

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

JOSIAS ALVES MACHADO

EFEITO DO ÁCIDO 5,5'-Ditiobis (2-nitrobenzóico) EM *Rhipicephalus sanguineus*
(Latreille,1806) ALIMENTADOS EM COELHOS (*Oryctolagus cuniculus*)

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ

Fevereiro - 2014

JOSIAS ALVES MACHADO

EFEITO DO ÁCIDO 5,5'-Ditiobis (2-nitrobenzóico) EM *Rhipicephalus sanguineus*
(Latreille,1806) ALIMENTADOS EM COELHOS (*Oryctolagus cuniculus*)

“Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal”.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Carlos Logullo

Campos dos Goytacazes – RJ

Fevereiro– 2014

“Porque há homens cujo trabalho é feito com sabedoria, e ciência, e destreza; contudo, deixará o fruto do seu labor para ser porção de quem não trabalhou nele.”

Ecclésiastes 2:21

DEDICATÓRIA

À DEUS pelo dom da vida, “tudo que sou ou que vier a ser eu ofereço a Ti”.

À minha família que caminhou comigo durante esta difícil e nobre tarefa.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à DEUS, que me deu forças e me capacitou para esta grande tarefa; Aos meus pais Marly Alves Machado e Manoel José Machado, pelo amor e sacrifícios, que me elevou a degraus acima dos seus já galgados; Aos meus irmãos e Cunhados Neemias e Elizabeth; Isaias e Simone; Esmeralda e José Carlos; Thiago e Fernanda; Carlos e Gisele. Aos meus sobrinhos: Neemias Jr, Davi, Maria Eduarda, Luis Felipe, Ana Júlia, Samuel, Daniel, João Marcos, Lucas e Pedro Lucas. Estes aceitavam, sem entender, minha ausência nas reuniões de família. À minha amada Hellen Christine, à minha princesa Ester, ao meu príncipe Nathan e à minha segunda mãe Thereza Cristina pela paciência e amor dispensados durante este trabalho;

Ao meu Orientador e Amigo, Prof. Carlos Logullo, por ter acreditado em mim, quando eu já estava morrendo academicamente. Por ter me reerguido e apoiado sobre sua envergadura científica – sempre serei grato e leal por isso;

À equipe da UEA: Dr. Evenilton Pessoa Costa, Dr. Leonardo Abreu, Dr^a Fernanda Antunes MsC Bárbara Pitta Della'Noce, Dr. Jorge Moraes, MsC. Elizabeth Correa Sales, MsC. Marcele Vianna, MsC. Renato Martins, Dr^a. Daniela Fantini, MsC Mariana Rocha, MsC. Newton Ruiz Sanches, aos ICs: Jhennifer do Nascimento, Christiano Calixto, Jorge Luis Ribeiro, Yolanda Porto Muniz e Luan Correa. À Cláudia (meu braço direito no biotério). À Adriana (Drika), pela ajuda e incentivo. Às estagiárias do curso de Patologia Clínica: Daynara, Soraia, Ester, Jéssica, Cynthia, Ingrid e Beatriz, pelo suporte e conselhos nos experimentos durante o mestrado, creiam sem vocês eu não conseguiria ir à diante.

Aos meus irmãos da Igreja Batista em Tocos, pelo suporte espiritual, que foram fundamentais nas horas difíceis;

Aos meus colegas de Trabalho: Orlando Melo Jr, MsC. Anderson Barros Teixeira Pinto, Prof. Antonio Peixoto Albernaz (chefe), Lenira, Gilda Manhães (diretora) e Sandra Maria Manhães Siqueira (coordenadora) pelo apoio e suporte profissional, suprimindo minha ausência nos setores;

À coordenação da pós-graduação, especialmente ao Professor Dr Olney Vieira Motta, Jovana e Conceição pelo incentivo e ajuda durante o curso.

Ao pessoal da Patologia Geral: Professor Eulógio Queiroz Carvalho, Rafael Medina, Rachel Bittencourt, Raniele, Daiana, Douglas, Anderson e Elizabeth

À UENF, por me acolher como funcionário e aluno.

SUMÁRIO

Resumo	vii
Abstract	ix
1- INTRODUÇÃO	10
1.1 Carrapatos	10
1.2 Biologia e ecologia do <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	11
1.3 Coelhos (<i>Oryctolagus cuniculus</i>) na experimentação animal	13
1.4 DTNB - Agente desestabilizante de proteínas com grupamentos tióis.....	15
2 – OBJETIVOS	17
2.1- Objetivo Geral	17
2.2- Objetivos Específicos	17
3 - MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1 - Manutenção da colônia de <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	18
3.2- Manutenção de coelhos	19
3.3 Avaliação Clínico laboratorial em coelhos	20
3.4 Avaliação de bioquímicas clínicas	20
3.5 Análise Anatomopatológica	21
3.6 Alimentação artificial “ <i>in vitro</i> ” de <i>R. sanguineus</i>	22
3.7 Alimentação natural “ <i>in vivo</i> ”de <i>R. sanguineus</i>	23
3.8 Avaliação da taxa de oviposição e eclosão	25
4 – RESULTADOS	26
4.1 Curva de Concentração do DTNB livre em plasma de coelhos	26
4.2 Farmacocinética em carrapatos <i>R.sanguineus</i>	27
4.3 Taxa de Oviposição de carrapatos alimentados Artificialmente.....	29
4.4 Avaliação da toxicidade de Dose única (aguda) em Coelhos.....	30
4.4 Avaliação da toxicidade de Doses repetidas em Coelhos.....	31
4.5 Avaliação da bioquímica Clínica.....	32
4.5.1 Uréia.....	34

4.5.2	Creatinina	35
4.5.3	Proteínas Totais.....	36
4.5.4	Albuminas.....	37
4.5.5	Aspartato Amino Transferase (AST).....	38
4.5.6	Alanina Amino Transferase (ALT).....	39
4.5.7	Fosfatase Alcalina (ALP).....	40
4.6	Análise Anatomopatológica.....	41
4.7	Taxa de oviposição de <i>R. sanguineus</i> natural em coelhos.....	42
4.8	Taxa de eclosão de <i>R. sanguineus</i> alimentados naturalmente em Coelhos....	43
5	– DISCUSSÃO	44
6	– CONCLUSÃO	50

Resumo

Carrapatos são ectoparasitas hematófagos e sua presença tem sido associada à grandes prejuízos econômicos e impactos na saúde pública. As espécies de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1880) (Acari: Ixodidae), também conhecido como carrapato marrom do cão, apresenta um ciclo de vida trixênico, onde larvas, ninfas e adultos de *R. sanguineus*, vivem em hospedeiros distintos e realizam suas mudas no ambiente, voltando a um vertebrado para se alimentar. Devido à sua distribuição cosmopolita, espera-se que existam populações distintas de *R. Sanguineus*. No entanto, eles podem se comportar de forma diferente de acordo com a especificidade do hospedeiro e transmissão de vários patógenos. O presente trabalho analisou os efeitos do ácido 5,5'-Ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) *in vivo* em coelhos (hospedeiro) e carrapato *R. sanguineus*. O potencial uso terapêutico do DTNB foi avaliado “*in vivo*” e “*in vitro*”. Inicialmente, diferentes doses de DTNB foram injetadas subcutaneamente em coelhos machos saudáveis. Análises bioquímicas clínicas e histopatológicas foram realizadas durante a experimentação. Além disso, *R. sanguineus* foram alimentados em coelhos. Após a alimentação, estes carrapatos foram incubados a 27 ± 1 °C em umidade relativa (acima de 70 %) e foi determinada a taxa de oviposição. Notavelmente, não foram observadas diferenças clínicas significativas em qualquer dose de DTNB usado em coelhos. No entanto, os carrapatos alimentados em coelhos que receberam dose de 145 mg.Kg⁻¹ de DTNB, apresentaram redução nas taxas de oviposição e na taxa de eclosão. Neste estudo foi estabelecido uma metodologia para avaliar as drogas contra ectoparasitas utilizando coelhos como hospedeiro. Este estudo mostrou que alguns membros desta classe de drogas podem ser utilizados, futuramente, para o desenvolvimento de novos acaricidas.

.

Palavras-chave: Controle de carrapatos, DTNB e 5,5'-Ditiobis-2-nitrobenzóico.

Abstract

Ticks are haematophagous ectoparasites associated with great economic losses and public health impacts. *Rhipicephalus sanguineus* species (Latreille,1986) (Acari: Ixodidae), also known as brown dog tick, have a triexenic life cycle in which larvae, nymphs and adults alternate feeding on different hosts and perform ecdysis in the environment, returning to a vertebrate. Due to its cosmopolitan distribution, distinct populations of *R. sanguineus* are expected to exist. However, they may behave differently according to host specificity and transmission of several pathogens. The present work analyzed the effects of 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) *in vivo* on rabbits (host) and *R. sanguineus* ticks. The potential therapeutic use of DTNB was evaluated *in vivo* and *in vitro*. Firstly, different DTNB doses were injected subcutaneously in healthy male rabbits. Clinical, enzymatic and histopathological analyses were performed before and after DTNB administration. Additionally, *R. sanguineus* were fed on rabbits. After feeding, these ticks were incubated at $27 \pm 1^{\circ}\text{C}$ in relative humidity (above 70%) and oviposition rate was determined. Remarkably, no clinical significant differences were observed in any DTNB dose used in rabbits. However, ticks fed on rabbits which received the dose of 145 mg.Kg^{-1} DTNB, presented reduced values (75%) of both oviposition and egg hatching. The aim of this study was to establish methodology to evaluate drugs against ectoparasites using rabbits as a host. These results show that some members of this class of drugs can be used to the development of new acaracides.

keywords: Tick control, DTNB and 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoic acid.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Carrapatos

Os carrapatos são artrópodes ectoparasitos hematófagos obrigatórios, subdivididos em duas principais famílias: Argasidae e Ixodidae (Sonenshine *et al.*, 2006). Até o momento foram descritas 866 espécies de carrapatos (Horak *et al.*, 2002). Devido a sua capacidade de infestar vertebrados terrestres, tais como: mamíferos, pássaros, répteis e até anfíbios, podem transmitir várias doenças aos seres humanos e aos animais. Curiosamente, nenhum outro artrópode conhecido tem a capacidade de ser vetor de tão ampla variedade de organismos patogênicos. Eles podem transmitir bactérias, vírus, fungos e protozoários, que resultam, frequentemente, em infecções letais, e podem ainda induzir algumas toxemias através de suas picadas aos hospedeiros (Sonenshine *et al.*, 2006).

Os Argasídeos (carrapatos moles) alimentam-se do sangue dos seus hospedeiros, repetidas vezes, abandonando-os após cada alimentação. As fêmeas efetuam várias posturas, alternando com a alimentação sanguínea. Cada postura não ultrapassa 150 ovos, um número pequeno quando comparado aos cerca de 3000 ovos dos Ixodídeos (carrapatos duros).

Nos Ixodídeos a alimentação é prolongada, ingerindo grandes quantidades de sangue, chegando a atingir 100 vezes a sua massa corporal inicial e o sangue é utilizado como única fonte de energia para o desenvolvimento destes carrapatos (Sonenshine *et al.*, 2006). Desta forma, sua nutrição está diretamente associada à conversão de ovos destes organismos. Estes carrapatos são encontrados em quase todas as regiões do mundo, com predominância em áreas tropicais e subtropicais, abrangendo regiões com produção de gado nas Américas, África, Ásia e Austrália (Johnston *et al.*, 1986) causando grande prejuízo na produção de carne, leite e couro. As parasitoses transmitidas por ixodídeos durante o repasto sanguíneo são consideradas cada vez mais um problema de saúde pública em ambientes rurais e urbanos. Isso se deve a sua vasta capacidade de infestar vários organismos e de transmitir vários patógenos através da saliva.

1.2 Biologia e ecologia do *Rhipicephalus sanguineus*

R. sanguineus, é um ixodídeo de ciclo trioxeno onde as larvas, ninfas e adultos vivem em hospedeiros distintos e realizam suas mudas no ambiente, voltando a um vertebrado para se alimentar (Guimarães *et al.*, 2011) (figura 1). Essa espécie é, provavelmente, a mais amplamente encontrada entre os ixodídeos no mundo (Silveira, 2008). Devido a esta distribuição cosmopolita, populações distintas de *R. sanguineus* são esperados em várias regiões de sua abrangência. Também, este parasito pode comportar-se diferentemente em relação à especificidade parasitária e na transmissão de agentes patogênicos, podendo infestar vários mamíferos, inclusive o homem (Loully, 2003).



Figura 1: . Ciclo de Vida do *Rhipicephalus sanguineus*: trioxenos, usa três hospedeiros diferentes em cada fase – larvas, ninfas e adultos , suas mudas ocorrem fora do hospedeiro.

Dentre as etiologias transmitidas aos vertebrados por *R. sanguineus*, as mais conhecidas na literatura são: *Babesia canis*, em cães; *Rhickettsia conori*, no homem (Maroli *et al.*, 1996) e *Ehrlichia canis* em homens e cães, sendo a erliquiose monocítica canina considerada a mais importante zoonose desde 1992 (Benenso, 1992). Além disso, o *R. sanguineus* é vetor da *Citauzzoon felis* em felinos (Hoskins, 1991) e da febre maculosa causada pela *Rickettsia rickettsii*, borreliose ou doença de Lyme, causada pela *Borrelia sp.*, *Hepatozoon* em cães (O'dwyer & Massard, 2001). O *R. sanguineus* é encontrado em alta prevalência em cães urbanos, sendo descrito na literatura como uma das principais espécies de parasitos de animais domésticos (PAZ *et al.*, 2008).

Há relatos de *R. sanguineus* em outras espécies de vertebrados da fauna silvestre brasileira como o lobo-guará (*Chrysdocyon brachurus*) e o cachorro do mato (*Cerdocyon thous*). Em várias regiões do mundo, esta espécie de carrapato tem sido encontrada parasitando uma grande variedade de mamíferos e até aves ratitas (Soulsby, 1966). Labruna (2004) considera que tanto a taxa de infestação quanto a intensidade desses ixodídeos vêm aumentando nas últimas décadas e que, atualmente, o *R. sanguineus*, juntamente com as pulgas, são os principais ectoparasitos de cães em todo Brasil. As estreitas relações estabelecidas entre os cães e o homem resultam em preocupações sobre o parasitismo em pessoas, que podem funcionar como hospedeiros secundários do ectoparasito. Além disso, infestações em hospedeiros secundários são consequências de um crescimento exagerado de *R. sanguineus* no ambiente, em áreas habitadas por cães. No Brasil, Louly (2003) registrou a ocorrência de parasitismo em seres humanos por *R. sanguineus* em funcionários do canil da Polícia Militar do município de Goiânia, no estado de Goiás, que mantinham estreita relação com os cães. Dantas-Torres *et al.* (2006) descreveram um caso de recidiva de parasitismo humano por esse ectoparasito no Recife, Pernambuco. Infestações de *R. sanguineus* em humanos foram notificadas em municípios brasileiros como Goiana (GO), Recife (PE), Pedreira (SP) e Cachoeira do Sul (RS) (Guglielmone *et al.*, 2006). Contudo, no Brasil esta espécie é raramente encontrada parasitando o homem e, quando ocorre, está relacionado com o contato estreito do homem ao cão (Labruna, 2004). Em outros países existem relatos de parasitismo humano por *R. sanguineus*. Dentre eles, podemos citar: Argentina (Guglielmone *et al.*, 1991); Estados Unidos (Clarck *et al.*, 1996; Felz *et al.*, 1996) e Itália (Maroli *et al.*, 1996; Manfredi *et al.*, 1999). Deve-se

salientar que não basta apenas a presença do vertebrado para que se estabeleça uma população de ectoparasitos. Esta dependerá, também, dos hábitos do hospedeiro no ecossistema, que devem ser favoráveis à sobrevivência e ao desenvolvimento das fases de vida livre (Labruna, 2004). *R. sanguineus* tem sido descrito freqüentemente associado à presença do hospedeiro cão (ARAGÃO,1936; RIBEIRO et al., 1997; LABRUNA & PEREIRA,2001; SZABÓ et al., 2001), estando adaptado a cães de domicílios em cidade. Contudo, esta espécie pode parasitar outros mamíferos, dentre eles o coelho.

