

Universidade Federal do Maranhão
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde
Mestrado

**HISTOLOGIA E COMPOSIÇÃO ELEMENTAR DA CUTÍCULA
DE DIFERENTES POPULAÇÕES DO CARRAPATO
Rhipicephalus microplus SUBMETIDAS OU NÃO AO
TRATAMENTO COM FLUAZURON**

CLARISSE NERES FERREIRA BARBOSA

São Luís
2024

CLARISSE NERES FERREIRA BARBOSA

**HISTOLOGIA E COMPOSIÇÃO ELEMENTAR DA CUTÍCULA
DE DIFERENTES POPULAÇÕES DO CARRAPATO
Rhipicephalus microplus SUBMETIDAS OU NÃO AO
TRATAMENTO COM FLUAZURON**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão, para defesa, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Lívio Martins Costa Júnior

Coorientador: Prof. Dr. Caio Pavão Tavares

São Luís

2024

**HISTOLOGIA E COMPOSIÇÃO ELEMENTAR DA CUTÍCULA
DE DIFERENTES POPULAÇÕES DO CARRAPATO
Rhipicephalus microplus SUBMETIDAS OU NÃO AO
TRATAMENTO COM FLUAZURON**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão, para defesa, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Aprovada em / /

BANCA

(1º Examinador)
Universidade Federal do Maranhão

(2º Examinador)
Universidade Federal do Maranhão

(3º Examinador)
Universidade Federal do Maranhão

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

Barbosa, Clarisse Neres Ferreira.

HISTOLOGIA E COMPOSIÇÃO ELEMENTAR DA CUTÍCULA DE
DIFERENTES POPULAÇÕES DO CARRAPATO *Rhipicephalus microplus*
SUBMETIDAS OU NÃO AO TRATAMENTO COM FLUAZURON / Clarisse
Neres Ferreira Barbosa. - 2024.

70 p.

Coorientador(a) 1: Caio Pavão Tavares.

Orientador(a): Livio Martins Costa Junior.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em
Ciências da Saúde/ccbs, Universidade Federal do Maranhão,
Universidade Federal do Maranhão, 2024.

1. Benzoilfenilureias. 2. Integumento. 3.
Ectoparasitos. 4. Controle. 5. Composição. I. Costa
Junior, Livio Martins. II. Tavares, Caio Pavão. III.
Título.

Dedico aos meus pais, à minha família, amigos e ao meu marido.

AGRADECIMENTOS

Esta dissertação não poderia ser concluída sem o apoio de várias pessoas, afinal, ninguém alcança nada sozinho.

Inicialmente gostaria de agradecer a Deus, sem ele eu não sou ninguém. Agradecer ao meu orientador, Professor Dr. Lívio Martins Costa Júnior, por ter me dado a oportunidade de ser sua orientada, aceitando minhas limitações de conhecimento sobre a pesquisa científica, abraçando a ideia de ter que ensinar do zero o que é fazer pesquisa. Agradeço a paciência e as conversas que me ensinaram a pensar como pesquisadora, pelas palavras de motivação, muito obrigada!

Gostaria de agradecer também ao Professor Dr. Hermes Ribeiro Luz, que me apresentou o Laboratório de Controle de Parasitos e pelas conversas científicas ao longo desses 2 anos de mestrado.

Ao meu coorientador, Professor Dr. Caio Pavão Tavares, que acompanhou toda a minha trajetória desde os experimentos de bancada até o último ponto dessa dissertação. Pelos conselhos, incentivo e correções assertivas, sem me desmotivar. Obrigada!

Também gostaria de agradecer meus companheiros de bancada, Wesley Douglas, Nara Sofia e Marcelo Henrique, que me ajudavam com testes, infestações e cuidados com as cepas de carrapatos. Obrigada por não soltarem a minha mão.

Agradeço também à Ruth Myriam, não sei se ela sabe, mas fez uma grande diferença tê-la como amiga durante esse processo, obrigada por não me deixar dormir sozinha no laboratório, alimentando carrapatos por 24h. Rayssa, Juliana, Ellen Cristina, Isabella, Rafael Arturo, Dauana e demais integrantes do LCP, estar com vocês diariamente, é sempre muito divertido e todos os dias aprendo com vocês.

Quero agradecer a equipe do LCP no geral, pois cada um teve seu papel no decorrer do caminho, por todo suporte, acolhimento e construção dessa dissertação como um todo; aos colegas de mestrado por toda caminhada juntos; à Universidade Federal do Maranhão, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde e à CAPES.

Por fim, as pessoas mais importantes da minha vida, meus pais e irmã por sempre me apoiarem em cada passo da minha vida, por serem tão amorosos e orgulhosos de mim, devo tudo a vocês! À minha família e amigos que acompanharam os momentos bons e ruins. Ao meu marido que desde o início me apoiou, sustentou e incentivou minhas escolhas, sempre enxugando minhas lágrimas e me puxando pra realidade. Obrigada meu amor!

RESUMO

Os carrapatos estão associados a inúmeros efeitos econômicos e para a saúde. O carrapato bovino, *Rhipicephalus microplus* com seu hábito hematófago os carrapatos transmitem patógenos causando diversas doenças, reduzindo a produção de leite e carne e afetando a saúde e bem-estar dos animais. O uso indiscriminado e repetido dos produtos carrapaticidas, levou ao surgimento de populações resistentes, fenômeno que tem aumentado nos últimos dez anos. A resistência pode ser atribuída a fatores como penetração reduzida do produto na cutícula, que pode modificar a composição química cuticular. Este estudo tem como objetivo de avaliar a composição química elementar e a histologia da cutícula de larvas de diferentes populações do carrapato *R. microplus* obtidas a partir de fêmeas tratadas ou não com fluazuron. Esta dissertação está apresentada em dois capítulos. O capítulo I se intitula: “Composição elementar da cutícula de larvas de *R. microplus* de diferentes populações no Brasil” e tem como objetivo caracterizar a composição elementar da cutícula de larvas de *R. microplus* de diferentes populações geográficas, correlacionando essas informações com os níveis de suscetibilidade ou resistência aos principais carrapaticidas sintéticos utilizados no controle dessa espécie. A população de referência POA demonstrou suscetibilidade a todos os carrapaticidas testados, enquanto as demais populações apresentaram resistência variável (baixa, média e alta) a cipermetrina, clorpirifós e fipronil, mantendo suscetibilidade universal à doramectina e à moxidectina. Na análise de microscopia eletrônica (Experimento II), foi observada uma composição elementar predominantemente de carbono na cutícula larval, com diferenças estatisticamente significativas entre as populações e entre as regiões dorsal e ventral, sendo que a região dorsal apresentou maior percentual de carbono em 9 das 11 populações analisadas. Além disso, identificou-se uma correlação positiva forte e significativa entre o percentual de carbono dorsal e a resistência à cipermetrina ($r = 0.7728$, $p = 0.0081$). Embora a correlação para clorpirifós e fipronil tenha sido positiva, não alcançou significância estatística. Já a composição de carbono na região ventral apresentou correlação negativa muito fraca e não significativa com os carrapaticidas avaliados. Não foi possível correlacionar a composição cuticular com a resistência à doramectina e moxidectina devido à suscetibilidade universal a esses compostos. O capítulo II se intitula: “Composição elementar da cutícula de larvas de *R. microplus* de diferentes populações no Brasil” e tem como objetivo caracterizar a composição elementar da cutícula de larvas de *R. microplus* de diferentes populações geográficas, correlacionando essas informações com os níveis de suscetibilidade ou resistência aos principais carrapaticidas sintéticos utilizados no controle dessa espécie. O capítulo II se intitula: “Histologia e composição elementar da cutícula de larvas de *Rhipicephalus microplus* obtidas a partir de fêmeas tratadas com fluazuron.” e tem como objetivo avaliar a composição química elementar e a histologia da cutícula de larvas de diferentes populações do carrapato *R. microplus* obtidas a partir de fêmeas tratadas ou não com fluazuron. Fêmeas de *R. microplus* tratadas com fluazuron apresentaram redução significativa no peso dos ovos (1,59 mg vs. 9,77 mg no grupo não tratado), na taxa de eclodibilidade (20,18% vs. 56,61% no grupo não tratado) e no índice de produção de ovos (3,00 vs. 42,99 no grupo não tratado), com controle

efetivo de 97,52%. Larvas oriundas de fêmeas tratadas apresentaram menor percentual de carbono na cutícula em diversas fases de desenvolvimento, com reduções significativas aos 7 e 21 dias (região dorsal) e aos 14 e 21 dias (região ventral) em relação ao grupo controle. No grupo controle, as três camadas cuticulares estavam preservadas nas larvas avaliadas. No grupo tratado, houve afinamento da procutícula, ausência da epicutícula e danos estruturais severos, indicando degradação resultante do tratamento das fêmeas tratadas com fluazuron. Esta dissertação se apresenta como o primeiro relato da tentativa de elucidação da composição, a nível de elementos químicos, da cutícula de larvas de diferentes populações de *R. microplus*, e foi possível detectar uma possível correlação entre a composição cuticular com a resistência aos carrapaticidas. Da mesma forma, demonstra pela primeira vez as alterações a nível elementar na cutícula de larvas do carrapato bovino obtidos a partir de fêmeas ingurgitadas tratadas com fluazuron, um inibidor de crescimento pertencente à classe das benzoilfenilureias.

Palavras – chave: Benzoilfenilureias; integumento; ectoparasitos; controle; composição.

ABSTRACT

Ticks are associated with numerous economic and health impacts. The bovine tick, *Rhipicephalus microplus*, with its hematophagous habits, transmits pathogens causing various diseases, reducing milk and meat production, and affecting the health and well-being of animals. The indiscriminate and repeated use of acaricides has led to the emergence of resistant populations, a phenomenon that has increased in the last decade. Resistance can be attributed to factors such as reduced penetration of the product into the cuticle, which can modify the chemical composition of the cuticle. This study aims to evaluate the elemental chemical composition and histology of the cuticle of larvae from different populations of *R. microplus* obtained from females treated or not with fluazuron. This dissertation is presented in two chapters. Chapter I is titled "Elemental Composition of the Cuticle of *R. microplus* Larvae from Different Populations in Brazil" and aims to characterize the elemental composition of the cuticle of *R. microplus* larvae from different geographical populations, correlating this information with susceptibility or resistance levels to the main synthetic acaricides used to control this species. The reference population POA showed susceptibility to all the tested acaricides, while the other populations exhibited variable resistance (low, medium, and high) to cypermethrin, chlorpyrifos, and fipronil, maintaining universal susceptibility to doramectin and moxidectin. In the electron microscopy analysis (Experiment II), a predominantly carbon composition was observed in the larval cuticle, with statistically significant differences between populations and between dorsal and ventral regions, with the dorsal region showing a higher carbon percentage in 9 of the 11 populations analyzed. In addition, a strong and significant positive correlation between dorsal carbon percentage and resistance to cypermethrin was identified ($r = 0.7728$, $p = 0.0081$). Although the correlation for chlorpyrifos and fipronil was positive, it was not statistically significant. The carbon composition in the ventral region showed a very weak and non-significant negative correlation with the evaluated acaricides. It was not possible to correlate the cuticular composition with resistance to doramectin and moxidectin due to universal susceptibility to these compounds. Chapter II is titled "Histology and Elemental Composition of the Cuticle of *Rhipicephalus microplus* Larvae from Females Treated with Fluazuron" and aims to evaluate the elemental chemical composition and histology of the cuticle of larvae from different populations of *R. microplus* obtained from females treated or not with fluazuron. *R. microplus* females treated with fluazuron showed a significant reduction in egg weight (1.59 mg vs. 9.77 mg in the untreated group), hatchability rate (20.18% vs. 56.61% in the untreated group), and egg production index (3.00 vs. 42.99 in the untreated group), with an effective control of 97.52%. Larvae from treated females showed a lower carbon percentage in the cuticle at various developmental stages, with significant reductions at 7 and 21 days (dorsal region) and at 14 and 21 days (ventral region) compared to the control group. In the control group, the three cuticle layers were preserved in the evaluated larvae. In the treated group, thinning of the procuticle, absence of the epicuticle, and severe structural damage were observed, indicating degradation resulting from the treatment of females with fluazuron. This dissertation represents the first report attempting to elucidate the chemical elemental composition

of the cuticle of larvae from different populations of *R. microplus*, and it was possible to detect a potential correlation between the cuticular composition and resistance to acaricides. It also demonstrates for the first time the elemental-level alterations in the cuticle of *R. microplus* larvae from engorged females treated with fluazuron, a growth inhibitor belonging to the benzoylphenylurea class.

Keywords: Benzoylphenylureas; integument; ectoparasites; control; composition.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xiv
LISTA DE TABELAS.....	xv
1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1. O carrapato <i>Rhipicephalus microplus</i> e as estratégias de controle	15
2.2. Resistência cuticular	20
2.3. A cutícula dos carrapatos.....	21
3. OBJETIVOS	24
3.1. Objetivo Geral.....	24
3.2. Objetivos Específicos	24
4. RESULTADOS	25
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51
 CAPÍTULO I - Composição química elementar da cutícula de larvas de <i>Rhipicephalus microplus</i> de diferentes populações do Brasil	33
RESUMO	35
ABSTRACT	37
1. Introdução	39
2. Material e Métodos	40
3. Resultados.....	44
3.1. Suscetibilidade das populações de <i>R. microplus</i> aos carrapaticidas.....	44
3.2. Microscopia Eletrônica de Varredura/Espectroscópio de Dispersão de Raio x (MEV/EDS)	45
4. Discussão	50
5. Conclusão.....	53
Referências Bibliográficas	54
 CAPÍTULO II - Histologia e composição elementar da cutícula de larvas de <i>Rhipicephalus microplus</i> obtidas a partir de fêmeas tratadas com fluazuron.....	56
1. Objetivo	57
2. Material e Métodos	57
3. Resultados.....	61

3.1. Alimentação artificial	61
3.2. Caracterização da composição cuticular das larvas de <i>R. microplus</i>	62
3.3. Efeitos do fluazuron na morfologia da cutícula de <i>R. microplus</i>.....	63
4. Discussão	65
5. Conclusão.....	67
Referências Bibliográficas	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

MEV/EDS: Microscopia Eletrônica de varredura acoplado a Espectroscópio de dispersão de raio-x
TPB: Tristeza Parasitária Bovina
GlcNAc: N-acetilglicosamina
UTP: Uridina trifosfato
POA: Porto Alegre
MA: Maranhão
MG: Minas Gerais I
MG: Minas Gerais
ES: Espírito Santo
BA: Bahia

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida do carrapato bovino <i>Rhipicephalus microplus</i>	19
Figura 2. Cortes histológicos do tegumento de fêmeas semi-ingurgitadas de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> . Fêmeas coradas com: (A, D) Hematoxilina – eosina (HE); (B, E) coradas com Ponceau de Xylidina; (C, F) coradas com Azul de Toluidina; e= epiderme; sb= subcutícula; pr= procutícula.....	24
Figura 3. Estrutura molecular da quitina.	28

CAPÍTULO I

Figura 1. Localização cuticular do ponto de análise SEM/EDS das regiões dorsal (A) e ventral (B). O ponto de análise é destacado com o círculo vermelho tracejado.	36
Figura 2. Comparação da porcentagem de carbono na composição cuticular de larvas de <i>Rhipicephalus microplus</i> , dentro da mesma população, ao longo de 7, 14 e 21 dias de desenvolvimento. A - Composição da região dorsal da larva. B - Composição da região ventral da larva. Os valores de p se referem ao teste ANOVA de composição cuticular entre diferentes dias de desenvolvimento larval para cada população.....	36
Figura 3. Comparação da porcentagem de carbono e oxigênio na composição cuticular de larvas de <i>Rhipicephalus microplus</i> de diferentes populações. A - Composição de carbono da região dorsal. B - Composição de carbono da região ventral. C - Composição de oxigênio da região dorsal. D - Composição de oxigênio da região ventral..	36

CAPÍTULO II

Figura 1. Fêmeas de <i>R. microplus</i> posicionadas dorsoventralmente em pratos de isopor com microcapilares encaixados no hipostômio.....	45
Figura 2. Comparação do percentual de carbono e oxigênio presentes na composição da cutícula de larvas oriundas de fêmeas ingurgitadas não tratadas (grupo controle – em verde) e tratadas com fluazuron 0,01 mg/ml (em vermelho). Avaliação feita ao longo de 21 dias de desenvolvimento larval. Todas as larvas são de uma mesma população (população MGI). As diferenças estatísticas foram determinadas entre as médias de composição em cada dia específico e marcadas com asterisco (*– $p < 0.05$, **– $p < 0.01$, ***– $p < 0.001$, ****– $p < 0.0001$).....	45
Figura 3. Comparação da cutícula de larvas do grupo controle e tratadas, com 21 dias. (Seta preta = epicutícula; seta branca = procutícula; seta azul = procutícula com afinamento – grupo tratado)....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais classes carrapaticidas utilizadas e seus mecanismos de ação. **25**

CAPÍTULO I

Table 1. Mortalidade (%) de larvas de 11 populações de *Rhipicephalus microplus* tratadas com a dose discriminante (DD) de cinco compostos carrapaticidas.. **35**

Table 2. Composição percentual de carbono (média $\pm$ desvio padrão) das regiões dorsal e ventral da cutícula de larvas de diferentes populações de *Rhipicephalus microplus* com 14 dias de desenvolvimento... **36**

Table 3. Correlação de Spearman entre a composição elementar das regiões dorsal e ventral da cutícula em larvas de *Rhipicephalus microplus* e seus perfis de resistência e suscetibilidade a diferentes carrapaticidas.... **36**

CAPÍTULO II

Table 1. Efeitos do fluazuron (0,01mg/mL) nos parâmetros reprodutivos de fêmeas semi ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* alimentadas artificialmente.. **44**

1. INTRODUÇÃO

O carrapato bovino, *Rhipicephalus microplus*, é o ectoparasito responsável pelas maiores perdas econômicas na pecuária bovina, chegando a causar prejuízos de US\$3.24 bilhões por ano (GRISI et al; 2014) e devido ao seu hábito hematófago, podem transmitir agentes patogênicos como, *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis* e *Babesia bigemina*, responsáveis pelo complexo Tristeza Parasitária Bovina (TPB) (ANDREOTTI, 2010; ANDREOTTI, KOLLER e GARCIA, 2016; GARCIA et al., 2019). A TPB é uma importante doença parasitária, caracterizada por alta morbidade e mortalidade (SANTOS et al., 2017) levando o animal a óbito, além dos problemas secundários como as miíases e infecções na pele do animal.

