

**DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DO CARRAPATO MARROM DO CÃO,  
*Rhipicephalus linnaei* (Audouin, 1826)(*Acari: Ixodidae*), DO DIA 11 AO 15**

**DIANA MILENA VELASQUEZ CAJAMARCA**

Foz do Iguaçu  
2026

**DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DO CARRAPATO MARROM DO CÃO,  
*Rhipicephalus linnaei* (Audouin, 1826)(Acari: Ixodidae), DO DIA 11 AO 15**

**DIANA MILENA VELASQUEZ CAJAMARCA**

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 Ciências Biológicas.

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

Foz do Iguaçu  
2026

DIANA MILENA VELASQUEZ CAJAMARCA

**DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DO CARRAPATO MARROM DO CÃO,  
*Rhipicephalus linnaei* (Audouin, 1826)(Acari: Ixodidae), DO DIA 11 AO 15**

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 Ciências Biológicas.

**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 à minha família, pelo amor, apoio e incentivo que me acompanharam em cada etapa desta caminhada.

## **AGRADECIMENTOS**

À minha família, pelo apoio incondicional, incentivo e compreensão durante todos os momentos da graduação, especialmente nos períodos de maior dificuldade, por estarem presentes mesmo à distância e por me incentivarem a seguir em frente diante dos desafios. Esta conquista também é de vocês, que sempre foram a minha maior fonte de força e motivação.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Pablo Nunes, pela confiança, orientação, disponibilidade e pelos conhecimentos compartilhados ao longo do desenvolvimento deste trabalho. À minha coorientadora, Profa. Dra. Carla Grade, pelas contribuições fundamentais para a realização desta pesquisa.

Aos meus amigos, especialmente aos que conheci ao longo da graduação, pela amizade, pelo companheirismo, pelas conversas, pelos momentos compartilhados, A companhia de vocês tornou essa etapa da minha vida muito mais leve e especial.

## RESUMO

Os carrapatos são ectoparasitas hematófagos de grande importância médica, veterinária e econômica devido à sua capacidade de transmitir diversos agentes patogênicos para animais e seres humanos. Apesar da relevância desses organismos, ainda existem lacunas no conhecimento sobre os eventos morfológicos que ocorrem durante o desenvolvimento embrionário de muitas espécies. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo descrever as principais mudanças morfológicas observadas durante o desenvolvimento embrionário de *Rhipicephalus linnaei* entre o dia 11 ao 15 pós-oviposição. Foram utilizadas fêmeas ingurgitadas mantidas em condições controladas de temperatura e umidade para obtenção dos ovos. Os embriões foram submetidos à remoção do córion, marcação nuclear com 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), microscopia de fluorescência e microscopia eletrônica de varredura (MEV). As análises permitiram acompanhar a articulação progressiva dos apêndices locomotores, a reorganização do quarto par de pernas e a diferenciação gradual das estruturas localizadas na região anterior do embrião. Entre os principais resultados observou-se o aumento da articulação dos três primeiros pares de pernas, a redução progressiva da visualização do quarto par de pernas e o surgimento de estruturas compatíveis com o desenvolvimento do hipostômio nos estágios mais avançados analisados. Os padrões observados mostraram-se semelhantes aos descritos para outras espécies da família Ixodidae, embora diferenças na cronologia de aparecimento de algumas estruturas tenham sido identificadas. Os resultados contribuem para ampliar o conhecimento sobre a embriogênese de *R. linnaei* e permitem ter informações relevantes para futuros estudos relacionados à biologia do desenvolvimento, morfologia comparada e estratégias de controle de carrapatos.

Palavras-chave: Ixodidae; embriogênese; morfogênese; microscopia de fluorescência; microscopia eletrônica de varredura.

## RESUMEN

Las garrapatas son ectoparásitos hematófagos de gran importancia médica, veterinaria y económica debido a su capacidad para transmitir diversos agentes patógenos a animales y seres humanos. A pesar de la relevancia de estos organismos, aún existen vacíos en el conocimiento sobre los eventos morfológicos que ocurren durante el desarrollo embrionario de muchas especies. En este contexto, el presente trabajo tuvo como objetivo describir los principales cambios morfológicos observados durante el desarrollo embrionario de *Rhipicephalus linnaei* entre los días 11 y 15 posteriores a la oviposición. Se utilizaron hembras ingurgitadas mantenidas bajo condiciones controladas de temperatura y humedad para la obtención de los huevos. Los embriones fueron sometidos a la remoción del corion, marcación nuclear con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), microscopía de fluorescencia y microscopía electrónica de barrido. Los análisis permitieron acompañar la articulación progresiva de los apéndices locomotores, la reorganización del cuarto par de patas y la diferenciación gradual de las estructuras localizadas en la región anterior del embrión. Entre los principales resultados se observó un aumento de la articulación de los tres primeros pares de patas, una reducción progresiva de la visualización del cuarto par de patas y la aparición de estructuras compatibles con el desarrollo del hipostoma en los estadios más avanzados analizados. Los patrones observados fueron similares a los descritos para otras especies de la familia Ixodidae, aunque se identifican diferencias en la cronología de aparición de algunas estructuras. Los resultados contribuyen a ampliar el conocimiento sobre la embriogénesis de *R. linnaei* y permiten tener información relevante para futuros estudios relacionados con la biología del desarrollo, la morfología comparada y las estrategias de control de garrapatas.

**Palabras clave:** Ixodidae; embriogénesis; morfogénesis; microscopía de fluorescencia; microscopía electrónica de barrido.

## ABSTRACT

Ticks are hematophagous ectoparasites of considerable medical, veterinary, and economic importance due to their ability to transmit a wide range of pathogens to animals and humans. Despite their relevance, significant gaps remain in the understanding of the morphological events that occur during the embryonic development of many tick species. In this context, the present study aimed to describe the main morphological changes observed during the embryonic development of *Rhipicephalus linnaei* between the 11th and 15th days post-oviposition. Engorged females were maintained under controlled temperature and humidity conditions for egg collection. The embryos were subjected to chorion removal, nuclear staining with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), fluorescence microscopy, and scanning electron microscopy. The analyses allowed the observation of the progressive articulation of the locomotory appendages, the reorganization of the fourth pair of legs, and the gradual differentiation of structures located in the anterior region of the embryo. Among the main findings, an increase in the articulation of the first three pairs of legs, a progressive reduction in the visibility of the fourth pair of legs, and the appearance of structures compatible with the development of the hypostome in the most advanced stages analyzed were observed. The patterns identified were similar to those described for other species of the family Ixodidae, although differences in the timing of the appearance of certain structures were detected. These findings contribute to expanding the current knowledge of the embryogenesis of *Rhipicephalus linnaei* and provide relevant information for future studies involving developmental biology, comparative morphology, and tick control strategies.

**Keywords:** Ixodidae; embryogenesis; morphogenesis; fluorescence microscopy; scanning electron microscopy.

## SUMÁRIO

|                                                                    |    |
|--------------------------------------------------------------------|----|
| <b>1.INTRODUÇÃO</b>                                                |    |
| 1.1 TAXONOMIA DOS CARRAPATOS.....                                  | 12 |
| 1.2 CARACTERÍSTICAS GERAIS DAS FAMÍLIAS IXODIDAE E ARGASIDAE.....  | 13 |
| 1.3 CICLO DE VIDA DOS CARRAPATOS.....                              | 15 |
| 1.4 BIOLOGIA E CICLO DE VIDA DE <i>Rhipicephalus linnaei</i> ..... | 15 |
| 1.5 IMPORTÂNCIA MÉDICA, VETERINÁRIA E ECONÔMICA.....               | 18 |
| 1.6 MORFOLOGIA DE <i>Rhipicephalus linnaei</i> .....               | 19 |
| 1.7 DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO EM CARRAPATOS.....                 | 22 |
| <b>2.JUSTIFICATIVA</b> .....                                       | 24 |
| <b>3.OBJETIVOS</b> .....                                           | 25 |
| 3.1 OBJETIVO GERAL.....                                            | 25 |
| 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....                                     | 25 |
| <b>4.METODOLOGIA</b> .....                                         | 25 |
| 4.1 ORIGEM DOS ESPÉCIMES.....                                      | 25 |
| 4.2 REMOÇÃO DO CÓRION.....                                         | 27 |
| 4.3 MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA.....                              | 27 |
| 4.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....                       | 28 |
| <b>5.RESULTADOS</b> .....                                          | 29 |
| 5.1 DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO NO DIA 11.....                     | 29 |
| 5.2 DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO NO DIA 12.....                     | 31 |
| 5.3 DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO NO DIA 13.....                     | 33 |
| 5.4 DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO NO DIA 14.....                     | 35 |
| 5.5 DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO NO DIA 15.....                     | 37 |
| <b>6. DISCUSSÃO</b> .....                                          | 39 |
| <b>7. CONCLUSÕES</b> .....                                         | 43 |
| <b>8. REFERÊNCIAS</b> .....                                        | 45 |

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Taxonomia dos carrapatos

Os Carrapatos são artrópodes, ectoparasitas e hematófagos, o que significa que eles dependem do sangue de um hospedeiro, neste caso organismos vertebrados, para se alimentar e completar seu ciclo de vida. Dessa forma eles se tornam vetores que podem transmitir diversos patógenos como bactérias e vírus, tanto para animais como para seres humanos, sendo seu estudo de grande relevância médica, veterinária e econômica.

Os carrapatos pertencem ao filo Arthropoda, grupo que reúne organismos amplamente conhecidos, como insetos, crustáceos, aranhas e escorpiões. Dentro desse filo, os carrapatos são classificados no subfilo Chelicerata, caracterizado pela presença de quelíceras, estruturas especializadas que participam da fixação e alimentação desses organismos (Brusca e Brusca, 2007).

No contexto da classificação taxonômica, os carrapatos pertencem ao Subfilo Chelicerata, Classe Arachnida e Ordem Ixodida (Nava et al., 2017). Atualmente, a ordem Ixodida é composta por três famílias existentes: Argasidae, Ixodidae e Nuttalliellidae. A família Argasidae compreende os chamados “carrapatos moles”, representados pelos gêneros *Ornithodoros*, *Argas*, *Otobius*, *Antricola* e *Nothoaspis*. A família Ixodidae, conhecida como “carrapatos duros”, apresenta maior diversidade de espécies e inclui gêneros de grande relevância médica e veterinária, como *Ixodes*, *Rhipicephalus*, *Amblyomma* e *Dermacentor*. Já a família Nuttalliellidae possui apenas uma espécie descrita, *Nuttalliella namaqua*, caracterizada por apresentar particularidades morfológicas que a distinguem das demais famílias de carrapatos (Nava et al., 2017).

Entre os gêneros pertencentes à família Ixodidae, *Rhipicephalus* destaca-se pela ampla distribuição geográfica e pela importância epidemiológica de diversas espécies. Tradicionalmente, *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* (Latreille, 1806) era considerado uma única espécie cosmopolita associada principalmente a cães domésticos. Entretanto, estudos morfológicos e moleculares demonstraram que esse táxon representa um complexo de espécies distintas (Slapeta et al., 2022).

Nesse contexto, a linhagem tropical anteriormente denominada *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* passou a ser reconhecida formalmente como *Rhipicephalus linnaei* (Audouin, 1826). A redefinição taxonômica proposta por Slapeta et al. (2022), baseada em evidências morfológicas e moleculares, permitiu o estabelecimento de um neótipo para a espécie, garantindo maior estabilidade na nomenclatura e consolidando *R. linnaei* como um táxon válido dentro do complexo *R. sanguineus*.

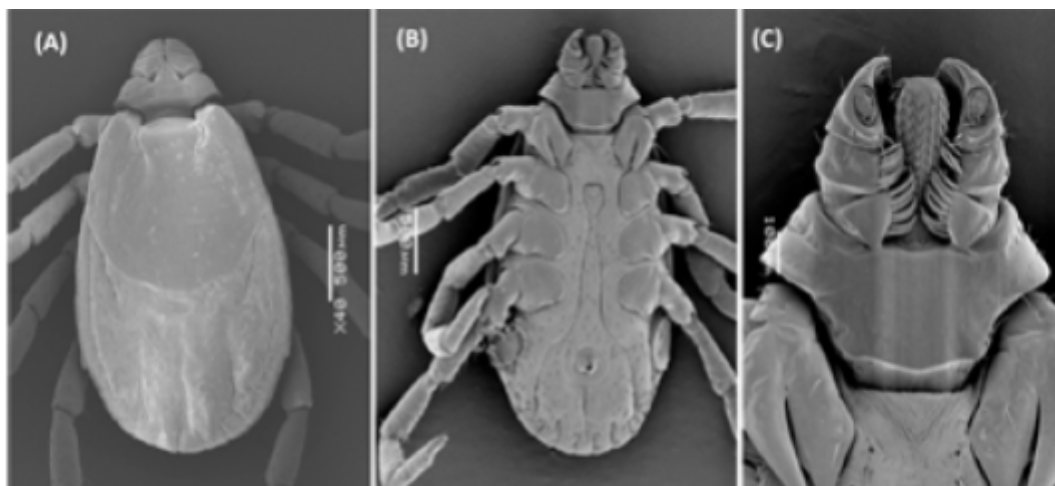
## 1.2 Características gerais das famílias Ixodidae e Argasidae

O conhecimento das diferenças morfológicas e biológicas entre as famílias Ixodidae e Argasidae é fundamental para compreender a diversidade dos carrapatos e suas adaptações evolutivas. Embora pertençam à mesma ordem, esses grupos apresentam características distintas relacionadas à morfologia, alimentação e ciclo de vida (Nava et al., 2017).

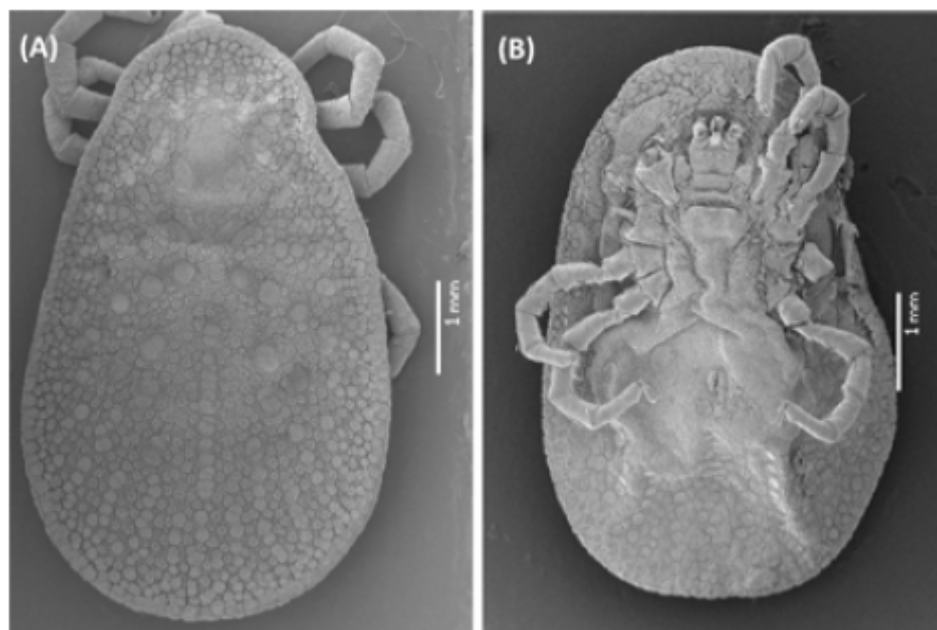
Os representantes da família Ixodidae, popularmente conhecidos como “carrapatos duros”, possuem como característica morfológica evidente a presença de um escudo dorsal esclerosado que protege a superfície do corpo. Além disso, apresentam dimorfismo sexual evidente nos indivíduos adultos. Nessa família, o gnátossoma, que é uma estrutura formada pela base do capítulo e pelas peças bucais, localiza-se na região anterior do corpo e pode ser observado em vista dorsal. Também apresentam festões, que são pequenas divisões delimitadas por sulcos na região posterior do corpo, além de placas espiraculares associadas ao sistema respiratório. Nas fêmeas, observa-se ainda a presença de áreas porosas localizadas na base do capítulo (Slapeta et al., 2022), (Figura 1).

As peças bucais dos ixodídeos são altamente especializadas para a fixação e alimentação no hospedeiro. O hipostômio apresenta dentes voltados para trás que auxiliam na ancoragem à pele, enquanto as quelíceras participam da perfuração dos tecidos. Os palpos possuem função sensorial e auxiliam na exploração do ambiente. No primeiro par de pernas encontra-se o órgão de Haller, uma estrutura sensorial que pode detectar calor, dióxido de carbono e vibrações, desempenhando um papel importante na localização dos hospedeiros. Devido às suas características morfológicas, esse órgão também apresenta relevância para estudos taxonômicos (Caetano et al., 2017; Leonovich, 2021).

Por outro lado, os representantes da família Argasidae são conhecidos como “carrapatos moles” por não possuírem escudo dorsal esclerosado. Diferentemente dos ixodídeos, apresentam corpo mais flexível e não exibem dimorfismo sexual evidente. O gnatossoma localiza-se na região ventral do corpo e não pode ser observado em vista dorsal. Além disso, não apresentam festões, áreas porosas nem placas espiraculares semelhantes às observadas nos Ixodidae (Nava et al., 2017) (Figura 2).



**Figura 1:** Micrografia eletrônica da morfologia geral dos carrapatos Ixodídeos, A. Vista dorsal, B. vista ventral, C. Peças bucais  
Fonte: Nava et al. (2017)



**Figura 2:** Micrografia eletrônica da morfologia geral dos carrapatos Argasídeos, (A) Vista dorsal, (B) vista ventral  
Fonte: Nava et al. (2017)

### 1.3 Ciclo de vida dos carrapatos

O ciclo de vida dos carrapatos compreende quatro estágios principais: ovo, larva, ninfa e adulto. Entretanto, a duração de cada fase, o número de hospedeiros utilizados e os hábitos alimentares podem variar entre as diferentes famílias e espécies (Nava et al., 2017).

Nos representantes da família Argasidae, o ciclo de vida inclui os estágios de ovo, larva, múltiplos estágios ninfais e adulto. A alimentação ocorre de forma rápida, principalmente nas fases de ninfa e adulto, que permanecem sobre o hospedeiro por minutos ou poucas horas antes de se desprenderem. Além disso, muitas espécies apresentam elevada resistência à privação alimentar, podendo sobreviver por longos períodos sem se alimentar. A cópula geralmente ocorre fora do hospedeiro, no ambiente (Nava et al., 2017).

Por sua vez, os carrapatos da família Ixodidae apresentam apenas um estágio ninfal entre a fase larval e adulta. Nesse grupo, a alimentação é prolongada e pode durar vários dias. Após o repasto sanguíneo, os indivíduos desprendem-se do hospedeiro para realizar a muda ou a oviposição no ambiente. Dependendo da espécie, o ciclo pode envolver um, dois ou três hospedeiros diferentes ao longo do desenvolvimento (Dantas-Torres, 2010).

Nos ciclos monoxenos, todas as fases parasitárias ocorrem em um único hospedeiro. Nos ciclos dioxenos, larvas e ninfas utilizam um primeiro hospedeiro, enquanto os adultos alimentam-se em um segundo. Já nos ciclos trioxenos, cada estágio parasitário utiliza um hospedeiro diferente, tendo períodos de vida livre no ambiente entre as mudas (Nava et al., 2017).

Entre os ixodídeos, *R. linnaei* apresenta ciclo trioxeno e constitui uma das espécies de maior importância veterinária associadas aos cães domésticos, sendo suas características biológicas descritas na seção seguinte (Nava et al., 2017).

### 1.4 Biologia e ciclo de vida de *Rhipicephalus linnaei*

Antes da revisão taxonômica do complexo *R. sanguineus*, grande parte dos estudos sobre biologia, morfologia e desenvolvimento embrionário foi realizada utilizando a denominação *R. sanguineus* ou *R. sanguineus sensu lato*. Somente após estudos

morfológicos e moleculares mais recentes, *R. linnaei* passou a ser reconhecido como uma espécie distinta dentro desse complexo. Assim, ao longo desta revisão bibliográfica, optou-se por manter a nomenclatura originalmente utilizada pelos autores das publicações citadas. Entretanto, ao descrever os resultados obtidos no presente trabalho, utiliza-se a denominação *R. linnaei*, por se tratar da espécie analisada neste estudo.

*R. sanguineus*, popularmente conhecido como carrapato marrom do cão, é uma espécie pertencente à família Ixodidae amplamente distribuída em regiões tropicais e subtropicais. Trata-se de um carrapato de grande importância veterinária, associado principalmente a cães domésticos (Dantas-Torres, 2008) embora possa ocasionalmente parasitar outros mamíferos, aves e até mesmo seres humanos (Estrada-Peña e Jongejan, 1999).

Assim como outros ixodídeos, *R. sanguineus* apresenta um ciclo de vida dividido em uma fase parasitária e uma fase não parasitária. Durante a fase parasitária, o carrapato permanece fixado ao hospedeiro para se alimentar de sangue. Já na fase não parasitária, os processos de muda, reprodução, oviposição e desenvolvimento embrionário ocorrem no ambiente (Dantas-Torres, 2010), (Figura 3).

Após a alimentação, as larvas e ninfas desprendem-se do hospedeiro e retornam ao ambiente para realizar a muda para o estágio seguinte. Os adultos também se alimentam sobre o hospedeiro, onde ocorre o acasalamento, e posteriormente as fêmeas ingurgitadas desprendem-se para realizar a postura dos ovos (Jongejan & Uilenberg, 2004).

Durante a fase adulta, a fêmea fixa-se ao hospedeiro e inicia a ingestão de sangue, obtendo os nutrientes necessários para a produção dos ovos. À medida que a alimentação avança, ocorre um aumento significativo do volume corporal, sendo então denominada “fêmea ingurgitada” aquela repleta de sangue. A ingestão sanguínea desempenha papel fundamental no processo reprodutivo, estimulando a espermatogênese nos machos e a ovogênese nas fêmeas (Dantas-Torres, 2010).