1.3 Coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) na experimentação animal

O coelho doméstico é proveniente da Península Ibérica e do Norte da África e sua domesticação se deu na Idade Média em mosteiros franceses, dando origem a uma das mais importantes fontes de proteína animal para alimentação nos EUA e no continente Europeu. Sucessivas seleções genéticas levaram esta espécie a características desejáveis para experimentação animal, sendo um dos primeiros animais utilizados na investigação biomédica.

Em 1884, Pasteur demonstrou que os cães podiam ser protegidos contra o vírus da raiva, mediante a inoculação de suspensões da medula espinhal, dessecada, de coelhos infectados experimentalmente com este vírus (Couto *et al.*, 2006). Dentre os vários modelos de animais de laboratório utilizados para ensaios de toxicidade, as espécies devem ser escolhidas com base na similaridade às espécies mais próximas da espécie alvo, avaliando a biodisponibilidade e biotransformação da droga utilizada. Para tanto, o desenho do estudo, incluindo a seleção de espécies de ensaio, os níveis de dosagem, a via e frequência de administração, deve basear-se na farmacodinâmica, farmacocinética e informações toxicológicas, bem como a avaliação clínica. Apesar dos cães serem mais predispostos na hospedagem do *R. sanguineus* (Labruna, 2004), os coelhos são animais mais adequados e seguros de serem manipulados em laboratório.

A necessidade da manutenção de animais de médios e grandes portes em laboratório para o estudo da biologia e ensaio de fármacos torna-se mais difícil devido ao alto custo com insumos, necessidade de mão de obra e infra-estrutura adequadas, além da questão ética relacionada ao uso de animais em experimentações científicas. Assim, a alimentação de carrapatos usando o coelho

como hospedeiro oferece vantagens por serem animais dóceis, de fácil manipulação, além de oferecer baixo custo durante a experimentação (Figura 3). Pelas características supracitadas, coelhos têm sido uma excelente ferramenta tanto para ensaios de fármacos quanto para o desenvolvimento de colônias de *R. sanguineus*.

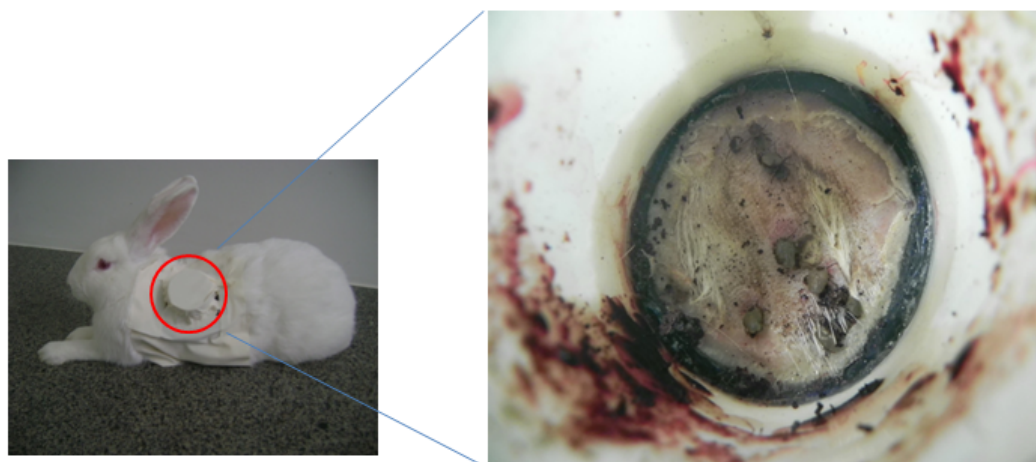


Figura 2. Esquema de alimentação Natural: um suporte hermético foi fixado na região do flanco do coelho (*O. cunicullus*) e 24 horas após a fixação foi realizada a infestação com carrapatos (*R. sanguineus*) (Machado, 2012).

Neste trabalho foram realizados estudos não clínicos de segurança para avaliar a toxicidade do DTNB - tanto para toxicidade de dose única (aguda) quanto para doses repetidas. Para tanto, este estudo foi conduzido de acordo com as normas vigentes de Boas Práticas de Laboratório (BPL) – OECD *principles of Good Laboratory practice; HANDBOOK : GOOD LABORATORY PRACTICE (GLP) / WHO (Quality practices for regulated non-clinical research and development)*-, utilizando animais machos, saudáveis, livres de patógenos (SPF- Specific Pathogen Free), com rastreio do “*status*” genético conhecido (matriz adquirida na cunicultura da UFV - Universidade Federal de Viçosa), com peso ($\pm 3,0$ kg) e idade (6 meses) adequados para experimentação.

Exames Clínicos (comportamental, temperatura, frequência cardíaca, consumo de ração e água - dados não mostrados), tomográficos, bioquímicos (ALT, AST, ALP, Uréia, Creatinina, Proteínas e Albuminas) e hematológicos (dados não apresentados), foram realizados antes, durante e após a experimentação. Após o

período de experimentação (6 meses), os animais foram anestesiados e posteriormente realizadas as eutanásias.

1.4 DTNB - Agente desestabilizante de proteínas com grupamentos tióis

O Ácido 5,5'-Ditiobis (2-nitrobenzoico) (DTNB) foi usado pela primeira vez para quantificar resíduos de cisteínas livres em grupamentos tióis de proteínas. Nesta reação, o DTNB reage equimolarmente com cisteínas de grupos sulfidris livres formando o ácido 2-nitro-1-benzóico (TNB) que tem coeficiente de absorvidade molar definido em 412 nm (figura 2).

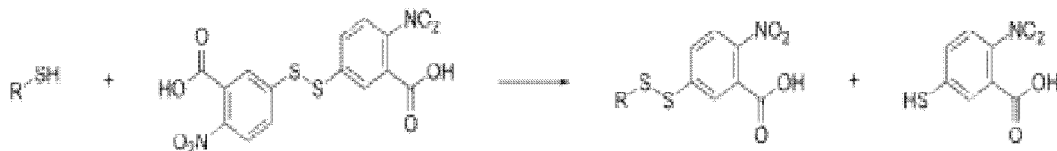


Figura 3. Representação esquemática da reação de Ellmans: Reação entre grupamento tiol e DTNB. Archives of Biochemistry and Biophysics. Volume 82, Issue 1, May 1959, Pages 70–77.

Uma vez ligada aos resíduos de cisteínas, o DTNB promove mudança estrutural irreversível em proteínas tióis, o que pode caracterizar perda de função em tais proteínas (Moraes *et al.*, 2011). Adicionalmente, o DTNB é conhecido como agente impermeável à membrana celular (Lara *et al.*, 2011), e seu papel funcional tem sido exaustivamente estudado em modelos de interação de fusão celular de parasitos como o vírus: HIV (Lara *et al.*, 2011; T Zankoe *et al.*, 2012), Rotavírus (Calderon *et al.*, 2012); bactérias: *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia psittaci* e *Chlamydia pneumoniae* (Conant *et al.*, 2007) e protozoários: *Leishmania chagasi* (Santos *et al.*, 2009). Nestes trabalhos, de forma unânime, é reportado que a proteína dissulfeto isomerase (PDI) desempenha um papel crítico na internalização desses patógenos pela célula hospedeira. Através da ação oxidativa do DTNB em proteínas tióis de superfície celular, o DTNB bloqueia a fusão celular entre o patógeno e a célula do hospedeiro. Assim, a inibição ocorre impedindo as reações

de intertrocas tiol-dissulfeto na superfície de proteínas da célula hospedeira e as proteínas extracelulares do patógeno (Ryser & Flückiger, 2005).

Na tentativa de controlar populações de carrapatos muitos fármacos já foram estabelecidos, tais como acaricidas a base de organofosfatos (Patarroyo & Costa 1980), piretróides sintéticos (Nolan *et al.*, 1989), amitraz (Soberanes *et al.*, 2002), ivermectina (Martins & Furlong, 2001) e fipronil (Castro-Janer *et al.*, 2010). Entretanto, o principal problema no controle deste parasita é a resistência aos acaricidas, uma característica preocupante que já está bem documentada na literatura (Ortiz *et al.*, 1995; Benavides *et al.*, 2000; Fernandes-Salas *et al.*, 2012). Desta forma, o controle da carga parasitária tornou-se essencial para a diminuição de importantes doenças emergentes transmitidas por esses vetores. Por estas razões, os esforços contínuos têm sido feitos a fim de desenvolver novos fármacos e/ou métodos mais seguros, eficazes e de fácil manipulação. O controle químico ainda é o mais utilizado e parece ser o mais eficiente até o presente momento; no entanto, a rotatividade de moléculas se faz necessária para evitar a resistência parasitária.

Esta foi a primeira vez que o DTNB foi testado “*in vivo*” em carrapatos *R. sanguineus* e em coelhos Nova Zelândia. Dados deste trabalho demonstram que pequenas concentrações do DTNB foi capaz de interferir negativamente na proliferação do carrapato *R. sanguineus*, diminuindo as taxas de oviposição e eclosão, tanto na alimentação artificial quanto na alimentação natural. Contudo, o mesmo protocolo não promoveu alterações teciduais significativas em coelhos tratados com DTNB, tanto em dose única (660mg/kg/dia), quanto em doses repetidas (330 mg/kg/dia), quando comparada aos animais do grupo controle.

2. OBJETIVOS:

2.1. Objetivo geral: Estabelecer metodologia para avaliação de fármacos contra ectoparasitas utilizando coelhos como hospedeiros.

2.2. Objetivos específicos

- ✓ Estabelecer colônias de *R. sanguineus* em laboratório;
- ✓ Estabelecer metodologia de administração de fármacos, por meio alimentação artificial (tubos capilares), na alimentação de *R. sanguineus*;
- ✓ Estabelecer metodologia de administração de fármacos acaricidas por meio da alimentação natural em coelhos;
- ✓ Avaliar “*status*” sanitário de coelhos Nova Zelândia, por meio de exames clínicos, antes, durante e após tratamento com DTNB;
- ✓ Avaliar lesões teciduais, por meio de exames histopatológicos, em coelhos tratados com DTNB;
- ✓ Avaliar a influência do DTNB na postura e eclosão de ovos em *R.sanguineus*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Manutenção da colônia de *Rhipicephalus sanguineus*

As colônias de *R.sanguineus* foram doadas pelo Dr. Itabajara da Silva Vaz Jr. da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Estas colônias foram formadas a partir de fêmeas teleóginas coletadas diretamente do corpo dos hospedeiros, e foram acondicionadas em estufa com temperatura de 27 ± 1 °C, e umidade relativa superior a 80% conforme sugerido por BELLATO & DAEMON, 1997. Estas fêmeas foram incubadas por três dias e observadas a postura de ovos, que ocorreu até o 10º dia.

Após a oviposição, estes ovos foram pesados e acondicionados em seringas descartáveis de 20 mL e fechados com tufo de algodão para permitir a entrada de oxigênio, mas também impedir a fuga de larvas após a eclosão. Estes tubos foram acondicionados em estufa com temperatura de 27 ± 1 C°, e umidade relativa superior a 80%. Após a eclosão dos ovos (em aproximadamente 15 dias), as larvas foram pesadas e foi verificada a taxa de eclosão. As larvas foram mantidas em estufa BOD e permaneceram por um período de 10 dias para pré-alimentação. Após o período de pré-alimentação as larvas foram colocadas em coelhos, distribuídas em potes herméticos colados na região do flanco do animal, onde permaneceram por 6 dias para alimentação. As larvas completamente ingurgitadas que se desprenderam do hospedeiro foram coletadas e monitoradas para observação da pré-ecdise (até o 6º dia após a alimentação) e a ecdise (até o 15º dia após alimentação). Após a ecdise as larvas deram origem às ninfas, que permaneceram em estufa por 15-25 dias para pré-alimentação e após este período foram novamente colocadas no coelho para a 2ª alimentação (durante 7 dias). Após a segunda alimentação, as ninfas foram colhidas e incubadas (durante 15 dias), fazendo a pré-ecdise. Após este período as ninfas fizeram a ecdises (durante 9 dias) e se transformaram em adultos. Após este tempo, estes adultos foram incubados por até 25 dias para pré-alimentação e foram novamente colocados no coelho para serem alimentados por 6 a 16 dias. Após a alimentação, as fêmeas ingurgitadas foram coletadas e acondicionadas em estufas por 3 dias para pré-postura. A postura dura até o 10º dia, completando o ciclo conforme desenho da figura 4.

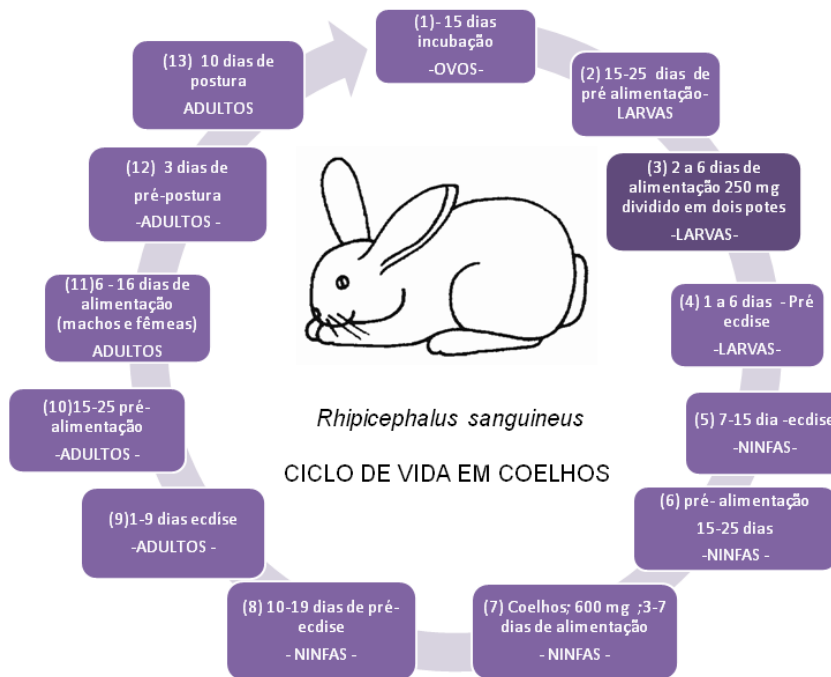


Figura 4. Ciclo do *R. sanguineus* mantido em coelhos em laboratório de experimentação animal. Eclosão dos ovos em aproximadamente 15 dias; 6 dias para alimentação; 15 dias ecdise das larvas; 15 dias pré alimentação; sete dias de alimentação em coelhos; 19 dias pré ecdise; 9 dias ecdise; 25 dias adultos; 3 dias de pré- postura e 10 dias de postura dos ovos (Machado,2012).