O principal método de controle dos carrapatos é o uso de carrapaticidas sintéticos e através de diferentes bases carrapaticidas, são elas: organofosforados, piretroides, amidínicos, fenilpirazóis, lactonas macrocíclicas, benzoilfeniluréias, thiazolinas e recentemente, as isoxazolininas, através do princípio ativo Fluralaner (ANDREOTTI, 2010; HIGA et al., 2019; BARCELOS, et al., 2024).

O mercado de produtos para saúde animal no Brasil movimentava cerca de R\$ 5,3 bilhões de reais por ano, sendo 27,2% representados apenas pelos antiparasitários (SINDAN, 2018). Logo, os gastos com carrapaticidas, medicamentos, infraestrutura e mão de obra para tratamento dos animais e dos funcionários, é altíssimo. Além disso, são utilizados de forma indiscriminada trazendo diversas consequências, como intoxicação dos aplicadores e de animais, contaminação dos alimentos de origem animal e poluição ambiental.

Ademais, o uso inadequado tem causado forte pressão seletiva, acelerando o surgimento de populações resistentes à todas as classes químicas disponíveis no mercado (CAMPOS et al., 2012; OLIVO et al., 2013; TAVARES, 2022).

Por essa razão, quando falamos em mecanismos fisiológicos da resistência, tratamos sobre a diminuição de penetração cuticular do carrapaticida, que retarda a penetração de moléculas, proporcionando à natureza hidrofóbica da cutícula dos insetos, a primeira barreira de proteção contra a desidratação, agentes químicos e

microrganismos invasores.

A cutícula é um órgão altamente complexo que desempenha um papel crucial na defesa dos artrópodes, os mecanismos de expansão da cutícula, alterações na composição da proteína cuticular e síntese de quitina, permanecem pouco compreendidos.

Portanto, é crucial ampliar o conhecimento sobre a cutícula dos carrapatos, visando o desenvolvimento de estratégias mais assertivas no combate aos carrapatos e consequentemente objetivando a diminuição dos problemas na saúde animal e do meio ambiente.

Acreditamos que a composição cuticular dos carrapatos *R. microplus* de diferentes populações, pode ser composta pelos mesmos elementos químicos, porém, tendo quantidades diferentes de cada um. Além disso, supomos que o carrapaticida – fluazuron perpassa seus efeitos de inibição na sobreposição das camadas de quitina, para os descendentes de fêmeas tratadas com ele, diminuindo a espessura e modificando a composição da cutícula.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho é avaliar a composição química elementar e a histologia da cutícula de larvas de diferentes populações do carrapato *Rhipicephalus microplus* obtidas a partir de fêmeas tratadas ou não com fluazuron.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. O carrapato *Rhipicephalus microplus* e as estratégias de controle

Os carrapatos são divididos em três famílias distintas: Ixodidae, Argasidae e Nutralliellidae, compreendendo cerca de 950 espécies descritas (DANTAS-TORRES et al., 2019; GARCIA et al., 2019).

A família Ixodidae compreende os “carrapatos duros”, é composta por 14 gêneros, onde 5 deles, são encontrados na região neotropical. Dentro deles, o gênero *Rhipicephalus*, que possui 82 espécies descritas, sendo *R. microplus* umas delas, que anteriormente foi classificada como *Bhoophilus microplus* e reclassificada após novas

análises filogenéticas, se tornando um subgênero (BURGER et al., 2014).

O seu ciclo de vida é monoxeno, podendo ser dividido em fase não parasitária e parasitária (FERRETO, 2013) (Figura 1). A fase parasitária constitui todo o período que o carrapato se encontra no hospedeiro, desde a fixação da larva até a fêmea ingurgitada, esse período compreende em média 21 dias (GARCIA et al., 2019).

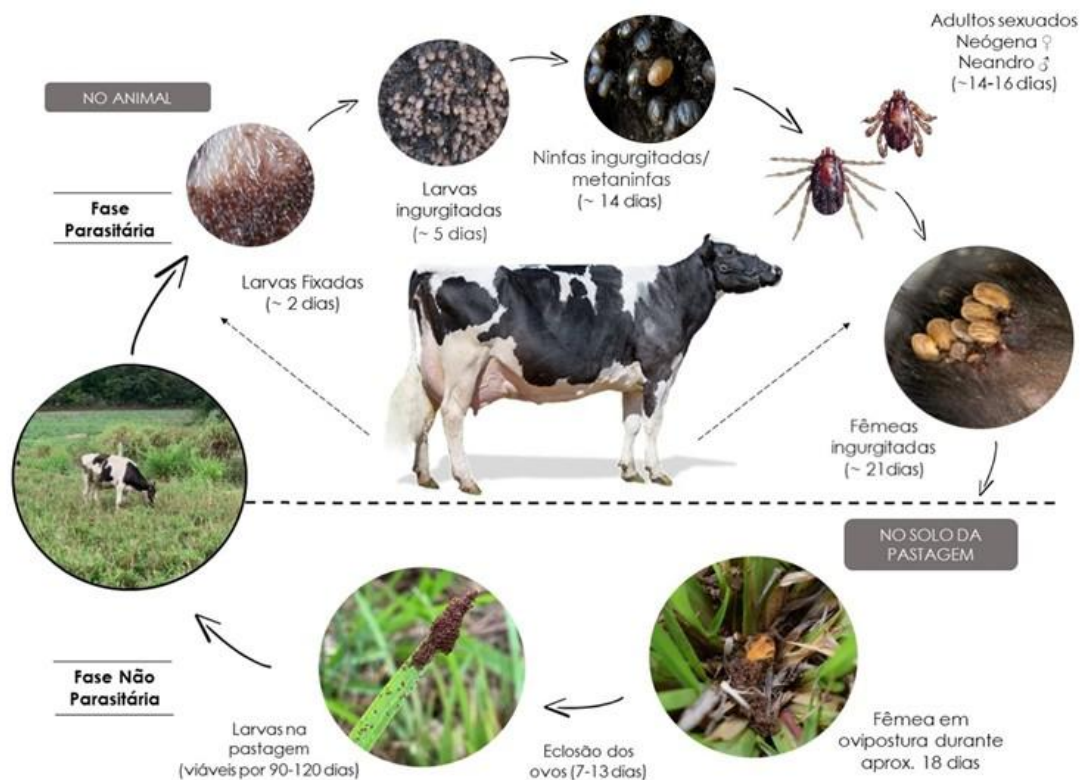


Figura 1: Ciclo de vida do carrapato bovino *Rhipicephalus microplus* (Sousa, 2022).

A fase de vida não parasitária se inicia a partir do momento em que a fêmea ingurgitada se desprende do animal e cai no solo, onde irá procurar um local adequado para realização da postura, e esse período se estende até a eclosão das larvas, e encontro de um novo hospedeiro. A fase não parasitária pode durar aproximadamente 70 dias, podendo ocorrer até 5 gerações por ano, mas esse tempo pode variar, devido a fatores como, temperatura ambiental, humidade relativa, tipo de forrageira e manejo da pastagem que afetam diretamente essa fase (GONZALES, 1974; CRUZ et al.,

2020).

O ciclo de vida parasitário inicia com as larvas infestantes (4 a 6 dias após eclosão), estando com a cutícula enrijecida, entrando em contato com o hospedeiro, na fase de larva até o carrapato se tornar adulto, o que leva cerca de 21 dias (ROCHA et al., 1984; BEYS DA SILVA et al., 2014; VERÍSSIMO, 2015).

Durante o repasto sanguíneo os carrapatos podem inocular, juntamente com a saliva, diferentes patógenos causadores de doenças aos bovinos, como as bactérias *B. bovis*, *B. bigemina* e o protozoário *A. marginale*, que são responsáveis, juntos, pelo Complexo da Tristeza Parasitária (TPB) (GUGLIELMONE et. al., 2006).

Os carrapatos afetam 80% da população mundial de gado bovino e estão associados a inúmeros efeitos econômicos e para a saúde (HURTADO & GIRALDO-RÍOS, 2019). A infestação por esses ectoparasitos pode afetar diretamente a produção de leite e carne em consequência à perda de peso do animal, redução da produção do leite, irritação e lesões na pele do animal que afetam a qualidade do couro, podendo atuar como porta de entrada para infecções secundárias. Estas infecções representam um impacto negativo para a atividade pecuária, comprometendo o processo de produção dos produtos de origem animal, causados pelos efeitos do parasitismo sobre a produtividade do gado (DOMINGUES et al., 2013; GRISI et al., 2014).

O controle do carrapato é fundamentalmente baseado no uso de carrapaticidas químicos, porém, problemas com a seleção de populações resistentes às drogas disponíveis, tem pressionado a indústria e os produtores a buscarem novas alternativas de controle, produtos baseados em moléculas naturais, baixa contaminação ambiental e animal, além de retardar a o surgimento de populações resistentes.

No entanto, o controle desta espécie tornou-se cada vez mais desafiador e os relatos de populações resistentes aumentaram consideravelmente nos últimos dez anos (DZEMO et al., 2022, GOMES et al., 2015, KLAFKE et al., 2017, LOPES et al., 2014, MACIEL et al., 2016, RECK et al., 2014a, RODRIGUEZ-VIVAS et al., 2018, VILELA et al., 2020).

O grupamento químico das lactonas macrocíclicas causou grande impacto no setor agropecuário, devido ao fato de poder ser utilizado em diferentes espécies animais, assim como pela eficácia comprovada frente a artrópodes e nematoides gastrointestinais de bovinos (COSTA, 2004).

As avermectinas foram introduzidas na medicina veterinária no ano de 1980, e são produzidas através da fermentação do fungo actinomiceto do solo *Streptomyces avermitilis* (HIGA et al., 2015).

Em 1985, a abamectina, também chamada de avermectina B1a, foi introduzida como inseticida e carrapaticida na agricultura, e mais tarde utilizada em animais como potente antiparasitário. A abamectina foi desenvolvida como produto injetável para a utilização em bovinos, e graças a seu amplo espectro de ação, eficácia e segurança clínica tem sido amplamente utilizada em ruminantes, suínos e equinos (SHOOP et al., 1995).

Já as benzoilfeniluréias atuam inibindo o crescimento de artrópodes e possuem a capacidade de inibir a produção de quitina, o maior componente presente na cutícula dos carrapatos.

A maioria dos carrapaticidas/carrapaticidas possui ação neurotóxica (Tabela 1). E levando em consideração as questões de resistências à diversas classes desses carrapaticidas, a indústria de químicos desenvolveu outros produtos com mecanismos de ação diferenciados, para complementar o atual quadro de controle químico, tanto de insetos quanto de carrapatos. A molécula do fluazuron pertence a uma família carrapaticida conhecida como benzoilfeniluréias ou “reguladores do crescimento” e, assim como outros carrapaticidas, foi desenvolvido primeiramente para controle de insetos. Atua impedindo o desenvolvimento e o processo de muda os carrapatos, além de impedir a eclosão de larvas, controlando assim a população de carrapatos (BULL et al., 1996; MERZENDORFER & ZIMOCH, 2003; CHEN et al., 2005; MOREIRA et al., 2007; ARAKANE et al., 2005).

Tabela 1. Principais classes carrapaticidas utilizadas e seus mecanismos de ação.

Classe carrapaticida	Carrapaticidas comuns utilizados	Sítio de ação	Modo de ação	Referência
Organofosforado	Clorpirifós, clorfenvinfós	Sistema nervoso	Inibidor de acetilcolinesterase	Fukuto, 1990.
Piretróide	Cipermetrina	Sistema nervoso	Modulador de canais de sódio	Narahashi, 1971; Hayes; Wailand, 1982.
Formamidina	Amitraz	Sistema nervoso	Agonista da octopamina	Jonsson et al., 2018.
Lactona macrocíclica	Avermectinas	Sistema nervoso	Ativador de canal de cloro (via GABA e/ou glutamato)	Cully et al., 1994; Yates et al., 2003; Wolstenholme, 2012.
Fenilpirazol	Fipronil	Sistema nervoso	Bloqueador do canal de cloro (agonista do GABA; glutamato)	Bloomquist, 1993; Cole et al., 1993.
Benzoilfeniluréia	Fluazuron	Quitina (exoesqueleto)	Inibe a síntese de quitina	Graf, 1993.
Isoxazolina	Fluralaner	Sistema nervoso	Bloqueador dos canais de cloreto ativados por glutamato e ácido gama-aminobutírico (GABA)	Zhou, et al., 2022; Rodriguez, et al., 2019

Por conta deste cenário, a ciência busca estratégias mais eficazes, que possam auxiliar no controle do carrapato, usando por exemplo, carrapaticidas sintéticos em época e intervalos preestabelecidos, levando em consideração o tempo de densidade baixa da população de carrapatos e o período residual do produto (controle estratégico) ou a utilização dos produtos apenas em animais com determinada quantidade de carrapatos, deixando outros animais de fora do tratamento, hipoteticamente diminuindo a questão da resistência (controle seletivo) (FURLONG e SALES, 2007; PEREIRA et al., 2008; PAIM et al., 2011, MOLENTO et

al., 2013).

2.2. Resistência cuticular

Rhipicephalus microplus, desenvolve resistência a carrapaticidas por diferentes mecanismos, incluindo mutações nos alvos moleculares, como canais de sódio e acetilcolinesterase (George et al., 2004; KUMAR et al., 2020), aumento na atividade de enzimas de detoxificação, como citocromos P450 e esterases (Li et al., 2004), e alterações na cutícula que reduzem a penetração do produto (Guerrero et al., 2012). Além disso, bombas de efluxo celular, como transportadores ABC, podem expelir carrapaticidas, dificultando sua ação (Rodriguez-Vivas et al., 2017).

Apesar de alguns autores relatarem a resistência cuticular como um possível mecanismo presente em carrapatos, não há nenhum estudo que tenha comprovado resistência cuticular em nesses ectoparasitos. Em se tratando especificamente de resistência cuticular, temos os insetos como os organismos com o mecanismo mais bem elucidado e que servem de referência para estudos em outros organismos.

A resistência à penetração refere-se a modificações como o espessamento da cutícula e a alteração da composição da cutícula na cutícula, principalmente através da maior deposição de componentes estruturais, como lipídios epicuticulares e/ou proteínas cuticulares estruturais (AHMAD, et al., 2006; PEDRINI, 2009; KOGANEMARU et al., 2013; JONES, 2013), o que eventualmente retarda a penetração de moléculas de inseticidas no corpo dos insetos.

