INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

Autarquia da Universidade de São Paulo

**Efeitos da radiação ionizante em ovários de *Rhipicephalus (Boophilus)*
microplus (ACARI: IXODIDAE) em fase de pré postura**

ALEXANDRE ANTONIO PASQUALINI

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências na área de Tecnologia Nuclear – Aplicações.

Orientador:

Prof. Dr. Valter Arthur

São Paulo

2020

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia da Universidade de São Paulo

**Efeitos da radiação ionizante em ovários de *Rhipicephalus (Boophilus)*
microplus (ACARI: IXODIDAE) em fase de pré postura**

Versão Corrigida

Versão Original disponível no IPEN

ALEXANDRE ANTONIO PASQUALINI

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação da Universidade de
São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências na área de
Tecnologia Nuclear – Aplicações.

Orientador:

Prof. Dr. Valter Arthur

São Paulo

2020

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

PASQUALINI. A.A. *Efeitos da radiação ionizante em ovários de Rhipicephalus (Boophilus) microplus (ACARI: IXODIDAE) em fase de pré postura*. 2020. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear) Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN/CNEM/SP. São Paulo. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br>>

Pasqualini, Alexandre Antonio

Efeitos da radiação ionizante em ovários de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (ACARI: IXODIDAE) em fase de pré postura / Alexandre Antonio Pasqualini; Orientador Valter Arthur. -- São Paulo, 2020.

59 p.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-graduação em Tecnologia Nuclear. (Aplicações) -- Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. Universidade de São Paulo. 2020.

1. Carrapato. 2. Cobalto 60. 3. Ensaio do Cometa. 4. \histologia 5. Eclodibilidade. I. Arthur, Valter, oriente. II. Título.

AGRADECIMENTOS

Meu especial agradecimento ao Prof. Dr. Valter Arthur, estimado orientador, pela oportunidade, paciência, dicas, sugestões e críticas e, por acreditar nas perspectivas deste trabalho;

Agradeço também ...

... aos funcionários do Laboratório de Radiobiologia e Ambiente do CENA / USP, pela contribuição ativa, sugestões e ajuda ao longo das pesquisas;

... aos professores de curso de Pós-Graduação de Ciências e Tecnologia Nuclear – Aplicações do IPEN pela oportunidade concedida.

... a todos os funcionários do Programa de Pós-Graduação do IPEN.

... à Profa. Dra. Silvia P. Irazusta, LATAMO-FATEC Sorocaba e ao Dr. Paulo Jose Balsamo, USFCAR Sorocaba ...

... e ...

... à Profa. Dra. Maria Izabel Camargo-Mathias, bem como à Msc. Marina R. Abreu e Michelen B. Schiavolin do Departamento de Biologia do Instituto de Biociências da UNESP de Rio Claro (SP) ...

... pelos ensinamentos, apoio logístico, laboratorial e científico despendidos para o desenvolvimento deste trabalho.

Obrigado.

RESUMO

Pasqualini, A. A. **Efeitos da radiação ionizante em ovários de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (ACARI: IXODIDAE) em fase de pré postura**. São Paulo, 2020. 59 p. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. IPEN/CNEM/USP. São Paulo

O *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) é uma espécie de carrapato presente nos países de clima tropical e parasitam diversos animais de interesse zootécnico, mas predominantemente, bovinos, e que está diretamente envolvido no complexo de doenças chamado de Tristeza Parasitária Bovina, causadas por infecções com *Babesia* spp, entre outras e, constituindo-se num fator limitante ao desenvolvimento da pecuária nos países tropicais e subtropicais. Assim, com o intuito de se propor uma alternativa para o controle populacional deste parasita, buscou-se avaliar os efeitos da radiação gama do ^{60}Co no aparelho reprodutor das fêmeas por meio das técnicas como o ensaio do cometa e preparação histológica de fixação em hematoxilina e eosina (H-E) e, o bioensaio de incubação das posturas avaliar a taxa de eclodibilidade para aplicações à técnica do inseto estéril. Vinte e cinco fêmeas ingurgitadas em fase de pré postura foram irradiadas com doses de 0, 5, 10, 15, 20 e 25 Gy para ambos os experimentos (5 fêmeas/tratamento) e após 24h foram dissecadas e seus ovários formaram uma amostra. O ensaio do cometa mostrou que o trauma cromossômico foi proporcional às doses da radiação ionizante. Os achados histológicos demonstraram que à dose de 5 Gy teve aspecto morfohistológico semelhante ao controle; doses de 10 e 15 Gy não evidenciaram efetiva desnaturação dos pedicelos ou epitélio dos ovários, contudo, desarranjos das granulações do vitelo e a presença de numerosos vacúolos nos ovócitos, corroboram com a degeneração celular ou autofagia, o que comprometeria a viabilidade dos ovos. Doses de 20 e 25 Gy mostraram efeitos agudos com significativo comprometimento de toda estrutura do aparelho reprodutor comprometendo a postura. No bioensaio as fêmeas também em fase de pré postura foram submetidas às doses de 0 a 400 Gy e se constatou que a radiação ionizante afetou em aproximadamente 70% o peso da postura, a taxa de eclosão dos ovos da Testemunha foi 68,2% maior que a menor dose ionizante, que quanto maior a dose de radiação, menor o índice de eclosões e nos tratamentos que receberam doses maiores de 20 Gy, não ocorreram eclosões das posturas, estabelecendo-se assim um marco para se estudar a aplicação de técnica do inseto estéril neste espécime.

Palavras chave:

1.Carrapato. 2.Cobalto-60. 3.Ensaio do Cometa. 4.Histologia. 5.Eclodibilidade

ABSTRAT

Pasqualini, A. A. **Effects of ionizing radiation on ovaries of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (ACARI: IXODIDAE) in pre-laying phase.** São Paulo, 2020. 59 p. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. IPEN/CNEM/USP. São Paulo

The *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) is a species of tick present in tropical countries and parasites several animals of zootechnical interest, but predominantly bovine, and which is directly reserved in the complex of diseases associated with Bovine Parasitic Sadness, caused by infections with *Babesia spp*, among others and, constituting a limiting factor to the development of livestock in climatic and subtropical countries. Thus, in order to propose an alternative for population control of this parasite, you can evaluate the effects of the ^{60}Co series on the female reproductive system using techniques such as the clinical or experimental hematoxylin and eosin (HE) assay and bioassay of hatching, evaluate hatchability rates for applications in sterile insect technique. Twenty-five engorged females in the pre-laying phase were irradiated with doses of 0, 5, 10, 15, 20 and 25 Gy for both experiments (5 females / treatment) and after 24 hours they were dissected and their ovaries formed a sample. The comet assay showed that the chromosomal trauma was proportional to the doses of the ionizing lesion. The histological findings demonstrated that the 5 Gy dose had a morpho-historical aspect similar to the control; doses of 10 and 15 Gy do not prove effective the denaturation of pedicels or ovarian epithelium, however, breakdowns of calf granulations and the presence of numerous vacuoles in the oocytes, corroborate with a cell degeneration or autophagy, or that compromise the viability of the eggs. Doses of 20 and 25 Gy have acute effects with significant impairment of the entire structure of the reproductive system, compromising posture. In the bioassay females also in the pre-laying phase was subjected to doses from 0 to 400 Gy and found that ionizing radiation affected approximately 70% or weight of the laying, a hatch rate of the witness eggs was 68.2% higher than is the lowest ionizing dose, which is the highest dose of injury, the lowest hatching rate and those receiving doses greater than 20 Gy, the postures do not hatch, establishing itself as a landmark for the study of a technical application for sterile in this species.

Key words: 1.Tick. 2. Cobalt-60. 3. Comet Test. 4. Histology. 5. Hatchability

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
2. OBJETIVO	8
3. REVISÃO DA LITERATURA	8
3.1 Biologia do carrapato	8
3.2 Controle do carrapato	9
3.3 Técnica do inseto estéril	11
3.4 Radiação Ionizante.....	13
3.5 Ensaio do cometa	14
3.6 Histologia do ovário de R.(B) microplus	15
4. MATERIAL E MÉTODOS	17
5. RESULTADOS	21
Capítulo 1	21
Capítulo 2	28
Capítulo 3	48
6. DISCUSSÃO	53
7. CONCLUSÕES	55
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

1 INTRODUÇÃO

Carrapatos são ectoparasitas pertencentes ao filo Arthropoda, classe Aracnida, ordem Acari e subordem Ixodida. Esta compreende 3 famílias: Argasidae, Nutalliedae e Ixodidae. Guimarães *et al*, (2001) relataram que a fauna brasileira conta com aproximadamente 57 espécies identificadas.

Estima-se que em bovinos parasitados por mais de 1300 carrapatos de fêmeas adultas que pesam em média 0,2g de peso vivo possam sofrer a espoliação de sangue de até 1 kg por dia.

O *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* pertence à família Ixodidae, é uma espécie de ácaro presente nos países de clima tropical e parasita diversos animais de interesse zootécnico, mas predominantemente, bovinos. No Brasil, o mercado industrial do setor agropecuário investiu 5,954 bilhões de reais no ano de 2018, sendo que 29% deste total estava relacionado ao emprego de produtos antiparasitários e, os ruminantes demandaram mais de 55% deste mercado (SINDAN, 2018).

Além das próprias perdas de produtividade dos animais como a diminuição da produção de leite e do peso da carcaça, outros prejuízos também estão relacionados a pecuária como os custos relacionados à mão-de-obra, despesas com instalações, aquisição de carrapaticidas e dos equipamentos para sua aplicação, e ainda, há de se considerar danos causados ao couro, comprometendo sua viabilidade comercial, como também, gastos no controle de enfermidades relacionadas à hemoparasitas como *Babesia spp* e *Anaplasma spp*, (ANDREOTTI, 2010).

Assim como na agricultura, a pecuária deve integrar um conjunto de estratégias para o controle de praga, pois o Brasil sendo um líder de exportações de carne bovina com um plantel comercial de 214, 7 milhões de cabeças, distribuídos em 162,2 milhões de hectares, que abateu 44,3 milhões de cabeças no ano de 2018, dos quais 80% foram destinadas à exportação, estes números justificam o investimento em novas tecnologias e recursos para atender toda a cadeia produtiva, científica e social do país (ABIEC, 2019).

Assim, o uso da tecnologia nuclear no controle de pragas é uma realidade e esta pesquisa frente ao carrapato do boi torna-se adequada e complementar ao sistema de produção da pecuária brasileira.

2 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da radiação gama em ovários de fêmeas ingurgitadas em fase de pré postura do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* visando o estabelecimento de informações para o desenvolvimento e aplicações da técnica do inseto estéril para o controle populacional desta espécie.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 BIOLOGIA DO CARRAPATO

O *Rhipicephalus (B) microplus*, também conhecido como carrapato do boi, parasita um único hospedeiro ao longo de sua vida (monóxico) e seu ciclo de vida pode ser dividido em duas fases: uma de vida livre, com duração de cerca de 28 dias e outra de vida parasitária variando entre 19 e 24 dias. A fase de vida-livre inicia-se no momento que a teleógena (fêmea fecundada e alimentada) cai ao solo e entra no período de pré postura que tem, em média, duração de dois a três dias. Inicia-se, então, a postura que dura aproximadamente 17 dias, podendo ovipor até 3 mil ovos. Após a eclosão dos ovos e a liberação de larvas / ninfas viáveis, chamadas de neolarvas ou metalarvas, ocorre a ecdise entre 5 a 10 dias, transformando-se em metaninfa, como pode ser visto na Figura 1. Nestas fases, as larvas se alimentam apenas de linfa e a fase de vida-livre é influenciada pelas condições climáticas, que alteram o período de duração dos vários estágios, que são especialmente afetados pela umidade e temperatura, mas em condições favoráveis, podem se manter nestes estágios por meses (ROCHA,1997).

Uma vez alcançado um hospedeiro, ao longo de 9 a 20 dias ocorre a diferenciação sexual, as metaninfas se transformam em neandro após 18 a 28 dias do início do ciclo, passando a gonandro e em mais dois dias em machos adultos. A transformação de metaninfa em neógena (fêmea) é feita em torno de 14 a 23 dias após o início do ciclo. O macho fecunda a neógena, que inicia o hematofagismo, passando à partenógena em três dias e, finalmente, à teleógena em mais dois dias. A fase de vida-parasitária não é tão sensível às influências climáticas como a fase de vida-livre. O início da queda das teleógenas ocorre no 19º dia da infestação, sendo em média entre o 22º e 23º dias. A fase parasitária dura em média 18 a 26 dias (GONZALES, 1974; ROCHA,1997).

Os carrapatos aumentam várias vezes seu tamanho, desde o estágio de larva que mede aproximadamente 1 mm, até o estágio adulto, quando uma fêmea ingurgitada (teleógena) pode medir até 1,2 cm. Em adultos, a diferenciação sexual é bastante evidente,

pois o macho é menor que a fêmea, medindo cerca de 2 mm (SEIXAS, 2008), como se pode ver nas imagens da Figura 1.

Figura 1. Imagens de diferentes estágios de vida do *Rhipicephalus (B) microplus*.

Legenda: A: metaninfa, observa-se 3 pares de patas; B: machos;

C: “Tpp” - Teleógena em pré postura e D: Teleógena em postura. Fonte: autor.

Pesquisas realizadas por Souza *et al.*, (1988) constataram que os ovos provenientes de teleógenas colocados no meio ambiente no período de abril a agosto (outono e inverno) foram sempre inférteis, e que nos meses de janeiro e fevereiro (verão) ocorreu uma concentração de eclosão de larvas oriundas de grupos de teleógenas que realizaram posturas férteis, assim foi confirmado o efeito da sazonalidade na fertilidade dos ovos.

3.2 CONTROLE DO CARRAPATO

A forma de controle das infestações por carrapatos nos animais, usualmente, se dá através do uso de acaricidas e conforme Furlong *et al.*, (2007) estes podem ser classificados como carrapaticidas de contato que compreendem os organofosforados, amidínicos, fenilpirazóis e recentemente o naturalyte e, carrapaticidas sistêmicos, endectocidas, compreendendo as lactonas macrocíclicas como abamectinas, ivermectinas, doramectinas, espiromectinas, salemectinas e moxidectinas. Contudo, não só a disponibilidade do princípio ativo deve estar adequada para alcançar seus efeitos desejados, como também a forma de administração, em associação com a estrutura de manejo e condições ambientais.

Historicamente os pecuaristas fazem uso de carrapaticidas para o controle deste parasita, contudo, quando mal-empregados podem resultar na resistência dos organismos aos princípios ativos dessas drogas, além de causarem contaminações ambientais.

Alonzo-Díaz *et al.*, (2006) relataram que os mecanismos de resistência empregados por estes ácaros envolvem desde mudança de comportamento à exposição e contato aos produtos, como alterações em seus exoesqueletos para minimizar a penetração cuticular, mudanças na taxa metabólica de detoxificação e mudança no sítio de ação de receptores de sensibilidade ao poucos princípios ativos disponíveis no mercado.

Segundo Labruna; Pereira (2001), 95,0% dos carrapatos estão no ambiente em fase de vida livre: teleógenas em pré postura, teleógenas em postura, ovos, ninfas e larvas. Assim, o controle dos carrapatos deve se integrar a uma estratégia de múltiplas ações que compreendam o conhecimento da biologia do parasita, a maneira como este interage com o hospedeiro, a sazonalidade climática em função do ciclo biológico com as pastagens, o tipo de forrageira, bem como as técnicas de rodízio de piquetes e lotação animal (VERRISSIMO, 2015), o uso de adubações nitrogenadas (WANDERLEY *et al.*, 2015) e há de ser considerado ainda, o estado nutricional dos animais bem como, o uso de vacina como (Bm86): TickGARD® (Austrália) / Gavac® (Cuba) e a resistência genética de bovinos (GOMES, 2012).