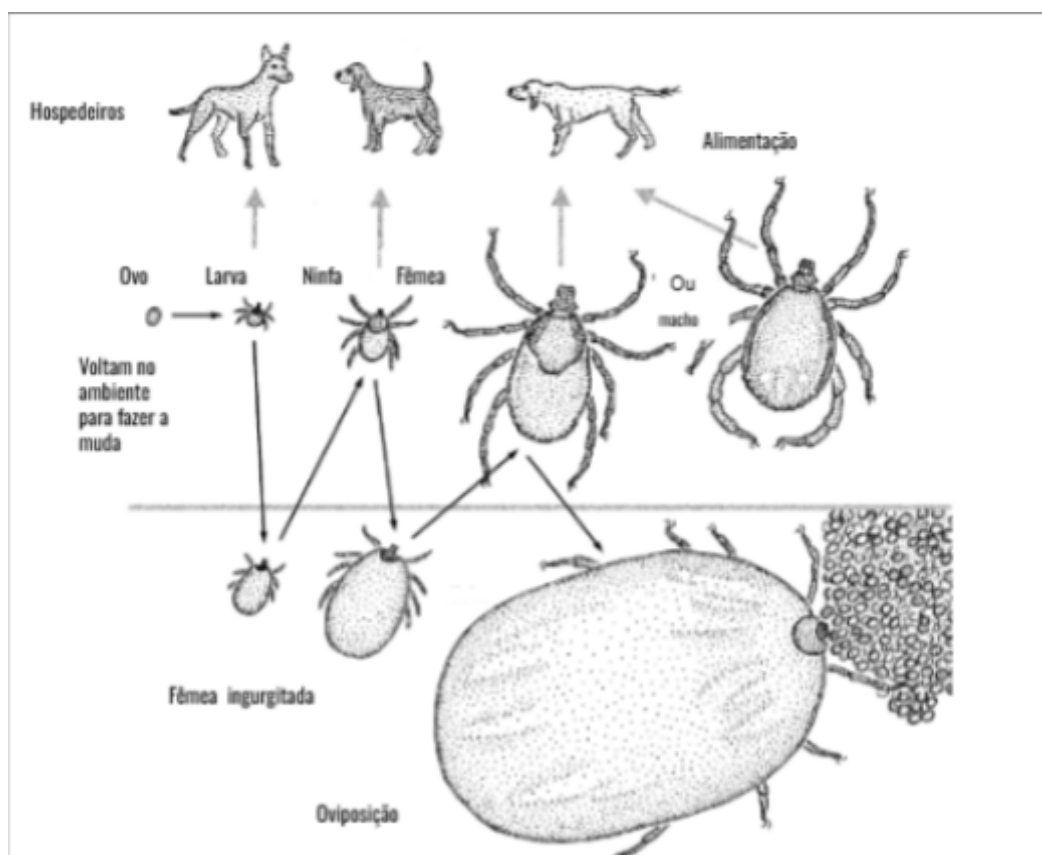
Em condições naturais, as fêmeas adultas costumam se desprender dos cães principalmente durante o período noturno (Paz et al., 2008). Após deixarem o hospedeiro, procuram locais protegidos, como fendas em paredes, frestas em

construções, rochas ou áreas próximas à superfície do solo, onde iniciam a oviposição. Esse processo pode durar várias semanas, período durante o qual cada fêmea é capaz de depositar aproximadamente 1.500 a 4.000 ovos (Koch, 1982 apud Dantas-Torres, 2010).

Os ovos de *R. sanguineus* apresentam formato arredondado e coloração marrom-escuro. Após o período de incubação, ocorre a eclosão das larvas, que medem aproximadamente 0,5 mm de comprimento e possuem apenas três pares de pernas.. Após a eclosão, as larvas precisam de um período para o endurecimento do exoesqueleto antes de iniciarem a busca por um hospedeiro novo (Dantas-Torres, 2010).

As larvas permanecem alimentando-se por um período que pode variar de três a dez dias. Após completarem o repasto sanguíneo, desprendem-se do hospedeiro e retornam ao ambiente, onde realizam a muda para o estágio ninfal. As ninfas já apresentam quatro pares de pernas, característica típica dos aracnídeos, e possuem morfologia semelhante à dos adultos, embora ainda não apresentem maturidade sexual. Após uma nova alimentação e posterior muda no ambiente, ocorre a formação dos adultos, completando o ciclo biológico da espécie (Dantas-Torres, 2008).

Antes da eclosão das larvas, os embriões passam por uma série de transformações celulares e morfológicas que ocorrem no interior dos ovos. Essas alterações são responsáveis pela formação das estruturas corporais observadas nos estágios posteriores do desenvolvimento e constituem a embriogênese da espécie, tema central do presente estudo.



**Figura 3:** Ciclo de vida de 3 hospedeiros para carrapatos Ixodídeos  
 Fonte: Adaptado de (Barker; Walker, 2014)

### 1.5 Importância biológica e veterinária de *R. linnaei*

*R. sanguineus* apresenta elevada capacidade de adaptação a diferentes condições ambientais de temperatura e umidade. Estudos demonstram que essa espécie pode completar seu ciclo de vida em uma ampla faixa de condições climáticas, apresentando elevadas taxas de sobrevivência e potencial para produzir várias gerações ao longo do ano (Dantas-Torres, 2008; Louly et al., 2007). Além disso, fatores ambientais como temperatura e fotoperíodo influenciam diretamente o sucesso da muda, a sobrevivência dos estágios não alimentados e a ocorrência de diapausa comportamental, contribuindo para a ampla distribuição geográfica da espécie (Labruna et al., 2017).

Devido ao seu hábito hematófago, *R. sanguineus* possui grande importância veterinária e em saúde pública. Além dos danos diretos causados pela alimentação, como lesões cutâneas, irritação e anemia em infestações intensas, essa espécie

atua como vetor de diversos agentes patogênicos. Em cães, destaca-se a transmissão de microrganismos como *Ehrlichia canis*, *Babesia canis* e *Hepatozoon canis*, associados a doenças de importância clínica. (Dantas-Torres, 2015). Além disso, *R. sanguineus* pode participar da transmissão de bactérias do gênero *Rickettsia*, responsáveis por diferentes formas de febre maculosa em humanos (Piotrowski e Rymaszewska, 2020).

Observações indicam que algumas raças de cães podem ser mais vulneráveis à infestação por *R. sanguineus*. Louly et al. 2007 observaram que cães da raça Cocker Spaniel Inglês apresentaram uma quantidade significativamente maior de carrapatos adultos em comparação com cães sem raça definida. Essas evidências sugerem que fatores genéticos ou morfológicos podem influenciar a preferência do carrapato pelo hospedeiro e que são importantes mais estudos para confirmar essas relações (Dantas-Torres, 2008).

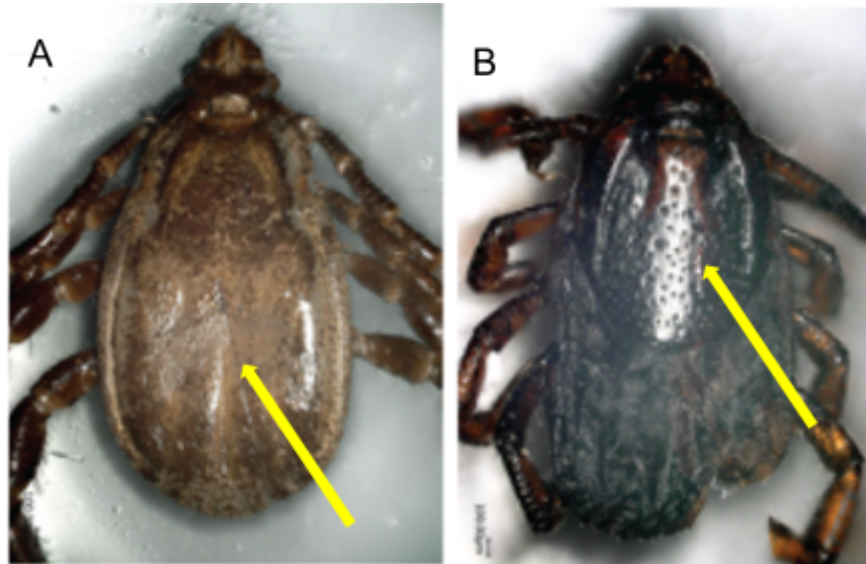
A ampla distribuição geográfica, a estreita associação com cães e sua relevância epidemiológica fazem de *R. linnaei* uma das espécies de carrapatos mais estudadas em ambientes urbanos e periurbanos. Entretanto, apesar da importância biológica e sanitária da espécie, aspectos relacionados ao seu desenvolvimento embrionário permanecem menos conhecidos quando comparados a outras etapas do ciclo de vida.

### 1.6 Morfologia de *R. linnaei*

A morfologia de *R. sanguineus* apresenta características que permitem sua identificação e diferenciação em relação a outras espécies de carrapatos. Como membro da família Ixodidae, possui corpo ovalado e achatado dorsoventralmente, além de um escudo dorsal esclerosado que confere proteção ao organismo (Figura 4). Outra característica marcante da espécie é a presença de uma base do capítulo com formato hexagonal (Figura 5) frequentemente utilizada como critério de identificação taxonômica (Dantas-Torres, 2008; Walker et al., 2000).

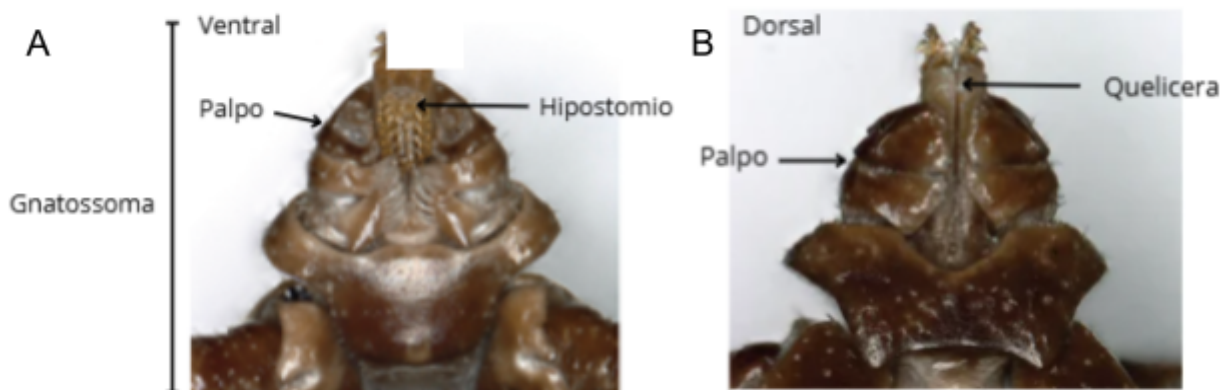
Os indivíduos adultos apresentam dimorfismo sexual. Os machos possuem corpo mais estreito e alongado, com o escudo dorsal cobrindo praticamente toda a superfície do dorso. Já as fêmeas apresentam corpo mais largo e arredondado, e o escudo ocupa apenas a região anterior do corpo, permitindo a expansão abdominal

durante a alimentação sanguínea. Essa característica possibilita que as fêmeas aumentem significativamente de tamanho durante o ingurgitamento, processo essencial para a produção dos ovos (Nava et al., 2017; Šlapeta et al., 2022).