A resistência à penetração já foi relatada em vários insetos como, *Musca domestica*, *Blattella germanica*, *Aedes aegypti* e *Cimex lectularis* (PLAP, et al., 1968; SCOTT, et al., 1986; KOGANEMARU, et al., 2013; LEE, et al., 1997; ZHU, et al., 2013; KASAI, et al., 2014; LILLY, et al., 2016).

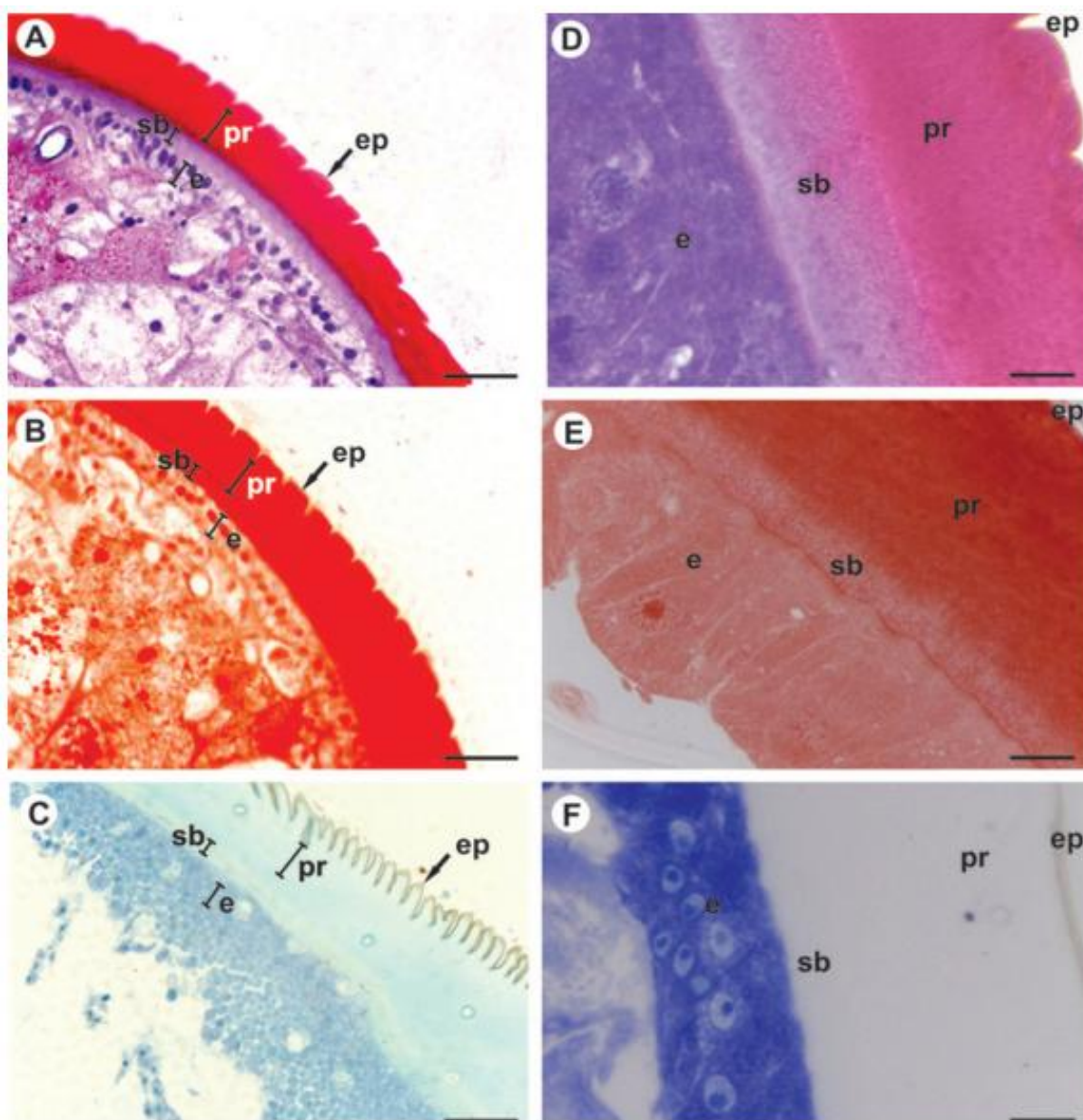
Um estudo feito por Meng et al., (2023) descobriu que o tegumento contribui com mais de 40,0% para a resistência a inseticidas por meio de diferentes estratégias de administração de inseticidas na mosca-das-frutas oriental e que existe uma relação negativa entre o espessamento da cutícula e a penetração de inseticidas em

resistentes/suscetíveis, também em linhagens de campo.

O papel da cutícula em impedir a penetração de inseticidas foi demonstrado em *Cimex lectularius* (percevejo) e *Myzus persicae* (pulgão), onde menor mortalidade foi observada após aplicação tópica de inseticidas do que após sua injeção ou ingestão. A penetração cuticular de inseticidas radioativos foi 30–50% menor em *Drosophila melanogaster* (mosca da fruta) e *Anopheles gambiae* (mosquito) resistentes a inseticidas do que em cepas desses insetos suscetíveis a inseticidas. Acredita-se que esse mecanismo seja conferido por alterações na composição cuticular e na estrutura física, impedindo que as moléculas de inseticidas atinjam seus alvos receptores (Wigglesworth, 1985; Livak, et al., 2001; Vicent, et al., 2004; Dittmer, et al., 2015; Vannini, et al., 2016; Cai, et al., 2024).

2.3. A cutícula dos carrapatos

A cutícula dos carrapatos desempenha um papel essencial na proteção, crescimento e sobrevivência desses ectoparasitas. Estruturalmente, é composta por três camadas principais: uma camada externa, a epicutícula, e a procutícula, que é mais interna. Essas camadas, formadas por lipídios, proteínas e ésteres, atuam como barreiras físicas e químicas contra patógenos e fatores ambientais adversos, além de limitar a penetração de carrapaticidas, reduzindo a eficácia desses produtos (Cherry, 1969; Hamilton et al., 1989; Mente et al., 2010) (Figura 2).



Bars: (A-C) 50 µm; (D-F) 10 µm

Figura 2. Cortes histológicos do tegumento de fêmeas semi-ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*. Fêmeas coradas com: (A, D) Hematoxilina – eosina (HE); (B, E) coradas com Ponceau de Xylidina; (C, F) coradas com Azul de Toluidina; e= epiderme; sb= subcutícula; pr= procutícula (CAMARGO-MATHIAS, 2018).

A composição molecular da cutícula inclui quitina como o principal componente estrutural, um polissacarídeo linear composto por unidades repetitivas de N-acetilglicosamina (GlcNAc) ligadas por ligações β -1,4. Essa quitina forma microfibrilas altamente organizadas, conferindo rigidez e resistência mecânica. Além disso, a quitina apresenta variações cristalinas, como a α -quitina, que fornece sustentação estrutural ao exoesqueleto. Proteínas cuticulares e lipídios complementam a matriz da cutícula, conferindo propriedades mecânicas e hidrofóbicas (Zhang et al., 2016; Rudall, 1963; Andersen & Roepstorff, 2005; Lees, 1952) (Figura 3).

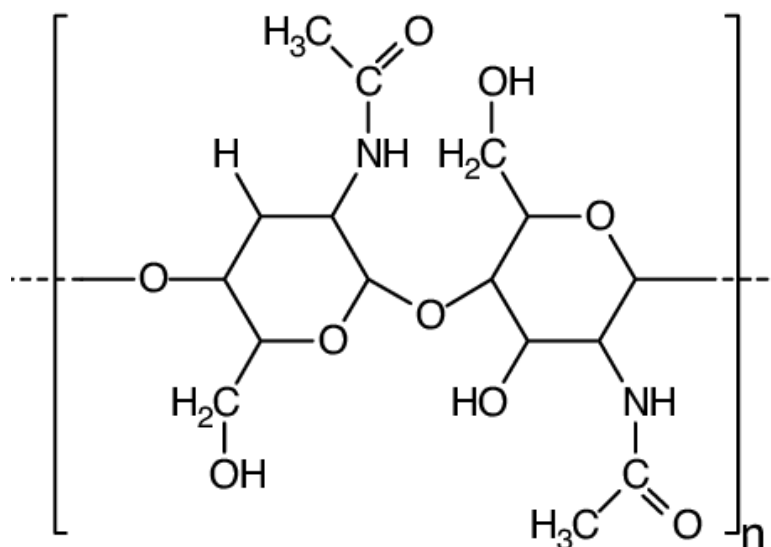


Figura 3. Estrutura molecular da quitina (YONG, et al., 2003).

A importância da cutícula vai além de sua função protetiva. Ela isola os órgãos internos do ambiente, protege contra agentes patogênicos e toxinas e proporciona suporte estrutural ao corpo do carrapato. Durante a alimentação sanguínea, a cutícula demonstra uma plasticidade única ao expandir sua área superficial para acomodar grandes volumes de sangue, uma adaptação essencial para a sobrevivência do carrapato (Andersen & Roepstorff, 2005; Starck et al., 2018). No entanto, essa estrutura também é um alvo potencial para carrapaticidas, que buscam inibir

componentes essenciais da formação e manutenção da cutícula, como as proteínas cuticulares (Santos et al., 2020; Wang et al., 2020).

O processo fisiológico de formação e renovação da cutícula está intimamente ligado ao crescimento dos carrapatos. Durante os períodos de muda, há uma completa renovação da cutícula para permitir o aumento do corpo. A síntese de quitina envolve reações enzimáticas que convertem glicose em polímeros de GlcNAc, os quais são transportados, polimerizados e integrados à matriz cuticular. Essas reações são cruciais para a formação de microfibrilas e a manutenção da integridade da cutícula. Além disso, a elasticidade da cutícula abdominal durante a alimentação sanguínea reflete a adaptação evolutiva desses organismos às condições de seu ciclo de vida (Gaudêncio, 2016; Moussián, 2019; Andersen & Roepstorff, 2005). Assim, o estudo detalhado da estrutura e das funções da cutícula dos carrapatos é fundamental para o desenvolvimento de novas estratégias de controle desses parasitos.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar a composição química elementar e a histologia da cutícula de larvas de diferentes populações do carrapato *Rhipicephalus microplus* obtidas a partir de fêmeas tratadas ou não com fluazuron.

3.2. Objetivos Específicos

- Comparar a composição química elementar cuticular das larvas de diferentes populações de *R. microplus*;
- Determinar a diferença na composição química elementar da cutícula de larvas de *R. microplus* obtidas a partir de fêmeas tratadas com fluazuron;

- Correlaciona a composição cuticular e perfil de resistência carrapaticida de larvas de diferentes populações de *R. microplus*;
- Avaliar as alterações histológicas da cutícula das larvas obtidas de fêmeas tratadas com fluazuron, a partir de uma nova técnica histológica;

4. RESULTADOS

Os resultados da presente dissertação estão apresentados sob forma de capítulos.

- **Capítulo I** – Composição elementar da cutícula de larvas de *Rhipicephalus microplus* de diferentes populações no Brasil.
- **Capítulo II** – Histologia e composição elementar da cutícula de larvas de *Rhipicephalus microplus* obtidas a partir de fêmeas tratadas com fluazuron.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, M. et al. Penetração cuticular retardada e metabolismo aumentado de deltametrina em cepas de *Helicoverpa armigera* resistentes a piretróides da China e do Paquistão Ciência do gerenciamento de pragas. 2006.

ANDREOTTI, R. Situação atual da resistência do carrapato-do-boi *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* aos carrapaticidas no Brasil. 2º edição. Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, Minas Gerais. 2010.

ANDREOTTI, R.; KOLLER, W.W.; GARCIA, M.V. Procedimentos para o controle do carrapato-do-boi em dez passos. p. 197-207. In: Carrapatos protocolos e técnicas para estudo. eds. ANDREOTTI, R.; KOLLER, W.W.; GARCIA, M.V. Embrapa, Brasília, Distrito Federal. 2016

ARAKANE, Y., HOGENKAMP, D.G., ZHU, Y.C., KRAMER, K.J., SPECHT, C.A., BEEMAN, R.W., et al. Characterization of two chitin synthase genes of the red flour beetle, *Tribolium*. (2004)

BEYS-DA-SILVA, W.O., SANTI, L., BERGER, M., CALZOLARI, D., PASSOS, D.O., GUIMARÃES, J.A., MORESCO, J.J., YATES, J.R. Secretome of the biocontrol agent *Metarhizium anisopliae* induced by the cuticle of the cotton pest *Dysdercus peruvianus* reveals new insights into infection. *Journal of Proteome Research*, v. 13, p. 2282-2296, (2014)

BULL, M. S., SWINDALE, S., OVEREND, D., & HESS, E. A. Supression of *Boophilus microplus* populations with fluazuron- an acarine growth regulator. *Australian Veterinary Journal*, 74(6), 468-470. 1996.

CAI, T. et al. Características morfológicas ovarianas e proteoma revelam desvantagens de aptidão à fecundidade em cepas resistentes à beta-cipermetrina de *Blattella germanica* (L.) (Blattodea: Blattellidae) Pest. Bioquímica. Fisiológica. 2020.

CAMARGO-MATHIAS, M. I., ed. *Inside ticks: morphophysiology, toxicology and therapeutic perspectives* [online]. São Paulo: Editora Unesp, 199 p. ISBN: 978- 85954-62-86-1. <https://doi.org/10.7476/9788595462861>. 2018.

CAMPOS, R. N. S., BACCI, L., ARAÚJO, A. P. A., BLANK, A. F., ARRIGONI-BLANK, M. F., SANTOS, G. R. A., & RONE, M. N. B. Óleos essenciais de plantas medicinais e aromáticas no controle do carrapato *Rhipicephalus microplus*. *Archivos de Zootecnia*. 61, 67-78. <https://doi.org/10.21071/az.v61i237.2>. 2012.

CHEN, L., WANG, Q., HUANG, R., MAO, C., SHANG, J., & BI, F. Synthesis and insecticidal evaluation of propesticides of benzoylphenylureas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(1), 38-4. 2005.

COSTA, A. J. Atividade endectocida de uma inovação quimioterápica (ivermectina + abamectina): resultados de 12 avaliações experimentais. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 13, 171-177. 2004.

CRUZ, B. C., DE LIMA, M. A. F., MACIEL, W. G., DOS SANTOS, I. B., GOMES, L. V. C., FELIPPELLI, G., et al. Biological parameters for *Rhipicephalus microplus* in the field and laboratory and estimation of its annual number of generations in a tropical region. *Parasitol Res.*;119(8):2421–30. 2020.

DANTAS-TORRES, F. et al. Ticks (Ixodida: Argasidae, Ixodidae) of Brazil: updated species checklist and taxonomic keys. *Ticks and born diseases*, v. 10, n. 6, p. 101252, 2019.

DOMINGUES, L. F., GIGLIOTO, R., FEITOSA, K. A., FANTATTO, R. R., RABELO, M. D., OLIVEIRA, C. S., OLIVEIRA, G. P., BECHARA, G. H., & CHAGAS, A. C. S. In vitro activity of pineapple extracts (*Ananascomosus*, Bromeliaceae) on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Experimental Parasitology*. 134, 400-404. 2013.

DITTMER, N.T. Annotation and expression analysis of cuticular proteins from the tobacco hornworm, *Manduca sexta* *Insect Biochem Mol Biol* 2015.

DZEMO, W.D., THEKISOE, O., VUDRIKO, P. Development of acaricide resistance in tick populations of cattle: A systematic review and meta-analysis. *Heliyon* 8, e08718. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e08718>. 2022.

FERRETTO R. Revisão de Literatura sobre *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.; 46. 2013.

GARCIA M.V.; RODRIGUES, V.S.; KOLLER, W.W.; ANDREOTTI, K. Biologia e importância do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. p. 17-27. In: Carrapatos na cadeia produtiva de bovinos. eds. ANDREOTTI, R.; GARCIA, M.V.; KOLLER, W.W. Embrapa, Brasília, Distrito Federal. 2019.

GEORGE, J. E. & DAVEY, R. B. Eficácia terapêutica e persistente de uma única aplicação de doramectina aplicada como pour-on ou injeção em bovinos infestados com *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology*, 41 (3), 402 – 407. Disponível em: <https://doi.org/10.1603/0022-2585-41.3.402>. 2004.