3.2 Manutenção de coelhos

Antes de estabelecer a colônia de coelhos no laboratório de experimentação animal, foram observadas as boas práticas de laboratório e os princípios éticos da experimentação animal. Para tanto vários esforços foram travados anteriormente, como: a instalação de equipamentos de biossegurança, instalação de equipamentos de barreiras sanitárias dentro do biotério de experimentação, seminário de manipulação animal e desenvolvimento de protocolos de manipulação animal (protocolo 171).

Após a observação dos critérios supracitados, o laboratório recebeu os animais de fontes confiáveis (Cunicultura UFV), com “*status genéticos*” conhecidos, “*status*” sanitários e idades próprias para experimentação.

Na chegada destes animais, estes ficaram em quarentena antes do início da experimentação. Cumprida esta etapa, estes animais foram examinados por médicos veterinários e foram submetidos a baterias de exames laboratoriais, como: exames hematológicos, bioquímicos e parasitológicos para avaliação do “*status*” sanitário. Após o período de experimentação, os animais foram anestesiados e submetidos à eutanásia para realização dos exames anatomopatológicos.

3.3 Avaliação Clínico laboratorial em coelhos

Diretrizes regulamentares para ensaios de fármacos geralmente sugerem a realização de exames clínicos e laboratoriais, como: análises hematológicas e bioquímicas e exames anatomopatológicos para avaliação em estudos de toxicidade crônica e subcrônicas (FAO/WHO, 1987). Para acompanhar o “*status*” sanitário dos animais, foi estabelecido um protocolo sistemático de exames clínicos (além da observação de comportamento, consumo de água e ração, frequência cardíaca e temperatura - dados não apresentados) e foram realizados exames, como: tomografia computadorizada, bioquímica clínica e exames histopatológicos.

As avaliações clínicas foram realizadas por um médico veterinário, que observou o comportamento, peso, temperatura, entre outros aspectos clínicos. Toda a anamnese foi colocada na ficha do animal, que recebeu uma identificação composta de letras e números. Após avaliação médico-veterinária, foram feitas as coletas de materiais biológicos e enviadas para o laboratório de análises clínicas do Hospital Veterinário da UENF, que forneceu laudos que foram avaliados pelo médico veterinário requisitante. Os laudos foram anexados às fichas de cada animal, junto com o parecer técnico. Após a experimentação, os animais foram anestesiados, submetidos à eutanásia e necropsia.

3.4 Avaliação de bioquímicas clínicas

Antes, durante e após o período de experimentação foram colhidos 5 mL de sangue dos coelhos por meio de venopunção da safena na região coxofemoral com agulha 25x0,7 mm acoplada em seringa de 5 mL estéril. Estas amostras foram transportadas, em caixa isotérmica, para o setor de patologia clínica da universidade (UENF) onde foram processadas. Foram acondicionados cerca de 3 mL de sangue

em tubo para bioquímica – sem anticoagulante, com gel separador, da marca BD® para análises de bioquímica do soro. Estas amostras foram centrifugadas a 1110 x G durante 5 minutos para separação da parte líquida (soro) dos elementos figurados do sangue. O sobrenadante foi separado para determinação de alanina amino transferase (ALT), aspartato amino transferase (AST), Fosfatase alcalina (ALP), uréia, creatinina, proteínas totais e albuminas. As mensurações bioquímicas foram realizadas em espectrofotômetro da marca Bioplus 2000®, com kits Labtest®, seguindo protocolo do fabricante do kit.

3.5 Análise Anatomopatológica

Após a eutanásia, as carcaças dos animais foram encaminhadas ao setor de Anatomia Patológica do Hospital Veterinário da UENF, onde foi realizada a necropsia dos animais. As amostras viscerais e de órgãos das necrópsias foram encaminhadas para o setor de patologia, acompanhadas de fichas de entrada com os dados dos animais, do projeto, e do veterinário solicitante, além do histórico clínico do animal. O material colhido foi fixado em formalina neutra tamponada a 10%, por, no mínimo 48 horas, a temperatura ambiente e, posteriormente, processado segundo técnicas histológicas de rotina. As amostras foram clivadas e acondicionadas em histossetes devidamente identificados, submetidos ao processamento automático para as etapas de desidratação em banhos de alcoóis, clarificação ou diafanização em banhos de xilol, embebição em parafina, inclusão de parafina, seguido da microtomia, coloração de hematoxilina e Eosina (HE) e montagem das lâminas. As lâminas foram avaliadas utilizando-se microscopia óptica, observando-se características morfológicas celulares e padrões teciduais.

3.6 Alimentação artificial “*in vitro*” de *R. sanguineus*

Entre os dias 6 e 16 de alimentação dos carrapatos adultos, foram coletadas, 30 fêmeas parcialmente ingurgitadas (partenógenas) para teste de DL-50. Estas fêmeas foram removidas, cuidadosamente, com auxílio de uma pinça, de maneira que não causasse injúrias à cápsula bucal do carrapato, o que prejudicaria sua alimentação (figura 5A). Estas fêmeas foram pesadas para posterior comparação de taxa de alimentação dentro do grupo.

Amostras de sangue foram colhidas em tubos Vacutainer® (BD Biosciences) com citrato de sódio a 0,105 M como anticoagulante, por venopunção da safena na região coxofemoral do coelho. O sangue coletado foi dividido de acordo com os grupos a serem alimentados. Um grupo controle foi alimentado com sangue total citratado sem o fármaco, outro grupo, foi alimentado com Tris 60 mM, pH 6,5 (diluyente do DTNB) e, por fim, a um grupo foi adicionado DTNB 20 mM pH 7,4. As alimentações foram realizadas por meio de tubos capilares para hematócrito (Invicta®) durante 12 horas, trocando os capilares a cada 2 horas (figura 5B). Após este período, os carrapatos foram novamente pesados para avaliar a taxa de alimentação para cada carrapato. Os carrapatos que atingiram próximo a 72 mg foram separados para o experimento.

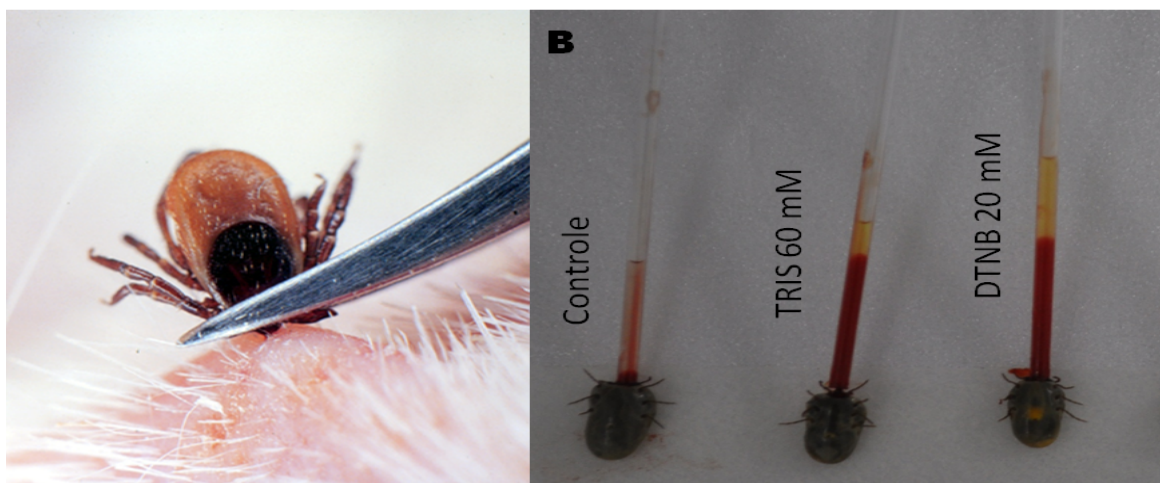


Figura 5. Alimentação artificial de *R. sanguineus* com sangue citrado de coelhos Nova Zelândia. Na figura A- esquema de coleta de partenógenas com pinças cirúrgicas. A coleta foi realizada cuidadosamente a fim de preservar a cápsula bucal do carrapato. Figura B - esquema de alimentação artificial por meio de tubos capilares com sangue de coelhos em carrapatos fixados em bandejas de isopor no período de 12 horas.

Completada a alimentação as fêmeas foram novamente acondicionadas em estufa BOD para observação, foi oviposição. Após a postura, os ovos foram pesados e avaliadas as taxas de oviposição e novamente incubados para observar a taxa de eclosão, verificando assim possíveis interferências do DTNB no ciclo do *R. sanguineus*.

3.7 Alimentação natural “*in vivo*” de *R. sanguineus*

Para alimentação natural dos carrapatos, foram utilizados coelhos Nova Zelândia machos, sadios com peso médio de 3 kg. Nestes coelhos foram colados suportes herméticos na região do flanco do coelho, fixados 12 horas antes de da infestação com *R. sanguineus* adultos, 30 fêmeas e 30 machos, foram colocados dentro dos potes para se alimentarem nos coelhos. Após a fixação dos carrapatos, foi injetado 10 mL de DTNB (100 mM) - 3 vezes de 12 em 12 horas (**figura 6**).

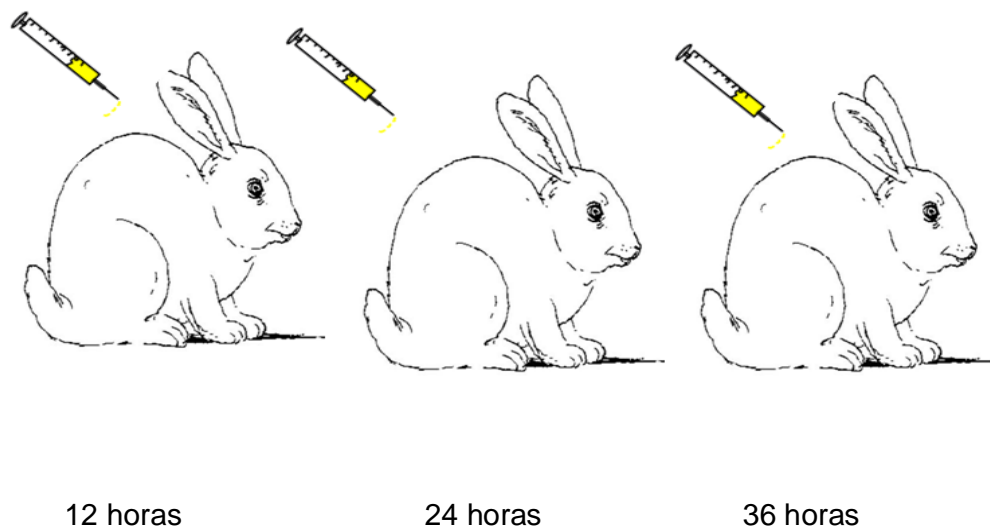


Figura 6. Protocolo de administração do fármaco após a fixação dos carrapatos. Foram aplicadas três injeções subcutâneas de DTNB a 100 mM no período de 12 horas entre uma injeção e outra.

As concentrações circulantes de DTNB e TNB foram paralelamente determinadas em nosso laboratório. A farmacocinética do DTNB foi monitorada em espectrofotômetro à 412nm, por meio do ensaio colorimétrico da reação da Glutathiona Reduzida (GSH) - 50 mM, pH 7,4 (figura 7)- com plasma sanguíneo dos coelhos tratados com DTNB, que foram coletados nos intervalos de 30 minutos, 60 minutos, 3 horas e 12 horas após injeção subcutânea do DTNB 100mM pH7,4.

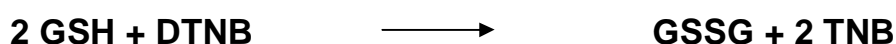


Figura 7. Reação química da GSH e o DTNB dando origem a moléculas de TNB. O DTNB oxida a molécula de GSH, formando duas moléculas de TNB, que é quantificada em espectrofotômetro a 412 nm. Na reação colorimétrica foi colocado GSH em excesso para reagir com DTNB. Através desta reação foi possível determinar na bancada as concentrações circulantes de TNB e DTNB no coelho.

Após a alimentação adultos de *R. sanguineus*, foram avaliados, sendo que as fêmeas teleóginas foram pesadas e colocadas em placas de cultura de células de 24 poços e acondicionadas em estufa com temperatura de 27 ± 1 °C, e umidade relativa superior a 80% nas mesmas condições estabelecidas por BELLATO & DAEMON, 1997 para manutenção de colônias de carrapato em laboratório. Foram avaliadas as taxas de postura e eclosão dos ovos.

3.8 Avaliação da taxa de oviposição e eclosão

Após a alimentação artificial, os carrapatos foram colocados em placas de culturas de células (24 poços), e acondicionados em estufas BOD $27\pm 1^{\circ}\text{C}$ com umidade relativa acima de 80% para oviposição. A cada dia de oviposição, os carrapatos foram mudados de poços, a fim de avaliar a performance diária de postura de ovos. Os ovos foram contados em lupa da marca Ziezz® com aumento de 10 vezes, usando papel milimetrado abaixo da placa para auxiliar a contagem dos ovos. Após a contagem os ovos, os poços das placas foram fechados com chumaços de algodão, para evitar a fuga de larvas, e foram novamente incubados, para observar a taxa de eclosão dos carrapatos.

Alimentação de *Rhipicephalus sanguineus*

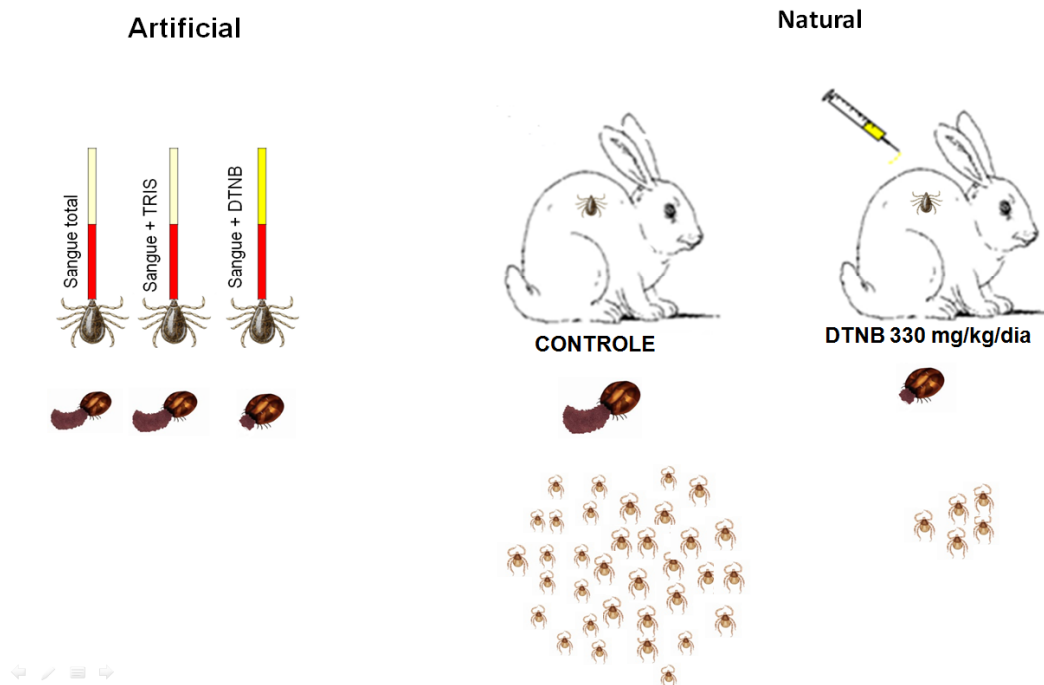


Figura 8. Desenho experimental dos ensaios de drogas em *R. sanguineus* alimentados artificialmente com sangue de coelhos e naturalmente em coelhos. No esquema observa-se as taxas de oviposição e eclosão.