Com o intuito de se minimizar os potenciais efeitos poluentes do uso indiscriminado de pesticidas na pecuária, tem-se estudado o uso de técnicas conhecidas por controle biológico. Um desses métodos se dá com nematoides entomopatogênicos, de dois gêneros: *Steinernema* e *Heterorhabditis* em associação com bactérias dos gêneros *Xenorhabdus* e *Photorhabdus*, respectivamente. Esses nematoides atuam como veículos para essas bactérias, que são patogênicas, e quando liberadas na hemocele, provocam rápida septicemia, levando os parasitas à morte. (MONTEIRO; PRATA, 2015).

Outra forma de controle biológico para os carrapatos se dá através da aplicação de soluções com fungos autóctones, pertencente gênero *Metarhizium Sorokin* (Ascomycota: Hypocreales) que parasitam grande variedade de espécies de artrópodes (ANGELO; BITTENCOURT, 2015).

Contudo, as técnicas de controle biológico de pragas são muito susceptíveis à sazonalidade e as condições ambientais, além da sua biodisponibilidade para atingir a espécie alvo, para o controle do carrapato, Monteiro; Prata (2015) relataram que a presença das fezes dos bovinos nas pastagens são fatores limitantes para o emprego destas técnicas.

Assim, visando solucionar os danos e perdas ocasionadas pelos insetos e ácaros tais como: boas práticas de armazenamento, monitoramento das pragas e tratamento químico, que podem resultar na resistência dos insetos aos princípios ativos utilizados na composição dos produtos químicos, existe a necessidade de se encontrar métodos de controle mais eficientes e custo baixo. A irradiação por inúmeros fatores vem se apresentando como a melhor solução no controle de pragas (FOLLETT *et al.*, 2013; HALLMAN, 2013; ARTHUR; MACHI; MASTRANGENO, 2015).

3.3 TÉCNICA DO INSETO ESTÉRIL (TIE)

A técnica do inseto estéril consiste em criar em laboratório machos que são esterilizados por meio de processo de irradiação e posteriormente são liberados no meio ambiente para se acasarem com fêmeas silvestres e conseqüentemente não resultar novos descendentes (F1), objetivando a supressão de populações consideradas como praga (HENDRICH, 2000)

Dick; Hendrichs; Robinson (2005) relataram que a TIE se iniciou nos Estados Unidos da América e está amplamente difundida e empregada no controle biológico em diversos países com a vantagem de não gerar impactos ambientais e nos organismos não alvo, bem como, de se integrar com outros controles biológicos como o uso de predadores, parasitoides e patógenos.

A TIE consiste na criação massal, esterilização e posterior liberação de machos em campo de insetos pragas que competirão com machos férteis. Se o número de insetos liberados for suficientemente grande, então a probabilidade de fêmeas encontrarem e acasarem com um macho estéril é bem maior do que um não estéril, promovendo assim a diminuição da população selvagem sem poluir o meio ambiente (ARTHUR *et al.*, 2012). E neste contexto, a TIE vem sendo empregada com sucesso no controle de pragas de dípteros, como no caso das moscas da fruta e também em lepidópteros (ARTHUR; MACHI; MASTRANGELO, 2015).

O princípio desta técnica está relacionado aos efeitos da radiação ionizante em células germinativas, mais sensíveis do que as células somáticas, resultando assim, na fragmentação cromossômica e gametas defeituosos comprometendo os processos de mitose e ocasionando a morte do embrião (ROBINSON, 2002).

Bakri; Metha; Lance, (2005) confirmaram que os efeitos das radiações nos insetos provocaram alterações no DNA dos gametas das células germinativas podendo resultar em aspermia, azoospermia e até mesmo na incapacidade de se acasalar. A ocorrência de

fragmentação das células germinativas pode gerar cromossomos portadores de genes dominantes, mutações, translocação, deleção e outras aberrações, o que resultará na produção de gametas desbalanceados e morte zigomática.

Bakri *et al.*, (2005), compilaram diversas publicações disponíveis ao longo de 50 anos sobre métodos de determinação de doses esterilizantes por radiação ionizante em artrópodes e obtiveram as seguintes doses de radiação para algumas ordens de insetos e ácaros: de 130 a 400 Gy em Lepidóptera, de 30 a 280 Gy em Acari, 40 a 200 Gy em Coleopteros, de 10 a 180 Gy em Hemipteros, de 20 a 160 Gy em Dipteros, de 20 a 150 Gy em Araneae, de 5 a 140 Gy em Dictyoptera, de 100 Gy em Thysanoptera, e 4 Gy em Orthoptera.

Arthur (2018) sintetizou múltiplas publicações sobre o uso da radiação para esterilização de coleópteros com doses entre 100 e 250 Gy e para lepidópteros, entre 300 e 600 Gy, contudo os trabalhos relacionados aos ácaros são escassos e mais ainda para ácaros hematófagos, que necessariamente parasitam um hospedeiro de sangue quente.

Gallum *et al.*; (1967) irradiaram carrapatos, da espécie *Ornithodoros tholozani*, no Oriente Médio, utilizando a radiação gama proveniente do Cobalto-60 com uma dose de 2000 rad em ninfas e 16.000 rad em machos adultos, obtendo resultados satisfatórios para a esterilização dos carrapatos.

No Brasil, o primeiro trabalho realizado com irradiação de ácaros para tratamento quarentenário foi o de Mineiro; Arthur (2003), que irradiaram ácaros *Tetranychus urticae* e determinaram que nas doses de 250, 300 e 400 Gy, a mortalidade dos ácaros foi maior que 80 %,

Arthur; Machi (2015) avaliaram os efeitos da radiação gama sobre as fases do ciclo evolutivo dos ácaros: *Tetranychus urticae*, *Tetranychus desertorum*, *Oligonychus ilicis* como forma de tratamento quarentenário. Fêmeas foram irradiadas com doses de 0, 100, 200, 300 e 400 Gy e os resultados obtidos mostraram a diminuição na viabilidade dos ovos e ninfas, proporcionalmente ao aumento das doses de radiação gama. A dose de 200 Gy foi esterilizante para todas as fases do ciclo evolutivo de *O. Ilicis*, e 300 Gy para *T. urticae* e *T. desertorum*.

Assim, buscou-se neste trabalho realizar as primeiras investigações com a radiação gama em fêmeas ingurgitadas de *R.(B)microplus* na fase de pré postura pois, em seu aparelho reprodutor existem diversos estágios de ovócitos em desenvolvimento, o que permitiu avaliar seus efeitos na viabilidade de seus descendentes.

Para tal, realizou-se o ensaio do cometa para investigar os eventuais efeitos genotóxicos da radiação ionizante, bem como, secções histológicas do aparelho reprodutor para se documentar as possíveis alterações morfofisiológicas dos ovários e seus anexos e, paralelamente, desenvolveu-se um bioensaio para se avaliar a taxa de postura e a eclodibilidade dos ovos.

3.4 Radiação Ionizante

O termo radiação significa propagação de energia em forma de ondas eletromagnéticas ou fótons ou em forma de partículas subatômicas com ou sem carga elétrica. A radiação é dita ionizante quando apresenta energia suficientemente alta, capaz de arrancar elétrons orbitais de átomos ou moléculas do meio por onde se propaga, produzindo pares de íons.

Os efeitos biológicos das radiações são consequências de eventos primários produzidos em macromoléculas biologicamente importantes das células, particularmente o DNA, considerado o principal alvo da radiação, dado o papel desempenhado por ele no controle de diversas funções celulares. O dano pode ocorrer como resultante da interação direta da radiação ionizante com o DNA, fenômeno este conhecido como ação direta da radiação. Em outras situações, a radiação transfere sua energia primariamente à molécula intermediária, como a da água, cuja radiólise leva a formação de produtos altamente reativos, os radicais livres, que são capazes de difundir e de danificar o DNA, caracterizando dessa forma, a ação indireta da radiação. Esse efeito indireto é o responsável pela maioria dos danos produzidos ao DNA, tendo em vista que 80% de uma célula é composta de água (HALL, 2000).

Os vários tipos de radiação ionizante diferem na eficácia em produzir danos biológicos. Isso porque quando a energia da radiação é absorvida pelo material biológico, as excitações e as ionizações não se distribuem ao acaso, mas tendem a ser localizadas ao longo do percurso, num padrão que depende do tipo de radiação envolvido. Consequentemente, a distribuição espacial de eventos ionizantes produzidos pelos diferentes tipos de radiação vai variar grandemente. Dessa forma, os efeitos biológicos estão intimamente relacionados com o conceito de transferência linear de energia ("Linear Energy Transfer" ou LET), um parâmetro que define a quantidade de energia média depositada na matéria por unidade de distância percorrida (keV/pm).

O valor do LET varia com a velocidade, massa e carga da radiação ionizante (HALL, 2000). De modo geral, as radiações de alto LET, como as partículas α e nêutrons são mais

eficazes na produção de danos biológicos que as radiações de baixo LET, como os raios X, radiação γ e partículas beta, assim, quando alguma forma de radiação ionizante, eletromagnética (raios-X e γ) ou particulada (nêutrons e partículas α e β), é absorvida por um material biológico, há possibilidade que esta venha interagir diretamente com alvos celulares, dentre eles o DNA. Sua natureza não específica induz uma variedade muito ampla de danos e respostas de estresse em vários tipos celulares.

Tanto os efeitos diretos, como os indiretos, produzem uma variedade de lesões à molécula de DNA, como quebra nas fitas simples e duplas da molécula, ligações cruzadas (entre DNA-DNA, entre DNA-proteínas) e alterações na desoxirribose ou nas bases púricas e pirimídicas (HALL, 2000; POUGET; MATHER, 2001).

Assim, empregou a técnica do teste do cometa em fêmeas de *R.(B) microplus* na fase de pré postura com o intuito de se avaliar qual dose de radiação seria capaz de gerar efeitos genotóxicos no processos reprodutivo destes ácaros.

3.5 ENSAIO DO COMETA

O teste do cometa ou eletroforese em microgel foi introduzido por Østing e Johanson em 1984 como uma técnica eletroforética para a direta visualização do dano no DNA em nível de células individuais. Quando as células são submetidas a um campo elétrico, os fragmentos danificados de DNA migram para o ânodo adquirindo a aparência de um cometa. A região nuclear dá origem a cabeça do cometa enquanto que os fragmentos dão origem as caudas cuja extensão está intimamente relacionada com a intensidade do dano (FAIRBAIRN *et al.*, 1995; McKELVEY-MARTIN *et al.*, 1993).

Em síntese, a eletroforese é uma técnica que visa à separação de moléculas envolvendo a migração de partículas em um meio gelatinoso durante a aplicação de uma diferença de potencial. Assim, a eletroforese em gel de agarose é um método muito utilizado para a separação e visualização de fragmentos de DNA. A forma e o tamanho das bandas após a corrida são adotados como parâmetros para detectar as possíveis lesões geradas na molécula de DNA.

O teste do cometa é amplamente empregado por apresentar uma série de vantagens como avaliação de dano em células isoladas, quantidade pequena de amostras da ordem de microlitros (μL), utilização de qualquer tipo celular proliferativo ou não, avaliação da capacidade de reparo, além de apresentar uma boa sensibilidade para detecção de danos ocorridos no DNA (SPEIT; HARTMANN, 1999).

Desde a criação dessa técnica, várias modificações metodológicas foram propostas (HARTMANN *et al.*, 2003). No entanto, o método alcalino, desenvolvido por Singh *et al.* (1988), tornou-se o mais utilizado e recomendado, devido a seu extenso espectro de detecção de danos no DNA (HARTMANN *et al.*, 2003; COLLINS *et al.*, 2008). Virtualmente, todas as células eucarióticas podem ser processadas para analisar o dano no DNA usando o teste do cometa (FAIRBAIRN *et al.*, 1995; McKELVEY-MARTIN *et al.*, 1993).

Em geral, sob condições alcalinas são medidas as quebras simples e duplas e os sítios álcali-lábeis, enquanto sob condições neutras somente são observadas as quebras duplas da fita do DNA (FAIRBAIRN *et al.*, 1995).

O teste consiste na imobilização de uma suspensão celular, homogeneizada em agarose baixo ponto de fusão, em lâminas pré tratadas com agarose ponto de fusão normal (AZQUETA; COLLINS *et al.*, 2013). O material é coberto com uma lamínula para assegurar uma distribuição homogênea. Após a solidificação, a lamínula é removida e as lâminas são transferidas para a solução de lise que contém tensoativos celulares (Triton X-100) que removem as membranas (AZQUETA; COLLINS, *et al.*, 2013). As lâminas são transferidas para a cuba de eletroforese, e são tratadas com uma solução numa concentração superior a 2,0 M e pH > 13.0. Essa solução promove a liberação de histonas e o desdobramento de DNA. Sob campo eletroforético, segmentos de DNA livres, produtos de quebras (clastogêneses), migram em direção ao cátodo, dando origem a uma cauda de cometa (AZQUETA; COLLINS *et al.*, 2013).

A genotoxicidade identifica substâncias capazes de induzir a mutação, bem como avalia quantitativamente o risco mutacional que certos agentes podem causar ao homem, as plantas e aos animais, e atualmente tem sido muito utilizada para se detectar e avaliar lesões pré mutagênicas, auxiliar em estudos sobre biomonitoramento ambiental, genética toxicológica, radiação biológica, processos de reparo de DNA e ecotoxicologia genética. (SCHERER; STROHSCHOEN, 2013).

3.6 HISTOLOGIA DO OVÁRIO DE *R. (B) MICROPLUS*

Os estudos com ovários de carrapatos têm se intensificado, uma vez que o sistema reprodutor é aquele responsável por fornecer as células germinativas que se desenvolverão e que darão origem aos novos indivíduos, preservando assim a espécie (CAMARGO-MATHIAS *et al.*, 2017). Assim, buscar alternativas que consigam inibir o desenvolvimento do sistema reprodutor pode representar uma estratégia para se conseguir controlar esses ectoparasitas que tantos danos causam aos seus hospedeiros e à economia dos países.

O aparelho reprodutor feminino dos carrapatos consiste em um ovário tubular em forma de ferradura, que está localizado no terço posterior do corpo, se estendendo para as laterais. O ovário possui um par de ovidutos, um útero, uma vagina e um par de glândulas acessórias que desembocam na abertura genital (SONENSHINE, 1991).

Denardi (2004) estabeleceu novas referências anátomo-morfológicas descrevendo os ovários destes ácaros como do tipo panoístico, em que todas as células germinativas corresponderiam às ovogônias, futuros ovócitos, e que não possuem células nutridoras e nem foliculares.

O ovário é formado apenas por uma camada de células epiteliais que delimitam o lúmen e que sustentam um grande número de ovócitos fixados por meio de um arranjo de células chamadas pedicelo, o qual sintetiza os elementos vitelogênicos, que são transportados para o interior dos ovócitos por transporte ativo (DENARDI *et al*, 2004; OLIVEIRA; CAMARGO-MATHIAS; BECHARA, 2006, 2007; RICARDO *et al*, 2007; SAITO *et al*, 2005).

Os ovócitos estão distribuídos no ovário conforme seu estágio de desenvolvimento, onde os mais desenvolvidos, estágios III, IV e V, estão mais proximais a vagina, e os que estão em estágios primordiais estão mais distais, contudo, o desenvolvimento dos ovócitos ocorre simultaneamente, porém de forma assíncronas, como o processo de vitelogênese.

No *R.(B)microplus* os ovários são classificados em cinco estágios de desenvolvimento (I-V) e seguem critérios morfológicos como: a) aspecto citoplasmático; b) localização da vesícula germinal; c) presença de quantidade e da constituição de grânulos de vitelo e d) presença de cório (DENARDI, 2004).

Para efeito de análise do experimento realizado com teleógenas submetidas às doses de radiação com Co-60, descrita no Capítulo 2, se faz necessário uma descrição dos estágios de desenvolvimento dos ovócitos, como descritos no Guia Básico de Morfologia Interna de Carrapatos Ixodídeos:

OVÓCITOS I – células pequenas, elípticas e com uma vesícula germinal (núcleo) central e um nucléolo, que ocupa grande parte do citoplasma. Este último tem aspecto homogêneo, pois não possui granulações vitelogênicas.

OVÓCITOS II – células maiores que as anteriores, elípticas e ainda apresentando a vesícula germinal na região central. Apresenta fina e homogênea granulação vitelogênica, pois tem-se o início da síntese e incorporação de elementos vitelogênicos.

OVÓCITOS III – células com tamanho intermediário, com forma variando de arredondada à elíptica. A vesícula germinal migra para a região próxima do pedicelo. O

citoplasma está repleto de grânulos de vitelo com diversos tamanhos sendo que os menores ocupam a região central e os maiores na periférica. Tem-se ainda a sintetização de elementos vitelogênicos.

OVÓCITOS IV – maiores que o estágio anterior, arredondados e com a vesícula germinal ocupando o polo do ovócito voltado para o pedicelo. O citoplasma apresenta muitos grânulos de vitelo de vários tamanhos, distribuídos aleatoriamente. Tem-se o início da deposição do cório (membrana protetora e resistente que permite as trocas gasosas entre o embrião e o ambiente). O processo de vitelogênese se encontra em estágio final.

OVÓCITOS V – são as maiores células germinativas nos ovários, com forma arredondada, constituídos de grandes e numerosos grânulos no citoplasma, dificultando assim a visualização da vesícula germinal. Ao redor deste ovócito, o cório está completamente depositado, sendo constituído por duas camadas e, o processo de vitelogênese está completo e finalizado.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho tem caráter multidisciplinar que envolveu 4 instituições:

ETEC Dr. Carolino da Motta e Silva, Espírito Santo do Pinhal, SP, Fazenda Escola onde foram coletados os carrapatos e onde se realizou o bioensaio para avaliação das taxas de postura e eclodibilidade.

FATEC Sorocaba, SP, Laboratório de Toxicologia Ambiental e Ocupacional (LATAMO), onde se realizou o experimento do ensaio do cometa.

UNESP Rio Claro, SP, Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, onde se realizou o experimento relacionado às secções histológicas dos ovários dos carrapatos.

CENA USP Piracicaba, SP, onde foram realizados os protocolos de aplicação de doses de radiação com Cobalto 60.

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Animais

Para todos os experimentos, 330 fêmeas adultas e ingurgitadas de *R.(B.)microplus* em fase de pré postura, obtidas de infestação natural de vacas leiteiras sem tratamento acaricida há mais de 30 dias, selecionadas dentro de um padrão morfológico quanto sua integridade e vivacidade respondida pelo toque ou manipulação, com peso vivo aproximado

de 0,2g, onde 25 foram utilizadas para o ensaio do cometa, 25 para histologia dos ovários e 280 para o bioensaio de postura e eclodibilidade.

4.1.2 Equipamentos

Na ETEC a incubação dos ovos se deu em Estufa Incubadora Diagtech® e estereoscópio eletrônico Digital Microscope DM 1000X.

Na FATEC fez-se uso do Agitador Magnético e Aquecedor (Marca: Nova, modelo: NI 1104); Balança de Precisão (Marca: AND, modelo: HR-200); Cuba de Eletroforese Marca: Kasvi; modelo: K33-10H); Fonte de Eletroforese (Marca Kasvi); Fonte Elétrica comum (Marca; Kenntech; modelo: KPS-303); Micro-ondas (Marca Eletrolux, modelo: MAG41), para o preparo das soluções e corrida dos cometas.

Na UNESP fez-se uso de do Micrótomo LEICA® RM 2255 para as secções histológicas e do Fotomicroscópio de luz de campo claro LEICA® DM750 para leitura e documentação das imagens.

No CENA usou-se a fonte de Co^{60} no GAMMACELL® 220 Excel (MSD-Nordion).

4.1.3 Soluções

Para coleta dos carrapatos e incubação dos ovos fez-se uso de recipientes não padronizados de plástico PEAD atóxicos.

Para o teste do cometa, se seguiu os seguintes protocolos:

A. Reagentes

Ácido Acético; Agarose Ponto de Fusão Normal (APFN); Agarose Low Melting Point (Baixo Ponto de Fusão) (ABPF); Carbonato de Sódio; DMSO; EDTA; Formol; Glicerina (Glicerol); H_2O_d (Água destilada e deionizada); HCl (Ácido clorídrico); MgCl_2 (Cloreto de Magnésio); N-Lauroyl-Sarcosine; NaCl (Cloreto de Sódio); NaOH (Hidróxido de Sódio); Nitrato de Amônio; Nitrato de Prata; Sulfato de zinco Heptahidratado; Tris; Triton X-100;

B. Soluções

Solução de Lise (Estoque)

NaCl, 146,1 g (2,5M); EDTA, 37,2 g (100mM); Tris, 1,2 g (10 mM); N-lauroyl-sarcosine, 10 g (1%); H_2O_d , 1000 ml (q.s.p.).

Preparo: Ajustar o pH para 10, antes de colocar o N-lauroyl-sarcosine; completar para 1000 mL com H_2O_d .; conservar em temperatura ambiente, abrigada da luz.

Solução de Lise (Uso) –

Triton - X 100, 1mL; DMSO, 10 mL; Solução de Lise (estoque), 100 mL (q.s.p.)

Preparo: Essa solução deve ser feita na hora do uso; deve ser colocada na geladeira até atingir no mínimo 4°C.

Solução de EDTA (A)

EDTA 14,89 g; H₂O_d 200 mL (q.s.p.).

Preparo: O pH deve ser ajustado para 10 com HCl e conservar em temperatura ambiente.

Solução de NaOH (B)

NaOH 200 g, H₂O_d 500 mL (q.s.p.).

Preparo: Completar em 500 mL com água destilada e conservar em temperatura ambiente, abrigada da luz.

Solução de Eletroforese

Deve-se fazer separadas as soluções: A (EDTA) e B (NaOH);

Preparo: Em balão volumétrico, reagir 5 mL de solução A com 30 mL de solução B, completando para 1L com H₂O destilada. O pH deve ser ajustado para >13 com NaOH.

Solução de Neutralização

Tris, 48,5 g (0,4 M) e H₂O_d, 1000 mL (q.s.p.)

Preparo: O pH deve ser ajustado para 7,5 com HCl ou NaOH e conservar em temperatura ambiente abrigada da luz.

Agarose – Ponto de Fusão Normal – 1,0%

Agarose PFN, 200 mg; PBS (livre de Ca⁺⁺ e Mg⁺⁺) 20 ml

Preparo: Diluir a Agarose de Ponto de Fusão Normal, deixando-a ferver por três vezes no micro-ondas.

Agarose – Low Melting Point (Baixo Ponto de fusão) – 0,5%

Agarose LMP, 100 mg e PBS (livre de Ca⁺⁺ e Mg⁺⁺) 20 mL.

Preparo: Diluir a Agarose Low Melting Point, deixando-a ferver por três vezes no micro-ondas, até que se dissolva por completo.

Tampão PBS (livre de Ca⁺⁺ e Mg⁺⁺)

KCl, 0,2 g (74,55M); KH₂HPO₄, 0,2 g (136,09M); NaCl 8,0 g (58,44M); Na₂HPO₄ 1,15 g (141,96M) e H₂O_d, 1000 mL (q.s.p.)

Preparo: Acertar o pH em 7,4. Estocar na geladeira.

Solução Fixadora

Ácido Tricloroacético 150g; Sulfato de Zinco Heptahidratado 50 g; Glicerol 50 mL e H₂O_d 1000 mL (q.s.p.)

Preparo: Conservar em temperatura ambiente, abrigada da luz.

Solução de Coloração “A” (estoque)

Carbonato de Sódio 50 g e H₂O 1000 mL (q.s.p.)

Conservar em temperatura ambiente, abrigada da luz.

Solução de Coloração “B” (Estoque)

Nitrato de Amônio 1 g; Nitrato de Prata 1 g; Ácido Tungstosilícico 2,5 g; Formol 1,5 mL
H₂O 1000 mL (q.s.p.).

Conservar em temperatura ambiente, abrigada da luz.

Para o preparo da Solução de Coloração de uso adicionar:

53 mL da “A” com 27 mL da “B” em cada cuba (que deve ser coberta com papel alumínio).

Solução de Parada

Ácido Acético 10 mL e H₂O 1000 mL (q.s.p.)

Observação: conservar em temperatura ambiente, abrigada da luz.

Para coloração das secções histológicas usou-se:

Hematoxilina de Harris:

Solução A – hematoxilina, 0,2g e Álcool absoluto, 20mL

Solução B – Alúmen de potássio, 40g e H₂O, 400mL

Preparo: Solução A+B e adicionar 1g de óxido de alumínio.

Eosina: Eosina, 1g e Álcool 95%, 100mL

Para dessecação dos carrapatos foi empregada uma solução salina (NaCl - 7.5 g/L, Na₂HPO₄ - 2.38 g/L e KH₂PO₄ - 2.72 g/L em 1000 mL de água destilada).

Para desidratação dos tecidos ovarianos fez-se passagens consecutivas com álcool (70, 80, 90 e 100%)

E para o processo de emblocamento dos tecidos desidratados, fez-se a embebição paraformaldeído 4% tamponado (pH 7,4) e posteriormente, em formas plásticas se adicionou Histoiresina (Histoiresina®, Leica, USA) e polimerizador.

4.2 MÉTODOS

A metodologia empregada em cada experimento foi descrita nas publicações e submissões de artigos em revista científicas elencadas nos capítulos abaixo.

5 RESULTADOS

Foram realizados 3 trabalhos e seus resultados e discussões se encontram nos capítulos abaixo, assim descritos:

- Capítulo 1

AVALIAÇÃO DA RADIAÇÃO IONIANTE EM OVÁRIOS DE *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (ACARI: IXODIDAE) ATRAVÉS DA TÉCNICA DO COMETA

- Capítulo 2

AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DOS OVÁRIOS DE CARRAPATOS *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* SUBMETIDOS À RADIAÇÃO IONIZANTE DO COBALTO-60

- Capítulo 3

EFEITO DO COBALTO-60 EM FÊMEAS DE *R.(B)microplus* NA POSTURA E NA INCUBAÇÃO DOS OVOS

CAPÍTULO 1

Artigo publicado em: Revista Faculdade do Saber, 04 (7): 466-471, 2019. ISSN nº 2448-3354.

AVALIAÇÃO DA RADIAÇÃO IONIANTE EM OVÁRIOS DE *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (ACARI: IXODIDAE) ATRAVÉS DA TÉCNICA DO COMETA

PASQUALINI,¹ A. A.; IRAZUSTA,² S. P.; V.; BALSAMO,³ P. J. ARTHUR,⁴

1- Alexandre Antono Pasqualini: Prof. Dr. ETEC Esp. Santo do Pinhal; 2- Profa. Dra.

Silvia Pierre Irazusta: LATAMO-FATEC Sorocaba; 3- Dr. Paulo Jose Balsamo: USFCAR

Sorocaba. 4- Prof. Dr. Valter Arthur: CENA-USP.

RESUMO

Avaliou-se os efeitos genotóxicos em tecidos ovarianos de ácaros do gênero *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, um carrapato que infesta, preferencialmente, bovinos com o intuito de aprimorar conhecimentos para se adaptar à técnica do inseto estéril como um meio de controle populacional deste parasita. Fêmeas ingurgitadas em fase de pré-postura foram irradiadas com doses de 0, 5, 10, 15, 20 e 25 Gy com Cobalto-60 e dentro de 24 horas foram dissecadas e seus ovários formaram uma amostra *pool* com os quais foi

realizado o teste do cometa e, a genotoxicidade inferida nestes tecidos foi proporcional ao aumento das doses ionizantes.

Palavras chave: acari, irradiação; teste do cometa; DNA

IONIAN RADIATION EVALUATION IN *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (ACARI: IXODIDAE) OVARIES THROUGH THE COMET TECHNIQUE

ABSTRAT

*The genotoxic effects on ovarian tissues of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* mites, a tick that preferentially infests cattle in order to improve knowledge to adapt to the sterile insect technique as a means of population control of this parasite, were evaluated. Pre-laying blood engorged females were irradiated at doses of 0, 5, 10, 15, 20 and 25 Gy with Cobalt-60 and within 24 hours were dissected and their ovaries formed a pool sample with which it was performed. comet testing and inferred genotoxicity in these tissues was proportional to the increase in ionizing doses.*

Keywords: acari; irradiation; comet assay; DNA

INTRODUÇÃO

O *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* pertence à ordem Acari e família do Ixodidae, é uma espécie de ácaro presente nos países de clima tropical e parasita diversos animais de interesse zootécnico, mas predominantemente, bovinos. No Brasil, o mercado industrial do setor agropecuário investiu 5,954 bilhões de reais no ano de 2018, sendo que 29% deste total estava relacionado ao emprego de produtos antiparasitários e, os ruminantes demandaram mais de 55% deste mercado (SINDAN, 2018).

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) através da Instrução Normativa - In nº 13 de 29/05/14, suspendeu o uso de lactonas macrocíclicas (avermectinas), endectocida de longa ação no mercado brasileiro, afetando diretamente a pecuária de corte, como também, a pecuária leiteira de animais jovens e a ovino caprinocultura e, posteriormente, revogou essa proibição em 27/03/2015, mas o mercado internacional não aceita produtos e derivados cárneos e lácteos com resíduos de avermectinas. Assim, se torna necessário pesquisar métodos alternativos de controle desse parasita em animais.

Os métodos de profilaxia empregados para as hemoparasitoses são: o controle dos vetores, a quimioprofilaxia, o uso de vacinas e para algumas espécies de insetos, já se emprega a técnica do inseto estéril.

Este trabalho buscou fomentar informações sobre os efeitos da radiação ionizante em fêmeas ingurgitadas na fase pré-postural de ácaros da espécie *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* através da exposição ao Cobalto-60 e avaliar através da técnica do cometa, se fomentar conhecimentos para o emprego da técnica modificada do inseto estéril, para a princípio, se inferir qual dose de radiação seria capaz de inviabilizar a postura ou a eclodibilidade dos ovos, através da avaliação da genotoxicidade nos tecidos ovarianos deste espécime.

MATERIAL E MÉTODOS

Fêmeas adultas e ingurgitadas de *R.(B.) microplus* em fase de pré postura, obtidas de infestação natural de vacas leiteiras da Escola Técnica ETEC Dr. Carolino da Motta e Silva em Espírito Santo do Pinhal, São Paulo (SP), sem tratamento acaricida há mais de 30 dias, foram lavadas, secadas e selecionadas dentro de um padrão morfológico e peso vivo aproximado de 0,2g. No Laboratório de Irradiação de Alimentos e Radioentomologia, CENA-USP, Piracicaba, SP. essas fêmeas foram irradiadas numa fonte de Co^{60} , no GAMMACELL 220, nas doses de 0, 5; 10; 15; 20; e 25 Gy (142 Gy/h.) na presença de oxigênio e em temperatura ambiente.

Elektroforese em gel de agarose

Vinte e quatro horas após a irradiação, no Laboratório de Toxicologia Ambiental e Ocupacional (LATAMO-FATEC) Sorocaba, SP, cinco fêmeas irradiada de cada dose, foram dissecadas e seus ovários separados, formando-se uma amostra constituído por um *pool* de tecidos e mantida em tampão PBS gelado em micro tubos. Posteriormente, essas amostras foram maceradas e promoveu-se uma suspensão celular que foi homogeneizada com agarose baixo ponto de fusão em lâminas previamente recobertas com agarose ponto de fusão normal (AZQUETA; COLLINS, 2013). O material foi coberto com uma lamínula para assegurar uma distribuição homogênea, e após a solidificação, as lamínulas foram removidas e as lâminas transferidas a uma solução de lise e pH >13, que contém tensoativos celulares (Triton X-100) para promoverem a ruptura das membranas (AZQUETA; COLLINS, 2013).