GRISI, L.; LEITE, R.C.; MARTINS, J.R.S.; BARROS, A.T.M.; ANDREOTTI, R.; CANÇADO, P.H.D.; LEÓN, A.A.P.; PEREIRA, J.B.; VILLELA, H.S.. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology* 23(2):150–156. 2014

GUERRERO, F.D., LOVIS, L., MARTINS, J.R. Acaricide resistance mechanisms in *Rhipicephalus microplus*. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 21, 1–6. 2012.

GUGLIELMONE A. A.; ROBBINS R. G.; APANASKEVICH, D. A.; PETNEY, T. N.; ESTRADA-PEÑA A.; HORAK I. G.; et al. The argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world: A list of valid species names. *Zootaxa.*; 28(2528):1–28
 Ishaaya, I. e Degheele, D. (1998) Inseticides with novel modes of action: Mechanisms and application. Springer link. 2010.

GONZALES, J. C. O ciclo parasitário do *Boophilus microplus* (can 1887) em bovinos estabulados. MESTRE JOU, editor. *Arq fac vet.* 1974;2(1):25–34. 1974.

GAUDÊNCIO FN, TUNHOLI-ALVES VM, LIMA MG, GÔLO PS, DA COSTA ANGELO I, CASTRO RN, DA FONSECA AH, SCOTT FB, PINHEIRO J. Alterations in the oxidative metabolism of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ticks in response to exposure to the insect growth regulator fluazuron. *Revista Brasileira De Parasitologia Veterinária.* 25:54–60. 2016.

GOMES, L. V. C., LOPES, W. D. Z., CRUZ, B. C., TEIXEIRA, W. F., FELIPPELLI, G., MACIEL, W. G., BICHUETTE, M. A., RUIVO, M. A., ALCANTARA COLLI, M. H., CARVALHO, R. S., MARTINEZ, A. C., SOARES, V. E., & DA COSTA, A. J. Carrapaticidal effects of fluazuron (2.5 mg/kg) and a combination of fluazuron (1.6 mg/kg) + ivermectin (0.63 mg/kg), administered at different routes, against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* parasitizing cattle. *Experimental Parasitology*, 153, 22-28. 2015.

HIGA, L.O.S.; GARCIA, M.V.; BARROS, J.C.; BONATTE JUNIOR, P.. Controle do carrapato-do-boi por meio de carrapaticidas. p. 137–147. In: ANDREOTTI, R.; GARCIA, M.V.; KOLLER, W.W. Carrapatos na cadeia produtiva de bovinos. Embrapa, Brasília, Distrito Federal. 2019

HIGA LOS, GARCIA MV, CAVALCANTE JB, KOLLER WW, ANDREOTTI R. Acaricide resistance status of the *Rhipicephalus microplus* in Brazil. *Med Chem* 5:326–333. 2015.

HURTADO, O. J. B., & GIRALDO-RÍOS, C. Economic and Health Impact of the Ticks in Production Animals. In: Abubakar M, Perer K. Ticks and Tick Borne Pathogen, London, UK, Intech Open. 10.5772/intechopen.81167. 2019.

JONES, C. M. A dinâmica da resistência aos piretróides em *Anopheles arabiensis* de Zanzibar e uma avaliação da base genética subjacente Vetores de parasitas 2013.

KASAI, S. *et al.* Mecanismos de resistência a piretróides no mosquito vetor da dengue, *Aedes aegypti*: Insensibilidade ao sítio alvo, penetração e metabolismo. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **8** (6), e2948 2014.

KLAFKE, G., WEBSTER, A., DALL AGNOL, B., PRADEL, E., SILVA, J., DE LA CANAL, L.H., BECKER, M., OSORIO, M.F., MANSSON, M., BARRETO, R., SCHEFFER, R., SOUZA, U.A., CORASSINI, V.B., DOS SANTOS, J., RECK, J., MARTINS, J.R. Multiple resistance to acaricides in field populations of *Rhipicephalus microplus* from Rio Grande do Sul state, Southern Brazil. *Ticks Tick Borne Dis.* **8**, 73–80. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.09.019>. 2017.

KOGANEMARU, A. *et al.* A resistência robusta à penetração cuticular no percevejo comum (*Cimex lectularius* L.) correlaciona-se com o aumento dos níveis de transcrição no estado estacionário dos genes da proteína da cutícula do tipo CPR. *Pesticida Biochem Physiol* 2013.

KUMAR, R. *et al.* Voltage-gated sodium channel gene mutations and pyrethroid resistance in *Rhipicephalus microplus*. *Ticks and tick-borne diseases*, v. **11**, n. **3**, p. 101404, 2020.

LILLY, D. G. Cuticle thickening in a pyrethroid-resistant strain of the common bed bug, *Cimex lectularius* L. (Hemiptera: Cimicidae) *PLoS One* 2016.

LI, A. Y., DAVEY, R. B., & MILLER, R. J. Detection and characterization of resistance to acaricides in field populations of the southern cattle tick, *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology*, **41**(3), 193-200. 2004.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. (2001) Análise de dados de expressão gênica relativa usando PCR quantitativo em tempo real e método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. *Métodos* **25**: 402–408.

LOPEZ-ARIAS, A., VILLAR-ARGAIZ, D., CHAPARRO-GUTIERREZ, J.J., MILLER, R.J., PEREZ DE LEON, A. A., 2014. Reduced efficacy of commercial acaricides against populations of resistant cattle tick *Rhipicephalus microplus* from two municipalities of Antioquia, Colombia. *Environ. Health Insights* **8**, 71–80. <https://doi.org/10.4137/EHI.S16006>.

MACIEL, W. G., LOPES, W. D. Z., GOMES, L. V. C., CRUZ, B. C., FELIPPELLI, G., SANTOS, I. B. D., *et al.* Susceptibility of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* to fluazuron (2.5 mg/kg) and a combination of novaluron (2.0 mg/kg) + eprinomectin (0.36 mg/kg) in field studies in Brazil. *Prev Vet Med* 2016; **135**: 74-86.

MERZENDORFER H, ZIMOCH L. Metabolismo da quitina em insetos: estrutura, função e regulação das sintases de quitina e quitinases. *J Exp Biol* 206:4393–4412

(2003).

MENG, L. W. Sequenciamento de RNA para injeção de imitação de miRNA, leituras de sequência bruta. NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra?> 2022.

MOLENTO, M. B.; VERÍSSIMO, C. J.; AMARANTE, A. T.; VAN WYK, J. A.; CHAGAS, A. C. S.; ARAÚJO, J. V.; BORGES, F. A. Alternative techniques for the control of gastrointestinal nematodes in small ruminants. *Arquivos do Instituto Biológico*, v.80, n.2, p.253- 263, 2013.

MOREIRA, M. F., SANTOS, A. S., MAROTTA, H. R., MANSUR, J. F., RAMOS, I. B., MACHADO, E. A., SOUZA, G. H., EBERLIN, M. N., KAISER, C. R., KRAMER, K. J., MUTHUKRISHNAN, S., & VASCONCELLOS, A. M. A chitin-simile component in *Aedes aegypti* eggshells, eggs and ovaries. *Insect Biochemistry and Insect Molecular Biology*, 37(12), 1249–1261. 2007.

MOUSSIAN, B. Chitin: Structure, Chemistry and Biology. In: Yang, Q., Fukamizo, T. (eds) *Targeting Chitin-containing Organisms. Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 1142. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-7318-3_2. 2019.

OLIVO, C. A., AGNOLIN, C. A., PARRA, C. L. C., NEILA, F. S. V., RICHARDSI, S. P. S., PELLEGRINI, L. G., WEBE, A., PIVOTO, P., & ARAÚJO, L. Efeito do óleo de eucalipto (*Corymbia citriodora*) no controle do carrapato bovino. *Ciência rural*. 43(2), 331-337. 2013.

PAIM RM, ARAÚJO RN, SOARES AC, LEMOS LC, TANAKA AS, GONTIJO NF, ET AL. Influence of the intestinal anticoagulant in the feeding performance of triatomine bugs (Hemiptera; Reduviidae). *Int J Parasitol*. 41(7):765–73. 2011.

PEDRINI, N. Controle de vetores da doença de Chagas resistentes a piretróides com fungos entomopatogênicos *PLoS Negl Trop Dis* 2009.

PEREIRA KS, SCHMIDT FL, GUARALDO AM, FRANCO RM, DIAS VL, PASSOS LA. 2009. Chagas disease as a foodborne illness. *J Food Prot*; 72: 441–46

RECK J, KLAFKE GM, WEBSTER A, DALL`AGNOL B, SCHEFFER R, SOUZA UA, CORASSINI VB, VARGAS R, SANTOS JS, MARTINS JRS (2014) Primeiro relato de resistência ao fluazuron em *Rhipicephalus microplus* : uma população de carrapatos resistentes a seis classes de carrapaticidas. *Veterinary Parasitol* 201(1–2):128–136.

ROCHA, U. F.; BANZATTO, D. A.; WOELZ C. R.; BECHARA G. H.; GALLUZZI F. D.; GARCIA M. C. C.; Ecologia de carrapatos VII — a escassa influência da luz do dia sobre oviposição e embriogênese de *Boophilus microplus* (Canestrini); equivalência de contagens de larvas e de cascas d'ovos. Vol. 5, Semina: Ciências Agrárias. 1984. p. 5.

RODRIGUEZ-VIVAS, R. I., et al. Evolution of acaricide resistance in tick populations: a systematic review. *Veterinary Parasitology*, v. 233, 1-10. 2017.

SANTOS, Vanessa Sardinha dos. "Artrópodes"; Brasil Escola. Disponível em: <https://brasilecola.uol.com.br/biologia/artropodes2.htm>. Acesso em 04 de julho de 2024.

SCOTT, J. G.; GEORGHIOU, G. P. Mechanisms responsible for high levels of permethrin resistance in the house fly. *Pestic Sci* 17: 195–206. 1986.

SHOOP, W. L., MROZIK, H., & FISHER, M. H. Structure and activity of avermectins and milbemycins in animal health. *Veterinar y Parasitology*, 59(2), 139–156. [http://dx.doi.org/10.1016/0304-4017\(94\)00743-V](http://dx.doi.org/10.1016/0304-4017(94)00743-V). PMID:7483237. 1995.

SOUSA, I.C., FIGUEREDO, W.K.R., TAVARES, C.P., GOMES, M.N., KLAFKE, G.M., SILVA, A.C. et al. Development and validation of software that quantifies the larval mortality of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* cattle tick. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 13, 101930. 2022.

TAVARES, C. P., SOUSA, I. C., GOMES, M. N. MIRÓ, V., VIRKEL, G., LIFSCHITZ, A., COSTA-JUNIOR, L. M. Combination of cypermethrin and thymol for control of *Rhipicephalus microplus* – Efficacy evaluation and description of an action mechanism. *Ticks Tick Borne Dis*. 13, 101874. 2022.

VERÍSSIMO, C. J., & KATIKI, L. M. Alternativas de controle do carrapato-do-boi na pecuária leiteira. *Resistência e Controle do Carrapato-do-boi*. Instituto de Zootecnia, Nova Odessa 76: 113 p. 2015.

VILELA, V. L. R., FEITOSA, T. F., BEZERRA, R. A., KLAFKE, G. M. & Riet-Correa, F. Multiple acaricide-resistant *Rhipicephalus microplus* in the semi-arid region of Paraíba state, Brazil. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 11, 101413. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2020.101413>. 2020.

WANG, G. et al., *Biologia e Gestão da Barata Alemã* 2021.

WIGGLESWORTH, V. W. A cutícula do inseto *Biol. Rev. Filós. Soc.*, 23, pp. 408 – 451.1948.

ZHANG H, ZHAO M, LIU Y, ZHOU Z, GUO J. Identificação de genes da monoxigenase do citocromo P450 e sua expressão em resposta à alta temperatura no besouro-pulga-da-erva-jacaré *Agasicles hygrophila* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Sci Rep.* 2018;8(1):17847.

CAPÍTULO I

Composição elementar da cutícula de larvas de *Rhipicephalus microplus* de diferentes populações no Brasil.

Composição química elementar da cutícula de larvas de *Rhipicephalus microplus* de diferentes populações do Brasil.

Clarisse N. F. Barbosa¹, Marcelo H. S. Silva-Junior¹, Caio P. Tavares¹, Livio M. Costa-Junior^{1*}

¹Laboratório de Controle de Parasitos, Departamento de Patologia, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, Maranhão, Brazil

* Corresponding author

Tel.: +55 98 32729543.

E-mail address: livio.martins@ufma.br (Livio M Costa Junior)

RESUMO

Compreender a composição elementar da cutícula de *Rhipicephalus microplus* é essencial para desvendar aspectos relacionados à resistência carrapaticida e para o desenvolvimento de estratégias de controle mais eficazes. Conhecer essas características pode permitir a escolha de práticas baseadas no histórico e nas particularidades de diferentes populações geográficas, contribuindo para um manejo integrado mais eficiente. O presente estudo teve como objetivo caracterizar a composição elementar da cutícula de larvas de *R. microplus* de diferentes populações geográficas, correlacionando essas informações com os níveis de suscetibilidade ou resistência aos principais carrapaticidas sintéticos utilizados no controle dessa espécie. Foram utilizadas larvas de 13 populações de *R. microplus* provenientes de diversas regiões do Brasil, incluindo uma população de referência (POA) com alta suscetibilidade a carrapaticidas. A suscetibilidade aos compostos cipermetrina, clorpirifós, fipronil, doramectina e moxidectina foi avaliada para 11 populações pelo teste de pacote larval (LPT), com base em critérios de mortalidade para classificação da resistência. A composição elementar da cutícula larval foi analisada por Microscopia Eletrônica de Varredura acoplada a Espectroscópio de Dispersão de Raios-X (MEV/EDS). No Experimento I, larvas de 7, 14 e 21 dias de desenvolvimento das populações POA, MA e MGI foram avaliadas para identificar mudanças composicionais ao longo do tempo. No Experimento II, larvas de 14 dias de 11 populações (incluindo POA) foram analisadas para investigar diferenças na composição cuticular entre populações e possíveis correlações com perfis de suscetibilidade carrapaticida. Os dados foram submetidos a análises estatísticas, incluindo testes t de Student, ANOVA com Tukey, e correlação de Spearman, com categorização qualitativa da resistência carrapaticida. A população de referência POA demonstrou suscetibilidade a todos os carrapaticidas testados, enquanto as demais populações apresentaram resistência variável (baixa, média e alta) a cipermetrina, clorpirifós e fipronil, mantendo suscetibilidade universal à doramectina e à moxidectina. Na análise de microscopia eletrônica (Experimento II), foi observada uma

composição elementar predominantemente de carbono na cutícula larval, com diferenças estatisticamente significativas entre as populações e entre as regiões dorsal e ventral, sendo que a região dorsal apresentou maior percentual de carbono em 9 das 11 populações analisadas. Além disso, identificou-se uma correlação positiva forte e significativa entre o percentual de carbono dorsal e a resistência à cipermetrina ($r = 0.7728$, $p = 0.0081$). Embora a correlação para clorpirifós e fipronil tenha sido positiva, não alcançou significância estatística. Já a composição de carbono na região ventral apresentou correlação negativa muito fraca e não significativa com os carrapaticidas avaliados. Não foi possível correlacionar a composição cuticular com a resistência à doramectina e moxidectina devido à suscetibilidade universal a esses compostos. Este estudo se apresenta como o primeiro relato da tentativa de elucidação da composição, a nível de elementos químicos, da cutícula de larvas de diferentes populações de *R. microplus*, e foi possível detectar uma possível correlação entre a composição cuticular com a resistência aos carrapaticidas.

Palavras-chave: Composição; Espectroscopia Eletrônica de Dispersão de raio x; Tegumento; Ectoparasitos.

ABSTRACT

Understanding the elemental composition of the cuticle of *Rhipicephalus microplus* is essential for uncovering aspects related to acaricide resistance and for developing more effective control strategies. Knowing these characteristics can allow for the selection of practices based on the history and particularities of different geographic populations, contributing to a more efficient integrated management approach. This study aimed to characterize the elemental composition of the cuticle of *R. microplus* larvae from different geographic populations, correlating these findings with susceptibility or resistance levels to the main synthetic acaricides used in the control of this species. Larvae from 13 *R. microplus* populations from various regions of Brazil were used, including a reference population (POA) with high susceptibility to acaricides. Susceptibility to the compounds cypermethrin, chlorpyrifos, fipronil, doramectin, and moxidectin was assessed for 11 populations using the larval packet test (LPT), based on mortality criteria for resistance classification. The elemental composition of the larval cuticle was analyzed by Scanning Electron Microscopy coupled with Energy Dispersive X-ray Spectroscopy (SEM/EDS). In Experiment I, larvae from 7, 14, and 21 days of development from the POA, MA, and MGI populations were evaluated to identify compositional changes over time. In Experiment II, 14-day-old larvae from 11 populations (including POA) were analyzed to investigate differences in cuticular composition between populations and potential correlations with acaricide susceptibility profiles. The data were subjected to statistical analyses, including Student's t-tests, ANOVA with Tukey, and Spearman's correlation, with qualitative categorization of acaricide resistance. The reference population POA demonstrated susceptibility to all tested acaricides, while the other populations exhibited variable resistance (low, medium, and high) to cypermethrin, chlorpyrifos, and fipronil, maintaining universal susceptibility to doramectin and moxidectin. In the electron microscopy analysis (Experiment II), a predominantly carbon-based composition in the larval cuticle was observed, with statistically significant differences

between populations and between the dorsal and ventral regions. The dorsal region had a higher percentage of carbon in 9 out of the 11 populations analyzed. Furthermore, a strong and significant positive correlation was found between the dorsal carbon percentage and resistance to cypermethrin ($r = 0.7728$, $p = 0.0081$). Although the correlation for chlorpyrifos and fipronil was positive, it did not reach statistical significance. The carbon composition in the ventral region showed a very weak and non-significant negative correlation with the tested acaricides. It was not possible to correlate the cuticular composition with resistance to doramectin and moxidectin due to universal susceptibility to these compounds. This study represents the first attempt to elucidate the chemical elemental composition of the cuticle of larvae from different populations of *R. microplus*, and it was possible to detect a potential correlation between cuticular composition and resistance to tickicides.

Keywords: Composition; Energy Dispersive X-ray Spectroscopy; Integument; Ectoparasites.

1. INTRODUÇÃO

A cutícula dos carrapatos é a parte mais externa do corpo, ela tem como função principal a proteção de impactos mecânicos, agentes patogênicos, intemperes ambientais e ajuda a regular seu equilíbrio hídrico (Sonenshine e Roe, 2014), é uma barreira que impede ou diminui a penetração de compostos externos, como os carrapaticidas.

A Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios X (EDS), em conjunto com a microscopia eletrônica de varredura (SEM) ou de transmissão (TEM), fornece análises rápidas e de fácil interpretação sobre os elementos presentes na sua composição e distribuição em diversos materiais e aplicações (Burgess et al., 2017). Um dos principais benefícios do EDS é a capacidade de identificar elementos como carbono, nitrogênio e oxigênio, essenciais para as estruturas biológicas, como a cutícula dos carrapatos.

Em insetos, a composição da cutícula pode depender de relações interespecíficas, entre espécies e o ambiente, além de poder variar no estágio de desenvolvimento, gênero, idade e resistência a inseticidas (Szafrank et al., 2012; Vanini et al., 2014; Balabadinou et al., 2018; Jacobs et al., 2023). Isso caracteriza o alto grau de complexidade do material cuticular (Rajabi et al., 2017).

O carrapato *Rhipicephalus microplus* ocasiona uma perda de três bilhões de dólares anuais na cadeia produtiva de bovinos no Brasil (Grisi et al., 2014). Esse desafio tem se intensificado, com um aumento considerável nos relatos de resistência nos últimos dez anos (Lopes et al., 2014; Reck et al., 2014; Gomes et al., 2015; Maciel et al., 2016; Klafke et al., 2017; Rodriguez-Vivas et al., 2018; Vilela et al., 2020; Dzemo et al., 2022).

Essa resistência pode surgir da penetração reduzida do produto na cutícula, desintoxicação metabólica e insensibilidade no local alvo (Anholeto et al., 2017, Nodari et al., 2017, Lima-de-Souza et al., 2022, Sunkara et al., 2022, Tian et al., 2023).

O mecanismo de resistência cuticular que é comprovada em *Musca*

domestica, *Blattella germanica*, *Aedes aegypti* e *Cimex lectularis* (Plap, et al., 1968; Scott, et al., 1986; Lee, et al., 1997; Zhu, et al., 2013; Koganemaru, et al., 2013; Kasai, et al., 2014; Lilly, et al., 2016). Estes estudos sugerem que a resistência cuticular também pode ocorrer em carrapatos, mas nenhuma comprovação foi relatada. Desse modo, a compreensão da composição elementar é fundamental para desvendar aspectos composicionais que são cruciais para a interpretação de resistência ou não de populações de carrapatos aos compostos sintéticos. Embora a resistência cuticular por si só seja insuficiente para conferir resistência completa, ela atua sinergicamente com outros mecanismos de resistência para promover a eliminação eficiente de inseticidas e limitar os danos internos (Kasai et al., 2014; Balabanidou et al., 2018).

A composição química da cutícula, a nível atômica, é desconhecida em carrapatos e o conhecimento dos compostos existentes nela, é crucial para o desenvolvimento de novas técnicas de controle, ainda utilizando produtos e compostos já conhecidos quanto a sua ação e eficiência. Além disso, conhecer a composição cuticular de populações de diferentes regiões, nos leva a analisar e escolher melhores estratégias e condutas de controle, baseado no histórico e características de cada população.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Populações de carrapatos

Larvas de 13 populações de *R. microplus* oriundas de diferentes localizações geográficas do Brasil foram utilizadas neste estudo, dentre as quais: seis são originárias do estado de Minas Gerais (populações C, D, E, I, J e MGI); três do estado da Bahia (A, G e H); duas do Espírito Santo (B e F); uma do Maranhão (MA); e uma população de referência (Porto Alegre – POA) com alta suscetibilidade aos carrapaticidas sintéticos (Reck et al., 2009). POA foi cedida pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e a população MGI, pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA Gado de Leite.

2.2. Suscetibilidade das populações aos carrapaticidas

A suscetibilidade das larvas de 11 populações do estudo, exceto as população MA e MGI, foi determinada pelo teste de pacote larval (LPT) (FAO, 2004). Estas duas populações não tiveram o seu perfil de suscetibilidade avaliadas neste estudo.

Para a realização do LPT, papéis-filtro de tamanho padrão (Whatman nº1, 850 mm x 750 mm) foram impregnados com 700 µL de uma solução composta por 1mL do carrapaticida + 14mL de azeite de oliva + 30mL tricloroetileno. Cada solução corresponde às doses discriminatórias (DD) de diferentes produtos carrapaticidas: Fipronil 0,04%; Clorpirifós 1%; Doramectina 1%; Moxidectina 0,5%; e Cipermetrina 1%. Um grupo controle contendo pacotes impregnados apenas com azeite de oliva e tricloroetileno também foi realizado. Todos os carrapaticidas foram adquiridos comercialmente: Fipronil, clorpirifós, doramectina e moxidectina (Grau técnico - Sigma Aldrich), e Barrage® (cipermetrina).

Foram adicionadas aproximadamente 100 larvas em cada pacote com o auxílio de uma espátula, os quais foram selados por cliques tubulares de plástico. Os pacotes foram mantidos em uma câmara incubadora (B.O.D.) a 27 ± 1 °C e umidade relativa de ~80%. Após 24 horas foi determinada a mortalidade das larvas a partir da contagem total de indivíduos vivos e mortos. Larvas capazes de mover seus apêndices, mas que não eram capazes de sair do lugar, foram consideradas mortas. Os testes foram feitos em triplicata para cada população e cada um dos carrapaticidas.

A classificação dos níveis de resistência das larvas foi realizada seguindo os critérios estabelecidos por Pérez-Otáñez et al. (2024 adaptado): População Suscetível (mortalidade $<95\%$ e $\geq 85\%$); População com baixa resistência (mortalidade $<85\%$ e $\geq 48\%$); População com média resistência (mortalidade $<47\%$ e $\geq 18\%$); População com alta resistência (mortalidade $<18\%$).

2.3. Microscopia Eletrônica de Varredura/Espectroscópio de Dispersão de Raio x (MEV/EDS)

Larvas das populações MA, MGI e POA foram fixadas em solução de formaldeído 10% ao completarem as idades de 7, 14 e 21 dias, e as 10 populações restantes (A, B, C, D, E, F, G, H, I e J) foram fixadas ao completarem a idade de 14 dias. A fixação em formaldeído tem como objetivo a preservação das estruturas e inibição do desenvolvimento larval. Duas horas antes da análise no MEV/EDS, as larvas foram transferidas para o Álcool Etílico Absoluto 99,8% P.A. ACS. As larvas foram divididas em 13 grupos experimentais ($n = 30$), um grupo para cada diferente população.

Cada larva foi colocada individualmente dorsal ou ventralmente em fita revestida de carbono e examinada usando SEM/EDS (Hitachi TM3000, Eindhoven, Holanda) a uma aceleração de 15 kV e 10 mA. De cada grupo experimental e para cada idade estabelecida, cinco larvas foram analisadas dorsalmente e outras cinco larvas foram analisadas ventralmente, todas no mesmo local (Figura 1).

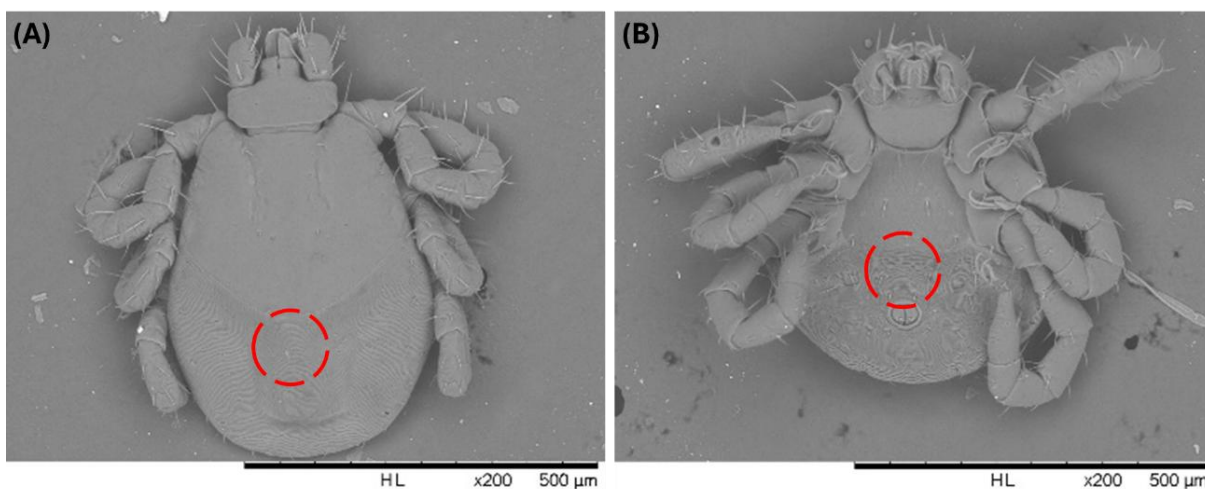


Figura 1. Localização cuticular do ponto de análise SEM/EDS das regiões dorsal (A) e ventral (B). O ponto de análise é destacado com o círculo vermelho tracejado.

A análise da composição elementar da cutícula de larvas de *R. microplus* por meio do MEV/EDS foi estruturada por meio de 2 diferentes experimentos com

objetivos distintos.

Experimento I

Larvas de *R. microplus* das populações MA, MGI e POA nas idades de 7, 14 e 21 dias, foram submetidas ao MEV/EDS para avaliar a estrutura e composição química elementar da cutícula de um ponto central da região dorsal e ventral. Cinco larvas da população MA, com 7 dias de desenvolvimento, foram avaliadas dorsalmente. Outras cinco larvas da mesma população e com sete dias de desenvolvimento, foram avaliadas ventralmente, e assim sucessivamente para cada idade e cada uma das populações. O objeto do experimento I é determinar se há diferença na composição cuticular ao longo do tempo de desenvolvimento larval (7, 14 e 21 dias) para cada população.

Experimento II

Larvas de *R. microplus* das populações A, B, C, D, E, F, G, H, I, J e POA com 14 dias de idade, foram submetidas ao MEV/EDS para avaliação estrutural e composicional da região dorsal e ventral da cutícula. Todas as 11 populações submetidas ao experimento II apresentam diferentes níveis de suscetibilidade a cipermetrina, clorpirifós, fipronil, doramectina e moxidectina. Dez larvas (cinco para análise da região dorsal e cinco para ventral) de cada população, foram submetidas ao MEV/EDS. O objeto do experimento II foi avaliar se há diferença na composição cuticular das larvas de 14 dias entre as diferentes populações e se as diferenças composicionais se correlacionam com os níveis de suscetibilidade carrapaticida de cada população.

2.4. Análise estatística

Os dados obtidos foram apresentados como porcentagem (%) e expressos como média $\pm$ desvio padrão. A análise descritiva apresentou os dados em gráficos

de barra e tabelas. A inferência estatística foi realizada a partir do teste t de Student e ANOVA (Análise de variância) seguido do teste de Tukey. Para avaliar a correlação entre as diferenças composicionais e os níveis de suscetibilidade carrapaticida, foi realizada a Correlação de Spearman, onde a variável qualitativa ordinal foi categorizada da seguinte forma: População suscetível = 1; Baixa resistência = 2; Média resistência = 3; Alta resistência = 4. As análises foram realizadas com o auxílio do software GraphPad Prism 8.0 (San Diego, CA, EUA).

3. RESULTADOS

3.1. Suscetibilidade das populações de *R. microplus* aos carrapaticidas

Como esperado, por ser uma população de referência, POA apresentou suscetibilidade a todos os compostos carrapaticidas avaliados, com 100 % de mortalidade ao ser tratada com a dose discriminatória de cada composto. Todas as populações apresentaram suscetibilidade à doramectina e à moxidectina. Por outro lado, para os compostos cipermetrina, clorpirifós e fipronil, as populações de A, B, C, D, E, F, G, H, I e J apresentaram perfil de resistência variando entre baixa, média e alta, como demonstrado na tabela 1.

Tabela 1. Mortalidade (%) de larvas de 11 populações de *Rhipicephalus microplus* tratadas com a dose discriminante (DD) de cinco compostos carrapaticidas.

População	Mortalidade (%)				
	Cipermetrina	Clorpirifós	Fipronil	Doramectina	Moxidectina
A	20.4	29.6	30.2	89.2	92.5
B	15.5	52.4	38.1	98.8	96.3
C	5.6	44.8	27.4	88.38	99.07
D	17.5	61.4	29.3	90.7	97.8
E	26.2	43.6	24.7	94.2	97.0
F	16.6	20.1	15.3	92.0	98.4
G	28.3	48.1	79.2	99.1	100.0
H	26.6	34.0	40.5	98.2	97.7
I	49.3	69.6	65.3	97.9	99.4
J	15.2	46.3	4.7	99.7	96.9
POA	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

Fipronil 0.04%; Clorpirifós 1%; Doramectina 1%; Moxidectina 0.5%; e Cipermetrina 1%. ■ População susceptível (mortalidade <95% e ≥85%); ■ População de baixa resistência (mortalidade <85% e ≥48%); ■ População de média resistência (mortalidade <47% e ≥18%); ■ População de alta resistência (mortalidade <18%).

3.2. Microscopia Eletrônica de Varredura/Espectroscópio de Dispersão de Raios X (MEV/EDS)

3.2.1. EXPERIMENTO I

Larvas de *Rhipicephalus microplus* das 3 populações avaliadas apresentaram variações estatisticamente significativas ($p < 0.05$) na composição de carbono, tanto para a região dorsal quanto para a ventral, entre os dias 7, 14 e 21 de desenvolvimento larval, caracterizando um aumento progressivo no percentual de carbono a cada dia de desenvolvimento avaliado, exceto para a região ventral da população MA (Figura

2).

Considerando a região dorsal, o percentual (%) de carbono aumentou de 56.27 ± 3.56 para 67.57 ± 1.10 para a população POA ($p = 0.0012$); de 56.60 ± 0.61 para 72.90 ± 0.53 para a população MA ($p < 0.0001$); e de 64.87 ± 0.49 para 74.60 ± 1.04 para a população MGI ($p < 0.0001$). Considerando a região ventral, o percentual de carbono aumento de 54.27 ± 2.98 para 71.73 ± 1.16 para a população POA ($p < 0.0001$); de 59.77 ± 3.62 para 70.77 ± 1.15 para a população MGI ($p = 0.0028$); e um pequeno decréscimo de 74.47 ± 1.80 para 73.97 ± 0.78 no percentual de carbono para a população MA ($p = 0.0002$).

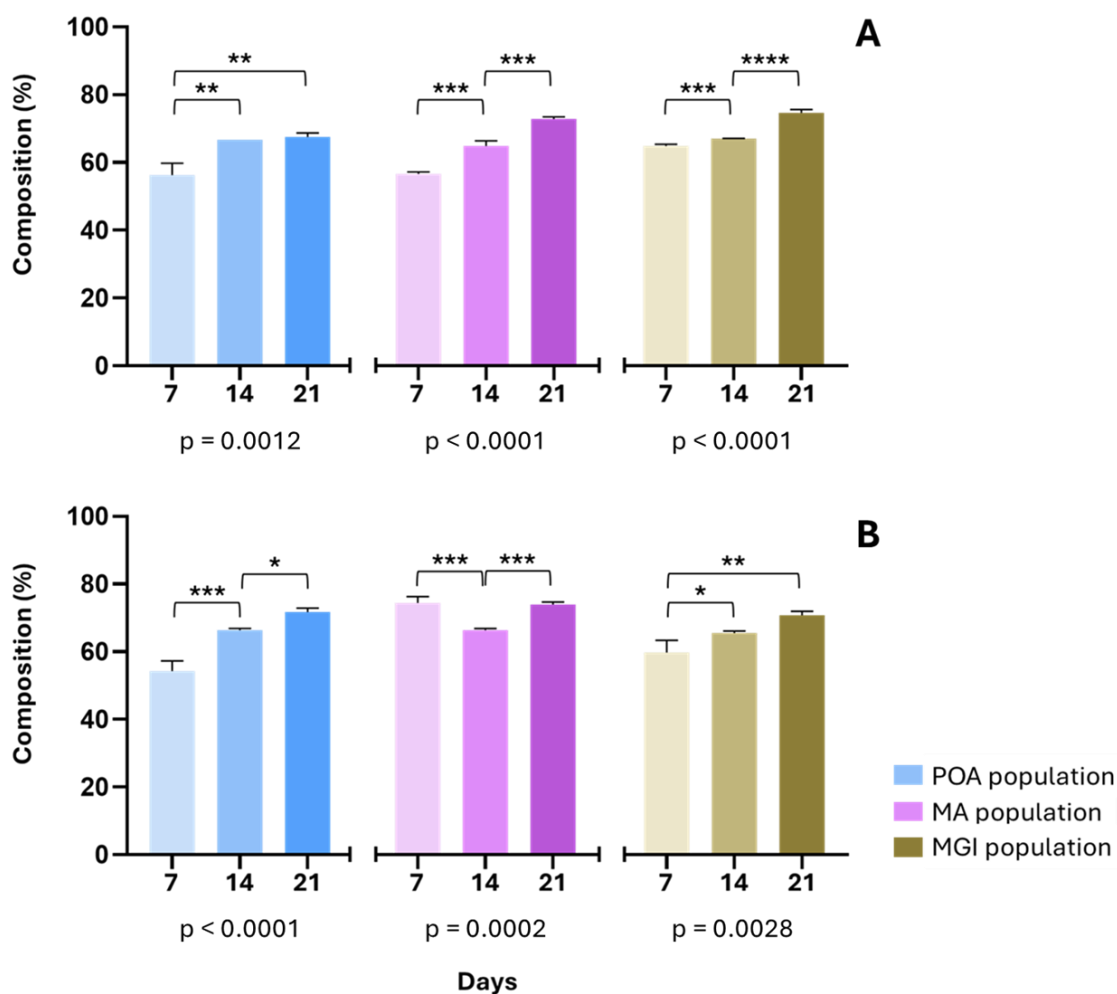


Figura 2. Comparação da porcentagem de carbono na composição cuticular de larvas

de *Rhipicephalus microplus*, dentro da mesma população, ao longo de 7, 14 e 21 dias de desenvolvimento. A - Composição da região dorsal da larva. B - Composição da região ventral da larva. Os valores de p se referem ao teste ANOVA de composição cuticular entre diferentes dias de desenvolvimento larval para cada população.

O percentual de oxigênio determinado nas regiões dorsal e ventral da cutícula das larvas das diferentes populações, foi proporcional ao percentual de carbono, sendo possível caracterizar uma quantidade superior de carbono em relação ao oxigênio em todas as amostras avaliadas das 3 populações (dados não mostrados).

3.2.2. EXPERIMENTO II

O percentual de carbono na região dorsal da cutícula das larvas (14 dias de desenvolvimento) das populações A, B, C, D, E, F, G, H, I, J e POA, apresentou diferença estatisticamente significativa ($p < 0.0001$) entre as diferentes populações. Da mesma forma, foi possível observar diferença estatística no percentual de carbono da região ventral da cutícula entre as populações analisadas, com $p < 0.0001$ (Figura 3).

A análise do percentual de oxigênio tanto da região dorsal quanto da região ventral da cutícula das larvas, demonstrou diferenças estatisticamente significativas entre as populações com $p < 0.0001$ para ambas as regiões.

A figura 3 demonstra nitidamente que a proporção de carbono com relação ao oxigênio, é superior em todas as amostras analisadas.

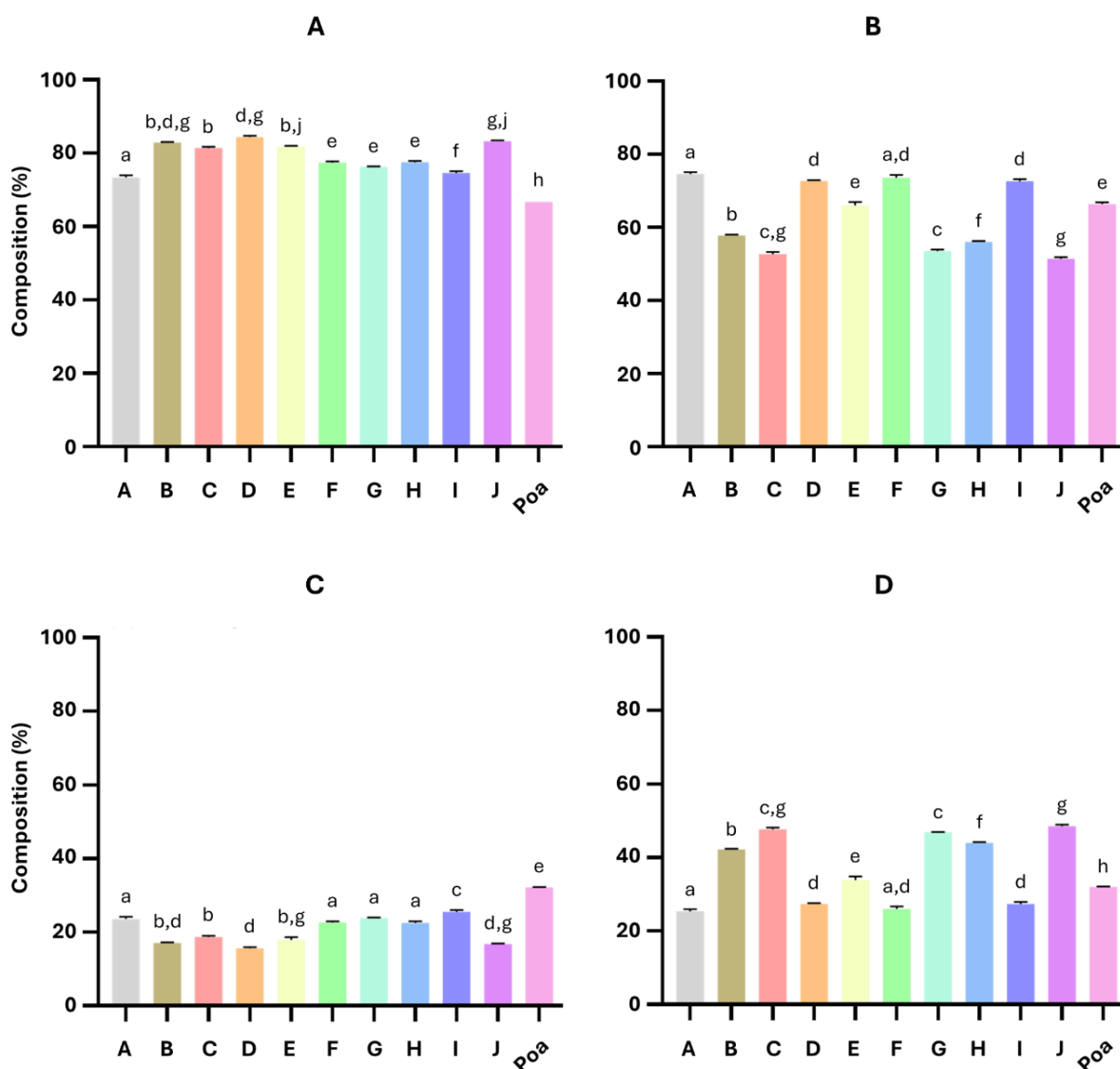


Figura 3. Comparação da porcentagem de carbono e oxigênio na composição cuticular de larvas de *Rhipicephalus microplus* de diferentes populações. A - Composição de carbono da região dorsal. B - Composição de carbono da região ventral. C - Composição de oxigênio da região dorsal. D - Composição de oxigênio da região ventral.

Das 11 populações avaliadas, 9 populações (B, C, D, E, F, G, H, I e J) apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$) no percentual de carbono entre as regiões dorsal e ventral, com a região dorsal apresentando maior

percentual de carbono do que a região ventral (Tabela 2).

As populações A e POA não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre o percentual de carbono das regiões dorsal e ventral com p-valor de 0,0526 e 0,3068, respectivamente.

Tabela 2. Composição percentual de carbono (média $\pm$ desvio padrão) das regiões dorsal e ventral da cutícula de larvas de diferentes populações de *Rhipicephalus microplus* com 14 dias de desenvolvimento.

POPULAÇÃO	CARBONO (%)		Região Dorsal
	Região Dorsal	POPULAÇÃO	
A	73.37 $\pm$ 0.55	74.60 $\pm$ 0.56	0,0526
B	82.87 $\pm$ 0.15	57.80 $\pm$ 0.20	<0,0001
C	81.33 $\pm$ 0.42	52.67 $\pm$ 0.59	<0,0001
D	84.37 $\pm$ 0.35	72.67 $\pm$ 0.31	<0,0001
E	81.77 $\pm$ 0.21	66.07 $\pm$ 0.93	<0,0001
F	77.40 $\pm$ 0.35	73.60 $\pm$ 0.79	0,0016
G	76.17 $\pm$ 0.21	53.50 $\pm$ 0.44	<0,0001
H	77.47 $\pm$ 0.40	56.03 $\pm$ 0.25	<0,0001
I	74.50 $\pm$ 0.56	72.63 $\pm$ 0.55	0,0145
J	83.23 $\pm$ 0.2	51.43 $\pm$ 0.40	<0,0001
POA	66.70 $\pm$ 0.00	66.37 $\pm$ 0.49	0,3068

Ao avaliar a correlação entre a composição elementar da cutícula das larvas de *R. microplus* e o perfil de suscetibilidade e resistência a diferentes carrapaticidas, foi determinado o valor de $r = 0.7728$, p-valor = 0.0081 e CI95% entre 0.3039 - 0.9403, para a correlação entre o percentual de carbono na região dorsal da larva e o perfil de resistência à cipermetrina. Estes valores indicam uma correlação positiva forte e estatisticamente significativa entre essas duas variáveis, com um intervalo de confiança que não inclui o zero, reforçando a ideia de que essa correlação é confiável

(Tabela 3).

Os valores de r (0.2293 e 0.5931) e p-valor (0.5152 e 0.0586) obtidos para a correlação entre o percentual de carbono na região dorsal e o perfil de resistência a clorpirifós e fipronil, respectivamente, sugerem correlações positivas entre a composição cuticular e a resistência a esses carrapaticidas, apesar de não ser uma correlação estatisticamente significativa.

A composição de carbono da região ventral das larvas apresentou uma tendência de correlação negativa muito fraca e estatisticamente não significativa, com o perfil de resistência a cipermetrina, clorpirifós e fipronil (Tabela 3).

Não foi possível realizar a correlação entre a composição cuticular e o perfil de resistência a doramectina e moxidectina, visto que todas as populações avaliadas se apresentaram suscetíveis a esses compostos.

Tabela 3. Correlação de Spearman entre a composição elementar das regiões dorsal e ventral da cutícula em larvas de *Rhipicephalus microplus* e seus perfis de resistência e suscetibilidade a diferentes carrapaticidas.

Composição/ Região	Coeficientes de correlação de Spearman	Cipermetrina	Clorpirifós	Fipronil	Doramectina	Moxidectina
Carbon/Dorsal	r	0.7728	0.2293	0.5931	n/a	n/a
	p-valor	0.0081	0.5152	0.0586	n/a	n/a
Carbon/Ventral	r	-0.2152	-0.1274	-0.0548	n/a	n/a
	p-valor	0.5206	0.7325	0.8799	n/a	n/a

Os valores destacados em vermelho são correlações estatisticamente significativas.

n/a: Não disponível – Todas as populações eram suscetíveis à doramectina e à moxidectina, e a correlação não foi possível.

4. DISCUSSÃO

Este estudo se apresenta como o primeiro relato da tentativa de elucidação

da composição, a nível de elementos químicos, da cutícula de larvas de diferentes populações de *R. microplus*, buscando detectar uma possível correlação entre a composição cuticular com a resistência aos carrapaticidas.

O surgimento de populações de carrapatos resistentes aos carrapaticidas se apresenta como um dos maiores desafios para a pecuária bovina (Desmond, et. al., 2021). Já existem relatos de populações resistentes e multirresistentes a todos os carrapaticidas comercialmente disponíveis, em todas as regiões do mundo onde o carrapato bovino é endêmico (Benavides et al., 2000; Fernández-Salas et al., 2012; Klafke et al., 2017; Pérez-Otáñez et al., 2024; Sagar et al., 2020).

Foi possível observar uma tendência de aumento no percentual de carbono tanto na região dorsal quanto na região ventral da cutícula das larvas das populações POA, MA e MGI. O carbono é o principal elemento encontrado nas moléculas orgânicas, e sendo a cutícula do carrapato uma estrutura constituída majoritariamente por quitina (YONG, et al., 2003), o aumento do percentual de carbono pode refletir a deposição de quitina na cutícula, o que caracteriza a sua formação e o seu espessamento.

Nossos resultados refletem sob um novo tipo de análise, o amadurecimento e espessamento da cutícula larval em *R. microplus*, estrutura fundamental para a sobrevivência do carrapato por conferir rigidez e proteção.

Ao avaliar a correlação entre a composição elementar da cutícula das larvas de *R. microplus* e o perfil de suscetibilidade e resistência a diferentes carrapaticidas, temos pela primeira vez, o indício de que a resistência à cipermetrina em carrapatos também pode estar relacionada às características da composição cuticular o que leva à uma possível diminuição da penetração cuticular, visto que foi observada uma correlação positiva forte e estatisticamente significativa entre a concentração de carbono na região dorsal da cutícula e a resistência à cipermetrina.

A redução da penetração cuticular como mecanismo de resistência é um fenômeno bem estabelecido, descrito inicialmente na década de 1960 (Fine et al., 1963; Forgash et al., 1962). Contudo, em carrapatos, esse mecanismo permanece pouco compreendido e ainda não foi caracterizado. Em insetos, por outro lado, é

amplamente estudado, com evidências que destacam o papel crucial da cutícula na resistência aos inseticidas (Kefi et al., 2021). Além disso, esse mecanismo pode atuar de forma sinérgica com outros, como a detoxificação enzimática mediada pelo citocromo P450, já demonstrada em *Aedes sp.* (Jacobs et al., 2023).

As alterações na composição da cutícula em insetos, como maior deposição de carbono ou lipídios, estão associadas à resistência a inseticidas, principalmente por reduzirem a penetração dos compostos químicos por conta da promoção de maior hidrofobicidade à cutícula. A maior hidrofobicidade da cutícula, possivelmente associada à deposição de hidrocarbonetos de cadeia longa regulados por genes específicos, dificulta a penetração de carrapaticidas polares, como os piretróides, contribuindo para a resistência química. Além disso, o aumento do teor de carbono na cutícula pode torná-la mais rígida e mecanicamente resistente, funcionando como uma barreira física eficaz contra agentes externos. (Balabanidou et al., 2018; Jacobs et al., 2023; Ren et al., 2023).

Jacobs et. al. (2023) demonstrou que populações resistentes de *Aedes sp.* exibiram espessamento da cutícula (principalmente na endocutícula) ao longo do tempo, com maior deposição de polissacarídeos, o que segundo Ren et al. (2023), cria uma barreira hidrofóbica que dificulta a penetração de toxinas.

Um estudo demonstrou que, no *Aedes aegypti*, a resistência à permetrina está associada a uma penetração mais lenta do inseticida através da cutícula resistente em comparação às cepas susceptíveis. A pesquisa observou que a taxa de penetração da permetrina foi significativamente menor nas cepas resistentes, com 90% do inseticida atravessando a cutícula das cepas susceptíveis em 12 horas, enquanto menos de 20% penetrou na cepa resistente (Kasai et al., 2014).

De maneira geral, nossos achados sugerem que a resistência aos carrapaticidas pode ser parcialmente mediada por um aumento de componentes ricos em carbono na cutícula, criando uma barreira eficaz para a redução da penetração dos produtos, especialmente a cipermetrina.

A população POA apresentou os menores percentuais de carbono na composição cuticular das larvas, sendo reconhecidamente sensível a todos os

carrapaticidas disponíveis (Reck et al., 2014), fato também comprovado neste estudo. Os baixos níveis de carbono observados na cutícula dessa população sensível reforçam a hipótese de que mecanismos de resistência cuticular podem estar presentes em carrapatos, contribuindo para a resistência aos carrapaticidas.

Observou-se que, para clorpirifós e fipronil, houve correlações positivas entre a composição cuticular e a resistência a esses carrapaticidas. Embora essas correlações não tenham apresentado significância estatística, os dados indicam uma tendência clara de que um maior percentual de carbono na região dorsal das larvas das populações resistentes pode estar contribuindo, de alguma forma, para a resistência a esses compostos.

5. CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo destacam a relevância da composição química da cutícula larval de *Rhipicephalus microplus* na resistência a carrapaticidas, particularmente à cipermetrina. Foi demonstrada uma correlação positiva e estatisticamente significativa entre o percentual de carbono na região dorsal da cutícula e a resistência a esse composto, sugerindo que a redução da penetração cuticular pode ser um dos mecanismos envolvidos.

Embora a resistência ao clorpirifós e fipronil tenha apresentado correlações positivas com a composição cuticular, estas não foram estatisticamente significativas, indicando a necessidade de mais estudos para explorar outros fatores e mecanismos envolvidos. As populações suscetíveis, como a POA, com baixos percentuais de carbono, reforçam a hipótese de que a composição cuticular desempenha um papel crucial na resposta aos carrapaticidas.

De forma pioneira, este estudo contribui para a compreensão dos mecanismos de resistência em carrapatos e sugere que estratégias de controle devem considerar as características estruturais e químicas da cutícula, visando o desenvolvimento de carrapaticidas mais eficazes e capazes de superar barreiras físicas impostas por alterações cuticulares.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, R. Z. *et al.* Acaricide resistance in cattle ticks and approaches to its management: The state of play. *Veterinary Parasitology*, v. 203, n. 1–2, p. 6–20, 2014.
- BALABANIDOU, V., GRIGORAKI, L. & VONTAS, J. Cutícula de inseto: um determinante crítico da resistência a inseticidas. *Curr. Opinião. Insect Sci.* 27, 68–74 2018.
- BENAVIDES, E., RODRÍGUEZ, J.L. & ROMERO, A. Isolation and partial characterization of the Montecitos strain of *Boophilus microplus* (Canestrini, 1877) multiresistant to different acaricides. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 916(1), 668–671. 2000.
- FERNÁNDEZ-SALAS, A., RODRÍGUEZ-VIVAS, R.I. & ALONSO-DÍAZ, M.A. First report of a *Rhipicephalus microplus* tick population multi-resistant to acaricides and ivermectin in the Mexican tropics. *Veterinary Parasitology*, 183(3–4), 338–342. 2012.
- FINE, B. C., GODIN, P. J., THAIN E. M. Penetração de piretrina I marcada com carbono-14 em moscas domésticas suscetíveis e resistentes a piretróides. *Nature* 199: 927–928. 1963.
- FORGASH, A. J., COOK B. J., e RILEY, R. C. Mecanismos de resistência em *Musca domestica* multirresistente selecionada com diazinon. *J. Econ. Entomol.* 55: 544–551. 1962.
- JACOBS, E., CHRISSIAN, C.; RANKIN-TURNER, S.; WEAR, M.; CAMACHO, E.; BRODERICK, N. A.; MCMENIMAN, J. C.; STARK, R. E.; & CASADEVALL, A. Cuticular profiling of insecticide resistant *Aedes aegypti*. *Nature P.* 2023.
- KASAI S., KOMAGATA O., ITOKAWA K., SHONO T., N. G. L. C., et al. Mechanisms of Pyrethroid Resistance in the Dengue Mosquito Vector, *Aedes aegypti*: Target Site Insensitivity, Penetration, and Metabolism. *PLoS Negl Trop Dis* 8(6): e2948. 2014.
- KEFI *et al.* Transcriptomic analysis of resistance and short-term induction response to pyrethroids, in *Anopheles coluzzii* legs. *BMC Genomics*. 2021.
- KLAFKE, G., WEBSTER, A., DALL'AGNOL, B., PRADEL, E., SILVA, J., DE LA CANAL, L.H. et al. Multiple resistance to acaricides in field populations of *Rhipicephalus microplus* from Rio Grande do Sul state, Southern Brazil. *Ticks and Tick-borne e Diseases*, 8(1), 73–80. 2017.
- MUTHUKRISHNAN, S. *et al.* A quitina cuticular dos insetos contribui para a forma e a função. *Curr. Farmacêutico. Des.* 26 (29), 3530–3545. 2020.

PÉREZ-OTÁÑEZ, X., VANWAMBEKE, S.O., OROZCO-ALVAREZ, G., ARCINIEGASORTEGA, S., RON-GARRIDO, L. & RODRÍGUEZ-HIDALGO, R. Widespread acaricide resistance and multi-resistance in *Rhipicephalus microplus* in Ecuador and associated environmental and management risk factors. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 15(1), 102274. 2024.

SAGAR, S.V., SAINI, K., SHARMA, A.K., KUMAR, S., KUMAR, R., FULAR, A. et al. Acaricide resistance in *Rhipicephalus microplus* collected from selected districts of Madhya Pradesh, Uttar Pradesh and Punjab states of India. *Tropical Animal Health and Production*, 52, 611–618. 2020.

REN, et al. Insect cuticle and insecticide development. *Insect Biochem. Physiol.* 2023.

CAPÍTULO II

Histologia e composição elementar da cutícula de larvas de *Rhipicephalus microplus* obtidas a partir de fêmeas tratadas com fluazuron.

Histologia e composição elementar da cutícula de larvas de *Rhipicephalus microplus* obtidas a partir de fêmeas tratadas com fluazuron.

Clarisse N. F. Barbosa, Caio P. Tavares, Livio M. Costa-Junior

1. OBJETIVO

Avaliar a composição química elementar e a histologia da cutícula de larvas de diferentes populações do carrapato *Rhipicephalus microplus* obtidas a partir de fêmeas tratadas ou não com fluazuron.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Carrapatos, bezerros e Fluazuron

Os animais utilizados neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Maranhão (UFMA), sob o protocolo número 23115.023981/2020-45. Os carrapatos analisados foram provenientes de duas fontes: colônias mantidas por meio de infestações controladas em bezerros no Biotério Central da UFMA e 10 populações adicionais enviadas pela EMBRAPA Gado de Leite. O composto sintético fluazuron utilizado no estudo foi adquirido comercialmente da Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, EUA).

2.2. Ensaios biológicos

2.2.1. Manutenção das populações dos carrapatos

Para a obtenção das fêmeas de *Rhipicephalus microplus*, foram utilizados bezerros com peso médio de 20 a 25 kg, infestados artificialmente, conforme descrito por Reck et al. (2014). As fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, obtidas após queda

natural dos hospedeiros, foram provenientes de infestações experimentais realizadas com larvas de uma população MGI encaminhadas pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA Gado de Leite). Essas fêmeas foram lavadas com água destilada, secas com papel filtro e colocadas em placas de Petri, sendo mantidas a uma temperatura de 27 ± 1 °C e umidade relativa (UR) $\geq 80\%$ até a completa oviposição. Os ovos coletados foram acondicionados em tubos Falcon de 15 mL, vedados com algodão para permitir a entrada de ar e umidade, e incubados sob as mesmas condições de temperatura e UR até a eclosão das larvas.

2.3. Alimentação artificial dos carrapatos

O ensaio de Alimentação artificial foi realizado de acordo com Pohl et al. (2011). Carrapatos fêmeas parcialmente ingurgitados (entre 30 e 80 mg) foram coletados manualmente entre o 18º e 21º dia após infestação das larvas em bezerros alojados em baias individuais. O sangue para alimentação artificial foi obtido de um pool de amostras coletadas com citrato de sódio dos bezerros, sem exposição prévia a carrapaticidas.

Logo após a coleta das fêmeas partenógenas, diretamente do bezerro, os carrapatos foram pesados individualmente e posteriormente iniciou-se a alimentação por meio de tubos capilares para hematócrito (Invicta®) posicionados sobre o aparelho bucal (hipostômio) dos carrapatos durante 12 e 24 horas, trocando os capilares a cada duas horas (Figura 1).

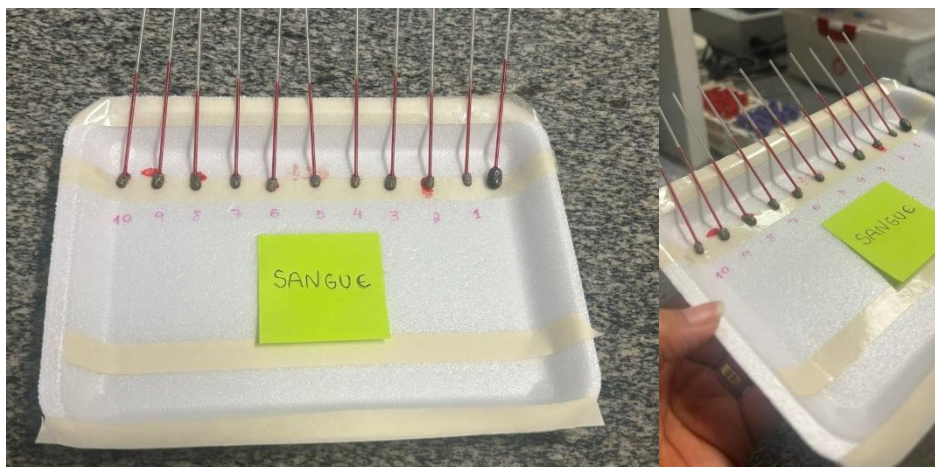


Figura 1. Fêmeas de *R. microplus* posicionadas dorsoventralmente em pratos de isopor com microcapilares encaixados no hipostômio.

O sangue coletado foi dividido de acordo com os grupos a serem alimentados, um grupo controle (I) foi alimentado com sangue total citratado sem o fármaco, outro grupo (II), foi alimentado com sangue + solução de fluazuron com concentração de 0,01mg/mL. Foram utilizados 10 carrapatos para cada grupo.

Durante a alimentação artificial, os carrapatos foram mantidos em incubadoras a 27 ± 1 °C e 80% de umidade relativa. Ao término da alimentação, os carrapatos foram novamente pesados para avaliar a taxa de alimentação para cada fêmea e mantidos individualmente em tubos falcon de 15ml a 27 ± 1 °C e 80% de umidade relativa por seis semanas. Durante o período de incubação dos ovos, o percentual de oviposição e eclosão foram acompanhados. A proporção de larvas emergindo de ovos eclodidos foi estimada por inspeção visual utilizando um estereomicroscópio.

2.4. Microscopia Eletrônica de Varredura e Espectroscopia por dispersão de Raio – X – MEV/EDS

Larvas de 10 populações enviadas pela EMBRAPA (não tratadas) e larvas descendentes das fêmeas submetidas a alimentação artificial foram fixadas em formol

10% nas idades de 7 e 14+ para preservação das estruturas foram avaliadas pela técnica do MEV/EDS. O método segue a mesma descrição realizada no item 2.3 do capítulo 1.

2.5. Histologia - microscopia de Luz campo claro (Brief Field – BF)

Transcorridas 24h de alimentação artificial, as fêmeas foram pesadas e acondicionadas em tubo falcon 15ml individualmente e levadas para BOD em temperatura de 27 °C (+/- 1 °C) com umidade relativa (UR) $\geq$ 80% até oviposição completa. A massa de ovos foi pesada e acompanhados o tempo de eclosão das larvas. Larvas advindas da alimentação artificial e das populações da EMBRAPA, foram fixadas com idade de 7 e 14+ em paraformaldeído a 5%, desidratados em séries crescentes de álcool (70%, 90%, 95%, 95% e 100%) 1 hora em cada, sendo a última 3 repetições de 45 minutos. O passo de diafanização feito com xylol 100% com 3 repetições de 45 minutos cada. A infiltração foi feita em parafina 60° por 30 minutos, após a infiltração em 3 tempos de 45 minutos, o material foi colocado em formas para construção dos blocos de parafina e mantidos em temperatura ambiente até o completo endurecimento. Foram feitas secções com 3 μ m de espessura e colocados em lâminas de vidro, coradas com hematoxilina-eosina (HE) de acordo com Junqueira e Junqueira (1983) para leitura e análise dos resultados, fotografadas em fotomicroscópio Leica DM750 com câmera embutida ICC50 HD. O protocolo de preparação histológica, foi ajustado conforme o necessário para obtenção das amostras por inteiro.

2.6. Análise estatística

Os dados obtidos foram expressos como média $\pm$ desvio padrão e a inferência estatística foi realizada a partir dos testes t de Student e ANOVA (Análise de variância) seguido do teste de Tukey. As análises foram realizadas com o auxílio do software GraphPad Prism 8.0 (San Diego, CA, EUA).

3. RESULTADOS

3.1. Alimentação artificial

As fêmeas partenogênicas de *R. microplus* alimentadas com sangue contendo fluazuron, apresentaram uma média de peso no valor de $53,08 \pm 14,34$ mg, não diferindo estatisticamente da média de peso das fêmeas do grupo controle $45,99 \pm 15,54$ mg. Entretanto, foi possível observar reduções estatisticamente significativas tanto no peso da massa dos ovos quanto na taxa de eclodibilidade.

O peso dos ovos ($1,59 \pm 1,43$ mg) das fêmeas tratadas com fluazuron foi reduzido em mais de 6 vezes quando comparado ao grupo controle ($9,77 \pm 13,66$ mg), já a taxa de eclodibilidade reduziu de 56,61% (grupo controle) para 20,18% (grupo tratado). O impacto do tratamento com fluazuron fica ainda mais evidente com os valores do Índice de produção de ovos (Grupo controle: 42,99; Grupo tratado: 3,00). A alimentação artificial com fluazuron no grupo tratado apresentou um percentual de controle de 97,52% (Tabela 1).

Tabela 1. Efeitos do fluazuron (0,01mg/mL) nos parâmetros reprodutivos de fêmeas semi ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* alimentadas artificialmente.

Tratamento	PF (mg)	PO (mg)	T (%)	IPO	%Rovip	%Rhatch	C%
Sangue	$45,99 \pm 15,54$ a	$9,77 \pm 13,66$ a	$56,61 \pm 41,50$ a	42,99	-	-	-
Sangue + Fluazuron	$53,08 \pm 14,34$ a	$1,59 \pm 1,43$ b	$20,18 \pm 25,95$ b	3,00	91,96	64,35	97,52

PF: Peso de fêmeas antes do tratamento; PO: Peso da massa de ovos; T (%): Taxa de eclodibilidade dos ovos; IPO: Índice de produção de ovos; %Rovip: Porcentagem de redução da oviposição; %Rhatch: Porcentagem de redução da eclosão; C%: Porcentagem do controle. Média $\pm$ Desvio padrão. Média com mesma letra na mesma coluna não difere significativamente em $p < 0.05$.

3.2. Caracterização da composição cuticular das larvas de *R. microplus*

As larvas de carrapato oriundas de fêmeas ingurgitadas tratadas e não tratadas com fluazuron (0,01mg/mL), tiveram a composição elementar de suas cutículas avaliadas (regiões dorsal e ventral) (Figura 2).

É possível observar que para as larvas obtidas a partir de fêmeas ingurgitadas não tratadas, houve um aumento no percentual de composição de carbono ao longo de 7, 14 e 21 dias de desenvolvimento, tanto para a região dorsal (7 dias: $64,87 \pm 0,49\%$; 14 dias: $67,03 \pm 0,12\%$; 21 dias: $74,60 \pm 1,04\%$) quanto para a região ventral (7 dias: $59,77 \pm 3,62\%$; 14 dias: $65,50 \pm 0,62\%$; 21 dias: $70,77 \pm 1,15\%$).

Por outro lado, para as larvas obtidas a partir de fêmeas ingurgitadas tratadas com fluazuron (0,01mg/mL), temos os seguintes resultados para a região dorsal: aumento no percentual de carbono do dia 7 ($62,03 \pm 0,72\%$) para o dia 14 ($67,67 \pm 1,10\%$), seguido de um decréscimo do dia 14 para o dia 21 ($64,33 \pm 0,65\%$) de desenvolvimento larval. Para a região ventral, foi observado um decréscimo no percentual de carbono do dia 7 ($59,40 \pm 1,78\%$) para o dia 14 ($58,77 \pm 0,40\%$), seguido de um aumento do dia 14 para o dia 21 ($62,03 \pm 0,64\%$). (Figura 7).

Quando se compara o percentual de carbono para ambas as regiões da cutícula, entre os dois grupos experimentais, é possível observar uma redução no percentual de carbono na cutícula das larvas de *R. microplus* oriundas de fêmeas ingurgitadas tratadas. Para a região dorsal, as larvas desses grupos apresentaram menor percentual de carbono na cutícula das larvas com 7 ($p = 0,0050$) e 21 dias de desenvolvimento ($p = 0,0001$), quando comparado com o percentual de carbono da cutícula de larvas obtidas de fêmeas ingurgitadas não tratadas. Com relação à região ventral, as larvas obtidas de fêmeas tratadas apresentaram menor percentual de carbono na cutícula das larvas com 14 ($p < 0,0001$) e 21 dias de desenvolvimento ($p = 0,0003$), quando comparado com o grupo de larvas obtidas de fêmeas não tratadas com o fluazuron.

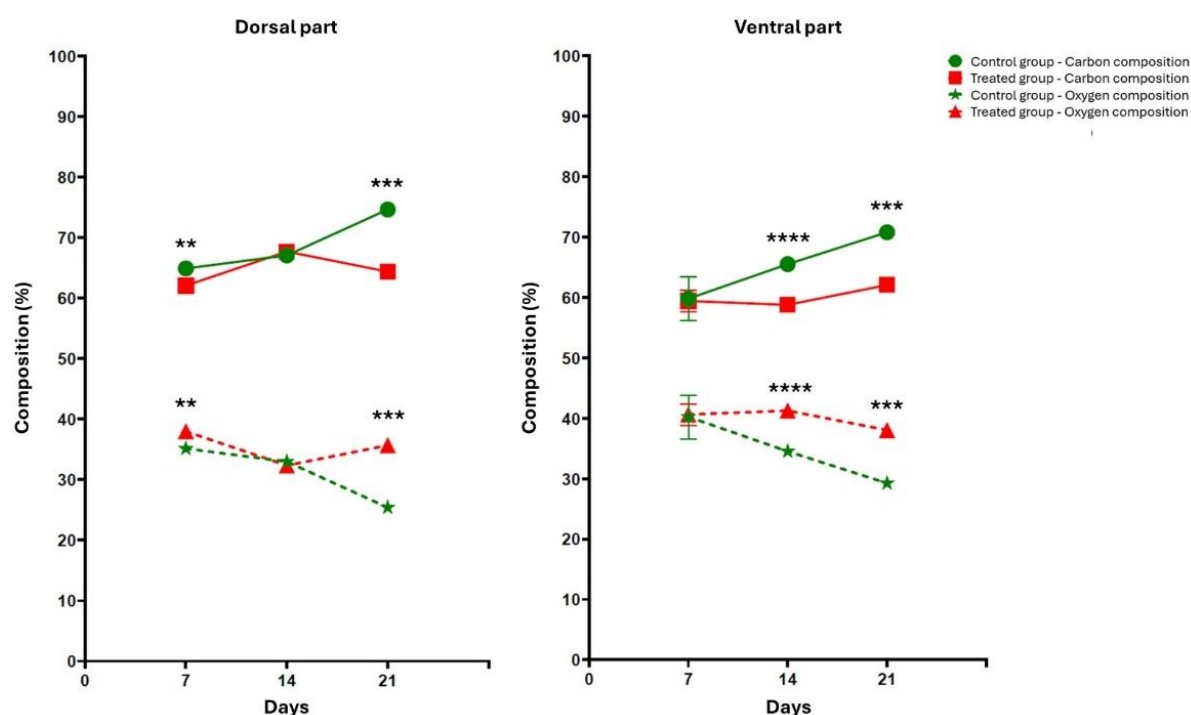


Figura 2. Comparação do percentual de carbono e oxigênio presentes na composição da cutícula de larvas oriundas de fêmeas ingurgitadas não tratadas (grupo controle – em verde) e tratadas com fluazuron 0,01 mg/ml (em vermelho). Avaliação feita ao longo de 21 dias de desenvolvimento larval. Todas as larvas são de uma mesma população (população MGI). As diferenças estatísticas foram determinadas entre as médias de composição em cada dia específico e marcadas com asterisco (*– $p < 0.05$, **– $p < 0.01$, ***– $p < 0.001$, ****– $p < 0.0001$).

3.3. Efeitos do fluazuron na morfologia da cutícula de *R. microplus*

No grupo controle, composto por fêmeas alimentadas exclusivamente com sangue, não foram observadas alterações na estrutura da cutícula. Todas as três camadas típicas da cutícula – epicutícula, procutícula e subcutícula – estavam preservadas e claramente visíveis (Figura 3).

Por outro lado, no grupo tratado com fluazuron, verificou-se um afinamento significativo da procutícula, além da ausência da epicutícula. Essa ausência sugere que a camada pode ter sido degradada ou perdida devido à ação do carrapaticida.

Durante o processamento histológico inicial, as larvas do grupo tratado não resistiram aos passos de desidratação seriada e diafanização com xilol, resultando na necessidade de um protocolo adaptado com tempos reduzidos de desidratação e diafanização para minimizar os danos estruturais. Ainda assim, as análises revelaram degradação das estruturas internas, com rupturas que levaram à abertura das larvas.

Em contraste, o grupo controle apresentou preservação completa das estruturas morfológicas, permitindo a visualização detalhada das características histológicas.

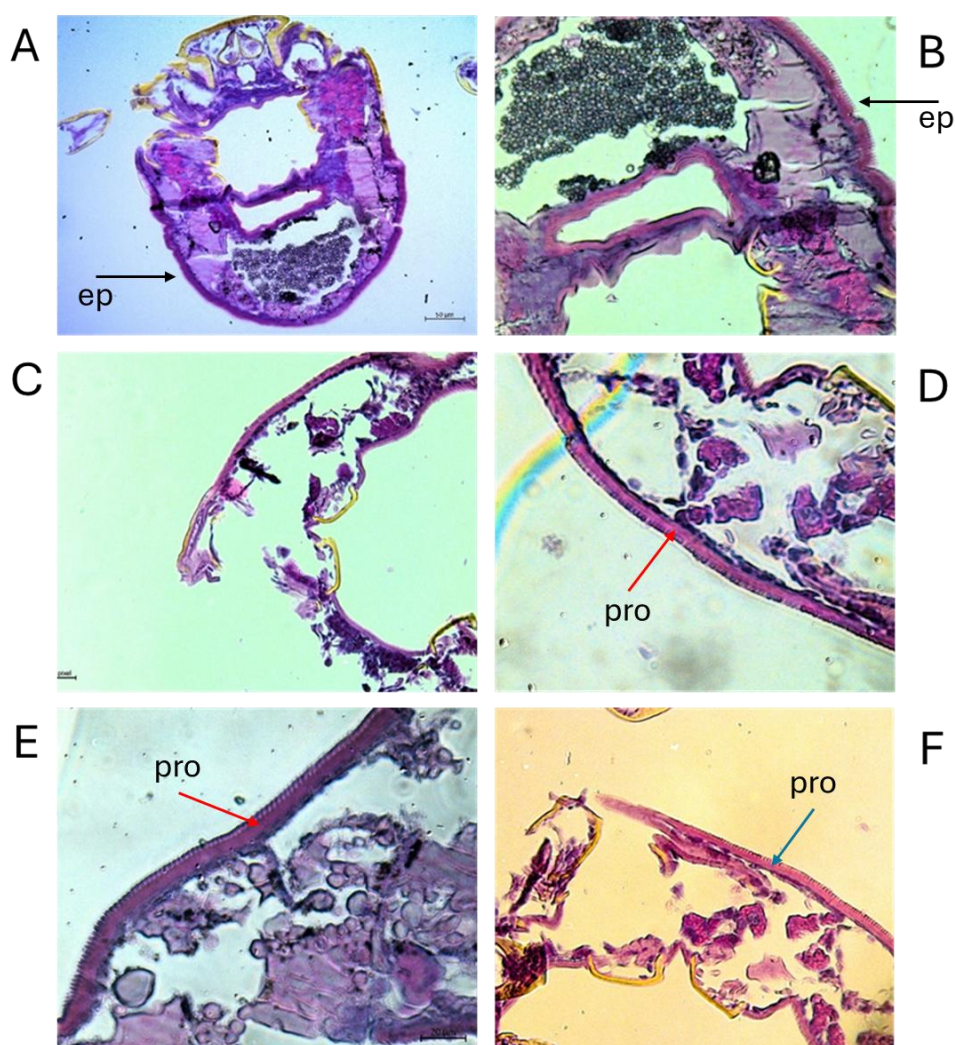


Figura 3. Comparação da cutícula de larvas do grupo controle e tratadas, com 21 dias. (Seta preta = epicutícula; seta branca = procutícula; seta azul = procutícula com afinamento – grupo tratado).

4. DISCUSSÃO

O carrapato *R. microplus* conhecido por sua capacidade de infestação em bovinos, representa um desafio significativo para a pecuária devido suas perdas econômicas associadas à redução de produtividade e aos custos de controle. A resistência a carrapaticidas e a adaptação a diversas condições ambientais tornam essencial a compreensão detalhada da biologia desses ectoparasitos. Este estudo demonstra pela primeira vez as alterações a nível elementar na cutícula de larvas do carrapato bovino obtidos a partir de fêmeas ingurgitadas tratadas com fluazuron, um inibidor de crescimento pertencente à classe das benzoilfenilureias.

Inicialmente, foi possível observar neste estudo, que houve uma diminuição de 91,96% no índice de produção dos ovos e uma redução da eclodibilidade em 64,35% no grupo tratado com fluazuron. Esta molécula inibe a biossíntese de quitina por meio de um bloqueio prévio da quitina quinase, e este bloqueio inibe a utilização de glicose para esta via, causando um distúrbio na homeostase de glicose. Este distúrbio resulta no aumento de glicose na hemolinfa, impactando diretamente na composição nutricional dos ovos e na etapa de pré-oviposição (COHEN, 2021).

Da mesma forma, a inibição do metabolismo da quitina pode interromper a produção de hormônios de tal forma que, alterações morfológicas ocorrem durante o desenvolvimento dos artrópodes, resultando na deposição de ovos inviáveis e na consequente redução do surgimento de novos indivíduos (OLIVEIRA et. al., 2013).

O fluazuron demonstrou ter efeitos evidentes na cutícula das larvas de *R. microplus*, afetando diretamente sua formação a nível elementar. Esse impacto parece estar relacionado à interferência do fluazuron na ovogênese, resultando em alterações na síntese de quitina das larvas originadas de fêmeas alimentadas artificialmente com sangue tratado com o carrapaticida. Essas modificações estruturais podem tornar as larvas mais vulneráveis tanto a fatores ambientais quanto à ação de outros carrapaticidas. Como a cutícula desempenha um papel crucial na proteção do carrapato, incluindo a prevenção de perda de água por dessecação, essa fragilidade pode comprometer a sobrevivência das larvas em condições adversas e potencializar

os efeitos de estratégias de controle químico.

A cutícula do carrapato é dividida em duas camadas principais: epicutícula e procutícula. A procutícula, por sua vez, apresenta duas subcamadas: a exocutícula, caracterizada por possuir inúmeros canais de poros, e a endocutícula, composta por lamelas sobrepostas e altamente organizadas. Estruturalmente, a cutícula inclui uma camada interna de proteínas, uma camada intermediária rica em lipídios e uma camada externa composta por cera, produzida por glândulas dérmicas. Essa organização complexa contribui para as funções essenciais da cutícula, como proteção e regulação da interação com o ambiente (SONESHINE, 1991). Neste novo método de processamento do carrapato para a realização das análises histológicas, foi possível observar todas essas estruturas, demonstrando inicialmente que esta técnica pode ser utilizada para a histologia do carrapato.

Ao observar os grupos tratados com fluzuron, foi detectada a ausência de subcutícula/endocutícula, assim como o estreitamento da procutícula, se comparada ao grupo controle.

A procutícula, a camada mais espessa da cutícula, fornece estabilidade significativa para manter o formato da cutícula. É composta principalmente de quitina, que é ligada a proteínas, contribuindo para sua integridade estrutural robusta (Moussian, 2013). Neste sentido, o estreitamento da procutícula pode ser considerado como efeitos na prole, associado ao tratamento de fêmeas com fluazuron.

Desta forma, o presente trabalho demonstrou pela primeira vez as consequências do tratamento de fêmeas do carrapato *R. microplus* na sua prole, ao serem evidenciadas alterações a nível cuticular das larvas, como as diferenças na composição elementar (percentual de carbono) e as modificações histológicas nas diferentes camadas que compõem a cutícula desse estágio de desenvolvimento do carrapato. Novos estudos precisam explorar a cutícula do carrapato tanto a nível elementar quanto estrutural, devido a sua importância na proteção do carrapato contra os fatores externos do ambiente e seu papel direto na redução da penetração de carrapaticidas. A cutícula do carrapato se apresenta como um alvo importante a ser explorado para o desenvolvimento de novas estratégias no controle de *R. microplus*.

5. CONCLUSÃO

O presente estudo apresentou uma análise inédita dos efeitos do fluazuron sobre *R. microplus*, destacando alterações na composição elementar e morfologia da cutícula de larvas oriundas de fêmeas tratadas com esse carrapaticida. Os resultados demonstraram uma significativa redução na taxa de produção e eclodibilidade dos ovos, bem como mudanças estruturais e elementares nas cutículas das larvas, evidenciadas pelo decréscimo no percentual de carbono e pelo afinamento ou ausência de camadas fundamentais, como a epicutícula e a procutícula.

Ao caracterizar detalhadamente as camadas cuticulares e suas funções, este estudo reforça a relevância da cutícula como um alvo estratégico para o controle químico de *R. microplus*. O impacto do fluazuron nas larvas indica um potencial para integrar essa abordagem a programas de manejo integrado, contribuindo para a redução da resistência carrapaticida e promovendo o controle sustentável do carrapato bovino.

Por fim, os resultados destacam a necessidade de investigações futuras voltadas à compreensão mais ampla dos mecanismos de ação do fluazuron e ao desenvolvimento de novas estratégias que explorem a vulnerabilidade cuticular como ferramenta para o controle eficaz de populações resistentes de *R. microplus*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

MOUSSIAN, B. Chitin: Structure, Chemistry and Biology. In: Yang, Q., Fukamizo, T. (eds) Targeting Chitin-containing Organisms. Advances in Experimental Medicine and Biology, vol 1142. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-7318-3_2. 2019.

POHL, P.C., KLAFKE, G.M., CARVALHO, D.D., MARTINS, J.R., DAFFRE, S., DA SILVA VAZ JR., I., MASUDA, A. ABC transporter efflux pumps: a defense mechanism against ivermectin in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Int. J. Parasitol. 41 (13–

14), 1323–1333. 2011.

RECK J., KLAFKE G. M., WEBSTER A., DALL`AGNOL B., SCHEFFER R., SOUZA U. A., CORASSINI V. B., VARGAS R., SANTOS J. S., MARTINS J. R. S. Primeiro relato de resistência ao fluazuron em *Rhipicephalus microplus*: uma população de carrapatos resistentes a seis classes de carrapaticidas. *Veterinary Parasitol* 201(1–2):128–136. 2014.

SONENSHINE, D.E. *Biology of Ticks* 1; Oxford University Press: New York, NY, USA, 1991.