4. Resultados

4.1 Curva de Concentração do DTNB livre em plasma de coelhos

Para conhecer a quantidade de DTNB livre no plasma sanguíneo, foi realizada uma curva de eficiência em várias concentrações: 2mM, 4 mM e 8mM.

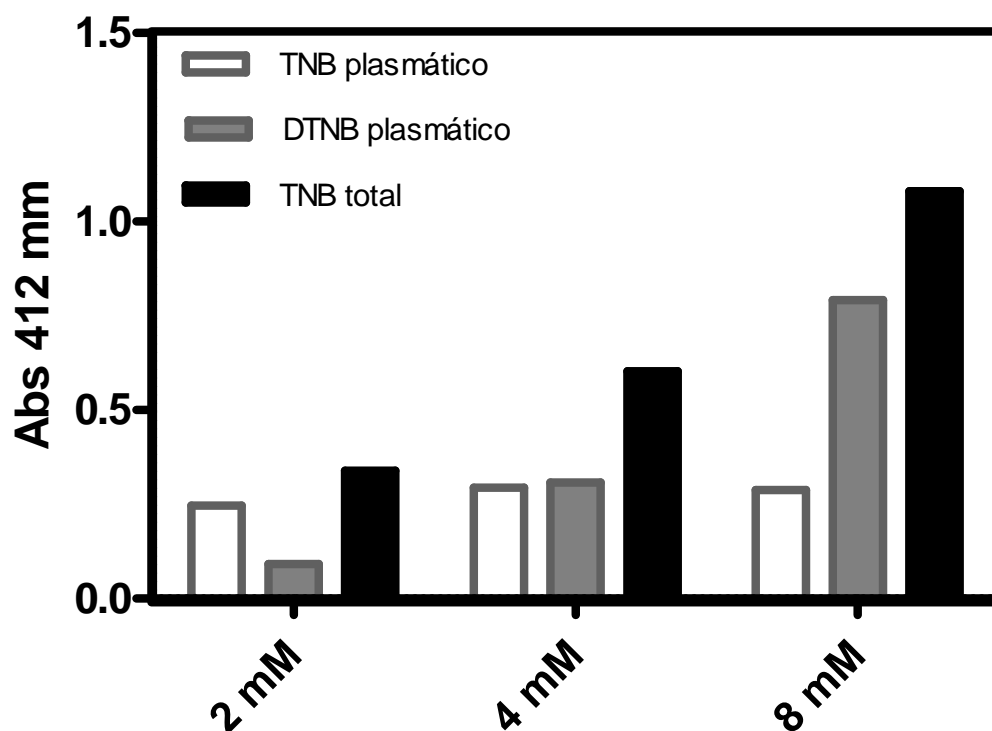


Figura 9. Curva de concentração do DTNB em plasma sanguíneo de coelho Nova Zelândia. Foram testadas várias concentrações de DTNB para determinar a quantidade ideal para alimentação de *R. sanguineus*. A reação com GSH 50 mM pH 3.2, aponta que, a partir de 4 mM a quantidade de DTNB é superior a quantidade TNB no plasma e que em 8mM a quantidade de DTNB livre é mais que o dobro da quantidade TNB.

Os resultados apontam grande quantidade de DTNB livre na concentração de 8 mM. A curva de eficiência serviu de base tanto para os ensaios de alimentação “*in vitro*” quanto para os ensaios de alimentação “*in vivo*”.

4.2 Farmacocinética em carrapatos *R.sanguineus*

Nas primeiras horas após a alimentação, foi possível observar a excreção de guanina pelo poro anal dos carrapatos, foi observado ainda mudança na coloração da guanina dos carrapatos tratados com DTNB (figura 8). Desta forma, foi avaliada a farmacocinética do DTNB e o sucesso da alimentação dos carrapatos.

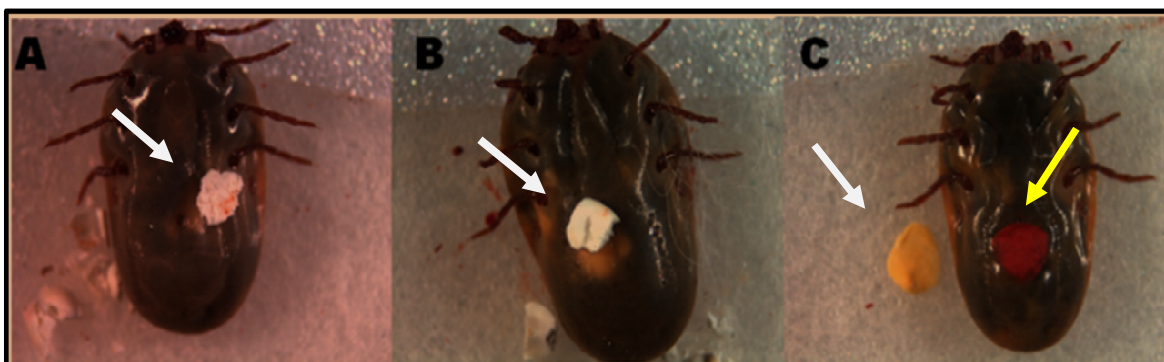


Figura 10. Fotografia da excreção de guanina do *R. sanguineus* - Farmacocinética de carrapatos alimentados artificialmente. Avaliação da coloração do produto de excreção após a alimentação artificial: A- carrapato alimentado com sangue total citratado; B – carrapato alimentado com sangue e TRIS 60 mM pH 6,5 e C- carrapato alimentado com DTNB 20 mM pH 7.4; durante 12 horas. As setas brancas indicam a coloração das guaninas, seta amarela região do poro anal.

Carrapatos alimentados por 12 horas com sangue citratado com DTNB com 20 Mm - pH 7,4 apresentavam coloração da guanina alaranjada, enquanto que carrapatos que foram alimentados apenas com sangue total e sangue com TRIS 60 mM - pH 7,0 o produto de excreção apresentava coloração branca.

Após a oviposição, os carrapatos foram colonizados por fungos *Metarhizium anisoplia* (Figura 10), os fungos que colonizaram os carrapatos que receberam DTNB adquiriram coloração alaranjada, indicando que ainda havia DTNB e/ou TNB na carcaça dos carrapatos, mesmo depois da postura dos ovos.

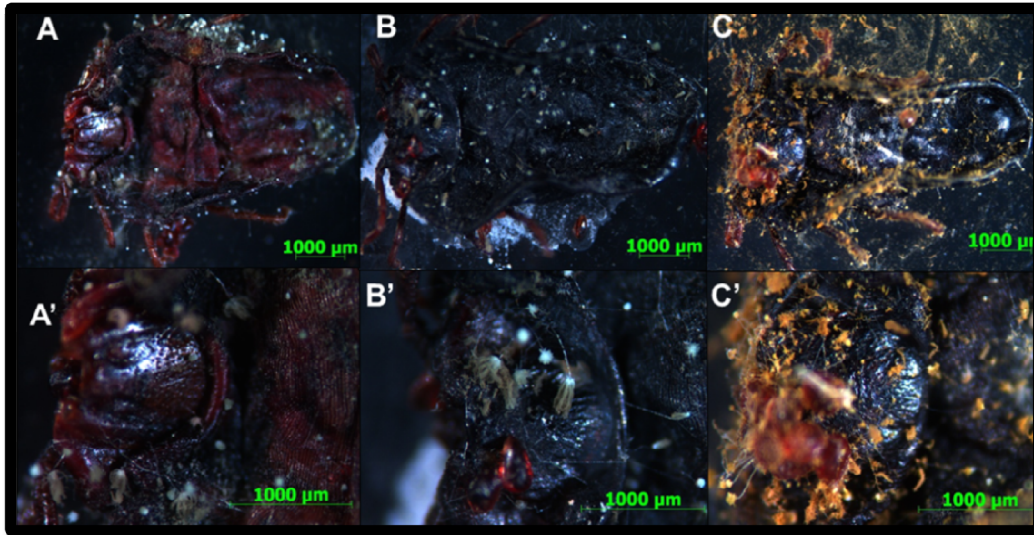


Figura 11. Fotografia de carrapatos colonizados por *Metarhizium anisopliae* em *R. sanguineus*, alimentados artificialmente por tubos capilares com sangue de coelho, após a oviposição. A. Controle: carrapatos que receberam apenas sangue; B. Controle TRIS: carrapatos que receberam sangue e TRIS 60mM; e C. Tratamento: carrapatos que receberam sangue e DTNB 20 mM. A', B' e C' ZOOM 5x em Lupas Ziezz aumento 10 vezes.

O Número de colônias não foi contabilizado, contudo, as mesmas características fenotípicas se repetiram na colonização de todos os carrapatos que foram tratados com DTNB, tanto para alimentação natural quanto para alimentação artificial. Adicionalmente, análise visual das colônias, a quantidade e morfologia das colônias permanecem inalteradas. Sugerindo biodegradação do fármaco sem afetar outros organismos.

4.3 Taxa de Oviposição de carrapatos alimentados Artificialmente

Foi avaliada a taxa de oviposição nos grupos de carrapatos alimentados artificialmente por 12 horas, com e sem tratamentos. Os resultados apontam diminuição significativa no grupo de carrapatos tratados com DTNB a 20 mM - pH 7,4. Contudo, não foi observada diferença estatística entre o grupo de carrapatos que receberam o TRIS 60 mM - pH 7,0 (diluyente do DTNB).

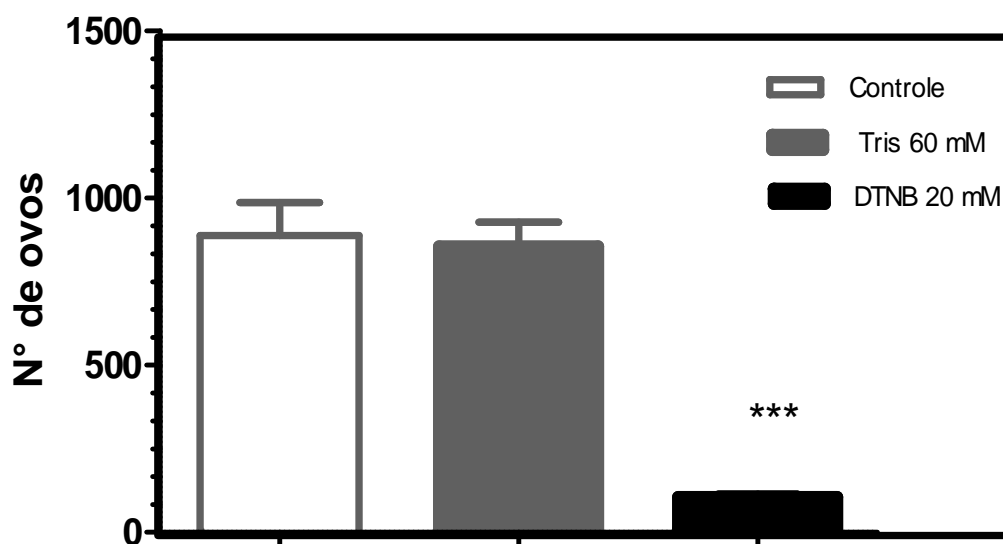


Figura 12. Taxa de oviposição de carrapatos alimentados artificialmente no período de 12 horas. O grupo de carrapatos que receberam o TRIS 60 mM não apresentou diferenças estatísticas (two way ANOVA $p > 0,05$), quando comparado ao controle. Contudo, foi observada diferença entre os controle e grupos tratados com DTNB 20 mM - pH 7,4; N° 30.

4.4 Avaliação da toxicidade de Dose única (aguda) em Coelhos.

A fim de avaliar a toxicidade do DTNB em coelhos Nova Zelândia, duas concentrações abaixo da sugestão da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que preconiza no máximo 1000 mg/kg/dia para roedores e não roedores, foi estabelecida a partir de testes em ratos: 330 mg/kg/dia e 660 mg/kg/dia. Após a administração do DTNB nos coelhos foram avaliadas: mortalidade, sinais clínicos, consumo de ração e água durante 14 dias. Os parâmetros supracitados permaneceram inalterados durante o estudo de dose única.

Cinco minutos após a administração subcutânea do DTNB, na região do flanco do coelho, as extremidades auriculares e conjuntivas oculares dos coelhos adquiriram coloração amarelada, indicando uma rápida perfusão tecidual (figura 12). Após 12 horas da aplicação, a droga foi excretada na urina e as conjuntivas oculares e voltaram à coloração normal.

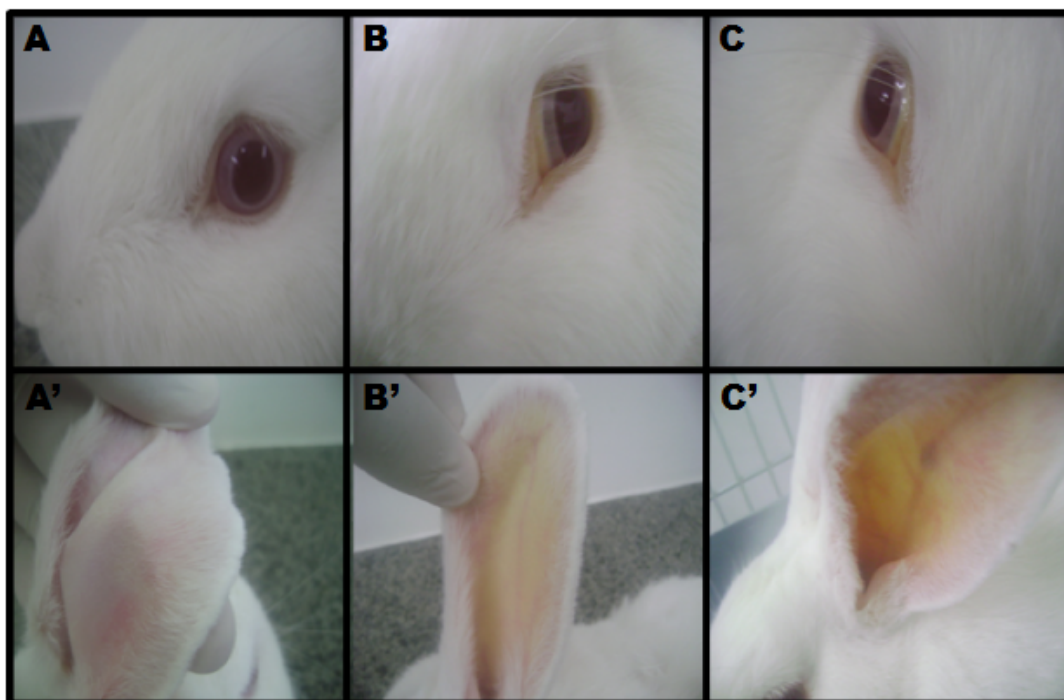


Figura 13. Teste de toxicidade de dose única em coelhos Nova Zelândia. Duas diferentes concentrações foram aplicadas subcutaneamente: **A e A'**-controle; **B e B'** - 330 mg/kg/dia; **C e C'**- 660mg/kg/dia. Após 12 horas os coelhos tratados eliminaram o DTNB pela via urinária e os coelhos voltaram à coloração normal.

