



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS (UFG)
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA (EVZ)
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

MIRNA SECCHIS VIEIRA

**Avaliação da biologia reprodutiva e histopatológica de fêmeas
ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* submetidas a uma
formulação contendo fipronil e fluazuron**

GOIÂNIA
2021



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

Dissertação Tese

2. Nome completo do autor

Mirna Secchis Vieira

3. Título do trabalho

Avaliação da biologia reprodutiva e histopatológica de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* submetidas a uma formulação contendo fipronil e fluzaron

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

- a) consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a);
- b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.

O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.

Termo de Ciência e de Autorização (TECA) EVZ 2357239 SEI 23070.041725/2021-62 / pg. 1



Documento assinado eletronicamente por **Caio Márcio De Oliveira Monteiro, Professor do Magistério Superior**, em 20/09/2021, às 09:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **MIRNA SECCHIS VIEIRA, Discente**, em 20/09/2021, às 09:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2357239** e o código CRC **54560578**.

MIRNA SECCHIS VIEIRA

**Avaliação da biologia reprodutiva e histopatológica de fêmeas
ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* submetidas a uma
formulação contendo fipronil e fluazuron**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, da Escola de Veterinária e Zootecnia, da Universidade Federal de Goiás (UFG), como requisito para obtenção do título de mestre em ciência animal.

Área de concentração: Saúde animal, tecnologia e segurança de alimentos.

Linha de pesquisa: saúde única e medicina veterinária preventiva.

Orientador: Professor Doutor Caio Márcio de Oliveira Monteiro

Coorientador: Professor Doutor Welber Daniel Zanetti Lopes

Coorientadora: Professora Doutora Walquíria Arruda

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Vieira, Mirna Secchis

Avaliação da biologia reprodutiva e histopatológica de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* submetidas a uma formulação contendo fipronil e fluazuron [manuscrito] / Mirna Secchis Vieira. - 2021.

xiv, 55 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Caio Márcio de Oliveira Monteiro; co orientador Dr. Welber Daniel Zanetti Lopes; co-orientador Dr. Walquíria Arruda.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia (EVZ), Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Goiânia, 2021.

Bibliografia.

Inclui gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. carrapato dos bovinos. 2. benzoilureia. 3. fenilpirazol. 4. histologia. 5. ovários. I. Monteiro, Caio Márcio de Oliveira, orient. II. Título.

CDU 639.09



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Ata nº **589** da sessão de Defesa de Dissertação de **Mirna Secchis Vieira**, que confere o título de Mestra em **Ciência Animal**, na área de concentração em **Saúde Animal, Tecnologia e Segurança de Alimentos**.

Aos **vinte e sete dias do mês de agosto de dois mil e vinte e um** a partir das **14h00min**, por meio de videoconferência, realizou-se a sessão pública de Defesa de Dissertação intitulada "**Avaliação da biologia reprodutiva e histopatológica de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* submetidas a uma formulação contendo fipronil e fluazuron**". Os trabalhos foram instalados pelo Orientador, **Prof. Dr. Caio Marcio de Oliveira Monteiro (IPTSP/UFG)** com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: **Prof. Dr. Pedro Vale de Azevedo Brito (ICB/UFG)**, membro titular externo ao programa; **Prof. Dr. Thiago Lopes Rocha (IPTSP/UFG)**, membro titular externo ao programa. Durante a arguição os membros da banca **não fizeram** sugestão de alteração do título do trabalho. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Dissertação, tendo sido a candidata **aprovada** pelos seus membros. Proclamados os resultados pelo(a) **Prof. