

## ACÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA DO AMITRAZ PELA INIBIÇÃO DA PRODUÇÃO DE INTERFERON GAMA E DA ATIVIDADE MITOCONDRIAL DE LINFÓCITOS T.

(ANTI-INFLAMMATORY EFFECT OF AMITRAZ DUE TO INHIBITION OF THE GAMMA-INTERFERON PRODUCTION AND MITOCHONDRIAL ACTIVITY OF THE T LYMPHOCYTES.)

(ACCIÓN ANTI-INFLAMATORIA DEL AMITRAZ POR LA INHIBICIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE INTERFERON GAMA Y DE LA ACTIVIDAD MITOCONDRIAL DE LOS LINFOCITOS T.)

P. A. DI FILIPPO<sup>1</sup>, R. V. SOUSA<sup>2</sup>, L. Q. VIEIRA<sup>3</sup>, G. C. SANTANA<sup>4</sup>,  
I. A. ABRAHAMSOHN<sup>5</sup>, M. A. P. OLIVEIRA<sup>6\*</sup>

### RESUMO

O amitraz, um pesticida formamidínico, é uma das drogas de escolha no tratamento da sarna demodécica canina. Alterações inflamatórias encontram-se associadas à presença, em número elevado, do ácaro *Demodex canis* na pele. As justificativas para a indicação do amitraz baseiam-se apenas na sua ação acaricida. Embora alguns autores tenham sugerido uma possível ação analgésica e anti-inflamatória, pouco tem-se feito para entender os possíveis mecanismos que proporcionam tal efeito. Para verificar essa sugerida ação, células esplênicas de camundongos C3H/He foram cultivadas e estimuladas com 5µg/mL de Concanavalina A (Con A) ou 10µg/mL de lipopolissacáride (LPS) de *Escherichia coli* 0111:B4 em presença de 0,00; 0,78; 1,56; 3,13; 6,25 e 12,50µg/mL de amitraz diluído em arol ou quantidade equivalente do diluente. A viabilidade das células foi significativamente reduzida quando cultivadas por 48 horas em quantidades iguais ou superiores a 3,13 µg/mL de amitraz. A atividade mitocondrial de esplenócitos, medida pela redução do MTT, não se alterou quando eles foram tratados com amitraz em concentrações iguais a 1,56 µg/mL, porém essa atividade foi significativamente reduzida quando os esplenócitos foram estimulados com Con A e posteriormente tratados com amitraz. A proliferação dos linfócitos T estimulada por Con A não se alterou quando se utilizou o amitraz na concentração (1,56µg/mL) capaz de inibir o metabolismo dessas células. A proliferação dos linfócitos B também não se mostrou alterada quando os esplenócitos foram tratados com LPS. A produção de IFN-γ foi inibida pelo amitraz em concentrações iguais ou superiores a 1,56µg/mL. Os resultados apresentados demonstram que um dos possíveis mecanismos da ação anti-inflamatória do amitraz decorre de sua capacidade em inibir o metabolismo e a produção de IFN-γ por linfócitos T, sem afetar-lhes a proliferação.

**PALAVRAS-CHAVE:** Amitraz. Linfócito T. Interferon gama. Arol. Sarna demodécica.

<sup>1</sup> Médica Veterinária. Doutoranda do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da Universidade Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal, SP.

<sup>2</sup> Médico Veterinário. Professor Adjunto II da Universidade Federal de Lavras, Departamento de Medicina Veterinária.

<sup>3</sup> Bióloga. Professora Adjunto IV da Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Bioquímica e Imunologia.

<sup>4</sup> Médica Veterinária. Professora da Universidade Federal de Lavras, Departamento de Medicina Veterinária.

<sup>5</sup> Médica. Professora Titular da Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Imunologia.

<sup>6</sup> Médico Veterinário. Professor Adjunto II da Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Departamento de Microbiologia, Imunologia, Parasitologia e Patologia. Sala 324. Rua 235, s/n, Goiânia, GO, CEP. 74070-150. End. Eletrônico: mapoliv@iptsp.ufg.br

## SUMMARY

Amitraz, a formamidine pesticide, is one of the selected drugs for the treatment of the canine demodectic mange. Inflammatory alterations are found associated with the presence of high numbers of the mite *Demodex canis* in the skin. The reasons for the indication of amitraz are based only on its acaricide action. Some authors have suggested analgesic and anti-inflammatory properties for this drug, but few studies have been done to understand the mechanisms that prove such effect. To validate this suggested action, splenic cells from C3H/He mice were cultured and stimulated with either 5µg/mL of Concanavalin A (Con A) or 10µg/mL of lipopolysaccharide (LPS) from *Escherichia coli* 0111:B4 in the presence of 0.00; 0.78; 1.56; 3.13; 6.25 and 12.50µg/mL of amitraz diluted in arol or equivalent amount of solvent. The viability of the cells was significantly reduced when these cells were cultured for 48 hours with amounts equal or higher than 3.13 µg/mL of amitraz. The mitochondrial activity of spleen cells, analyzed by the MTT reduction method, did not change when amitraz was used in concentrations equal or higher than 1.56 µg/mL, although this activity was significantly reduced when the spleen cells were stimulated with Con A and then treated with amitraz. The proliferation of T lymphocytes stimulated with Con A did not change when amitraz was used in the concentrations equal or higher than 1.56µg/mL. The proliferation of B lymphocytes also did not change when spleen cells were treated with LPS. The production of IFN-γ was inhibited by amitraz in concentrations equal or higher than 1.56µg/mL. The results described here demonstrate that one of the possible mechanisms for the anti-inflammatory effect of amitraz relates to its ability of inhibiting the T lymphocyte metabolism and IFN-γ production, without affecting the proliferation of these cells.

**KEY -WORDS:** Amitraz. T lymphocytes. IFN-γ. Arol. Canine Demodex.

## RESÚMEN

El amitraz es un pesticida formamidínico y una de las drogas escogidas en el tratamiento de la sarna demodéctica canina. Alteraciones inflamatorias se encuentran asociadas con la presencia, en número elevado, del ácaro *Demodex canis* en la piel. Las justificativas para la indicación del amitraz se basan apenas en su acción acaricida. Aunque algunos autores han sugerido una posible acción analgésica y antiinflamatoria, poco se ha hecho para entender los mecanismos que proporcionan tal efecto. Para verificar esta supuesta acción, células esplénicas de ratones C3H/He, fueron cultivadas y estimuladas con 5 µg/ml de Concanavalina A (Con A) o 10 µg/ml de lipopolisacáridos (LPS) de *Escherichia coli* 0111:B4, en presencia de 0; 0.78; 1.56; 3.13; 6.25 y 12.50 µg/ml de amitraz diluido en arol, o una cantidad equivalente de diluyente. La viabilidad de las células fue significativamente reducida cuando cultivadas por 48 horas en cantidades iguales o superiores a 3,13 µg/ml de amitraz. La actividad mitocondrial de los esplenocitos, medida por medio de la reducción del MTT, no se alteró cuando estos fueron tratados con amitraz en concentraciones iguales a 1,56 µg/ml. Por lo tanto, esta actividad fue significativamente reducida cuando los esplenocitos fueron estimulados con Con A y posteriormente tratados con amitraz. La proliferación de los linfocitos T estimulada por Con A no se alteró cuando se utilizó el amitraz en una concentración (1,56 µg/ml) capaz de inhibir el metabolismo de estas células. La proliferación de los linfocitos B tampoco mostró ser alterada cuando los esplenocitos fueron tratados con LPS. La producción de IFN-γ fue inhibida por el amitraz en concentraciones iguales o superiores a 1,56 µg/ml. Los resultados presentados muestran que uno de los posibles mecanismos de la acción antiinflamatoria del amitraz se debe a su capacidad de inhibir el metabolismo y la producción de IFN-γ por los linfocitos T, pero sin afectar su proliferación.

**PALABRAS-CLAVE:** Amitraz. Linfocitos T. Interferón gama. Arol. Sarna demodéctica.

## INTRODUÇÃO

A demodicose dos cães, sarna demodéctica ou sarna folicular, é uma doença parasitária da pele de caráter inflamatório, associada a um estado de imunodeficiência e caracterizada pela presença, em número elevado, do ácaro *Demodex canis* nas estruturas cutâneas. O *Demodex canis* faz parte da microbiota normal da pele canina, estando presente em números diminutos nos animais sadios (MUELLER, 2004, CURTIS, 2004). Essa ectoparasitose,

considerada uma dermatopatia não neoplásica de difícil terapia, apresenta-se de duas formas. A primeira é conhecida como localizada, uma forma branda da doença caracterizada pela presença de áreas de alopecia e eritema, podendo se resolver espontaneamente mesmo na ausência de tratamento. A forma generalizada, que evolui a partir da localizada, é uma forma mais grave da doença, caracterizada por uma extensa reação inflamatória, associada a quadros de alopecia, eritema, edema, disqueratinização, piodermite e intenso prurido, podendo, em alguns casos, levar o animal

a óbito (MEDLEAU e WILLEMSE, 1995, HUGNET et al., 2001). Embora alguns cães jovens possam curar-se naturalmente, é impossível para o clínico descobrir qual animal evoluirá para a cura espontânea e qual apresentará complicações (BAKER, 1970, FOLZ et al., 1984, MUELLER, 2004).

Uma das drogas utilizadas no tratamento dessa dermatopatia é o amitraz, um inseticida e acaricida formamidínico mundialmente empregado no controle dos ectoparasitas em cães, gatos (AGIN et al., 2004, MUELLER, 2004, COWAN e CAMPBELL, 1988), bovinos e ovinos (FOLZ et al., 1983, QUEIROZ-NETO et al., 1994, KAGARUKI, 1996, ELFASSY et al., 2001). Inicialmente sintetizado, nos EUA, para uso pecuário e agrícola (PALMER et al., 1971), constituiu-se em uma das drogas de escolha para o tratamento da demodicose canina (BUSSIERAS e CHERMETTE, 1980, SCOTT e WALTON, 1985, AGIN, 2004). O mecanismo de ação do amitraz é complexo, incluindo a inibição da atividade da enzima mitocondrial monoaminaoxidase, a qual possui ação catalisadora no processo de desaminação de catecolaminas, resultando assim no aumento dos níveis de noradrenalina e serotonina no sistema nervoso central, produzindo excessiva ativação simpática (AZIZ e KNOWLES, 1973, MOSER e MACPHAIL, 1989). Há evidências também de sua ação direta em canais de sódio e, ainda, atividade agonista sobre receptores  $\alpha$ 2-adrenérgicos responsável em parte por sua neurotoxicidade (COSTA et al., 1988, COSTA et al., 1991, CHEN e HSU, 1994, VILLAREAL e SANTANA, 1997, AGIN et al., 2004, MUELLER, 2004). As justificativas para a indicação do amitraz como droga de escolha para o tratamento da sarna demodécica baseiam-se fundamentalmente na sua ação parasiticida. Embora alguns autores tenham sugerido uma possível ação analgésica e anti-inflamatória dessa droga (VILLARREAL et al., 1996), pouco tem sido feito para se entender os possíveis mecanismos que proporcionam tal efeito. Assim sendo, objetivou-se, por meio deste trabalho, verificar possíveis mecanismos envolvidos na ação anti-inflamatória do amitraz na sarna demodécica.

## MATERIAL E MÉTODOS

*Animais:* Camundongos C3H/He fêmeas de 8-16 semanas de idade provieram do Biotério do Departamento de Imunologia do ICB/USP ou do Biotério do IPTSP/UFG. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas com até 5 camundongos por gaiola, sendo água e ração fornecidas à vontade.

*Obtenção dos esplenócitos dos animais e cultura celular:* Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, o baço retirado em condições assépticas e triturado em placas de seis poços de fundo chato

(COSTAR) com êmbolo de seringa de 5 mL. Os esplenócitos foram lavados duas vezes (centrifugaram-se as células a 300 x g por 10 min e as células foram resuspendidas em PBS (PBS1- SIGMA Chemical Corporation, St Louis, MO, USA). As hemácias foram lisadas pela adição de 1 mL de solução de lise (Tris-HCl 17 mM + cloreto de amônia 0,144 M) por 1 a 2 min. A lise foi interrompida pela adição de 10 mL de salina tamponada com 0,1 M de fosfato, pH 7,3 (PBS1-SIGMA) contendo 10% de soro bovino fetal (SBF-INVITROGEN, San Diego, CA, USA). As células foram lavadas mais duas vezes em PBS (PBS1- SIGMA), sendo, após a última centrifugação, ressuspensas em 1 mL de RPMI 1640 (R6504- SIGMA), suplementado com 10% de SBF, 2mM de L-glutamina (G6784- SIGMA), 100 U/mL de penicilina (G6784- SIGMA), 100 µg/mL de estreptomicina (G6784- SIGMA), 50 µM de 2-mercaptoetanol (M7522 - SIGMA). A contagem das células foi feita em hematocítmetro e a verificação da viabilidade foi feita com o auxílio da coloração por azul de tripan (T6146 - SIGMA) a 0,5% em PBS (PBS1- SIGMA). Preparações de esplenócitos com viabilidade inferior a 95% foram descartadas. A suspensão de células foi diluída para uma concentração final de 0,5 a 5 x 10<sup>6</sup> esplenócitos/mL em placas de cultura de 96 poços (COSTAR) de acordo com o experimento. A cultura foi mantida a 37°C por 48 horas em estufa comum.

*Estímulos e drogas:* Os esplenócitos foram cultivados na presença ou ausência de amitraz (TRIATOX®, Schering-Ploug Saúde Animal - Brasil - 1,5 di-(2,4-dimethylphenyl)-3-methyl-1,3,5-tri-aza-penta-1,4 diene; metabólito ativo BTS27271), previamente dissolvido no solvente arol ou em arol puro, ambos gentilmente cedidos pela Schering-Ploug Saúde Animal, nas concentrações indicadas nas figuras. O estímulo dos esplenócitos foi feito com Concanavalina A (ConA) (C5275- SIGMA) a 5µg/mL ou LPS de *Escherichia coli* 0111:B4 (L4391- SIGMA) a 10µg/mL.

*Avaliação do metabolismo celular:* A avaliação do metabolismo celular foi feita como descrito por Mosmann (1983). Brevemente, as células foram cultivadas a partir de 0,5 x 10<sup>6</sup> esplenócitos/mL como descrito acima na presença ou ausência de ConA, amitraz e/ou do solvente arol. Após 48 horas de cultura foram adicionados 10 µL de MTT (CGD1 - SIGMA) a 5mg/mL em PBS estéril. As células foram mantidas em cultura a 37°C por mais 4 horas, quando foram adicionados 100µL de uma solução de dodecilssulfato de sódio (SIGMA) a 10% em HCl 0,01N. As placas foram mantidas em 37°C por 18 horas e a densidade óptica lida em leitor de ELISA a 550 nm.

*Avaliação da proliferação de linfócitos T ou B:* Após 48 horas de cultura adicionou-se aos esplenócitos 0,5 mCi/poço de metil-[<sup>3</sup>H] timidina ([<sup>3</sup>H]TdR, Amersham Pharmacia, Biotech UK Ltd, Little Chalfont, Bucks., UK). Após 18 horas a cultura foi coletada em papel de filtro (Titerterk, Flow lab, McLean, VA. EUA) por coletor celular

“cell harvester”, Skatron, Lier, Norway). A incorporação de trítio foi medida após a adição de líquido de cintilação em cintilador automático (Packard Instrument, Co, Meriden, CT, USA). Os resultados foram expressos em contagem média por minuto (c.p.m.) das triplicatas da cultura.

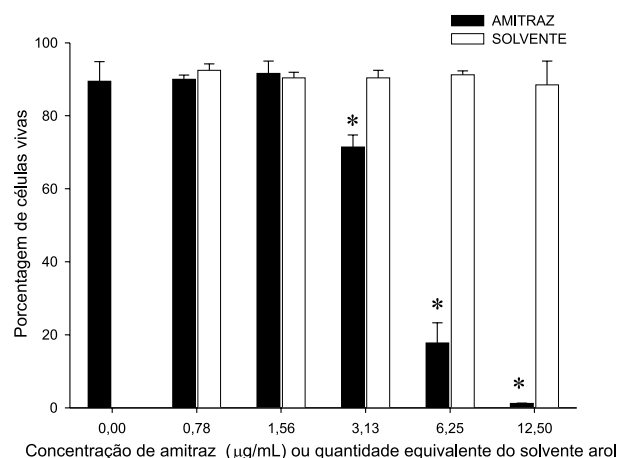
**Quantificação da produção de Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ):** A produção de IFN- $\gamma$  foi avaliada pelo método imunoadsorvente ligado à enzima (ELISA), variação ELISA de captura como descrito por Tadokoro e Abrahamsohn, (2001). Os anticorpos monoclonais XMG 1.2 (anticorpo de cobertura) e o anticorpo AN18 biotinilado foram produzidos a partir de cultura de hibridomas. A reação foi revelada pela adição de extravidin® (E2511- SIGMA) conjugada a peroxidase seguido da adição do cromógeno ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) A1227- SIGMA) contendo 0,001% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (C8531- SIGMA). A leitura foi feita em leitor de ELISA a 405 nm. Os sobrenadantes de cultura dos esplenócitos foram testados em duplicatas e os resultados expressos em média  $\pm$  desvio-padrão da média. O limite de detecção foi de 1,6 ng/mL.

**Análise estatística:** Todos os resultados foram avaliados por análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

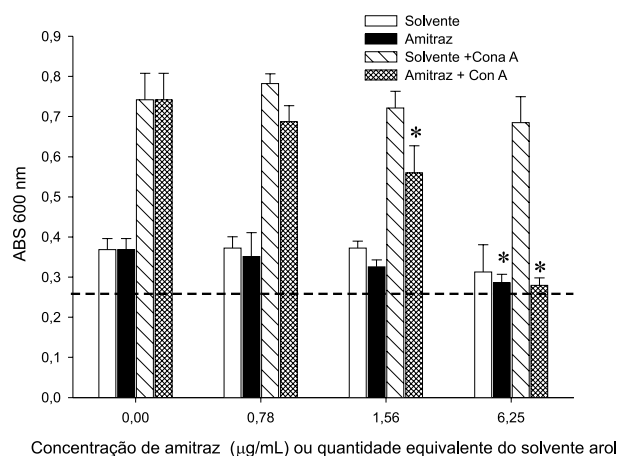
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A toxicidade de drogas pode variar muito nos diversos tipos celulares e órgãos de um indivíduo, dependendo, por exemplo, do mecanismo de ação da droga em questão. Em ratos, foi demonstrado que o amitraz tem ação inibitória sobre a monoamino oxidase (MOSER e MACPHAIL, 1986), suprime a formação de AMPc e liberação de insulina (CHEN e HSU, 1994), promove agregação de plaquetas (JOHNSON e KNOWLES, 1985) entre outros efeitos. Em linhagens de células tumorais, essa droga não se mostrou tóxica em cultura por 48 horas em concentrações inferiores a 3 $\mu$ g/mL (UENG et al., 2004). Por outro lado, linhagem de célula epitelial de rim suíno não sofreu alteração da sua proliferação quando cultivada com amitraz na concentração de 10 $\mu$ g/mL por 48 horas (D'ANGELO e RODRIGUES, 1996). Em estudo prévio realizado por Di Filippo et al. (2002), a viabilidade de esplenócitos murinos começou a diminuir quando cultivados por 48 horas em concentrações iguais ou superiores a 3,13  $\mu$ g/mL de amitraz (Figura 1). Nessa concentração, apenas 71,4  $\pm$  3,3% das células mostravam-se viáveis e capazes de excluir o azul de tripan do citoplasma. Diante desse resultado, optou-se por trabalhar com concentrações de até 1,56  $\mu$ g/mL de amitraz, para que os efeitos observados sobre os esplenócitos não fossem decorrentes da diminuição do número de células viáveis.

O ensaio de redução do MTT tem sido extensivamente usado para estimar a viabilidade e a proliferação celular. Embora a precisa localização das enzimas responsáveis pela redução desse sal tetrazólico ainda não seja certa, grande parte da redução do MTT depende do potencial redox mitocondrial, fazendo com que o uso dessa técnica possa estimar a atividade mitocondrial ou o metabolismo celular (BERNAS e DOBRUCKI, 2002, COLLIER e PRITSOS, 2003). A atividade mitocondrial de esplenócitos murinos não se alterou quando tratados com amitraz em concentrações iguais a 1,56  $\mu$ g/mL, porém essa atividade foi significativamente reduzida quando os esplenócitos foram tratados com amitraz e estimulados com ConA, um conhecido mitógeno para linfócitos T (BOLDT et al., 1975, MOND e BRUNWICK, 1998). Esse dado sugere que a presença do amitraz pode impedir a ativação de linfócitos T. Quando os linfócitos T são ativados pelos antígenos específicos ou por mitógenos, essas células rapidamente proliferam para, depois, começar a exercer a sua função. Os resultados demonstram que a proliferação dos linfócitos T estimulada por ConA não se alterou quando o amitraz foi utilizado em concentrações capazes de inibir o metabolismo dessas células, ou seja, 1,56 $\mu$ g/mL (Figura

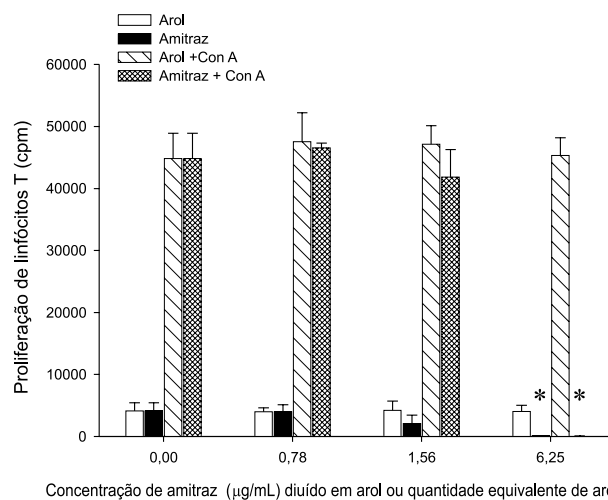


**Figura 1 - Amitraz em concentrações iguais ou superiores a 3,13  $\mu$ g/mL é tóxico para células esplênicas em culturas.** Células esplênicas de camundongos foram obtidas como descrito em Material e Métodos. As células foram cultivadas por 48 horas em presença de amitraz (previamente dissolvido em arol) em diferentes concentrações ou de solvente arol nas quantidades equivalentes àquelas utilizadas para dissolver o amitraz. As barras representam a porcentagem de células vivas  $\pm$  desvio-padrão de células esplênicas de 4 camundongos. \* representa diferença estatística das células não-tratadas com amitraz ou arol ( $p \leq 0,05$ ). O gráfico apresenta 1 de 3 experimentos.



**Figura 2 - Amitraz em concentrações iguais ou superiores a 1,56 µg/mL inibe o metabolismo de células esplênicas estimuladas com mitógeno.** Células esplênicas de camundongos foram obtidas como descrito em Material e Métodos. As células foram cultivadas por 48 horas em presença de amitraz (previamente dissolvido em arol) em diferentes concentrações ou de solvente arol nas quantidades equivalentes àquelas utilizadas para dissolver o amitraz. O metabolismo celular foi avaliado pela metabolização de MTT por 2 horas. As barras representam absorbância 600 nm  $\pm$  desvio-padrão de células esplênicas de 3 camundongos. A linha pontilhada representa a absorbância na ausência de células. \* representa diferença estatística das células não-tratadas com amitraz ou arol ( $p \leq 0,05$ ). O gráfico apresenta 1 de 2 experimentos.

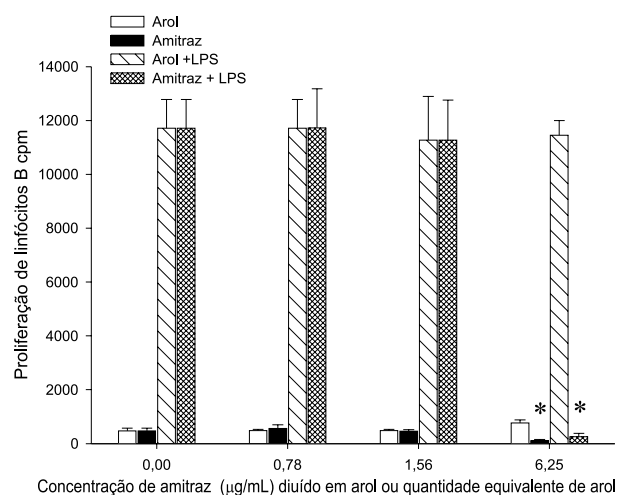
2). Isso indica que o amitraz tem uma ação seletiva em algumas atividades dos linfócitos T, já que inibe a atividade mitocondrial, mas não interfere na proliferação dessas células (Figuras 2 e 3). A proliferação dos linfócitos B também não se alterou quando as células esplênicas foram tratadas com baixas doses de amitraz e com LPS (Figura 4), um conhecido mitógeno para linfócitos B (MOND e BRUNWICK, 1998), permitindo que se infira que a proliferação celular não é inibida pela presença de doses de amitraz de até 1,56 µg/mL. Uma importante função dos linfócitos T auxiliares, quando são estimulados por antígenos específicos, é a de produção de citocinas, sendo o IFN- $\gamma$  uma das principais citocinas pró-inflamatórias produzidas pelos linfócitos T para ativação da resposta imune celular (GAZZINELLI et al., 1998). O IFN- $\gamma$  exerce várias funções sobre o sistema imune tais como: a estimulação da atividade microbicida de macrófagos, o aumento da expressão de moléculas co-estimulatórias, o estímulo da secreção de outras citocinas,



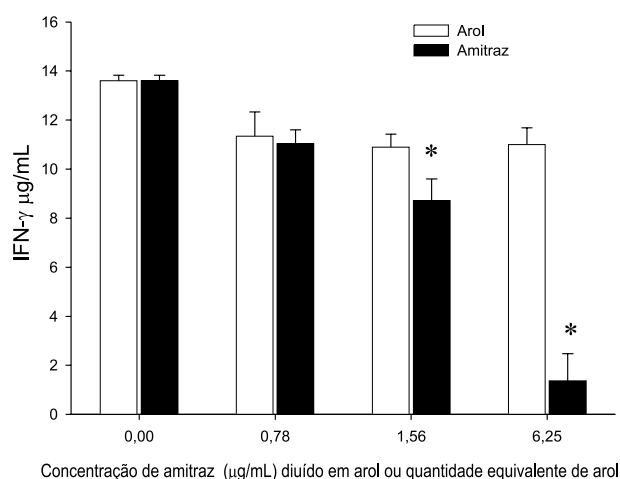
**Figura 3 - Amitraz em concentrações iguais ou superiores a 1,56 µg/mL não interfere na proliferação de linfócitos T.** Células esplênicas de camundongos foram obtidas como descrito em Material e Métodos. As células foram estimuladas ou não com Con A (5µg/mL) e cultivadas por 48 horas em presença de amitraz (previamente dissolvido em arol) em diferentes concentrações ou de solvente arol nas quantidades equivalentes àquelas utilizadas para dissolver o amitraz. As barras representam a proliferação das células T avaliada pela incorporação de timidina [ $^3$ H] expressa pela contagem média por minuto (cpm)  $\pm$  desvio-padrão de células esplênicas de 3 camundongos. \* representa diferença estatística das células não tratadas com amitraz ou arol ( $p \leq 0,05$ ). O gráfico apresenta 1 de 2 experimentos.

dentre outros efeitos. Como apresentado na Figura 5, a produção de IFN- $\gamma$  também foi reduzida devido à presença do amitraz.

Sabe-se que o amitraz, em doses superiores a 3,13 µg/mL, é citotóxico para esplenócitos murinos (DI FILIPPO et al., 2002). Além disso, doses não citotóxicas dessa droga não inibem a proliferação de linfócitos T ou B, quando estimulados por mitógenos policlonais. Entretanto, na dose de 1,56 µg/mL, o amitraz inibiu a atividade redox das mitocôndrias e a produção de IFN- $\gamma$ . Embora a diminuição da atividade mitocondrial observada possa indicar diversas alterações no metabolismo celular dos linfócitos, a inibição da produção de IFN- $\gamma$  sugere uma diminuição da resposta inflamatória mediada por essa citocina. Esse efeito anti-inflamatório associado ao potencial acaricida do amitraz pode ser benéfico ao hospedeiro, pois proporciona um combate ao parasita associado a uma diminuição nos danos teciduais causados pela resposta inflamatória.



**Figura 4** - Amitraz em concentrações iguais ou superiores a 1,56 µg/mL não interfere na proliferação de linfócitos B. Células esplênicas de camundongos foram obtidas como descrito em Material e Métodos. As células foram estimuladas ou não com LPS (10µg/mL) e cultivadas por 48 horas em presença de amitraz (previamente dissolvido em arol) em diferentes concentrações ou de solvente arol nas quantidades equivalentes àquelas utilizadas para dissolver o amitraz. As barras representam a proliferação das células B, avaliada pela incorporação de timidina [<sup>3</sup>H] expressa pela contagem média por minuto (cpm) ± desvio-padrão de células esplênicas de 3 camundongos. \* representa diferença estatística das células não tratadas com amitraz ou arol (p ≤ 0,05). O gráfico apresenta 1 de 2 experimentos.



**Figura 5** - A produção de IFN-γ é inibida pelo Amitraz em concentrações iguais ou superiores a 1,56µg/mL. Células esplênicas de camundongos foram obtidas como descrito em Material e Métodos. As células foram estimuladas ou não com Con A (5µg/mL) e cultivadas por 48 horas em presença de amitraz (previamente dissolvido em arol) em diferentes concentrações ou de solvente arol nas quantidades equivalentes àquelas utilizadas para dissolver o amitraz. As barras representam a quantidade de IFN-y no sobrenadante de cultura, determinada por ELISA. Cada barra representa a média ± desvio-padrão da dosagem no sobrenadante de cultura de células esplênicas de 3 camundongos. \* representa diferença estatística das células não-tratadas com amitraz ou arol (p ≤ 0,05). O gráfico apresenta 1 de 2 experimentos.

#### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a FAPESP, CAPES e o CNPq pelas bolsas de pesquisa e suporte financeiro.

ARTIGO RECEBIDO: Abril/2005  
APROVADO: Maio/2006

#### REFERÊNCIAS

AGIN, H., CALKAVUR, S., UZUN, H., BAK, M. Amitraz poisoning: clinical and laboratory findings. **Indian Pediatric**, v.41, n.5, p.482-486, 2004.

AZIZ, S. A., KNOWLES, C. O. Inhibition of monoamine oxidase by the pesticide chlordimeform and related compounds. **Nature**, v.242, p.417-418, 1973.

BAKER, K. P. Observations on the epidemiology, diagnosis and treatment of demodicosis in dogs. **Veterinary Record**, v.86, n.4, p.90-91, 1970.

BERNAS, T., DOBRUCKI, J. Mitochondrial and nonmitochondrial reduction of MTT: interaction of MTT with TMRE, JC-1, and NAO mitochondrial fluorescent probes. **Cytometry**, v.47, n.4, p.236-242, 2002.

BOLDT, D. H., MACDERMOTT, R. P., JOROLAN, E. P. Interaction of plant lectins with purified human lymphocyte populations: binding characteristics and kinetics of proliferation. **Journal of Immunology**, v.114, n.5, p.1532-1536, 1975.

BUSSIERAS, J., CHERMETTE, R. Bilan de deux ans de traitement de la demodecie du chien par amitraz. **Recueil de Medicine Veterinaire de l'Ecole d'Alfort**, v.156, p.605-608, 1980.

- CHEN, T. H. W., HSU, H. Inhibition of insulin release by a formamidine pesticide amitraz and its metabolites in a rat beta-cell line: an action mediated by alpha-2 adrenoceptors, a GTP-binding protein and a decrease in cyclic AMP. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapy**, v.271, n.3, p.1240-1245, 1994.
- COLLIER, A. C., PRITSOS, C. A. The mitochondrial uncoupler dicumarol disrupts the MTT assay. **Biochemistry and Pharmacology**, v.66, n.2, Jul 15, p.281-287, 2003.
- COSTA, L. G., GASTEL, J., MURPHY, S. D. The formamidine pesticides chlordimeform and amitraz decrease hepatic glutathione in mice through an interaction with alpha 2-adrenoceptors. **Journal Toxicol Environ Health** v.33, n.3, p.349-358, 1991.
- COSTA, L. G., OLIBET, G., MURPHY, S. D. Alpha 2-adrenoceptors as a target for formamidine pesticides: in vitro and in vivo studies in mice. **Toxicology Appl Pharmacology**, v.93, n.2, p.319-328, 1988.
- COWAN, L. A., CAMPBELL, K. Generalized demodicosis in a cat responsive to amitraz. **Journal of the American Veterinary Medicine Association**, v.192, n.10, p.1442-1444, 1988.
- CURTIS, C. F. Current trends in the treatment of Sarcoptes, Cheyletiella and Otodectes mite infestations in dogs and cats. **Veterinary Dermatology**, v.15, n.2, p.108-114, 2004.
- D'ANGELO, M., RODRIGUES, M. A. Amitraz effects on foot-and-mouth disease virus in mammalian cells in vitro. **Ecotoxicology Environment Safety**, v.33, n.2, p.163-167, 1996.
- DI FILIPPO, P. A., SOUSA, R. V., SANTANA, G. C., OLIVEIRA, M. A. P. Atividade antiinflamatória *in vitro* do amitraz e do solvente arol em células esplênicas de camundongos C3H. In: Congresso de iniciação científica da UFLA – CICESAL, 13., SEMINÁRIO de avaliação do PIBIC/CNPq, 8., SEMINÁRIO de avaliação do PBICT/FAPEMIG, 3., 2000, Lavras, MG. **Anais...** p. 266.
- ELFASSY, O. J., GOODMAN, F. W., LEVY S, A., CARTER, L. L. Efficacy of an amitraz-impregnated collar in preventing transmission of *Borrelia burgdorferi* by adult *Ixodes scapularis* to dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.219, n.2, p.185-189, 2001.
- FOLZ, S. D., KAKUK, T. J., HENKE, C. L., RECTOR, D. L., TESAR, F. B. Clinical evaluation of amitraz as a treatment for canine demodicosis. **Veterinary Parasitology**, v.16, n.3-4, p. 335-341, 1984.
- FOLZ, S. D., KRATZER, D. D., CONKLIN, R. D. JR., NOWAKOWSK, L. H. I., KAKUK, T. J., RECTOR, D. L. Chemotherapeutic treatment of naturally acquired generalized demodicosis. **Veterinary Parasitology**, v.13, n.1, p.85-93, 1983.
- GAZZINELLI, R. T., TALVANI, A., CAMARGO, M. M., SANTIAGO, H. C., OLIVEIRA, M. A. P., VIEIRA, L. Q., MARTINS, G. A., ALIBERTI, J. C., SILVA, J. S. Induction of cell-mediated immunity during early stages of infection with intracellular protozoa. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.31, p.89-104, 1998.
- HUGNET, C., BRUCHON-HUGNET, C., ROYER, H., BOURDOISEAU, G. Efficacy of 1.25% amitraz solution in the treatment of generalized demodicosis (eight cases) and sarcoptic mange (five cases) in dogs. **Veterinary Dermatology**, v.12, n.2, p.89-92, 2001.
- JOHNSON, T. L., KNOWLES, C. O. Formamidine-mediated inhibition of rat platelet aggregation. **General Pharmacology**, v.16, n.4, p.321-325, 1985.
- KAGARUKI, L. K. The efficacy of amitraz against cattle ticks in Tanzania. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v.63, n.2, p.91-96, 1996.
- MEDLEAU, L., WILLEMSE, T. Efficacy of daily amitraz therapy for refractory, generalized demodicosis in dogs: two independent studies. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v.31, n.3, p.246-249, 1995.
- MOND, J. J., BRUNWICK, M. In vitro assays for mouse lymphocyte function. In: Coligan, Kruisbeck, Margulies, Shevack e Strober. **Current Protocols in Immunology**. Philadelphia: John Wiley & Sons, 1998, p.30-38.
- MOSER, V. C., MACPHAIL, R. C. Differential effects of formamidine pesticides on fixed-interval behavior in rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.84, n.2, Jun 30, p.315-324. 1986.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal Immunology Methods**, v.65, p.55-63, 1983.
- MUELLER, R. S. Treatment protocols for demodicosis: an evidence-based review. **Veterinary Dermatology**, v.15, n.2, p.75-89, 2004.
- PALMER, B. H., MCCARTHY, J. F., KOZLIK, A., HARRISON, J. R. A New Chemical Group of Cattle Acarecides. **Proc. of 3<sup>rd</sup> D. Jotarnat. Cong of Acarology Pragua**, p.687-691, 1971.

QUEIROZ-NETO, A., JUANG, S. J., SOUZA, K. R., AKAMATSU, A. Antinociceptive effect of amitraz in mice and rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.27, n.6, p.1407-1411, 1994.

SCOTT, D. W., WALTON, D. K. Experiences with the use of amitraz and ivermectin for treatment of generalized demodicosis in dog. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v.21, p.535-541, 1985.

TADOKORO, C. E., ABRAHAMSOHN I. A. Bone marrow-derived macrophages grown in GM-CSF or M-CSF differ in their ability to produce IL-12 and to induce IFN-gamma production after stimulation with Trypanosoma cruzi antigens. **Immunology Letters**, v.77, n.1, p.31-38, 2001.

UENG, T. H., HUNG, C. C., WANG, P. H., CHAN, W. K. Effects of amitraz on cytochrome P450-dependent monooxygenases and estrogenic activity in MCF-7 human breast cancer cells and immature female rats. **Food Chemical Toxicology**, v.42, n.11, p.1785-1794, 2004.

VILLARREAL, C. F., FREIRE, A. C. T., SANTANA, G. C. Influência da ioimbina, idazoxan, 4-aminopiridina, aminofilina e naloxona sobre o efeito antinociceptivo do amitraz em camundongo. In: **ANAIS/XI/FESBE**, 1996, Caxambú, Anais... p.289.

VILLARREAL, C. F., SANTANA, G. C. Estudo comparativo do efeito antinociceptivo do amitraz e da xilazina em camundongos. In: **XII/FESBE**, 1997, Caxambú. Anais... p.340.