4.4 Avaliação da toxicidade de Doses repetidas em Coelhos.

Para avaliar a o perfil de toxicidade de doses repetidas, foi utilizada a menor dose testada no estudo da toxicidade de dose única (330 mg/kg/dia). Para tanto, administrado três injeções subcutâneas em intervalo de 12 horas. Após a terceira dose, foi observada a farmacodinâmica e farmacocinética plasmática do coelho, por meio da reação colorimétrica da GSH 50 mM- pH 3,5. A biodisponibilidade e a biotransformação do DTNB foram observadas espectrofotometricamente a 412 nm, nos períodos de 0, 30 minutos, 60 minutos, três horas e 12 horas (figura 13).

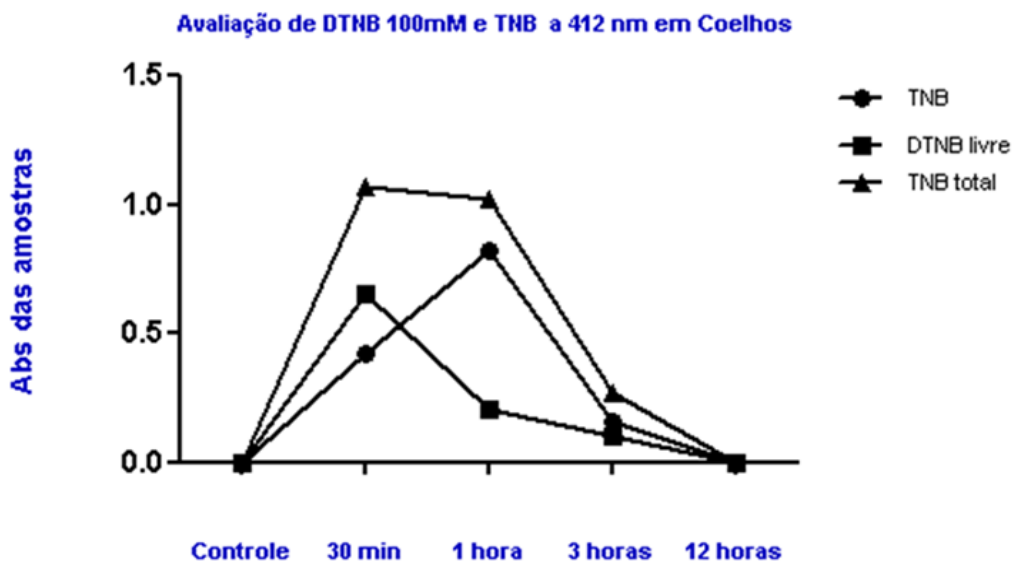


Figura 14. Farmacocinética do DTNB na circulação sanguínea de coelhos. Foram avaliados diferentes momentos: 0(controle)- antes da injeção; 30 minutos: observa-se maior quantidade de DTNB livre circulante; 1 h: observa-se a principal biotransformação do DTNB em TNB e início da eliminação; 3h: grande parte da droga já foi excretada; 12 h após a injeção não foi identificado nenhum resquício nem de DTNB e TNB na circulação sanguínea.

4.5 Avaliação da bioquímica Clínica

Para avaliar a sanidade dos animais neste experimento, foram realizados os seguintes testes bioquímicos: uréia, creatinina, proteínas totais, albumina, Aspartatoamino transferase (AST), Alaninaamino transferase (ALT) e Fosfatase Alcalina (ALP), dos grupos tratados e não tratados com DTNB. Os animais foram testados durante 90 dias e os resultados foram analisados antes, durante e após os tratamentos.

Fonte de Variação	GL	Uréia (u/L)		Creatinina (mg/dL)		Proteína (g/dL)		Albumina (g/dL)	
		QM	F	QM	F	QM	F	QM	F
Tratamentos (T)	2	68,69	3,36*	0,03	0,55 ^{ns}	0,2	0,50	0,1	0,73
						8	^{ns}	4	^{ns}
Período (P)	2	11,36	0,56 ^{ns}	0,13	2,43 ^{ns}	2,6	4,68*	0,7	3,94*
						2	*	4	
Bloco	4	3,07	0,15 ^{ns}	0,14	2,60 ^{ns}	1,5	2,79	0,1	0,64
						5	^{ns}	2	^{ns}
Interação (TxP)	3	3,61	0,18 ^{ns}	0,07	1,23 ^{ns}	0,5	1,06	0,0	0,15
						9	^{ns}	3	^{ns}
Resíduo	24	20,28	-	0,05	-	0,5	-	0,1	-
						6		9	
		CV(%): 13,49		15,86		12,04		10,52	

Tabela 1. Análise da variância conjunta para os parâmetros séricos de uréia, creatina, proteína total e albumina, avaliados nos períodos 0,1 e 90 dias após a aplicação subcutânea de DTNB em coelhos.* Teste F significativo ($P \leq 0,01$), ** significativo ($P \leq 0,05$) e ns- não significativo ($n=12$, $N=32$).

Fonte de Variação	GL	AST (u/L)		ALT (u/L)		ALP (u/L)	
		QM	F	QM	F	QM	F
Tratamentos (T)	2	1277,03	2,12 ns	1147,00	1,60 ^{ns}	3620,08	11,88**
Período (P)	2	515,86	0,86 ns	60,75	0,08 ^{ns}	9607,00	31,52**
Bloco	4	1930,55	3,21*	3972,25	5,53**	4161,56	13,65**
Interação (TxP)	3	304,28	0,51 ns	82,00	0,11 ^{ns}	829,21	2,72 ^{ns}
Resíduo	24	601,88	-	717,60	-	304,76	-
	CV(%)	58,68		41,91		15,22	

Tabela 2. Análise da variância conjunta para os parâmetros séricos de AST, ALT E ALP, avaliados nos períodos 0, 1 e 90 dias após a aplicação subcutânea de DTNB em coelhos. * Teste F significativo ($P \leq 0,01$), ** significativo ($P \leq 0,05$) e ns- não significativo (n=12, N=32).

Os resultados em conjunto dos parâmetros séricos, não apresentaram mudanças significativas em relação ao tempo e aos tratamentos, exceto na fosfatase alcalina (ALP).

4.5.1 Uréia

Em mamíferos, a uréia é sintetizada no fígado a partir do grupo amina liberado pelos aminoácidos durante o catabolismo das proteínas. Grande parte da uréia é excretada através da urina, sendo por isso utilizada como indicador do funcionamento renal.

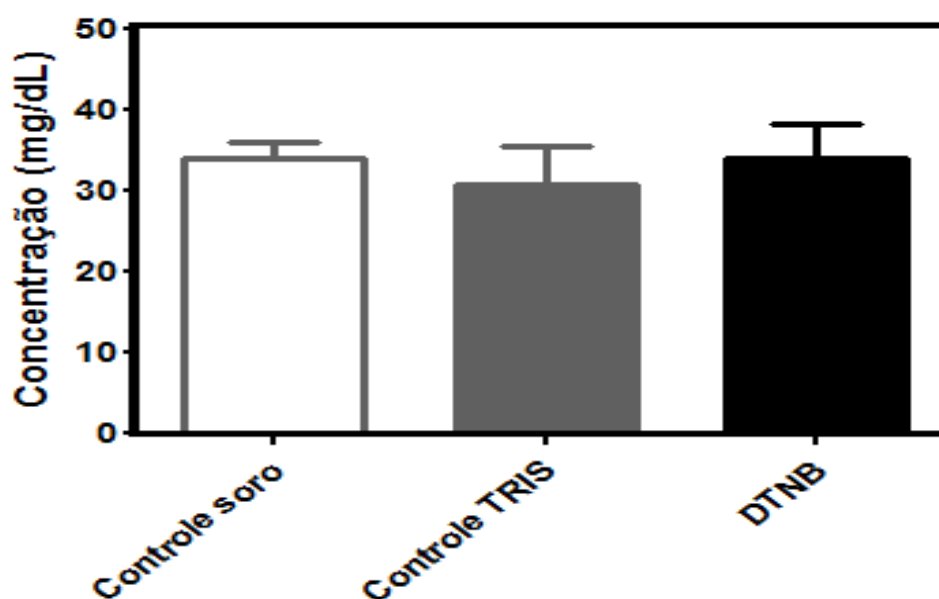


Figura 15. Concentrações de uréia sérica (médias \pm desvio padrão) avaliadas nos períodos 0,1 e 90 dias após a aplicação subcutânea de DTNB em coelhos.

Os resultados demonstram que as concentrações de uréia plasmática de coelhos tratados com TRIS 300mM e DTNB 100mM pH 7,4 não apresentaram alterações nos períodos 0, 24 h e 3 meses.

4.5.2 Creatinina

A creatinina é o produto do catabolismo da creatina, sendo a principal fonte de fosfato para a ressíntese de ATP (creatina fosfato) no tecido muscular. A excreção da creatinina ocorre via renal, refletindo a taxa de filtração e, conseqüentemente, o desempenho funcional deste órgão.

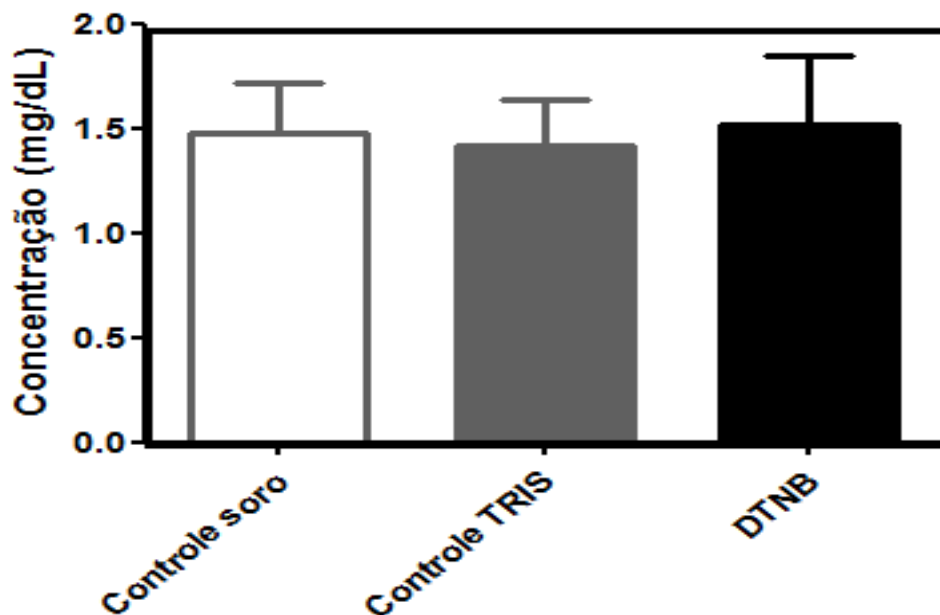


Figura 16. Concentrações de creatinina sérica (médias \pm desvio padrão) avaliadas nos períodos 0,1 e 90 dias após a aplicação subcutânea de DTNB em coelhos.* Médias com letras minúsculas na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si, segundo o Teste de Tukey ($P \leq 0,05$, DMS= 0,24; GL= 24).

Os resultados demonstram que as concentrações de creatinina plasmática de coelhos tratados com TRIS 300 mM e DTNB 100 mM pH 7,4, não apresentaram alterações nos períodos 0, 24 h e 3 meses.

4.5.3 Proteínas Totais

As proteínas estão aumentadas em algumas neoplasias, especialmente em mieloma múltiplo; na macroglobulinemia; doenças autoimunes, como artrite reumatóide; doenças granulomatosas como a sarcoidose, leishmaniose visceral; endocardite bacteriana sub-aguda e linfogranuloma; em alguns casos de doença hepática crônica, como hepatite autoimune e na desidratação.

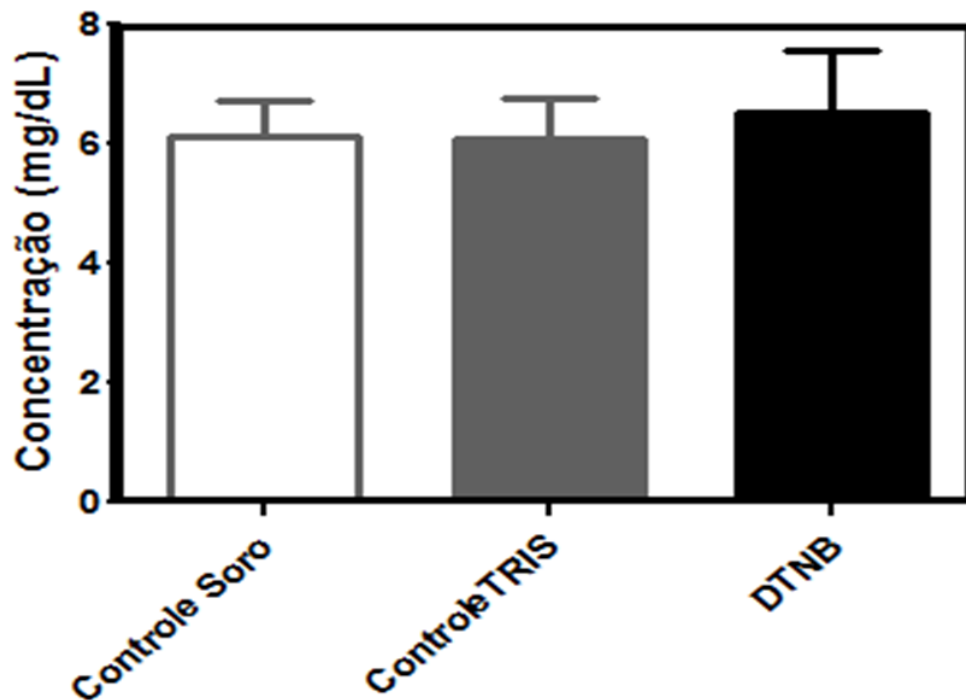


Figura 17. Concentrações de Proteínas totais (médias \pm desvio padrão) avaliadas nos períodos 0,1 e 90 dias após a aplicação subcutânea de DTNB em coelhos.* Médias com letras minúsculas na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si, segundo o Teste de Tukey ($P \leq 0,05$, DMS= 0,76; GL= 24).

Os resultados demonstram que as concentrações de proteína plasmática de coelhos tratados com TRIS 300 mM e DTNB 100 mM pH 7,4 apresentaram alterações entre os tratamentos nos períodos 0, 24 horas e 3 meses.

4.5.4 Albuminas

A albumina é a proteína mais importante do plasma para mamíferos. Os níveis plasmáticos de albumina, devido à sua relação com o aporte de proteína e à produção no fígado, são frequentemente usados como parâmetro para avaliação do estado nutricional e função hepática. Diminuições da albumina ocorrem na cirrose e outras doenças hepáticas, incluindo o alcoolismo crônico; na gravidez e associado ao uso de contraceptivos orais; em muitas doenças crônicas, incluindo as neoplasias, síndrome nefrótica, enteropatias com perda protéica (doença de Crohn, colite ulcerativa), doenças inflamatórias, como as doenças autoimunes, imobilização prolongada, falência cardíaca e outros estados catabólicos crônicos. Elevação da albumina sérica é encontrada somente na desidratação.

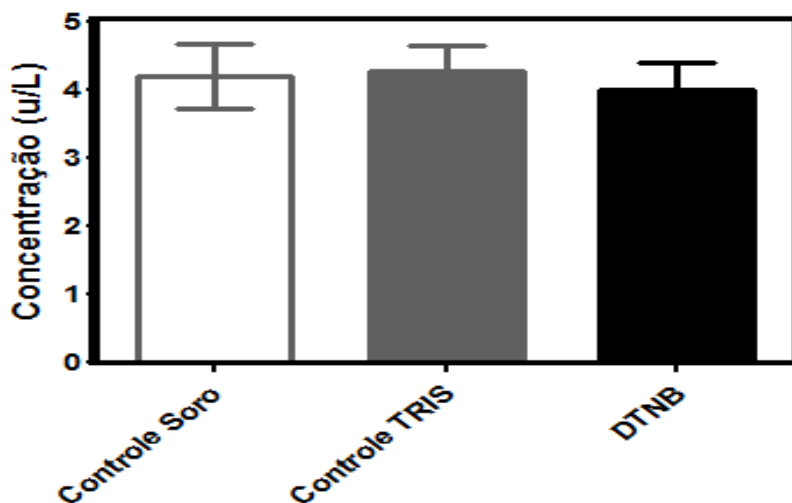


Figura 18. Concentrações de Albumina sérica (médias \pm desvio padrão) avaliadas nos períodos 0,1 e 90 dias após a aplicação subcutânea de DTNB em coelhos * Médias com letras minúsculas na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si, segundo o Teste de Tukey ($P \leq 0,05$, DMS= 0,44; GL= 24).

Os resultados demonstram que as concentrações de proteína plasmática de coelhos tratados com TRIS 300 mM e DTNB 100 mM pH 7,4 apresentaram alterações entre os tratamentos nos períodos 0, 24 h e 3 meses.

4.5.5 Aspartato Amino Transferase (AST)

A AST ou transaminase glutâmico-oxalacética (GOT/TGO) é uma enzima encontrada em concentração muito alta em músculo cardíaco, músculo esquelético no fígado e em menor concentração nos rins e pâncreas. Nos hepatócitos a AST está localizada no citoplasma (40%) e na mitocôndria (60%). Qualquer lesão tissular ou doenças que afetam o parênquima hepático liberará uma maior quantidade da enzima para corrente sanguínea, elevando o nível da AST sérica. Sempre que houver uma injúria hepatocelular de qualquer etiologia, haverá uma grande liberação da enzima AST para a corrente sanguínea.

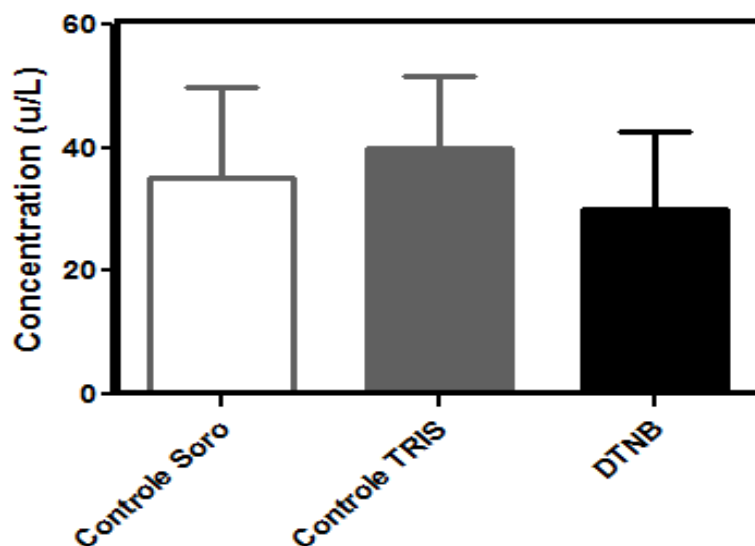


Figura 19. Concentrações de AST sérica (médias \pm desvio padrão) avaliadas nos períodos 0,1 e 90 dias após a aplicação subcutânea de DTNB em coelhos.* Médias com letras minúsculas na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si, segundo o Teste de Tukey ($P \leq 0,05$, DMS= 24,99; GL= 24).

Os resultados demonstram que as concentrações de AST de coelhos tratados com TRIS 300 mM e DTNB 100 mM pH 7,4 não apresentaram alterações entre os tratamentos nos períodos 0, 24 horas e 3 meses.

4.5.6 Alanina Amino Transferase (ALT)

A ALT ou transaminase glutâmico-pirúvica (GTP/TGP) pertence a um grupo de enzimas que catalisa a conversão de aminoácido e oxi-ácido através da transferência de grupos amina, esta enzima é encontrada predominantemente no fígado em concentração moderada nos rins e em menor quantidade no coração e nos músculos esqueléticos. Nos hepatócitos 90% ALT está localizada no citoplasma e 10% nas mitocôndrias. Qualquer injúria tissular ou doença que afeta o parênquima hepático, mesmo que modesto, liberará grande parte de ALT para circulação sanguínea.

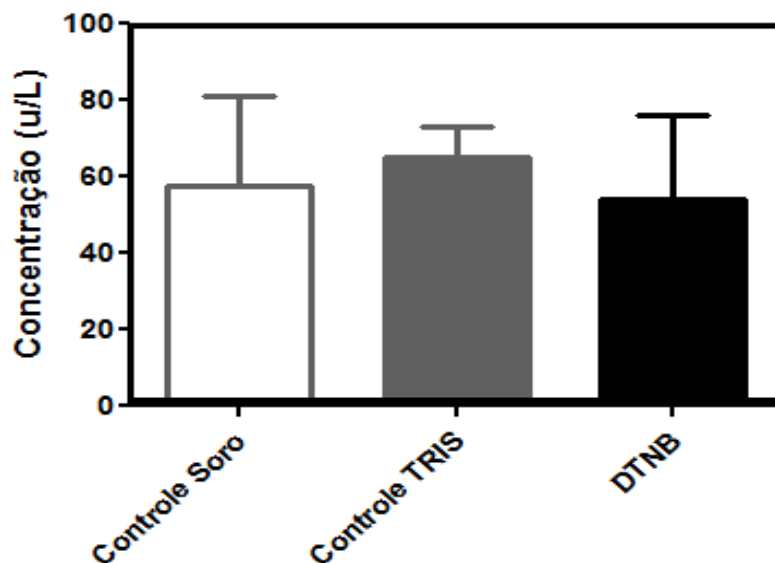


Figura 20. Concentrações de ALT sérica (médias \pm desvio padrão) avaliadas nos períodos 0,1 e 90 dias após a aplicação subcutânea de DTNB em coelhos * Médias com letras minúsculas na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si, segundo o Teste de Tukey ($P \leq 0,05$, DMS= 27,29; GL= 24).

Os resultados demonstram que as concentrações de AST de coelhos tratados com TRIS 300 mM e DTNB 100 mM pH 7,4 não apresentaram alterações entre os tratamentos nos períodos 0, 24 h e 3 meses.

4.5.7 Fosfatase Alcalina (ALP)

A ALP ou fosfatase alcalina (FAL) Fosfoidrolase monosséster ortofosfórica (IUB), compreende um grupo de enzima fosfohidrolase que apresentam atividades máximas em pH alcalino em torno de 10. Esta enzima é encontrada em vários tecidos, com maior concentração no fígado, no epitélio do trato biliar e no osso. A mucosa intestinal e a placenta contêm também a fosfatase alcalina. Os coelhos são os únicos a apresentar três isoenzimas ALP (TRALL et al., 2006).

No fígado, a ALP é secretada pelos hepatócitos (célula de Kupfer) e pelas células da mucosa do trato biliar. Geralmente, qualquer hepatopatia ativa pode aumentar os valores da ALP, mas as maiores elevações nos níveis da enzima ocorrem nos casos de obstrução do trato biliar. Desse modo, a ALP estará muito aumentada nas obstruções biliares intra ou extra-hepáticas assim como nas cirroses. Esta enzima está ainda envolvida na transferência de íons através da membrana celular. Seu aumento pode ser consequente de vazamentos por dano celular e de aumento da atividade celular.

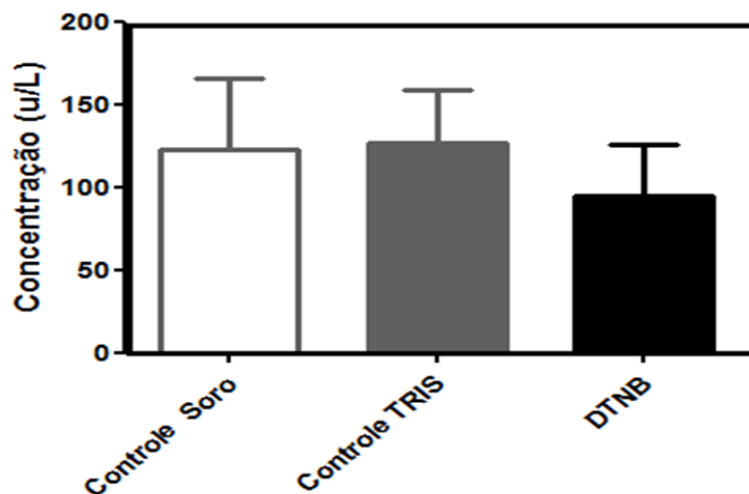


Figura 21. Concentrações de ALP sérica (médias \pm desvio padrão) avaliadas nos períodos 0,1 e 90 dias após a aplicação subcutânea de DTNB em coelhos.* Médias com letras minúsculas na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si, segundo o Teste de Tukey ($P \leq 0,05$, DMS= 17,79; GL= 24).

Os resultados demonstram que as concentrações de ALP de coelhos tratados com TRIS 300 mM e DTNB 100 mM pH 7,4 não apresentaram alterações entre os tratamentos nos períodos 0, 24 h e 3 meses.

4.6 Análise Anatomopatológica

As análises anatomopatológicas foram realizadas no setor de Anatomia Patológica do Hospital Veterinário da UENF, onde foi realizada a necropsia dos animais, as amostras das vísceras e de órgãos das necropsias foram encaminhadas ao setor de patologia para a realização das análises histotécnicas. Foram eleitos os seguintes órgãos: Pulmão, cérebro, Coração, Fígado e Rim. Os resultados da histologia, revelaram que coelhos tratados com DTNB 100 mM- pH 7,4 no período de três meses, não apresentaram diferenças nos padrões de teciduais após o tratamento.

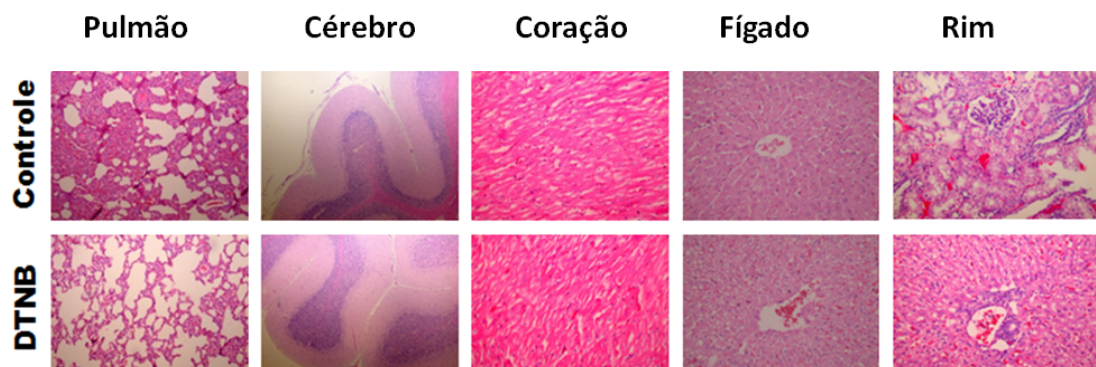


Figura 22. Fotografias de lâminas coradas pelo método Hematoxilina e Eosina (H.E.), com aumento de 400x. Os padrões histológicos de: pulmão, cérebro, coração, fígado e rim de coelhos do grupo tratado com DTNB (100mM- pH 7,4), revelaram que não houve injúrias teciduais proeminentes, quando comparado com coelhos do grupo controle.

4.7 Taxa de oviposição de *R. sanguineus* natural em coelhos

Após os carrapatos fixarem no coelho foi aplicado 10 mL de DTNB 100 mM – pH 7,4 e os carrapatos foram coletados pós-queda, quando os carrapatos atingiram total ingurgitamento (teleógenas). Os resultados mostram significativa redução no número de ovos de carrapatos tratados com DTNB.

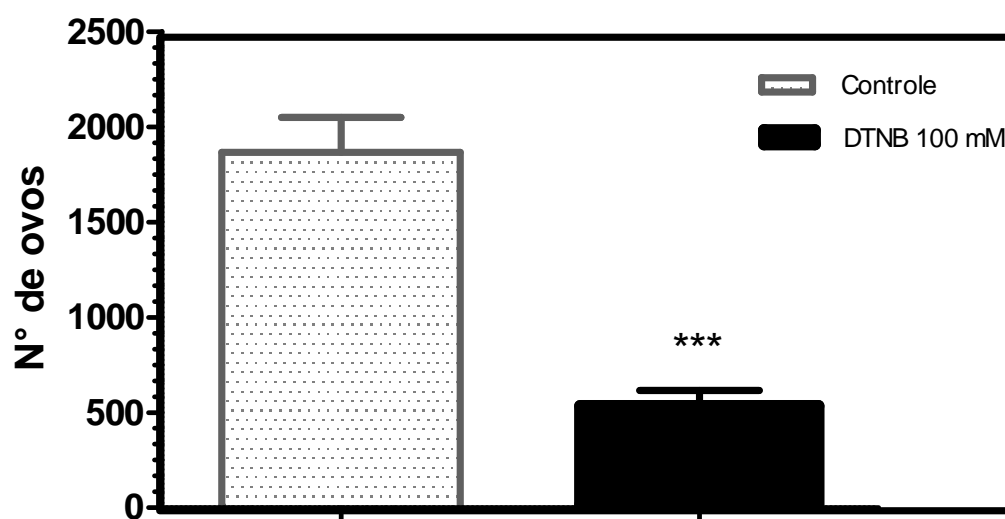


Figura 23. Redução do número total de ovos de *R.sanguineus* alimentados em coelhos Nova Zelândia tratados com DTNB. Durante a alimentação, três doses 10 mL do DTNB 100 mM- pH 7,4 foi administrado em intervalo 12 h.

4.8 Taxa de eclosão de *R. sanguineus* alimentados naturalmente em Coelhos Nova Zelândia

Após o período de oviposição, os ovos de *R.sanguineus* foram incubados em estufa BOD - $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ com umidade relativa acima de 80% - por 15 dias, após este período, foi avaliada a taxa de eclosão dos ovos. Os resultados em porcentagem mostram que houve uma diminuição de 75% na taxa de eclosão em carrapatos tratados com DTNB.

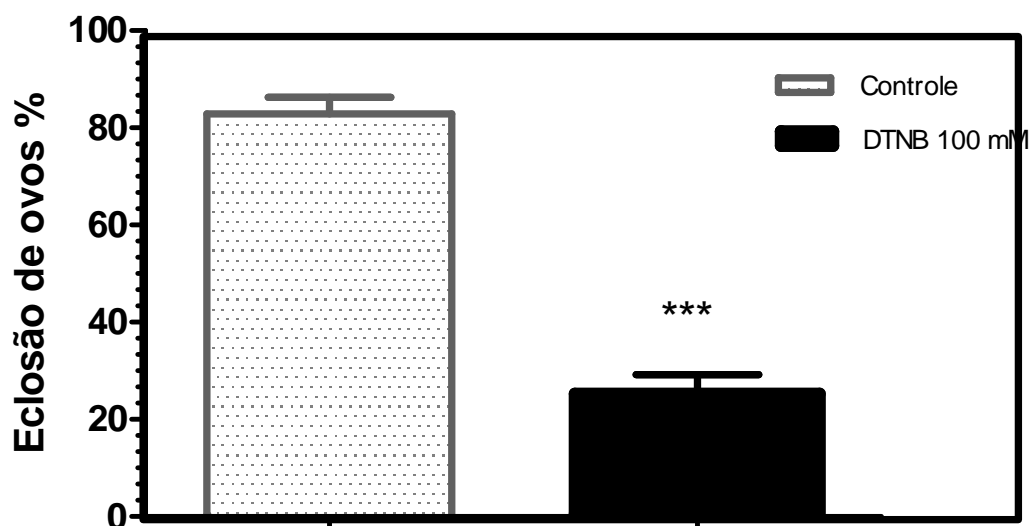


Figura 24. Taxa de eclosão de ovos de *R.sanguineus* alimentados naturalmente em coelhos Nova Zelândia, tratados com DTNB. Houve uma diminuição de 75% na taxa de eclosão de ovos totais.

5. Discussão

O controle de carrapatos tem se tornado uma tarefa laboriosa para as indústrias farmacêuticas e grupos que estudam controle de pragas. Tal dificuldade se justifica devido às mudanças evolutivas destes organismos, o que não raramente lhes confere resistências a múltiplas drogas. Para tanto, diversas moléculas sintéticas têm sido isoladas na tentativa de controlar populações de carrapatos. Neste sentido, vários esforços têm sido estabelecidos tais como: controles biológicos, desenvolvimentos de vacinas e descobertas de novas moléculas químicas (Patarroyo & Costa 1980; Nolan *et al.*, 1989; Soberanes *et al.*, 2002; Martins & Furlong, 2001; Castro-Janeret *et al.*, 2010).

Dentre as estratégias de controles de carrapatos, o que tem apresentado ser a mais promissora é o controle químico. Contudo, devido às altas taxas de resistências destes organismos a estes fármacos, faz-se necessária a rotatividade e descobertas de novas moléculas, a fim de que consiga eficiência na diminuição das populações deste parasito (Soberanes *et al.*, 2002). Com este propósito, o DTNB foi testado, pela primeira vez “in vivo”, em carrapatos *R. sanguineus* e em coelhos Nova Zelândia (hospedeiro). O DTNB é um agente derivatizante de grupamentos tióis, para quantificar resíduos de cisteínas livres em proteínas tióis. Nesta reação, o DTNB reage equimolarmente com cisteínas com grupos sulfidrilas livres formando o ácido 2-nitro-1-benzoico (TNB) que tem coeficiente de extinção molar definido em 412 nm (Aitken *et al.*, 2009). Trabalho de nosso grupo mostrou que o DTNB foi capaz de inibir a atividade enzimática da triose Fosfato Isomerase (TIM), uma proteína crítica na via glicolítica (Moraes *et al.*, 2011). Inicialmente foi realizada uma curva de concentração para avaliar a biotransformação do DTNB no sangue de coelhos (figura 8). Concentrações de 2 mM, 4 mM e 8 mM foram medidos espectrofotometricamente, com comprimento de onda à 412 nm, na presença GSH. Os resultados mostram que a concentração de 8 mM apresenta mais que o dobro de DTNB livre no plasma do sangue do coelho. Estes dados são importantes tanto para a alimentação artificial quanto a alimentação natural de *R. sanguineus*, pois desta forma é possível estimar a quantidade de DTNB e TNB livres administrados nos momentos das alimentações.

Em animais ovíparos, como carrapatos, o sucesso da ovogênese depende da taxa de alimentação. Desta forma, vários trabalhos associam o sucesso da alimentação à conversão de ovos (Davey *et al.*, 1980; Costa *et al.*, 1982; Benavides *et al.*, 1984). Dentro deste contexto, Cunha *et al.* (2006) ao alimentarem artificialmente fêmeas parcialmente ingurgitadas de *R. sanguineus*, usando tubos capilares, determinaram que o ganho de peso estava relacionado com o período de alimentação. A alimentação por meio de tubos capilares tem se mostrado uma excelente ferramenta para alimentação de *R. sanguineus*, quando comparado a outros métodos de alimentação artificial. Para tanto, foi testada a concentração 20 mM pH 7,4 de DTNB, por meio da alimentação artificial usando microtubos capilares. Observou-se inicialmente que carrapatos que se alimentaram em período de 24 horas não sobreviveram durante o período de pré-postura (dados não apresentados). Contudo, carrapatos que receberam o DTNB por 12 horas, a excreção de guanina (produto nitrogenado da degradação protéica) apresentava coloração alaranjada, enquanto que nos grupos de carrapatos controle e alimentados com sangue adicionado de TRIS 60 mM a guanina manteve esbranquiçada normal (figura 9). Esta mudança de coloração pode indicar que durante a alimentação do carrapato, a droga passa pelo trato digestivo e é biotransformada em TNB, antes de ser excretada no poro anal do carrapato. Adicionalmente, observou-se que o grupo de carrapatos tratados com DTNB, após o período de postura de ovos, teve suas carcaças colonizadas por fungos, e o aspecto destes apresentou coloração alaranjada, tais como a excreção de guanina. Curiosamente, os fungos que colonizaram as carcaças dos carrapatos dos outros grupos (controle e TRIS) mantiveram aspectos esbranquiçados. Assim, a coloração destes fungos pode indicar a presença do DTNB e/ou TNB nas carcaças dos carrapatos tratados, mesmo após a sua morte (figura 10). Contudo, parece que DTNB não afeta as colônias que decompõe os carrapatos, pois não foi observada diminuição das colônias em nenhum dos tratamentos. A mudança de coloração, tanto da guanina quanto das colônias de fungos, pode ter sido pela reação do DTNB com proteínas tióis, promovendo a formação do TNB, que apresenta coloração mais intensa quando comparado à molécula de DTNB.

A taxa de oviposição em carrapatos alimentados artificialmente por meio de tubos capilares com DTNB 20 mM- pH 7,4 -apresentou diminuição expressiva no número de ovos por fêmeas, enquanto que carrapatos tratados com TRIS 60 mM

(diluente do DTNB), não houve diminuição na taxa de oviposição (figura 11). O mesmo evento foi observado em carrapatos alimentados naturalmente em coelhos Nova Zelândia com três doses de DTNB 100 mM pH 7,4 (figura 15). A diferença observada entre o número de ovos por fêmeas do grupo de carrapatos alimentados artificialmente e grupo de carrapatos alimentados naturalmente, deve-se a diferença da eficiência nutricional destas duas técnicas. Portanto, carrapatos alimentados naturalmente alcançam maior peso (média de 160mg) enquanto pela alimentação artificial os carrapatos atingiram menor peso (média de 72 mg). Por este motivo, a taxa de conversão de alimento em ovos é menor na alimentação artificial.

Na literatura, até o momento, não há relato de ingurgitamento total em *R. sanguineus* alimentados com sangue de coelhos, entretanto estudos realizados por Rau & Hannoun (1968) obtiveram sucesso ao alimentar adultos e ninfas do argasídeo *Argas reflexus reflexus* (Fabricius, 1794) através de tubos capilares, com sangue de frango ou pombo heparinizado. Os autores observaram que houve o ingurgitamento total dessas fêmeas que forneceram posturas férteis e as ninfas mudaram para os próximos estágios. Já Willadsen *et al.* (1984) ao trabalharem com alimentação artificial de fêmeas parcialmente ingurgitadas de *R. microplus* através de tubos capilares com sangue de bovinos, coelhos, ratos e cobaias, observaram que os carrapatos alimentaram-se com todos os tipos de sangue, mas só obtiveram sucesso no ingurgitamento e oviposição quando alimentados com sangue do hospedeiro natural.

Lösel *et al.* (1993) ao alimentarem artificialmente fêmeas parcialmente ingurgitadas de *R. appendiculatus* por meio de tubos capilares, com soro de coelhos que tinham sido previamente infestados com carrapatos e com soro obtidos dos mesmos animais antes da infestação. Os autores mostraram ganho de peso significativamente menor quando as fêmeas foram alimentadas com soro de coelhos infestados. Ainda nesse estudo os carrapatos foram também alimentados artificialmente com soro de bovinos (que são seus hospedeiros naturais) que tinham sido previamente infestados e com soro de bovinos não expostos à infestação. Os autores observaram que não houve diferença significativa no ganho de peso, demonstrando assim a diferença entre o hospedeiro natural e a resistência adquirida por animais de laboratório. Em outros trabalhos, De la Vega *et al.* (2000) obtiveram sucesso ao alimentar artificialmente fêmeas de *R. microplus* utilizando sangue heparinizado ou desfibrinado. Em seguida, estas fêmeas foram colocadas

novamente no hospedeiro natural para completar o ingurgitamento. A alimentação artificial não causou efeito negativo sobre os carrapatos, ou em seu desenvolvimento posterior. No entanto, Abel (2004) infestou com *A. cajennense* previamente alimentadas colônias de coelhos. As paternógenas foram removidas antes de terminarem o ingurgitamento, sendo submetidas à alimentação por meio de tubos capilares por períodos de 2, 6 e 12 horas com sangue bovino citratado. O ganho médio de peso foi significativo já a partir de 2h.

Dos poucos trabalhos com *R. sanguineus*, apresentados em literaturas, Cunha et al. (2008) alimentando artificialmente fêmeas parcialmente ingurgitadas de *R. sanguineus* oriundas de coelhos, observaram pesos médios das fêmeas 66,0; 69,10 e 73,60 mg após alimentação artificial com sangue canino citratado por meio de tubos capilares por 6, 12 e 24 horas, respectivamente. Os pesos médios das posturas provenientes das fêmeas alimentadas artificialmente foram de 42,60; 46,90 e 41,60 mg, respectivamente. No Brasil, Coelho (1993) ao estudar os parâmetros da oviposição, obteve fêmeas ingurgitadas com peso variando entre 82,60 a 228,60mg e com peso médio de 166,02 mg. Neste trabalho, foi utilizado período de 12 horas para alimentação artificial e foi observado que as taxas de eficiências nutricionais foram semelhantes aos de Cunha *et al* (2008). Contudo, o período de 6 horas não foi testado e o de 24 horas os carrapatos morreram durante o período de pré-postura. Já na alimentação natural, foi utilizado período de 24 horas, e foi observado que as taxas de eficiências nutricionais eram semelhantes às taxas observadas por Coelho (1993).

Em artrópodes hematófagos, a ovogênese está diretamente ligada ao metabolismo de aminoácidos, que se dá no momento da digestão da porção protéica, derivada da alimentação sanguínea que é utilizada pelas células do corpo gorduroso para a síntese de proteínas do vitelo. A principal proteína de reserva dos ovos de artrópodes é a vitelina, adquirida pelos ovócitos e acumulada em estruturas chamadas grânulos de vitelo (Sappington & Raikhel, 1998). Uma das funções da vitelina é suprir o desenvolvimento do embrião com aminoácidos, e sua mobilização esta relacionada à ação de proteases específicas que tornam possível sua utilização pelas células dos embriões em desenvolvimento no interior dos ovos (Fagotto, 1990; Yamamoto & Takahashi, 1993; Logullo *et al.*, 1998).

Na figura 16, observou-se que a taxa de eclosão de *R. sanguineus* foi afetada significativamente - mais de 70% - nos carrapatos *R. sanguineus* que foram

alimentados em coelhos tratados com três injeções de DTNB 100 mM- pH 7,4. Eventos que ocorrem durante a ovogênese são reflexos da mudança na homeostase de sistemas celulares interrelacionados. Sendo assim, o desenvolvimento da célula germinativa depende direta ou indiretamente dos recursos disponíveis das células foliculares e/ou nutrízes, ou mesmo de células de outros sistemas. A interação entre ovócitos e células foliculares e nutrízes é bem estabelecida para o grupo *Insecta*, com descrição de três modelos estruturais de ovário: panoístico, politrófico e telotrófico, definidos de acordo com o tipo de interação celular presente (Huebner e Anderson, 1972). Sabe-se que as células foliculares, células nutrízes e ovócitos interagem de múltiplas formas na ovogênese, ou seja, durante o crescimento do folículo, transporte citoplasmático, vitelogênese e formação do córion. A função nutricional dessas células é facilitada pela presença de canais citoplasmáticos estáveis denominados “pontes intercelulares” responsáveis pela ligação dessas células ao ovócito. Desta forma, servem como rota de transporte para lipídeos, proteínas, carboidratos, mitocôndrias, retículo endoplasmático, RNAm, ribossomos que são produzidos por estas células e estocados no ovócito em crescimento (Büning, 1994 e Telfer, 1975). Desta forma, a ação oxidativa do DTNB em proteínas tióis pode promover mudanças estruturais e, por conseguinte perda de função destas proteínas levando a perda da homeostase nestas células. Uma das proteínas tióis que tem sido estudada pelo nosso grupo é a Triose Fosfato Isomerase de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (RBm-TIM). Moraes e colaboradores (2011), classificaram esta proteína como alvo de drogas pelo seu alto teor de resíduos de cisteínas não conservadas nas posições Cis: 7,25,51,86 e 143.

Outra abordagem de interferência sobre agentes oxidante de proteínas tióis, como DTNB, é apresentado por Gómez-Puyou e colaboradores (1995) que observaram que agentes derivatizantes de resíduos de cisteínas foram capazes de inibir drasticamente TIMs com resíduos de cisteínas na posição Cis 14 de *Trypanosomas brucei*, o mesmo não acontecendo com TIMs de coelhos. Em estudos para o desenvolvimento de vacinas contra *Taenia solium*, Jimenez e colaboradores (2000) observaram diferenças entre as sequências de duas regiões-chave da TIM do parasita e *Homo sapiens*. Estas diferentes regiões da enzima de *Schistosoma mansoni* foram identificadas como epítomos para células T e B. Na esquistossomose, a TIM foi considerada pela OMS como uma das seis prioridades em candidatas vacinas contra *S. mansoni* (Bergquist, 1995). A TIM é considerada

um alvo para o desenvolvimento de medicamentos contra diversas doenças humanas envolvendo endoparasitas, tais como o *Plasmodium*, *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei* e *Giardia lamblia* (Garza-Ramos *et al.*, 1996; Maldonado *et al.*, 1998; Gao *et al.*, 1999; Hernandez-Alcantara *et al.*, 2002; Zomosa-Signoret *et al.*, 2003). Adicionalmente, o DTNB tem sido exaustivamente aplicado e estudado em outra proteína tiol, Proteína Dissulfeto Isomerase (PDI), em modelos de interação de fusão celular de parasitos como: vírus (Ryser *et al.*, 1994; Barbouche *et al.*, 2005; Golwthaman *et al.*, 2008; Lara *et al.*, 2011; Calderon *et al.*, 2012), bactérias (Conant *et al.*, 2007) e protozoários (Santos *et al.*, 2009). Nestes trabalhos, de forma unânime, é reportado que a PDI desempenha um papel crítico na internalização desses patógenos pela célula hospedeira. Assim, o DTNB bloqueia eficientemente a fusão celular entre o patógeno e a célula hospedeira mediada pela PDI. Tal inibição impede a reação de intertroca tiol-dissulfeto na superfície da célula hospedeira entre a PDI e as proteínas extracelulares do patógeno (Ryser & Flückiger, 2005). Desta forma, o DTNB poderia atuar na fusão de alguns patógenos transmitidos durante o repasto sanguíneo. Destarte, uma nova classe de drogas derivadas do DTNB pode contribuir não só para ovogênese, mas também na diminuição de cargas parasitárias de alguns patógenos transmitidos pelo carrapato.

Nos coelhos, tanto na avaliação da toxicidade de dose única (figura 12) quanto na avaliação de doses repetidas (figura 13), a excreção da droga ocorreu em 12 horas após a administração, não sendo encontrando resíduos do fármaco na circulação sanguínea após este período. As avaliações das bioquímicas clínicas permaneceram inalteradas após o tratamento com DTNB (tabelas 1-9), e a mesma observação se deu nos achados histológicos em lâminas de pulmão, cérebro, coração, fígado e rim de coelhos submetidos aos tratamentos, durante seis meses, com DTNB (tabela 14). Igualmente, as avaliações tomográficas (anexo) mostram que durante o período de experimentação o coelho não apresentou sinais de modificações nas estruturas dos órgãos eleitos para o acompanhamento clínico.

O conjunto de avaliações clínicas e não clínicas, atestam que não houve influência no “*status*” sanitário dos coelhos usados durante e após o período de ensaio com DTNB. Isto pode indicar que os derivados deste fármaco (DTNB), poderão ser usados futuramente como candidatos a fármacos acaricidas em coelhos Nova Zelândia. Haja vista, que os efeitos deletérios foram observados em carrapatos *R. sanguineus* e o mesmo evento não foi observado em coelhos Nova Zelândia.

6. Conclusões

1- Carrapatos *R. sanguineus* foi capaz de infestar com eficiência, coelhos Nova Zelândia.

2- Houve diminuição significativa nas taxas de oviposição em *R. sanguineus* alimentados artificialmente com DTNB 20 mM – pH 7,4 por meio de tubos capilares;

3- Houve diminuição significativa nas taxas de oviposição e eclosão de *R. sanguineus* alimentados naturalmente em coelhos Nova Zelândia;

4- A performance da bioquímica clínica dos coelhos Nova Zelândia permaneceram inalteradas antes, durante e após tratamento com DTNB;

5- Os exames histopatológicos não evidenciaram lesões em coelhos tratados com DTNB;

6- O DTNB influencia no desenvolvimento dos embriões de *R.sanguineus*. Contudo, não afeta o *status sanitário dos coelhos*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abromaitis, S., Stephens, R.S. 2009. Attachment and Entry of *Chlamydia* Have Distinct Requirements for Host Protein Disulfide Isomerase. PLoS Pathog. 5, e1000357.
- Barbouche, R., Lortat-Jacob, H., Jones, I.M., Fenouillet, E. 2005. Glycosaminoglycans and Protein Disulfide Isomerase-Mediated Reduction of HIV Env. Mol Pharmacol. 67, 1111-1118.
- Bellato, V., Daemon, E. 1997. Influência da temperatura de manutenção de fase não parasitária sobre a fase parasitária de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). Rev. Bras. Parasitol. Vet. 6, 15-19.
- Benavides, E., Rodríguez, J.L., Romero, A. 2000. Isolation and Partial Characterization of the Montecitos Strain of *Boophilus microplus* (Canestrini, 1877) Multiresistant to Different Acaricides. Annals of the New York Academy of Sciences. 916, 668-671.
- Benenson, A.S. 1992. El control de las enfermedades transmisibles en el hombre, Organizacion Mundial de Salud, Washington, DC, pp. 115-117.
- Bergquist, N.R. 1995. Schistosomiasis vaccine development: approaches and prospects. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 90, 221-227.
- Broadwater, S.T., Harvey, A.S., LaPointe, E.A., Woelkerling, W.M.J. 2002. Conceptacle structure of the parasitic coralline red alga *Choreonema thuretii* (Corallinales) and its taxonomic implications. J. Phycol. 38, 1157-68.
- Burgdorfer, W. The possible role of ticks as vectors of leptospirae. 1956. Transmission of *Leptospira pomona* by the argasid tick, *Ornithodoros turicata*, and the persistence of this organism in its tissues. Experimental Parasitology. n. 5, p. 571-579, [S.I.].

- Calderon, M.N., Guerrero, C.A., Acosta, O., Lopez, S., Arias, C.F., 2012. Inhibiting Rotavirus Infection by Membrane-Impermeant Thiol/Disulfide Exchange Blockers and Antibodies against Protein Disulfide Isomerase. *Intervirology*. 55, 451-464.
- Castro-Janer, E., Martins, J.R., Mendes, M.C., Namindome, A., Klafke, G.M., Schumaker, T.T.S. 2010. Diagnoses of fipronil resistance in Brazilian cattle ticks *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* using in vitro larval bioassays. *Vet. Parasitol.* 173, 300-306.
- Chabaud, A.G. Sur la nutrition artificielle des tiques. 1950. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparee*, v.25, n.1-2, p. 424-47.
- Clark, K.L., Wills, W., Tedders, S.H., Williams, D.C. 1996. Ticks Removed from Dogs and Animal Care Personnel in Orangeburg County, South Carolina. *Journal of Agromedicine*. 3, 45-55.
- Conant, C.G., Stephens, R.S., 2007. *Chlamydia* attachment to mammalian cells requires protein disulfide isomerase. *Cellular Microbiology*. 9, 222-232.
- da Cunha, N.C., Rangel, C.P., Piranda, E.M., de Rezende, J., Teixeira, R.C., da Fonseca, A.H. 2010. Assessment of weight gain and biological parameters of *Rhipicephalus sanguineus* females fed artificially via capillary tubes. *Ciência Rural*. 40, 928-933.
- Dantas-Torres, F., Figueredo, L.A., Brandão-Filho, S.P. 2006. *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae), the brown dog tick, parasitizing humans in Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 39, 64-67.

de La Vega, R., Diaz, G., Finlay, L. 2000. Artificial feeding of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) through micropipettes. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 916, 315-319.

FAO/WHO. 1987. Guidelines for the preparation of Toxicological Working papers for the Joint FAO/WHO Expert Committee on food Additives, Geneva. July (Documnet ICS/89.41).

Fabres, A., de Andrade, C.P., Guizzo, M., Sorgine, M.H.F., de O. Paiva-Silva, G., Masuda, A., da Silva Vaz, I., Logullo, C. 2010. Effect of GSK-3 activity, enzymatic inhibition and gene silencing by RNAi on tick oviposition and egg hatching. *Parasitology*. 137, 1537-1546.

Felz, M.W., Durden, L.A., Oliver, J.H. 1996. Ticks Parasitizing Humans in Georgia and South Carolina. *The Journal of Parasitology*. 82, 505.

Fernández-Salas, A., Rodríguez-Vivas, R.I., Alonso-Díaz, M.A. 2012. First report of a *Rhipicephalus microplus* tick population multi-resistant to acaricides and ivermectin in the Mexican tropics. *Vet. Parasitol.* 183, 338-342.

Gao, X.-G., Maldonado, E., Pérez-Montfort, R., Garza-Ramos, G., de Gómez-Puyou, M.T., Gómez-Puyou, A., Rodríguez-Romero, A. 1999. Crystal structure of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi* in hexane. *Proc Natl Acad Sci USA*. 96, 10062-10067.

Garza-Ramos, G., Pérez-Montfort, R., Rojo-Domínguez, A., de Gómez-Puyou, M.T., Gómez-Puyou, A. 1996. Species-Specific Inhibition of Homologous Enzymes by Modification of Non-conserved Amino Acids Residues. *European Journal of Biochemistry*. 241, 114-120.

- Gómez-Puyou, A., Saavedra-Lira, E., Becker, I., Zubillaga, R.A., Rojo-Domínguez, A., Pérez-Montfort, R. 1995. Using evolutionary changes to achieve species-specific inhibition of enzyme action: studies with triosephosphate isomerase. *Chem. Biol.* 2, 847-855.
- Gowthaman, U., Jayakanthan, M., Sundar, D. 2008. Molecular docking studies of dithionitrobenzoic acid and its related compounds to protein disulfide isomerase: computational screening of inhibitors to HIV-1 entry. *BMC Bioinformatics.* 9, S14.
- Guglielmone, A., Beati, L., Barros-Battesti, D., Labruna, M., Nava, S., Venzal, J., Mangold, A., Szabó, M., Martins, J., González-Acuña, D., Estrada-Peña, A. 2006. Ticks (Ixodidae) on humans in South America. *Experimental and Applied Acarology.* 40, 83-100.
- Guimarães, J.H., Tucci, E.C., Barros-Battesti, D.M. 2001. *Ectoparasitos de importância veterinária.* São Paulo, Brasil, Editora Plêiade. 213 pp.
- Hernández-Alcántara, G., Garza-Ramos, G., Hernández, G.M., Gómez-Puyou, A., Pérez-Montfort, R., 2002. Catalysis and stability of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei* with different residues at position 14 of the dimer interface. Characterization of a catalytically competent monomeric enzyme. *Biochemistry.* 41, 4230-4238.
- Hoskyns, J.D. 1991. Tick transmitted diseases. The brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806). *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 21, 99-101.

Jiménez, L., Vibanco-Pérez, N., Navarro, L., Landa, A. 2000. Cloning, expression and characterisation of a recombinant triosephosphate isomerase from *Taenia solium*. *International Journal for Parasitology*. 30, 1007-1012.

Johnston, L.A.Y., Kemp, D.H., Pearson, R.D. 1986. Immunization of cattle against *Boophilus microplus* using extracts derived from adult female ticks: Effects of induced immunity on tick populations. *International Journal for Parasitology*. 16, 27-34.

Kocan, K.M., Yoshioka, J., Sonenshine, D.E., de la Fuente, J., Ceraul, S.M., Blouin, E.F., Almazán, C. 2005. Capillary tube feeding system for studying tick-pathogen interactions of *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae) and *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae). *J Med Entomol*. 42, 864-874.

Labruna, M.B., Camargo, L.M.A., Terrassini, F.A., Ferreira, F., Schumaker, T.T.S., Camargo, E.P. 2005. Ticks (Acari: Ixodidae) from the state of Rondônia, western Amazon, Brazil. *Systematic and Applied Acarology*. 10, 17-32.

Lara, H.H., Ixtepan-Turrent, L., Garza-Treviño, E.N., Flores-Teviño, S.M., Borkow, G., Rodríguez-Padilla, C. 2011. Antiviral properties of 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid and bacitracin against T-tropic human immunodeficiency virus type 1. *Virology Journal*. 8, 137.

Louly, C.C.B., Fonseca, I.N., Oliveira, V.F. de, Borges, L.M.F. 2006. Ocorrência de *Rhipicephalus sanguineus* em trabalhadores de clínicas veterinárias e canis no município de Goiânia, GO. *Ciência Animal Brasileira*. 7, 103-106.

Maldonado, E., Soriano-García M., Moreno, A., Cabrera, N., Garza-Ramos, G., Tuena de Gómez-Puyou, M., Gómez-Puyou, A., Perez-Montfort, R. 1998. Differences in the

intersubunit contacts in triosephosphate isomerase from two closely related pathogenic trypanosomes. *Journal of Molecular Biology*. 283, 193-203.

Maroli, M., Khoury, C., Frusteri, L., Manilla, G. 1996. Distribution of dog ticks *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) in Italy: a public health problem. *Ann Ist Super Sanita*. 32, 387-397.

Martins, J.R., Furlong, J. 2001. Avermectin resistance of the cattle tick *Boophilus microplus* in Brazil. *The Veterinary Record*. 149, 64.

Moraes, J., Arreola, R., Cabrera, N., Saramago, L., Freitas, D., Masuda, A., da Silva Vaz Jr., I., Tuena de Gomez-Puyou, M., Perez-Montfort, R., Gomez-Puyou, A., Logullo, C. 2011. Structural and biochemical characterization of a recombinant triosephosphate isomerase from *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 41, 400-409.

Nolan, J., Wilson, J., Green, P., Bird, P. 1989. Synthetic pyrethroid resistance in field samples in the cattle tick *Boophilus microplus*. *Australian Veterinary Journal*. 66, 179-182.

O'Dwyer, L.H., Massard, C.L., Pereira de Souza, J.C. 2001. Hepatozoon canis infection associated with dog ticks of rural areas of Rio de Janeiro State, Brazil. *Veterinary Parasitology*. 94, 143-150.

Ortiz, E.M., Santamaría, V.M., Ortiz, N.A., Soberanes, C.N., Osorio, M.J., Flanco, B.R., Martínez, I.F., Quezada, D.R., Fragosó, S.H. 1995. Caracterización of *Boophilus microplus* resistance to ixodicides in México. *Seminário Internacional de Parasitología Animal*. Acapulco (México). 58-66.

- Patarroyo, J., Costa, J. 1980. Susceptibility of Brazilian samples *Boophilus microplus* to organophosphorus acaricides. *Tropical Animal Health and Production*. 12, 6-10.
- Paz, G.F., Labruna, M.B., Leite, R.C. 2008. Ritmo de queda de *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) de cães artificialmente infestados. *Rev Bras Parasitol Vet*. 17, 139-144.
- Ryser, H.J., Levy, E.M., Mandel, R., DiSciullo, G.J. 1994. Inhibition of human immunodeficiency virus infection by agents that interfere with thiol-disulfide interchange upon virus-receptor interaction. *Proc Natl Acad Sci USA*. 91, 4559-4563.
- Ryser, H.J.-P., Flückiger, R., 2005. Keynote review: Progress in targeting HIV-1 entry. *Drug Discovery Today*. 10, 1085-1094.
- Santos, C.X.C., Stolf, B.S., Takemoto, P.V.A., Amanso, A.M., Lopes, L.R., Souza, E.B., Goto, H., Laurindo, F.R.M. 2009. Protein disulfide isomerase (PDI) associates with NADPH oxidase and is required for phagocytosis of *Leishmania chagasi* promastigotes by macrophages. *J Leukoc Biol*. 86, 989-998.
- Soberanes, C.N., Santamaría, V.M., Fragoso, S.H., García, V.Z. 2002. Primer caso de resistencia al amitraz en la garrapata del ganado *Boophilus microplus* en México. *Tec Pec Mex* 40:81-92
- Sonenshine, D.E. 2006. Tick pheromones and their use in tick control. *Annual Review of Entomology*. 51, 557-580.
- Sonenshine, D.E., Kocan, K.M., de la Fuente, J. 2006. Tick control: further thoughts on a research agenda. *Trends in Parasitology*. 22, 550-551.

Venzal, J.M., Guglielmone, A.A., Estrada-Peña, A., Cabrera, P.A., Castro, O. 2003. Ticks (Ixodida: Ixodidae) parasitising humans in Uruguay. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. 97, 769-772.

Zomosa-Signoret, V., Hernández-Alcántara, G., Reyes-Vivas, H., Martínez-Martínez, E., Garza-Ramos, G., Pérez-Montfort, R., Tuena De Gómez-Puyou, M., Gómez-Puyou, A. 2003. Control of the reactivation kinetics of homodimeric triosephosphate isomerase from unfolded monomers. *Biochemistry*. 42, 3311-3318.