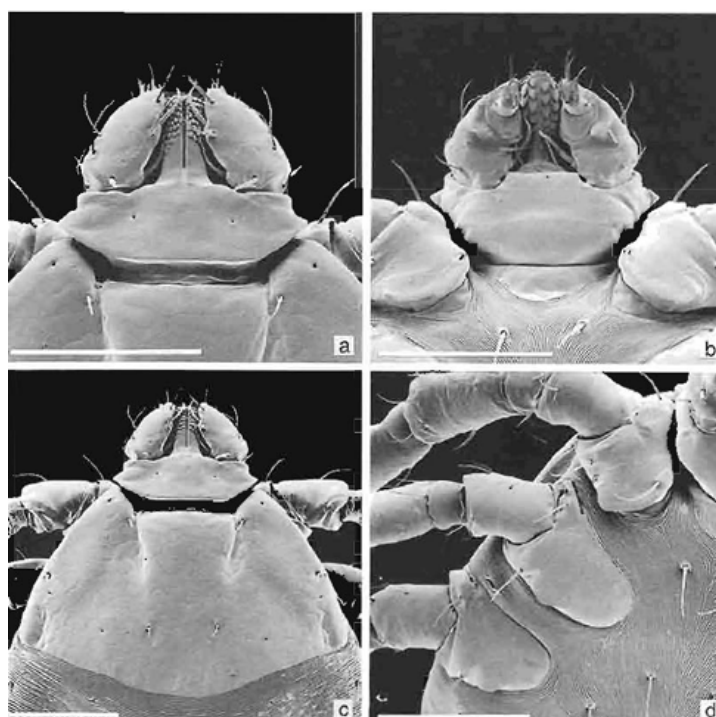
**Figura 4:** Morfologia geral de *R. sanguineus*, (A) Macho, (B) Fêmea. As setas indicam o escudo dorsal, que cobre praticamente todo o dorso do macho e apenas a região anterior da fêmea, caracterizando o dimorfismo sexual. Fonte: Šlapeta et al., 2022

As peças bucais são formadas por estruturas especializadas para fixação e alimentação no hospedeiro. Os palpos são curtos, o hipostômio apresenta dentículos voltados para trás que auxiliam na ancoragem à pele, e as quelíceras participam da perfuração dos tecidos. Além disso, os carrapatos apresentam quatro pares de pernas nos estágios de ninfa e adulto, sendo cada perna constituída por sete artigos: coxa, trocânter, fêmur, patela, tíbia, metatarso e tarso, a espécie apresenta olhos laterais e placas espiraculares associadas ao sistema respiratório, características comuns entre os ixodídeos (Walker et al., 2000).



**Figura 5:** Peças bucais, base do capítulo com formato hexagonal. (A) vista ventral, (B) vista dorsal. Fonte: Šlapeta et al., 2022

Ao longo do ciclo de vida, a morfologia varia de acordo com o estágio de desenvolvimento. Os ovos apresentam formato arredondado e coloração marrom-escuro. As larvas recém-eclodidas possuem aproximadamente 0,5 mm de comprimento e apresentam apenas três pares de pernas, característica que as distingue dos demais estágios (Figura 6). Após a alimentação e a muda, originam-se as ninfas, que já apresentam quatro pares de pernas e morfologia semelhante à dos adultos, embora ainda não possuam maturidade sexual. Finalmente, após uma nova muda, surgem os indivíduos adultos, sexualmente diferenciados e aptos para reprodução (Dantas-Torres, 2008).



**Figura 6:** Ninfas de *R. sanguineus*. A) capitulo, vista dorsal; B) capitulo, vista ventral; C) escudo; D) 3 pares de pernas.  
Fonte: Walker et al., 2000

O conhecimento das características morfológicas dos diferentes estágios de desenvolvimento é fundamental para estudos relacionados à biologia e à embriogênese da espécie, uma vez que muitas das estruturas observadas nos indivíduos adultos começam a ser formadas ainda durante o desenvolvimento embrionário.

### 1.7 Desenvolvimento embrionário em carrapatos

A embriogênese é o processo pelo qual um ovo fertilizado se desenvolve até formar uma larva completamente estruturada. Durante esse período ocorrem sucessivas divisões celulares, diferenciação dos tecidos e organização progressiva das estruturas corporais do embrião, resultando na formação do organismo antes da eclosão (Friesen et al., 2015).

Além dos fatores intrínsecos ao embrião, condições ambientais também podem influenciar o desenvolvimento embrionário dos carrapatos. A temperatura e a umidade relativa desempenham papel importante na velocidade do desenvolvimento, na viabilidade dos ovos e no momento da eclosão larval. Dessa forma, os estudos embriológicos contribuem não apenas para a compreensão dos mecanismos do desenvolvimento, mas também para o entendimento dos efeitos ambientais sobre o crescimento embrionário e para análises comparativas relacionadas à evolução e à morfologia dos artrópodes (Friesen et al., 2015).

Entre os estudos mais relevantes sobre o desenvolvimento embrionário de carrapatos destaca-se o trabalho de Santos et al. (2013), para a espécie *Rhipicephalus microplus*. Nas primeiras 24 horas de desenvolvimento embrionário descritas neste trabalho, as divisões celulares ocorrem no interior do vitelo e um pequeno número de núcleos pode ser observado na periferia do ovo. Com o avanço do desenvolvimento, ocorre um aumento progressivo do número de células e a formação do blastoderma, caracterizado pela distribuição celular ao longo da superfície embrionária.

Posteriormente, é observado o surgimento de um acúmulo celular em uma região específica do ovo, estrutura que dará origem à futura banda germinativa. À medida que o desenvolvimento prossegue, ocorre a organização dos eixos corporais, seguida pela diferenciação do embrião e pela articulação gradual dos apêndices e demais estruturas que formarão a larva. Esses eventos constituem questões importantes para o estabelecimento do plano corporal dos carrapatos (Santos et al., 2013).

Utilizando esse sistema de estadiamento como referência, Friesen et al. (2015) investigaram o desenvolvimento embrionário de *Dermacentor andersoni* por meio de

microscopia de fluorescência e microscopia eletrônica de varredura. Durante o desenvolvimento embrionário de *D. andersoni*, Friesen et al. (2015) observaram a formação e extensão da banda germinativa, seguida pela diferenciação dos futuros segmentos corporais e pelo surgimento dos primórdios das peças bucais e dos apêndices locomotores. Com o avanço da embriogênese, os autores descreveram a retração da banda germinativa, a fusão progressiva dos segmentos corporais e a diferenciação das estruturas que irão compor o idiossoma e o capítulo da larva.

Nos estágios mais avançados do desenvolvimento, foram observados eventos como o fechamento dorsal do embrião, a especialização das peças bucais, a diferenciação dos artigos das pernas e o aparecimento de estruturas sensoriais, incluindo o órgão de Haller. Ao final do processo embrionário, todas as estruturas externas da larva encontravam-se formadas e organizadas em sua posição definitiva, antecedendo a eclosão (Friesen et al., 2015).

Mais recentemente, Hinne et al. (2025) descreveram o desenvolvimento embrionário de *Ixodes scapularis*, propondo um sistema de estadiamento composto por 16 estágios. O estudo ampliou o conhecimento sobre os eventos iniciais da embriogênese em carrapatos e utilizou como referência os sistemas previamente desenvolvidos por Santos et al. (2013) e Friesen et al. (2015), permitindo comparações entre diferentes representantes da família Ixodidae.

Durante o desenvolvimento de *I. scapularis*, Hinne et al. (2025) descreveram eventos semelhantes aos observados em outras espécies de carrapatos, incluindo a formação do blastoderma, o desenvolvimento da banda germinativa, a segmentação corporal e a diferenciação progressiva das estruturas cefálicas e locomotoras. Os autores também relataram a extensão e posterior retração do quarto par de pernas durante os estágios avançados da embriogênese, bem como a diferenciação gradual do hipostômio, dos palpos e das quelíceras até a formação completa da larva.

Os resultados obtidos por Santos et al. (2013), Friesen et al. (2015) e Hinne et al. (2025) demonstram que os principais eventos morfogenéticos são amplamente conservados entre diferentes espécies de Ixodidae. Dessa forma, os sistemas de estadiamento propostos por esses autores constituem importantes ferramentas para estudos comparativos sobre desenvolvimento embrionário, biologia do

desenvolvimento e evolução dentro da ordem Ixodida.

No âmbito da linha de pesquisa sobre o desenvolvimento embrionário de *Rhipicephalus linnaei* desenvolvida na Universidade Federal da Integração Latino-Americana (UNILA), estudos anteriores descreveram o desenvolvimento embrionário de *R. linnaei* entre o 1º e o 10º dia pós-oviposição, caracterizando os principais eventos morfológicos observados durante esse período inicial da embriogênese. O presente trabalho dá continuidade a essa linha de pesquisa ao investigar os eventos morfológicos observados entre o 11º e o 15º dia do desenvolvimento embrionário da espécie.

## 2. JUSTIFICATIVA

Embora existam estudos descrevendo o desenvolvimento embrionário em espécies de Ixodidae, como *R. microplus* e *D. andersoni*, ainda são escassas as informações disponíveis para *R. linnaei*. A ampliação desse conhecimento é relevante não apenas para a compreensão dos processos biológicos envolvidos na formação do embrião, mas também para a identificação de possíveis períodos de maior vulnerabilidade durante o desenvolvimento. O entendimento detalhado das etapas embrionárias pode fornecer subsídios para futuras pesquisas voltadas ao controle de carrapatos, contribuindo para o desenvolvimento de estratégias mais específicas e potencialmente menos impactantes ao ambiente quando comparadas aos métodos convencionais baseados exclusivamente no uso de acaricidas.

Nesse contexto, dando sequência a outros trabalhos desenvolvidos por Banci (2025), que descreveu os estágios iniciais do dia 1 ao dia 5 e por Zambrano (2025), que caracterizou o desenvolvimento entre o sexto e o décimo dia pós-oviposição, o presente estudo busca caracterizar os eventos morfológicos observados entre o 11º e o 15º dia do desenvolvimento embrionário desta espécie, contribuindo para a compreensão da embriogênese e para o preenchimento de lacunas existentes na literatura. Os resultados obtidos poderão servir como base para futuras pesquisas em biologia do desenvolvimento, morfologia comparada, fisiologia e estratégias de controle de carrapatos, ampliando o conhecimento disponível sobre o ciclo biológico desse importante ectoparasita.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Caracterizar o desenvolvimento embrionário de *R. linnaei* entre o 11º e o 15º dia pós-oviposição, por meio da análise morfológica e cronológica dos principais eventos morfogenéticos observados durante esse período.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Remoção do córion dos ovos utilizando a metodologia adaptada de Friesen et al. (2015), possibilitando a visualização das estruturas embrionárias.
- Aplicar a técnica de marcação nuclear com DAPI para análise em microscopia de fluorescência buscando visualizar a distribuição celular durante o desenvolvimento embrionário.
- Utilizar a microscopia eletrônica de varredura (MEV) para caracterizar as estruturas embrionárias presentes entre o 11º e o 15º dia pós-oviposição.
- Descrever os principais eventos morfogenéticos observados durante o desenvolvimento embrionário de *R. linnaei* nesse período, destacando as transformações estruturais associadas à formação da larva.

### 4. METODOLOGIA

As principais etapas metodológicas empregadas neste estudo estão resumidas na Figura 7.

#### 4.1 Origem dos ovos

Os espécimes de *R. linnaei* utilizados neste estudo foram gentilmente fornecidos pela empresa Ticks & Fleas, localizada em Araguari – MG, já previamente identificados como pertencentes à espécie. Foram recebidas 24 fêmeas ingurgitadas, as quais foram utilizadas para obtenção dos ovos destinados às análises do desenvolvimento embrionário.

As fêmeas permaneceram em incubadora tipo BOD, mantida a 27 °C, umidade relativa de aproximadamente 80% e fotoperíodo de 12 horas claro/escuro.

Todos os ovos de postura foram coletados diariamente, sempre no mesmo horário, sob microscópio estereoscópico. Os ovos coletados em um mesmo dia foram

reunidos em um único tubo de microcentrífuga de 2 mL, constituindo um lote correspondente àquele dia de oviposição. Posteriormente, foram mantidos nas mesmas condições de temperatura, umidade e fotoperíodo até atingirem os períodos de desenvolvimento correspondentes aos dias 11, 12, 13, 14 e 15 pós-oviposição.

Após o período de incubação, os ovos foram processados de acordo com a metodologia descrita por Friesen et al. (2015) para remoção do córion.



**Figura 7:** Fluxograma resumido das principais etapas metodológicas empregadas neste estudo, desde a obtenção das fêmeas ingurgitadas até a preparação das amostras para microscopia de fluorescência e microscopia eletrônica de varredura.

Fonte: Autora (2026).

#### 4.2 Remoção do córion

Para a etapa de remoção do córion, membrana vitelínica e fixação dos ovos foi utilizado um protocolo baseado e adaptado do trabalho Friesen et al. (2015) com algumas adaptações.

Inicialmente, os ovos coletados foram colocados em microtubos tipo Eppendorf, foi adicionado 1 mL de solução de hipoclorito de sódio a 6% nos microtubos que contém os ovos e posteriormente submetidos à agitação leve (100 rpm) por 8 minutos, após esse período, a solução foi descartada, e os ovos foram lavados três vezes com água destilada, com leve agitação entre cada lavagem.

Em seguida, foi adicionado novamente 1 mL de água destilada aos microtubos, que foram colocados em banho-maria a 90 °C por 3 minutos. Imediatamente após o aquecimento, os tubos são transferidos para gelo por mais 3 minutos. Posteriormente, a água é removida e substituída por uma solução composta por 500 µL de heptano, 450 µL de paraformaldeído (PFA) 4% e 50 µL de dimetilsulfóxido (DMSO).

Os microtubos contendo essa solução foram novamente submetidos à agitação a 100 rpm por 40 minutos. No final, foi observada a separação em duas fases líquidas, a fase inferior foi cuidadosamente removida com auxílio de uma pipeta Pasteur de vidro e imediatamente substituída por 500 µL de metanol P.A, os microtubos foram centrifugados por 30 segundos, foi realizada a remoção da solução e três lavagens subsequentes com metanol, também utilizando micropipetas e agitação leve. Os embriões foram então armazenados em metanol 100% e mantidos em freezer a -20 °C até sua utilização.

#### 4.3 Microscopia de fluorescência

Todos os procedimentos relacionados à microscopia de fluorescência foram realizados no Laboratório de Biotecnologia Aplicada à Saúde da UNILA.

A preparação dos embriões para microscopia de fluorescência foi realizada conforme o protocolo descrito por Friesen et al. (2015). Após a fixação e remoção do córion, os embriões foram submetidos a um processo de reidratação gradual à temperatura ambiente. Para isso, foram realizadas lavagens sequenciais de 5 minutos em soluções de metanol/PBST (PBS contendo 1% de Tween 20) nas concentrações de 75%, 50% e 25%, utilizando-se 100 µL de solução em cada etapa.

Ao final da reidratação, os embriões foram lavados uma vez em PBST.

Posteriormente, nos embriões foi adicionado aproximadamente 100 µL de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), utilizada na concentração pronta para uso fornecida pelo fabricante, permanecendo por 30 minutos em temperatura ambiente e protegidos da luz. Após a marcação, os embriões foram lavados uma vez em PBST e posteriormente transferidos para lâminas de vidro contendo uma gota de meio de montagem com agente *antifading* (Vectashield®), sendo montados aproximadamente de cinco a oito embriões por lâmina, cobertos com lamínula, selados com esmalte e armazenados sob refrigeração e ao abrigo da luz até o momento da análise.

As imagens foram obtidas utilizando microscópio de fluorescência Nikon Eclipse Ni e documentadas por meio do software NIS-Elements, com auxílio de uma câmera Nikon DS-Qi acoplada ao microscópio. A análise e interpretação da distribuição celular e das estruturas embrionárias observadas foram realizadas pela autora deste trabalho, com base na avaliação das imagens obtidas e na literatura especializada.

#### **4.4 Microscopia eletrônica de varredura**

Todos os procedimentos descritos nesta etapa foram realizados no Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura da UNILA.

A preparação das amostras para microscopia eletrônica de varredura seguiu o protocolo descrito por Friesen et al. (2015), com as adaptações descritas a seguir.

Após o mesmo processo de reidratação descrito anteriormente, parte dos embriões foi destinada à análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os embriões foram cuidadosamente transferidos com auxílio de pincel sob microscópio estereoscópico e fixados em stubs para microscopia eletrônica de varredura utilizando fita adesiva dupla face, sendo distribuídos aproximadamente de 10 a 15 embriões por suporte. Em seguida, as amostras foram metalizadas com uma liga de ouro-paládio para aumentar a condutividade elétrica das amostras e possibilitar sua observação ao microscópio eletrônico de varredura.

As amostras foram então observadas no microscópio eletrônico de varredura Zeiss EVO. Para cada estágio de desenvolvimento foram obtidas imagens digitais das principais estruturas embrionárias, documentadas por meio do software SmartSEM. A análise e interpretação das características morfológicas foram realizadas pela autora deste trabalho, com base na observação das imagens obtidas e na literatura especializada.

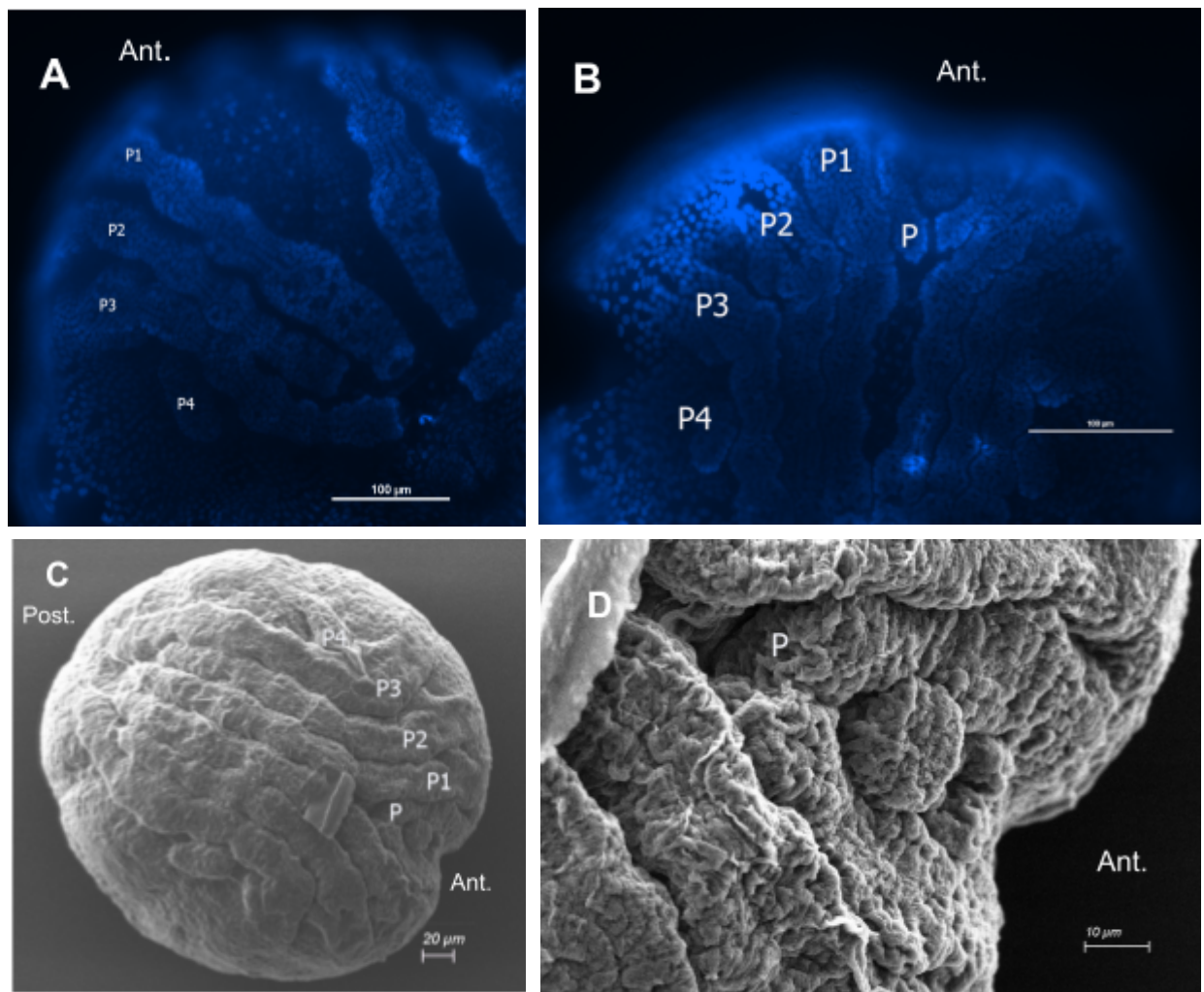
A microscopia eletrônica de varredura foi utilizada como técnica complementar à microscopia de fluorescência, possibilitando a observação detalhada da morfologia externa dos embriões e das estruturas formadas em estádios mais avançados do desenvolvimento.

## **5- RESULTADOS**

### **5.1 Desenvolvimento embrionário no dia 11**

No dia 11 de desenvolvimento embrionário, em microscopia de fluorescência, a marcação nuclear com DAPI evidenciou a organização celular associada aos apêndices em desenvolvimento, sendo possível reconhecer os quatro primeiros pares de pernas e as regiões correspondentes às estruturas cefálicas (Figura 8A, 8B e 8C).

As imagens por microscopia eletrônica de varredura mostraram maior definição morfológica dos apêndices já formados. Os três primeiros pares de pernas (P1, P2 e P3) apresentaram aumento de comprimento estendendo-se em direção à região posterior do embrião, enquanto o quarto par de pernas (P4) permaneceu visível, porém ainda em estágio inicial de desenvolvimento, sem formação do eixo proximal-distal e articulação. Os palpos são visíveis e mais evidentes. (Figura 8B e 8D)



**Figura 8:** Embriões de *R. linnaei* com 11 dias de desenvolvimento, (A-B) Microscopia de fluorescência após marcação nuclear com DAPI evidenciando as pernas em desenvolvimento. (C-D) Microscopia eletrônica de varredura mostrando a morfologia externa do embrião. (P1 a P4): Perna 1,2,3 e 4; (P): Palpo, (Ant. e Post.) indicam a orientação do eixo antero - posterior do embrião.

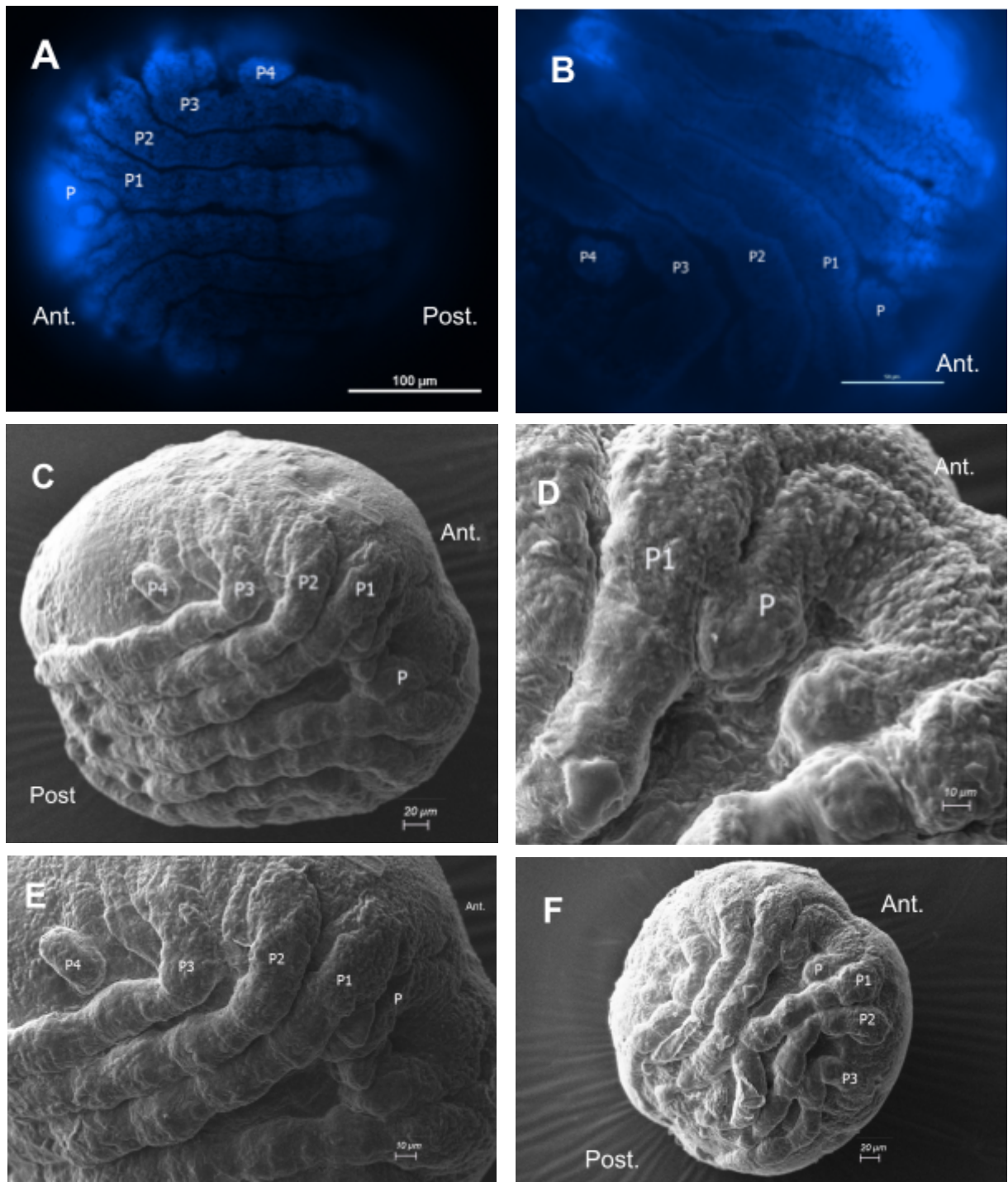
## 5.2 Desenvolvimento embrionário no dia 12

As imagens obtidas por meio da marcação nuclear, demonstraram a organização celular associada das estruturas em desenvolvimento (Figura 9A e 9B) e evidenciaram a continuidade do crescimento dos três primeiros pares de pernas no 12º dia de desenvolvimento embrionário

Em microscopia eletrônica de varredura, os três primeiros pares de pernas apresentaram maior alongamento quando comparados ao estágio anterior, aproximando-se de sua conformação definitiva (Figura 9C e 9D). Além disso, foi possível observar a formação dos artigos, evidenciando o avanço da diferenciação morfológica (Figura 9C, 9E e 9F).

O quarto par de pernas (P4) permanece visível, (Figura 9A e 9C) e pode ser observado com mais detalhe na Figura 9E

Os palpos puderam ser claramente observados, enquanto as quelíceras não foram claramente identificadas nas imagens analisadas (Figura 9F).



**Figura 9:** Embriões de *R. linnaei* com 12 dias de desenvolvimento, (A-B) Microscopia de fluorescência após marcação nuclear com DAPI, (C-F) Microscopia eletrônica de varredura evidenciando a morfologia externa do embrião. (P1 a P4): Perna 1,2,3 e 4; (P): palpo, (Ant. e Post.) indicam a orientação do eixo antero - posterior do embrião.

### 5.3 Desenvolvimento embrionário no dia 13

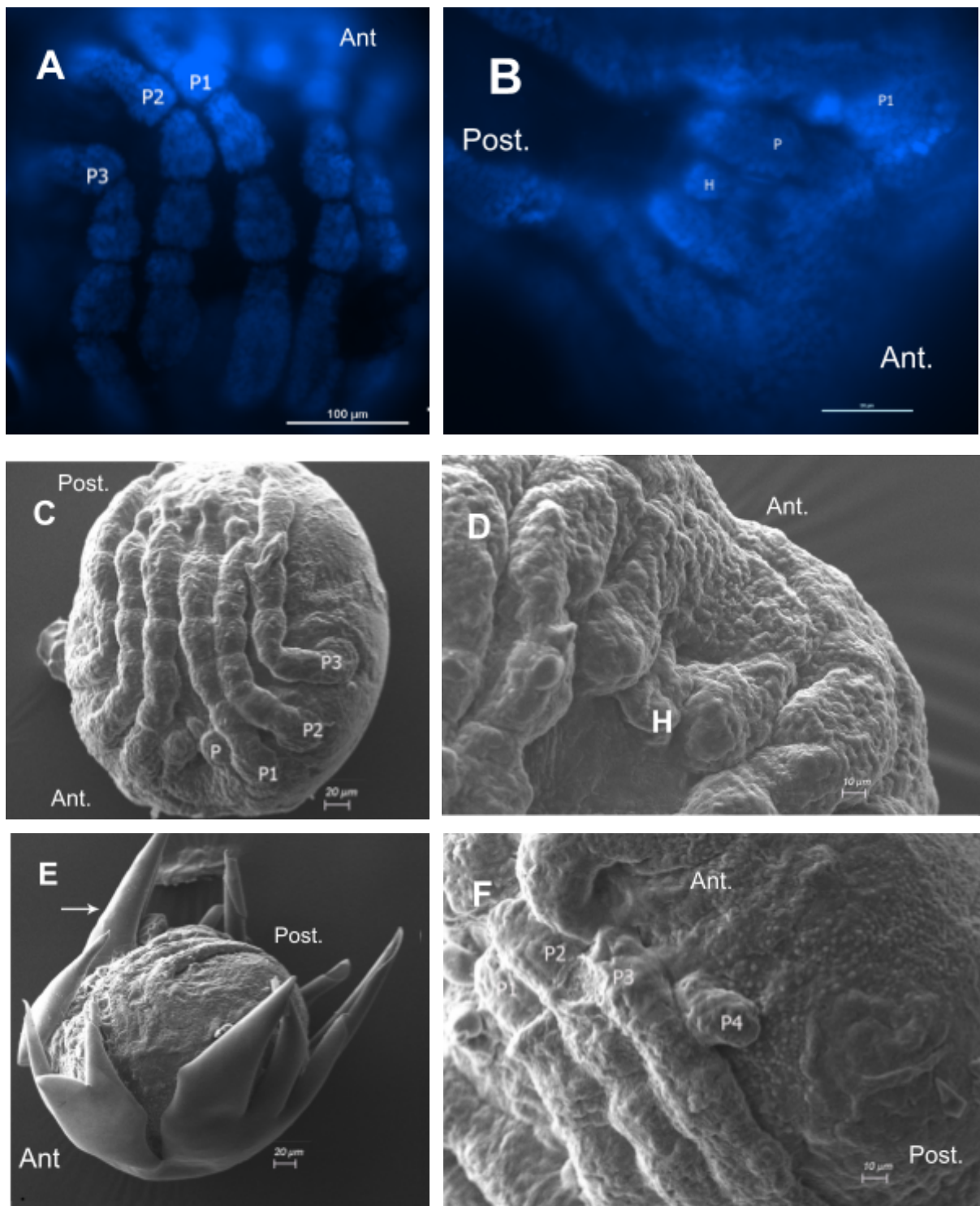
No dia 13 de desenvolvimento embrionário foi observado um avanço na diferenciação morfológica dos apêndices locomotores. Em comparação aos estágios anteriores, os artigos das pernas se apresentaram mais definidos, permitindo uma visualização mais clara da organização.

A marcação nuclear com DAPI evidenciou a distribuição celular ao longo dessas estruturas, destacando a articulação progressiva das pernas (Figura 10A).

Foi observada uma estrutura compatível com o desenvolvimento inicial do hipostômio (Figura 10B e 10D)

Em microscopia eletrônica de varredura, os três primeiros pares de pernas (P1, P2 e P3) mantiveram seu processo de crescimento e diferenciação (Figura 10C), o quarto par (P4) apresentou redução ainda mais evidente quando comparado aos dias anteriores (Figura 10C), tornando-se inclusive pouco visível em algumas amostras analisadas. (Figura 10F). Os palpos permaneceram claramente identificáveis e, entre eles, pode ser também observado a estrutura do hipostômio em desenvolvimento (Figura 10D), as quelíceras não puderam ser claramente identificadas nas imagens obtidas.

A (Figura 10E) mostra o embrião ainda envolvido por remanescentes do córion, permitindo observar que essa estrutura apresenta aspecto rígido e permanece aderida ao embrião. A presença do córion dificulta a visualização das estruturas embrionárias, podendo impedir a observação detalhada da morfologia externa.



**Figura 10:** Embriões de *R. linnaei* com 13 dias de desenvolvimento (A-B) Imagens obtidas por microscopia de fluorescência DAPI. Em (A) observa-se maior evidência da articulação das pernas. Em (B) destaca-se a estrutura compatível com o desenvolvimento inicial do hipostômio (H). Imagens (C-F) obtidas por microscopia eletrônica de varredura. Em (C) e (F) mostrando a redução do quarto par de pernas (P4) em relação aos demais apêndices, em (D) a estrutura inicial do hipostômio, em (E) embrião com remanescentes do córion (seta) após o processo de remoção. (P1 a P4): Perna 1,2,3 e 4; (P): palpo, (H): hipostômio, (Ant. e Post.) indicam a orientação do eixo antero - posterior do embrião.

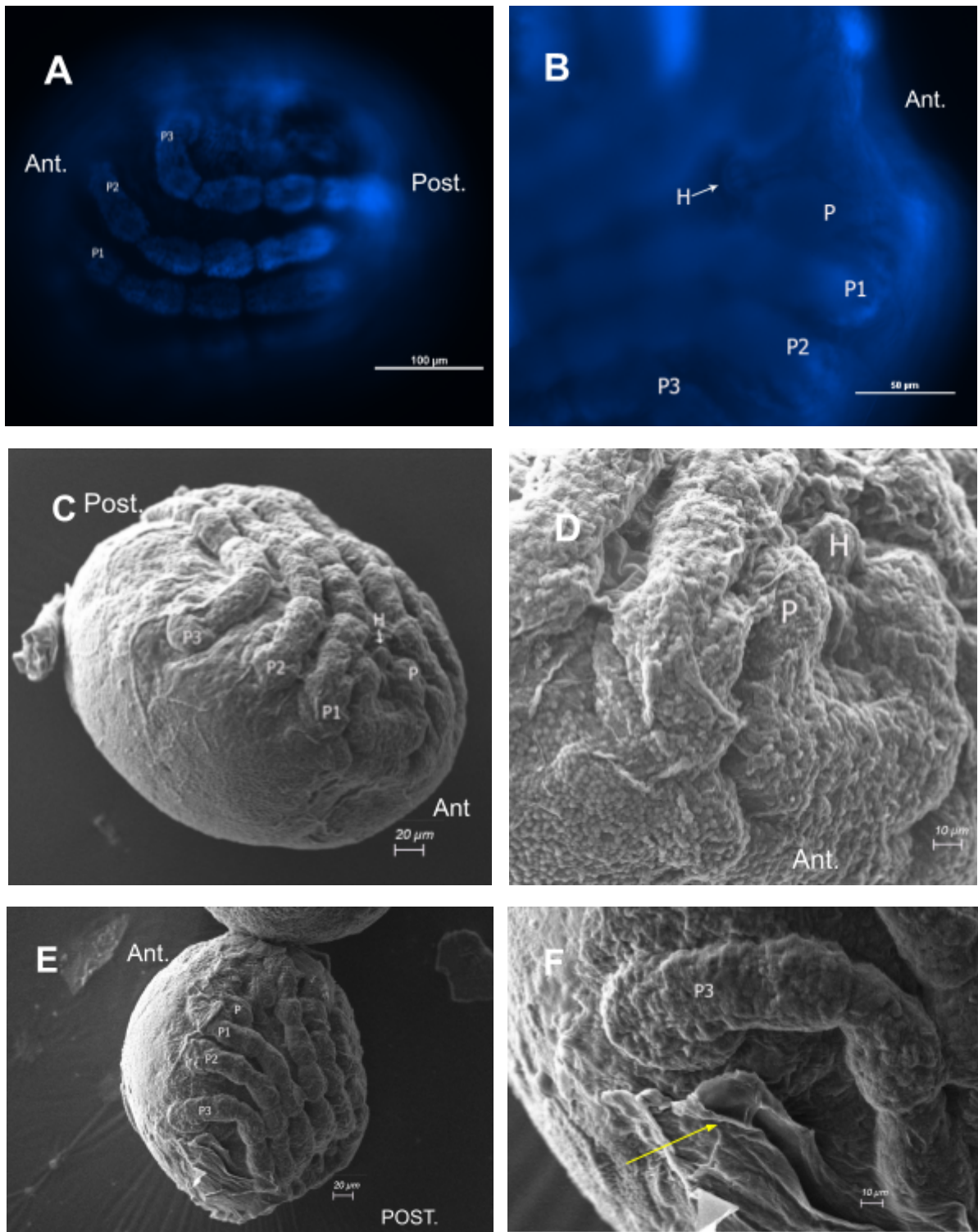
#### **5.4 Desenvolvimento embrionário no dia 14**

No dia 14 de desenvolvimento embrionário se observa um avanço na diferenciação das estruturas corporais previamente descritas. Em microscopia de fluorescência (Figura 11A e 11B) os apêndices locomotores apresentam articulação mais evidente, com delimitação mais clara dos futuros artículos das pernas quando comparados aos estágios anteriores.

Na região anterior do embrião a estrutura localizada entre os palpos, compatível com a diferenciação inicial do hipostômio, apresentou maior definição em relação ao dia 13 sendo visível como uma projeção alongada com uma fenda longitudinal central (Figura 11B e 11D)

Em microscopia eletrônica de varredura, os três primeiros pares de pernas apresentaram maior grau de articulação e organização morfológica (Figura 11C e 11E). A Figura 11F apresenta um detalhe ampliado da perna 3, evidenciando com maior nitidez a diferenciação de cada articulo, assim como presença ainda de partes do córion aderidos no embrião.

Diferentemente dos estágios anteriores, o quarto par de pernas continuou se reduzindo (Figura 11C) e não pôde ser identificado nas amostras analisadas. Ainda não foram observadas evidências claras da formação das garras terminais.



**Figura 11:** Embriões de *R.linnaei* com 14 dias de desenvolvimento (A-B) Imagens obtidas por microscopia de fluorescência DAPI, evidenciando a articulação dos pernas, (B) mostrando a diferenciação da estrutura do hipostômio (H) localizada entre os palpos. (C-F) Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura mostrando a morfologia externa do embrião, (C) evidenciando artigos das pernas, (D) detalhe do hipostômio (H) e palpos, (E) vista geral do embrião e articulação das pernas, (F) Detalhe da articulação de perna 3, (seta) indica presença de corion. P1–P3: primeiro ao terceiro par de pernas; P: palpo; H: hipostômio, (Ant. e Post.) indicam a orientação do eixo antero - posterior do embrião.

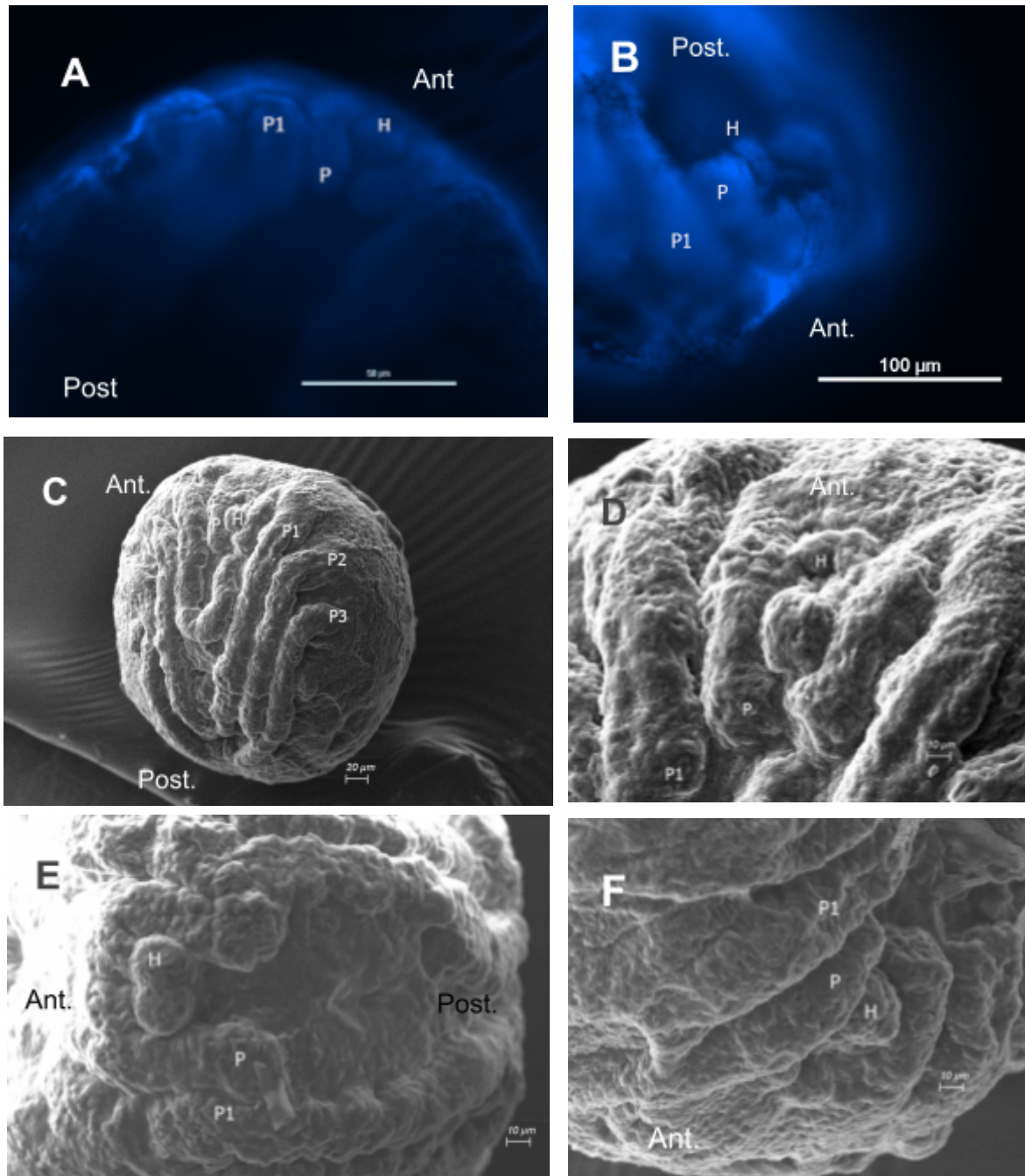
### 5.5 Desenvolvimento embrionário no dia 15

No 15º dia de desenvolvimento embrionário, observou-se um avanço na diferenciação das estruturas da região anterior do capítulo. Em microscopia de fluorescência, o hipostômio apresentou aspecto mais evidente, com uma diferenciação da porção apical bilobada mais definida em relação aos dias anteriores (Figura 12A e 12B).

Os palpos permaneceram visíveis e bem delimitados, enquanto a organização das estruturas bucais é progressivamente mais complexa.

Em microscopia eletrônica de varredura, foi confirmado maior desenvolvimento da estrutura do hipostômio que se mostrou mais alongada e delimitada (Figura 12D e 12F), sendo possível observar em detalhe a porção apical bilobada do hipostômio em desenvolvimento (Figura 12E).

Apesar do avanço na diferenciação das peças bucais, não foi possível identificar de forma inequívoca a presença das quelíceras nas imagens analisadas.



**Figura 12.** Embriões de *R.linnaei* com 15 dias de desenvolvimento. (A-B) Imagens obtidas por microscopia de fluorescência DAPI evidenciando a diferenciação das estruturas localizadas na região anterior do embrião. Observa-se a estrutura compatível com o hipostômio (H). (C-D) Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura, (D,E e F) mostrando maior definição das estruturas bucais, com destaque para os palpos (P) e hipostômio em desenvolvimento (H), hipostômio (H). P1–P3: primeiro ao terceiro par de pernas; P: palpo; H: hipostômio, (Ant. e Post.) indicam a orientação do eixo antero - posterior do embrião.

## 6. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos entre o dia 11 e 15 de desenvolvimento embrionário de *R. linnaei* demonstraram a continuidade dos processos de diferenciação morfológica observados nos estágios anteriores da embriogênese. Durante esse período, os principais eventos observados estiveram relacionados ao crescimento e articulação das pernas e com a diferenciação progressiva das estruturas localizadas na região anterior do embrião, que posteriormente vão formar as peças bucais, palpos e hipostômio.

Entre o dia 11 a 14 foi observado um aumento progressivo do comprimento dos três primeiros pares de pernas, acompanhado por uma articulação cada vez mais evidente. Esse padrão de desenvolvimento é compatível com as descrições realizadas por Santos et al. (2013) para *R. microplus* e por Friesen et al. (2015) para *D. andersoni*, que relatam a diferenciação gradual das pernas durante os estágios avançados da embriogênese. Nos embriões analisados neste estudo, a articulação tornou-se progressivamente mais definida, indicando o avanço da organização corporal e a aproximação dos estágios finais de formação da larva.

Um aspecto particularmente interessante observado durante as análises foi a variação no grau de regressão do quarto par de pernas entre embriões pertencentes ao mesmo dia de desenvolvimento. Enquanto em alguns exemplares essa estrutura encontrava-se reduzida a um pequeno vestígio já no dia 13, em outros já não era possível identificá-la. Essa variação pode estar relacionada à assincronia natural do desenvolvimento embrionário, uma vez que, embora os embriões tenham sido agrupados de acordo com o número de dias pós-oviposição, não é possível determinar com precisão o momento exato em que cada ovo foi depositado pela fêmea. Dessa forma, pequenas diferenças no estágio de desenvolvimento entre embriões do mesmo grupo são esperadas e refletem a natureza contínua da embriogênese.

Esse resultado encontra suporte nas observações realizadas por Hinne et al. (2025) em *I. scapularis*, nas quais os autores descreveram a extensão inicial seguida pela retração do quarto par de pernas durante os estágios avançados da embriogênese. Considerando que as larvas de carrapatos apresentam apenas três pares de pernas funcionais após a eclosão, a redução observada em *R. linnaei* representa a etapa normal do processo de reorganização morfológica que antecede a formação da

larva.

Outro resultado relevante foi a diferenciação progressiva das estruturas bucais. No dia 13 foi observada uma estrutura localizada entre os palpos, que se tornou mais evidente nos dias posteriores. No dia 14 essa estrutura apresentava maior definição morfológica e, no dia 15, mostrava-se mais alongada e organizada, apresentando uma fenda central ao longo da estrutura. A posição anatômica e a sequência temporal observadas sugerem que essa estrutura seja compatível com o desenvolvimento do hipostômio putativo.

Os resultados obtidos apresentam semelhanças com as observações realizadas por Friesen et al. (2015) em *D. andersoni*. Esses autores discutem a origem embrionária do hipostômio e sugerem que essa estrutura se forma a partir da fusão dos enditos dos palpos durante os estágios avançados do desenvolvimento. Em *D. andersoni*, os enditos deslocam-se para uma posição abaixo das quelíceras e posteriormente se fundem na região do estomodeu em desenvolvimento. Embora a origem exata da estrutura observada em *R. linnaei* não possa ser confirmada apenas pelas análises morfológicas realizadas neste estudo, Friesen et al. (2015) utilizaram microscopia confocal associada à marcação por DAPI e F-actina para estabelecer um sistema de estagiamento embrionário baseado em critérios morfológicos. No presente estudo, embora tenham sido empregadas microscopia de fluorescência e microscopia eletrônica de varredura, a descrição foi realizada com base em dias pós-oviposição, o que limita comparações diretas entre os estágios embrionários.

No dia 15 foram observadas estruturas bilaterais e arredondadas localizadas na porção apical ao hipostômio, compatível com a sua diferenciação progressiva entre o 13º e o 15º dia de desenvolvimento embrionário. Inicialmente, essa estrutura apresentou-se pouco evidente, tornando-se gradualmente mais alongada e com aspecto bilobado mais definido nos estágios seguintes. Esses achados indicam que a especialização das peças bucais ocorre de forma progressiva ao longo da embriogênese. Esse resultado é particularmente interessante quando comparado ao modelo proposto por Santos et al. (2013) para *R. microplus*. Segundo esses autores, as quelíceras e os palpos já se encontram em desenvolvimento durante o estágio 10 que corresponde aproximadamente aos dias 5-6, enquanto no estágio 12 correspondente aos dias 9-12 as estruturas cefálicas apresentam posicionamento praticamente completo e os enditos dos palpos iniciam a fusão para a formação do hipostômio.

Em contraste, nos embriões de *R. linnaei* analisados neste estudo, as quelíceras não puderam ser claramente identificadas ainda, enquanto a estrutura compatível com o hipostômio tornou-se evidente a partir do 13º dia. Esses resultados sugerem que, embora os eventos morfogenéticos gerais sejam semelhantes aos descritos para *R. microplus*, podem existir diferenças na cronologia observada para a diferenciação das peças bucais entre as duas espécies. Entretanto, essa comparação deve ser realizada com cautela, uma vez que Santos et al. (2013) utilizaram um sistema baseado em estágios embrionários, enquanto o presente estudo foi conduzido utilizando dias pós-oviposição como referência temporal.

De forma geral, os resultados obtidos demonstram que os eventos morfogenéticos observados em *R. linnaei* seguem o padrão geral descrito para outros carrapatos da família Ixodidae. A articulação progressiva dos apêndices locomotores, a reorganização do quarto par de pernas e a diferenciação gradual das estruturas bucais observadas neste estudo corroboram a conservação dos principais mecanismos de desenvolvimento descritos por Santos et al. (2013), Friesen et al. (2015) e Hinne et al. (2025).

Ao mesmo tempo, as diferenças observadas na cronologia de aparecimento de determinadas estruturas reforçam a importância de estudos específicos para cada espécie, permitindo melhorar a compreensão dos padrões de desenvolvimento dentro da ordem Ixodida.

| <b>Estrutura / Evento</b>             | <b>Santos et al. (2013)</b><br><i>R. microplus</i> | <b>Friesen et al. (2015)</b><br><i>D. andersoni</i>                                                        | <b>Hinne et al. (2025)</b><br><i>I. scapularis</i>                                                                                            | <b>Presente estudo</b><br><i>R. linnaei</i>               |
|---------------------------------------|----------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| <b>Três primeiros pares de pernas</b> | Alongamento progressivo nos estágios 8–10          | Alongamento e segmentação progressiva entre os estágios 9–12 (5–12 dias AEL).                              | P1–P3 alongam-se progressivamente e e, no estágio 14 (23–30 dAEL), encontram-se totalmente alongados e segmentados.                           | Alongamento e segmentação progressiva entre os dias 11–15 |
| <b>Quarto par de pernas</b>           | Inicia no estágio 9 e desaparece até o estágio 11  | No Estágio 9, os três primeiros pares de pernas começam a ser ligeiramente mais longos                     | P4 interrompe o crescimento no estágio 12 (17–18 dAEL), inicia a retração e encontra-se quase totalmente retraído no estágio 14 (23–30 dAEL). | Regressão observada entre os dias 13 e 14                 |
| <b>Hipostômio</b>                     | Não é o foco deste estudo                          | Ao final do estágio 12 (9–12 dias AEL), encontra-se formado e posicionado entre as quelíceras e os palpos. | Enditos dos palpos sob as quelíceras, parecem se fundir para formar o hipostômio no estágio 12                                                | Torna-se evidente apenas entre os dias 13–15.             |

|                             |                                                                                                                  |                                                                                                                    |                                                                                                                          |                                                                                       |
|-----------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Quelíceras</b>           | São Visíveis desde estágio 8                                                                                     | Evidentes durante o estágio 12; no estágio 13 permanecem em desenvolvimento no interior dos lobos pré-quelícerais. | Os lobos pré-quelícerais tornam-se evidentes no estágio 10 (15 dAEL).                                                    | Não identificadas de forma inequívoca entre os dias 11–15                             |
| <b>Estruturas cefálicas</b> | No estágio 13, observa-se alteração do posicionamento das quelíceras durante a diferenciação da região anterior. | Ao final do estágio 12, a posição das estruturas cefálicas está praticamente completa.                             | No estágio 14 (23–30 dAEL), palpos, hipostômio e quelíceras encontram-se completamente desenvolvidos e em posição final. | A diferenciação da região anterior ainda está em desenvolvimento nos dias analisados. |

**Figura 13:** Comparação dos principais eventos morfológicos descritos durante o desenvolvimento embrionário de carrapatos da família Ixodidae em diferentes estudos e aqueles observados no presente estudo para *Rhipicephalus linnaei*. Abreviaturas: P1–P4 = primeiro ao quarto par de pernas; dAEL = dias após a oviposição (*days after egg laying*).  
Fonte: Adaptado de Santos et al. (2013), Friesen et al. (2015), Hine et al. (2025) e dados do presente estudo.

## 7. CONCLUSÕES

O presente estudo permitiu caracterizar aspectos do desenvolvimento embrionário de *R. linnaei* entre o dia 11 ao 15 pós-oviposição por meio da microscopia de fluorescência e da microscopia eletrônica de varredura.

Durante o período analisado foi observada a articulação progressiva das pernas e o desenvolvimento de estruturas localizadas na região anterior do embrião compatíveis com o hipostômio. Também foi observada a redução progressiva do quarto par de pernas, padrão semelhante ao descrito para outras espécies de

carrapatos.

Os resultados obtidos mostraram-se compatíveis com os principais eventos morfogênicos descritos para outras espécies da família Ixodidae, especialmente aqueles relatados por Santos et al. (2013), Friesen et al. (2015) e Hinne et al. (2025), embora diferenças na cronologia de aparecimento de algumas estruturas tenham sido observadas.

Dessa forma, este trabalho contribui para ampliar o conhecimento sobre a embriogênese de *R. linnaei* e fornece informações que poderão servir de base para futuros estudos em biologia do desenvolvimento, morfologia comparada e estratégias de controle de carrapatos.

## REFERÊNCIAS

- BANCI, Patricia Aparecida Silva. Descrição dos estágios iniciais do desenvolvimento embrionário do carrapato do cão, (*Acari: Ixodidae*) *Rhipicephalus linnaei* (Audouin, 1826). 2025. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas – Ecologia e Biodiversidade) – Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2025.
- BRUSCA, R. C. BRUSCA, G. J. Invertebrados segunda edição, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.
- CAETANO, R. L.; VIZZONI, V. F.; BITENCOURTH, K.; CARRIÇO, C.; SATO, T. P. PINTO, Z. T. OLIVEIRA, S. V.; AMORIM, M.; VOLOCH, C. M. GAZÊTA, G. S. Ultrastructural Morphology and Molecular Analyses of Tropical and Temperate "Species" of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae) in Brazil. *Journal of Medical Entomology*, v. 54, n. 5, p. 1201–1212, 2017.
- DANTAS-TORRES, F. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): from taxonomy to control. *Veterinary Parasitology*, v. 152, n. 3–4, p. 173–185, 2008.
- DANTAS-TORRES, F. Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Parasites & Vectors*, v. 3, p. 26, 2010.
- DANTAS-TORRES, F.; OTRANTO, D. Best Practices for Preventing Vector-Borne Diseases in Dogs and Humans. *Trends in Parasitology*, v. 32, n. 1, p. 43–55, 2015.
- ESTRADA-PEÑA, A.; JONGEJAN, F. Ticks feeding on humans: a review of records on human-biting Ixodoidea with special reference to pathogen transmission. *Experimental and Applied Acarology*, v. 23, p. 685–715, 1999.
- 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.
- 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.
- JONGEJAN, F.; UILENBERG, G. The global importance of ticks. *Parasitology*, v. 129, suppl. 1, p. S3–S14, 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, jan. 2017

LEONOVICH, S. A. Structure of Haller's organ and taxonomy of hard ticks of the subfamily Amblyomminae (Family Ixodidae). Entomological Review, v. 101, p. 709–724, 2021.

LOULY, C. C. B. et al. Dinâmica sazonal de *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) em cães de uma unidade policial de Goiânia, Goiás, Brasil. *Ciência Rural*, 2007.

NAVA, S.; VENZAL, J. M.; GONZÁLEZ-ACUÑA, D. A.; MARTINS, T. F.; GUGLIELMONE, A. A. Ticks of the Southern Cone of America: diagnosis, distribution, and hosts with taxonomy, ecology and sanitary importance. London: Academic Press, 2017.

PAZ, G. F.; LABRUNA, M. B.; LEITE, R. C. Ritmo de queda de *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) de cães artificialmente infestados. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 2008.

PIOTROWSKI, M.; RYMASZEWSKA, A. Expansion of tick-borne rickettsioses in the world. *Microorganisms*, 2020.

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.; DA FONSECA, R. N. The embryogenesis of the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: the establishment of a new chelicerate model system. *Genesis*, v. 51, n. 12, p. 803–818, 2013.

SLAPETA, J.; HALLIDAY, B.; CHANDRA, S.; ALANAZI, A. D.; ABDEL-SHAIFY, 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, 2022.

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.

ZAMBRANO, Ilenia Beatriz Nava. Desenvolvimento e estagiamento embrionário do carrapato vermelho do cão, *Rhipicephalus linnaei* (Audouin, 1826) (Acari: Ixodidae), do sexto ao décimo dia. 2025. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biotecnologia) – Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2025.