



INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE  
CIÊNCIAS DA VIDA E DA NATUREZA  
(ILACVN)  
BIOTECNOLOGIA

**DESENVOLVIMENTO E ESTAGIAMENTO EMBRIONÁRIO DO  
CARRAPATO VERMELHO DO CÃO,  
*Rhipicephalus linnaei* (Audouin, 1826)(Acari: Ixodidae), DO SEXTO AO  
DÉCIMO DIA.**

**ILENIA BEATRIZ NAVA ZAMBRANO**

FOZ DO IGUAÇU



2025

INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE  
CIÊNCIAS DA VIDA E DA NATUREZA  
(ILACVN)  
BIOTECNOLOGIA

**DESENVOLVIMENTO E ESTAGIAMENTO EMBRIONÁRIO DO  
CARRAPATO VERMELHO DO CÃO,  
*Rhipicephalus linnaei* (Audouin, 1826)(Acari: Ixodidae), DO SEXTO AO  
DÉCIMO DIA.**

**ILENIA BEATRIZ NAVA ZAMBRANO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao  
Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida  
e da Natureza da Universidade Federal da  
Integração Latino-Americana, como requisito  
parcial à obtenção do título de Bacharel em  
Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Pablo Henrique Nunes  
Co-orientadora: Profa. Dra. Carla Vermeulen Carvalho Grade

FOZ DO IGUAÇU  
2025  
ILENIA BEATRIZ NAVA ZAMBRANO

**DESENVOLVIMENTO E ESTAGIAMENTO EMBRIONÁRIO DO  
CARRAPATO VERMELHO DO CÃO,  
*Rhipicephalus linnaei* (Audouin, 1826)(Acari: Ixodidae), DO SEXTO AO  
DÉCIMO DIA.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao  
Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida  
e da Natureza da Universidade Federal da  
Integração Latino-Americana, como requisito  
parcial à obtenção do título de Bacharel em  
Biotecnologia.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Prof. Dr. Pablo Henrique Nunes  
UNILA

---

Prof. Dra. Elaine Della Giustina Soares (UNILA)

---

Prof. Beatriz Mitidiero Stachissini Arcain  
(ITAIPU PAQUETEC)

Foz do Iguaçu, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

Dedico este trabalho a:  
meus pais, irmãos e sobrinhos

## AGRADECIMIENTOS

Em primeiro lugar agradeço ao meu professor orientador Pablo Nunes e a minha co-orientadora Carla Grade pela constante orientação, dedicação e paciência durante a realização deste trabalho, assim como por todos os conhecimentos compartilhados ao longo do curso, com aulas inspiradoras.

Agradeço à professora Laura Amato, que foi minha tutora no PET desde o segundo semestre, que não só me orientou nas atividades acadêmicas mas sim foi um apoio a nível pessoal, me ajudando com as dificuldades sempre com muito carinho e compreensão.

Especialmente a minha família, pais, irmãos e tios que me apoiaram a cada dia em todas as minhas decisões e sonhos, sem importar quais foram, em especial meus pais que me criaram para ser uma pessoa apaixonada pela curiosidade, a vida, e a pesquisa. E aos meus irmãos que tem sido uma fonte de inspiração e meus modelos a seguir, em todo momento me impulsionando a lutar e conseguir minhas metas com muito amor.

Daniel, que esteve presente em cada etapa deste processo desde nossa chegada a Foz do Iguaçu, mas que tem estado presente em cada etapa da minha vida, e estar do meu lado nos dias difíceis.

Aos membros da banca a professora Elaine e a professora Beatriz por aceitar formar parte deste momento, e por dedicar parte de seu tempo a ler este trabalho.

Aos colegas do curso, que fizeram cada dia mais agradável, com cada risada, tempo de estudo, e seção de perguntas antes de cada prova, vocês foram umas das melhores coisas que a UNILA já me deu, agradeço o carinho e sei que vocês todos vão ser Biotecnologistas maravilhosos.

Finalmente quero agradecer a todas as pessoas que fizeram possível minha viagem para concretar os estudos na UNILA

## RESUMO

Estudos moleculares sobre a evolução dos carrapatos sugerem que esses ectoparasitas surgiram no período Carbonífero e, atualmente, encontram-se amplamente distribuídos em nível mundial, com maior diversidade de espécies nas regiões tropicais e subtropicais. Os carrapatos pertencem ao filo Arthropoda. A ordem Ixodida, distribuída em quatro famílias: três existentes, Ixodidae; Argasidae; e Nuttalliellidae, e uma extinta, Deinocrotonidae. No Brasil, eram conhecidas, em 2019, 70 espécies de carrapatos, sendo 47 pertencentes à família Ixodidae e 23 à família Argasidae. Os carrapatos de corpo duro recebem essa denominação devido à presença de uma placa dorsal esclerotizada. Possuem características que aumentam sua capacidade de transmitir patógenos e habitam diversos ambientes. O gênero *Rhipicephalus* compreende 79 espécies e é considerado tipicamente originário da África; por isso, a hipótese mais aceita é a de que *R. sanguineus* seja uma espécie africana disseminada mundialmente por meio de cães. Essa espécie foi descrita pela primeira vez em 1806 por Latreille. *R. linnaei* (Audouin, 1826), anteriormente incluída na sinonímia de *R. sanguineus*, foi proposta como substituição para denominar a “linhagem tropical” de *R. sanguineus sensu lato*. Com base nas informações disponíveis, adotou-se o uso do nome *Rhipicephalus linnaei* para essa linhagem. Os carrapatos do gênero *Rhipicephalus* são geralmente pequenos, de coloração amarelo-pálida a marrom-avermelhada, com corpo alongado e discreto dimorfismo sexual. Uma característica marcante do carrapato-marrom é a base hexagonal do capítulo. *R. sanguineus sensu lato* possui grande importância em saúde pública por sua capacidade de carregar, transmitir ou atuar como reservatório de diversos patógenos de relevância econômica, veterinária e humana, como *Rickettsia conorii*, agente da febre botonosa. Seu ciclo de vida envolve três hospedeiros, sendo o cão doméstico o preferencial em todas as fases. A embriogênese dos carrapatos envolve eventos morfogenéticos bem coordenados que determinam a posição, diferenciação e destino dos tecidos em formação. No entanto, existem poucos estudos sobre o desenvolvimento embrionário de carrapatos e, especificamente para *R. linnaei*, não há bibliografia descrevendo suas etapas, o que motiva a realização deste trabalho. Compreender esse processo pode ser essencial para estratégias de controle. Este estudo descreveu e mapeou morfologicamente as etapas do desenvolvimento embrionário de *R. linnaei* do 6º ao 10º dia, identificando estruturas e mudanças celulares-chave. Foram utilizadas dez fêmeas ingurgitadas adquiridas da empresa Ticks & Fleas, mantidas em incubadora BOD a 27 °C, umidade relativa de 61% e fotoperíodo de 12 horas. Os ovos foram coletados diariamente, em intervalos de 24 horas, mantidos nas mesmas condições e processados. Após a remoção do córion, a marcação com DAPI foi bem-sucedida. No 6º dia, os embriões apresentaram características do estágio 7, como a formação da banda germinativa e estabelecimento do eixo dorso-ventral. entre o 6º e o 7º dia, observou-se o estágio 8, com presença do sulco ventral e início da diferenciação dos primórdios dos apêndices. Entre o 7º e o 8º dia, as características se encaixam no estágio 9, com crescimento dos apêndices e segmentações mais evidentes, e o quarto par de pernas com tamanho reduzido. No 9º e 10º dia, é documentada a progressão para o estágio 10, com alongamento dos primeiros três pares de pernas, maior organização cefálica, evidência do hipostômio e início do fechamento do sulco ventral, além da diferenciação entre prossoma e opistossoma.

**Palavras-chave:** vetores de patógenos; ectoparasitas; estágios embrionários; morfogênese; marcação com DAPI.

## RESUMEN

Estudios moleculares sobre la evolución de las garrapatas sugieren que ectoparásitos surgieron durante el período Carbonífero y, en la actualidad, se encuentran ampliamente distribuidos a nivel mundial, con mayor diversidad de especies en las regiones tropicales y subtropicales. Las garrapatas pertenecen al filo Arthropoda. El orden Ixodida está distribuido en cuatro familias: tres existentes, Ixodidae, Argasidae y Nuttalliellidae, y una extinta, Deinocrotonidae. En Brasil, hasta el año 2019, se conocían 70 especies de garrapatas, de las cuales 47 pertenecían a la familia Ixodidae y 23 a la familia Argasidae. Las garrapatas de cuerpo duro reciben esta denominación debido a la presencia de una placa dorsal esclerotizada. Presentan características que aumentan su capacidad de transmitir patógenos y habitan diversos ambientes. El género *Rhipicephalus* comprende 79 especies y se considera típicamente originario de África; por ello, la hipótesis más aceptada es que *R. sanguineus* sea una especie africana diseminada mundialmente a través de los perros. Esta especie fue descrita por primera vez en 1806 por Latreille. *R. linnaei* (Audouin, 1826), anteriormente incluida en la sinonimia de *R. sanguineus*, fue propuesta como sustitución para denominar la “línea tropical” de *R. sanguineus sensu lato*. Con base en la información disponible, se adoptó el uso del nombre *Rhipicephalus linnaei* para esta línea. Las garrapatas del género *Rhipicephalus* son generalmente pequeñas, de coloración amarillo pálida a marrón rojiza, con cuerpo alargado y discreto dimorfismo sexual. Una característica destacada de la garrapata marrón es la base hexagonal del capítulo. *R. sanguineus sensu lato* posee gran importancia en salud pública debido a su capacidad de portar, transmitir o actuar como reservorio de diversos patógenos de relevancia económica, veterinaria y humana, como *Rickettsia conorii*, agente de la fiebre botonosa. Su ciclo de vida involucra tres hospedadores, siendo el perro doméstico el hospedador preferencial en todas las fases. La embriogénesis de las garrapatas involucra eventos morfogénicos bien coordinados que determinan la posición, diferenciación y destino de los tejidos en formación. Sin embargo, existen pocos estudios sobre el desarrollo embrionario de las garrapatas y, específicamente para *R. linnaei*, no existe bibliografía que describa sus etapas, lo que motiva la realización de este trabajo. Comprender este proceso puede ser esencial para el desarrollo de estrategias de control. Este estudio describió y mapeó morfológicamente las etapas del desarrollo embrionario de *R. linnaei* del sexto al décimo día, identificando estructuras y cambios celulares clave. Se utilizaron diez hembras ingurgitadas adquiridas de la empresa Ticks & Fleas, mantenidas en incubadora BOD a 27 °C, con una humedad relativa del 61 % y un fotoperíodo de 12 horas. Los huevos fueron recolectados diariamente, a intervalos de 24 horas, mantenidos en las mismas condiciones y procesados. Tras la remoción del corion, la marcación con DAPI fue exitosa. En el sexto día, los embriones presentaron características del estadio 7, como la formación de la banda germinativa y el establecimiento del eje dorsoventral. Entre el sexto y el séptimo día, se observó el estadio 8, con presencia del surco ventral e inicio de la diferenciación de los primordios de los apéndices. Entre el séptimo y el octavo día, las características se ajustaron al estadio 9, con crecimiento de los apéndices y segmentaciones más evidentes, y el cuarto par de patas con tamaño reducido. En el noveno y décimo día, se documentó la progresión al estadio 10, con el alargamiento de los tres primeros pares de patas, mayor organización cefálica, evidencia del hipostoma e inicio del cierre del surco ventral, además de la diferenciación entre prosoma y opistosoma.

**Palabras clave:** vectores de patógenos; ectoparásitos; estadios embrionarios; morfogénesis; marcación con DAPI.

## ABSTRACT

Molecular studies on the evolution of ticks suggest that these ectoparasites originated during the Carboniferous period and are currently widely distributed worldwide, with greater species diversity in tropical and subtropical regions. Ticks belong to the phylum Arthropoda. The order Ixodida is distributed into four families: three extant families, Ixodidae, Argasidae, and Nuttalliellidae, and one extinct family, Deinocrotonidae. In Brazil, as of 2019, 70 tick species were known, of which 47 belonged to the family Ixodidae and 23 to the family Argasidae. Hard-bodied ticks receive this designation due to the presence of a sclerotized dorsal plate. They possess characteristics that increase their ability to transmit pathogens and inhabit diverse environments. The genus *Rhipicephalus* comprises 79 species and is considered to be typically of African origin; therefore, the most widely accepted hypothesis is that *R. sanguineus* is an African species disseminated worldwide through dogs. This species was first described in 1806 by Latreille. *R. linnaei* (Audouin, 1826), previously included in the synonymy of *R. sanguineus*, was proposed as a replacement to designate the “tropical lineage” of *R. sanguineus sensu lato*. Based on the available information, the use of the name *Rhipicephalus linnaei* was adopted for this lineage. Ticks of the genus *Rhipicephalus* are generally small, pale yellow to reddish-brown in color, with an elongated body and discrete sexual dimorphism. A distinctive characteristic of the brown dog tick is the hexagonal base of the capitulum. *R. sanguineus sensu lato* is of great importance in public health due to its ability to carry, transmit, or act as a reservoir for several pathogens of economic, veterinary, and human relevance, such as *Rickettsia conorii*, the causative agent of Mediterranean spotted fever. Its life cycle involves three hosts, with the domestic dog being the preferred host at all developmental stages. Tick embryogenesis involves well-coordinated morphogenetic events that determine the position, differentiation, and fate of developing tissues. However, there are few studies on tick embryonic development and, specifically for *R. linnaei*, there is no literature describing its stages, which motivates the present study. Understanding this process may be essential for control strategies. This study described and morphologically mapped the stages of embryonic development of *R. linnaei* from the sixth to the tenth day, identifying key structures and cellular changes. Ten engorged females were used, acquired from the company Ticks & Fleas, and maintained in a BOD incubator at 27 °C, 61% relative humidity, and a 12-hour photoperiod. Eggs were collected daily at 24-hour intervals, maintained under the same conditions, and processed. After removal of the chorion, DAPI staining was successful. On the sixth day, embryos showed characteristics of stage 7, such as formation of the germ band and establishment of the dorsoventral axis. Between the sixth and seventh days, stage 8 was observed, with the presence of the ventral furrow and the beginning of differentiation of appendage primordia. Between the seventh and eighth days, the characteristics corresponded to stage 9, with growth of the appendages and more evident segmentation, and the fourth pair of legs showing reduced size. On the ninth and tenth days, progression to stage 10 was documented, with elongation of the first three pairs of legs, greater cephalic organization, evidence of the hypostome, and the beginning of ventral furrow closure, as well as differentiation between the prosoma and opisthosoma.

**Keywords:** pathogen vectors; ectoparasites; embryonic stages; morphogenesis; DAPI staining.

## SUMARIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	
1.1 TAXONOMIA.....	10
1.2 BIOLOGIA DOS CARRAPATOS.....	11
1.3 IMPORTÂNCIA MÉDICA E VETERINÁRIA.....	14
1.4 CONTROLE.....	16
1.5 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA.....	19
1.6 CLASIFICAÇÃO TAXONÓMICA DE <i>Rhipicephalus linnaei</i> .....	20
1.7 CICLO DE VIDA DE <i>R. linnaei</i> .....	21
1.8 BIOLOGIA DE <i>Rhipicephalus linnaei</i> .....	24
1.9 MORFOLOGIA DE <i>R. linnaei</i> .....	24
1.10 IMPORTÂNCIA MÉDICA E ECONÔMICA DE <i>R. linnaei</i> .....	29
1.11 REPRODUÇÃO <i>R. linnaei</i> .....	31
1.12 DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DOS CARRAPATOS.....	32
<b>2 JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>35</b>
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>36</b>
3.1 OBJETIVO GERAL.....	36
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
<b>4 METODOLOGIA.....</b>	<b>36</b>
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>38</b>
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>50</b>
<b>7 CONCLUSÕES.....</b>	<b>54</b>
<b>8 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>55</b>

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Taxonomia

A classificação dos carrapatos baseia-se em critérios de filogenia e apresenta grande correlação com as características morfológicas, considerando-se as semelhanças entre os grupos. Nos últimos quinze anos foram introduzidas modificações significativas nas classificações anteriores, com a incorporação de marcadores moleculares nas análises filogenéticas. Isso levou à reconsideração do status taxonômico e da posição filogenética de numerosas espécies de carrapatos (Nava et al., 2009).

Os carrapatos pertencem ao filo dos artrópodes, incluídos no subfilo Cheliceriformes. A classe Chelicerata inclui aranhas, carrapatos, ácaros, escorpiões e caranguejos-ferradura (Brusca e Brusca, 2007). O subfilo recebe seu nome devido à presença de quelíceras, que são apêndices pontiagudos, no caso dos carrapatos, são utilizadas para dilacerar a pele e penetrar as peças bucais no hospedeiro. A classe Arachnida, inclui a subclasse Acari que engloba 11 ordens, entre elas a ordem Ixodida (Brusca e Brusca, 2007; Nava et al., 2009; Nava et al., 2017; Santos et al., 2013).

Dentro da subclasse Acari, consideram-se dois grupos: Actinotrichida (Acariformes: ácaros) e Anactinotrichida (Parasitiformes: carrapatos) (Nava et al., 2017; Santos et al., 2013). De acordo com as informações disponíveis em Nava et al. (2017), a ordem Ixodida inclui 956 espécies distribuídas em quatro famílias: três atuais (Ixodidae, com 736 espécies; Argasidae, com 218 espécies; e Nuttalliellidae, monoespecífica) e uma extinta (Deinocrotonidae, monoespecífica).

A família Ixodidae está dividida em dois grupos com base em suas características morfológicas e biológicas. O grupo Prostriata que inclui todas as espécies do gênero *Ixodes*, cuja característica comum é um sulco anal anterior ao ânus e um ventre majoritariamente coberto por placas planas dos machos. Já o grupo Metastriata contém espécies de gêneros importantes como *Amblyomma*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis* e *Rhipicephalus* com o sulco anal posterior ao ânus ou indistinto, e o ventre dos machos nunca é majoritariamente coberto por placas planas (Nava et al., 2017).

A família Argasidae encontra-se dividida em duas subfamílias: Argasinae, composta pelo gênero *Argas*, contendo 56 espécies, e *Ornithodorinae*, composta por 4 gêneros: *Antricola* com 74 espécies, *Ornithodoros* com 42 espécies, *Otobius* com 3 espécies e *Nothoaspis* (Bakkes et al., 2018; Horak et al., 2002).

Nas regiões da Argentina, Chile, Paraguai e Uruguai estão registradas 62 espécies de carrapatos (Nava et al., 2017). Por outro lado, até 2019, eram conhecidas 70 espécies de carrapatos no Brasil, incluindo 47 espécies da família Ixodidae e 23 espécies pertencentes à família Argasidae (Costa et al., 2020; Dantas-Torres, 2019).

## 1.2 Biologia dos carrapatos

Estudos de sistemática molecular sobre a evolução dos carrapatos sugerem que esses antigos ectoparasitas surgiram no período Carbonífero da era Paleozóica, que teve início há cerca de 354 milhões de anos (De Sandip et al., 2020), e atualmente encontram-se amplamente distribuídos em nível mundial. Embora sua distribuição vá desde zonas tropicais até subárticas, a maior diversidade de espécies ocorre nas regiões tropicais e subtropicais (Anderson e Magnarelli, 2008).

Os carrapatos conhecidos como carrapatos de corpo mole (Argasidade) possuem características morfológicas que lhes conferem resistência e evitam a dessecação, o que lhes permite viver em condições de altas temperaturas e regiões áridas. No entanto, para completar seus ciclos reprodutivos, as condições ideais são úmidas e mais frescas. Para tanto, eles geralmente se aproveitam de microclimas gerados em fendas e áreas rochosas. Além das condições microclimáticas intrínsecas dos abrigos, o calor corporal e a umidade do hospedeiro dentro do micro-habitat ajudam a estabelecer as condições necessárias para o desenvolvimento desses carrapatos (Vial, 2009).

Os carrapatos de corpo duro (Ixodidae) recebem esse nome devido à presença de uma placa dorsal esclerotizada e possuem certas características que aumentam sua capacidade de transmitir patógenos. Elas se distribuem amplamente nas zonas tropicais e subtropicais, onde aproximadamente 50% das espécies pertencem ao gênero *Amblyomma* (Dantas-Torres, 2008; Nava et al., 2009). Os carrapatos de corpo duro que habitam o campo podem ser encontrados em florestas, savanas, matagais, páramos, pastagens, pradarias, arbustos e até mesmo desertos. Essas espécies têm tolerância limitada à dessecação, mas compensam movendo-se verticalmente na vegetação de acordo com suas necessidades de umidade e hospedeiros, possuindo ainda a capacidade de absorver umidade diretamente do ar (Anderson e Magnarelli, 2008).

Na Europa, os carrapatos de corpo duro aumentaram sua densidade e sua capacidade de se expandir para novas áreas; isso pode estar relacionado ao aumento das temperaturas, invernos mais curtos e outonos e primaveras mais longos, o que favorece a expansão da

distribuição de algumas espécies (por exemplo, *Dermacentor reticulatus*, *Ixodes ricinus*, *Rhipicephalus sanguineus*) para latitudes mais ao norte e altitudes mais elevadas, tanto na Europa como na Eurásia (Krčmar, 2019).

No Brasil, a persistência em zonas urbanas, assim como em áreas silvestres, está associada à presença de hospedeiros, tanto silvestres, quanto domésticos (Valero et al., 2013).

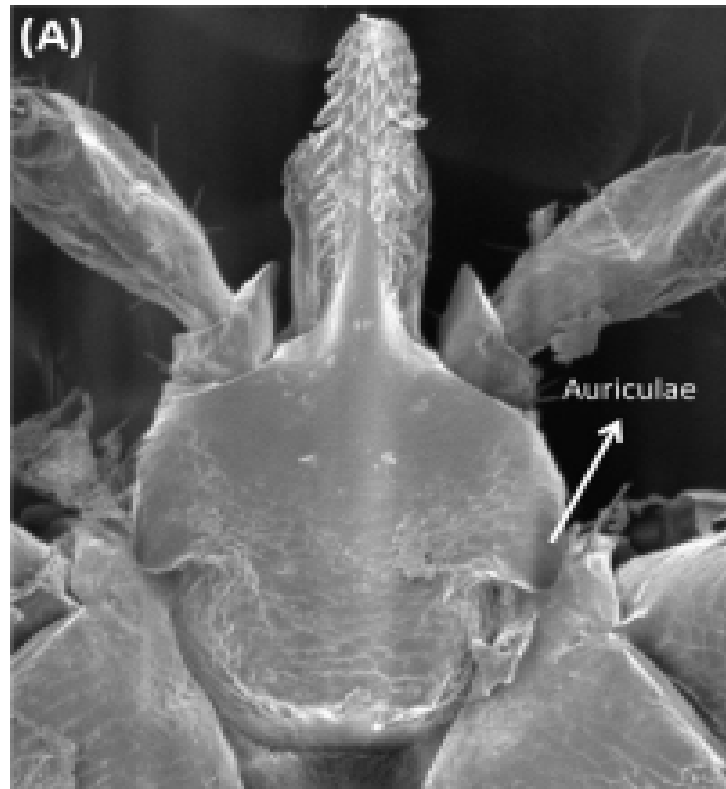
Algumas espécies de carrapatos conseguem sobreviver por longos períodos sem se alimentar, ou apresentam períodos de alimentação de curta duração. Certas espécies, como *Ixodes scapularis* (carrapato-de-pernas-pretas) e *Dermacentor variabilis* (carrapato-do-cão americano), podem passar mais de 98% de suas vidas fora de seus hospedeiros (Anderson e Magnarelli, 2008). Por outro lado, existem espécies com períodos de alimentação mais prolongados, como *Dermacentor albipictus* (carrapato-de-inverno).

A alimentação dos carrapatos está associada a diferentes classes de vertebrados, destacando-se anfíbios, répteis, aves e mamíferos. Algumas espécies podem adotar diferentes comportamentos na busca pelo hospedeiro; por exemplo, o carrapato-marrom-do-cão (*Rhipicephalus sanguineus*) é principalmente um caçador ativo, embora também possa adotar a estratégia de emboscada (Dantas-Torres, 2010).

A maioria das espécies de carrapatos são parasitas de animais silvestres. A redução dos habitats naturais de seus hospedeiros primários devido a atividades humanas, assim como o aumento do comércio de animais vivos, pode impactar diretamente a abundância, a riqueza e a distribuição das espécies (Nava et al., 2017). Algumas podem ser extintas, enquanto outras se adaptam às novas condições, o que pode gerar alterações nos seus padrões de alimentação, busca de hospedeiros e reprodução (Nava et al., 2017; Randolph, 2004).

O tipo de alimentação das fêmeas de Argasidae consiste em ingerir várias dezenas de vezes o seu volume em sangue, enquanto as fêmeas de Ixodidae podem ingerir até várias centenas de vezes o seu peso corporal. Diferentemente dos Argasidae, que podem acasalar, se alimentar e ovipositar repetidamente, os Ixodidae adultos passam por mudanças irreversíveis durante a alimentação, ocorrendo a maturação das gônadas e apenas uma postura maciça de ovos. Os machos de carrapatos do gênero *Ixodes* apresentam peças bucais mais especializadas para o acasalamento do que para a alimentação (Figura 1). Sua estrutura parece pouco adequada para aderir a um hospedeiro e alimentar-se, especialmente nas espécies nidícolas desse gênero (Kiszewski et al., 2001).

**Figura 1**



Peças bucais do macho de carrapatos do gênero *Ixodes*

Fonte Nava et al. 2017

O comportamento de cortejo e as estratégias de cópula nos carrapatos são determinados principalmente por feromônios. Esses compostos químicos são responsáveis por alguns comportamentos, como a agregação fora do hospedeiro, onde se formam grupos estacionários na vegetação. Esse tipo de feromônio de agregação provoca respostas diferentes dependendo da espécie. Por outro lado, no hospedeiro pode ocorrer uma agregação não sexual, atraindo diversos indivíduos. Este comportamento é estimulado por feromônios de agregação e de fixação (Dantas-Torres e Otranto, 2011; Kiszewski et al., 2001).

A agregação sexual dos *Metastrata* no hospedeiro ocorre devido aos feromônios sexuais secretados pelas fêmeas enquanto se alimentam, o que atrai os machos e os estimula a estabelecer contato sexual. As fêmeas de *Dermacentor variabilis*, por exemplo, secretam um feromônio copulatório em sua cutícula durante a alimentação. Ao tocar a fêmea, o macho “monta” sobre seu dorso e se desloca até a parte ventral. Em seguida, inverte-se de modo que os ventres coincidam; então, a estimulação por feromônios sexuais leva o macho a transferir seu espermátóforo para a fêmea (Kiszewski et al., 2001).

Os carrapatos são animais ovíparos, com métodos de cópula e reprodução complexos, passando pelos estágios do ciclo de vida de ovo, larva, ninfa e adulto. Muitas espécies podem ter mais de um hospedeiro durante seu ciclo (Anderson e Magnarelli, 2008). Os carrapatos da família Argasidae passam por várias fases ninfais ao longo de seu ciclo de vida. Um exemplo é a espécie *Ornithodoros puertoricensis*, que, dependendo de fatores ambientais como temperatura e umidade, pode passar por até quatro estágios de ninfa antes de mudar para adulto. Além disso, as fêmeas ingurgitadas podem realizar uma segunda fase de alimentação antes da postura, conforme demonstrado nos estudos realizados por Robayo-Sánchez et al. (2022).

Os carrapatos da família Ixodidae apresentam ciclo de vida hemimetábolo, de metamorfose incompleta, pois seus estágios iniciais de desenvolvimento possuem as mesmas características morfológicas, de comportamento e de alimentação que os estágios intermediários e o adulto. As larvas apresentam três pares de pernas, diferentemente da ninfa e do adulto. Os tempos de alimentação podem variar segundo a espécie. As fêmeas dos Ixodidae, após copularem sobre o hospedeiro, caem dele e buscam local seguro para ovipositar, geralmente no solo (Barradas et al., 2017; Céspedes-Rosas et al., 2024; Polanco-Echeverry e Ríos-Osorio, 2016).

Os carrapatos são vetores de organismos patogênicos, como bactérias, protozoários, vírus e nematóides o que os torna de grande importância para a medicina humana, a medicina veterinária e também em nível econômico (Anderson e Magnarelli, 2008).

### 1.3 Importância médica e veterinária

A capacidade vetorial dos artrópodes é um processo complexo, regido por um conjunto multifacetado de mecanismos genéticos. Em primeiro lugar, a interação com um novo patógeno desencadeia uma resposta de atividade molecular antimicrobiana, ativando rotas genéticas e bioquímicas que permitem ao artrópode estabelecer uma forte resistência aos patógenos, limitando sua proliferação e desenvolvendo estratégias, sejam elas genéticas ou imunológicas, que permitam que ele seja portador sem ser prejudicado (De Sandip et al., 2020; Esteves et al., 2009).

A laceração causada pela introdução das peças bucais do carrapato, combinada com os supressores imunológicos presentes em sua saliva, constitui uma porta de entrada para patógenos (Esteves et al., 2009). A maioria dos patógenos é adquirida pelos carrapatos

durante a ingestão de sangue de hospedeiros infectados, além da transmissão transovariana (De Sandip et al., 2020).

Os carrapatos têm a capacidade de transmitir muitos agentes patogênicos e são responsáveis por causar danos graves à saúde humana e prejuízos econômicos em setores, como por exemplo a pecuária, principalmente em bovinos, pequenos ruminantes e animais de companhia como cães e gatos (Darvishi et al., 2014).

Os humanos, animais domésticos e silvestres estão cada dia em maior interação por causa da ocupação de áreas. Entre estes animais domésticos e silvestres, existem diferentes níveis de competências para sustentar a transmissão de patógenos transmitidos por carrapatos. Cães domésticos são comumente parasitados por *Amblyomma sculptum*, *R. sanguineus* e *R. microplus* com a distribuição destas espécies sobrepostas em diferentes espécies hospedeiras, o que ajuda a manter as populações dos patógenos que são transmitidos por estes carrapatos. Pode-se citar como exemplo a espécie *Amblyomma sculptum*, uma espécie de carrapato generalista que transmite a febre maculosa brasileira, uma doença humana letal (Randolph, 2004; Ramos et al., 2020).

A importância dos carrapatos ganhou grande destaque a partir da descoberta de Smith e Kilborne, em 1893, que identificaram que o carrapato *Rhipicephalus annulatus* (Say, 1821) transmitia o protozoário parasita *Babesia bigemina* durante a alimentação em bovinos. A partir dessa descoberta, estabeleceu-se que os carrapatos não apenas podem danificar a pele de humanos e animais não humanos, mas também são vetores de patógenos de grande importância médica (Anderson e Magnarelli, 2008; De Sandip et al., 2020).

Desta forma, a prevalência dos carrapatos que afetam humanos e outros animais domésticos aumenta, à medida que a exposição humana a estes animais é maior, e a exposição de cães e gatos porém tende a aumentar, os quais podem atuar como importantes hospedeiros. Durante a alimentação do carrapato ocorre a transmissão de organismos patogênicos como protozoários, vírus e bactérias. Além disso, as picadas dos carrapatos podem causar paralisia, toxicoses e reações alérgicas (Anderson e Magnarelli, 2008; De Sandip et al., 2020; Sormunen et al. 2025).

Alguns exemplos de patógenos de grande importância veterinária transmitidos por carrapatos como *Rhipicephalus microplus*, que se alimenta predominantemente de sangue bovino, são *Anaplasma marginale* e *Babesia bovis*, causadores das doenças anaplasmoze e babesiose, respectivamente. Os carrapatos provocam lacerações na pele do hospedeiro e liberam imunossupressores, transformando esses locais em portas de entrada para patógenos.

Além disso, o próprio procedimento de alimentação desses carrapatos, aliado ao nível de infestação, pode causar forte anemia nos hospedeiros (Esteves et al., 2009).

O carrapato *Dermacentor nitens* tem a capacidade de transmitir espécies de *Babesia* que, segundo registros anteriores, realizam ciclos de replicação nesse carrapato, como *Babesia bigemina*, *Babesia ovis* e *Babesia caballi* (Kurtzy e Mundeloh, 1983).

Outro exemplo é o *Dermacentor marginatus*, que porta *Rickettsia slovaca*, *Francisella tularensis*, *Coxiella burnetii* e o vírus da encefalite. Darvishi et al. (2014), apud Marguez 2005, identificaram *Dermacentor marginatus* como um vetor importante de *Anaplasma phagocytophilum* e *Borrelia burgdorferi*, que são transmitidos a ovinos, como ovelhas e cabras.

Os carrapatos de corpo mole (Argasidae), como o *Ornithodoros hermsi*, que têm roedores como hospedeiros (principalmente esquilos) infectados com *Borrelia* nas áreas montanhosas do continente americano (o oeste dos Estados Unidos e o sul da Colúmbia Britânica, Canadá; em áreas do México, América Central e América do Sul), costumam se alimentar em humanos. Os humanos são expostos a picadas de carrapatos infectados em cabanas e casas de campo habitadas por esses hospedeiros (Anderson e Magnarelli, 2008).

Nos EUA e na Dinamarca, o aumento na incidência da borreliose de Lyme tem sido correlacionado com o aumento na densidade e distribuição de veados. Em partes da Europa, o risco de encefalite transmitida por carrapatos tem sido relacionado com a presença de veados, já que eles sustentam as populações de *Ixodes ricinus* que atuam como vetores do vírus (Randolph, 2004).

Soares et al. (2022) propõem os carrapatos como um dos principais grupos de risco biológico ocupacional devido aos patógenos que podem transmitir, afetando instalações militares, que resultam em exposição frequente a infestações de carrapatos.

#### 1.4 Controle

A erradicação de carrapatos geralmente não é viável, exceto em pequenas ilhas, onde campanhas bem sucedidas foram implementadas ocasionalmente. Em grandes ilhas e continentes, a situação é bastante diferente e a erradicação de carrapatos não é um objetivo realista na maioria dos casos. Em espaços residenciais, técnicas de controle e métodos de prevenção têm sido aplicados, mas a tentativa de erradicar carrapatos desses espaços, até o momento, também não teve sucesso (De la Fuente, 2021; 1994; Walker, 2011).

A resistência a acaricidas, como os carbamatos e organofosforados, é talvez uma das principais razões para o fracasso na erradicação de carrapatos como *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, *Boophilus decoloratus* e *Rhipicephalus appendiculatus* (George et al., 2004). Os animais selvagens frequentemente atuam como “hospedeiros reservatórios” de carrapatos de importância médica e econômica, e esta é outra razão pela qual é pouco realista considerar a erradicação de carrapatos (George et al., 2004; Jongejan e Uilenberg, 1994).

No mercado existem diversos produtos com diferentes métodos de controle de carrapatos, em animais domésticos, tanto químicos como biológicos. Sendo majoritariamente usados os controles químicos sintéticos com formulações acaricidas em pó ou líquidas, as quais usualmente contêm o mesmo princípio ativo. Estes métodos de controle podem ser aplicados diretamente no pelo ou como um shampoo durante o banho. Apesar do banho ser um dos métodos mais utilizados, não é muito eficiente, resultando em um controle leve (Garris, 1991).

O uso de acaricidas químicos é pouco controlado, o que ocasiona casos de uso irracional de acaricidas pelos produtores. Diluição incorreta, métodos de aplicação inadequados estão entre os fatores que aceleram o desenvolvimento de resistência a acaricidas. No México e em Uganda, tem sido reportada a resistência a acaricidas por *R. microplus*. No estudo realizado em Uganda dois carrapatos do gênero *Rhipicephalus* mostraram ser resistentes a múltiplos acaricidas, 75% da espécie *R. decoloratus* mostrou ser resistente e 25% da espécie *R. appendiculatus* apresentou resistência (Vudriko et al. 2016).

Por outro lado, a imunidade a carrapatos pelo gado *Bos indicus*, tem sido interpretada como uma forma de controle biológico. Este fenômeno tem sido observado principalmente nas raças Gir Leiteiro Australiano e Sahiwal Australiano, raças selecionadas por meio de melhoramento genético por sua capacidade de adquirir resistência eficaz contra o *R. microplus*. Outras raças de gado *Bos indicus* também foram usadas para o controle de *R. microplus* e *Babesia* (Walker, 2011). No entanto, este não é um método que pode ser usado de forma geral, pois muitos carrapatos possuem imunossuppressores, o que lhes permite evadir o sistema imunológico do hospedeiro e infectá-lo (Jongejan e Uilenberg, 1994).

Em estudos com o gado da raça Bonsmara na África do Sul, observou-se que a imunidade adquirida pode ser demonstrada, por meio da redução no número de carrapatos capazes de se fixar ao hospedeiro, também pela diminuição no peso dos carrapatos que conseguiram se alimentar o que ocasiona uma redução na produção de ovos e larvas, resultando no declínio significativo das populações (Jongejan e Uilenberg, 1994; Walker, 2011).

A imunização estratégica em conjunto com a aplicação de tratamentos químicos conforme a infestação dos animais, permite, em condições de produção, reduzir o consumo de acaricidas e as doenças associadas a *R. (B.) microplus*. Em Cuba, com o uso do imunógeno da vacina recombinante cubana Gavac®, inicialmente reduziu-se 60% dos tratamentos químicos e, até 2014, o país havia reduzido esse consumo de acaricidas em 95%. Além disso, o uso desse tipo de imunogênico reduziu em 10 vezes o índice de doenças e mortes por hemoparasitoses (Gáinza et al., 2014).

O uso de acaricidas em cães geralmente é eficaz para eliminar infestações de carrapatos e prevenir reinfestações por um certo período. Um dos métodos utilizados, tanto em cães quanto em gatos, são as coleiras que contêm ingredientes ativos, ou seja, vários acaricidas impregnados em uma resina ou material plástico. Isso permite que o acaricida seja liberado lentamente durante um período determinado. A eficácia do acaricida nessas coleiras está relacionada à toxicidade do ingrediente ativo e à velocidade de liberação do produto (Danta-Torres, 2008; Garris, 1991).

Embora as abordagens químicas representam um método amplamente utilizado no controle de carrapatos, estudos realizados em outras espécies demonstraram avanços que vão além do uso de acaricidas, que têm maior efetividade e menor impacto ambiental. Um exemplo é o controle que foi usado para o desenvolvimento de vacinas a partir de antígenos do intestino do carrapato. Isso causa a morte dos carrapatos adultos, resultando em um controle indireto de doenças como a babesiose bovina (Kurtty e Mundeloh, 1983; Jongejan e Uilenberg, 1994).

Atualmente, são necessários mais métodos de controle que sejam eficazes e sustentáveis, pois já se passaram pouco mais de 25 anos desde que as únicas vacinas existentes foram fabricadas. Nesse sentido, na tentativa de desenvolver novas vacinas, a biotecnologia busca uma abordagem voltada para as biomoléculas e processos biológicos derivados tanto dos carrapatos quanto dos patógenos que eles transmitem (De la Fuente, 2021).

Nos últimos anos, métodos de controle sustentáveis alternativos para carrapatos têm sido investigados. Nesses estudos, inúmeros patógenos e predadores naturais de carrapatos foram identificados, mas até o momento poucos programas de biocontrole foram desenvolvidos. Alguns estudos empregaram extratos de plantas medicinais, como *Margaritaria discoidea*, contra os carrapatos *R. appendiculatus* e *Hyaloma variegatum*, ou extrato de flores de *Matricaria chamomilla* contra a fase adulta de *R. (B.) annulatus*. Esses

extratos demonstraram um potencial efeito na mortalidade de carrapatos alimentados (Pirali-Kheirabadi e Silva, 2011).

Fungos entomopatogênicos também podem ser usados como biocontrole, principalmente em suspensões aquosas de conídios (água mais Tween 80) para tratar ovos, larvas, ninfas e adultos de várias espécies de carrapatos. As soluções são aplicadas no campo sobre a vegetação ou em hospedeiros, mas nestes últimos são menos eficientes. A concentração de inóculo fúngico necessária para controlar carrapatos é muito alta em comparação com a concentração de fungos usada para controlar pragas agrícolas. A melhoria da eficiência dependerá de avanços na formulação de conídios que aumentem sua persistência no campo e melhorem a adesão dos conídios à superfície dos carrapatos (Fernandes et al., 2012).

Alguns exemplos de fungos entomopatogênicos que mostraram potencial como agentes de controle de carrapatos em condições de campo são *Beauveria bassiana* ou *Metarhizium anisopliae*. Suspensos em óleo ou em um gel de celulose polimerizada, eles ofereceram níveis promissores de controle para *R. microplus*, *R. sanguineus*, *R. appendiculatus*, *Amblyomma variegatum* e *A. nitens* (Fernandes et al., 2012).

### 1.5 Importância Econômica

Os custos e as perdas econômicas no controle de pragas em nível global, devido a doenças transmitidas por carrapatos, são estimados em bilhões de dólares anualmente. A família Ixodidae inclui as espécies de maior importância econômica, no entanto, os carrapatos da família Argasidae também desempenham um papel significativo como vetores de doenças, especialmente em aves de capoeira (Jongejan e Uilenberg, 1994).

Na Austrália, segundo Smit e Postma (2015), as campanhas de vacinação para a doença viral da encefalite transmitida por carrapatos (TBE) entre 1991 e 2000 custaram 60 milhões de euros.

Em 2018, as perdas anuais estimadas devido à transmissão de doenças por carrapatos e aos custos de controle foram de cerca de 275,7 milhões de dólares. De acordo com a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO), 80% da população mundial de gado bovino está exposta a infestações por carrapatos, com um impacto econômico estimado em 7,30 dólares por cabeça ao ano. No Brasil, o carrapato do gado *R. microplus* provoca perdas econômicas estimadas em 3,24 bilhões anuais para a indústria pecuária (Narladkar, 2018).

O carrapato *R. microplus* causa grandes perdas em rebanhos bovinos (Castillo et al., 2019). As fêmeas de *R. microplus* começam a ingerir sangue rapidamente, o que pode induzir anemia no hospedeiro, e a picada causa danos na pele. Esses fatores resultam em perdas econômicas graves, pois reduzem a produção de leite e carne, e diminuem o valor comercial do couro (De Sandip et al., 2020; Esteves et al., 2009; Heath, 2015).

Outro carrapato que causa grandes perdas econômicas é o carrapato-estrela-solitária (*Amblyomma americanum*), uma praga séria para o gado, a vida selvagem e os humanos. Devido à sua prevalência e ao incômodo que causa, o carrapato-estrela-solitária gera anualmente perdas econômicas significativas em receitas de turismo recreativo e da indústria pecuária nos Estados Unidos (Garris, 1991).

Para animais de companhia, os patógenos transmitidos por carrapatos têm uma grande importância econômica. Grandes quantias de dinheiro são investidas em tratamentos e controle, e a infecção de animais domésticos em áreas residenciais gera focos de zoonose (Garris, 1991; Jongejan e Uilenberg, 2004; Walker, 2011). O conhecimento da etiologia das doenças e seus custos foram de aproximadamente 1 bilhão de dólares no ano de 2011 (Walker, 2011).

Diante desses cenários, para conseguir a implementação e a manutenção de novos métodos de controle mais específicos e que os mesmos sejam aceitos pelos produtores se requiere fazer inicialmente avaliações dos custos por animal, seguido de uma comparação entre os custos da implementação do novo método e os custos causados pelo danos e os controles já existentes, ressaltando o benefício econômico líquido para o produtor (George et al., 2004).

### 1.6 Classificação Taxonômica *Rhipicephalus linnaei*

O gênero *Rhipicephalus* compreende 79 espécies, incluindo cinco espécies que faziam parte do gênero *Boophilus*. Este gênero é tipicamente originário da África, por essa razão, a hipótese mais amplamente aceita é que *R. sanguineus* seja uma espécie africana que foi disseminada mundialmente por meio de cães. O *R. sanguineus* foi descrito pela primeira vez em 1806 por Latreille como "*Ixodes sanguineus*", e pertence à subfamília Rhipicephalinae e à família Ixodidae (Dantas-Torres, 2008).

Um estudo sul-americano forneceu pela primeira vez evidências moleculares e reprodutivas de que o táxon *R. sanguineus* poderia ser representado por duas espécies distintas na América do Sul, denominadas "espécies tropicais" e "espécies temperadas". Não

há espécies de *Rhipicephalus* nativas das Américas, então foi proposto que a "espécie temperada" deriva de carrapatos introduzidos da região do Mediterrâneo, enquanto a "espécie tropical" deriva de carrapatos introduzidos da África (Labruna et al., 2017).

A classificação taxonômica específica dos carrapatos *R. sanguineus* tem sido tema de debate global até hoje. Têm sido feitas tentativas de classificá-los usando diferentes abordagens, como a morfologia tradicional e a biologia molecular, que classificam os carrapatos *R. sanguineus* como um grupo de espécies; ou seja, um complexo de cerca de 10 espécies intimamente relacionadas (Dantas-Torres, 2008).

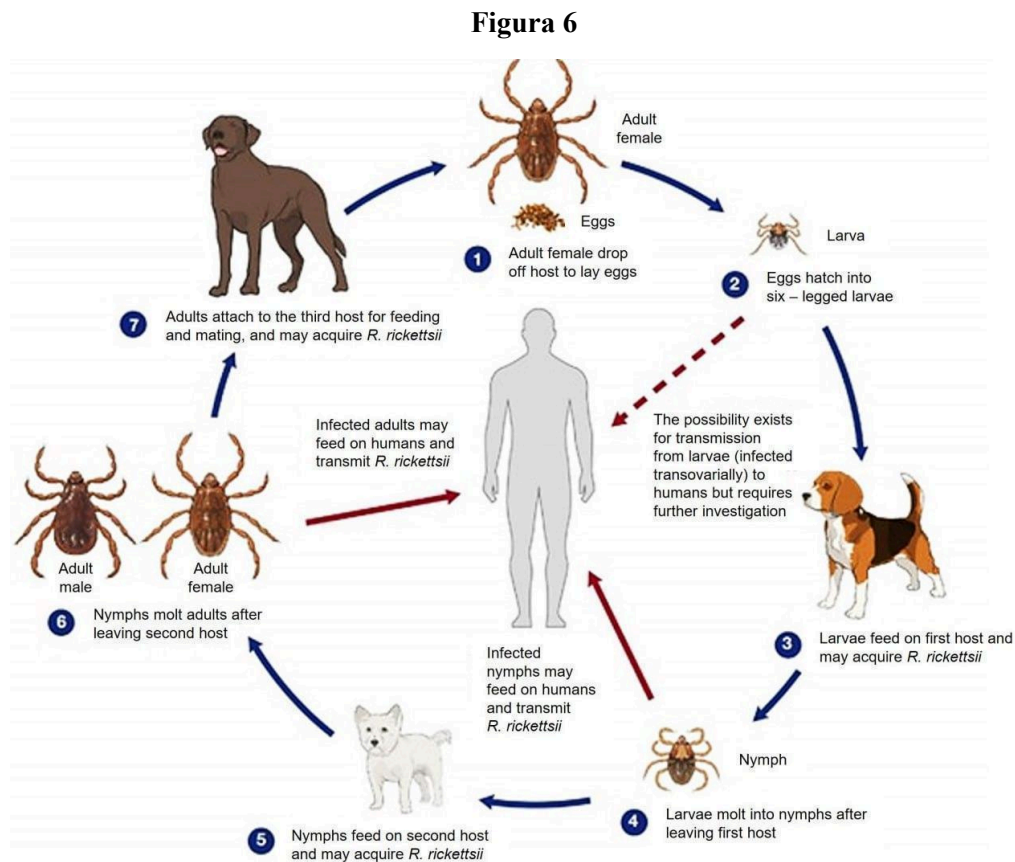
No entanto, o grupo *R. sanguineus* tem sido difícil de descrever, principalmente por meio de análises morfológicas, já que os métodos fenotípicos não são suficientes para distinguir todos os membros desse grupo. Por isso, até que o status taxonômico de *R. sanguineus* seja resolvido, qualquer espécime de carrapato que seja morfológicamente compatível com o táxon *R. sanguineus* devia ser denominado *R. sanguineus sensu lato* (Dantas-Torres, 2008; Labruna et al., 2017).

Análises de dados de sequência de DNA realizados na última década demonstraram que uma linhagem genética, com ampla distribuição, comumente conhecida como *R. sanguineus s.l.* ou linhagem tropical está conformada por um grupo de carrapatos muito similares entre si, mas esse complexo até recentemente, ainda não possuía um nome taxonômico formalmente reconhecido (Šlapeta et al., 2021).

Assim em 2022, Šlapeta propõe o uso da sinonímia *Rhipicephalus linnaei* (Audouin, 1826), para ser utilizada no lugar de *R. sanguineus s.l.* "linhagem tropical". Para proporcionar estabilidade à nomenclatura, estabelecem o neótipo e descrevem a espécie utilizando ferramentas modernas, incluindo análises morfológicas e caracterização genética abrangente, para desvendar a situação taxonômica da "linhagem tropical", os adultos foram redescritos designando o neótipo devido ao fato de que o espécime Tipo está perdido. O neótipo foi coletado na localidade Tipo no Egito. caracterizando a *R. linnaei* a partir de uma série de exemplares de referência, caracterizados morfológicamente e geneticamente usando sequenciamentos das regiões de rRNA 12S e 16S, com o intuito de esclarecer o status de *R. sanguineus s.l.* (Almazan et al., 2024; Dantas-Torres et al., 2024; Šlapeta et al., 2022).

A partir das informações coletadas nesses estudos foi adotado o uso do nome *R. linnaei* para a linhagem tropical, *R. sanguineus s.l.* além disso confirmou-se a presença de *R. linnaei* nas Américas, Ásia, África e Austrália com base em seus mitogenomas completos (Almazan et al., 2024; Šlapeta et al., 2022).

## 1.7 Ciclo de Vida (*R. linnaei*)



Ciclo de vida de *R. sanguineus*. Fonte: CDC life cycle of *Rhipicephalus sanguineus*

Assim como outros carrapatos ixodídeos, o *R. sanguineus*\* passa por quatro estágios de desenvolvimento: ovo, larva, ninfa e adulto. Os ovos são pequenos, esféricos e de cor marrom-escuro (Hadi e Adventini 2015).

O *R. sanguineus* é um carrapato de três hospedeiros; o hospedeiro preferencial para todos os estágios de desenvolvimento é o cão doméstico. Isso significa que cada estágio de desenvolvimento se alimenta apenas uma vez de um hospedeiro e faz a ecdise no ambiente, voltando a parasitar um hospedeiro que pode ser o mesmo indivíduo ou outro. Na fase adulta, as fêmeas de *R. sanguineus* se alimentam do hospedeiro por um período entre cinco e 21 dias. Uma vez concluída a alimentação, elas se desprendem e caem do hospedeiro para digerir o sangue e depositar seus ovos (Dantas-Torres, 2008; Walker 2000).

O *R. sanguineus* passa por três estágios não parasitários fora do hospedeiro, onde ocorre a ecdise. Esses períodos são relativamente longos em comparação com seus períodos de alimentação no hospedeiro. As fêmeas alimentadas depositam grandes quantidades de ovos em locais protegidos, escuros, úmidos e com temperaturas moderadas. Esses ovos são

\*Apesar da recente revisão taxonômica do carrapato-marrom-do-cão, que passou de *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* para *Rhipicephalus linnaei*, neste trabalho optou-se por manter a nomenclatura utilizada em cada artigo de referência, devido ao fato de que a maioria das publicações emprega a denominação antiga, o que permite maior coerência às fontes consultadas

difíceis de eliminar e têm uma alta taxa de sobrevivência, o que contribui para a manutenção de grandes populações de carrapatos (Izzati et al., 2024).

Inicialmente, as fêmeas, ao se soltarem do hospedeiro, têm um período de pré-oviposição que varia de 3 a 14 dias. O período de oviposição tem uma duração média de 16 a 18 dias. As fêmeas de *R. sanguineus* alimentadas geralmente colocam cerca de 4.000 ovos, embora possam chegar a 7.273 ovos. Ao final da postura, as fêmeas morrem. Em seguida, os ovos são incubados por um período que varia de 6 a 23 dias. As pequenas larvas que recém-eclodem começam imediatamente a procurar um hospedeiro (Dantas-Torres, 2008).

As larvas se alimentam por 3 a 10 dias antes de caírem do hospedeiro para mudar para ninfas. O período de muda das larvas varia de 5 a 15 dias. Larvas não alimentadas de *R. sanguineus* podem sobreviver por aproximadamente 8 meses. As ninfas se alimentam por 3 a 11 dias e se soltam do hospedeiro para se desenvolverem em adultos. O período de muda das ninfas pode variar de 9 a 47 dias. As ninfas não alimentadas podem sobreviver por 6 meses, e os adultos não alimentados, por 19 meses (Walker et al., 2000).

Em condições favoráveis, o ciclo de vida pode ser completado em 63 a 91 dias. Em condições de laboratório, os parâmetros biológicos (por exemplo, períodos de oviposição e muda) dos carrapatos *R. sanguineus* variam muito com a temperatura, umidade relativa e o tipo de hospedeiro. Recentemente, demonstrou-se que os carrapatos *R. sanguineus* conseguem fazer as mudas de larva e de ninfa em condições de altas temperaturas, as fêmeas ingurgitadas ovipositaram ovos férteis, com uma porcentagem de eclosão acima do 68%. o que facilita seu estabelecimento em regiões desfavoráveis. Em condições de campo, os períodos de muda e de alimentação podem variar amplamente entre as populações e são diretamente influenciados por fatores como a temperatura e a disponibilidade do hospedeiro (Labruna et al. 2017).

Estudos de campo indicam que os carrapatos *R. sanguineus* podem completar duas ou mais gerações por ano. No Brasil, onde as condições ambientais são bastante favoráveis, os carrapatos *R. sanguineus* podem completar até quatro gerações por ano (Dantas-Torres, 2008).

Os carrapatos têm locais de fixação preferidos nos cães. Os estágios imaturos preferem as pernas, o peito e o ventre, enquanto as ninfas têm preferência pelas orelhas. Os adultos são encontrados principalmente nas orelhas, na cabeça e no pescoço. Em casas e apartamentos, esses carrapatos costumam estar presentes nos arredores onde os animais de estimação descansam. Ao se desprenderem, algumas ninfas e fêmeas alimentadas migram

verticalmente, se a superfície permitir, para realizar a muda ou começar a postura dos ovos em rachaduras, fendas ou frestas nas paredes (Walker et al., 2000).

### 1.8 Biologia de *Rhipicephalus linnaei*

*R. sanguineus* (Latreille) é comumente conhecido como o carrapato marrom do cão, com uma ampla distribuição mundial. Este carrapato foi introduzido da Região Afrotropical em muitos países, provavelmente por meio da importação de cães domésticos infestados, seu hospedeiro preferido. Até recentemente, era considerada uma das poucas espécies cosmopolitas (Dantas-Torres et al., 2006; Labruna et al., 2017).

No Brasil, o *R. sanguineus s.l.* é encontrado comumente em cães de ambientes urbanos e rurais. Além disso, há relatos de *R. sanguineus s.l.* parasitando outros animais, como coelhos, gatos, ratos-noruegueses, pombos e canídeos silvestres, o que permite um contato frequente em ambientes habitados por humanos, sendo encontrado aninhado em casas, em locais como sofás e paredes (Dantas-Torres et al., 2006).

Ao longo de sua história evolutiva, os carrapatos da espécie *R. sanguineus s.l.*, desenvolveram estratégias de caçadores, um comportamento de busca de hospedeiro, embora também possam adotar a estratégia de emboscada, um comportamento de espreita (Dantas-Torres, 2010).

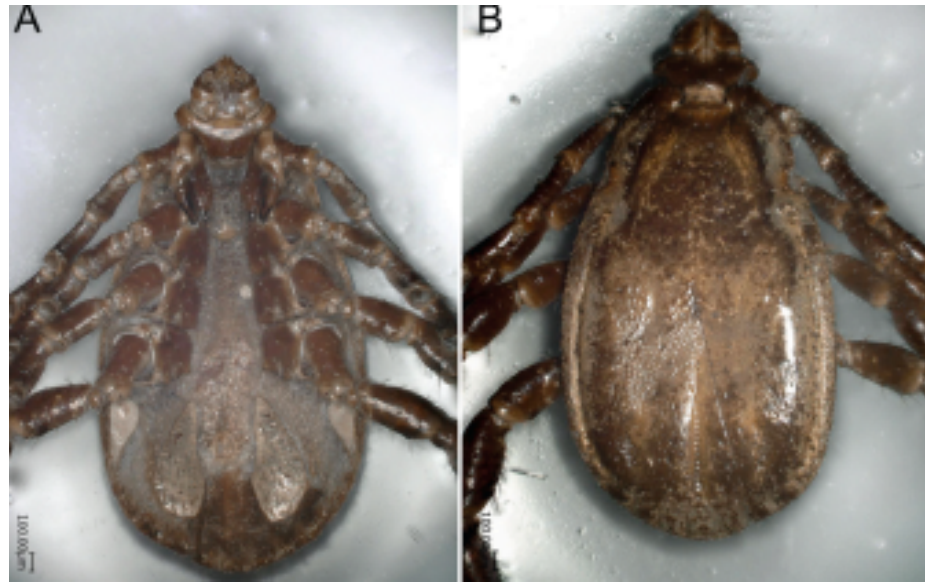
### 1.9 Morfología (*R. linnaei*)

Os carrapatos do gênero *Rhipicephalus* são geralmente pequenos, de cor amarelo-pálido ou marrom-avermelhado, com uma forma alongada e um leve dimorfismo sexual. Geralmente, possuem palpos curtos, olhos e festões. A coxa I é profundamente fendida, mas pouco visível, e as placas espiraculares têm formato de vírgula, com um padrão de pontuações nos machos. Uma característica identificadora do carrapato marrom do cão é a base hexagonal do capítulo (Dantas-Torres, 2008; Walker et al., 2000).

As características morfológicas do macho de *R. linnaei* apresentadas na figura (2) são dadas por apresentar uma placa espiracular alongada e de forma subtriangular, em forma de vírgula com uma estreita prolongação dorsal que é geralmente visível dorsalmente. A prolongação dorsal é mais estreita que a largura do festão adjacente. As pontuações são escassas, com tamanhos irregulares. O escudo é geralmente de cor amarelada ou marrom-avermelhada; sulco marginal conspicuo, profundo e pontuado; sulco posteromediano

distintivo e alongado, e sulcos posterolaterais frequentemente subcirculares, mais curtos que o sulco posteromediano; placas anais longas, largas e de forma subtriangular, com uma clara concavidade em sua margem interna e margem posterior amplamente arredondada ou truncada; placa adanal acessória com a extremidade posterior mais estreita que a largura do festão adjacente (Figura 2-A); Capitulum, a base do capítulo dorsalmente hexagonal, com ângulos laterais pontiagudos, margem posterior côncava (Figura 2B); coxa I com duas esporas triangulares longas, subparalelas, sendo a externa mais estreita que a interna; coxas II-IV com uma única espora externa curta cada uma. As pernas aumentam ligeiramente de tamanho da I para a IV. A abertura genital está na altura das coxas II (Šlapeta et al., 2022; Walker et al., 2000).

**Figura 2**

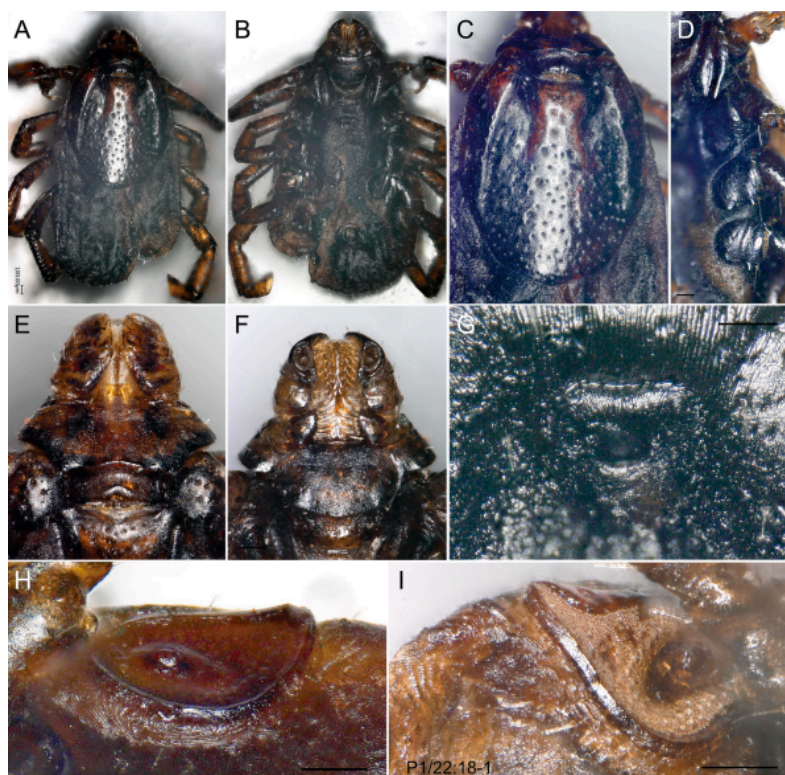


*Rhipicephalus linnae* Macho. B) Corpo, vista ventral D) Vista dorsal, mostrando o capitulum com a base hexagonal. Fonte: Šlapeta et al., 2022.

A fêmea de *R. linnaei*, apresentada na figura (3), pode ser caracterizada pela presença de uma abertura genital ampla em forma de U (figura 3-G), placa espiracular com uma estreita prolongação dorsal visível dorsalmente (figura 3-E, H e I), a base do capítulo hexagonal (Figura 3-E) com ângulos laterais mais largos do que longos, e escudo apenas um pouco mais longo do que largo, com margem posterior sinuosa e pontuações de número moderado e tamanho desigual (figura 3-A), sendo maiores e mais numerosas ao longo dos campos cervicais. Estes campos são ligeiramente deprimidos, em forma de “bisturi”, geralmente marcados por estrias e alguma granulação. Os palpos são mais longos que os do macho (Figura 3-F), estreitamente arredondados no ápice, Hipostômio curto, com coroa de denticulos finos, coxa I com duas espinhas triangulares largas, subparalelas, Espina externa mais estreita que a interna, coxas II–IV com espina externa curta e uma interna mais arredondada, mais esbeltas que em machos (Figura 3D) (Šlapeta et al., 2022; Walker et al., 2000).

As fêmeas adultas, antes de se alimentarem, se assemelham aos machos em tamanho (comprimento de 2,4 a 2,7 mm; largura de 1,44 a 1,68 mm), forma e cor. Após se alimentarem de sangue, a fêmea pode aumentar o volume corporal até atingir 11,5 mm de comprimento por 7,5 mm de largura, e a porção aumentada do corpo adquire uma cor que varia de cinza-azul a oliva (Dantas-Torres, 2008).

**Figura 3**



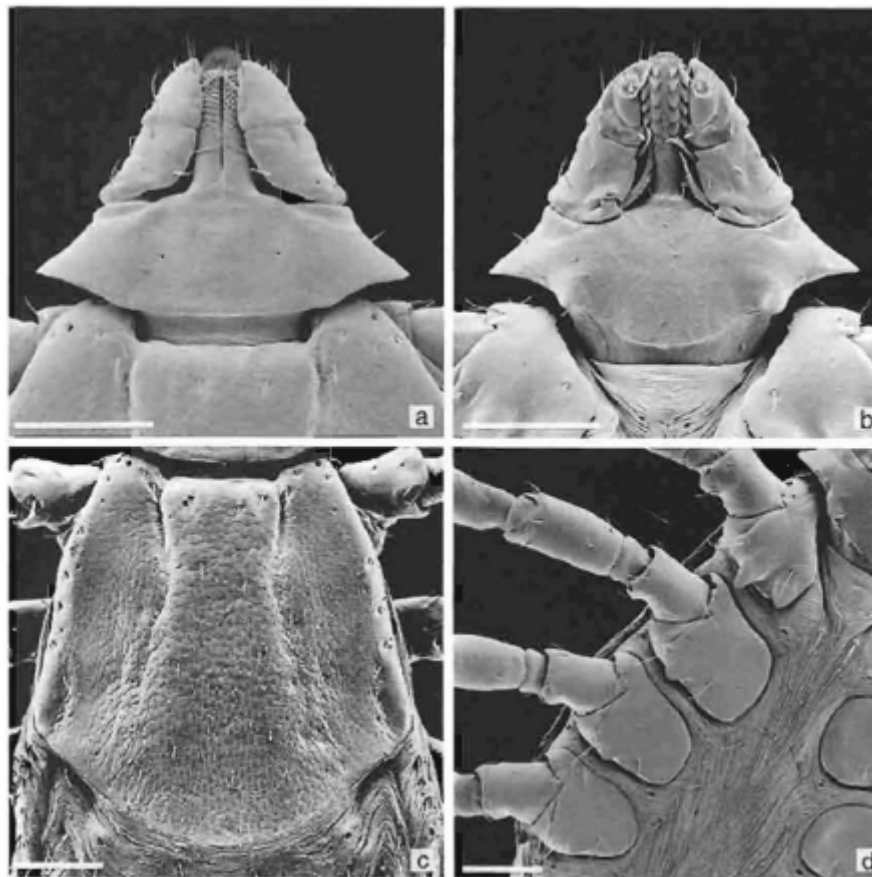
*Rhipicephalus linnaei*. Femea. A) Corpo, vista dorsal. B) Cuerpo, vista ventral. C) Escudo e vista dorsal do capitulum. D) Coxa I com dois esporões longos e triangulares, e as coxas II–IV com um esporão externo curto E) Base dos capítulos dorsalmente hexagonal, mais larga do que longa, com ângulos laterais proeminentes. Palpos curtos e arredondados no ápice. F) Base dos capítulos em vista ventral. Hipostômio curto. G) Abertura genital ampla, em forma de U. H e I) Placas espiraculares largas, em forma de vírgula. Fonte: Šlapeta et al., 2022.

As ninfas têm quatro pares de pernas e se assemelham aos adultos, embora sejam menores (comprimento de 1,14 a 1,3 mm; largura de 0,57 a 0,66 mm) e sexualmente imaturas, ou seja, não possuem abertura genital (Dantas-Torres, 2008).

As características para distinção da ninfa de *R. sanguineus*, apresentadas na Figura (4), são: a base do capítulo subtriangular dorsalmente (figura 4A e 4B) com ângulos laterais ligeiramente curvados e presença de processos ventrais (figura 4-C), escudo aproximadamente tão longo quanto largo com margens laterais quase retas e margem posterior amplamente arredondada, e sulcos cervicais curtos, estendendo-se posteriormente até o nível dos olhos. Os palpos são curtos, com o ápice agudo. Os olhos se encontram no ponto mais largo,

ligeiramente convexos. As coxas I têm cada uma duas esporas curtas e amplamente separadas, sendo a externa mais longa que a interna; uma única espora externa arredondada, diminuindo de tamanho nas coxas II e III; as coxas IV não possuem esporas (Figura 4D) (Walker et al., 2000).

**Figura 4**



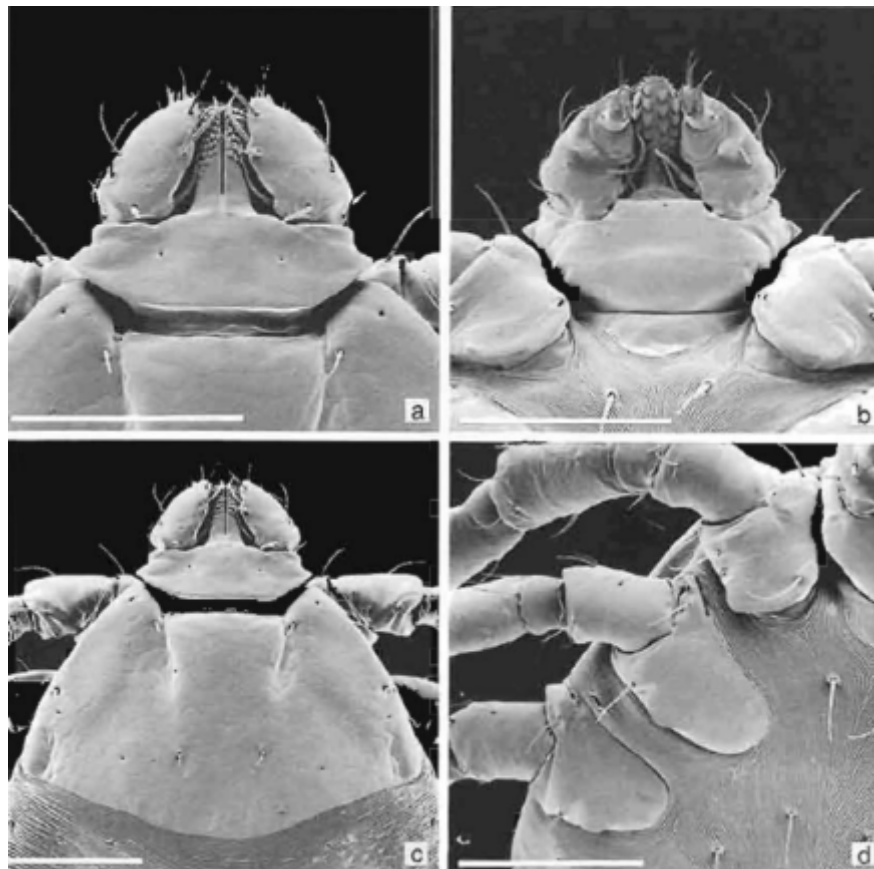
*Rhipicephalus sanguineus*. Ninfa. A) capitulum, vista dorsal; B) capitulum, vista ventral; C) escudo; D) coxas. Fonte: Walker et al., 2000

As larvas recém-eclodidas são pequenas (comprimento de 0,54 mm; largura de 0,39 mm) e possuem apenas três pares de pernas (Dantas-Torres, 2008).

As características morfológicas que distinguem a larva de *R. sanguineus* s.l., apresentadas na figura 5, são: a base do capítulo mais larga que longa, com ângulos laterais curtos e ligeiramente curvados e margem posterior levemente convexa (figura 5-A e 5-B); comprimento total médio do corpo de 605,9  $\mu\text{m}$ ; sulcos cervicais curtos, superficiais e subparalelos; e escuto quase duas vezes mais largo que longo (Figura 5C). Os palpos são

curtos, com a margem externa ligeiramente convexa e o ápice rombo. Os olhos se encontram no ponto mais largo, são grandes e estão localizados além da metade do escudo. Ventralmente, as coxas I têm cada uma uma crista saliente e larga, as coxas II têm cada uma uma pequena espora, e as coxas III têm apenas uma leve indicação de espora (Figura 5D) (Walker et al., 2000).

**Figura 5**



*Rhipicephalus sanguineus*. Larva. A) capitulum, vista dorsal; B) capitulum, vista ventral; C) escudo; D) coxas. Fonte: Walker et al., 2000

#### 1.10 Importância Médica e Econômica de *Rhipicephalus linnaei*

No Brasil, no início de 2005, foi brevemente relatada a primeira descrição de parasitismo humano por *R. sanguineus sensu lato* (Dantas-Torres et al., 2006).

O *R. sanguineus sensu lato*, ou o carrapato marrom-do-cão, é um ectoparasita de interesse para a saúde pública devido à sua capacidade de carregar e transmitir vários patógenos de importância econômica, veterinária e para a saúde humana. Esses patógenos são

causadores de uma alta taxa de morbidade e mortalidade. Embora seja incomum, há vários relatos de parasitismo humano por *R. sanguineus* no mundo (Dantas-Torres et al., 2006; Izzati et al., 2024). Devido à sua relevância veterinária e de saúde pública, *R. sanguineus s.l.* é um dos carrapatos mais estudados (Dantas-Torres, 2010).

Os estágios imaturos são facilmente ignorados devido ao seu pequeno tamanho, mas um aspecto importante é que as ninfas de *R. sanguineus s.l.* são consideradas os principais transmissores de patógenos zoonóticos como *Rickettsia conorii*, bactéria causadora da febre botonosa ou febre maculosa do Mediterrâneo, em humanos. O *R. sanguineus s.l.* também pode atuar como reservatório natural de *R. conorii*. Na Europa, a maioria dos casos de febre botonosa é registrada durante o verão e o outono, já que em climas mais quentes os carrapatos estão mais dispostos a parasitar humanos e outros animais, como coelhos. Isso sugere que a mudança climática está associada ao aumento da transmissão de patógenos como *R. conorii* (Dantas-Torres, 2010).

A *R. conorii* não foi encontrada nas Américas, mas mesmo assim as populações de *R. sanguineus* neste continente parecem ser suscetíveis à infecção e têm potencial para serem vetores deste patógeno. Cães mostraram-se capazes de se infectar com *R. conorii* sem apresentar sintomas, o que os torna potenciais reservatórios do patógeno (Gray et al., 2013).

Os carrapatos *R. sanguineus s.l.* também são vetores conhecidos de patógenos como *Babesia canis* e *Ehrlichia canis*, os agentes etiológicos da babesiose canina e da erliquiose monocítica canina, respectivamente. Outros patógenos transmitidos pelo carrapato marrom são *Haemobartonella canis* e *Hepatozoon canis*, transmitidos a cães, e *Rickettsia rickettsii* (México e EUA), transmitida a humanos (Dantas-Torres, 2008; Gowrishnkar et al., 2021).

Sabe-se também que o *R. sanguineus* é encontrado em cães de regiões onde a infecção por *R. rickettsii* é endêmica; outros podem estar infectados com rickettsias do grupo da febre maculosa. Portanto, as informações coletadas Dantas-Torres et al., 2006 e em outros estudos prévios de casos de doenças rickettsiais transmitidas por carrapatos no Brasil poderiam destacar uma nova situação epidemiológica para essas doenças transmitidas por carrapatos (Dantas-Torres et al., 2006).

O carrapato marrom foi relacionado a uma epidemia altamente letal e de longa duração de febre maculosa das Montanhas Rochosas que afeta tanto humanos quanto cães no norte do México e nos Estados Unidos, e na incidência de *Rickettsia massiliae*, que foi causadora, em casos humanos, de febre maculosa na Europa e na América do Sul. Isso pode ser devido à presença de diferentes linhagens de *R. sanguineus*, bem como à possível hibridização entre elas, somada à disposição de parasitar humanos (Dantas-Torres et al.,

2012; Pascoe et al., 2022). Os fatores de risco associados a esse parasitismo incluem a posse de cães, a presença de cães infestados em ambientes internos e um alto nível de infestação ambiental (Dantas-Torres, 2010).

Doenças como a erliquiose, causada por *Ehrlichia canis*, foram implicadas em alguns casos humanos na Venezuela. Uma nova cepa de *E. canis* também foi detectada em cães no Peru. Existe evidência sorológica de infecção por *Ehrlichia* em humanos na América do Sul, embora os dados moleculares sobre as espécies de *Ehrlichia* que infectam humanos nesta região sejam limitados (Dantas-Torres et al., 2012).

Os carrapatos marrons do cão têm a capacidade de manter alguns patógenos na natureza ao longo de várias gerações por meio da transmissão transovariana, na qual a infecção é transmitida da fêmea para os embriões (um exemplo é a *Babesia canis*), e da transmissão transestadial, na qual a infecção é transmitida para os estágios subsequentes do ciclo de vida, (como por exemplo a *Ehrlichia canis*) (Dantas-Torres, 2008).

#### 1.11 Reprodução (*R. linnaei*)

As fêmeas têm um período de alimentação lenta, com digestão contínua, até a cópula, quando então se alimentam completamente por meio de um processo de ingestão rápida de sangue, com digestão reduzida. Os machos podem se alimentar várias vezes e têm a capacidade de se desprender e mudar para outro cão que compartilha o mesmo ambiente para se alimentar dele. A ingestão de sangue é um importante estímulo para a espermatogênese nos machos e para a ovogênese nas fêmeas (Dantas-Torres, 2008; Dantas-Torres, 2010).

O *R. sanguineus* é um carrapato gregário, o que significa que ele tende a formar aglomerações de adultos em locais com alta taxa de infestação. Demonstrou-se que a agregação influencia o processo de muda em larvas e ninfas de *R. sanguineus*. Por outro lado, os fatores envolvidos nesse processo, como os feromônios e a possível importância na reprodução, não são muito claros até o momento (Dantas-Torres e Otranto, 2011).

Dantas-Torres e Otranto (2011), sugerem que as elevadas densidades de carrapatos afetam a eficiência na produção de ovos, mas não a eclosão deles. A densidade de carrapatos foi negativamente correlacionada com o período de incubação dos ovos, sugerindo que a agregação poderia acelerar essa fase do ciclo de vida do carrapato.

A formação das aglomerações de carrapatos é induzida por feromônios de agregação, como a guanina, que está naturalmente presente nas fezes dos carrapatos. A importância dessas formações para a reprodução é pouco conhecida, mas acredita-se que ela favoreça sua

sobrevivência, permitindo que os indivíduos se acumulem em locais que os ajudem a evitar condições ambientais adversas e aumentando as chances de encontrar hospedeiros. Em ambientes altamente infestados, é comum encontrar carrapatos ingurgitados formando grupos chamados de "ninhos de carrapatos". Além disso, os carrapatos também tendem a se agrupar enquanto se alimentam do hospedeiro. Este fenômeno é induzido por feromônios de atração-agregação-aderência (Dantas-Torres e Otranto, 2011).

Durante a cópula, o macho sobe pelo dorso da fêmea e se arrasta para sua superfície ventral, posicionando-se de forma que seus ventres se encontrem. Em seguida, o macho estimula a abertura genital da fêmea (gonoporo), inserindo as pontas de suas quelíceras nela. Pouco depois, o macho transfere o espermatóforo (um saco de paredes duplas cheio de esperma) para o gonoporo, com a ajuda de suas peças bucais. O espermatóforo então se reverterá no trato genital da fêmea. Aproximadamente 24 horas após a cópula, uma cápsula cheia de espermatozoides maduros (espermatóforos) pode ser encontrada no receptáculo seminal das fêmeas dissecadas (Dantas-Torres, 2010).

Quando o carrapato está completamente ingurgitado, ele se desprende do seu hospedeiro e vai para o ambiente para completar a digestão em um local isolado e iniciar a postura (Dantas-Torres, 2008; Walker et al., 2000).

### 1.12 Desenvolvimento Embrionário dos Carrapatos

A embriogênese envolve uma série de eventos morfogênicos bem coordenados que, por meio de sinais internos complexos, determinam a posição, diferenciação e o destino dos tecidos em formação. Este processo também pode ser influenciado por fatores externos ao ovo. A partir dessa integração de sinais, o ovo fertilizado evolui de uma estrutura unicelular para uma organização multicelular mais complexa, culminando na eclosão da larva (Friesen et al., 2015).

Estudos embriológicos podem ajudar a compreender melhor os mecanismos do desenvolvimento ou os efeitos das condições ambientais no crescimento larval. Além disso, comparações morfológicas e moleculares entre embriões continuam sendo realizadas para estabelecer relações filogenéticas e a evolução da morfologia animal. Os estudos descritivos de embriões de animais fornecem a base para essas pesquisas, pois caracterizam as mudanças morfológicas do embrião que levam à formação do plano corporal (Friesen et al., 2015).

Durante as investigações, têm persistido interpretações contraditórias sobre eventos-chave durante a embriogênese dos carrapatos, particularmente nos padrões de

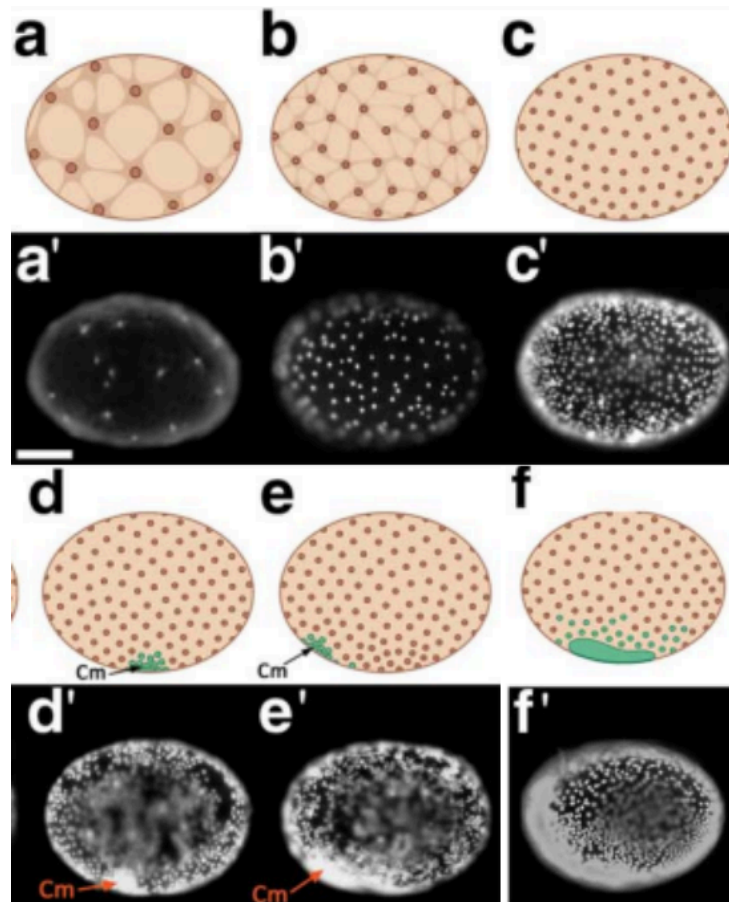
segmentação. Os padrões de segmentação em artrópodes foram geralmente descritos como superficiais em textos clássicos, os quais foram influenciados por estudos do inseto modelo *Drosophila melanogaster* (Santos et al., 2013).

Santos et al. (2013) expõe uma realidade sobre a falta de modelos em ácaros e propõem a espécie *R. microplus*, como um candidato apropriado para modelo no desenvolvimento de carrapatos, ressaltando a importância deste modelo, devido às diferenças no desenvolvimento embrionário que apresentam quando comparado com outros modelos de artrópodes.

As mudanças morfológicas que ocorrem durante a embriogênese dos carrapatos foram estudadas no carrapato Argasidae *Ornithodoros moubata* (Murray) e nos carrapatos Ixodidae *Ixodes ricinus* L., *Hyalomma dromedarii* (Koch) e *Rhipicephalus microplus* (Canestrini) (Friesen et al., 2015).

Santos et al. (2013), realizaram análise morfológica de *Rhipicephalus microplus*, para estabelecer um sistema de estágios e a cronologia dos eventos morfogenéticos. As primeiras divisões não foram possíveis de observar, ocorreram no interior do vitelo, nas primeiras 24 horas do desenvolvimento embrionário, um pequeno número de núcleos pôde ser visualizado na periferia do ovo, e o embrião provavelmente torna-se celularizado durante esse período (Figura 7A). As divisões mitóticas levam a um aumento de células considerável, e as células migram para a periferia do ovo (Figura 7B). O número de células aumenta quase 4 vezes, embora nenhuma região celular distinta possa ser observada (Figura 7C). A medida que o número de células aumenta, um grupo celular acumulado pode ser observado em um dos lados do ovo, ao longo do eixo curto do ovo (seta vermelha) (Figura 7D). Com o avanço do desenvolvimento, o acúmulo de células parecem migrar em direção ao eixo longo do ovo (Figura 7E). O ovo pode ser dividido em duas regiões, incluindo uma área com núcleos grandes e uma segunda área com núcleos pequenos; esta última corresponde à futura banda germinativa (Figura 7F).

**Figura 7**



(A) Pequeno número de núcleos pôde ser visualizado na periferia do ovo, cheio de vitelo, (B) As células migram para a periferia do ovo o vitelo após várias divisões mitóticas, (C) O número de células aumenta quase 4 vezes, (D) Um grupo celular acumulado pode ser observado em um dos lados do ovo, (E) O acúmulo de células parecem migrar em direção ao eixo longo do ovo, (F) O ovo pode ser dividido em duas regiões, incluindo uma área com núcleos grandes e uma segunda área com núcleos pequenos. Fonte: Santos et al., 2013.

Aproximadamente 72 horas após a postura , o desenvolvimento embrionário passa a ser caracterizado pela formação de uma banda germinativa organizada e segmentada, e ocorre a definição da estrutura corporal do embrião. tornando-se visível os eixos corporais anterior-posterior e dorso-ventral. Conforme o embrião cresce, surgem brotamentos dos apêndices, inicialmente como pequenas projeções celulares que, progressivamente, se alongam e se diferenciam em estruturas como as pernas e os apêndices bucais (Friesen et al., 2015; Santos et al., 2013).

Ao longo do desenvolvimento, a banda germinativa gradualmente se posiciona e retrocede, promovendo a organização do corpo em duas regiões, prossoma e opistossoma. Paralelamente, ocorre do poro anal para sua localização definitiva na região ventral (Friesen et al., 2015; Hinne et al. 2025; Santos et al., 2013).

À medida que o embrião se aproxima ao período de eclosão, os apêndices tornam-se mais definidos, o capítulo sofre reorganização estrutural e inicia-se a formação da cutícula larval. Próximo ao final do desenvolvimento, já é possível considerar a morfologia típica da forma larval, com as articulações e estruturas sensoriais bem formadas, culminando na eclosão (Friesen et al., 2015; Hinne et al. 2025; Santos et al., 2013).

## 2. JUSTIFICATIVA

Existem poucos estudos sobre o desenvolvimento embrionário de carrapatos, e no caso específico do *Rhipicephalus linnaei*, não há bibliografia que descreva as etapas desse processo. Isso motiva a realização deste trabalho, pois entender o desenvolvimento embrionário dessa espécie pode ser a chave para seu controle.

Os carrapatos *R. linnaei* são de grande importância devido à sua capacidade como vetores de patógenos, incluindo protozoários, bactérias e vírus, que podem ser transmitidos a animais e seres humanos em qualquer fase da vida. O risco de contato com esses carrapatos aumenta porque seu hospedeiro preferido é o cão doméstico, o que coloca seu nicho ecológico em áreas residenciais, facilitando a interação com humanos.

As doenças causadas por patógenos associados ao *R. linnaei* são uma grande preocupação mundial. Isso tem levado à busca por métodos de controle mais eficazes, já que a alta prevalência desses carrapatos, o desenvolvimento de resistência a acaricidas e os danos que esses produtos causam aos ecossistemas têm dificultado seu manejo. Por isso, é essencial explorar novas estratégias de controle que sejam mais eficientes e sustentáveis.

Conhecer as diferentes etapas do desenvolvimento embrionário do *R. linnaei* permitiria identificar pontos críticos que poderiam ser inibidos, o que abriria a possibilidade de desenvolver novos métodos de controle. Essa abordagem poderia ser fundamental para reduzir a população de carrapatos e, com isso, diminuir a transmissão de doenças associadas.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

- Descrever e realizar um mapeamento morfológico das etapas do desenvolvimento embrionário de *Rhipicephalus linnaei*, do 6º ao 10º dia, identificando as estruturas e as mudanças celulares-chave em cada fase.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Remover o córion dos ovos pelo método descrito em Friesen et al. (2015) a fim de facilitar a marcação, visualização e a caracterização morfológica dos embriões.
- Aplicar a técnica de coloração com DAPI para visualizar os núcleos celulares.
- Descrever as características morfológicas do desenvolvimento embrionário do carrapato marrom do cão *Rhipicephalus linnaei* do 6º ao 10º dia pós-oviposição, destacando as principais mudanças estruturais.

### 4. METODOLOGÍA

#### Estágios do Embrião

Para realização deste trabalho foram utilizadas 10 fêmeas ingurgitadas adquiridas da empresa Ticks & Fleas. As fêmeas foram mantidas numa incubadora BOD modelo ELP202/3 em condições de temperatura 27°C e umidade relativa 61%, e com fotoperíodo de 12 horas. Os ovos foram coletados sempre no mesmo horário em intervalos de 24 horas sob estereomicroscópio, armazenados em tubos para centrifuga de 2 mL, e mantidos em BOD nas mesmas condições das fêmeas, por 06, 07, 08, 09 e 10 dias. Em seguida foram processados conforme o protocolo de Friesen et al. (2015):

Procedimento de decorionização, segundo Friesen et al. (2015).

Os ovos contendo embriões com 06 a 10 dias de desenvolvimento foram decorionizados e fixados, conforme segue.

Inicialmente os ovos foram imersos em 1 mL de solução de hipoclorito de sódio a 6% e agitados suavemente por 8 minutos a 100 rpm em shaker (agitador orbital KLD350 tipo VDRL/Kline). Em seguida, foram lavados por três vezes com 500 µL água destilada.

Os ovos foram então cobertos com 1 mL de água destilada e os tubos colocados em banho-maria a 90°C por 3 minutos, sendo imediatamente a seguir, transferidos para gelo por 3 minutos, a fim de favorecer a ruptura do córion. O excesso de água foi removido do tubo e substituído por uma solução bifásica recém preparada na proporção de 10:9:1 de heptano/paraformaldeído a 4%/DMSO (500µL de heptano, 450 µL de paraformaldeído a 4% em tampão fosfato salino (PBS; 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4), 50 µL de dimetilsulfóxido), para fixação dos embriões.

Os embriões foram então agitados suavemente a 100 rpm por 40 minutos, à temperatura ambiente em um agitador orbital KLD350 tipo VDRL/Kline. Após a fixação, a fase aquosa inferior foi substituída por 500 µL metanol e os tubos foram agitados vigorosamente em vortex por aproximadamente 30 segundos. Na sequência os embriões foram lavados duas vezes com 500 µL de metanol e armazenados a -20°C em metanol a 100%.

#### Microscopia de fluorescência

Os embriões foram reidratados sequencialmente à temperatura ambiente por meio de banhos de 5 minutos em soluções de metanol/PBST (1% Tween 20/PBS) a 75%, 50% e 25%, seguidas de uma única lavagem em PBST, usando 500 µL em cada lavagem.

Aos embriões decorionados e fixados, se adicionou uma gota aproximadamente 10 µL de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), e os tubos foram mantidos a temperatura ambiente por 30 minutos no escuro.

Os embriões tratados com DAPI foram transferidos cuidadosamente com pincel para lâminas de vidro, contendo uma gota de meio de montagem contendo antifading (vectashield®). Em seguida foram cobertas com lamínula, seladas com esmalte e armazenadas em geladeira no escuro. A marcação com DAPI permite visualizar o DNA de fita dupla nos núcleos celulares; o DAPI é excitado com luz ultravioleta a 350 nm e é observado por meio de um filtro azul-ciano a 470 nm no microscópio de fluorescência Nikon eclipse Ni.

A marcação com DAPI proporciona visualização relativamente clara dos núcleos celulares em todos os estágios de desenvolvimento, exceto nos mais desenvolvidos. A visualização das estruturas foi realizada usando o microscópio de fluorescência Nikon eclipse Ni através do software NIS-elements, e as imagens foram tomadas com a câmera Nikon DS-Qi.

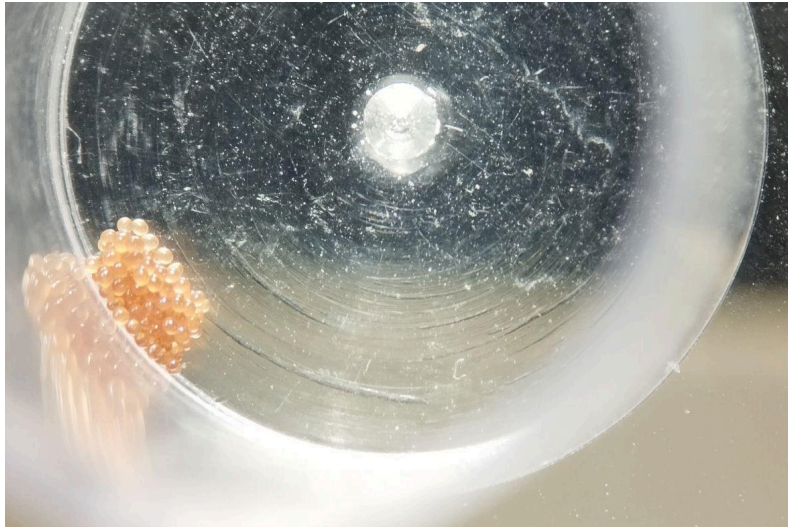
A comparação e definição dos estágios do desenvolvimento embrionário foram realizadas utilizando Santos et al. (2013), em *Rhipicephalus microplus* como referência, uma vez que esse estudo apresenta uma descrição detalhada, tanto textual quanto visual, do processo embrionário. Essa abordagem permitiu a designação de um estágio correspondente a cada dia de desenvolvimento.

## **6. RESULTADOS**

### **Remoção do córion:**

Os ovos coletados entre 0 e 24 horas após a postura foram observados sob estereomicroscópio apresentando coloração salmão brilhante (Figura 10), com o passar dos dias os ovos adquiriram uma cor marrom escura. Os ovos mantidos na incubadora BOD por 6, 7, 8, 9 e 10 dias, foram processados pelo método descrito em Friesen et al. (2015). Após o processamento observaram-se mudanças na coloração de marrom escuro opaco para avermelhado brilhante (Figura 11). o que indica que a remoção do córion ocorreu. Na Figura 12 mostram-se os ovos na lupa, onde logrou-se observar os ovos sem o córion, e foi possível observar o córion solto no metanol sinalizado com a seta. Após este processamento conseguiu-se observar que a penetração do marcador DAPI foi exitosa para os ovos nos quais o córion foi retirado completamente, no processo se preservaram as estruturas do estágio de desenvolvimento que foram utilizadas para as análises embrionárias a seguir.

**Figura 10**



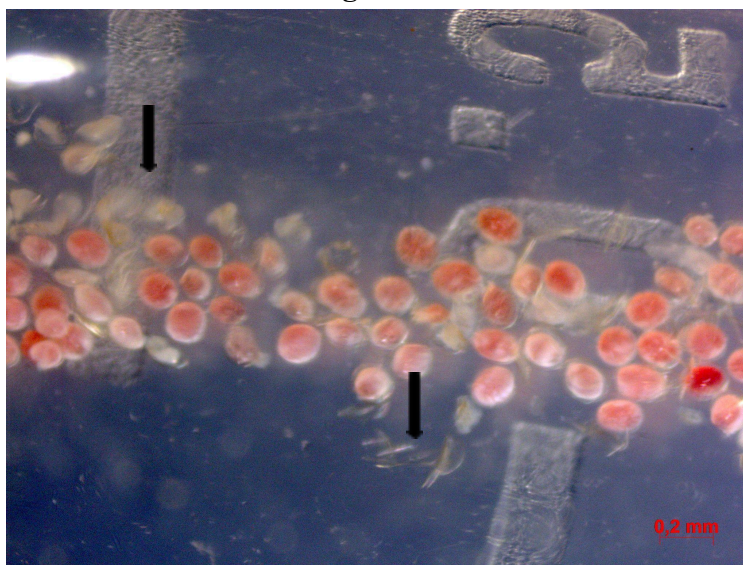
Ovos coletados entre 0 e 24h após a postura mostrando coloração salmão brilhante.

**Figura 11**



Ovos com 7 dias de desenvolvimento antes da remoção do córion (à direita) e após a remoção do córion (à esquerda)

**Figura 12**



Ovos vistos sob estereomicroscópio após retirada do córion, nos quais é possível visualizar a coloração avermelhada, e o córion disperso no metanol.

## **Descrição das características morfológicas de embriões do carrapato marrom do cão *Rhipicephalus linnaei* com 6 a 10 dias de desenvolvimento.**

### **Embriões com 6 dias de Desenvolvimento**

No sexto dia de desenvolvimento foi possível observar embriões ligeiramente diferentes, sendo que alguns apresentam características menos desenvolvidas (Figuras 13A-D), enquanto outros aparentemente mais desenvolvidos (Figuras 13E-F). Nos embriões menos desenvolvidos, é possível observar células dispostas de maneira organizada, formando uma “Banda Germinativa (BG)”, na vista ventral (Figuras 13A, B). Identificam-se duas regiões intercalares, sendo uma com maior quantidade de células acumuladas e núcleos aparentemente menores, formando uma faixa, e a outra região com núcleos mais distantes e maior tamanho indicado com a seta vermelha (Figuras 13A,B). É possível observar uma redução na largura, na parte mediana dos ovos em comparação com os polos, onde se observam duas regiões ainda não muito diferenciadas que darão origem às partes anterior e posterior da larva (Figura 13B). Nas figuras 13C e 13D é possível observar a fase inicial dos estágios deste dia o embrião em vista lateral (13C) com um acúmulo de células formando faixas perpendiculares ao eixo ântero-posterior. Nas extremidades das faixas começa a se formar um acúmulo de células em forma de brotos pareados. Já em vista dorsal (13D), é possível diferenciar a extremidade anterior (A) com núcleos grandes e maior quantidade de células, em comparação com a extremidade posterior (denominada zona de crescimento ZC), com menor acúmulo de células, separados por um espaço sem núcleos visíveis. Seguindo o eixo ântero-posterior observa-se a banda germinativa com acúmulo de células que formam faixas bem definidas. Ainda nos embriões de 6 dias pode-se observar em vista ventral os apêndices em formação (palpos e pernas) (Figura 13E). O primeiro par de pernas (P1), localizado mais próxima à região anterior do embrião, é o maior e apresenta aspecto mais robusto, enquanto o quarto par de pernas (P4), mais posterior, é menor e mais delgado. Nestes embriões, os acúmulos de células em forma de faixas não são mais visíveis, e o sulco ventral aparece como uma abertura bem definida. Na Figura 13F observa-se o embrião em vista lateral, distinguindo-se estruturas que darão origem à cabeça, chamadas pré-quelícera (PQ) e a banda germinativa com alguns brotos de apêndices em pares em formação, além do sulco ventral e a zona de crescimento na parte posterior do embrião, onde há um grande acúmulo de células.

Figura 13

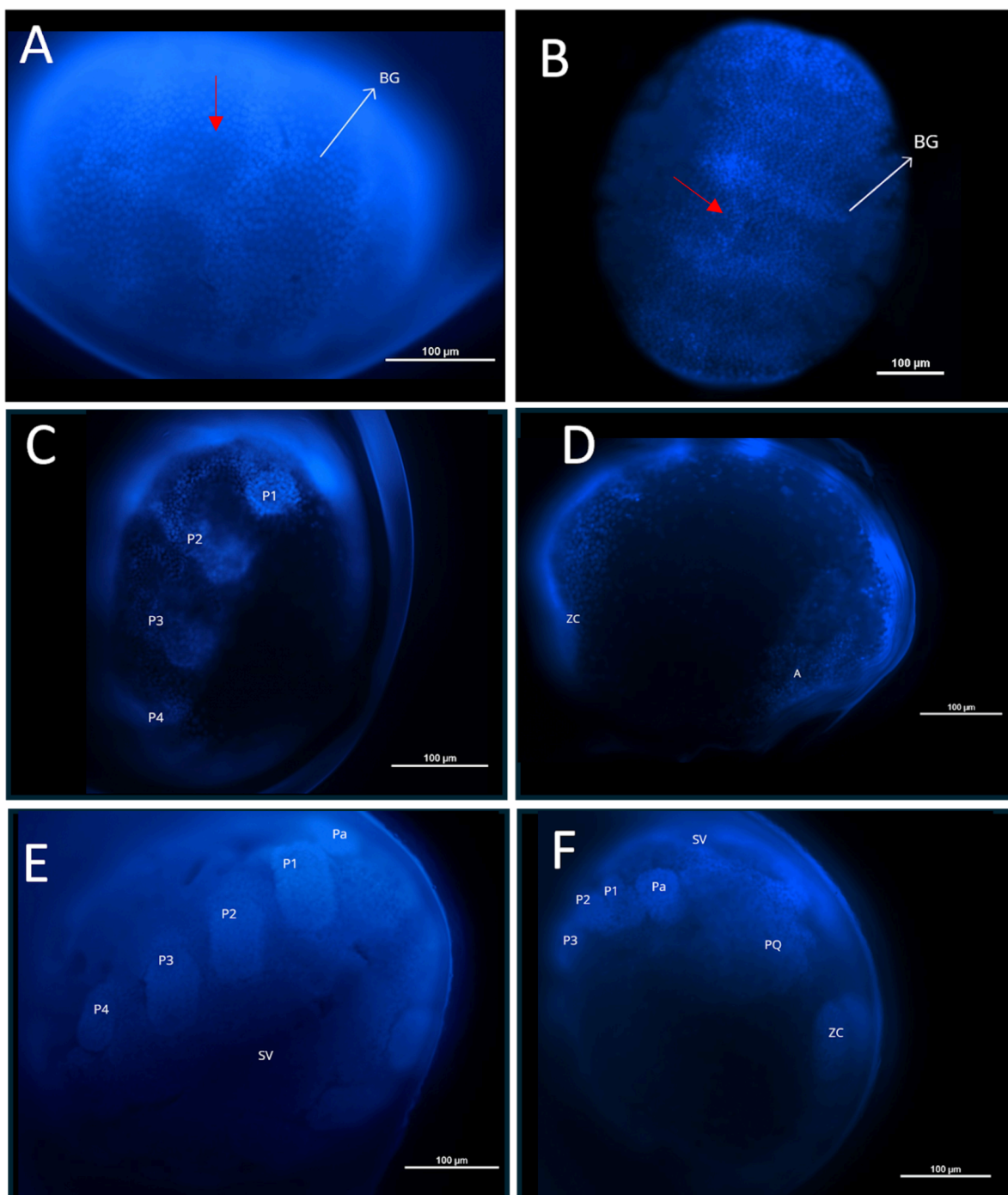


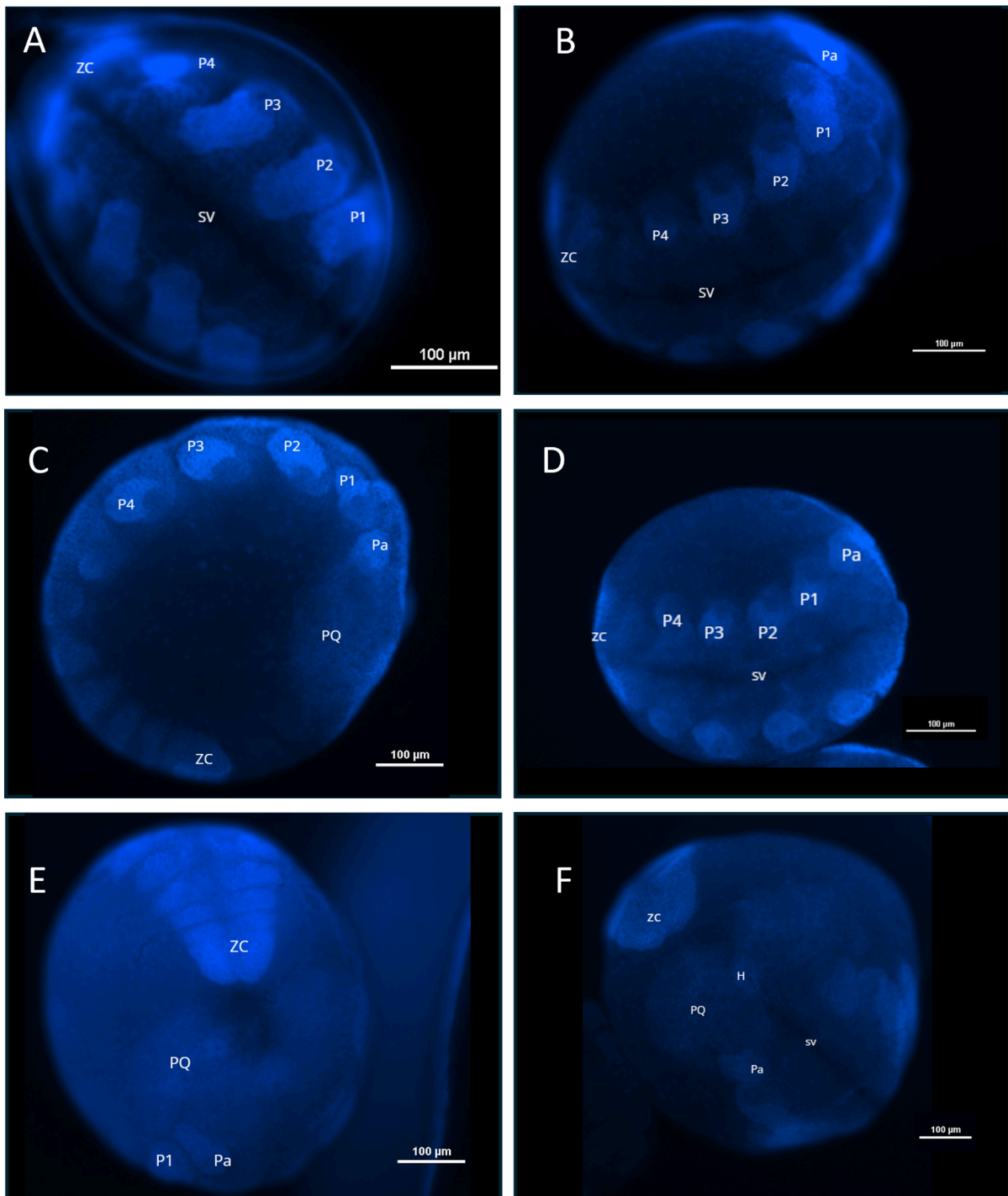
Figura 13 – Embriões de *R. linnaei* com seis dias de desenvolvimento marcados com DAPI. **A e B** - Vista ventral mostrando banda germinal formada por o acúmulo de núcleos; **C**- Vista lateral mostrando a banda germinativa com brotos nos extremos dos acúmulos de células; **D** - Vista dorsal mostrando espaço sem marcação dividindo os eixos ântero-posterior e a banda germinal, o eixo anterior mostrando uma maior celularização e mais largura, a zona de crescimento mostrando uma menor celularização; **E** - Vista ventral mostrando o sulco ventral (SV) já formado, e os apêndices em crescimento; **F** – Vista lateral mostrando uma maior organização tanto da parte anterior mostrando as pré-quelíceras quanto os apêndices.

BG – Banda Germinativa; P1, P2, P3 e P4 - Pernas 1, 2, 3 e 4 respectivamente; Pa – Palpos; ZC – Zona de Crescimento; A - eixo anterior; SV – Sulco Ventral; PQ – pré-quelíceras.

### **Embriões com 7 dias de Desenvolvimento**

Nos embriões com sete dias de desenvolvimento observou-se uma etapa mais imatura do embrião onde os brotos estão começando-se formar, o sulco ventral ainda não é muito marcado e a zona de crescimento a mostrar segmentações (figura 14D). Nestes, pode-se visualizar o eixo ântero-posterior, e a formação de acúmulos celulares associados aos futuros apêndices em forma de brotos. Nas figuras 14A e 14B nota-se o Sulco Ventral (SV) como linha bem definida sem núcleos visíveis, juntamente com os apêndices (P1, P2, P3, e P4). Na figura 14B também é possível observar parcialmente a zona de crescimento. A vista lateral do embrião mostrou a parte anterior bem organizada, e em sequência ântero-posterior observam-se os apêndices (Pa, P1, P2, P3, e P4). Na parte posterior, logo após o quarto par de pernas (P4), as células se organizam em forma de 8 segmentos (S) perpendiculares em relação ao sulco ventral, e com simetria bilateral, além disso, é possível observar alguns núcleos no interior do ovo de um tamanho maior e dispersos (figura 14C). A vista dorsal do embrião mostrou uma organização bem definida da parte anterior similar à forma de uma borboleta, formada pelos lóbulos pré-quelícerais. Na região central dos lóbulos pré-quelícerais há um acúmulos de células que darão origem ao hipostômio (H), a zona de crescimento posterior observou-se mais próxima da zona anterior, entretanto os segmentos se distinguem bem formados pelos acúmulos células, e o sulco ventral estende-se aproximadamente até o segmento 7, conforme observado nas figuras 14E e 14F.

**Figura 14**



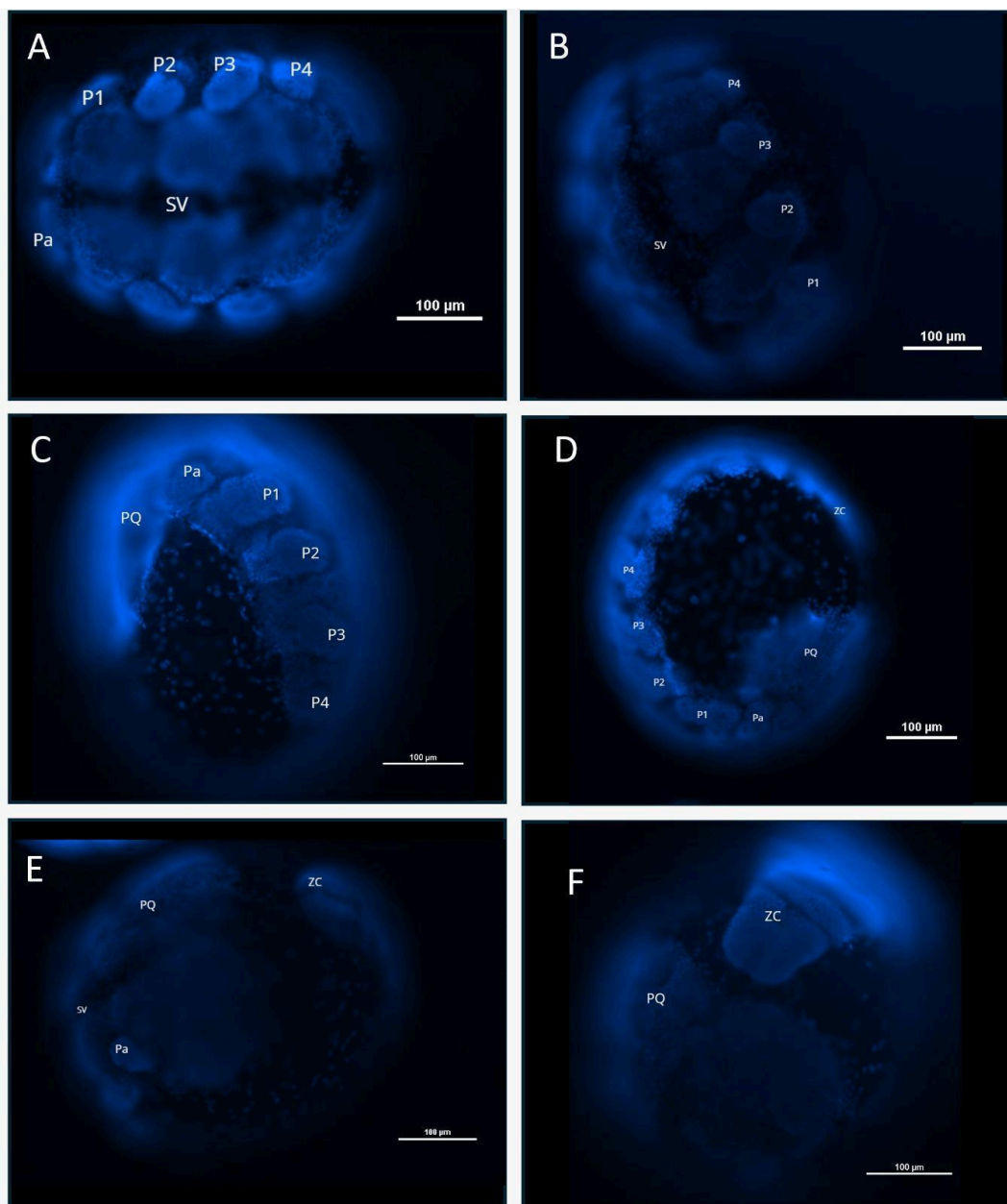
**Figura 14** - Embriões de *R. linnaei* com sete dias de desenvolvimento marcados com DAPI: **A e B** - Vista ventral do embrião mostrando os apêndices; **C**: vista lateral mostrando o lóbulo pré-quelícual, os apêndices, e a Zona de Crescimento dividida em 8 segmentos; **D**: um estágio menos desenvolvido do dia 7 que mostra os brotos começando a se formar, o sulco ventral, e a zona de crescimento com inícios de segmentação; **E e F** - Vista dorsal do embrião mostrando os lóbulos pré-quelicerais, os palpos, e a zona de crescimento com o sulco ventral no meio até o segmento 7, e o acúmulo de células (Hipostômio).

P1, P2, P3 e P4 - Pernas 1, 2, 3 e 4 respectivamente; Pa – Palpos; ZC – Zona de Crescimento; A - Região Anterior; SV – Sulco Ventral; PQ – pré-quelíceras; H - hipostômio

### **Embriões com 8 dias de Desenvolvimento**

Na vista ventral do embrião o sulco ventral ainda tem aparência bem marcada, com uma separação maior na parte posterior do que na parte anterior (Figuras 15A e 15B). Os apêndices mostraram um crescimento progressivo especialmente os palpos e os três primeiros pares de pernas (Pa, P1, P2, e P3), porém o quarto par de pernas (P4) apresenta o mesmo tamanho que no dia 7 de desenvolvimento (Figuras 15C e 15D). Na vista dorsal do embrião a parte anterior aparece ampliada, ocupando grande parte da superfície visível. Os palpos começam a se deslocar em direção a zona ventral e na zona de crescimento apresentou-se reduzida em largura em relação ao dia anterior, e apresenta uma grande celularização, encontrando-se ainda próximo à região anterior (figuras 15E e 15F).

Figura 15



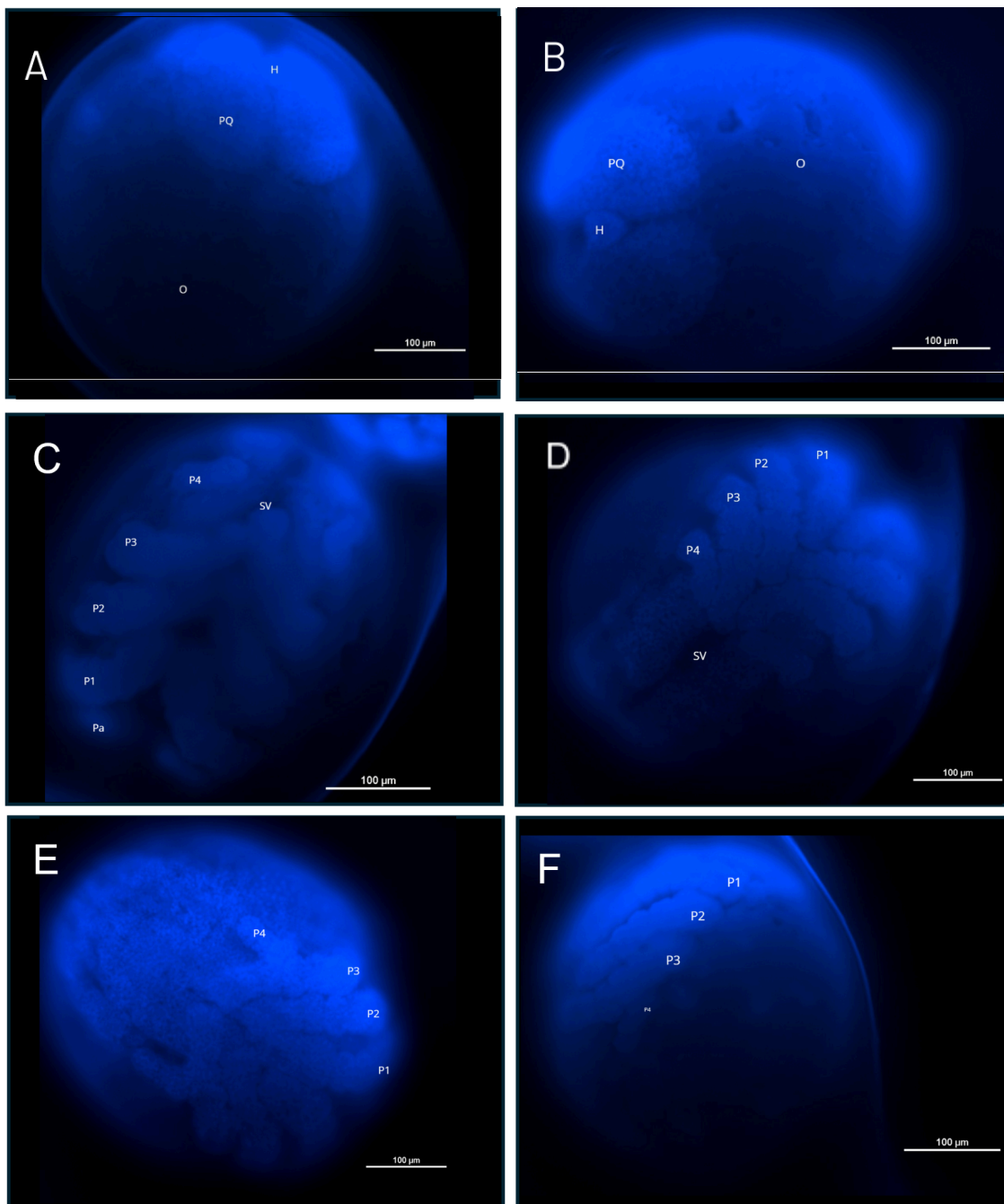
**Figura 15** - Embriões de *R. linnaei* com oito dias de desenvolvimento marcados com DAPI: **A e B** - Vista ventral do embrião mostrando os apêndices; **C e D**: vista lateral mostrando o lóbulo pré-quelíceral, os apêndices, e a Zona de Crescimento; **E e F** - Vista dorsal do embrião mostrando os lóbulos pré-quelícerais, os palpos, e a zona de crescimento com o sulco ventral no meio até o segmento 7, e o acúmulo de células (Hipostômio).

P1, P2, P3 e P4 - Pernas 1, 2, 3 e 4 respectivamente; Pa – Palpos; ZC – Zona de Crescimento; A - Região Anterior; SV – Sulco Ventral; PQ – pré-quelíceras; H - hipostômio

## **Embriões com 9 dias de Desenvolvimento**

No nono dia do desenvolvimento, os embriões vistos em posição dorsal, apresentam lóbulos pré-quelicerais ainda posicionados na parte dorsal do corpo no eixo anterior, com as células mais concentradas perdendo a forma de borboleta, e adquirindo uma forma mais alongada. O Hipostômio fica mais visível, mas a forma do corpo que nos dias anteriores mantinha a forma da banda germinativa, agora apresenta-se mais globosa. Isso permite distinguir entre a parte do prosoma e o opistossoma (Figuras 16A e 16B). Na vista ventral observa-se que os palpos são delgados e mais longos, e as pernas 1, 2, e 3 são longas e semi segmentadas, enquanto o quarto par de pernas permanece fino e sem crescimento aparente em relação com os dias anteriores. A direção do crescimento das pernas é ântero-posterior e em direção ao sulco ventral. Também é possível observar que as pernas estão posicionadas mais próximas ao eixo anterior. Por sua vez, o sulco ventral encontra-se em processo de fechamento, sendo visível ainda aberto nas Figuras 16C e 16D, e fechado na Figura 16E. Na vista lateral a forma globosa do corpo é evidente, o par de pernas 1 (P1) mais longas e decrescendo em tamanho até o par de pernas 3 (P3), finalmente, o quarto par (P4) aparece como um pequeno apêndice aproximadamente de  $\frac{1}{3}$  do tamanho de P3 (Figura 16F).

**Figura 16**

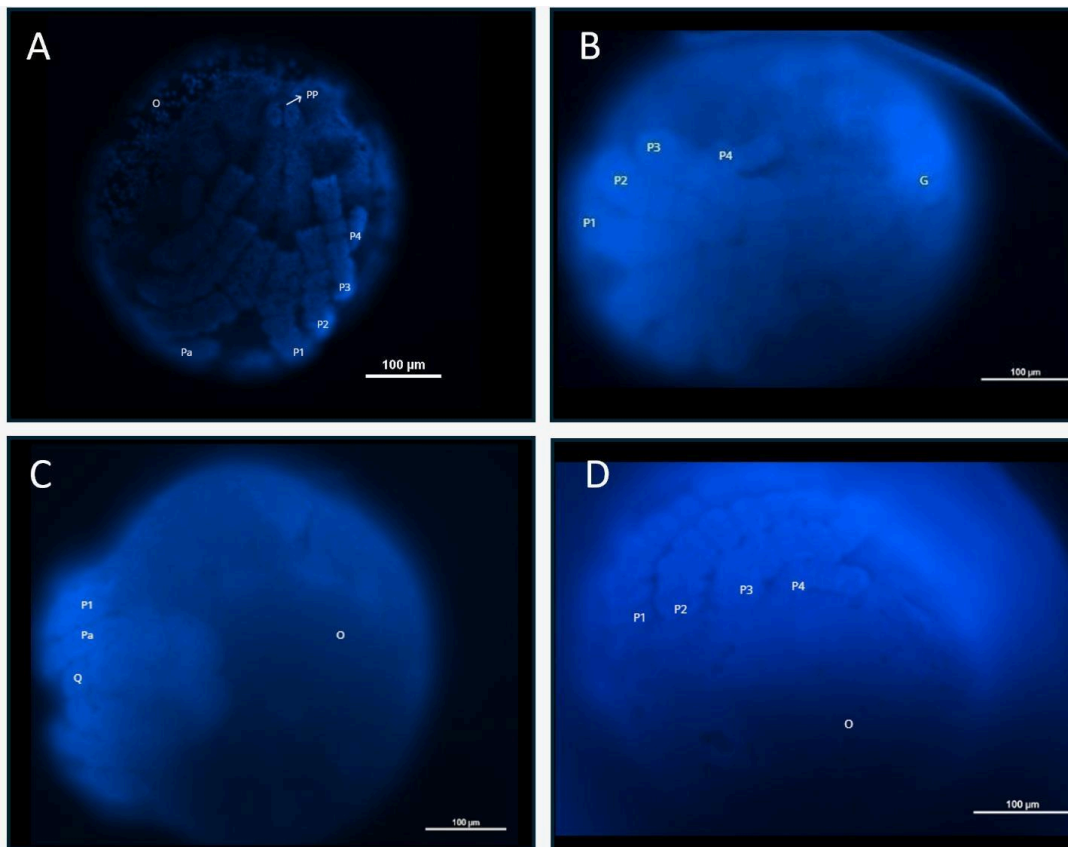


**Figura 16** - Embriões de *R. linnaei* com nove dias de desenvolvimento marcados com DAPI: **A** e **B** vista dorsal observa-se os lóbulos alongados na parte anterior com o hipostômio no meio mais celularizado, forma globosa distinguindo o prosoma do opistossomo; **C**, **D** e **E** vista ventral as pernas apresentam crescimento maior em direção ao sulco ventral e deslocadas ao eixo anterior, o par P4 não apresenta crescimento; **F** vista lateral pode-se observar o comprimento das pernas 1-3, e o 4o sem crescimento.  
P1, P2, P3 e P4 - Pernas 1, 2, 3 e 4 respectivamente; Pa – Palpos; SV – Sulco Ventral; PQ – pré-quelíceras; H - hipostômio

### Embriões com 10 dias de Desenvolvimento

No décimo dia de desenvolvimento, na visão ventral, os três primeiros pares de pernas (P1, P2 e P3) continuam crescendo em comprimento, em direção ao poro proctodeal já visível na região ventral posterior do embrião (Figura 17A e 17B). Em vista dorsal, no prosoma observa-se maior organização com as quelíceras visíveis, os palpos apresentam-se bifurcados e a forma diferenciada em prosoma e opistossoma, assim como observado no nono dia de desenvolvimento (Figura 17C). Na visão lateral os três primeiros pares de pernas (P1, P2 e P3), são facilmente reconhecíveis devido ao seu maior desenvolvimento, enquanto o quarto par (P4), embora visível, não tenha apresentado aumento de tamanho (Figura 17D).

**Figura 17**



**Figura 17** - Embriões de *R. linnaei* com dez dias de desenvolvimento marcados com DAPI: **A** e **B** vista ventral as pernas apresentam crescimento maior em direção ao sulco ventral e deslocadas ao eixo anterior, o par P4 não apresenta crescimento e poro proctodeal já visível na região ventral posterior do embrião; **C** observa-se os lóbulos alongados na parte anterior com o hipostômio em formação, palpos bifurcados e quelíceras, forma globosa distinguindo o prosoma do opistossomo; **D** vista lateral pode-se observar o comprimento das pernas 1-3, e o 4º par atrofiado.

P1, P2, P3 e P4 - Pernas 1, 2, 3 e 4 respectivamente; Pa – Palpos; SV – Sulco Ventral; PQ – pré-quelíceras; H - hipostômio; Q- quelíceras; PP poro proctodeal, O opistossoma.

## 7. DISCUSSÃO

A remoção do córion demonstrou ser um procedimento eficaz para permitir a marcação com DAPI e a visualização das mudanças morfológicas ocorridas entre os dias 6 e 10 do desenvolvimento embrionário de *Rhipicephalus linnaei*. No entanto, para otimizar o número de ovos sem córion disponíveis para análise, foi necessário modificar pontualmente o protocolo originalmente descrito por Friesen et al. (2015). Essa modificação consistiu no aumento no tempo de imersão no hipoclorito de sódio de 3 minutos para 8 minutos.

Após a caracterização morfológica dos embriões entre o 6º e o 10º dia de desenvolvimento, realizou-se a associação desses achados com os aspectos descritos na literatura. Utilizou-se o trabalho de Santos et al. (2013) com a espécie *R. microplus* como referência principal, com a finalidade de comparar e classificar as fases embrionárias observadas. Ainda o trabalho de Hinne et al. (2025) com *Ixodes scapularis* com um período de desenvolvimento que ocorre entre 35 e 40 dias, reportando 15 estágios, apesar de apresentarem algumas similaridades morfológicas, os tempos de desenvolvimento e a progressão dos estágios relatados, diferem amplamente dos padrões observados neste estudo, sendo uma espécie que apresenta maior proximidade temporal no processo de eclosão com *Rhipicephalus linnaei*, que pertence ao complexo do carrapato-marrom tropical (*R. sanguineus sensu lato*), o tempo de incubação dos ovos provavelmente é semelhante ao observado para *R. sanguineus* sob condições tropicais 15-30 dias (Jacobs et al., 2004). Resultados distintos foram descritos para *D. andersoni* por Friesen et al. (2015). Segundo estes autores, a espécie apresenta um período de desenvolvimento de 14–18 dias até a eclosão das primeiras larvas, e seu desenvolvimento para os estágios estudados neste trabalho começam no 4º dia. Enquanto, *R. microplus* (Santos et al., 2013) apresentam período de desenvolvimento de 21 dias, porém, esse estudo não associa explicitamente os estágios embrionários aos dias de desenvolvimento, no entanto, as características morfológicas descritas mostram-se mais semelhantes às observadas em *R. linnaei*.

Como resultado, obtém-se que o 6º dia de desenvolvimento de *R. linnaei* objeto de estudo neste trabalho corresponde inicialmente ao estágio 7 de *R. microplus* utilizado em Santos et al. (2013), incluindo a formação da banda germinativa caracterizada por um acúmulo de núcleos intercalados entre faixas com maiores agregações de núcleos e faixas com menor agregação de núcleos; nos extremos das faixas de células começa-se formar brotos quando vistos lateralmente; o eixo anterior mostra uma maior celularização e largura, em comparação a zona de crescimento mostrando uma menor celularização, na vista dorsal

tem-se um espaço sem núcleos marcados dividindo os eixos anterior e posterior. Essas observações corroboram os registros de Friesen et al. (2015), trabalhando com embriões de *Dermacentor andersoni*, identificaram o estágio 7 entre os dias 3 e 4 pós-oviposição, enquanto em embriões de *Ixodes scapularis*, observaram-se o mesmo estágio entre os dias 10 e 11 (Hinne et al., 2025). Em ambos estudos relatam-se o aparecimento da banda germinativa na região ventral, o que marcou o estabelecimento de um eixo corporal dorso-ventral, e na visão dorsal, foi descrito um espaço com menor concentração de núcleos (Friesen et al. 2015, Hinne et al. 2025). Por sua vez, mencionam para *D. andersoni* e *I. scapularis*, aglomerados de núcleos em posição médio-lateral se espalham ao longo do eixo ântero-posterior. Embora, haja similaridades, Friesen et al. (2015) destacam uma diferença relevante, ainda no estágio 7: as células se organizaram em segmentos ao longo da banda germinativa, e sulcos segmentares ficaram visíveis conforme esses aglomerados de células desapareceram, característica não observada nos embriões de *R. linnaei* no 6º dia.

Ainda no final do 6º dia e no 7º dia em fase inicial observou-se em *R. linnaei* que as características morfológicas se assemelham às do estágio 8 de *R. microplus* estudado em Santos et al (2013). Nesta fase, o sulco ventral já se encontra em formação, e os apêndices em crescimento; o embrião na vista lateral deixa evidente uma maior organização da parte anterior mostrando as pré-quêlicas e os brotos que darão origem aos apêndices (palpos e pernas 1, 2, 3 e 4). Santos et al. (2013) descrevem o estágio 8 de desenvolvimento, porém não relacionam o estágio a dia específicos pós-oviposição. Por sua vez, Friesen et al. (2015) associam esse estágio aos dias 4–5 de desenvolvimento, enquanto Hinne et al. (2025) relatam sua ocorrência apenas no dia 12. Apesar dessas variações temporais, as características morfológicas do estágio 8 descritas pelos três autores assim como os resultados encontrados neste trabalho, apresentam semelhanças como o aparecimento de quatro brotos de pares de pernas visíveis na região torácica, e dos apêndices bucais que surgiram ventrolateralmente na faixa germinativa; todos esses primórdios com comprimento comparável ao longo do eixo proximal-distal. O embrião adquiriu uma aparência de ferradura, e ocorreu uma inversão para internalizar o vitelo. No estágio 8 também relatou-se em todos os estudos, Santos et al., (2013); Friesen et al., (2015) e Hinne et al. (2025), incluindo *R. linnaei*, o início da formação do sulco ventral.

No final do dia 7 e no dia 8 os embriões de *R. linnaei* marcados com DAPI apresentam características compatíveis ao estágio 9 relatado em Santos et al., 2013 em *R. microplus*, de acordo com os parâmetros observados em diferentes posições. Em vista ventral foram observados os apêndices (palpos e as perna 1, 2 e 3 ) com um crescimento progressivo,

porém o quarto par de pernas (P4) apresentou tamanho semelhante ao observado no estágio anterior, o sulco ventral tornou-se mais evidente; na vista lateral se evidenciou-se o lóbulo pré-quelíceral bem definido, e a Zona de Crescimento dividida em 8 segmentos; Na perspectiva dorsal, os lóbulos pré-quelícerais exibiram uma concentração celular central, indicando a formação do hipostômio, e a zona de crescimento próxima a zona anterior. Essas observações são consistentes com os achados descritos por Santos et al. (2013) em *R. microplus* e Friesen et al. (2015) em *D. andersoni*, os quais relatam durante as fases iniciais e intermediárias do estágio 9, a observação do sulco ventral, mudanças que incluem um aumento no tamanho dos apêndices e P4 distintamente mais curto do que os outros pares de pernas. Além disso, ambos os autores destacam que, ao final do estágio 9, o sulco ventral inicia o fechamento. Na zona de crescimento vários sulcos segmentares foram observados. Os lobos pré-quelícerais estão claramente definidos, a zona de crescimento posterior e os lobos pré-quelícerais estavam próximos no lado dorsal do embrião nesse estágio, indicando a extensão completa da faixa germinativa. É neste estágio que as extremidades anterior e posterior são definidas. No entanto, algumas divergências foram observadas, nos embriões de *R. microplus* em Santos et al. (2013) relatam a regressão do quarto par de pernas ao final do estágio, característica não observada no presente estudo. Já Friesen et al. (2015) descrevem a presença de brotos que iram formar quelíceras em *D. andersoni*.

O 9° e 10° dia apresentaram características se correspondem ao estágio 10. Embriões de *R. linnaei* marcados com DAPI, em vista dorsal apresentaram lóbulos alongados na parte anterior com o hipostômio no meio mais celularizado, o corpo adquiriu uma forma globosa distinguindo o prosoma do opistossomo; na perspectiva ventral as pernas apresentam segmentação e um crescimento maior em direção ao sulco ventral em fechamento e deslocadas ao eixo anterior, o par P4 não apresenta crescimento e sem diminuição na largura (regressão). Esses achados apresentam forte correspondência com as descrições de Friesen et al. (2015), para o estágio 10 de *D. andersoni* foi observado nos dias 5 e 6 do desenvolvimento, apresentou inicialmente o prosoma claramente delimitado incluindo cabeça, estruturas bucais e segmentos locomotores e o opistossoma visivelmente definido com o início da contração da faixa germinativa. Na visão dorsal os lobos pré-quelíceras ainda estendidos para o lado dorsal-anterior. menciona também que na visão ventral teve migração do segmento posterior, contendo o orifício proctodeal, o qual eventualmente irá a formar o orifício anal. Assim como observado em *R. linnaei*, Friesen et al. (2015) relatam para *D. andersoni* o alongamento dos pares de pernas 1–3 em direção ao eixo ventral, enquanto o par P4 começou a regredir. Os mesmos autores reportam também a segmentação das pernas

simultaneamente, o que sugere que um padrão periódico de expressão de um morfógeno foi estabelecido durante este alongamento. Além dessas características Santos et al. (2013) em concordância com este trabalho observaram o começo do fechamento do sulco ventral, ocorrendo em sincronia com o aumento no tamanho das pernas na espécie *R. microplus*.

Por outro lado, Hinne et al. (2025) descrevem características referentes aos estágios 9 e 10 em *Ixodes scapularis* de forma defasada temporalmente em relação a *R. linnaei*, sendo essas equivalentes, neste trabalho, aos estágios 8 e 9, respectivamente.

Os resultados da associação entre dias pós-oviposição e os estágios de desenvolvimento foram sintetizados na Tabela 1, onde são apresentados os critérios utilizados para a classificação e a correspondência entre tempo pós-oviposição e estágio embrionário.

<b>Dia</b>	<b>estágio</b>	<b>Características morfológicas</b>
6	7-8	Estágio 7: apresenta organização celular em forma de uma banda germinativa (BG), fazendo aparentes os eixos ântero-posterior e dorso-ventral e na zona ventral formam-se com acúmulo de células em forma de bandas horizontais ao eixo ântero-posterior. Estágio 8: os primórdios das pernas (P1-4), o eixo anterior observa-se mais largo, e o eixo posterior mais fino, no estágio 8 mais avançado os primórdios dos apêndices visualizam-se mais compridos.
7	8-9	Estágio 9: na fase inicial aparece o sulco ventral, cabeça começa a se formar na parte anterior com os lóbulos pré-quelícerais, e os palpos visíveis curtos, as pernas (P1-4), apresentam crescimento, mas P4 é claramente o apêndice com menor crescimento com respeito aos outros pares de pernas, logo após do quarto par de pernas começam aparecer segmentos perpendiculares ao sulco ventral.
8	9	
9	10	A forma do embrião muda drasticamente da banda germinativa, para um corpo aparentemente globoso, com a diferenciação entre o prosoma e o opistossomo, os palpos e quelíceras são mais evidentes na parte anterior em direção ao eixo ventral, o hipostômio apresenta maior concentração de células enquanto as pernas P1-3 mostram crescimento, e P4 é de $\frac{1}{3}$ do tamanho de P3 e reduz sua largura. no início deste estágio o sulco ventral ainda é visível, e para um estado mais avançado os dois feixes embrionários vão se fundindo.
10		

**Tabela 1.** Relação entre os dias de desenvolvimento e os estágios descritos em outros trabalhos considerando características morfológica do desenvolvimento de *Rhipicephalus linnaei*

## 8. CONCLUSÕES

Os resultados da retirada do córion foi satisfatório e permitiram a marcação com DAPI de maneira exitosa, permitindo a visualização e avaliação progressiva das mudanças morfológica devido a organização celular, na formação dos eixos embrionários e no surgimento e diferenciação de estruturas segmentares e apendiculares dos embriões do sexto ao décimo dia.

Por meio desta técnica, foi possível avaliar as mudanças diárias do desenvolvimento embrionário, desde a formação da banda germinativa no sexto dia até a diferenciação corporal entre prossoma e opistossomo no décimo dia. Esse acompanhamento permitiu a identificação das características morfológicas mais evidentes, possibilitando a distinção entre os diferentes dias de desenvolvimento.

O detalhamento destas características permitiu a comparação com os estudos realizados por Santos et al. 2013 em *Rhipicephalus microplus*, a atribuição satisfatória de um estágio de desenvolvimento para cada dia analisado, de acordo com os 14 estágios propostos por esses autores. Dessa forma este estudo contribui na padronização do estagiamento do desenvolvimento embrionário para *Rhipicephalus linnaei*.

## 9. REFERÊNCIAS

- ALMAZÁN, C.; TORRES RODRÍGUEZ, L.; ALANAZI, A. D.; ŠLAPETA, J. American mitogenome reference for the tropical brown dog tick, *Rhipicephalus linnaei* (Audouin, 1826). **Current Research in Parasitology & Vector-Borne Diseases**, v. 6, e100194, 2024.
- ANDERSON, J. F., & MAGNARELLI, L. A. Biology of Ticks. **Infectious Disease Clinics of North America**, 22, 195-215, 2008. The Connecticut Agricultural Experiment Station, New Haven, CT, USA.
- BAKKES, D. K., DE KLERK, D., LATIF, A. A., MANS, B. J. Integrative taxonomy of Afrotropical *Ornithodoros* (*Ornithodoros*) (Acari: Ixodida: Argasidae). **Ticks and Tick-borne Diseases**, 585-592, 2018. DOI: [10.1016/j.ttbdis.2018.03.024](https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.03.024).
- BARRADAS PIÑA, F. T.; RODRIGUES, V. S.; HIGA, L. O. S.; GARCIA, M. V.; BARROS, J. C.; PÉREZ DE LEÓN, A. A.; ANDREOTTI, R. Life cycle of *Amblyomma mixtum* (Acari: Ixodidae) parasitizing different hosts under laboratory conditions. **Experimental and Applied Acarology**, 2017. DOI: [10.1007/s10493-017-0205-2](https://doi.org/10.1007/s10493-017-0205-2).
- BRUSCA, R. C.; BRUSCA, G. J. **Invertebrados** segunda edição, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.
- CÉSPEDES-ROSAS, J. E. E.; PENICHE-CARDEÑA, Á. E. de J.; VILLAGÓMEZ-CORTÉS, J. A.; BARRADAS-PIÑA, F. T.; MARTÍNEZ-HERRERA, D. I.; VIVANCO-CID, H. Reproductive parameters of *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* under controlled conditions. **Multidisciplinary Science Journal**, v. 6, e2024241, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.31893/multiscience.2024241>.
- COSTA, F. B., MARTINS, T. F., MUÑOZ-LEAL, S., SERPA, M. C. A., OGRZEWALSKA, M., LUZ, H. R., BARROS-BATTESTI, D. M., MESQUITA, E. T. K. C., COSTA, A. P., NOGUEIRA, R. M. S., LABRUNA, M. B. Retrospective and new records of ticks (Acari: Argasidae, Ixodidae) from the state of Maranhão, an Amazon-Cerrado transition area of Brazil. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, 21, 100413, 2020. DOI: [10.1016/j.vprsr.2020.100413](https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2020.100413).
- DANTAS-TORRES, F.; FIGUEREDO, L. A.; BRANDÃO-FILHO, S. P. *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae), the brown dog tick, parasitizing humans in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, volume 39, numero 1, p. 64-67, jan.-fev. 2006.
- DANTAS-TORRES, F. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): From taxonomy to control. **Veterinary Parasitology**, v. 152, p. 173–185, 2008. DOI: [10.1016/j.vetpar.2007.12.030](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.12.030)
- DANTAS-TORRES, F. Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. **Parasites & Vectors**, [s.l.], v. 3, p. 26, 2010. DOI: [10.1186/1756-3305-3-26](https://doi.org/10.1186/1756-3305-3-26).

DANTAS-TORRES, F.; OTRANTO, D. Effects of aggregation on the reproductive biology of *Rhipicephalus sanguineus* females. **Experimental and Applied Acarology**, v. 55, p. 417–423, 2011. DOI: 10.1007/s10493-011-9491-z.

DANTAS-TORRES, F.; CHOMEL, B. B.; OTRANTO, D. Ticks and tick-borne diseases: a One Health perspective. **Trends in Parasitology**, [s.l.], v. 28, n. 10, p. 437-446, out. 2012. DOI: 10.1016/j.pt.2012.07.003.

DANTAS-TORRES, F., MARTINS, T. F., MUÑOZ-LEAL, S., ONOFRIO, V. C., & BARROS-BATTESTI, D. M. Ticks (Ixodida: Argasidae, Ixodidae) of Brazil: Updated species checklist and taxonomic keys. **Ticks and Tick-borne Diseases**, 10, 101252, 2019.

DANTAS-TORRES, F.; DE SOUSA-PAULA, L. C.; OTRANTO, D. The *Rhipicephalus sanguineus* group: updated list of species, geographical distribution, and vector competence. **Parasites & Vectors**, v. 17, art. 540, 2024.

DARVISHI, M. M., YOUSSEFI, M. R., CHANGIZI, E., SHAYAN, P., ROSTAMI LIMA, R., RAHIMI, M. T. Biology of *Dermacentor marginatus* (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, 4(Suppl 1), S284–S289, 2014

DE LA FUENTE, J. Translational biotechnology for the control of ticks and tick-borne diseases. **Ticks and Tick-borne Diseases**, [s.l.], v. 12, n. 5, p. 101738, set. 2021.

DE, S.; KITSOU, C.; SONENSHINE, D. E.; PEDRA, J. H. F.; FIKRIG, E.; KASSIS, J. A.; PAL, U. Epigenetic regulation of tick biology and vectorial capacity. **Special Issue: Microbial Genetics**. TIGS 1740 No. of Pages 4. 2020.

ESTEVEZ, E., FOGACÇA, A. C., MALDONADO, R., SILVA, F. D., MANSO, P. P. A., PELALJO-MACHADO, M., VALLE, D., DAFFRE, S. Antimicrobial activity in the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* eggs: Cellular localization and temporal expression of microplusin during oogenesis and embryogenesis. **Developmental and Comparative Immunology**, 33, 913–919, 2009.

FERNANDES, É. K. K.; BITTENCOURT, V. R. E. P.; ROBERTS, D. W. Perspectives on the potential of entomopathogenic fungi in biological control of ticks. **Experimental Parasitology**, [s.l.], v. 130, n. 3, p. 300-305, mar. 2012. DOI: 10.1016/j.exppara.2011.11.004.

FRIESEN, K. J.; DIXON, M.; LYSYK, T. J. Embryo Development and Morphology of the Rocky Mountain Wood Tick (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, 2015, p. 1–11. DOI: 10.1093/jme/tjv193.

GAÍNZA, A.; MARRERO, S. M.; GONZÁLEZ, C. B. Las garrapatas de interés veterinario en Cuba, y su importancia en las condiciones climáticas cambiantes. **REDVET - Revista Electrónica de Veterinaria**, v. 15, n. 02, 2014.

GARCIA, M. V., SILVA, D. C., ALMEIDA, R. F. C., CUNHA, R. C., MATIAS, J., BARROS, J. C., ANDREOTTI, R., SZABÓ, M. P. J. Environmentally associated ticks (Acari: Ixodidae) in

Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, Jaboticabal**, v. 22, n. 1, p. 124-128, jan.-mar. 2013.

GARRIS, G. I. Control of Ticks. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, [s.l.], v. 21, n. 1, p. 211-225, jan. 1991.

GEORGE, J. E.; POUND, J. M.; DAVEY, R. B. Chemical control of ticks on cattle and the resistance of these parasites to acaricides. **Parasitology**. 129, S353–S366. 2004.

GOWRISHANKAR, S.; LATHA, B. R.; SREEKUMAR, C.; LEELA, V. Solar tick trap with a pheromone lure – A stand-in approach for off-host control of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato ticks. **Ticks and Tick-borne Diseases**, [s.l.], v. 12, n. 3, p. 101656, maio 2021. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2021.101656.

GRAY, J., DANTAS-TORRES, F., ESTRADA-PEÑA, A., LEVINE, M. Systematics and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. **Ticks and Tick-borne Diseases**, 4, 171–180, 2013.

HADI, U. K.; ADVENTINI, M. Fecundity, oviposition and egg incubation period of female *Rhipicephalus sanguineus* Latreille (Acari: Ixodidae) ticks in Indonesia. **Journal of Veterinary Medicine and Research**, v. 2, n. 5, s.p., 2015. DOI: <https://doi.org/10.47739/2378-931X/1036>

HEATH, A. C. G. Biology, ecology and distribution of the tick, *Haemaphysalis longicornis* Neumann (Acari: Ixodidae) in New Zealand. **New Zealand Veterinary Journal**, 2015.

HINNE, I. A.; CICCOTTI, H. R.; WUDARSKI, J.; PHAM, M. N.; SHARMA, A.; McVICAR, M. M.; FAUSTINO, B.; NUSS, A. B.; SHARMA, P. P.; GULIA-NUSS, M.. O desenvolvimento embrionário inicial no carrapato *Ixodes scapularis* sugere organização sincicial e celularização antes da formação da blastoderme. **EvoDevo**, v. 4, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13227-025-00240-y>

HORAK, I. G., CAMICAS, J.-L., KEIRANS, J. E. The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida): a world list of valid tick names. *Experimental and Applied Acarology*, 28, 27–54, 2002. **Kluwer Academic Publishers**. Printed in the Netherlands.

JACOBS, P. A.; FOURIE, L. J.; HORAK, I. G. Comparação laboratorial dos ciclos de vida dos carrapatos caninos *Haemaphysalis leachi* e *Rhipicephalus sanguineus*. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 71, n. 1, p. 15–28, mar. 2004.

JONGEJAN, F.; UILENBERG, G. Ticks and control methods. **Revue Scientifique et Technique de l'Office International des Épizooties**, [s.l.], v. 13, n. 4, p. 1201–1226, 1994.

JONGEJAN, F.; UILENBERG, G. The global importance of ticks. **Parasitology**, v. 129, p. S3–S14, 2004. DOI: 10.1017/S0031182004005967

KISZEWSKI, A. E.; MATUSCHKA, F.-R.; SPIELMAN, A. Mating strategies and spermiogenesis in ixodid ticks. **Annual Review of Entomology**, [s.l.], v. 46, p. 167–182, 2001. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.46.071801.114346>

KRČMAR, Stjepan. Diversity, ecology, and seasonality of hard ticks (*Acari: Ixodidae*) in eastern Croatia. **Journal of Vector Ecology**, jun. 2019. DOI: 10.1111/jvec.12325.

KURTTI, T. J., MUNDERLOH, U. G., STILLER, D. The Interaction of *Babesia caballi* Kinetes with Tick Cells. **Journal of Invertebrate Pathology**, 42, 334–343, 1983.

LABRUNA, M. B.; GERARDI, M.; KRAWCZAK, F. S.; MORAES-FILHO, J. Comparative biology of the tropical and temperate species of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (*Acari: Ixodidae*) under different laboratory conditions. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 8, n. 1, p. 146-156, jan. 2017. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2016.10.011

NARLADKAR, B. W. Projected economic losses due to vector and vector-borne parasitic diseases in livestock of India and its significance in implementing the concept of integrated practices for vector management. **Vet World**, [s.l.], v. 11, n. 2, p. 151–160, 9 fev. 2018. DOI: 10.14202/vetworld.2018.151-160.

NAVA, S.; ESTRADA-PEÑA, A.; MANGOLD, A. J.; GUGLIELMONE, A. A. Ecology of *Amblyomma neumanni* (*Acari: Ixodidae*). **Acta Tropica**, v. 111, n. 3, p. 226-236, sept. 2009. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.04.013>.

NAVA, S.; GUGLIELMONE, A. A.; MANGOLD, A. J. An overview of systematics and evolution of ticks. **Frontiers in Bioscience**, v. 14, p. 2857-2877, 1 jan. 2009

NAVA, S.; VENZAL, J. M.; GONZÁLEZ-ACUÑA, D.; MARTINS, T. F.; GUGLIELMONE, A. A. Ticks of the Southern Cone of America: Diagnosis, Distribution, and Hosts with Taxonomy, Ecology, and Sanitary Importance. **Academic Press, Elsevier**, 2017.

NAVA, S.; BEATI, L.; VENZAL, J. M.; LABRUNA, M. B.; SZABO, M. P. J.; PETNEY, T.; SARACHO-BOTTERO, M. N.; TARRAGONA, E. L.; DANTAS-TORRES, F.; SANTOS SILVA, M. M.; MANGOLD, A. J.; GUGLIELMONE, A. A.; ESTRADA-PEÑA, A. *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806): neotype designation, morphological re-description of all parasitic stages and molecular characterization. **Ticks and Tick-borne Diseases**, [s.l.], v. 10, n. 5, p. 1083, 2018. DOI: [10.1016/j.ttbdis.2018.08.001](https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.08.001).

PASCOE, E. L., NAVA, S., LABRUNA, M. B., PADDOCK, C. D., LEVIN, M. L., MARCANTONIO, M., FOLEY, J. Predicting the northward expansion of tropical lineage *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* ticks in the United States and its implications for medical and veterinary health. **PLoS ONE**, 17(8): e0271683, 2022.

PIRALI-KHEIRABADI, K. H., & TEIXEIRA DA SILVA, J. A. In-vitro assessment of the acaricidal properties of *Artemisia annua* and *Zataria multiflora* essential oils to control cattle ticks. **Iranian Journal of Parasitology**, 6(1), 58-65, 2011.

POLANCO-ECHEVERRY, D. N.; RÍOS-OSORIO, L. A. Aspectos biológicos y ecológicos de las garrapatas duras. **Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria**, v. 17, n. 1, p. 81-95, 2016

RANDOLPH, S. E. Tick ecology: processes and patterns behind the epidemiological risk posed by ixodid ticks as vectors. **Parasitology**, v. 129, p. S37–S65, 2004.

RAMOS, V. N.; LEMOS, F. G.; AZEVEDO, F. C.; ARRAIS, R. C.; LIMA, C. F. M.; CANDEIAS, I. Z.; MARTINS, M. M.; SANDRIN, A. C. L. G.; SIQUEIRA, S. M.; SZABÓ, M. P. J. . Wild carnivores, domestic dogs and ticks: shared parasitism in the Brazilian Cerrado. **Parasitology**, v. 147, n. 6, p. 689–698, 27 fev. 2020. DOI: 10.1017/S0031182020000335.

ROBAYO-SÁNCHEZ, L. N.; LÓPEZ, Y.; MUÑOZ-LEAL, S.; RAMÍREZ-HERNÁNDEZ, A.; ALEMAN, A.; CORTÉS-VECINO, J. A.; MATTAR, S.; FACCINI-MARTÍNEZ, Á. A. Laboratory life cycle of *Ornithodoros puertoricensis* (Ixodida: Argasidae) collected in the Colombian Caribbean. **Experimental and Applied Acarology**, v. 88, p. 387–395, 2022.

SANTOS, V. T.; RIBEIRO, L.; FRAGA, A.; BARROS, C. M.; CAMPOS, E.; MORAES, J.; FONTENELE, M. R.; ARAUJO, H. M.; FEITOSA, N. M.; LOGULLO, C.; FONSECA, R. N. The Embryogenesis of the Tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: The Establishment of a New Chelicerate Model System. **Genesis**, v. 51, p. 803–818, 2013.

ŠLAPETA, J.; CHANDRA, S.; HALLIDAY, B. The "tropical lineage" of the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato identified as *Rhipicephalus linnaei*. **International Journal for Parasitology**, v. 51, n. 6, p. 431-436, 2021.

ŠLAPETA, J.; HALLIDAY, B.; CHANDRA, S.; ALANAZI, A. D.; ABDEL-SHAFY, S. *Rhipicephalus linnaei* (Audouin, 1826) reconhecido como a "linhagem tropical" do carrapato marrom do cão *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato: designação de neótipo, redescritção e estabelecimento de referência morfológica e molecular. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 13, 2022.

ŠMIT, R.; POSTMA, M. J. Review of tick-borne encephalitis and vaccines: clinical and economical aspects. **Expert Review of Vaccines**, [s.l.], v. 14, n. 5, p. 737–747, 2015. DOI: 10.1586/14760584.2015.1038246.

SOARES, R. F., ARAÚJO, I. M., CORDEIRO, M. D., BAÊTA, B. A., SILVA, J. B., FONSECA, A. H. Diversity of tick species (Acari: Ixodidae) in military training areas in Southeastern Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, 31(2), e001322, 2022. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612022027>.

SORMUNEN, J. J.; VESTERINEN, E. J.; KLEMOLA, T. Carrapatos e patógenos transmitidos por carrapatos encontrados em cães e gatos: uma perspectiva do norte da Europa. **Doenças Transfronteiriças e Emergentes**, 4 jun. 2025, pág. 5574554. DOI: 10.1155/tbed/5574554.

VIAL, L. Biological and ecological characteristics of soft ticks (Ixodida: Argasidae) and their impact for predicting tick and associated disease distribution. **Exp. Appl. Acarol.**, [s.l.], v. 49, n. 1-2, p. 1–20, 2009. DOI: 10.1007/s10493-009-9266-3.

VUDRIKO, P.; OKWEE-ACAI, J.; TAYEBWA, DS.; BYARUHANGA, J.; KAKOOZA, S.; WAMPANDE, E.; OMARA, R.; MUHINDO, JB.; TWEYONGYERE, R.; OWINY, D. O.; HATTA, T.; TSUJI, N.; UMEMIYA-SHIRAFUJI, R., XUAN, X.; KANAMEDA, M.; FUJISAKI, K.; SUZUKI, H. Emergence of multi-acaricide resistant *Rhipicephalus* ticks and its implication on chemical tick control in Uganda. **Parasites & Vectors**, v. 9, p. 4, 4 jan. 2016. DOI: 10.1186/s13071-015-1278-3.

VUI, N. V.; LINH, N. T.; QUYEN, N. T. K.; NANG, K.; VIET, H. V. The utility of *Ocimum basilicum*, *Perilla frutescens*, and *Mentha spicata* essential oils to control larvae and engorged female *Rhipicephalus sanguineus* ticks on dogs. **Journal of Veterinary Medical Science**, [s.l.], v. 86, n. 12, p. 1237–1242, 2024. DOI: 10.1292/jvms.24-0288. Recebido em: 22 jul. 2024. Aceito em: 26 set. 2024.

WALKER, J. B.; KEIRANS, J. E.; HORAK, I. G. The Genus *Rhipicephalus* (*Acari, Ixodidae*): A Guide to the Brown Ticks of the World. **Cambridge: Cambridge University Press**, 2000.

WALKER, A. R. Eradication and control of livestock ticks: biological, economic and social perspectives. **Parasitology**, v. 138, n. 8, p. 945-959, 2011. DOI: 10.1017/S003118201100070X.