



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

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – ECOLOGIA E
BIODIVERSIDADE

DESCRIÇÃO DOS ESTÁGIOS INICIAIS DO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DO
CARRAPATO DO CÃO, (Acari: Ixodidae) *Rhipicephalus linnaei* (Audouin, 1826).

Patricia Aparecida Silva Banci

Foz do Iguaçu- PR

2025



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

**CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – ECOLOGIA E
BIODIVERSIDADE**

**DESCRIÇÃO DOS ESTÁGIOS INICIAIS DO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DO
CARRAPATO DO CÃO, (Acari: Ixodidae) *Rhipicephalus linnaei* (Audouin, 1826).**

Patricia Aparecida Silva Banci

Trabalho de Conclusão de Curso II, apresentado ao
Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da
Natureza da Universidade Federal de Integração
Latino Americana

Orientador: Prof. Dr. PABLO HENRIQUE NUNES

Co-orientadora: Profa Dra. CARLA VERMEULEN CARVALHO GRADE

FOZ DO IGUAÇU- PR

2025

Patricia Aparecida Silva Banci

DESCRIÇÃO DOS ESTÁGIOS INICIAIS DO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DO
CARRAPATO DO CÃO, *Rhipicephalus linnaei* (Audouin, 1826).

Trabalho de Conclusão de Curso II, apresentado ao
Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza da
Universidade Federal de Integração Latino Americana

BANCA EXAMINADORA.

BEATRIZ MITIDIERO

Universidade Federal de Integração-Latino Americana - UNILA

Co-orientadora: Profa Dra. CARLA VERMEULEN CARVALHO GRADE

Universidade Federal de Integração-Latino Americana - UNILA

Prof. Dr. ELAINE DELLA GIUSTINA SOARES

Universidade Federal de Integração-Latino Americana - UNILA

Orientador: Prof. Dr. PABLO HENRIQUE NUNES

Universidade Federal de Integração-Latino Americana - UNILA

FOZ DO IGUAÇU, DIA _____ DE _____ DE 20_____

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a cada membro da minha família, que da sua forma, me ajudou como podia, meu pai, Valdir, com seu auxílio financeiro nos momentos mais apertados, minha mãe, Arlete, sempre cuidando de mim, mesmo de longe, e minha irmã, Sirlei, que foi minha heroína, me incentivando a me jogar de cabeça nessa loucura que foi fazer uma faculdade longe de casa, em um lugar onde eu não conhecia ninguém.

Também gostaria de agradecer a todos os meus amigos, que ajudaram-me a trilhar esse caminho até aqui, Liciane e Liz Melissa, compartilhar essa jornada junto com vocês foi incrível, emocionante, e assustador ao mesmo tempo.

Sem minha família e amigos, posso dizer com toda certeza, que eu não teria chegado aonde eu cheguei, por isso, seria errado eu terminar esse trabalho sem agradecê-los. Com esse trabalho minha jornada se encerra, mas minha gratidão vai durar para sempre.

RESUMO

O desenvolvimento embrionário de carrapatos constitui uma área ainda pouco explorada dentro do grupo dos aracnídeos, especialmente quando se trata de espécies recentemente redefinidas taxonomicamente, como *Rhipicephalus linnaei*. Reconhecida como a linhagem tropical do complexo *Rhipicephalus sanguineus sensu lato*, essa espécie possui grande relevância médico-veterinária devido ao seu papel como ectoparasita de cães e vetor de agentes como *Ehrlichia canis*, *Babesia vogeli* e *Hepatozoon canis*. Apesar do crescente número de estudos sobre biologia, ecologia e distribuição de Ixodidae, estudos relacionados à embriogênese permanecem limitados.

Neste estudo, foram analisados embriões de *R. linnaei* com 4 e 5 dias de desenvolvimento, a fim de caracterizar a organização nuclear durante os estágios iniciais do embrião. Fêmeas ingurgitadas foram mantidas em condições controladas, e seus ovos foram submetidos a protocolo de descorionização baseado em Friesen et al. (2015), seguido de permeabilização e marcação nuclear com DAPI. As amostras foram avaliadas em microscopia de fluorescência para verificar a integridade estrutural dos embriões e a distribuição dos núcleos.

Os resultados obtidos mostraram que, no 4º dia de desenvolvimento, os embriões apresentaram grande quantidade de núcleos distribuídos de forma relativamente homogênea no citoplasma, além de grânulos de vitelo bem definidos e variáveis em tamanho. No 5º dia, observou-se aumento significativo na quantidade de núcleos e início de agrupamento nuclear, sugerindo a transição para fases mais avançadas, e dando início aos processos preparatórios para a formação do blastoderma. A ausência visível de grânulos de vitelo nesse estágio pode indicar reorganização citoplasmática à medida que o desenvolvimento progride.

Alguns embriões apresentaram falhas na marcação fluorescente ou remoção parcial do córion, resultando em distribuição nuclear irregular e estruturas disformes, o que evidencia limitações técnicas em protocolos de lixiviação e permeabilização, especialmente quando aplicados a embriões de idades variáveis. Tais dificuldades já foram relatadas em estudos com outras espécies de carrapatos, reforçando a necessidade de padronização aprimorada para análises embrionárias comparativas.

De modo geral, os padrões observados confirmam que *R. linnaei* apresenta dinâmica embrionária compatível com outros quelicerados. A caracterização desses estágios iniciais contribui para preencher lacunas no entendimento da embriogênese do grupo e fornece informações essenciais

para futuras investigações envolvendo morfogênese, biologia celular, evolução e potenciais intervenções no ciclo de vida de carrapatos.

Palavras-chave: Estadiamento embrionário, Descorionização de ovos, Marcação fluorescente, Organização nuclear, Aracnídeos.

ABSTRACT

Embryonic development in ticks remains an understudied area within arachnid biology, particularly regarding species that have recently undergone taxonomic redefinition, such as *Rhipicephalus linnaei*. Recognized as the tropical lineage of the *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato complex, this species holds substantial medical and veterinary importance due to its role as an ectoparasite of dogs and vector of pathogens such as *Ehrlichia canis*, *Babesia vogeli*, and *Hepatozoon canis*. Despite the increasing number of studies on Ixodidae biology, ecology, and distribution, research focused on embryogenesis remains limited.

In this study, *R. linnaei* embryos at 4 and 5 days of development were analyzed with the aim of characterizing nuclear organization during the early developmental stages. Engorged females were maintained under controlled laboratory conditions, and their eggs were subjected to a decortication protocol based on Friesen et al. (2015), followed by permeabilization and nuclear staining with DAPI. Samples were examined using fluorescence microscopy to assess structural integrity and nuclear distribution.

The results demonstrated that embryos at 4 days of development exhibited numerous nuclei distributed relatively homogeneously throughout the cytoplasm, along with well-defined yolk granules of variable sizes. By the 5th day, a marked increase in nuclear number and the onset of nuclear clustering were observed, indicating progression toward more advanced developmental phases and the initial steps leading to blastoderm formation. The absence of visible yolk granules at this stage suggests cytoplasmic reorganization as development advances.

Some embryos showed incomplete fluorescent staining or partial chorion removal, resulting in irregular nuclear distribution and distorted structures. These findings highlight technical limitations associated with decortication and permeabilization procedures,

particularly when applied to embryos of varying developmental ages—challenges previously reported in studies involving other tick species.

Overall, the observed patterns confirm that *R. linnaei* exhibits an embryonic dynamic consistent with other chelicerates. The characterization of these early stages helps fill existing gaps in the understanding of embryogenesis in ticks and provides essential information for future investigations involving morphogenesis, cell biology, evolution, and potential interventions in the tick life cycle.

Keywords: Embryonic staging, Egg dechoriation, Fluorescent labeling, Nuclear organization, Arachnids.

RESUMEN

El desarrollo embrionario de los garrapatos constituye un área aún poco explorada dentro del grupo de los arácnidos, especialmente cuando se trata de especies recientemente redefinidas desde el punto de vista taxonómico, como *Rhipicephalus linnaei*. Reconocida como la linaje tropical del complejo *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato, esta especie posee una gran relevancia médico-veterinaria debido a su papel como ectoparásito de perros y vector de agentes como *Ehrlichia canis*, *Babesia vogeli* y *Hepatozoon canis*. A pesar del creciente número de estudios sobre la biología, ecología y distribución de los Ixodidae, las investigaciones relacionadas con la embriogénesis siguen siendo limitadas.

En este estudio se analizaron embriones de *R. linnaei* con 4 y 5 días de desarrollo, con el objetivo de caracterizar la organización nuclear durante las etapas iniciales del embrión. Las hembras ingurgitadas se mantuvieron en condiciones controladas, y sus huevos fueron sometidos a un protocolo de descorionización basado en Friesen et al. (2015), seguido de permeabilización y marcación nuclear con DAPI. Las muestras se evaluaron mediante microscopía de fluorescencia para verificar la integridad estructural de los embriones y la distribución de los núcleos.

Los resultados obtenidos mostraron que, en el cuarto día de desarrollo, los embriones presentaron una gran cantidad de núcleos distribuidos de manera relativamente homogénea en el citoplasma, además de gránulos de vitelo bien definidos y variables en tamaño. En el quinto día se observó un aumento significativo en el número de núcleos y el inicio del agrupamiento nuclear, lo que sugiere la transición hacia fases más avanzadas del

desarrollo y el comienzo de los procesos preparatorios para la formación del blastodermo. La ausencia visible de gránulos de vitelo en esta etapa puede indicar una reorganización citoplasmática a medida que el desarrollo progresa.

Algunos embriones presentaron fallas en la marcación fluorescente o una remoción parcial del corion, lo que resultó en una distribución nuclear irregular y en estructuras deformes, evidenciando limitaciones técnicas en los protocolos de lixiviación y permeabilización, especialmente cuando se aplican a embriones de diferentes edades. Estas dificultades ya han sido reportadas en estudios con otras especies de garrapatos, lo que refuerza la necesidad de una estandarización mejorada para análisis embrionarios comparativos.

En general, los patrones observados confirman que *R. linnaei* presenta una dinámica embrionaria compatible con la de otros quelicerados. La caracterización de estas etapas iniciales contribuye a llenar vacíos en la comprensión de la embriogénesis del grupo y proporciona información esencial para futuras investigaciones relacionadas con la morfogénesis, la biología celular, la evolución y posibles intervenciones en el ciclo de vida de los garrapatos.

Palabra Clave: Estadificación embrionaria, Descorionización de huevos, Marcación fluorescente, Organización nuclear, Arácnidos.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.	10
OBJETIVOS GERAIS	16
OBJETIVO ESPECÍFICO	16
MATERIAIS E MÉTODOS	17
RESULTADOS	18
DISCUSSÃO	22
CONCLUSÃO	24
BIBLIOGRAFIA	24

INTRODUÇÃO.

Os carrapatos pertencem à classe Arachnida, e Hoogstraal e Aeschlimann (1982), foram os primeiros a estabelecer uma relação evolutiva sobre os carrapatos, e os classificaram em dois grandes grupos: os Prostriata e os Metastriata (Silva, 2017).

Nos dias atuais, os carrapatos estão distribuídos em três famílias, sendo elas a família Argasidae, Ixodidae, e Nuttaliellidae. A família Nuttaliellidae possui apenas uma espécie, chamada *Nuttalliella namaqua*, que pode ser encontrada no continente africano. A família Argasidae é chamada de “carrapatos de corpo mole”, isso por que esses carrapatos tem como principal característica morfológica a ausência de um escudo esclerotizado na região dorsal do corpo. Já a família Ixodidae, é conhecida como “carrapatos de corpo duro”, isso porque eles possuem um escudo esclerotizado na região dorsal corpo (Silva, 2017).

Além da presença ou ausência de um escudo dorsal, existem outras características fisiológicas e morfológicas que diferenciam as famílias Argasidae e Ixodidae (Estrada-Peña, 2015). Segundo um guia emitido pela Secretaria de Saúde do Estado do Rio Grande do Sul (2018), algumas das características morfológicas que podem diferenciar essas famílias incluem coxas sem espinhos, festões ausentes e o capítulo anterior não visível dorsalmente em Argasidae. Já em Ixodidae, existem espinhos na região interna das coxas, os festões estão presentes na maioria das espécies, e é possível visualizar o capítulo anterior a partir da região dorsal. O único representante da família Nuttaliellidae, apresenta características de ambos os grupos de “carrapatos moles” e “carrapatos duros”. (Estrada-Peña, 2015; Silva, 2017).

A diferenciação entre espécies de carrapatos normalmente é feita através de características morfológicas, o que pode ser um fator limitante no momento de se construir uma árvore filogenética, já que além desse grupo ser bastante diverso, muitas espécies diferentes podem apresentar características morfológicas semelhantes. Por conta disso, diversos estudos moleculares vêm sendo feitos para tentar verificar outras diferenças não vistas na morfologia de cada espécie (Silva, 2017).

Entre os Ixodidae, o gênero *Rhipicephalus* destaca-se por sua ampla distribuição geográfica e grande importância médica e veterinária. Atualmente, são reconhecidas cerca de 786 espécies válidas dentro da família Ixodidae, das quais aproximadamente 90 pertencem ao gênero *Rhipicephalus* (Dantas-Torres et al, 2024). Tradicionalmente, *Rhipicephalus sanguineus*

(Latreille, 1806) era considerado uma única espécie cosmopolita, amplamente associada a ambientes urbanos e ao parasitismo de cães domésticos. No entanto, estudos recentes utilizando marcadores morfológicos e moleculares demonstraram que *R. sanguineus* que acreditava-se ser uma única espécie são, na realidade, um complexo de espécies, com diferenças significativas em sua biologia, distribuição e competência vetorial (Šlapeta et al, 2022).

Esse complexo, de carrapatos tropicais, ganhou destaque por apresentar características morfológicas singulares, como espiráculos mais estreitos e alongados, e elevada divergência genética em comparação com *R. sanguineus*. As análises conduzidas por Šlapeta et al. (2022) demonstraram que a linhagem de carrapatos tropicais corresponde a uma espécie distinta, sendo seu nome válido *Rhipicephalus linnaei* (Audouin, 1826). Como o material-tipo original encontrava-se perdido, foi necessária a designação de um neótipo, garantindo a estabilidade nomenclatural e permitindo a caracterização formal da espécie conforme o Código Internacional de Nomenclatura Zoológica. O reconhecimento da linhagem tropical de *R. sanguineus* como de *R. linnaei*, tem impacto direto na parasitologia veterinária, epidemiologia e controle de carrapatos, uma vez que suas características biológicas diferem das demais espécies do complexo.

Os carrapatos, possuem uma relação de parasitismos com seus hospedeiros, sendo estes hospedeiros, principalmente vertebrados. Nessa relação o carrapato se beneficia metabolicamente se alimentando de seus hospedeiros (Luz-Faccini, 2023).

Os carrapatos estão associados a transmissão de várias doenças em humanos e animais, que podem levar à morte, por conta disso, a presença destes parasitas faz com que isso se torne um problema de saúde pública, sendo assim, parasitas e hospedeiros devem ser mantidos sob vigilância a fim de prevenir que essas doenças se espalhem (Paz, et al. 2008).

A família Ixodidae é a família que possui mais espécies com interesse médico, econômico e veterinário. Sua importância médica e veterinária vem do fato de que eles podem atuar como vetores de diversos agentes patogênicos, como vírus, bactérias e protozoários, com potencial zoonótico (Estrada-Peña, 2015), além de trazerem prejuízos significativos ao hospedeiro, variando de irritações cutâneas a anemias severas e transmissão de patógenos. Dentre as espécies de maior relevância, *R. sanguineus* sensu lato (incluindo *R. linnaei*) é reconhecido mundialmente como um dos principais vetores de agentes etiológicos como *Ehrlichia canis*,

Babesia vogeli e *Hepatozoon canis*, responsáveis por doenças graves em cães domésticos (Dantas-Torres e Otranto, 2013; Ferreira e Silva, 2017).

Os carrapatos são caracterizados por possuir quatro estágios de desenvolvimento, o ovo, a larva, ninfa e o adulto. Os estágios imaturos como larvas e ninfas de Ixodidae tendem a se alimentar de pequenos animais, como pássaros e roedores, já os adultos podem se alimentar de mamíferos maiores, selvagens ou domésticos (Silva, 2017). Assim que o carrapato encontra seu hospedeiro ele pode escolher um local adequado para poder começar seu processo de alimentação, após a escolha, o carrapato dilacera a pele utilizando suas quelíceras e insere o hipostômio.

O gnatossoma (local onde se ancoram as peças bucais dos aracnídeos) possui um hipostômio (que são as peças bucais que penetram no hospedeiro) que possui denticulos recurvados para trás, o que ajuda na sua fixação no hospedeiro. Já os palpos têm função sensorial, que os ajudam a encontrar o melhor local para a inserção de suas quelíceras que dilaceram a epiderme do hospedeiro até chegar ao seu alimento (o sangue) (Wachholz et al, 2014). Após a inserção das peças bucais, o carrapato começa a liberar saliva, com diversos componentes químicos, que possui diversas funções, sendo uma delas a de formar uma espécie de cimento. Após a cimentação, passa-se a desencadear uma série de eventos complexos, principalmente nas glândulas salivares do carrapato, que permitirá a lise das células que circundam a área de alimentação. Essa lise permite um maior fluxo sanguíneo, e diminui a resposta imune do hospedeiro (Silva, 2017).

O número de hospedeiros que um carrapato precisa para completar seu ciclo de vida varia para cada espécie, podendo ser de um a até três hospedeiros. O carrapato pode se alimentar, fazer a muda (ecdise) e se alimentar novamente do mesmo hospedeiro, esses carrapatos são conhecidos por possuírem um ciclo monoxeno. Mas quando o carrapato necessita de dois hospedeiros, esses carrapatos são conhecidos por possuírem um ciclo dioxeno (ou heteroxeno de dois hospedeiros), e quando envolve três diz-se trioxeno (heteroxeno de três hospedeiros) (Brito et al, 2006). A diferença entre ciclos (mono e di/trioxeno) tem implicações práticas para controle: espécies monoxênicas tendem a ser mais facilmente controladas via manejo do hospedeiro e tratamentos acaricidas dirigidos, já as espécies heteroxenas exigem intervenções ambientais, monitoramento de fauna silvestre e estratégias integradas, pois utilizam múltiplos hospedeiros e tipos de habitat (Andreotti et al, 2016)

Os carrapatos da família Ixodidae são caracterizados por se alimentarem por vários dias, enquanto que os da família Argasidae, se alimentam por algumas horas, geralmente no período da noite, quando seus hospedeiros estão descansando, ou seja, os Argasidae apresentam um comportamento “endofilo”, que é quando um parasita raramente sai da toca do hospedeiro. Isso lhes garante uma fonte segura de alimentos, e pouca variação climática (Estrada-Peña, 2015), já que dentro da toca o clima tende a se manter mais estável. Algumas espécies de Ixodidae também apresentam esse tipo de comportamento, como por exemplo o *R. sanguineus* (Dantas-Torres, 2010)

O clima ideal é de extrema importância para o desenvolvimento dos carrapatos, já que auxilia na regulação da muda e da oviposição. Em meio ao ambiente natural, os períodos de muda e ingurgitamento podem variar amplamente entre as populações de carrapatos, e podem ser fortemente influenciados pela temperatura e o tamanho da população. No Brasil, onde as condições ambientais são favoráveis, é possível que ocorram de três a até quatro gerações de carrapatos por ano (Dantas-Torres, 2010).

A espécie de carrapato *R. sanguineus sensu lato*, pertencente a subfamília Rhipicephalinae, e da família Ixodidae, possui sua origem na região Afrotropical, porém, nos dias atuais ela é uma espécie cosmopolita, ou seja, pode ser encontrada em qualquer região zoogeográfica do mundo (Mendes et al, 2019). De acordo com o trabalho de Labruma e Pereira de 2001, a sua possível introdução no Brasil, deve ter ocorrido no século XVI, com a chegada dos colonizadores europeus e seus animais domésticos (apud Garcia et al, 2008). Desde então ocorreu uma grande dissipação dessa espécie de carrapato, devido ao clima favorável ao qual o Brasil apresenta (Garcia et al, 2008).

Apesar do principal hospedeiro do *R. sanguineus* ser os cães domésticos, esses artrópodes são sinantrópicos, ou seja, se dão muito bem em condições antrópicas, e apesar de existirem poucos relatos de parasitismos em humanos, trabalhos como o Louly de 2006, nos mostram que a estreita relação do homem com o cão, pode acarretar no desenvolvimento da relação de parasitismo de *R. sanguineus* em humanos.

Os carrapatos *R. sanguineus* podem atuar como vetores e reservatórios de certos patógenos, ou seja, o carrapato tem a capacidade de manter o patógeno presente na natureza, através de várias gerações, por via transovariana (da fêmea para sua progênie) e transtadial (através de fases sucessivas da vida) (Dantas-Torres, 2008).

Em *R. sanguineus*, a transição de um estágio para outro é caracterizada por um período de muda, que necessita de alimentação em seu hospedeiro, ou seja, para essa espécie de carrapato são necessários três hospedeiros até completar a sua fase adulta, sendo esse hospedeiro da mesma espécie ou não, e após a alimentação a muda ocorre no ambiente (Dantas-Torres, 2010). Os ovos de *R. sanguineus*, são pequenos, esféricos e possuem uma coloração marrom escuro. As larvas possuem seis pernas, corpo de pequenas dimensões (cerca de 0,5 mm) e coloração castanho-clara (Estrada-Peña e Bouattour, 2004). O escudo dorsal cobre grande parte do corpo, e o capítulo (é a região anterior do corpo, que é composto pelas quelíceras, pedipalpos e hipostômio) (Sonenshine, 2014) é proporcionalmente maior quando comparado às ninfas e adultos. As larvas apresentam hipostômio com denticúlos finos e palpos relativamente curtos, (esse padrão do hipostômio se repete nas ninfas) adequados à fixação inicial ao hospedeiro. A presença de placas espiraculares (abertura do sistema respiratório) (Sonenshine, 2014; Walker et al, 2003) ainda não é evidente nessa fase (Walker et al., 2000), o que ajuda a diferenciá-las das ninfas. As ninfas apresentam oito pernas, maior tamanho corporal (aprox. 1–1,5 mm) e escudo mais desenvolvido, embora ainda proporcionalmente reduzido quando comparado aos adultos (Dantas-Torres, 2008). O capítulo mantém o formato característico do gênero *Rhipicephalus*, com base retangular e palpos curtos. A ninfa possui placas espiraculares discretas, e sua ornamentação corporal permanece simples. Assim como as larvas, a ninfa não apresenta dimorfismo sexual aparente, sendo morfológicamente indistinguível entre machos e fêmeas nessa fase (Walker et al., 2000). Os adultos apresentam maior complexidade morfológica, com dimorfismo sexual bem evidente. Ambos possuem corpo ovalado, escudo rígido e coloração variando do marrom ao castanho-escuro. As estruturas bucais incluem palpos curtos e hipostômio com denticção disposta em fileiras, adaptado para fixação prolongada no hospedeiro (Dantas-Torres, 2010).

Nas fêmeas, o escudo é pequeno e ocupa apenas a região anterior do dorso, permitindo grande expansão do corpo durante o repasto sanguíneo, podendo aumentar mais de cem vezes o tamanho original quando ingurgitadas. A placa genital é simples e situada na superfície ventral. A ausência de placas adanais é um marcador morfológico importante (Walker et al., 2000). A área anal também apresenta formato simples e sem ornamentação. Os machos possuem escudo cobrindo praticamente toda a superfície dorsal, impedindo grande expansão corporal durante a alimentação. Apresentam placas adanais alongadas, estrutura fundamental para a identificação taxonômica do gênero *Rhipicephalus* (Dantas-Torres, 2008). Na superfície ventral, os machos exibem ornamentação genital e placas acessórias, que estão ausentes nas

fêmeas. Além disso, o macho é geralmente menor que a fêmea não ingurgitada e apresenta coloração mais escura.

Após a alimentação, as fêmeas adultas que se encontram ingurgitadas, e que acabaram de acasalar, se desprendem de seus hospedeiros, para que no ambiente possam digerir o sangue ingerido e realizar a oviposição, porém antes da oviposição a fêmea passa por um período de pré-oviposição, que pode durar entre 3 a 14 dias. Nesse período a fêmea procura um local protegido e com umidade adequada, que garantirá a viabilidade de seus ovos. A oviposição pode durar de 16 a 18 dias, e a fêmea põe cerca de 4000 ovos, mas esse número pode ser ainda maior (Dantas-Torres, 2008).

De acordo com o trabalho realizado por Labruna et al. (2017), um trabalho que verificava-se se havia diferença entre as linhagens tropicais e temperadas de *R. sanguinius*, viu-se que a temperatura ideal para a oviposição e desenvolvimento dos ovos de *R. sanguineus*, é entre 20°C e 30°C. Esse padrão repete-se em fêmeas de ambas as linhagens tropicais e temperadas.

Os ovos são depositados em rachaduras ou fendas geralmente acima do chão, e de preferência próximo ao local onde o hospedeiro descansa (Dantas-Torres, 2010).

O período de incubação dos ovos é de 5 a 8 semanas (41 dias aproximadamente) Labruna et al. (2017), e após a eclosão dos ovos, as larvas que emergem, passam a procurar imediatamente por um hospedeiro, após uma alimentação que pode durar de 3 a 10 dias, as larvas se desprendem do hospedeiro para realizar sua primeira ecdise que pode durar cerca de 5 a 15 dias. Após a ecdise a larva muda para ninfa, que logo sai em busca de um novo hospedeiro. A alimentação de uma ninfa pode durar de 3 a 11 dias, após a alimentação as ninfas se desprendem do hospedeiro para realizar a sua última ecdise e se transformar em adultas. Esse período de muda da ninfa pode durar cerca de 9 a 47 dias (Dantas-Torres, 2008).

A realização de estudos em laboratório mostrou que parâmetros biológicos e ambientais (temperatura, umidade e tipo de hospedeiro) de *R. sanguineus* impactam na oviposição dos ovos e no desenvolvimento do carrapato (Labruna et al, 2017). A sobrevivência das ninfas ocorreu a uma temperatura de 20°C e umidade de 85%. Carrapatos adultos eram mais resistentes do que as ninfas não alimentadas, em condições ambientais desfavoráveis a uma temperatura de 35°C e 35% de umidade. Esse estudo demonstrou que os carrapatos dependem

pouco de condições adequadas de umidade, o que lhes permite dispersar para ambientes desfavoráveis e ainda sim manter seu equilíbrio hídrico (Dantas-Torres, 2008).

A embriogênese de *Rhipicephalus microplus* foi descrita por Santos et al. (2013), que estabeleceram um sistema de estadiamento embrionário composto por 14 estágios, desde as clivagens iniciais até a formação do embrião pré-eclosão. O trabalho de Friesen et al (2015) também estabelece um sistema de estadiamento embrionário, porém, diferente de diferenciar em estágios, Friesen et al, (2015) diferenciou os estágios em dias. Já Campos et al, (2006), descreve os estágios de desenvolvimento até o dia 7, porém o principal foco do trabalho é estabelecer qual a principal fonte de energia utilizada durante o desenvolvimento.

Apesar da ampla literatura sobre a ecologia, taxonomia e competência vetorial de Ixodes, existem uma ampla lacunas no conhecimento sobre o desenvolvimento embrionário, apesar de trabalhos como o de Seixas et al. (2012), Santos (2013), Friesen et al. (2015), Hinne et al., 2025, e entre outros, que tratam sobre o estadiamento embrionário do gênero *Rhipicephalus*, etapa crucial que determina padrões morfogênicos, organização celular e características estruturais iniciais podem variar entre espécies próximas. A compreensão detalhada dos estágios embrionários é fundamental para estudos futuros de biologia do desenvolvimento, genética reprodutiva e possíveis intervenções no ciclo de vida desses ectoparasitas.

Dessa forma, o presente trabalho tem como objetivo fazer uma análise inicial da organização dos núcleos de embriões com 4 e 5 dias de desenvolvimento de *R. linnaei*, fornecendo informações preliminares que possam subsidiar estudos posteriores de estadiamento embrionário e contribuir com o entendimento morfológico e celular dessa espécie recentemente redefinida. A caracterização embrionária pode oferecer subsídios importantes para pesquisas taxonômicas, evolutivas e aplicadas, especialmente no desenvolvimento de estratégias de controle mais precisas e no entendimento integral da biologia desse importante ectoparasita.

OBJETIVOS GERAIS

- Descrever a organização geral dos núcleos do embrião do carrapato *Rhipicephalus linnaei* com 4 e 5 dias de desenvolvimento

OBJETIVO ESPECÍFICO

- Realizar a remoção do córion e a marcação dos núcleos de embriões de *R. linnaei* com DAPI.
- Analisar sob microscopia de fluorescência como ocorre a distribuição dos núcleos de embriões de *R. linnaei* com 4 e 5 dias de desenvolvimento

MATERIAIS E MÉTODOS

Para realização do trabalho, foram utilizadas 9 fêmeas ingurgitadas, que foram adquiridas da empresa TICKS AND FLEAS (tiksandfleas@gmail.com). Após o recebimento das fêmeas, elas foram acomodadas individualmente em frascos coletores universais e mantidas em BOD com temperatura a 27°C e umidade de 80%, com fotoperíodo de 12 horas escuro e claro. Após o início da postura, a coleta dos embriões foi realizada diariamente, e no mesmo horário. Os ovos coletados foram armazenados em microtubos do tipo eppendorf de 2 mL

Para marcação dos núcleos, foi necessário inicialmente realizar a remoção do córion e permeabilização dos embriões. Para a remoção do córion foi seguido o protocolo realizado por Friesen et al.2015.

Os ovos embrionados coletados do dia 0 a 2, passaram por um processo de lixiviação, onde eles foram inicialmente lavados 1 mL de hipoclorito de sódio a 6% por 3 minutos e, após este processo os ovos foram lavados com 500 µL de água destilada 3 vezes. Os ovos coletados do dia 3 a 5 dias de desenvolvimento, também passaram pelo mesmo processo de lixiviação, porém os ovos ficaram imersos por 8 minutos e, lavados com 500 µL de água destilada 3 vezes. Após a lavagem, nos ovos de 3 a 5 dias foi adicionado 1 mL de água destilada em cada eppendorf, que então foi mantida por 3 minutos a 90°C em Banho Maria. Logo após o processo de aquecimento, os tubos foram levados ao gelo por 3 minutos, o que causou um choque térmico e provocou a quebra da casca do ovo, ou a retirada do córion. Em seguida a água foi retirada e então foram adicionadas aos microtubos alíquotas de uma solução bifásica

contendo heptano, DMSO e paraformaldeído a 4% (10:9:1). O material foi então agitado no shaker KLD-350 por 40 minutos a 100 rpm. Os ovos que tiveram o córion removido ficaram na interface entre as duas fases. Após o término da agitação, a fase inferior da solução foi retirada, e então foram adicionados 500 µL de metanol, que também formou uma solução bifásica, e os microtubos foram agitados no vórtex por 30 segundos, para separar completamente o córion do embrião. Em seguida os ovos foram lavados 3 vezes com 500 µL de metanol e armazenados a -20°C.

Para a marcação dos núcleos, foi utilizado o fluorocromo DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol), de acordo com protocolo descrito por Santos, et, al. (2003).

Para realizar a marcação com o DAPI, os ovos que estavam armazenados a -20°C com metanol, foram reidratados quatro vezes com diferentes concentrações decrescentes de metanol e crescentes PBST.

O PBST é uma solução preparada a partir de uma solução tampão de fosfato (PBS) mais 0,1% de Tween-20, para a permeabilização das membranas. Ao todo foram realizados quatro banhos, sendo que o primeiro banho teve uma concentração de 75% de metanol e 25% de PBST, o segundo banho teve uma concentração de 50% de metanol e 50% de PBST, o terceiro banho teve uma concentração 25% de metanol e 75% de PBST, o último banho foi realizada apenas com PBST. Para a marcação, foi utilizada uma pequena alíquota de DAPI, suficiente para cobrir as amostras em cada microtubo, por 30 minutos. Em seguida, os ovos foram lavados 3 vezes com PBST e montados em lâminas contendo meio de montagem com antifading para posterior observação e documentação fotográfica em microscópio de Fluorescência Nikon eclipse Ni.

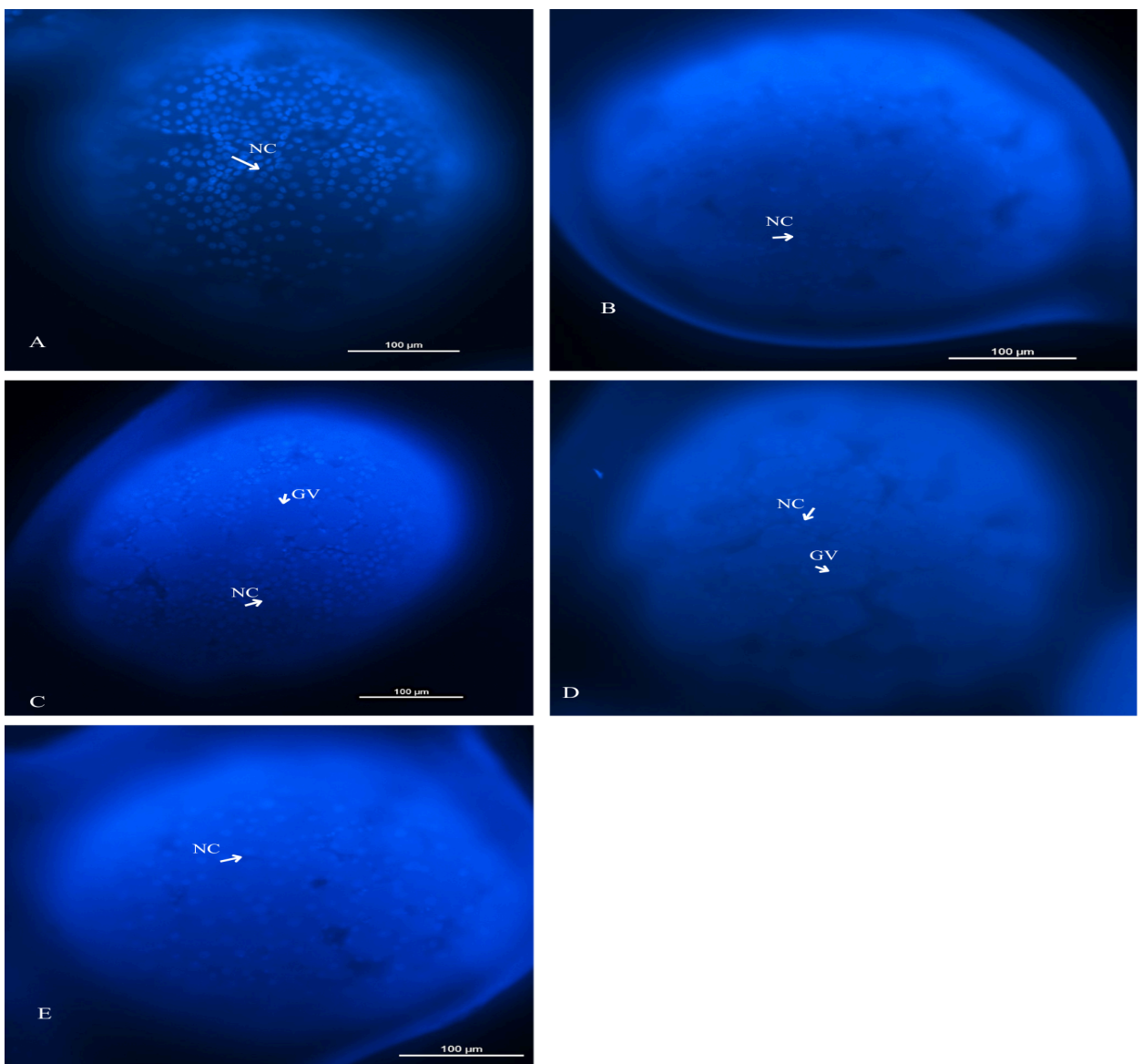
RESULTADOS

Os ovos processados do dia 0 ao dia 3 foram perdidos, pois não mantiveram sua integridade morfológica, sendo assim, não foi possível fazer a análise desses ovos

A análise dos embriões de *R. linnae* de 4 e 5 dias de desenvolvimento, permitiu verificar a organização nuclear ao longo dos estágios embrionários, assim como verificar a eficiência do protocolo na remoção do córion e marcação dos núcleos com DAPI

Em sua maioria, a remoção do córion e a marcação com DAPI ocorreu de forma eficiente como vemos nas figuras 1 e 2. Os embriões analisados demonstraram padrões morfológicos diferentes entre o 4º e o 5º dia de desenvolvimento, principalmente no que diz respeito à quantidade, organização e distribuição dos núcleos.

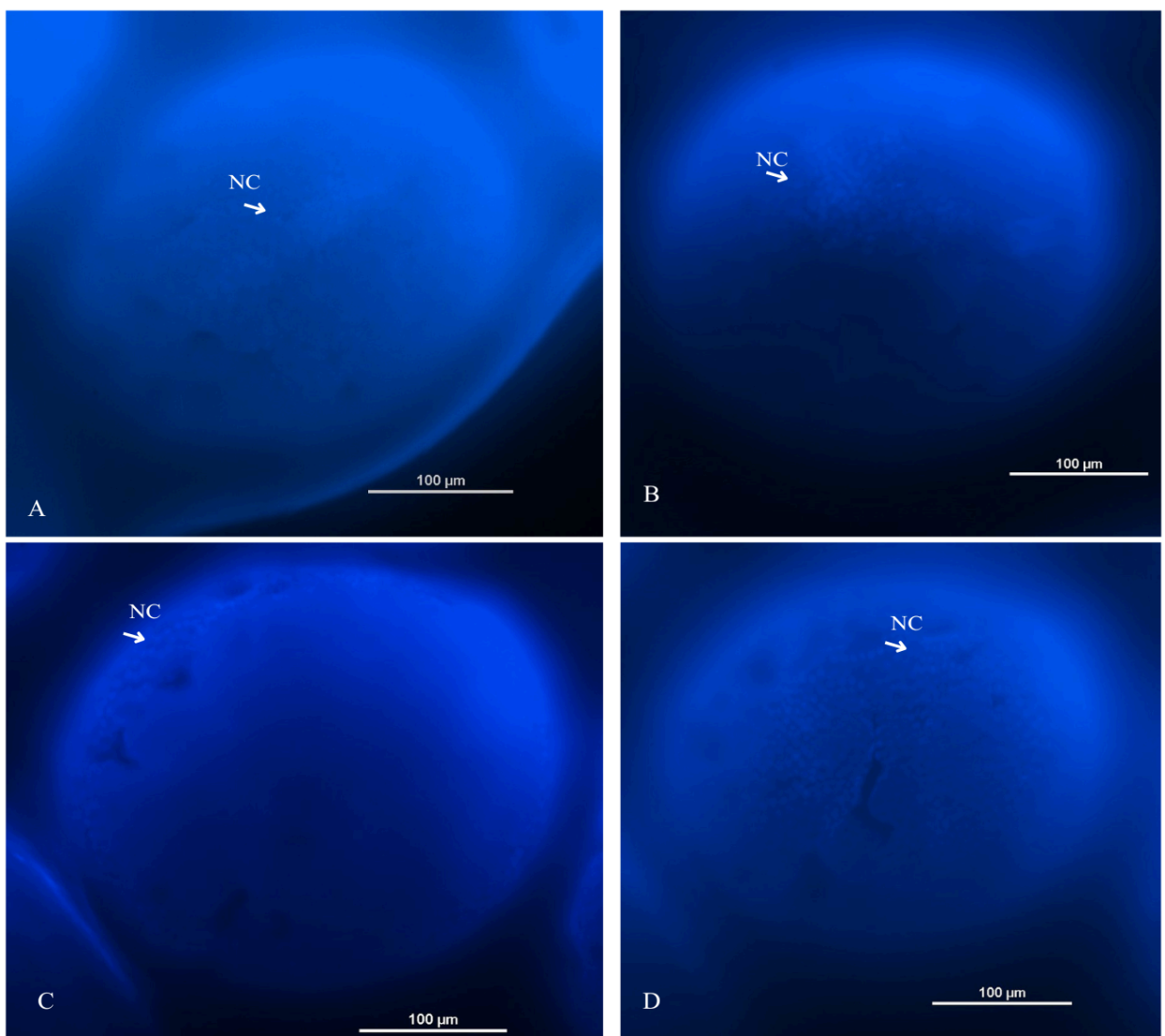
A seguir, são apresentadas as figuras retiradas sob o microscópio de fluorescência e a descrição das principais características observadas para cada dia de desenvolvimento, destacando-se as diferenças na distribuição nuclear, na presença de vitelo e na integridade estrutural dos embriões.



FONTE: Autora, 2015

FIGURA 1: Embriões de *R. linnaei* com 4 dias de desenvolvimento marcados com DAPI, onde é mostrado o NC (núcleo) e GV (grânulo de vitelo), em cada embrião.

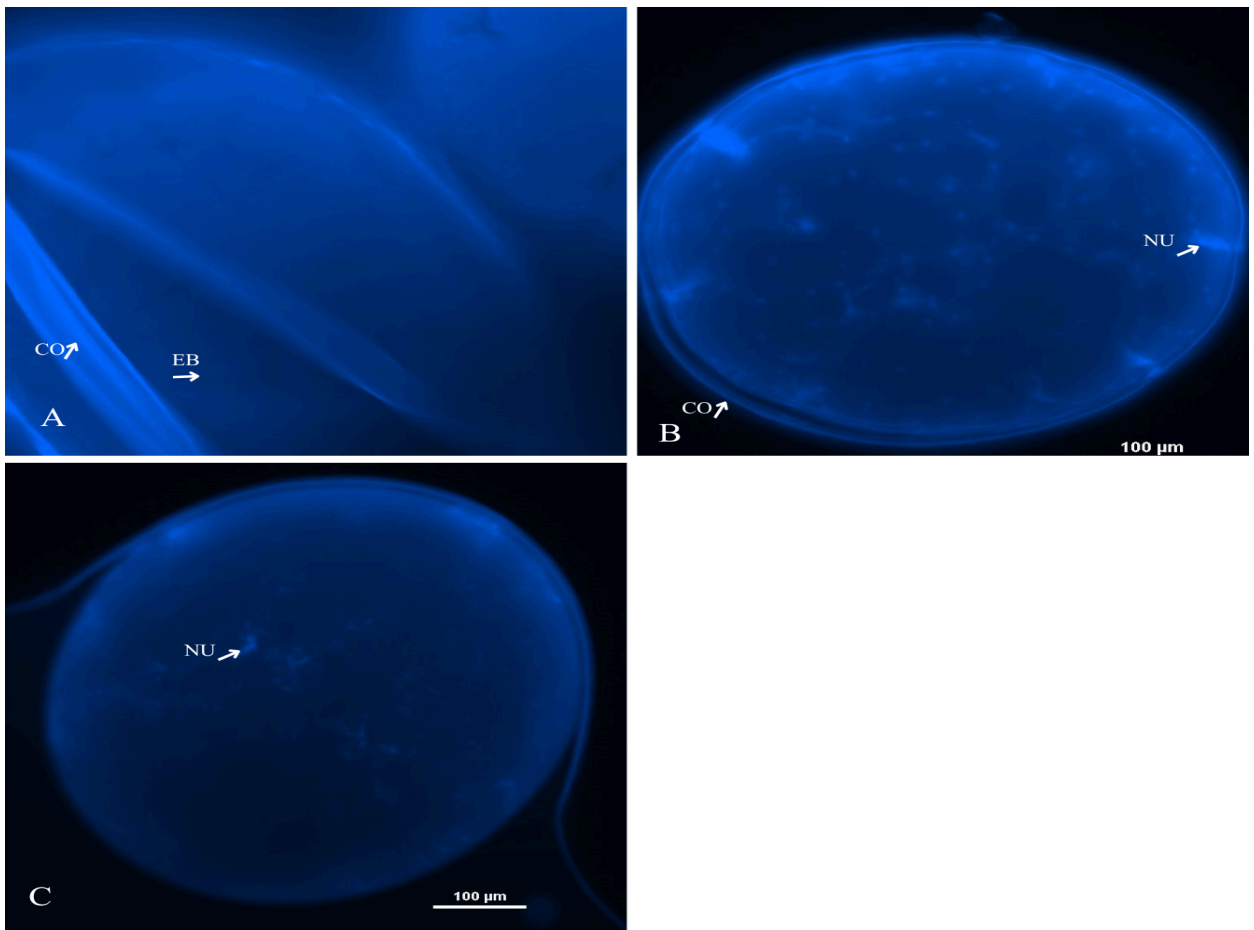
A análise dos embriões do 4º dia de desenvolvimento, mostrou que existe uma grande quantidade de núcleos que estão uniformemente espalhados pelo embrião, e isso é bastante observado nas figuras 1A-E. Em algumas das figuras é possível ver os grânulos de vitelo, como observado nas figuras 1C-D. Observando-se o tamanho dos núcleos é possível ver que eles possuem tamanhos diferentes, sendo uns maiores que outros, essa observação se estende para tamanho e forma dos grânulos de vitelo. Apesar de haver uma grande quantidade de núcleos nos embriões, é possível ver uma diferença na quantidade de núcleos observados entre os embriões, e o mesmo é observado com os grânulos de vitelo.



FONTE: Autora, 2025

FIGURA 2: Embriões de *R. linnaei* com 5 dias de desenvolvimento marcados com DAPI, onde é mostrado o NC (núcleo) de cada embrião.

No 5º dia de desenvolvimento a quantidade de núcleos parece ter aumentado como observado nas figuras 2A-D, porém esses núcleos parecem estar entrando em um estágio de agrupamento como visualizado nas figuras 2A-C. Na figura 2A a concentração de núcleos parece formar uma pequena faixa no centro do embrião, e na figura 2B o acúmulo de núcleos está indicado pela seta, parecendo possuir o formato oval. Porém não foi possível observar os grânulos de vitelo como no 4º dia. Porém como no 4º dia os núcleos aparentam possuir tamanhos diferentes, sendo uns maiores que outros, essas diferenças parecem ocorrer tanto dentro de cada embrião, como entre os embriões, isso é possível de se observar comparando os embriões fotografados 2A-D



FONTE: Autora, 2025

FIGURA 3: Embriões de *R. linnaei* com 4 (B e C) e 5 (A) dias de desenvolvimento, onde é mostrado o EB (embrião), CO (córion), NC (núcleo).

Na figura 3 são observados embriões que tiveram problemas com a remoção do córion, ou com a marcação do DAPI. A figura 3A apresenta um embrião de 5 dias de desenvolvimento, onde não ocorreu a marcação com o DAPI. A figura 3B mostra um

embrião de 4 dias de desenvolvimento, e mostra um embrião que teve o córion rompido, o que permitiu a entrada do DAPI, e marcação do núcleos, mas a essa marcação dos núcleos indica que eles se encontram disformes e mal distribuídos. Já no embrião mostrado na figura 3C, o córion foi completamente removido, porém a marcação com o DAPI, não ocorreu de forma correta, e assim como no embrião da figura 3B, os embriões se encontram disformes e sem uma clara distribuição

DISCUSSÃO

A análise dos embriões de *Rhipicephalus linnaei* com 4 e 5 dias de desenvolvimento revelou padrões compatíveis com o descrito para outros Ixodidae como o de Seixas et al. (2012), Santos (2013), Friesen et al. (2015), Hinne et al., 2025. A diferença de tamanho, quantidade e formato dos núcleos, grânulos de vitelo, provavelmente se deve ao fato do intervalo entre as coletas, que foi de 24h, uma situação já descrita em estudos que analisam séries de oviposição contínua em ixodídeos (Friesen et al., 2016). O embrião coletado logo no início das 24h deve estar mais desenvolvido do que o embrião que foi postado próximo ao momento da coleta seguinte. Porém mesmo com essa ocorrência, é possível ver a existência de um padrão em ambos os dias, como a distribuição de núcleos pelo embrião

Comparando-se com outros artrópodes, observa-se que muitos insetos holometábolos, como *Drosophila melanogaster* apresenta rápida proliferação nuclear (Campos-Ortega e Hartenstein, 1997). Entretanto, a velocidade do desenvolvimento em insetos é notavelmente mais rápida, devido ao metabolismo mais elevado e à menor presença de vitelo, enquanto os carrapatos possuem embriogênese mais lenta e dependente quase inteiramente das reservas vitelínicas (Sonenshine e Roe, 2014).

Ao comparar o desenvolvimento embrionário de *R. linnaei* com o de outros aracnídeos, é possível observar que o estágio inicial do sincício é semelhante ao relatado em carrapatos, com núcleos migrando para a periferia do embrião antes da formação do blastoderma (Miyoshi et al. 2004). Esse padrão, também observado em *R. linnaei* no 4º e 5º dias, sugere que a organização inicial dos núcleos em embriões de quelicerados segue princípios morfogênicos amplamente conservados. Porém em aranhas, a formação da gástrula inicia-se mais cedo, com

movimentos morfogenéticos bem definidos, enquanto em carrapatos esse processo ocorre mais tardiamente, fato já descrito para *R. (Boophilus) microplus* (Santos et al. 2013; Seixas et al. 2012).

Observou-se que no 4º dia de desenvolvimento embrionário, de *R. linnae* havia uma grande quantidade de núcleos, essa distribuição ocorreu de maneira ligeiramente uniforme pelo citoplasma. Comparando com o trabalho de Santos et al, (2013), que trata do carrapato *R. (boophilus) microplus* o desenvolvimento segue o mesmo padrão apresentado no estágio 5, onde existe um grande número de núcleos bem distribuído pelo embrião. Já em comparação com o trabalho de Campos et al, (2006), que também trata do carrapato *R. (boophilus) microplus*, porém ao tratar o estadiamento em dia e não em estágios, como o trabalho de Santos (2013), o desenvolvimento parece seguir o mesmo padrão apresentado no 6º dia de desenvolvimento, ou seja parece que em *R. linnae*, o estágio onde ocorre a grande quantidade de núcleos parece atingir em um período mais cedo. A distribuição de grânulos de vitelo de diferentes tamanhos também condiz com o trabalho de Campo et al, (2006), sugerindo que, assim como em espécies próximas, a redistribuição dessas reservas energéticas ocorre de forma heterogênea conforme avança o desenvolvimento

No 5º dia de desenvolvimento de *R. linnae* houve um acréscimo na quantidade de núcleos, e em alguns embriões já é possível ver um agrupamento desses núcleos. Comparando com o trabalho de Santos et al, (2013), o desenvolvimento do embrião apresenta o mesmo padrão apresentado no estágio 6, e em alguns casos como o apresentado na figura 2C, pode até mesmo estar atingindo o estágio 7, já que a concentração de núcleos, se concentra mais nas bordas do que no centro do embrião. Porém no 5º dia, ainda não é possível ver nenhum tipo de organização morfológica.

A ocorrência de embriões com marcação irregular ou córion apenas parcialmente removido, como observados nas Figuras 3, pode ser um indício de uma limitação técnica do processo de descorionização e permeabilização. Problemas semelhantes já foram relatados por Friesen et al. (2016), que informou que a remoção completa do córion pode variar conforme o estágio do embrião e a adesividade estrutural do córion em determinadas espécies. Estudos como os de Santos et al, (2013) também relatam dificuldades ocasionais de marcação nuclear em

embriões que não tiveram seu córion totalmente removido, o que reforça a necessidade de padronização refinada e repetição experimental.

CONCLUSÃO

O presente estudo permitiu descrever a organização dos núcleos de embriões de *Rhipicephalus linnaei* com 4 e 5 dias de desenvolvimento. No 4º dia, observou-se grande quantidade de núcleos distribuídos de forma relativamente uniforme. No 5º dia, verificou-se aumento no número de núcleos e início de agrupamento, indicando progressão para estágios mais avançados da segmentação.

Apesar de algumas limitações técnicas relacionadas à remoção do córion e à marcação com DAPI, a maioria das amostras apresentou resultados satisfatórios, demonstrando que o protocolo aplicado é adequado para a visualização nuclear em *R. linnaei*.

Os dados obtidos fornecem informações iniciais sobre o desenvolvimento embrionário dessa espécie e servem como base para estudos futuros de estadiamento detalhado. A caracterização embrionária contribui para o entendimento biológico de *R. linnaei*, espécie de importância médica e veterinária, e pode auxiliar no avanço de pesquisas voltadas à taxonomia, biologia do desenvolvimento e estratégias de controle.

BIBLIOGRAFIA

ANDREOTTI, R.; KOLLER, W. W.; GARCIA, M. V. Carrapatos: protocolos e técnicas para estudo. Brasília, DF: Embrapa, 2016

BARBOSA, I. C.; OLIVEIRA, R. P.; FERREIRA, J. M; Ecologia e distribuição de *Rhipicephalus sanguineus* em ambientes urbanos. Revista de Parasitologia Veterinária, v. 26, n. 3, p. 345-352, 2017.

BRITO, L. G.; NETTO, F. G. S.; OLIVEIRA, M. C. S.; BARBIERI, F. S. Bio-ecologia, importância médico-veterinária e controle de carrapatos, com ênfase no carrapato dos bovinos *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Rondônia: Embrapa, 2006.

CAMPOS, E.; MORAES, J.; FAÇANHA, A. R.; MOREIRA, E.; VALLE, D.; ABREU, L.; MANSO, P. P. A.; NASCIMENTO, A.; PELAJÓ-MACHADO, M.; LENZI, H.; MASUDA, A.; VAZ JR, I.; LOGULLO, C. Kinetics of energy source utilization in *Boophilus microplus* (*Canestrini, 1887*) (Acari: Ixodidae) embryonic development. *Veterinary Parasitology*, v. 138, n. 3-4, p. 349-357, 2006.

CAMPOS-ORTEGA, J. A.; HARTENSTEIN, V. *The Embryonic Development of Drosophila melanogaster*. 2. ed. Berlin: Springer, 1997.

DANTAS-TORRES, F; The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille,1806) (Acari: Ixodidae): from taxonomy to control. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, Rio de Janeiro v. 152, n. 3/4, p. 173-185, Apr. 2008.

DANTAS-TORRES, F; Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Parasites & Vectors*, v. 3, n. 26, 2010.

DANTAS-TORRES, F.; OTRANTO, D. *Rhipicephalus sanguineus* (sensu lato) and its role as vector of pathogens. *Veterinary Parasitology*, v. 198, p. 12-23, 2013.

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

ESTRADA-PEÑA, A.; BOUATTOUR, A. *Ticks of Domestic Animals in the Mediterranean Region*. Zaragoza: University of Zaragoza Press, 2004.

ESTRADA-PEÑA, A. *The evolutionary significance of Nuttalliella namaqua*. 2015.

FERREIRA, L. P. SILVA, A. R; Infestações por carrapato-marrom e riscos sanitários em ambientes domésticos. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v. 40, n. 2, p. 85-92, 2018.

FRIESEN, K. J., DIXON, M., LYSYK, T. J. Embryo development and morphology of the rocky mountain wood tick (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology*, v. 53, n. 2, p. 279-289, 2015.

GARCIA, M. V.; MONTEIRO, A. C.; SZABÓ, M. P. J.; PRETTE, N. Eventos externos e internos da infecção de larvas e ninfas de *Rhipicephalus sanguineus* por *Metarhizium anisopliae*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 60, n. 4, p. 855–863, 2008.

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. Early embryonic development in the tick *Ixodes scapularis* suggests syncytial organization and cellularization before blastoderm formation. *EvoDevo*, v. 16, n. 1, p. 4, 2025

HOOGSTRAAL, H.; AESCHLIMANN, A; Tick-host specificity. *Bulletin de la Société Entomologique Suisse*, v. 55, p. 5–32, 1982

MIYOSHI, K; FURUTA, K; Early embryonic development of the spider *Achaearanea tepidariorum*: characterization of the syncytial stages. *Journal of Morphology*, v. 259, p. 1–15, 2004.

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, 2017.

LOULY, C. C. B; FONSECA, I. N; OLIVEIRA, V. F. de; BORGES, L. M. F; OCORRÊNCIA DE *Rhipicephalus sanguineus* EM TRABALHADORES DE CLÍNICAS VETERINÁRIAS E CANIS, NO MUNICÍPIO DE GOIÂNIA, GO. *Ciência Animal Brasileira / Brazilian Animal Science*, Goiânia, v. 7, n. 1, p. 103–106, 2006.

LUZ, H, R; FACCINI, J, L, H; Parasitismo por carrapatos em anuros no Brasil: revisão. *Veterinária e Zootecnia*, v. 30, n. 1, p. 1–15, 2023.

MENDES, T. M.; BALBINO, J. N. F.; SILVA, N. C. T.; FARIAS, L. A. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e *Rhipicephalus sanguineus*: uma revisão sobre as perspectivas, distribuição e resistência. *Pubvet*, v. 13, n. 06, p. 1–9, 29 jun. 2019

PAZ, G. F.; LEITE, R. C.; OLIVEIRA, P. R. Controle de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) no canil da Escola de Veterinária da UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 17, n. 1, p. 41-44, 2008.

Rio Grande do Sul. Secretaria Estadual da Saúde; Centro Estadual de Vigilância em Saúde (CEVS/RS). Guia de Vigilância Acarológica: vetores e hospedeiros da febre maculosa e outras riquetsioses no Rio Grande do Sul. Porto Alegre: CEVS/RS, 112 p; 2018.

SANTOS, V. T.; RIBEIRO, L.; FRAGA, A.; DE BARROS, C. M.; CAMPOS, E.; MORAES, J.; FONTENELE, M. R.; ARAÚJO, H. M.; FEITOSA, N. M.; LOGULLO, C.; NUNES DA FONSECA, R. The embryogenesis of the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: the establishment of a new chelicerate model system. *Genesis*, v. 51, n. 12, p. 803–818, dez. 2013

SEIXAS, A.; OLIVEIRA, P.; TERMIGNONI, C.; LOGULLO, C.; MASUDA, A.; DA SILVA VAZ, I. Jr. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* embryo proteins as target for tick vaccine. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 148, p. 375–381, 2012.

SILVA, M, P, M, da; *Rhipicephalus sanguineus* group (Acari: Ixodida) of Western Iberia Peninsula and Africa: mitochondrial lineages study. 2017. 74 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Ambiente) – Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências, Lisboa, 2017.

ŠLAPETA, J.; HALLIDAY, B.; CHANDRA, S.; ALANAZI, A. D.; ABDEL-SHAFY, S. *Rhipicephalus linnaei* (Audouin, 1826) recognised as the “tropical lineage” of the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato: neotype designation, redescription, and establishment of morphological and molecular reference. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, v. 13, n. 6, p. 102024, nov. 2022.

SONENSHINE, D, E.; ROE, R, M; *Biology of ticks*. 2. ed. New York: Oxford University Press, v. 1. 2014.

WALKER, A. R.; BOUATTOUR, A.; CAMICAS, J. L.; ESTRADA-PEÑA, A.; HORAK, I.; LATIF, A. A.; PEGRAM, R. G.; PRESTON, P. M. *Ticks of Domestic Animals in Africa: A Guide to Identification of Species*. Edinburgh: Bioscience Reports, 2003.

WALKER, A. R.; BOUATTOUR, A.; CAMICAS, J. L.; ESTRADA-PEÑA, A.; HORAK, I. G.; LATIF, A. A.; PEGRAM, R. G.; PRESTON, P. M. Ticks of Domestic Animals: Identification and Biology. Edinburgh: Bioscience Reports, 2014.