Posteriormente, as lâminas foram levadas para a cuba de eletroforese, utilizando-se 300 mA e 36 V. Os fragmentos de DNA livres, fracionados migraram em direção ao ânodo, dando origem a uma cauda de cometa. Neste trabalho empregou-se a coloração com nitrato de prata, pois tem como vantagens o fácil acesso, o uso de microscópio óptico comum e a possibilidade de armazenamento das lâminas (BRIANEZI *et al.*, 2009). Assim, foram analisados cerca de 50 cometas escolhidos ao acaso para a validação de cada amostra irradiada. O dano no DNA foi quantificado para cada célula individualmente e classificado em cinco categorias (0-4) correspondente à intensidades de danos do DNA:

Nível 0 = sem danos (<5%); Nível 1 = baixo nível de danos (5-20%); Nível 2 = médio nível de danos (20-40%); Nível 3 = alto nível de danos (40-95%) e Nível 4 = dano total (>95%).

RESULTADOS

Para avaliação e quantificação dos danos adotou-se como referência um gabarito confeccionado a partir da amostra de sangue total humano, utilizado como controle interno da reação (Figura 01).

Figura 01 - Níveis de cometa com células sanguíneas como referência comparativa ao experimento.
Fonte: Autor

Os resultados obtidos com o ensaio do cometa para avaliação dos danos ao DNA nos tecidos ovarianos dos ácaros submetidos às gradativas doses de radiação, mostraram que a intensidade das quebras aumentou com o aumento das doses, porém os danos mais severos (níveis 3 e 4) só ocorreram com a maior dose (25Gy). Na figura 02 se observa imagens do cometa em células de ovários e a classificação quanto ao dano celular. O Histograma da Figura 03 apresenta a frequência de cada nível de danos em porcentagem após a contagem de 50 nucleóides.

Figura 02. Imagens dos cometas das células de ovário. Em A. os cometas foram classificados em nível 0 e são do grupo controle; em B. observa-se cometas em nível 1; em C. os cometas estão no nível 3 e em D. a imagem é de um cometa nível 4. Aumento de 100X no fotomicroscópio Leyca.

Fonte: Autor

Figura 03. Histograma de distribuição dos diferentes níveis de dano (0-4) nas diferentes doses de radiação (0, 5, 10, 15, 20 e 25 Gy). Fonte: autor

DISCUSSÃO

O teste do cometa é uma ferramenta para estudos da genotoxicidade em processos relacionados a malformações, doenças congênitas, genéticas e degenerativas, envelhecimento celular, câncer, entre outras (ERDTMANN, 2003).

A eletroforese em gel de agarose é um método muito utilizado para a separação e visualização de fragmentos de DNA. A forma e o tamanho das bandas após a corrida são adotados como parâmetros para detectar as possíveis lesões geradas na molécula de DNA e

apresenta como vantagens avaliação de dano em células isoladas, quantidade pequena de amostra, da ordem de microlitros, utilização de qualquer tipo celular proliferativo ou não, avaliação da capacidade de reparo, além de apresentar uma boa sensibilidade para detecção de danos ocorridos no DNA (SPEIT; HARTMANN, 1999).

Contudo, o teste do cometa não permite identificar o tipo de dano no DNA. O estudo da cinética de reparo celular tem adotado como referência para danos de bases e quebras simples na fita do cromossomo, reparos com alta fidelidade dentro de 15 minutos após a irradiação, desde que a fita não danificada contenha a sequências de bases complementar para que possa ser usada como "template" no reparo. Quando o dano ocorre na fita dupla, onde ambas as fitas do DNA são afetadas, no mesmo sítio, pode ocorrer o reparo do DNA entre 2-3h (SINGH *et al.*, 1988; POPANDA *et al.*, 2003).

Com foco em danos causados pela radiação, Hill (1999) relatou que mais de 90% das quebras da fita dupla induzidas pela radiação γ são reparadas em 3 h; já as quebras na fita dupla produzidas pelas partículas α podem ser reparadas com uma redução de 30 – 50 % após 3 h.

Nascimento (2000) avaliou os danos e reparos do DNA em células sanguíneas de 3 doadores de sangue sadios e de 3 pacientes com câncer de mama, por meio da técnica de eletroforese, processando células 3 e 24 horas após a exposições *in vitro* com doses de 0,2 a 10 Gy de radiação gama de ^{60}Co (0,722Gy/min) e constatou que o dano ao DNA foi mais pronunciado logo após as irradiações e que as células apresentaram um aumento na migração de DNA em função da dose de radiação, tanto em doadores sadios como em pacientes com câncer de mama.

Oliveira (2000), utilizando ^{90}Sr e ^{90}Y com dose entre 0,2 a 5Gy adotando a referência de Estimativa de Dano ao DNA (DD) usualmente numa escala de 1- 4, de menor dano ao maior, constatou a correlação direta de maior dano celular proporcionalmente as doses de radiação Beta, similarmente ao padrão encontrado por Nascimento, 2000.

Valgôde (2008) estudando os efeitos da radiação gama do ^{60}Co em linhagens tumorais (T-47D e IVCIF-7) e não tumorais (MCF-10) originárias de mama humana, constatou que, uma hora após a exposição a 5; 10; 20 e 30 Gy (1,5 Gy/min), todas as linhagens exibiram uma redução considerável de dano quando comparadas com os valores iniciais e que após 3 horas, praticamente todo o dano radioinduzido havia sido reparado.

CONCLUSÃO

Este experimento se ateve em demonstrar que o dano celular foi proporcional a ao aumento das doses ionizantes com ^{60}Co em concordância com a literatura consultada, contudo demonstrou que as doses empregadas são consideradas baixas quando comparadas às empregadas em ácaros machos nos experimentos direcionados para a técnica do inseto estéril, mas que resultaram em severos danos celulares nos tecidos ovarianos, assim como, resultou em inviabilidade de nascituros, proporcionalmente às dose crescentes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AZQUETA, A; COLLINS, A. The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. **Archives of Toxicology**, New York, v. 87, n. 6, p. 949–968, jun. 2013.
- BRASIL **Instrução Normativa nº 13 de 29/05/14**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA).
- BRIANEZI, G.S. *et al.* Desenvolvimento e validação de técnica quantitativa de análise de imagem para avaliação do teste do cometa corado pela prata. **J Bras Patol Med Lab**, v. 45, n. 4, p. 325-334, agosto 2009
- ERDTMANN, B. A genotoxicidade nossa de todos os dias. In: Silva, J.; Erdtmann, B.; Henriques, J. A. P. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance. 2003.
- FAIRBAIRN, D.; OLIVE, P. L.; O'NEILL, K. L., The comet assay: a comprehensive review. **Mutat. Res.**, vol. 339, p 37-59, 1995.
- HILL, M.A. Radiation damage to DNA: the importance of track structure. **Radiation Measurements**, v.31, n.1-6, p.15-23, 1999.
- NASCIMENTO, P.A. Avaliação do dano radioinduzido e capacidade de reparo do DNA em pacientes com cancer de mama por meio da técnica do cometa. **Tese**. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. 2000. Acessado em 20/07/2019.
- OLIVEIRA, E.M. Avaliação do efeito da radiação bet dp ^{90}Sr em células sanguíneas humanas e elaboração de curva-resposta. **Dissertação**. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. 2000.
- POPANDA, O. *et al.* Radiation-induced DNA damage and repair in lymphocytes from breast cancer patients and their correlation with acute skin reactions to radiotherapy. **International Journal Radiation Oncology Biology Physics.**, v.55, n.5, p.1216-25, 2003
- SINDAN - Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal. **Mercado Brasileiro**. <http://www.sindan.org.br/mercado-brasil-2018/> Acessado 05/07/2018
- SINGH, N. *et al.* A simple technique for quantitation damage of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, New York, v.175, n. 1, p. 184–191, 1988.
- SPEIT, G.; HARTMANN, A. The comet assay (single-cell gel test). A sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. **Methods in Molecular Biology**, v113, p.203-12, 1999.

VALGÔDE, F.G.S. Avaliação do dano radioinduzido, capacidade de reparo e morte celular em células humanas tumorais (T-47D e MCF-7) e não tumorais (MCF-10) de mama. 2008. **Tese**. <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/85/85131/tde-16052012-141727/en.php>

CAPÍTULO 2

Artigo submetido à: Australian Journal of Basic and Applied Sciences em 08/01/20.
ISSN: 1991-8178 (print) **ISSN:** 2309-8414 (online).

AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DOS OVÁRIOS DE CARRAPATOS *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* SUBMETIDOS À RADIAÇÃO IONIZANTE DO Co⁶⁰

HISTOLOGICAL EVALUATION OF *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* OVARIES
SUBJECTED TO IONIZING RADIATION OF Co⁶⁰

Pasqualini, A.A.¹; Arthur, V.²; Schiavolin, M.B.³; Abreu, M.R.⁴; Camargo-Mathias, M.I.⁵

1- Alexandre Antonio Pasqualini: Prof. Dr. ETEC-Pinhal, SP.

2- Valter Arthur: Prof. Dr. IPEN / CENA – USP, SP.

3- Michelen Barbosa Schiavolin: Biomédica bolsista FAPESP (2017/18853-0)

4- Marina Reis Abreu: Msc. Biologia Celular e Molecular, Instituto de Biociências -UNESP-Rio Claro, SP

5- Maria Izabel Camargo Mathias: Profa. Dra. Departamento de Biologia do Instituto de Biociências da UNESP de Rio Claro (SP).

Palavras Chaves: carrapato, cobalto⁶⁰, histologia, ovários

RESUMO

Fêmeas de carrapatos *R.(B)microplus* ingurgitadas e na fase de pré postura foram submetidas às doses de 0, 5, 10, 15, 20 e 25 Gy com o objetivo de se avaliar os seus efeitos sobre a morfohistologia dos ovários com consequente estabelecimento do grau de dano causado nos órgão do aparelho reprodutor desta espécie. Para tanto, 24 horas após a exposição ao Co⁶⁰ (142 Gy/h) os ectoparasitas foram dissecados e tiveram seus ovários retirados e preparados para histologia com coloração H-E. Os resultados obtidos demonstraram que a radiação à dose de 5 Gy teve aspecto morfohistológico semelhante ao padrão controle adotado. As seções histológicas relativas às doses de 10 e 15 Gy não causaram muitas modificações nos ovários, exceto que foram observadas alterações nos grânulos de vitelo (tamanho, distribuição e padrão de coloração), bem como a extensa presença de vacúolos

citoplasmáticos nos ovócitos, principalmente na região que faz o contato ovócito/pedicelo, sugerindo a ocorrência de alterações também na fisiologia do órgão. Nos ovários expostos às doses de 20 e 25 Gy, observou-se severas alterações no órgão como um todo, bem como nas células germinativas (ovócitos) as quais sofreram modificações no tamanho e forma, distribuição dos grânulos de vitelo, comprometimento do DNA presente na vesícula germinal (núcleos do ovócito), além da extensa vacuolização citoplasmática, alterações estas que inviabilizaram o amadurecimento destas células e consequentemente inibiu a produção de novos indivíduos.

ABSTRAT

Engorged R. (B) microplus ticks and pre-laying females were submitted to doses of 0, 5, 10, 15, 20 and 25 Gy in order to evaluate their effects on ovarian morphohistology with consequent establishment. degree of damage to the organs of the reproductive tract of this species. Therefore, 24 hours after exposure to Co60 (142 Gy / h) the ectoparasites were dissected and their ovaries removed and prepared for histology with H-E staining. The results showed that the radiation at the dose of 5 Gy had morphologic aspect similar to the control standard adopted. The histological sections related to the 10 and 15 Gy doses did not cause many changes in the ovaries, except that changes in the calf granules (size, distribution and staining pattern) were observed, as well as the extensive presence of cytoplasmic vacuoles in the oocytes, especially in the oocytes. region that makes oocyte / pedicel contact, suggesting changes in organ physiology as well. In the ovaries exposed to doses of 20 and 25 Gy, severe changes were observed in the organ as a whole, as well as in the germ cells (oocytes) which suffered changes in size and shape, distribution of calf granules, impairment of DNA present in the ovaries. germinal vesicle (oocyte nuclei), in addition to extensive cytoplasmic vacuolization, alterations that prevented the maturation of these cells and consequently inhibited the production of new individuals.

Key words: tick, cobalt⁶⁰, histology, ovaries

INTRODUÇÃO

O *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* pertence à ordem Acari e família Ixodidae, é uma espécie de ácaro presente nos países de clima tropical e parasita diversos animais de interesse zootécnico, mas predominantemente, bovinos. No Brasil, o mercado industrial do

setor agropecuário investiu 5,954 bilhões de reais no ano de 2018, sendo que 29% deste total estavam relacionados ao emprego de produtos antiparasitários e, os ruminantes demandaram mais de 55% deste mercado (SINDAN, 2018).

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) através da Instrução Normativa - In nº 13 de 29/05/14, suspendeu o uso de lactonas macrocíclicas (avermectinas), endectocida de longa ação no mercado brasileiro, afetando diretamente a pecuária de corte, como também, a pecuária leiteira de animais jovens e a ovino caprinocultura e, posteriormente, se revogou essa proibição em 27/03/2015, mas o mercado internacional não aceita produtos e derivados cárneos e lácteos com resíduos de avermectinas. Assim, se torna necessário pesquisar métodos alternativos de controle desse parasita para esses animais.

Os métodos de profilaxia empregados para hemoparasitas são: o controle dos vetores, rodízios de pastagens, a quimioprofilaxia, o uso de vacinas e para algumas espécies de insetos, já se emprega a técnica do inseto estéril (TIE).

A TIE consiste em criar em laboratório os machos de espécimes alvo, que são esterilizados por meio do processo de irradiação e posteriormente serão libertados no ambiente para que se acasalem com fêmeas silvestres e consequentemente, não resultando a descendência de insetos, o que provocaria uma gradativa diminuição da população selvagem sem poluir o ambiente (ARTHUR *et al.*, 2015).

Assim, este trabalho teve como objetivo trazer à luz mais informações sobre os efeitos da radiação ionizante nos tecidos de carrapatos da espécie *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, especialmente naqueles que fazem parte dos ovários, onde fêmeas ingurgitadas, na fase de pré postura, foram expostas ao Cobalto-60 em diferentes dosagens e posteriormente, por meio da aplicação de técnicas histológicas de rotina, avaliou-se se houve ou não a ocorrência de danos e, ainda, em caso positivo, qual foi a dosagem mais agressiva, no sentido de inviabilizar o desenvolvimento das células germinativas (ovócitos). Paralelo aos resultados histológicos também fez-se a avaliação da genotoxicidade dos efeitos ionizantes nestes órgãos, a taxa de postura e de eclodibilidade dos ovos para se adotar referências e se desenvolver a técnica do inseto estéril.

MATERIAL E MÉTODOS

Vinte e cinco fêmeas adultas e ingurgitadas de *R.(B.) microplus* em fase de pré postura, obtidas de infestação natural de vacas leiteiras na Escola Técnica ETEC Dr. Carolino da Motta e Silva em Espírito Santo do Pinhal, São Paulo (SP), latitude 22°11'27" sul e longitude 46°44'27" oeste, sem tratamento acaricida há mais de 30 dias, foram lavadas,

secas e selecionadas dentro de um padrão morfológico quanto sua integridade física, motilidade e vivacidade, com peso médio de 0,2g. No Laboratório de Irradiação de Alimentos e Radioentomologia, CENA-USP, Piracicaba, SP, estas fêmeas foram irradiadas numa fonte de Co^{60} , no GAMMACELL® 220 Excel (MSD-Nordion), nas doses de 0, 5; 10; 15; 20; e 25 Gy (142 Gy/h.) (5 fêmeas/dose) em temperatura ambiente e na presença de oxigênio.

Preparo histológico

No Laboratório de Histologia, do Departamento de Biologia da UNESP de Rio Claro, SP, as 25 fêmeas irradiadas foram anestesiadas por choque térmico em refrigerador, por 5 minutos. Na sequência as mesmas foram colocadas em placas de Petri contendo solução tampão fosfato (PBS), (NaCl - 7.5 g/L, Na_2HPO_4 - 2.38 g/L e KH_2PO_4 - 2.72 g/L em 1000 mL de água destilada) e, dissecadas com tesouras e pinças oftalmológicas para extração dos ovários. O material foi colocado em tubos Eppendorff contendo solução de paraformaldeído 4% tamponado (pH 7,4) onde permaneceu por 48 horas. Depois procedeu-se a desidratação do material em série crescente de álcool (70, 80, 90 e 100%) em intervalos de 30 minutos, para ser posteriormente incluído em resina de embebição (Historesina®, Leica, USA) por 48h. Ao final desse período o material foi colocado em moldes plásticos contendo resina mais polimerizador e deixado em estufa a 37°C para endurecimento dos blocos. Estes foram depois seccionados em micrótomo LEICA® RM 2255, com secções de 3 μm de espessura, que foram recolhidas em lâminas de vidro previamente limpas (Fig. 1).

As lâminas contendo as secções foram coradas pela hematoxilina de Harris durante 8 minutos. Depois de lavadas em água corrente, foram coradas pela eosina aquosa, por mais 10 minutos, e novamente lavadas em água corrente. Após a obtenção e coloração das secções as lâminas que as continham foram colocadas em suportes de madeira para secagem à temperatura ambiente. Depois as mesmas foram cobertas com bálsamo do Canadá e lamínulas (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2000), novamente colocadas em estufa para secagem por aproximadamente 72h, para serem posteriormente observadas e documentadas sob fotomicroscópio de luz de campo claro LEICA® DM750.

Figura 1A: *pool* de ovários que foram retirados das fêmeas de cada tratamento para serem processados para histologia. **B:** blocos de madeira onde foram colados os materiais já incluídos na resina. **C:** fotografia do micrótomo modelo Leica RM2255 onde as secções histológicas foram obtidas. Fonte: o próprio autor

RESULTADOS

Os resultados histológicos obtidos, mostraram que o aspecto íntegro é preservado nos ovários das fêmeas de *R.(B)microplus* que não foram irradiadas e, aqui foram denominados de controle, estando exemplificado na Figura 2 (adaptado de Saito *et al.*, 2005). Nesta pode se observar vários ovócitos em vários estágios de desenvolvimento (II a VI), presos à parede do ovário por um pedicelo, constituído também por células epiteliais, assim como o próprio ovário. Em alguns dos ovócitos é possível observar a presença do núcleo celular, que nestas células é denominado de vesícula germinal.

Figura 2: Secção histológica de ovário controle (de fêmea não irradiada) de *R. (B) microplus* onde podem ser observados ovócitos em diferentes estágios de desenvolvimento (II-V) incluindo o estágio VI, ovócitos que estão sendo reabsorvidos e cujos restos serão reaproveitados pelo próprio carrapato: **pe:** pedicelo; **lu:** lúmen do ovário; **ec:** células epiteliais da parede do ovário; **vg:** vesícula germinal. Fonte: Adaptado de Saito *et al.*, 2005.

FÊMEAS IRRADIADAS

Dose de 5 Gy

Os ovários das fêmeas ingurgitadas expostas a dose de 5 Gy permaneceram com aspecto histológico semelhante àquele observado nos ovários das fêmeas alocadas no grupo controle, ou seja, não foram observadas alterações significativas.

Doses de 10 e 15 Gy

Os resultados histológicos dos ovários das fêmeas expostas às doses de 10 e 15 Gy mostraram que, principalmente na dose de 15 Gy ocorreram alterações nos ovários (Fig. 3). Pode se observar alterações que incluíram mudanças no tamanho dos ovócitos, mudanças na sua forma, além de mudanças na sua constituição citoplasmática, visto que, extensa vacuolização foi detectada no interior dos ovócitos e, muitas vezes presentes na região de contato entre o limite celular dos ovócitos e as células do pedicelo. Estas últimas também sofreram alterações, principalmente vacuolização citoplasmática. Em algumas células da parede do ovário foi possível observar a presença de vários núcleos picnóticos, ou seja, com sua cromatina totalmente condensada, indicativo de morte celular.

Figura 3: Histologia do ovário de fêmeas irradiadas com Co^{60} na dose de 15 Gy . Podem ser observados ovócitos nos diversos estágios de desenvolvimento (I-IV) com deformações e tamanhos modificados. Extensa vacuolização pode ser observada no citoplasma, além de células epiteliais da parede dos ovários com núcleos picnóticos.

pe : pedicelo; **lu**: lúmen; **ec**: epitélio do ovário; **co**: cório; **va**: vacúolos. Magnification 200 X

Dose de 20 Gy

Nas fêmeas irradiadas com 20 Gy (Fig. 4), observou-se que os ovários sofreram alterações muito semelhantes àsquelas observadas na dose de 15 Gy (Fig. 3). Pode-se verificar que um grande número de ovócitos apresentou alteração morfológica representada por uma constrição mediana. Outra alteração observada foi que nem todos os estágios de desenvolvimento estavam presentes nesses ovários, estando a maioria deles em estágios denominados de imaturos, onde os grânulos de vitelo ainda não foram totalmente depositados, bem como seus componentes essenciais, a saber, proteínas, lipídeos e carboidratos, sugerindo que a radiação impediu o desenvolvimento destas células e passagem para os estágios subsequentes.

Figura 4: Secção histológica de ovário de fêmea irradiada com dose de 20 Gy de Co^{60} . Observar a ausência de alguns estágios de desenvolvimento dos ovócitos. As células dos pedicelos apresentam vacuolização ao redor dos seus núcleos.

pe: pedicelo; **lu:** lúmen; **ec:** epitélio do ovário; **co:** cório; **va:** vacúolos; **vg:** vesícula germinal. Magnification 200X.

Fonte: o próprio autor

Dose de 25 Gy

Os ovários retirados das fêmeas irradiadas com dose de 25 Gy (Fig. 5), foram aqueles que mais sofreram alterações morfohistológicas quando comparados com os ovários das fêmeas do grupo controle. Os ovócitos IV e V, apresentaram extensa e significativa vacuolização citoplasmática, também concentradas muitas vezes na região de contato entre

o pedicelo e o limite do ovócito. As células do pedicelo apresentaram-se hipertrofiadas e com seus núcleos com extensa vacuolização ao redor. Ficou bastante evidente que a vesícula germinal de vários ovócitos, principalmente daqueles em estágios imaturos, apresentou alterações, inclusive a presença de nucléolo em anel, uma característica típica de células que estão com seu DNA alterado.

Figura 5: ovários de fêmeas irradiadas com dose de 25 Gy de Co⁶⁰, onde pode-se observar que os efeitos da radiação foram muito mais agressivos do que aqueles irradiados com doses menores. Observar extensa vacuolização no citoplasma dos ovócitos (estágios de II a IV), em especial no contato ovócito/células do pedicelo. Houve uma hipertrofia das células do pedicelos e extensa vacuolização ao redor do núcleo das mesmas. Magnification 200X.

pe : pedicelo; **lu:** lúmen; **ec:** epitélio do ovário; **co:** cório; **va:** vacúolos; **vg:** vesícula germinal.

Fonte: o próprio autor.

DISCUSSÃO

Os estudos que vem sendo desenvolvidos sobre a reprodução dos carrapatos tem mostrado que existem diferenças morfológicas e histológicas nos ovários das espécies entre as famílias Argasidae e Ixodidae e até mesmo dentro dos ixodídeos (DENARDI *et al.*, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2006). O ovário dos carrapatos, assim como em alguns insetos é do tipo panoístico, ou seja, não possuem células nutridoras (DENARDI *et al.*, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2006) e no caso dos carrapatos, também estão ausentes as células foliculares. Este órgão está constituído por uma parede de células epiteliais, e nos locais onde os ovócitos se prendem à parede, essas células se dividem e vão formar os chamados

pedicelos, estruturas que são responsáveis não somente por manter os ovócitos fixados à parede do ovário, mas também por captar elementos (proteínas, carboidratos e lipídeos) da hemolinfa e enviá-los para o interior do ovócito onde ali comporão os grânulos de vitelo (DENARDI *et al.*, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2006, RICARDO *et al.*, 2007), uma vez que nos ovários panoísticos não existe a presença de células nutridoras, as células do pedicelo as substituiriam nesta função específica.

Os estudos com ovários de carrapatos têm se intensificado, uma vez que o sistema reprodutor é aquele responsável por fornecer as células germinativas que se desenvolverão e que darão origem aos novos indivíduos, preservando assim a espécie (CAMARGO-MATHIAS *et al.*, 2017). Assim, buscar alternativas que consigam inibir o desenvolvimento do sistema reprodutor pode representar uma estratégia para se conseguir controlar esses ectoparasitas que tantos danos causam aos seus hospedeiros e a economia do países.

Nessa direção, o uso da radiação ionizante tem sido empregado como estratégia de controle populacional de algumas espécies de insetos através da TIE. No Brasil, a literatura consultada relata o emprego desta técnica em diversas espécies de insetos, como os estudos realizados por Rocha *et al.*, (2014) no controle das moscas da fruta (*C. Capitata*; *A. fraterculus*); o estudo sobre os efeitos da radiação gama em cigarrinhas da folha da cana de açúcar (*Malhanarva posticata*) nas condições do nordeste brasileiro (RODRIGUES *et al.*, 1978); o estudo de esterilizações da brocas do abacate (*Stenoma catenifer*) (SILVA *et al.*, 2007) e, as pesquisas em curso realizadas na MOSCAMED® com *Aedes aegyti*, são exemplos desta técnica como mais uma opção ao controle biológico de pragas.

Assim, buscou-se parâmetros morfológicos e biológicos em outros experimentos que empregaram protocolos acaricidas e ionizantes em insetos e ácaros de outras espécies e tentar se estabelecer uma relação dos achados morfofisiológicos de fêmeas ingurgitadas de *R.(B)microplus* na fase pré postura, submetidas a radiação ionizante para o desenvolvimento da TIE.

Dentre os trabalhos desenvolvidos anteriormente e que buscaram formas para controlar os carrapatos, estão aqueles de Sousa *et al.* (2013) que avaliaram por meio de técnicas histológicas a morfohistologia do ovário de fêmeas ingurgitadas de *R.(B)microplus* expostas ao extrato hexânico de frutos verdes de *Melia azedarach*, onde verificaram que os ovários reduziram de peso, tiveram predomínio de ovócitos nos estágios imaturos, tiveram o tamanho da célula e dos seus núcleos diminuídos, extensa vacuolização citoplasmática e desorganização dos grânulos do vitelo, o que certamente impediu que esses ovócitos

chegassem aos próximos estágios de desenvolvimento, caracterizando assim a inibição da produção de novos indivíduos.

Outro trabalho desenvolvido por Oliveira (2010), expôs fêmeas de *Rhipicephalus sanguineus* ao acaricida fipronil nas concentrações de 1, 5 e 10 ppm *in vitro*, obtendo resultados que mostraram que a maior dose empregada provocou alterações morfológicas que incluíram desde a presença de poucos e pequenos vacúolos até a interrupção da vitelogênese e morte celular.

Camargo-Mathias *et al.*, (2017) relataram que o uso do piretróide deltametrina (Butox®) nas concentrações de 25-200 ppm em *R. sanguineus* resultaram, nas maiores concentrações empregadas, alterações morfofisiológicas nos ovários, com efeitos em todos os estágios de desenvolvimento dos ovócitos, desorganização do citoplasma, intensos processos de vacuolizações, modificações do processo de secreção e estrutura do córion, segmentação da cromatina, causando danos na vesícula germinativa, resultando assim no comprometimento do desenvolvimento celular e consequentemente, inviabilidade dos ovos.

As lesões teciduais evidenciadas nos achados histológicos de ovários e seus anexos em insetos e ácaros expostos à piretróides e fipronil podem ser descritas como processos autofágicos que resultariam da atividade de hidrólise ácida (fosfatase ácida), evidenciados por extensos e numerosos vacúolos autofágicos e consequente destruição celular, como também, por processos apoptóticos, onde a ação de endonucleases, clivariam o material genético, acabando por resultar na condensação da cromatina e morte celular (CASTANHA-ZANOLI *et al.*, 2012).

Outros processos que também descreveriam a ocorrência de hidrólises e apoptoses em células eucarióticas decorrentes da exposição à piretróides e ao fipronil foram descritos por Schimith *et al.* (2017) e Palma (2014), respectivamente, como resultantes da disfunção respiratória mitocondrial ocasionada pelo aumento da permeabilidade de suas membranas e assim, comprometendo a formação do gradiente eletroquímico de prótons e, consequentemente, da produção de adenosina trifosfato (ATP). Uma vez comprometida a função mitocondrial, ocorre disfunção no metabolismo oxidativo que controlam as vias apoptóticas e necróticas das células.

Assim, caso estes inseticidas não promovessem a morte dos espécimes alvos, suas funções reprodutivas estariam comprometidas pelos severos danos teciduais nos ovários e ovócitos.

O emprego da radiação ionizante através na TIE visa estabelecer o controle populacional ou erradicação de uma espécie alvo através da esterilização de fêmeas,

aspermia ou azoospermia em machos, inabilidade para acasalamentos ou mutação letal dominante, tanto em machos como nas fêmeas sem o risco de contaminação ambiental ou intoxicações de predadores naturais decorrentes do uso inadequado dos pesticidas (SILVA; ARTHUR, 2004).

Neste contexto, Cantwell; Henneberry (1964) realizaram um experimento utilizando moscas machos e fêmeas de *Drosophila melanogaster meigen*, com 3 a 4 dias de idade expostas à radiação entre 80 e 160 Gy de Co⁶⁰. Os ovários das fêmeas foram removidos e ao analisarem em microscopia ótica, constataram significativa redução do tamanho do órgão, completa quebra dos ovócitos, células foliculares e desarranjo estrutural dos tecidos adjacentes, além de que, nenhuma fêmea realizou postura de ovos com a dose de 160 Gy.

El Naggar *et al.* (2010) estudaram a morfologia e histologia do ovário do gorgulho vermelho da palmeira, *Rhynchophorus ferrugineus*, submetidas às doses de 5, 10 e 15 Gy de radiação gama e posteriormente, acasaladas com macho não irradiados. O efeito da irradiação gama na morfologia dos ovários mostrou que houve alongamento do filamento terminal, a ruptura, a separação ou o encolhimento da bainha externa do epitélio folicular, degeneração ou ausência de células nutridoras e ovócitos rompidos e, vacuolizações apareceram em diferentes graus dentro dos oócitos a 15 Gy.

Walder; Calkins (1992) avaliaram pupas pré emergentes de Mosca do Caribe (*Anastrepha suspensa*) irradiadas com ¹³⁷Cs nas doses 0, 15, 20, 25, 30, 50 e 70 Gy e dissecaram as fêmeas que nasceram nos intervalos 1, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 dias para avaliar os efeitos da radiação nos ovários e, relataram que nas doses de 15 Gy os ovários já apresentavam significativa alterações de conformação; com doses de 20 Gy os ovários apresentaram número reduzido de ovócitos em seu interior e doses igual e superior a 25 Gy causaram severa atrofia dos ovários e danos irreversíveis nos tecidos germinativos, sem regeneração tecidual aparente.

Quando se emprega alguma forma de radiação ionizante, eletromagnética (raios-X e gama) ou particulada (nêutrons e partículas alfa e beta), a energia absorvida por um material biológico pode vir a interagir diretamente com alvos celulares, dentre eles o DNA. vindo modificar sua estrutura ou por ação direta, através da quebra nas fitas simples e duplas da molécula, entre DNA e proteínas ou mesmo nas bases púricas e pirimídicas e, por ação indireta, quando ocorre transferência de energia da radiação às moléculas circundantes do DNA, especialmente a água, levando ao início à uma cadeia de reações químicas e bioquímicas, que resultam na produção de radicais livres que podem afetar a estrutura e a

função celular. Tanto os efeitos diretos, como os indiretos, produzem uma variedade de lesões à molécula de DNA (HALL, 2000).

Ainda hoje busca-se entender como as células respondem ao estresse oxidativo resultante de exposição à radiação ionizante e, conseqüentemente, o destino posterior de células irradiadas, isto é, se elas morrem por apoptose ou necrose ou sobrevivem e se proliferam.

Bakri *et al.*, (2005), compilaram diversas publicações sobre doses esterilizantes por radiação ionizante em artrópodes com insetos e ácaros: de 130 a 400 Gy em Lepidóptera, de 30 a 280 Gy em Acari, 40 a 200 Gy em Coleopteros, de 10 a 180 Gy em Hemipteros, de 20 a 160 Gy em Dípteros, de 20 a 150 Gy em Araneae, de 5 a 140 Gy em Dictyoptera, de 100 Gy em Thysanoptera, e 4 Gy em Orthoptera.

Como para cada espécie de insetos e ácaros há um estágio de desenvolvimento mais apropriado para a esterilização (SILVA; ARTHUR, 2004), visando a possibilidade de acasalamentos com seus pares, os achados histológicos deste trabalho evidenciou que os tecidos dos ovários e seus anexos expostos às doses até 15 Gy apresentaram efeitos estocásticos, que poderiam aplicados à TIE, ao passo que a exposição às doses de 20 e 25 Gy apresentaram efeitos determinísticos, representados pela desnaturações teciduais.

CONCLUSÃO

A análise de lâminas histológicas de ovários de fêmeas de *R.(B)microplus* em fase de pré postura, dissecadas e coradas com H-E, 24h após a exposição à radiação gama do Co⁶⁰, submetidas às doses de 20 e 25 Gy, observou-se os efeitos agudos nos tecidos ovarianos e seus anexos, com significativa desorganização dos ovócitos que resultaria em morte celular e reduzida viabilidade de postura. As seções histológicas relativas às doses de 10 e 15 Gy não evidenciaram efetiva alteração dos pedicelos ou epitélio dos ovários, contudo, desarranjos das granulações do vitelo e a presença de numerosos vacúolos nos ovócitos, principalmente identificados na região proximal dos pedicelos, o que sugere degeneração celular ou autofagia, o que comprometeria a viabilidade de muitos ovos. Os achados histológicos dos tecidos expostos à dose de 5 Gy foram de aspecto morfohistológico semelhante ao padrão controle adotado.

REFERÊNCIAS

- ARTHUR, V.; MARCHI, R.A.; MASTRANGELO, T. **Ionizing Radiation in Entomology**: In: Topics in Ionizing Radiation Research, II Ed., In Tech. n. 1, p. 1-17, 2015.
- BARKI, A.; HEATHER, N.; HENDRICH, J.; FERRIS, J. Fifty Years of Radiation Biology in Entomology: Lessons Learned from IDIDAS. **Ann. Entomol. Soc. Am.**, v. 98, n. 1, p.1-12, 2005.
- BLANK, K R *et al.*, The molecular of apoptosis and implications for radiation oncology. **Int J. Radiat Biol**, V. 71 , n. 5, p. 455-466, 1997.
- BRASIL. **INSTRUCAO_NORMATIVA** 13 de maio de 2013. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). DOU de 30/05/2014.
- CANTWELL, G.E.; HENNEBERRY, T.J.S. The effects of gamma radiation and apholate on the reproductive tissues of *Drosophila melanogaster meigen*. **J. Insect Pathol.**: Vol: 5; Other Information: Orig. Receipt Date 1964. Acessado: <https://www.osti.gov/biblio/4151240> em 27/07/2019.
- CAMARGO-MATHIAS, M.I. *et al.* Deltamethrin as inductor agent of precocious ovarian degeneration in *Rhipicephalus sanguineus* s.l. (Acari: Ixodidae) ticks. **Exp Appl Acarol**. Springer International Publishing Switzerland, 2017.
- DENARDI, S.E. *et al.* Morphological characterization of the ovary and vitellogenesis dynamics in the tick *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, 125(3-4), p. 379–395, 2004.
- CASTANHA-ZANOLI, J.C. *et al.* Abamectin affects the bioenergetics of liver mitochondria: A potential mechanism of hepatotoxicity. **Toxicol. in vit**, v.26, p. 51-56, 2012.
- EL NAGGAR, S.E.M.; MOHAMED, H.F.; MAHMOUD, E.A. Studies on the morphology and histology of the ovary of red palm weevil female irradiated with gamma rays. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, 13(1), p. 9–16, 2010.
- HALL, E. J. Radiobiology for the Radiologist Lippincot Williams & Wilkins. cap. 3, **Cell survive curves**, p. 33-50, 2000.
- JUNQUEIRA, I.C.; CARNEIRO, J. **Biologia Celular e Molecular**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, pp. 90–92. (Eds.), 2000.
- MOSCAMED - **Biofábrica Moscamed Brasil** - Av. C1, 992 - Quadra D 13, Lote 15, Distrito Industrial do São Francisco, Juazeiro - BA - Brasil - CEP 48.908-000 Telefone e Fax: (74) 3612.5399; E-mail: biofabrica@moscamed.org.br
- OLIVEIRA *et al.*, Morfological characterization of the ovary and oocytes vitellogenesis of the R. sanguineus (Acari:Ixodidae). **Experimental Parasitology**, San Diego, V.110, p.146, 2005.
- OLIVEIRA, P.R.; CAMARGO-MATHIAS, M.I.; BECHARA, G.H. Amblyomma triste (Koch, 1844) (Acari: Ixodidae): Morphological description of the ovary and of vitellogenesis. **Experimental Parasitology**, 113(3), 179–185, 2006.
- OLIVEIRA, P.R. Avaliação dos efeitos do fipronil (ingrediente ativo do FRONTLINE®) nos ovários de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) e no sangue periférico de roedores. **Tese** - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, 2010.

PALMA, I. D. F. Fipronil na bioenergética de mitocôndrias isoladas de fígado de rato. **Dissertação (mestrado)** - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Medicina Veterinária, 2014.

RICARDO, A.J. *et al.* Ultrastructural detection of proteins, lipids and carbohydrates in oocytes of *Amblyomma triste* (Koch, 1844) (Acari; Ixodidae) during the vitellogenesis process. **Tissue and Cell**, V.39, p. 203–215, 2007.

SAITO, K.C. *et al.* Morphological, histological, and ultrastructural studies of the ovary of the cattle-tick *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology** n.129 p.299–31, 2005.

SCHIMITH, L.E. *et al.* Exposição à permetrina no estágio larval induz disfunção mitocondrial em larvas de *Danio reiro*. **Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão**. v.9, n.3, 2017. <http://200.132.146.161/index.php/siepe/article/view/30004>. Acessado em 04/01/20.

SINDAN. **Representatividade por classe terapêutica**. Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal. <http://www.sindan.org.br/mercado-brasil-2018>. Acessado em 17/03/2019.

SILVA, L.K.F.; Arthur, V.; Nava, D.E.; Parra, J.R.P., Uso da radiação gama do Cobalto-60 visando ao tratamento quarentenário e a esterilização de *Stenoma catenifer* Walsingham (Lepidoptera: Elachistidae). **Bol. San. Veg. Plagas**, 33: 427-438, 2007.

SILVA, L. K. F.; ARTHUR. V... Efeito do fracionamento de dose de radiação gama sobre *Sitophilus oryzae* (L., 1763)(Col., Curculionidae), *Rhyzopertha dominica* (F., 1792)(Col., Bostrichidae) e *Tribolium castaneum* (Herb. 1797) (Col., Tenebrionidae). **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 71, n. 2, p. 253-256, 2004.

SOUSA, L.A.D. *et al.* Ovary histology and quantification of hemolymph proteins of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* treated with Melia azedarach. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, Jaboticabal, v. 22, n. 3, p. 339-345, jul.-set. 2013.

ROCHA, A.C.P, *et al.* Morfologia do sistema reprodutor e produção de espermatozoides de machos irradiados de *Ceratitis capitata* (Wied.) (Diptera: Tephritidae), linhagem tsl – Vienna. **XXV Congresso Brasileiro de Entomologia**. http://www.seb.org.br/cbe2012/trabalhos/1024/1024_1.pdf Acessado em 15/11/ 2014

RODRIGUES, Z.A. Efeitos da radiação gama em *Malhanarva posticata* (Stal,1855) nas condições do nordeste brasileiro. **Rev. Nordest. Biol.**, 1(I): 83-88, junho de 1978.

WALDER, J.M.; CALKINS, C.O. Gamma Radiation Effects on Ovarian Development of the Caribbean Fruit Fly, *Anastrepha Suspensa* (Loew) (Diptera: Tephritidae), and its Relationship to Sterile Fly Identification. **Research Reports**: Vol.75, No. 2, 1992. <https://journals.flvc.org/flaent/article/view/58841>. Acessado em 18/03/19.

CAPÍTULO 3

PUBVET v.14, n.2, a516, p.1-6, Fev., 2020 <https://doi.org/10.31533/pubvet.v14n2a516.1-6>

Efeito do cobalto-60 em fêmeas *R. (B) microplus* na postura e na incubação dos ovos

Alexandre Antonio Pasqualini¹ & Valter Arthur²

1- *Doutorando, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, USP. Prof. Msc.*

ETEC Espírito Santo do Pinhal, SP

2- *Prof. Dr. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares/ centro de energia nuclear na agricultura / CENA-USP, Piracicaba, SP*

Autor para correspondência, E-mail: xpasq@yahoo.com

RESUMO

Este trabalho buscou avaliar os efeitos do Co⁶⁰ na postura de fêmeas ingurgitadas do carrapato *R.(B) microplus* na fase de pré postura e na eclodibilidade de seus ovos quando submetidas às doses de 0 a 400 Gy onde constatou-se que a radiação ionizante afetou em aproximadamente 70% o peso da postura dos ovos destas fêmeas, que a taxa de eclosão dos ovos do Controle foi 68,2% maior que a menor dose ionizante, o Tratamento com 5 Gy, que quanto maior a dose de radiação, menor o índice de eclosões e nos tratamentos que receberam doses maiores de 20 Gy, não ocorreram eclosões das posturas, estabelecendo-se assim um marco para se estudar a aplicação de técnica do inseto estéril neste espécime.

Palavras chave: carrapato, incubação, irradiação, postura.

Effect of cobalt-60 on R. (B) microplus females on egg laying and incubation

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the effects of Co⁶⁰ on the posture of engorged females of tick R. (B) microplus in the pre-laying phase and on the hatchability of their eggs when submitted to doses from 0 to 400 Gy where it was found that ionizing radiation affected approximately 70% the egg laying weight of these females, that the egg hatching rate of the Witness was 68.2% higher than the lowest ionizing dose, the 5 Gy Treatment, that the higher the radiation dose, the lower the index. of hatching and treatments that received doses higher than 20 Gy, there were no hatching of the postures, thus establishing a milestone to study the application of sterile insect technique in this specimen.

Key words: tick, incubation, irradiation, posture.

Efecto de cobalto-60 en hembras *R. (B) microplus* sobre la puesta e incubación de huevos

RESUMEN

*Este estudio tuvo como objetivo evaluar los efectos de Co^{60} en la postura de las hembras congestionadas de la garrapata *R. (B) microplus* en la fase de pre-puesta y la incubabilidad de sus huevos cuando se sometieron a dosis de 0 a 400 Gy, donde se descubrió que la radiación ionizante afectaba aproximadamente el 70% del peso de la puesta de huevos de estas hembras, que la tasa de eclosión del testigo fue un 68,2% más alta que la dosis ionizante más baja, el tratamiento de 5 Gy, que cuanto mayor es la dosis de radiación, menor es el índice de eclosión y tratamientos que recibieron dosis superiores a 20 Gy, no hubo eclosión de las posturas, estableciendo así un hito para estudiar la aplicación de la técnica de insecto estéril en este espécimen.*

Palabras clave: garrapata, irradiación, postura, incubación.

Introdução

O *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* pertence à ordem Acari e família Ixodidae, é uma espécie de ácaro presente nos países de clima tropical e parasita diversos animais de interesse zootécnico, mas predominantemente, bovinos. No Brasil, o mercado industrial do setor agropecuário investiu 5.954 bilhões de reais no ano de 2018, sendo que 29% deste total estavam relacionados ao emprego de produtos antiparasitários e, os ruminantes demandaram mais de 55% deste mercado (SINDAN, 2018).

Buscou-se avaliar os efeitos da radiação gama na postura e na eclodibilidade dos ovos de fêmeas ingurgitadas do carrapato da espécie *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* submetidas a uma fonte de Cobalto-60, utilizando o Gammacell-220®, instalado no CENA, Piracicaba, SP, afim de se fomentar conhecimentos para a realização da Técnica do Inseto Estéril (TIE) e assim se propor uma nova perspectiva para um controle parasitário.

Material e Métodos

Fêmeas adultas e ingurgitadas de *R.(B.) microplus* em fase de pré postura, obtidas de infestação natural de vacas leiteiras da Escola Técnica ETEC Dr. Carolino da Motta e Silva em Espírito Santo do Pinhal, São Paulo (ETEC-Pinhal), sem tratamento acaricida há mais

de 30 dias, foram lavadas, secadas e selecionadas dentro de um padrão morfológico e peso vivo médio de 0,2g e no dia seguinte, no Laboratório de Irradiação de Alimentos e Radioentomologia, CENA-USP, Piracicaba, SP, 400 exemplares foram submetidas às doses de 0, 5, 10, 15, 20, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 e 400 Gy, (0,145Gy/h) com Gammacell®-220 Excel (MSD Nordion) (Figura 1).

Vinte e quatro horas após a irradiação estas foram transportadas para ETEC-Pinhal, onde seus ventres foram fixados com fita adesiva de dupla face em recipientes plásticos PEAD atóxico e mantidas em estufa Incubadora Diagtech® ajustada para temperatura de 29°C (+/- 0,5) e umidade relativa do ar em 60% (+/- 5).

Cada dose compunha de 5 tratamentos com 4 repetições, e estas fêmeas foram monitoradas diariamente para se estabelecer o início da postura e dos nascituros. As teleógenas, as posturas e as larvas nascidas foram pesadas sob forma de *pool* de amostras para efeitos de análise dos dados.

Resultados

As posturas tiveram início quatro dias após as irradiações e após 12 dias todos os tratamentos apresentaram postura de um ou mais espécimes, e se estabeleceu o limite para o período de incubação de 36 dias para as avaliações da eclodibilidade dos ovos.

Com o *pool* de ovos do tratamento Testemunha, contou-se 350 ovos que pesados totalizaram 0,005g, onde 1g corresponderiam a 70.000 ovos, como mostra a figura 2.

Figura 1. Gammacell® 220 Excel – Cena / USP
Fonte: autor

Figura 2. Contagem de 350 ovos de teleógenas de *R.(B) microplus* não irradiadas pesando 0,005g
Fonte: autor

Na tabela 1 observa-se que o peso médio dos tratamentos foi de 3,6g e das teleógenas de 0,18g. Constatou-se que ocorreu 5% de óbitos das teleógenas irradiadas com 5, 10, 20 Gy (1/20); 10% na dose de 300 Gy (2/20); e 20% nas doses de 25, 50, 100 e 350 Gy (4/20).

O peso médio da postura do tratamento Testemunha, 2,499g, foi 41,4% maior que o segundo maior peso de postura nos tratamentos irradiados, 150 Gy com 1,036g. A mesma relação foi encontrada quando analisado esta relação se considerando apenas às fêmeas vivas que realizaram a postura.

O peso médio das posturas irradiadas, 0,755g, foi 69,8% menor que a média do peso da postura do tratamento Testemunha 2,499g e considerando a mesma relação com as fêmeas vivas que realizaram a postura, o peso médio da postura das teleógenas irradiadas 0,041g foi 67,2% menor que o peso médio das Testemunhas 0,125g.

Cada tratamento teve todos seus ovos reunidos e pesados para se formar um *pool* de amostra para efeito de incubação. A eclosão dos ovos teve início 33 dias contados a partir do início da postura e após 30 dias do início da eclosão, as larvas de cada amostra, sob as mesmas condições já citadas, foram pesadas para se estabelecer a relação entre seu peso com os ovos não eclodidos, conforme se observa na Tabela 2 e ainda, que a partir da dose de 20Gy, não ocorreu a eclosão dos ovos.

Ao final dos 30 dias após o início das eclosões, realizou-se a pesagem dos ovos não eclodidos e das larvas, as quais em sua maioria estavam mortas e constatou-se que houve severa desidratação através da comparação com o peso da postura inicial, e o tratamento Testemunha foi o que apresentou maior perda, 74,5%. Assim, na Tabela 3 se corrigiu o grau de desidratação para se estabelecer a taxa de eclodibilidade dos tratamentos à uma condição mais precisa e assim constatou-se através do peso corrigido que a taxa de eclosão dos ovos da Testemunha foi 68,2% maior que a menor dose ionizante, o Tratamento com 5 Gy, e ainda se observou que quanto maior a dose de radiação, menor o índice de eclosões.

Tabela 1. Relação de peso das teleógenas irradiadas e o peso das posturas, com detalhe de ocorrência de óbitos das fêmeas, anteriormente a postura.

Ocorrências de óbitos	Doses (Gy) (0,145 Gy/h)	Peso Teleógenas tratamento (g)	Peso da Postura por tratamento (g)	Peso / Postura por tratamento (%)	Peso médio das teleógenas (g)	Peso médio postura fêmeas vivas (g)	Peso / Postura fêmeas vivas (%)
20 fêmeas	Test "0"	4,082	2,499	61,2	0,204	0,125	61,2
1 óbito, 19 fêmeas	5	4,158	0,873	21,0	0,208	0,046	22,1
1 óbito, 19 fêmeas	10	4,091	0,908	22,2	0,205	0,048	23,4
20 fêmeas	15	2,837	0,989	34,9	0,142	0,049	34,9
1 óbito, 19 fêmeas	20	3,503	0,943	26,9	0,175	0,050	28,3
4 óbitos, 16 fêmeas	25	3,460	0,761	22,0	0,173	0,048	27,5
4 óbitos, 16 fêmeas	50	2,660	0,623	23,4	0,133	0,039	29,3
4 óbitos, 16 fêmeas	100	3,620	0,672	18,6	0,181	0,042	23,2
20 fêmeas	150	4,142	1,036	25,0	0,207	0,052	25,0
20 fêmeas	200	4,244	0,794	18,7	0,212	0,040	18,7
20 fêmeas	250	3,952	0,872	22,1	0,198	0,044	22,1
2 óbitos, 18 fêmeas	300	2,970	0,388	13,1	0,149	0,022	14,5
4 óbitos, 16 fêmeas	350	3,364	0,316	9,4	0,168	0,020	11,7
20 fêmeas	400	3,366	0,638	19,0	0,168	0,032	19,0
Média		3,604	0,879		0,180	0,044	
Média Trat. Irradiados			0,755			0,041	

Tabela 2. Relação do peso da postura de cada tratamento e o peso das larvas 30 dias após o termina das eclosões.

Doses Gy	Peso médio da Postura (g)	Peso médio ovos Não eclodidos (g)	Peso médio das larvas (g)	Soma Peso Ovos n. eclod. E Larvas (g)	peso postura menos soma ovos e larvas (g)	ovos e larvas / Pos- tura Desidratação (%)	Larvas /ovos Nascimentos (%)
Test	2,499	0,577	0,061	0,638	1,862	74,5	9,55
5	0,873	0,352	0,081	0,433	0,440	50,4	18,71
10	0,908	0,513	0,006	0,519	0,389	42,8	1,16
15	0,989	0,525	0,033	0,558	0,431	43,6	5,91
20	0,943	0,905	0,003	0,908	0,035	3,8	0,29
25	0,761	0,426	0,000	0,426	0,335	44,0	0,00
50	0,623	0,340	0,000	0,340	0,283	45,4	0,00
100	0,672	0,360	0,000	0,360	0,312	46,4	0,00
150	1,036	0,618	0,000	0,618	0,418	40,3	0,00
200	0,794	0,466	0,000	0,466	0,328	41,3	0,00
250	0,872	0,500	0,000	0,500	0,372	42,7	0,00
300	0,388	0,222	0,000	0,222	0,166	42,8	0,00
350	0,316	0,228	0,000	0,228	0,088	27,8	0,00
400	0,638	0,370	0,000	0,370	0,268	42,0	0,00
Média	0,879				0,879		
Méd. Trat. Irrad	0,755	0,448	0,009	0,458	0,297	39,493	2,06

Tabela 3. Taxa de eclodibilidade estimada através da aplicação da porcentagem de desidratação apresentada na Tabela 2.

Doses Gy	Peso médio da Postura (g)	Soma Peso Ovos não eclod. e Larvas (g)	Perda de peso na pesagem 30dd (g)	Desidratação (%)	Peso médio ovos aferido (g)	Peso médio ovos reidratados (g)	Peso médio larvas aferido (g)	Peso médio Larvas reidratados (g)	Tx Eclosão
Test	2,499	0,638	1,86	74,5	0,577	2,259	0,061	0,239	10,579
5	0,873	0,433	0,44	50,4	0,352	0,710	0,081	0,163	23,011
10	0,908	0,519	0,39	42,8	0,513	0,898	0,006	0,010	1,170
15	0,989	0,558	0,43	43,6	0,525	0,931	0,033	0,058	6,286
20	0,943	0,908	0,03	3,7	0,905	0,940	0,003	0,003	0,331

Discussão

Muito se tem investido no controle de parasitas na pecuária do Brasil e em contrapartida, os produtores constataam ao longo do tempo que estes vêm adquirindo resistência aos poucos princípios ativos disponíveis no mercado.

O uso intensivo das substâncias químicas possibilitou o desenvolvimento da resistência dos carrapatos aos carrapaticidas. A excessiva utilização dos acaricidas, associada ao seu manejo incorreto ocasionou resistência do carrapato às drogas disponíveis no mercado (GAUSS; FURLONG, 2002; SPAGNOL *et al.*, 2010).

O uso da radiação ionizante constitui-se em uma técnica atrativa e eficaz para o controle de pragas, por ser um método específico e não oferecer riscos aos inimigos naturais, aos polinizadores e ao meio ambiente (ARTHUR, 1997).

A literatura consultada relata o emprego desta técnica em diversas espécies de insetos, como os estudos no controle das moscas das frutas *Ceratitis capitata* e *Anastrepha fraterculus*; e os efeitos da radiação gama em cigarrinhas da folha da cana de açúcar *Malhanarva posticata* nas condições do nordeste brasileiro (RODRIGUES, 1978), e a esterilização da broca do abacate *Stenoma catenifer* descrito por SILVA *et al.*, (2007). Há também as pesquisas realizadas na Moscamed® com *Aedes aegypti* que são exemplos desta técnica como mais uma opção ao controle biológico de pragas.

Bakri *et al.*, (2005), compilaram diversas publicações disponíveis ao longo de 50 anos sobre métodos de determinação de doses esterilizante por radiação ionizante em artrópodes e obtiveram as seguintes doses de radiação para algumas ordens de insetos e ácaros: de 130 a 400 Gy em Lepidóptera, de 30 a 280 Gy em Acari, 40 a 200 Gy em Coleopteros, de 10 a 180 Gy em Hemipteros, de 20 a 160 Gy em Dipteros, de 20 a 150 Gy em Araneae, de 5 a 140 Gy em Dictyoptera, de 100 Gy em Thysanoptera, e 4 Gy em Orthoptera.

Silva *et al.*, (2007) irradiaram pupas e adultos de *Stenoma catenifer*; insetos da ordem Lepidóptera com doses de 150 Gy e 200 Gy, respectivamente, e conseguiram a esterilização dos insetos adultos.

Galum *et al.*, (1967) irradiaram carrapatos, da espécie *Ornithodoros tholozani*, no Oriente Médio, utilizando a radiação gama proveniente do Cobalto-60 com uma dose de 2000 rad em ninfas e 16.000 rad em machos adultos, obtendo resultados práticos e satisfatórios com a esterilização dos carrapatos.

No Brasil, o primeiro trabalho realizado com irradiação de ácaros para tratamento quarentenário foi o de Mineiro e Arthur (2003), que irradiaram ácaros *Tetranychus urticae* e determinaram que nas doses de 250, 300 e 400 Gy, a mortalidade dos ácaros foi maior que 80 %,

Arthur; Machi (2015) avaliaram os efeitos da radiação gama sobre as fases do ciclo evolutivo dos ácaros: *Tetranychus urticae*, *Tetranychus desertorum*, *Oligonychus ilicis* como tratamento quarentenário e como um método de controle alternativo de controle. Ácaros fêmeas foram irradiadas com doses de 0 (controle), 100, 200, 300 e 400 Gy, Os resultados obtidos mostraram uma diminuição na viabilidade dos ovos e ninfas de ácaros, que foi diretamente proporcional ao aumento das doses de radiação gama. A dose de 200 Gy foi a esterilizante para todas as fases do ciclo evolutivo de *O. Ilcis*, e de 300 Gy para *T. urticae* e *T. desertorum*.

Walder; Mastrangelo (2011) descreveram o emprego da irradiação com raios X na TIE recomendando doses que podem variar de 18 a 70 Gy/min, e relataram a viabilidade de esterilizar 20 litros de pupas de moscas das frutas *Ceratitis capitata*, ao longo de 3-5 minutos e que os efeitos biológicos dos raios X foram semelhantes aos da radiação gama, uma vez que ambas são radiações eletromagnéticas.

Houve significativa diferença de peso da postura entre os tratamentos Testemunha e os demais, assim como a taxa de eclodibilidade o que demonstra o evidente efeito da radiação ionizante na postura desta espécie de parasita.

Neste levantamento bibliográfico se observou que nos diferentes espécimes estudados, as doses ionizantes para se obter a esterilização dos descendentes foram muito mais altas do que as empregadas neste experimento, mas também a metodologia empregada diverge em si.

A opção de se empregar doses até 25Gy se baseou na dosagem empregada na esterilização de bolsas de sangue para transfusão (GOES *et al.*, 2008) usualmente empregadas em hemocentros, isso para que não ocorra significativa destruição celular das fêmeas ingurgitadas, pois aproximadamente, 60% de seu peso nesta fase é de sangue dos hospedeiros que serve para nutrir seus ovos. E os resultados encontrados evidenciaram que doses acima de 25 Gy não geraram descendentes.

Na Tabela 2 se observa que as larvas apresentaram ganho de peso até o momento da pesagem e disto surge a necessidade de se realizar um teste *in vivo* afim de se avaliar a ocorrência de reparos celulares ou efeitos mutagênicos nestes nascituros, não podendo se

especular que 25 Gy pode ser uma dose esterilizante para carrapatos da espécie *R.(B)microplus*.

Por outro lado, na Tabela 3 se observa que a Testemunha e o Tratamento com 5 Gy foram os que apresentaram maior grau de desidratação das larvas, 74,5 e 50,4%, ou seja, aproximadamente a mesma concentração de líquidos corpóreos das teleógenas e assim, ao se realizar a irradiação de larvas pode ocorrer efeito encontrado neste experimento.

Conclusão

Este experimento estabeleceu os primeiros dados sobre os efeitos da radiação ionizantes do Cobalto 60 nesta espécie de ácaro.

A irradiação em fêmeas na fase de pré postura demonstrou que doses até 20 Gy possibilitam se realizar a experimentação da TIE com todos os descendentes que têm a característica de ambos os gêneros serem hematófagos, contudo, se faz necessário a realização de um ensaio biológico em hospedeiros *in vivo*, afim de se avaliar sua aplicabilidade, bem como, eventual efeito mutagênico em seus descendentes através da competição com parceiros sexuais nativos para redução das infestações *in loco*.

Referências

ARTHUR, V. Controle de insetos pragas por radiações ionizantes. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 64, n.2, p. 77-79, 1997.

ARTHUR, V.; MACHI, A.R. The use of gamma radiation from cobalt-60 for quarantine treatment of mites (Acari: Tetranychidae) of agricultural importance. **Florida Entomology**, (In Press.) 2015.

BARKI, A.; HEATHER, N.; HENDRICH, J.; FERRIS, J. Fifty Years of Radiation Biology in Entomology: Lessons Learned from IDIDAS. **Ann. Entomol. Soc. Am.**, v. 98, n.1, p.1-12, 2005.

GALUN, R.; WARBURG, M.; AVIVI, A. Studies on the application of the sterility method in the tick *Ornithodoros tholozani*. **Ent. Exp. Appl.** v.10, n. 2, p. 143-152, 1967.

GAUSS, C. L. B.; FURLONG, J. Comportamento de larvas infestantes de *Boophilus microplus* em pastagem de *Brachiaria decumbens*. **Ciência Rural, Santa Maria**, v. 32, n. 3, p. 467-472, 2002;

GOES, E. G; *et al.* Quality control of blood irradiation with a teletherapy unit: damage to stored red blood cells after cobalt-60 gamma radiation. **Transfusion**, 48, 332-340, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18028274> >. Acesso em: 02/06/19

MINEIRO, J. L. C.; ARTHUR, V. Efeitos da radiação gama do Cobalto-60 em adultos de *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). **IX Encontro Científico dos Pós-Gradandos no CENA-USP**. 2003

RODRIGUES, Z. A. (1978). Efeitos da radiação gama em *Malhanarva posticata* (Stal,1855) nas condições do nordeste brasileiro. **Rev. Nordest. Biol.**, v.1, n. 1. p. 83-88.

SILVA, L. K. F.; ARTHUR, V.; NAVA, D. E.; PARRA, J. R. P. (2007). Uso da radiação gama do Cobalto-60 visando ao tratamento quarentenário e a esterilização de *Stenoma catenifer* (Lepidoptera: Elachistidae). **Bol. San. Veg. Plagas**, n. 33, p. 427-438.

SINDAN. **Representatividade por classe terapêutica**. Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal - São Paulo – SP. www.sindan.org.br Acessado 18/07/2018.

SPAGNOL, F. H.; PARANHOS, E. B.; ALBUQUERQUE, G. R. Avaliação in vitro da ação sobre o *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* Canestrini, 1887 (Acari:Ixodidae) de bovinos leiteiros no município de Itamaraju, Bahia. **Ciência Animal Brasileira, Goiânia**, v. 11, n. 3, p. 731-736. 2010.

WALDER, J. M. M.; MASTRANGELO, T. A. Raios X: nova tecnologia para a técnica do inseto estéril. “**Mudanças climáticas e sustentabilidade: quebra de paradigmas**” 12o SICONBIOL. Simpósio de Controle Biológico, 18 a 21 de julho de 2011.

6 DISCUSSÃO

O controle de pragas que usualmente é feito através de pesticidas tem se mostrado pouco eficiente em função de diversos fatores isolados e concomitantes, como o custo para aquisição dos inseticidas, uso inadequado decorrentes de erros de se formular as dosagens corretas, bem como a falta de conhecimento por parte dos produtores rurais, a falta de novos princípios ativos disponíveis no mercado, a habilidade dos parasitas em desenvolverem resistência às drogas e, soma-se a isto os fatores extrínsecos a esse manejo, que seriam a interferência de fatores climáticos, as limitações geográficas, a reserva de mercado frente a carência ou uso de grupos químicos, como também, existe a falta de especificidade de ação das drogas para o organismo alvo e o potencial fator de contaminação ambiental.

O emprego da radiação ionizante para o controle de pragas já é um recurso oficial empregado em diversos países e este se faz através de protocolos de esterilização de machos ou fêmeas, que são criados em larga escala e liberados para encontrarem e acasalarem com seus pares selvagens e assim, diminuir a população latente. Este protocolo tem o nome de Técnica do Inseto Estéril.

Muitas pesquisas têm estabelecido as doses de radiação ionizantes adequadas para várias ordens e família de pragas relacionadas às culturas agrícolas, contudo, ainda são escassos os trabalhos direcionados à pecuária em geral.

Pode se afirmar que além da dificuldade científica de se estabelecer um modelo experimental com animais, esses parasitas, em sua grande maioria são hematófagos, o que demanda um hospedeiro vertebrado obrigatório para seu desenvolvimento.

Assim, este trabalho direcionou as investigações para fêmeas adultas em fase de pré postura, para as posturas e para os seus descendentes em sua fase primordial de vida, onde não ocorrem ainda a fase de parasitismo.

A escolha das doses ionizantes foi baseada na fisiologia reprodutiva da fêmea em fase de pré postura por estar ingurgitada de sangue e assim, dose elevadas de radiação desnaturariam os elementos do sangue, comprometendo assim a sobrevivência dos ácaros e o funcionamento do aparelho reprodutor, inclusive os ovócitos.

As doses usualmente empregadas nos hemocentros do Brasil para se esterilizar as bolsas de sangue é de 20 Gy. Segundo Brasil (2014), a dose em qualquer área da bolsa de hemocomponentes não pode ser inferior a 15 Gy e nem superior a 50 Gy.

Avaliar os efeitos da radiação ionizante no *R.(B)microplus*, que além de ser um trabalho inédito, demandaram metodologias laboratoriais que corroborassem com os resultados alcançados no bioensaio frente a não eclodibilidade dos ovos nas doses empregadas acima de 25 Gy.

Os achados histológicos realizados com a dose mais baixa não tiveram discrepância comparativa ao padrão testemunha. Mas as doses intermediárias, 10 e 15 Gy apresentaram alterações morfofisiológicas tanto nos tecidos como nos ovócitos, e este efeito pode ser observado na taxa de eclosão dos ovos que foi em média, 35% menor em relação a testemunha.

Sabe-se que os efeitos ionizantes no DNA promovem rupturas nas fitas simples e duplas da molécula, ligações cruzadas (entre DNA-DNA, entre DNA-proteínas) e alterações na desoxirribose ou nas bases púricas e pirimídicas (HALL, 2000; POUGET; MATHER, 2001), já citado anteriormente e, a realização do teste do cometa comprovou leve efeito genotóxicos para essas doses, que evidenciaram danos médios a moderados, proporcionalmente a dose empregada.

Estas informações possibilitam especular que, ou as larvas poderiam sobreviver normalmente em função da habilidade de reparo celular dos eucariontes ou, poderiam ser portadores de uma aberração cromossômica ou ainda, apresentarem alguma forma limitadora na função reprodutiva em si, sendo estas duas últimas circunstâncias, alvo da técnica do inseto estéril.

Com relação as maiores doses em comum, empregadas nos três experimentos mostraram que 20 e 25 Gy causaram danos severos nos tecidos ovarianos e ovócitos, comprovadamente demonstrados nos achados histológicos, através de severa desorganização das estruturas e, também demonstrado no teste do cometa que apresentou alto grau genotóxico em 20% das células avaliadas e dano total em outros 20%.

O mesmo foi comprovado na incubação dos ovos onde a taxas de eclodibilidade nestas doses foram de 0,03 e 0%, ou seja, não ocorreu eclosão de novos indivíduos.

7 CONCLUSÕES

- 1- As doses ionizantes empregadas nos experimentos foram suficientes para causar danos no aparelho reprodutor e seus anexos;
- 2- As três metodologias que avaliaram os efeitos da radiação ionizante do cobalto-60 se correlacionaram com seus resultados;
- 3- Mesmo as doses mais elevadas de radiação ionizante não interferiram nas posturas das fêmeas de *R.(B)microplus*, contudo, todas as posturas das fêmeas irradiadas foram menores do que a testemunha;
- 4- Dose de 10 e 15 Gy possibilitaram a o nascimento de larvas, contudo outros estudos se fazem necessários quanto a aplicabilidade desses descendentes para aplicação da técnica do inseto estéril;
- 5- Dose de 20 e 25 Gy resultaram em danos letais no sistema reprodutivo das fêmeas em fase de pré postura, com significativo efeito genotóxico, comprovado pelo ensaio do cometa e que inviabilizaram a geração de novos descendentes.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALONZO-DIAZ, M.A. Resistência de la garrapata *Boophilus microplus* a los ixodicidas. **Archivos de Medicina Veterinária**. V.38, ano 2, p.103, 2006.

ANDREOTTI, R. Situação atual da resistência do carrapato-do-boi *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* aos acaricidas no Brasil. Campo Grande, MS: **Embrapa Gado de Corte**, 2010. **Doc 180**. <http://old.cnpgc.embrapa.br/publicacoes/doc/DOC180.pdf>. Acessado em 11/03/2015.

ANGELO, I.C.; BITTENCOURT, V.R.E.P. **Utilização de fungos entomopatogênicos para o controle de carrapatos**. In: Controle de carrapatos nas pastagens 2. ed. Rev. e Ampl. Instituto de Zootecnia de Nova Odessa, p.72-76, 2015.

ARTHUR, V.; ARTHUR, P.B.; GAVA, M.A.; FRANCO, S.S.H.; MACHI, A.R. Uso de técnicas nucleares em entomologia no Brasil. In: BUSSOLI, A.C.; GRIGOLLI, J.F.J.; SOUZA, A.C.; KUBATA, M.M.; COSTA, E.N.; SOUZA, C.A.O.; NETTO, J.C; VIANA, M.A. **Tópicos em entomologia na agricultura V**. Jaboticabal. Gráfica e Editora Press. P. 13-25, 2012.

ARTHUR, V.; MACHI R. A.; MASTRANGELO, T. Ionizing Radiation in Entomology: *In: Topics in Ionizing Radiation Research*, II Ed., In Tech. n. 1, p. 1-17, 2015.

ARTHUR, P.B. Determination of lethal and sterilizing doses for life cycle phases of *Alphitobius diaperinus* (Panzer, 1797) (Coleoptera: Tenebrionidae). 2018. **IAEA** (org). <https://inis.iaea.org/search/citationdownload.aspx>. Acessado em 17/12/19.

ARTHUR, V.; MACHI, A.R. The use of gamma radiation from cobalt-60 for quarantine treatment of mites (*Acari: Tetranychidae*) of agricultural importance. **Florida Entomology**, (In Press.), 2015.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIS EXPORTADORAS DE CARNE. Beef Report, perfil da pecuária no Brasil. Disponível em: <http://www.abiec.com.br/controle/uploads/arquivos/sumario2019portugues.pdf>. Acessado em 03/01/2020.

AZQUETA, A; COLLINS, A. The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. **Archives of Toxicology**, New York, v. 87, n. 6, p. 949–968, jun. 2013.

BAKRI, A; METHA, K. LANCE, D.R. **Sterilizing insects with ionizing radiation**. In: DICK, V.A; HENDRICH, J.; ROBINSON, A.N. (Ed) Sterile insect technique. Principles and practice in area-wide integrate pest management. Dordrecht. Springer: p.223-258. 2005.

BARKI, A.; HEATHER, N.; HENDRICH, J.; FERRIS, J. Fifty Years of Radiation Biology in Entomology: Lessons Learned from IDIDAS. **Ann. Entomol. Soc. Am.**, v. 98, n.1, p. 1-12, 2005.

BRASIL. Ministério da saúde. Resolução da diretoria colegiada – RDC N° 34, 11/06/2014

CAMARGO-MATHIAS, M.I. *et al.* Deltamethrin as inductor agent of precocious ovarian degeneration in *Rhipicephalus sanguineus s.l.* (Acari: Ixodidae) ticks. **Exp. Appl. Acarol.** Springer International Publishing Switzerland, 2017.

COLLINS, A.R. *et al.* The comet assay: topical issues. **Mutagenesis**, v. 23, n. 3, p. 143-51, 2008.

DENARDI, S.E. *et al.* Morfological characterization of the ovary and vitelogenesis dynamics in the tick *Amblioma cajanenses* (ACARI;IXODIDAE). **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 125, p.379-395, 2004.

FAIRBAIRN, D.; OLIVE, P. L.; O'NEILL, K. L. The comet assay: a comprehensive review, **Mutat. Res.**, vol. 339, p 37-59, 1995.

FOLLETT, P.A.; ESNOOK, K.; JANSON, A.; ANTONIO, B.; HARUKI, A.; OKAMURA, M.; BESEL, J. Irradiation quarantine treatment for control of *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae) in rice. **Journal Stored Products Research**, v. 52, p. 63-67, 2013

FURLONG, J.; MARTINS, J.R.; PRATA. M.C.A. O carrapato dos bovinos e a resistência: temos o que comemorar? **A Hora Veterinária**, ano 27, nº 159, 2007.

GALUN, R.; WARBURG, M.; AVIVI, A. Studies on the application of the sterility method in the tick *Ornithodoros tholozani*. **Ent. Exp. Apl.** v.10, n. 2, p. 143-152, 1967.

GOMES, C.G. **O problema do carrapato e a necessidade de estratégias alternativas para o seu controle.** Workshop International de Seleção Genômica em Bovinos de Corte. 09/08/2012.

GONZALES, J.C. O carrapato do boi: vida, resistência e controle. São Paulo: **Mestre Journal**, p.101-104, 1974

GUIA BÁSICO DE MORFOLOGIA INTERNA DE CARRAPATOS IXODÍDEOS. **Sistema Reprodutor feminino.** Maria Izabel Camargo Mathias (org). São Paulo. Editora Unesp, p. 85-87, 2013.

GUIMARÃES, J.H., *et al.* Ectoparasitas de importância veterinária. São Paulo: **Pleiades – Fapesp**, 2001.

HALL, E.J. Radiobiology for the Radiologist Lippincot Williams & Wilkins. cap. 3, **cell survive curves**, p. 33-50; 2000

HALLMAN, G.J. Control stored product pests by ionizing radiation. **Journal Stored Products Research**, v. 52, p. 36-41, 2013.

HENDRICH, J. Use of the sterile insect technique against key insect pests. **Sustainable Development International**. V.2, p.75-79, 2000.

KAMMANN, U.; BUNKE, M.; STEINHART, H. A permanent fish cell line (EPC) for genotoxicity testing of marine sediments with the comet assay. **Mutation Research**, Amsterdam. v. 498, p. 61-77, 2001.

LABRUNA, M.B; PEREIRA, M.C. Carrapatos em cães no Brasil. **Clínica Veterinária**, v.30, p.24-32, 2001.

McKELVEY-MARTIN. VJ.; GREEN. M.H.L.; SCHMEZER. P.; POOL-ZOBEL, B.L.; De MEO. M.P.; COLLINS.A.R. The single cell gel electrophoresis (comet assay): a European review. **Mutat. Res.**, 288, 47-63, 1993.

MINEIRO, J.L.C.; ARTHUR, V. Efeitos da radiação gama do Cobalto-60 em adultos de *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). In: *Encontro Científica dos Pós-Graduandos no CENA/USP, Resumos...* Piracicaba - SP. 2003. CDROM.

MONTEIRO, C.M.O; PRATA, M.C. **Controle biológico do carrapato dos bovinos *Rhipicephalus microplus* com a utilização de nematoides entomopatogênicos: conquistas e desafios.** In: Controle de carrapatos nas pastagens 2. ed. Rev. e Ampl. Instituto de Zootecnia de Nova Odessa, p.54-60, 2015.

OLIVEIRA, P.R.; CAMARGO-MATHIAS, M.I.; BECHARA, G.A. *Amblioma triste* (Koch) (ACARI;IXODIDAE) Morfological description of the ovary and vitelogenesis. **Experimental Parasitology**. San Diego, v.113, p.178-185, 2006.

OLIVEIRA, P.R.; CAMARGO-MATHIAS, M.I.; BECHARA, G.A. Role for pedicel cells. **Veterinary Parasitology**, v. 143, p.134, 2007.

OSTLING, O; JOHANSON, K.J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 123, n. 1, p. 291–298, aug. 1984.

POUGET, J.P.; MATHER, S.J. General aspects of the celular response to low and high-LET adiation. **Eur. J. NucL Med**, v. 28, p. 541-561, 2001.

ROBINSON, A.S. Mutations and their use in insect control. **Mutat. Res.** V. 511, p. 117-128, 2002.

ROCHA, C.M.B.M. **O carrapato dos bovinos.** Boletim Técnico: Série Extensão da Universidade Federal de Lavras, ano VI, n.06, p.27, 1997.

ROCHA, C.M.B.M.; LEITE, R.C.; BRUHN, F.R.P.; GUIMARÃES, A.M.; FURLONG, J. Perceptions about the biology of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* among milk producers in Divinópolis, Minas Gerais. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v.20, n.4, p.289-294, 2011.

SAITO, K.C. *et al.* Morfological, histological, and ultrastrutuctural studies of the ovary of the cattle-tick *Boophilus microplus* (Canestri, 1887) (Acari:Ixodidae). **Veterinary Parasitology**. Amsterdam, v. 129, p. 299-304, 2005.

SCHERER, K; STROHSCHOEN. A.A.G. Padronização do Teste Cometa para análise de genotoxicidade como atividade de ensino para graduação na área de saúde. **Revista Destaques Acadêmicos**, VOL. 5, N. 3, - CCBS/UNIVATES, p50 – 60. 2013.

SINDAN. **Representatividade por classe terapêutica**. Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal (org). <http://www.sindan.org.br/mercado-brasil-2018>. Acessado em 17/03/2019.

SINGH, N. *et al.* A simple technique for quantitation damage of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, New York, v.175, n. 1, p. 184–191, mar. 1988.

SONENSHINE, D.E. The female reproductive system. In (org) **Biology of the ticks**. New York: Oxford University Press. P.280-304, 1991.

SOUZA, A.P.; GONZALES, J.C.; RAMOS, C.I.; PALOSCHI, C.G. e MORAES, A.N. Fase de vida livre do *Boophilus microplus* no Planalto Catarinense. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, 23 v.4, p.427-434. abr. 1988.

SPEIT, G.; HARTMANN, A. The comet assay (single-cell gel test). A sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. **Methods in Molecular Biology**, v113, p.203-12, 1999.

VERISSIMO, C.J. **Fatores que afetam a fase de vida livre de carrapatos**. In: Controle de carrapatos nas pastagens 2. ed. Rev. e Ampl. Instituto de Zootecnia de Nova Odessa, p.5-11, 2015.

WANDERLEY, R.P.B; RIBEIRO, A.C.L; RODRIGUES, D.S.; LEITE, R.C. Adubação com uréia em pastelo rotacionado e seu efeito no controle do *Rhipicephalus (B) microplus*. In: **Controle de carrapatos nas pastagens** 2. ed. Rev. e Ampl. Instituto de Zootecnia de Nova Odessa, p.103-104, 2015.

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Diretoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Ensino
Av. Prof. Lineu Prestes, 2242 – Cidade Universitária CEP: 05508-000
Fone/Fax(0XX11) 3133-8908
SÃO PAULO – São Paulo – Brasil
<http://www.ipen.br>

O IPEN é uma Autarquia vinculada à Secretaria de Desenvolvimento, associada à Universidade de São Paulo e gerida técnica e administrativamente pela Comissão Nacional de Energia Nuclear, órgão do Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações.