a quantificação diferencial dos hemócitos foi utilizada a metodologia descrita no item 3.3.4. Foram realizadas 10 leituras de contagem para cada grupo (controle e tratados, em cada tempo de avaliação).

3.7 Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada pelo programa computacional BioEstat 5.3 (AYRES, 2007). Para o AIT a normalidade foi calculada por D' agostino Pearson e a análise das médias foi realizada por ANOVA para dados paramétricos e Kruskal Wallis para dados não paramétricos. Para a avaliação da resposta celular a normalidade dos foi verificada pelo teste de Shapiro Wilk, utilizando o teste de T para análise das médias de dados paramétricos e teste Mann-Whitney para análise das médias de dados não paramétricos. Todas as análises tiveram o intervalo de confiança de 95% ($p \leq 0,05$).

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização celular

4.1.1 Quantificação total dos hemócitos

A média da contagem total de hemócitos de fêmeas ingurgitadas de *A. sculptum* observada no presente estudo foi de 1024.0 ± 597.64 células. μL^{-1} , descrita na Tabela 1, com contagens mínima de 28 e máxima de 2520 hemócitos.

Tabela 1 – Média do total de hemócitos de fêmeas ingurgitadas de *Amblyomma sculptum*.

| Hemócitos | Média/ DP | Mín-Máx |
|-------------------------|-------------------|-----------|
| (cél/s/ μL) | $1024 \pm 597,64$ | 28 - 2520 |

4.1.2 Classificação e avaliação celular

A avaliação através da microscopia óptica da hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *A. sculptum* sugere a existência de seis tipos de hemócitos classificados como: prohemócitos, plasmatócitos, granulócitos, esferulócitos, adipohemócitos e oenocitoides. Também foi observada presença de binucleação e mitose celular em alguns tipos de hemócitos.

Prohemócitos (PR): Foi o menor tipo celular observado medindo em média $13 \times 11 \mu\text{m}$, se apresentando em formato arredondado, com grande núcleo central de tamanho médio de $8 \times 7 \mu\text{m}$ e escasso citoplasma. Algumas células apresentavam nucléolo evidente e finas granulações no citoplasma. Ocasionalmente foram observadas projeções citoplasmáticas e estruturas semelhantes a grânulos ou esferas que pode indicar diferenciação celular (Figura 7).



Figura 7 – Prohemócitos presentes na hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Amblyomma sculptum*. Microscopia óptica (Aumento de 1000x). Coloração Giemsa.

Plasmatócitos (PL): Apresentando-se polimórficos, foi o grupo com maior variação de forma e tamanho com medidas médias de $24 \times 10 \mu\text{m}$. Podem-se observar células arredondadas, ovaladas e fusiformes, com projeções citoplasmáticas bastante irregulares. Núcleo arredondado a ovalado, ora central ora excêntrico, de tamanho variado (média de $8 \times 6 \mu\text{m}$). O citoplasma pode apresentar vacúolos e/ou grânulos. Foi o segundo tipo celular mais encontrado (Figura 8).



Figura 8 – Plasmatócitos presentes na hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Amblyomma sculptum*. Microscopia óptica (Aumento de 1000x). Coloração Giemsa.

Granulócitos Tipo I (GR I): Foi o tipo celular mais abundante na hemolinfa. Com medidas médias de 22x19 µm, são células de tamanhos variados e de formas arredondadas a elípticas. O núcleo (média de 8x7 µm) pode ser central ou excêntrico e é envolvido por um grande volume de citoplasma. O Citoplasma apresenta grande quantidade de grânulos arredondados medindo em torno de 2 µm, que podem muitas vezes dificultar a visualização do núcleo (Figura 9). Muitas vezes é possível observar aglomerados celulares destes hemócitos. Grânulos soltos pelo esfregaço também foram observados. De acordo com o tamanho celular foi classificado um segundo tipo desde hemócitos (Granulócito Tipo II – GR II), caracterizados como células gigantes. Apesar de grandes, estas células apresentam uma grande variação de tamanho medindo em média 27x25 µm. Os GR II são menos frequentes, na hemolinfa. Frequentemente observou-se que os grânulos (menores que os presentes em granulócitos tipo I) cobriam o núcleo, dificultando sua visualização. Diversas vezes foram observadas rupturas do citoplasma desde tipo celular (Figura 10).

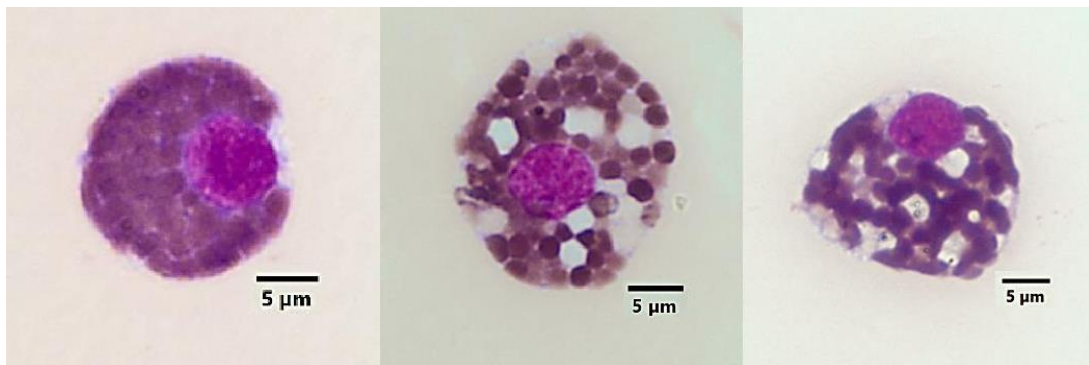


Figura 9 – Granulócitos Tipo I presentes na hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Amblyomma sculptum*. Microscopia óptica (Aumento de 1000x). Coloração Giemsa.

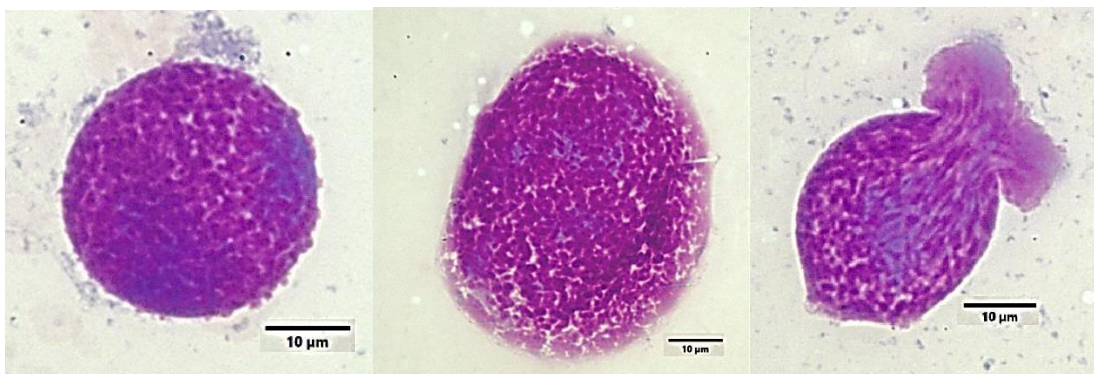


Figura 10 – Granulócitos Tipo II presentes na hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Amblyomma sculptum*. Microscopia óptica (Aumento de 1000x). Coloração Giemsa.

Esferulócitos (ES): Os esferulócitos são células arredondadas (tamanho médio de $22 \times 20 \mu\text{m}$) com núcleo excêntrico (tamanho médio de $9 \times 7 \mu\text{m}$) que pode muitas vezes ser camuflado por estruturas presentes de forma abundante no citoplasma, as esférulas. De tamanhos variados, as esférulas muitas vezes podem causar saliências no citoplasma, provocando deformidades citoplasmáticas e irregularidade celular. Observou-se presença de vacúolos citoplasmáticos (Figura 11).



Figura 11 – Esferulócitos presentes na hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Amblyomma sculptum*. Microscopia óptica (Aumento de 1000x). Coloração Giemsa.

Adipohemócitos (AD): Raramente encontrados, os adipohemócitos são células de tamanho variável, margens citoplasmáticas irregulares e vesículas/gotas refringentes no citoplasma. O núcleo em sua maioria se apresenta excêntrico (Figura 12). Esse tipo celular foi considerado um achado celular e a quantidade observada não foi suficiente para realização da conferência das medidas com segurança estatística.

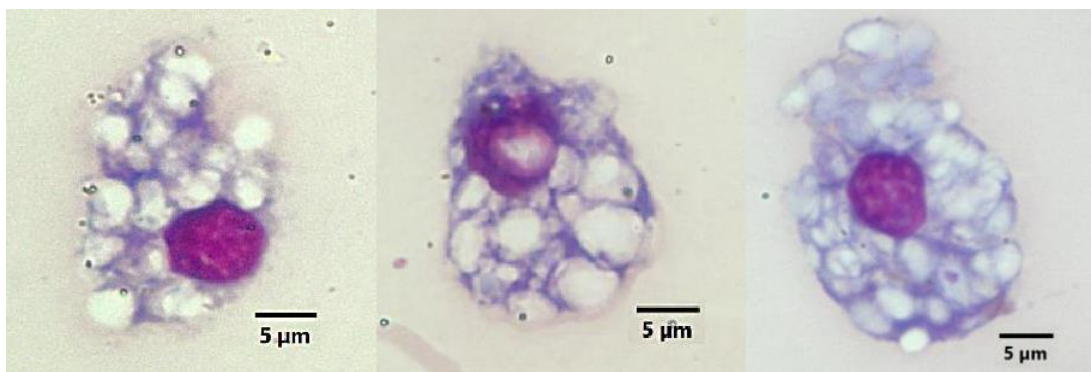


Figura 12 – Adipohemócitos presentes na hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Amblyomma sculptum*. Microscopia óptica (Aumento de 1000x). Coloração Giemsa.

Oenocitoides (OE): São células de tamanho intermediário (média: 23x19µm), arredondadas e podendo ter margens irregulares. Apresenta núcleo na maioria das vezes excêntrico e relativamente pequeno (média: 10x7µm) em relação ao volume citoplasmático. O citoplasma apresenta granulações refráteis e aspecto esponjoso (Figura 13).



Figura 13 – Oenocitoides presentes na hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Amblyomma sculptum*. Microscopia óptica (Aumento de 1000x). Coloração Giemsa.

A seguir (Tabela 2) estão descritos os valores das medidas celulares e nucleares obtidas neste estudo. Através dos resultados pode-se afirmar que houve diferença estatística entre os tamanhos de alguns tipos celulares, onde PR < PL = ES = OE = GR I < GR II.

Tabela 2 – Médias dos diâmetros maior e menor dos tipos celulares e de seus respectivos núcleos presentes na hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Amblyomma sculptum*.

| TIPO CELULAR | CÉLULA: média-diâmetro maior (µm) | CÉLULA: média-diâmetro menor (µm) | NÚCLEO: média-diâmetro maior (µm) | NÚCLEO: média-diâmetro menor (µm) |
|--------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| PR | 13 ± 2,59 ^a 7 - 22 | 11 ± 1,94 ^a 7 - 16 | 8 ± 1,42 ^a 5 - 10 | 7 ± 1,26 ^a 4 - 10 |
| PL | 24 ± 6,26 ^b 14 - 41 | 10 ± 1,83 ^a 7 - 14 | 8 ± 1,02 ^a 5 - 10 | 6 ± 0,91 ^a 4 - 9 |
| ES | 22 ± 2,33 ^b 19 - 29 | 20 ± 2,26 ^b 16 - 26 | 9 ± 0,97 ^a 6 - 11 | 7 ± 1,11 ^{ac} 5 - 10 |
| OE | 23 ± 2,51 ^b 18 - 28 | 19 ± 2,81 ^b 13 - 25 | 10 ± 1,5 ^a 6 - 15 | 7 ± 1,29 ^b 4 - 10 |
| GR I | 22 ± 2,69 ^b 17 - 29 | 19 ± 2,42 ^b 14 - 28 | 8 ± 0,84 ^b 6 - 11 | 7 ± 0,84 ^{bc} 5 - 9 |
| GR II | 27 ± 6,21 ^c 19 - 61 | 25 ± 4,81 ^c 18 - 50 | - | - |

(PR) Prohemócitos; (PL) Plasmatócitos; (ES) Esferulócitos; (OE) Oenocitóides; (GR I) Granulócitos Tipo I; (GR II) Granulócitos Tipo II. Letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si ($p > 0,05$); Letras minúsculas diferentes na mesma coluna apresentam diferença estatística ($p \leq 0,05$).

A Tabela 3 expressa as medidas dos grânulos e esférulas, encontradas nos hemócitos do tipo GR I e ES, respectivamente, onde observa-se que as esférulas apresentam o dobro do tamanho dos grânulos.

Tabela 3 – Médias dos diâmetros maior e menor dos grânulos e esférulas dos tipos celulares granulócitos tipo I e esferócitos presentes na hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Amblyomma sculptum*.

| | MÉDIA-DIÂMETRO MAIOR (μm) | MÉDIA-DIÂMETRO MENOR (μm) |
|----------|---|---|
| GRÂNULO | $2 \pm 0,38^a$ 1 - 3 | $2 \pm 0,31^a$ 1 - 3 |
| ESFÉRULA | $4 \pm 1,12^b$ 2 - 7 | $4 \pm 0,99^b$ 2 - 6 |

Letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si ($p > 0,05$); Letras minúsculas diferentes na mesma coluna apresentam diferença estatística ($p \leq 0,05$).

4.1.3 Contagem diferencial dos hemócitos

Os resultados obtidos através da contagem diferencial de hemócitos em fêmeas ingurgitadas de *A. sculptum* estão expressos na Tabela 4. Os GR foi o tipo celular mais encontrado, estando presentes em todas as contagens diferenciais. AD e OE foram os tipos de hemócitos menos presentes.

Tabela 4 – Percentual médio dos tipos de hemócitos encontrados na hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Amblyomma sculptum*.

| Tipo celular | Média % / DP | Mín – Máx (%) |
|--------------|------------------|---------------|
| PR | $6 \pm 8,84^a$ | 0 – 53 |
| PL | $10 \pm 7,66^a$ | 0 – 39 |
| GR | $78 \pm 12,25^b$ | 34 – 94 |
| ES | $5 \pm 4,85^a$ | 0 – 25 |
| AD | $0 \pm 1,04^c$ | 0 – 5 |
| OE | $1 \pm 1,63^c$ | 0 – 6 |

(PR) Prohemócitos; (PL) Plasmatócitos; (ES) Esferulócitos; (OE) Oenocitóides; (GR I) Granulócitos Tipo I; (GR II) Granulócitos Tipo II. Letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si ($p > 0,05$); Letras minúsculas diferentes na mesma coluna apresentam diferença estatística ($p \leq 0,05$).

4.2 Teste de Imersão de Fêmeas ingurgitadas (AIT)

No AIT os valores obtidos a partir da concentração de $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ atingiram eficácia satisfatória com eclodibilidade e eficiência reprodutiva iguais a zero chegando a 100% na concentração de $4000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (tabela 5).

Tabela 5 - Peso médio das teleógina, postura e quenógina; Índice de nutrição, fecundidade e porcentagem de mortalidade de fêmeas ingurgitadas de *A. sculptum* expostas a diferentes concentrações de Fluazuron.

| Concentração [µg.mL ⁻¹] | Média Peso Teleógina | Média Peso Postura | Média (%) Eclodibilidade | Média Eficiência reprodutiva | Eficácia (%) |
|-------------------------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|------------------------------------|--------------|
| Controle | 0,627 ± 0,089 ^a | 0,327 ± 0,074 ^a | 79,3 ± 43,92 ^a | 847416,37 ± 474145,22 ^a | 0,0 |
| 7,81 | 0,632 ± 0,035 ^a | 0,320 ± 0,092 ^a | 60,3 ± 36,39 ^a | 666172,29 ± 407447,64 ^a | 21,4 |
| 250 | 0,621 ± 0,112 ^a | 0,285 ± 0,099 ^a | 47,4 ± 16,70 ^a | 419561,41 ± 167343,69 ^a | 50,5 |
| 500 | 0,640 ± 0,073 ^a | 0,304 ± 0,079 ^a | 13,5 ± 19,81 ^b | 140670,63 ± 212526,86 ^b | 83,4 |
| 2000 | 0,623 ± 0,081 ^a | 0,316 ± 0,065 ^a | 5,4 ± 10,12 ^b | 62625,79 ± 118201,01 ^b | 92,6 |
| 4000 | 0,636 ± 0,102 ^a | 0,292 ± 0,094 ^a | 0 ± 0,00 ^b | 0,00 ± 0,00 ^b | 100,0 |

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna apresentam diferença estatística ($p \leq 0,05$).

4.3 Avaliação da Resposta Celular das Fêmeas Ingurgitadas ao Fluazuron

4.3.1 Quantificação total de hemócitos

No tempo de 24h o fluazuron, nas concentrações de 7,81, 250 e 4000 µg.mL⁻¹, não causou alterações no número total de hemócitos em relação à contagem do controle. No tempo de 48h houve redução na contagem total de hemócitos na concentração de 4000 µg.mL⁻¹ (491 células / µL) em relação ao controle (884 células / µL). A contagem total de hemócitos não mostrou variações significativas nas concentrações de 7,81 e 250 µg.mL⁻¹ em relação ao grupo controle. As médias dos valores obtidos nas quantificações totais de hemócitos estão exibidas na tabela 6.

Tabela 6 – Média da contagem total de hemócitos da hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Amblyomma sculptum* nos tempos de 24 e 48 horas após imersão dos grupos controle e fluazuron nas concentrações de 7,81, 250 e 4000 µg.mL⁻¹.

| Concentração (µg.mL ⁻¹) | Tempo de análise | |
|-------------------------------------|--|--|
| | 24h | 48h |
| Controle | 636 ± 481,9 ^a (118 - 1435) | 884 ± 433,2 ^a (218 - 1770) |
| 7,81 | 1121 ± 1031 ^a (358 - 3540) | 710 ± 244,8 ^a (423 - 1190) |
| 250 | 975 ± 887,7 ^a (318 - 3310) | 809 ± 331,2 ^a (505 - 1450) |
| 4000 | 876 ± 710,5 ^a (290 - 2590) | 491 ± 431,4 ^b (160 - 1530) |

Letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si ($p > 0,05$).

4.3.2 Contagem diferencial de hemócitos

Os resultados obtidos através da contagem diferencial de hemócitos de fêmeas ingurgitadas de *A. sculptum* após teste de imersão com fluazuron dos grupos controle e tratados estão expressos na tabela 6. Os PR, PL e AD não apresentaram variação nos tempos e concentrações. Os OE apresentaram pouca variação no tempo de 24h com aumento na

concentração de 7,81. Em 48h, na concentração de 4000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, houve redução significativa dos GR e aumento significativo dos ES. A presença de ES foi menos em 24h nas concentrações de 7,81 e 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Tabela 6 – Percentual médio dos tipos de hemócitos encontrados na hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Amblyomma sculptum* após imersão em fluazuron nas concentrações de 7,81, 250 e 4000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ nos tempos de 24h e 48h.

| TIPO CELULAR | 24h | | | | 48h | | | |
|--------------|--|--|--|---|---|--|---|---|
| | CONTROLE | 7,81 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ | 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ | 4000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ | CONTROLE | 7,81 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ | 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ | 4000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ |
| PR (%) | 7 \pm 3,9 ^a (3 - 15) | 9 \pm 6,86 ^a (1 - 22) | 11 \pm 7,92 ^a (2 - 26) | 11 \pm 8,29 ^a (2 - 27) | 10 \pm 3,99 ^a (3 - 17) | 12 \pm 6,17 ^a (4 - 20) | 12 \pm 6,36 ^a (5 - 26) | 14 \pm 6,76 ^a (4 - 23) |
| PI (%) | 17 \pm 8,45 ^a (7 - 30) | 15 \pm 12,35 ^a (4 - 43) | 18 \pm 6,33 ^a (8 - 26) | 17 \pm 12,48 ^a (3 - 47) | 15 \pm 7,92 ^a (4 - 26) | 16 \pm 11,31 ^a (2 - 42) | 17 \pm 5,10 ^a (7 - 25) | 14 \pm 7,29 ^a (4 - 25) |
| GR (%) | 69 \pm 12,72 ^a (48 - 87) | 71 \pm 14,13 ^a (49 - 89) | 69 \pm 12,48 ^a (48 - 98) | 58 \pm 29,09 ^a (9 - 91) | 71 \pm 8,80 ^a (61 - 84) | 67 \pm 15,55 ^a (39 - 90) | 69 \pm 8,62 ^a (58 - 88) | 63 \pm 7,61 ^b (52 - 76) |
| ES (%) | 7 \pm 5,15 ^a (2 - 16) | 2 \pm 1,52 ^b (0 - 4) | 1 \pm 1,05 ^b (0 - 3) | 13 \pm 15,38 ^a (1 - 53) | 2 \pm 2,10 ^a (0 - 6) | 1 \pm 1,25 ^a (0 - 4) | 1 \pm 1,60 ^a (0 - 5) | 8 \pm 7,04 ^b (0 - 21) |
| OE (%) | 1 \pm 1,03 ^a (0 - 3) | 0 \pm 0,42 ^a (0 - 1) | 0 \pm 0,32 ^a (0 - 1) | 0 \pm 0,42 ^a (0 - 1) | 1 \pm 0,71 ^a (0 - 2) | 3 \pm 7,13 ^a (0 - 23) | 0 \pm 0,52 ^a (0 - 1) | 0 \pm 0,32 ^a (0 - 1) |
| OE (%) | 0 \pm 0,32 ^a (0 - 1) | 3 \pm 2,83 ^b (0 - 8) | 2 \pm 3,49 ^a (0 - 11) | 1 \pm 1,10 ^a (0 - 3) | 2 \pm 2,41 ^a (0 - 6) | 4 \pm 3,91 ^a (0 - 12) | 2 \pm 1,83 ^a (0 - 5) | 1 \pm 2,25 ^a (0 - 7) |

(PR) Prohemócitos; (PI) Plasmatócitos; (ES) Esferulócitos; (OE) Oenocitóides; (GR I) Granulócitos Tipo I; (GR II) Granulócitos Tipo II. Letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem estatisticamente entre si ($p > 0,05$); Letras minúsculas diferentes na mesma coluna apresentam diferença estatística ($p \leq 0,05$)

5 DISCUSSÃO

5.1 Caracterização celular

O presente estudo realizou a caracterização celular da hemolinfa no carrapato *A. sculptum*, avaliando de forma qualitativa e quantitativa os valores hemocitários. Com a finalidade de determinar padrões celulares foram avaliadas características morfológicas através de imagens e medições por microscopia óptica. Também com o auxílio da microscopia óptica foram realizadas as contagens total e diferencial, por câmara de contagem celular do tipo Neubauer e esfregaço em lâmina de vidro respectivamente.

Ainda são escassos os estudos que relatam informações sobre as características e funções das células presentes na hemolinfa de carrapatos, porém alguns autores como Carneiro e Daemon (1997) e Costa (2013) qualificaram em seus trabalhos os tipos celulares presente na hemolinfa das espécies *R. sanguineus* e *Ornithodoros rostratus*. No entanto, na literatura ainda não há publicações referentes estudo que caracterizam e avaliam a hemolinfa de *A. sculptum*. Em virtude das limitadas referências sobre o assunto estudado, a busca por trabalhos desenvolvidos na área agrícola se tornou essencial para a estruturação, o desenvolvimento e entendimento dos resultados de caracterização do presente estudo.

A quantificação total dos hemócitos presentes na hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *A. sculptum* realizada neste estudo (com média de 1024 células/ μL) revela que houve grande variação no número total de células de acordo com cada espécime. Os valores foram de 28 a 2520 células/ μL e podem demonstrar um grande intervalo de referência para contagem total de hemócitos nesta espécie de carrapato, supondo que mesmo submetidos às mesmas condições a resposta imune celular de cada indivíduo apresenta individualidade.

Em relação à quantidade total de hemócitos encontrada, a comparação entre outras espécies de carrapatos se torna inviável, pois apesar de existirem estudos que totalizem o número de hemócitos após exposição a algum agente patogênico, não existem estudos que caracterizem previamente a contagem total de células nesses artrópodes.

Quando comparado com outros artrópodes, os valores não apresentam um padrão na contagem total. Araújo (2011) descreve a contagem total dos hemócitos circulantes na hemolinfa do *A. aegypti* sadio, avaliada entre o primeiro dia após eclosão com o valor de 1100 hemócitos/ μL . O autor também revela que existem diferenças significantes entre o número de células de acordo com a idade do mosquito (do primeiro ao 8º dia após eclosão), podendo chegar a 4600 hemócitos/ μL . Em um estudo que realizou a caracterização citológica dos hemócitos de larvas de *Anticarsia gemmatilis* (lagarta da soja), Negreiro et al. (2009) descrevem resultado com variação semelhante. Os hemócitos totais apresentaram variação de acordo com o dia de desenvolvimento da larva variando entre 6377 a 15393 hemócitos/ μL entre o 6º ao 11º dia de desenvolvimento. A partir destes resultados, pode-se supor que de acordo com a fase evolutiva e/ou idade do carrapato haverá variações na contagem total de hemócitos na hemolinfa, embora que no presente estudo tenha ocorrido variação da contagem total de hemócitos em carrapatos da mesma idade.

Os tipos celulares encontrados na hemolinfa de *A. sculptum* foram os mesmos descritos por Carneiro e Daemon (1997) em *R. sanguineus* que de acordo com a caracterização morfológica baseada na classificação de Jones (1962), encontrou seis tipos celulares: prohemócitos, plasmatócitos, granulócitos, esferulócitos, adipohemócitos e oenocitóides. Costa (2013) também encontrou esses tipos celulares em *R. sanguineus* e *O. rostratus*, porém relatou a ausência de adipohemócitos.

Nos trabalhos que descrevem as células da hemolinfa em outros artrópodes houve correspondência nos tipos hemocitários observados, porém nem todas as células

necessariamente estão presentes em todas as espécies descritas. Negreiros e colaboradores descreveram em 2009 seis tipos de hemócitos presentes em larvas de *A. gemmatalis*: plasmatócitos, granulócitos, esferulócitos, prohemócitos, oenocitoides e vermiformes, esta última caracterizada como célula em formato fusiforme, com superfície celular lisa, com núcleo alongado e central. Em gafanhotos *Tropidacris collaris*, além dos prohemócitos, granulócitos e plasmatócitos, outro tipo de hemócitos foi descrito, os coagulócitos, que se caracterizam por apresentar núcleo central e diversos vacúolos de tamanhos diferentes próximos à superfície da célula (CORREIA et al., 2005). A busca de melhores definições sobre as funções específicas dos hemócitos pode ajudar na justificativa que envolve a presença ou ausência de determinado tipo celular. A diferença do tipo de alimentação do artrópode, temperatura do local onde ele é encontrado, patógenos que ele é capaz ou não de transmitir são exemplos de fatores que podem de forma provável influenciar a configuração hemocitária de cada espécie.

A morfologia dos hemócitos descrita na literatura em geral corrobora com o presente estudo, ocorrendo divergência em relação aos tamanhos celulares. Os prohemócitos são descritos neste estudo como o menor tipo celular encontrado (13x11 µm) com grande núcleo central (8x7 µm), porém Costa (2013) descreve células menores, medindo cerca de 8 µm assim como Carneiro e Daemon (1997) que descrevem esse tipo celular medindo aproximadamente 9 µm com núcleo de aproximadamente 7 µm, ambos em *R. sanguineus*. Prohemócitos também foram descritos em outras espécies de artrópodes. *T. collaris* (CORREIA et al., 2005), *A. albopictus* (ARAÚJO, 2011), *E. rorotaense* e *E. trombetense* (SILVA, 2014) são exemplos de artrópodes que apresentam prohemócitos pequenos, arredondados e com núcleo grande, ocupando grande parte do citoplasma, assim como *A. sculptum*.

Os plasmatócitos, que no presente estudo são descritos medindo em média 24x10 µm com núcleo de tamanho variado (média de 8x6 µm), em *R. sanguineus* se apresenta medindo cerca de 19µm (COSTA, 2013). Já Carneiro e Daemon (1997), também em *R. sanguineus* relatam medidas semelhantes com o presente estudo (24x14µm), com núcleo medindo aproximadamente 9x7µm. Os autores também descrevem esse tipo celular de forma semelhante ao presente estudo: polimórficas, com grande variação de tamanho com núcleo arredondado a ovalado, central ou excêntrico, com citoplasma que pode apresentar projeções, vacúolos e/ou grânulos. Larvas de *A. gemmatalis* (NEGREIRO et al., 2009), *A. albopictus* (ARAÚJO, 2011) e *Diatraea saccharalis* (BOMBONATO; GREGÓRIO, 1995) também possuem características morfológicas que corroboram com as associadas ao carrapato *A. sculptum*.

A descrição morfológica dos granulócitos relatada por Carneiro e Daemon (1997) e Costa (2013), ambos para *R. sanguineus*, Araújo (2011) para *A. albopictus* e Silva (2014) para *E. rorotaense* e *E. trombetense* se fazem semelhante ao descrito neste estudo. Características como forma arredondada a elíptica, núcleo que pode ser central ou excêntrico e extenso citoplasma com inúmeros grânulos foram descritas pelos autores também estão presentes em granulócitos de *A. sculptum*. Em relação às medidas, foi observado que os granulócitos se apresentam com 22x19 µm de média de tamanho e núcleo com 8x7x µm, entretanto Costa (2013) relata células menores, medindo até 16µm. Carneiro e Daemon (1997) também relatam medidas próximas a 16µm e descreve núcleo de tamanho médio de 3µm. Ambos autores descrevem um segundo tipo de granulócito classificado de acordo com o tamanho celular (Granulócitos Tipo II). Carneiro e Daemon (1997) e Costa (2013) descrevem as medidas deste tipo celular como acima de 16µm e aproximadamente 24µm, respectivamente corroborando com o presente estudo, que classificou granulócitos tipo II como células maiores com média de 27x25µm.

No presente estudo os esferulócitos foram caracterizados como células arredondadas com núcleo excêntrico que pode muitas vezes ser camuflado pelas esférulas de tamanhos variados e presença de vacúolos citoplasmáticos, medindo em média 22x20µm. Medidas que variaram entre 17 a 20µm foram descritas por Carneiro e Daemon (1997) para ES de *R. sanguineus*, corroborando com Costa (2013) que relatou medidas de 20µm neste tipo celular., Os ES também foram descritos em outros artrópodes como larvas de *D. saccharalis*, *T. collaris*, larvas de *A. gemmatalis*, *A. albopictus*, dentre outros (BOMBONATO; GREGÓRIO, 1995; CORREIA, 2005; NEGREIRO et al., 2009; ARAÚJO, 2011).

Com a finalidade de diferenciar esférulas e grânulos foram feitas medições dessas estruturas e os resultados revelaram que apesar de ambas serem em sua maioria estruturas arredondadas, as esférulas medem em média 4µm enquanto os grânulos medem a metade deste valor (2µm). Alguns autores divergem na classificação dos tipos celulares que apresentam essas estruturas, portanto é de suma importância o desenvolvimento de técnicas que possam determinar com segurança esses tipos celulares.

Outro tipo celular encontrado na hemolinfa de *A. sculptum* foi o adipohemócito, que está ausente em diversas espécies de artrópodes como larvas de *D. saccharalis*, larvas de *A. gemmatalis* e *T. collaris* (BOMBONATO; GREGÓRIO, 1995; CORREIA, 2005; NEGREIRO et al., 2009). Porém há divergência de resultados quando se trata do carrapato *R. sanguineus*. Carneiro e Daemon (1997) relatam a presença deste tipo celular enquanto Costa (2013) descreve que não encontrou estes hemócitos na hemolinfa. Devido suas características pode haver uma confusão na identificação do adipohemócito, pois suas vesículas podem ser confundidas com vacúolos presentes em outros tipos celulares. Neste contexto, a importância de técnicas mais avançadas para reconhecimento celular pode servir como ferramenta para uma mais precisa identificação. Outra questão importante é a contaminação de células do corpo gorduroso que pode ser rompido no momento da coleta da hemolinfa, se misturando com o conteúdo analisado, levando a errônea classificação celular.

O último hemócito classificado neste estudo foi o oenocitoide que foram descritos em *R. sanguineus* por Carneiro e Daemon (1997) como células grandes (25x23µm), arredondadas, com pequenas granulações no citoplasma. O presente estudo classificou esta célula em tamanho intermediário com medidas de 23x19µm. Araújo (2011) diverge em relação às descrições anteriores, encontrando células menores na hemolinfa de *A. albopictus*, medindo aproximadamente sete a 10µm.

Um resumo dos dados obtidos em relação aos tamanhos dos tipos celulares presentes na hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Amblyomma sculptum* comparadas com as medidas descritas por outros autores está descrito no quadro a seguir (Figura 14). Os distintos resultados citados podem ter ocorrido devido à diferença da espécie de artrópode analisada em cada estudo.

| TIPO CELULAR (µM) | ESTUDO ATUAL <i>A. SCULPTUM</i> | (COSTA, 2013) <i>R. SANGUINEUS</i> | (CARNEIRO E DAMON, 1997) <i>R. SANGUINEUS</i> | (ARAÚJO, 2011) <i>A. ALBOPICTUS</i> |
|-------------------|------------------------------------|---------------------------------------|--|--|
| PR | 13x11 | 8 (aprox.) | 9 (aprox.) | - |
| PL | 24x10 | 19 (aprox.) | 24x14 | - |
| ES | 22x20 | 20 (aprox.) | 20x17 | - |
| OE | 23x19 | - | 25x23 | 10 (aprox.) |
| GR | 22x19 | 16 (aprox.) | 16 (aprox.) | - |
| GR II | 27x25 | 24 (aprox.) | >16 | - |

Figura 14 - Medidas dos tipos celulares presentes na hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Amblyomma sculptum* comparadas com as medidas descritas por outros autores em diferentes artrópodes. (PR) Prohemócitos; (PL) Plasmatócitos; (ES) Esferulócitos; (OE) Oenocitoides; (GR I) Granulócitos Tipo I; (GR II) Granulócitos Tipo II.

Em relação à contagem diferencial dos hemócitos presentes na hemolinfa de *A. sculptum*, o tipo celular mais encontrado, estando presente em todas as contagens diferenciais foi o granulócito. Os plasmatócitos também se destacaram, sendo o segundo tipo celular mais frequente nas contagens. As funções primordiais que esses tipos celulares possuem (fagocitose, nodulação e encapsulamento de patógenos), integrando o sistema imune dos artrópodes, podem justificar essa maior frequência na hemolinfa (PEREIRA et al., 2001).

5.2 Teste de Imersão de fêmeas ingurgitadas e Avaliação da resposta celular das ao Fluazuron

Com os resultados obtidos no AIT foi possível determinar a sensibilidade *in vitro* de fêmeas ingurgitadas de *A. sculptum* ao fluazuron, servindo de ponto de partida para a escolha das concentrações utilizadas na avaliação da resposta celular.

No que concerne à quantificação dos hemócitos, o presente estudo revelou diminuição em sua contagem total nos carrapatos expostos ao fluazuron na concentração de 4000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ em 48h em relação ao controle (de 884 células/ μL para 491 células/ μL), demonstrando a capacidade deste regulador de crescimento alterar a configuração hemocitária desses artrópodes.

Outros exemplos de inibição hemocitária, porém em diferentes circunstâncias, foram observados nos estudos de Silva et al. (2006) e Feitosa et al. (2015). A partir do quinto dia após infecção com *Leishmania infantum* o autor relata diminuição significativa na contagem total de hemócitos em *R. sanguineus*. Já fungo *Metarhizium anisopliae* é capaz de causar redução acentuada a total inibição dos hemócitos de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* (SILVA et al., 2006).

Informações relacionadas à competência na dinâmica da hemolinfa de carrapatos expostos a acaricidas são escassas. No entanto, estudos voltados para insetos de importância para a agricultura demonstram alterações diretas na hemolinfa destes relacionada à ação de IGR's. Estudos que relatam os efeitos da exposição ao hexaflumuron em hemócitos de larvas de *Mythimna separata*, conhecida como lagarta dos cereais, e de larvas de *Ephestia kuehniella*, a traça da farinha, de Huang et al. (2016) e Rahimi et al. (2013) respectivamente, relevam a ação de IGR's sobre a resposta celular destes insetos. A média total de hemócitos diminuiu significativamente nos grupos tratados de ambos os experimentos, havendo também, de maneira semelhante ao presente estudo alterações nas contagens proporcionais de granulócitos, com diminuição deste tipo celular. Os autores também relatam variações na densidade de plasmatócitos, entretanto a presença deste hemócitos na hemolinfa de *A. sculptum* quando exposto ao fluazuron não apresentou variação, diferentemente dos esferulócitos que sofreram um aumento significativo.

Assim como o fluazuron, outro IGR que foi capaz de reduzir a população hemocitária em artrópodes é o piriproxifeno. No estudo de Sezer e Ozalp (2015) foi investigado efeito do piriproxifen na contagem total de hemócitos de pupas de *G. mellonella*. Onde houve diminuição progressiva, de acordo com a dose de exposição, na contagem total de hemócitos em pupas expostas a 1, 5 e 10 $\mu\text{g} / \text{ml}$ de piriproxifen.

Apesar da redução no total de hemócitos neste estudo ter ocorrido apenas em 48h e na concentração de 4000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de fluazuron a utilização de outras concentrações foi indispensável para confirmação de que essa diminuição dos hemócitos circulantes foi devido à exposição ao fluazuron e não em decorrer do tempo.

A dinâmica celular da hemolinfa pode sofrer mudanças relevantes após a exposição de patógenos e de acaricidas (RUSSO et al., 2001). Foi o que se relatou neste estudo, onde através da contagem diferencial de hemócitos de fêmeas ingurgitadas de *A. sculptum* após teste de

imersão com fluazuron em diferentes concentrações se observou variações nas presenças de determinados tipos celulares.

Os resultados obtidos referentes aos granulócitos e esferulócitos neste estudo, onde ocorre diminuição de granulócitos e aumento dos esferulócitos, diferem das respostas celulares apresentadas em estudos com agentes patogênicos. Silva et al. (2006), em seu estudo de avaliação da resposta celular de *R. microplus* após infecções com fungos entomopatogênicos, descreveram aumento acentuado de granulócitos após 72 horas da inoculação fúngica.

Silva et al. (2006) também relata que o número de pro-hemócitos encontrado no grupo inoculado com o fungo *Beauveria bassiana* apresenta diferença significativa quando comparado com o grupo controle, diferente do presente trabalho, onde as contagens de prohemócitos não evidenciaram diferença estatística entre os grupos controle e fluazuron. O autor também relata que não houve diferença significativa nas contagens de esferulócitos entre grupo tratado e controle, porém, no presente estudo o fluazuron estimulou a diferenciação desse tipo celular.

Apesar de distintos, esses resultados sugerem que a produção das células da hemolinfa pode ser estimulada, inibida ou até mesmo esgotada, variando a resposta de acordo com o tipo de estímulo submetido. Conhecendo a função dos tipos celulares envolvidos pode-se também sugerir que após a exposição ao fluazuron houve redução da capacidade de fagocitose e encapsulamento dos hemócitos devido a diminuição do número de GR. Além disso, um provável aumento de síntese proteica pode ocorrer devido ao aumento de ES. (ABOU-TALEB et al., 2015).

Essa divergência de resultados pode ter sido gerada pela diferença do tempo de coleta e metodologia empregada e sugere que o fluazuron age de maneira distinta ao fungo *B. bassiana*. É provável que o fungo não penetre na cutícula tão rapidamente quanto o fluazuron, agindo lentamente e estimulando a produção de células fagocitárias pelo carrapato, como mecanismo de defesa. Pode-se então acreditar que a dinâmica celular está relacionada também com a concentração e o tempo de ação sobre o organismo do artrópode alvo (HUANG et al., 2016; RAHIMI et al., 2013).

6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos neste trabalho conclui-se que a partir da microscopia óptica foi possível determinar o valor médio do total de hemócitos circulantes na hemolinfa do carrapato *A. sculptum*. Ainda através da microscopia óptica foi possível concluir que este ixodídeo possui seis tipos celulares classificados morfológicamente: prohemócitos, plasmatócitos, granulócitos, esferulócitos, adipohemócitos e oenocitoides, e determinar a frequência média de cada tipo na hemolinfa.

Considerando as alterações celulares, o fluazuron foi capaz de promover alterações na dinâmica hemocitária de fêmeas ingurgitadas de *A. sculptum* após exposição *in vitro*, promovendo redução significativa na contagem total de hemócitos e na frequência dos tipos celulares, o que sugere que este IGR seja capaz de promover alteração na resposta celular desta espécie de carrapato após exposição *in vitro*.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente estudo além de se estabelecer um padrão de coleta e de avaliação celular da hemolinfa, que poderão ser reproduzidos em trabalhos com diversas espécies de carrapatos, realizou-se a caracterização dos hemócitos, com o entendimento dos tipos celulares e das alterações da hemolinfa do carrapato *A. sculptum*. Essas informações serão o ponto de partida para melhor esclarecimento do seu sistema imunológico e darão suporte a futuros estudos relacionados à avaliação hemolinfática destes carrapatos quando expostos a acaricidas e agentes patogênicos, obtendo dados que possibilitarão futuros testes *in vivo*.

Uma vez que a classificação dos hemócitos tem se mostrado divergente entre os diversos estudos, métodos mais específicos se fazem necessários para melhor identificação dos tipos celulares e de seus componentes. Neste estudo utilizamos a microscopia óptica para realizar as avaliações em geral, porém a utilização de outros métodos como microscopia eletrônica de transmissão e microscopia de varredura a laser se fazem válidas a fim de estabelecer mais informações de forma concisa e detalhada.

A metodologia eficaz para coleta de material hemolinfático e para análise celular descrita no presente estudo poderá servir de base para guiar pesquisadores que buscam realizar trabalhos correspondentes.

A caracterização da quantificação total dos hemócitos circulantes na hemolinfa do carrapato *A. sculptum*, assim como a realização da contagem diferencial destes hemócitos a fim de determinar a frequência dos mesmos, foi de suma importância para o estabelecimento dos valores de referências celular desta espécie. Esses valores, além de guiar a segunda etapa do trabalho onde se avaliou as alterações celulares na hemolinfa do *A. sculptum* expostas ao fluazuron, também serão úteis em estudos que avaliarão a resposta desta ou de outras espécies de carrapatos expostas a outros agentes patogênicos, naturais ou químicos, sendo possível discutir resultados frente a normalidade celular da espécie *A. sculptum* e realizar a comparação com outras espécies.

Os resultados deste trabalho revelam a capacidade do fluazuron em alterar a dinâmica celular responsável pela imunidade do carrapato, com a ocorrência da imunossupressão e alteração da frequência dos tipos celulares hemolinfáticos. Esses resultados revelam a importância da realização de estudos mais aprofundados acerca da resposta imune dos carrapatos, buscando técnicas mais avançadas para reconhecimento das células e de todos seus componentes. Aprofundar o conhecimento das funções de cada tipo celular encontrado na hemolinfa também se torna necessário para o entendimento geral da resposta imunológica desses artrópodes.

Preencher as lacunas a respeito da atividade do fluazuron sobre o sistema imune das formas evolutivas de *A. sculptum* e conhecer as alterações causadas por esse fármaco, auxiliará nos conhecimentos que visam o controle de infestações causadas por esse parasito, evitando assim, consequentes prejuízos econômicos e em saúde.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, M. S. R. **Resposta celular e metabólica de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* expostas ao Fluazuron.** 2019. 59f. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2019.
- ANDE BRASIL (Associação Nacional De Equoterapia). Curso básico de equoterapia Brasília: **Associação Nacional de Equoterapia**, 2012.
- ANDREOTTI, R. Situação atual da resistência do carrapato-do-boi (*Rhipicephalus Boophilus*) microplus aos acaricidas no Brasil. – Dados eletrônicos. – Campo Grande, MS: **Embrapa Gado de Corte**, p.36, 2010.
- ANGELO I.C. **Avaliação dos perfis proteico e lipídico na resposta de *Rhipicephalus microplus* à infecção com fungos.** 2011. 141f. Tese (Doutorado), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2011.
- ANGELO, I.C.; GÔLO, P.S.; CAMARGO, M.G.; KLUCK, G.E.G.; FOLLY, E; BITTENCOURT, V.R.E.P. Haemolymph protein and lipid profile of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infected by fungi. **Transboundary and Emerging Diseases.** v.57, n.1-2, p.79-83, 2010.
- ANUALPEC (Anuário da Pecuária Brasileira). **Instituto FNP**, São Paulo, n.20, p 6, 2017.
- ARAÚJO, H.R.C. **Caracterização morfológica dos hemócitos do *Aedes aegypti* e do *Aedes albopictus* e a resposta imune dos hemócitos do *Aedes aegypti* após a infecção pelo dengue vírus.** Tese (Doutorado). Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, 2011.
- BARBIERI, F. da S.; BRITO, L. G.; LABRUNA, M. B.; BARROS-BATTESTI, D. M.; FACCINI, J. L.; CAMARGO, L. M. A.; FAMADAS, K. M. Metodologia para o estudo da porotaxia em larvas de carrapatos Ixodidae. (Comunicado Técnico n.321) Porto Velho: **EMBRAPA**, p.1-5, 2006.
- BARROS-BATTESTI, D.M.; ARZUA, M.; BECHARA, G.H. **Carrapatos de importância médico-veterinária da Região Neotropical: Um guia ilustrado para identificação de espécies.** São Paulo: Vox/ International Consortium on Ticks and Tick-borne Diseases (ICTTD-3) /Butantan, p. 223, 2006.
- BEATI, L.; NAVA, S.; BURKMAN, E. J.; BARROS-BATTESTI, D. M; LABRUNA, M. B.; GUGLIELMORE, A. A.; CÁCERES, A. G.; GUZMÁN-CORNEJO, C.; LÉON, R.; DURDEN, A. L.; FACCINI, J. L. H. *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae), the Cayenne tick: phylogeography and evidence for allopatric speciation. **BMC Evolutionary Biology**, v. 13, n. 1, p. 1-20, 2013.
- BOMBONATO, M. T. S.; GREGÓRIO, E. A. Estudo morfológico e quantitativo dos hemócitos em larvas de *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera, Pyralidae). **Revista Brasileira de Zoologia** v.12, n.4, p. 867-879, 1995.
- BOWMAN, D. D. **Georgis' Parasitology for Veterinarians.** 8ªed. Editora Elsevier Science (Usa), p.422, 2003.

BRITES-NETO, J.; BRASIL, J.; TAKEDA, G.A.C.G.; GUILLEN, A.C.; LABRUNA M.B.; PINTER, A. Diferenciação morfométrica entre larvas de *Amblyomma sculptum* Berlese, 1888 e *Amblyomma dubitatum* Neumann, 1899. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.70, n.5, p.1521-1528, 2018.

BULL, M. S.; SWINDALE, S.; DOVEREND, D.; HESS, E. A. Supression of *Boophilus Microplus* populations with fluazuron; An Acarine growth regulator. **Australian Veterinary Journal**. v.74, n.6, p.468-470, 1996.

CABRERA R.R; LABRUNA M. B. Influence of photoperiod and temperature on the larval behavioral diapause of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, p.1303-1309, 2009.

CARNEIRO, ME.; DAEMON, E. Caracterização dos tipos celulares presentes na hemolinfa de adultos de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Ixodoidea: Ixodidae) em diferentes estados nutricionais. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 6, p.1-9, 1997.

CHAPMAN RF. Circulatory system blood and immune systems. In: **The insects: structure and function**. 4^a ed. Cambridge: Cambridge University, p.94-131, 1998.

COELHO, C. N.; CORREIA, T. R.; OLIVEIRA, G. F.; COUMENDOUROS, K.; TAVEIRA, M. T.; CALADO, S. B.; AVELAR, B. R de; NASCIMENTO, C. G.; SCOTT, F. B. Associação de abamectina com fluazuron no controle do carrapato *Rhipicephalus microplus* em bovinos naturalmente infestados. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**. v.37, n.1, p.51-54, 2015.

COHEN, E. Chitin synthesis and inhibition: a revisit. **Pest Management Science**, v.57, p.946–950, 2001.

CORREIA, T. R. **Eficácia do Inibidor de Crescimento de Insetos Pyriproxyfen Associado ao Piretróide D-phenotrina no Controle de *Ctenocephalides felis felis* (BOUCHÉ, 1835) (SIPHONAPTERA:Pulicidae) em Cães, Gatos e no Ambiente**. 52 p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2003.

CORREIA A.A.; FERREIRA A.V.S.; WANDERLEY-TEIXEIRA V.; TEIXEIRA A.A.C. Descrição morfológica dos hemócitos do gafanhoto *Tropidacris collaris* (stoll, 1813) (orthoptera: romaleidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.72, n.1, p.57-61, 2005.

COSTA J.; BOTELHO J. Classe Arachnida. In: NEVES D.; MELO A.; LINARDI P.; VÍTOR R. (Eds.), **Parasitologia Humana**, 13^aed., Atheneu: Rio de Janeiro, p. 449-458. 2011.

COSTA, L.E.S. **Comparação morfo-fisiológica dos tipos celulares encontrados na hemolinfa de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* (Ixodidae) e *Ornithodoros rostratus* (Argasidae)**. 2013. 44f. (Trabalho de Conclusão de Curso), Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Rio Claro, 2013.

COURE, U.; SOLARI, M. A.; TRELLES, A. Current status of resistance and first diagnostic of multiple resistance *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tick simultaneously resistant to five drugs in Uruguay. **Veterinária (Montevideo)**. v.53, n.205, p.13-19, 2017.

CRUZ-LANDIM, C. **Abelhas, morfologia e função de sistemas**. Editora UNESP: São Paulo, p.408, 2009.

CUNHA, A. P.; BELLO, A. C. P. P.; LEITE, R. C.; BASTIANETTO, E.; RIBEIRO, A. C. C. L.; FREITAS, C. M. V.; OLIVEIRA, P. R. Controle estratégico de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) em equinos, Minas Gerais, Brasil – Parte I. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 16, n. 4, p. 221-228, 2007.

DEL FIORI, F. S.; JUNQUEIRA, F. M.; ROCHA, M. C. P.; TOLEDO, M. I.; BARBERATO FILHO, S. A febre maculosa no Brasil. **Revista Panamericana de Salud Publica**, p. 461–467, 2010.

ESTRADA-PEÑA, A.; TARRAGONA, E.L.; VESCO, U.; MENEGHI, D.; MASTROPAOLO, M.; MANGOLD, A.J.; GUGLIELMONE, A.A.; NAVA, S. Divergent environmental preferences and areas of sympatry of tick species in the *Amblyomma cajennense* complex (Ixodidae). **International Journal for Parasitology**, v.44, p.1081-1089, 2014.

FALLEIROS, Â. M. F.; BOMBONATO, M. T. S.; GREGÓRIO, E. A. Ultrastructural and quantitative studies of hemocytes in the sugarcane borer *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Pyralidae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.46, n.2, p.287-294, 2003.

FAO (Food And Agriculture Organization), 2004. Resistance management and integrated parasite control in ruminants – Guidelines, Module 1 – Ticks: Acaricide resistance: diagnosis, management and prevention. **Food and Agriculture Organization, Animal Production and Health Division**, Rome, p. 25–77. 2014.

FEITOSA, A.P.S. **Resposta imune celular e humoral de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) desafiados com *Leishmania infantum* (Nicolle, 1908)**. 2015. Tese (Doutorado). Universidade Federal De Pernambuco, Recife, 2015.

FRAZÃO, T. Equoterapia: recurso terapêutico em discussão. **O Coffito**, v. 4, n. 11, 2001.

FREITAS, S. E. P.; ZAPATA, M. T.; FERNANDES, F. de F. Monitoring of resistance or susceptibility of adults and larvae of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) o synthetic acaricides in Goiás, Brazil. **Experimental Applied Acarology**, v.53, n.2, p.189-202, 2011

FURLONG, J. *Amblyomma cajennense*. In: PRATA, M. C. A. **Carrapato: Problemas e Soluções, Embrapa Gado de Leite**, Juiz de Fora, cap. 5, p. 65, 2005.

FURLONG, J.; SALES, R. O. Controle estratégico de carrapatos no bovino de leite: uma revisão. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v.1, n.2, p.44-72, 2007.

GAUDÊNCIO, F.N. **Efeito do fluazuron sobre ovos, larvas e fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus***. 2016. Tese (Doutorado). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2016.

GHANIM, M.; ISHAAYA, I. Insecticides with novel modes of action: mechanism and resistance management. In: AMIARD-TRIQUET, C.; RAINBOW, P.S.; ROMÉO, M. (EDS.). **Tolerance to environmental contaminants**. CRC Press: EUA, cap.16, p.385-407, 2011.

GHASEMI, V.; MOHARRAMIPOUR, S.; SENDI, J.J. Impact of pyriproxyfen and methoxyfenozide on hemocytes of the Mediterranean flour moth, *Ephesia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Crop Protection**, v.3, p. 449-458, 2014.

GIANNOTTI, E.; F.H. CAETANO. Caracterização morfológica dos hemócitos de *Polistes lanio lanio* (Hymenoptera, Vespidae) durante o desenvolvimento pós-embrionário. **Revista Brasileira de Biologia**, v.51, p.179-184, 1990.

GIULIANINI, P.G.; BERTOLO, F.; BATTISTELLA S.; AMIRANTE, G.A. Ultrastructure of the hemocytes of *Cetonischema aeruginosa* larvae (Coleoptera, Scarabeidae): involvement of both granulocytes and oenocytoids in vivo phagocytosis. **Tissue and Cell**, v.35, p.243-251, 2003.

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO - INFORME TÉCNICO. **Febre Maculosa Brasileira**. São Paulo, 2011. Disponível em: <
http://www.saude.sp.gov.br/resources/sucen/homepage/downloads/arquivos-de-febre-maculosa/bepa94_suplemento_fmb.pdf > Acesso em: 09 jan 2020.

GRAF J. F The role of insect growth regulators in arthropod control. **Parasitology Today**. v.9, n.12, p.12, 1993.

GRAF, J.F.; GOGOLEWSKI, R.; LEACH-BING, N.; SABATINI, G.A.; MOLENTO, M.B.; BORDIN, E.L.; ARANTES, G.J. Tick control: an industry point of view. **Parasitology**, v. 129, n.1, p.427-442, 2004.

GUEDES, E., LEITE, R.C. Dinâmica sazonal de estádios de vida livre de *Amblyomma cajennense* e *Amblyomma dubitatum* (Acari: Ixodidae) numa área endêmica para febre maculosa, na região de Coronel Pacheco, Minas Gerais. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.17, p.78-82, 2008.

GUGLIELMONE, A. A.; NAVA, S. Names for Ixodidae (Acari: Ixodoidea): valid, synonyms, incertae sedis, nomina dubia, nomina nuda, lapsus, incorrect and suppressed names - with notes on confusions and misidentifications. **Zootaxa**, v.3767, n.1, p. 001-256, 2014.

GUGLIELMONE, A.A., BEATI, L., BARROS-BATTESTI, D.M., LABRUNA, M.B., NAVA, E.S, VENZAL, J.M., MANGOLD, A.J., SZABO, M.P.J., MARTINS, J.R., GONZALES-ACUNA, D., ESTRADA-PENA, A. Ticks (Ixodidae) on humans in South America. **Experimental & Applied Acarology**, v. 40, n. 2, p. 83-100, 2006.

GULLAN, P.J. ; CRANSTON, P.S. **Os insetos, um resumo de entomologia**. 3ª ed., Editora Roca: São Paulo, 2008.

HAMI, M.; TAIBI, F.; SMAGGHE, G.; SOLTANI- MAZOUNI, N. Comparative toxicity of three ecdysone agonist insecticides against the Mediterranean flour moth. **Applied Biological Sciences**, v.70, n.4, p.767-773, 2005.

HINK, W. F.; DROUGHT, D. C. BARNETT, S. Effect of an experimental systemic compound, CGA-184699. on life stages of the cat flea. **Journal of Medical Entomology**, v. 28, n. 3, p. 424-427, 1991.

HINK, W.F., DUFEEY, T.E. Controlling ticks and fleas with linalool. **Patent 4,933,371**, 1990.

HUANG, Q.; ZHANG, L.; YANG, C.; YUN, X.; HEO, Y. The competence of hemocyte immunity in the armyworm *Mythimna separata* larvae to sublethal hexaflumuron exposure. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 130, p. 31-38, 2016.

JARDIM, L. S. Babesiose em equinos. **Patologia Veterinária**. Rio Grande do Sul, out. 2014. Disponível em: <<http://patologiaveterinaria12.blogspot.com.br/2014/10/babesiose-emequinos.html>>. Acesso em: 17 abr. 2017

JONES, J.C. Current concepts concerning insect hemocytes. **American Zoologist**, v.2, n.2, p.209-246, 1962.

KARP R.D. Inducible humoral immunity in insects: does an antibody-like response exist in invertebrates? **Immunology Research**, v.141; p.923-926, 1990.

KEMP, D.H.; DUNSTER, S.; BINNINGTON, K.C.; BIRD, P.; NOLAN, J. Mode of action of CGA 157419 on the cattle-tick *Boophilus microplus*. **Bulletin de la Société française de parasitologie**, v.8, p. 1048-1049, 1990.

KOPÁČEK P.; HAJDUSEK O.; BURESOVÁ V.; DAFFRE S. Tick Innate Immunity. In: SODERHALL K. **Invertebrate Immunity**. Department of Comparative Physiology Uppsala University Uppsala Sweden, p.1–26, 2010.

LABRUNA, M. B.; MATTAR, S.; NAVA, S.; BERMUDEZ, S. M.; VENZAL, J. M.; DOLZ, G.; ABARCA, K.; ROMERO, L.; SOUSA, R.; OTEO, J.; ZAVALA-CASTRO, J. Rickettsiosis in Latin America, Caribbean, Spain and Portugal. **Revista MVZ Cordoba**, v. 16, n. 2, p. 2435-2457, 2011.

LABRUNA, M.B. Brazilian spotted fever: the role of capybaras. In: MOREIRA, J.R.; FERRAZ, K.M.P.M.B.; HERRERA, E.A.; MACDONALD, D.W. (Eds.) **Capybara: biology, use and conservation of an exceptional neotropical species**. Springer Science Business Media: New York, cap.23, p.371-383, 2013.

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

LABRUNA, M.B.; KASAI, N.; FERREIRA, F.; FACCINI, J.L.H.; GENNARI, S.M. Seasonal dynamics of ticks (Acari: Ixodidae) on horses in the state of São Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.105, p.65- 77, 2002.

LABRUNA, M.B.; SANTOS, F.C.P.; OGRZEWALSKA, M.; NASCIMENTO E.M.M.; COLOMBO S.; MARCILI A.; ANGERAMI R. N. Genetic identification of rickettsial isolates from fatal cases of Brazilian spotted fever and comparison with *Rickettsia rickettsii* isolates from the American Continents. **Journal of Clinical Microbiology**, v.52, p.3788-3791, 2014.

LANOT, R.; ZACHARY, D.; HOLDER, F.; MEISTER, M. Postembryonic hematopoiesis in *Drosophila*. **Developmental Biology**, v.230, p.243-257, 2001.

LAVINE, M.D.; STRAND, M.R. Insect hemocytes and their role in immunity. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.32, p.1295–1309, 2002.

LOPES, W. D. Z.; CHIUMMO, R. M.; VETTORATO, L. F.; CASTRO R. D.; SONADA, R. B. The effectiveness of a fixed-dose combination pour-on formulation of 1.25% fipronil and 2.5% fluzuron against economically important ectoparasites and associated pharmacokinetics in cattle. **Parasitology International**, v.66, n.5, p.627–634, 2017.

MACIEL, W. G.; LOPES, W. D. Z.; GOMES, L. V. C.; CRUZ, B. C.; FELIPPELLI, G.; SANTOS, I. B. dos; A, BORGES, F. de A.; JUNIORD, W. A. C. A.; SCARPA, A. B.; NICARETTA, J. E.; BASTOSB, T. S. A.; COSTA, A. J. da. Susceptibility of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* to Fluzuron(2.5 Mg/Kg) and a combination of Novaluron(2.0 mg/Kg) + Eprinomectin (0.36 mg/Kg) in field studies in Brazil. **Preventive Veterinary Medicine**. v.135, n.1, p.74–86, 2016.

MANACHINI, B.; ARIZZA, V.; PARRINELLO, D.; PARRINELLO, N. Hemocytes of *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier) (Coleoptera: Curculionidae) and their response to *Saccharomyces cerevisiae* and *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.106(3), p.360–365, 2011.

MANS, B. J.; KLERK, D.; PIENAAR, R.; LATIF, A. A. *Nuttalliella namaqua*: A living fossil and closest relative to the ancestral tick lineage: implications for the evolution of blood-feeding in ticks. **Plos One**, v. 6, n. 8, p. 1-11, 2011.

MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). 2016. Revisão do Estudo do Complexo do Agronegócio Caval. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/camaras-setoriais-tematicas/documentos/camaras-setoriais/equideocultura/anos-anteriores/revisao-do-estudo-do-complexo-do-agronegocio-do-cavalo/view>>. Acesso em: 03 dez 2019.

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

MARTINS, T. F.; OLIVEIRA, C. S.; BINDER, L. C.; COSTA, F. B.; NUNES, P. H.; GREGORI, F.; LABRUNA M. B. *Amblyomma yucumense* n. sp. (Acari: Ixodidae), a parasite

of wild Mammals in Southern Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v.52, n.1, p.28-37, 2015.

MARTINS, T.F.; ONOFRIO, V.C.; BARROS-BATTESTI, D.M.; LABRUNA, M.B. Nymphs of the genus *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) of Brazil: descriptions, redescrptions, and identification key. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v.1, p.75-99, 2010.

MASTROPAOLO, M.; NAVA, S.; GUGLIELMONE, A.A.; MANGOLD, A.J. Biological differences between two allopatric populations of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) in Argentina. **Experimental Applied Acarology**, v. 53, p. 371-375, 2011.

MELO, R. M. P. dos S. **Morfologia e biologia de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille) (Acari: Ixodidae) submetido ao regulador de crescimento de artrópodes fluazuron**. 2007. 43f. Dissertação (mestrado). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Veterinária, Seropédica-RJ, 2007.

MINISTÉRIO DA SAÚDE Disponível em: < www.saude.gov.br/saude-de-a-z/febre-maculosa/situacao-epidemiologica >. Acesso em: 17 dez 2019.

MORAES-FILHO, J. Febre maculosa brasileira. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v. 15, p.38-45, 2017.

NAVA, S.; BEATI, L.; LABRUNA, M. B.; CÁCERES, A. G.; MANGOLD, A. J.; GUGLIELMONE, A. A. Reassessment of the taxonomic status of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) with the description of three new species, *Amblyomma tonelliae* n. sp., *Amblyomma interandinum* n. sp. and *Amblyomma patinoi* n. sp., and reinstatement of *Amblyomma mixtum* Koch, 1844, and *Amblyomma sculptum* Berlese, 1888 (Ixodida: Ixodidae). **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 5, p. 252–276, 2014.

NEGREIRO, M.C.C.; CARVALHO, R.B.R.; ANDRADE, F.G.; LEVY, S.M.; MOSCARDI, F.; FALLEIROS, A.M.F. Caracterização citológica dos hemócitos de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera, Noctuidae) em larvas resistentes ao vírus AgMNPV. **Iheringia: Série Zoologia**. v.99, p. 66-70, 2009

NETO, J.B.; BRASIL, J.; ANDRADE, J.; SAQUI, G. L. Evaluation of an association of alpha-cypermethrin and flufenoxuron for tick control in an area at risk of Brazilian spotted fever. **Veterinary Parasitology**, v. 238, p1-4, 2017.

OLIVEIRA, P.R.; BORGES, L.M.F.; LEITE, R.C.; FREITAS, C.M.V. Seasonal dynamics of the Cayenne tick, *Amblyomma cajennense* on horses in Brazil. **Medical and Veterinary Entomology**, v.17, n.4, p.412-416, 2003.

ONOFRIO, V.C.; LABRUNA, M.B.; PINTER, A.; GIACOMIN, F. G.; BARROS-BATTESTI, D. M. Comentários e chaves para as espécies do gênero *Amblyomma*. In: BARROS-BATTESTI, D.M.; ARZUA, M.; BECHARA, G.H. **Carrapatos de importância médico-veterinária da Região Neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies**. São Paulo: Vox/ICTTD-3/Butantan, p.53-71, 2006.

PALLI, S. R.; RETNAKARAN, A. Molecular and biochemical aspects of chitin synthesis inhibition. In: P. JOLLES, R. A. A. MUZZARELLI (EDS.), **Chitin and Chitinases**. Basel: Birka user Verlag, v.87, p.85-98, 1999.

PALLINI, A.; FADINI, M.A.M.; VENZON, M.; MORAES, G. J.; BARROS-BATTESTI D. M. Demandas e perspectivas para a Acarologia no Brasil. **Neotropical Biology and Conservation**, v.2, p.169-175, 2007.

PECKLE, M., PIRES, M.S., SANTOS, T.M., ROIER, E.C.R.R., SILVA, C.B., VILELA, J.A.R, SANTOS, H.A, MASSARD, C.L. Molecular epidemiology of *Theileria equi* in horses and their association with possible tick vectors in the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Parasitology Research**, v. 112, n. 5, p. 2017–2025, 2013.

PEREIRA L.S.; OLIVEIRA P.L.; BARJA-FIDALGO C.; DAFFRE S. Production of reactive oxygen species by hemocytes from the cattle tick *Boophilus microplus*. **Experimental Parasitology**, v.99, p.66-72, 2001.

PEREIRA, M.C.; LABRUNA, M.B.; SZABO, M.P.J.; KLAFKE, G.M. **Rhipicephalus (Boophilus) microplus: Biologia, Controle e Resistência**. MedVet: São Paulo, 2008.

RAHIMI V.; ZIBAE A.; MOJAHED S.; MADDAHI K.; ZARE D. Effects of pyriproxyfen and hexaflumuron on cellular immunity of *Ephestia kuehniella* Zeller (lepidoptera: pyralidae). **Romanian Journal of Biology – Zoology**, v 58, p151-162, 2013.

RECK, J.; KLAFKE, G. M.; WEBSTER, A.; DALL'AGNOL, B.; SCHEFFER, R.; SOUZA, U. A.; CORASSINI, V. B.; VARGAS, R.; SANTOS, J. S. dos; MARTINS, J. R. First report of fluazuron resistance in *Rhipicephalus microplus*: a field tick population resistant to six classes of acaricides. **Veterinary Parasitology**. v.201, n.1-2, p.128–136, 2014.

RODRIGUES, V. S.; PINA, F. T. B.; BARROS, J. C.; GARCIA, M. V.; ANDREOTTI, R. Carrapato-estrela (*Amblyomma sculptum*): Ecologia, Biologia, Controle e Importância. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, v. 132, 2015.

RUSSO, J.; BREHÉLIN, M.; CARTON, Y. Haemocyte changes in resistant and susceptible strains of *Drosophila melanogaster* caused by virulent and avirulent strains of the parasitic wasp *Leptopilina boulardi*. **Journal of Insect Physiology**, v.47, p.167-172, 2001.

SCHMID-HEMPEL P. Evolutionary ecology of insect immune defenses. **Annual Review of Entomology**, v.50, p.529-551, 2005.

SCOTT, F. B.; MARTINS, I. V. F.; SOUZA, C. P.; CORREIA, T. R. Aspectos gerais do controle da pulga *Ctenocephalides felis felis* em cães. **A Hora Veterinária**, v.21, n.125, p.13-18, 2002.

SENER, B. & OZALP, P. Effects of pyriproxyfen on hemocyte Count and morphology of *Galleria mellonella*. **Fresenius Environmental Bulletin**, v. 24, n. 2, 2015.

SHINJO S.K.; GAUDITANO G.; MARCHIORI P.E.; BONOLDI V.L.N.; MANTOVANI E.; YOSHINARI N.H. Manifestação neurológica na Síndrome de Baggio-Yoshinari (Síndrome brasileira semelhante à doença de Lyme). **Revista Brasileira de Reumatologia**, v.49, p.492-505, 2009.

SILVA S.B. **Identificação e quantificação de hemócitos de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* inoculados com fungos *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Penicillium corylophilum* e *Fusarium oxysporum***. 2006. 60f. Tese (Doutorado), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2006.

SILVA, J.C. **Identificação e caracterização morfológica de hemócitos em *Ectemnaspis rorotense* (Floch & Abonnenc) e *Ectemnaspis trombetense* (Hamada, Py-Daniel & Adler) (Diptera: Simuliidae)**. 2014. Dissertação (Mestrado). Manaus, 2014.

SILVA, S.B.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Avaliação da resposta celular de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* (CANESTRINI, 1887) inoculadas com *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Penicillium corylophilum* ou *Fusarium oxysporum*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 15, p. 151-156, 2006.

SONENSHINE D.E.; HYNES W.L. Molecular characterization and related aspects of the innate immune response in ticks. **Frontiers in Bioscience** v.13, p. 7046–7063, 2008.

SONENSHINE, D. E.; ROE, R. M. *The Biology of Ticks*, Oxford University Press, New York, USA. 2^a.ed, p.540, 2014.

SONENSHINE, D.E. **The Biology of Ticks**. 1^a.ed. Oxford University Press: New York, USA, 1991.

STRAND M.R. The insect cellular immune response. **Insect Science**, v.15, p.1-14, 2008.

TAYLOR, M. A. Recent developments in ectoparasiticides. **The Veterinary Journal**, v.161, n.3, p.253-268, 2001.

TAYLOR, M. A.; COOP, R. L.; WALL, R. L. **Parasitologia Veterinária**. 3ed. Rio De Janeiro: Editora Guanabara Koogan. p.902, 2014.

TRIPLEHORN, C. A.; JONNISON, N. F. Estudos dos insetos. Tradução da 7^a edição de **Borror e DeLong's introduction to the study of insects**. Cengage Learning: São Paulo, Brasil. p.809, 2011.

VIEIRA, V. P. da C. **Atividade do fluazuron administrado por via oral no controle de *Rhipicephalus sanguineus* em cães**. 2012. (56 f.). Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica-RJ, 2012.

9 ANEXO

9.1 Certificado de aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Veterinária da Universidade Federal do Rio de Janeiro



UFRRJ
Universidade Federal Rural
do Rio de Janeiro

**Comissão de Ética no
Uso de Animais**
Instituto de Veterinária



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Manutenção de colônia laboratorial do carrapato *Amblyomma sculptum* e *Amblyomma cajennense* sensu stricto em coelhos", protocolada sob o CEUA nº 7699190418 (ID 001112), sob a responsabilidade de **Fabio Barbour Scott e equipe; Debora Azevedo Borges; Diefrey Ribeiro Campos** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (CEUA/UFRRJ) na reunião de 09/11/2018.

We certify that the proposal "Maintenance of laboratory colony of *Amblyomma sculptum* and *Amblyomma cajennense* sensu stricto ticks in rabbits ", utilizing 100 Rabbits (males and females), protocol number CEUA 7699190418 (ID 001112), under the responsibility of **Fabio Barbour Scott and team; Debora Azevedo Borges; Diefrey Ribeiro Campos** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Veterinary Institute of Rural Federal University of Rio de Janeiro (CEUA/UFRRJ) in the meeting of 11/09/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **12/2018 a 10/2023**

Área: **Parasitologia Animal**

Origem: **Setor de Cunicultura da UFRRJ**

Espécie: **Coelhos**

sexo: **Machos e Fêmeas**

idade: **6 a 10 meses**

N: **100**

Linhagem: **Nova Zelândia**

Peso: **2 a 3 kg**

Local do experimento: Será realizado nas dependências do Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária (LQEPV) do Departamento de Parasitologia Animal do Instituto de Veterinária, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, localizada no Km 07 da BR 465, Município de Seropédica, Estado do Rio de Janeiro. As instalações ficam localizadas no Anexo I do Instituto de Veterinária. O endereço da UFRRJ é Km 7 da BR 456, Seropédica, RJ, CEP 23890-000.

Seropédica, 28 de junho de 2019

Prof. Dr. Fabio Barbour Scott
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Carlos Alexandre Rey Matias
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro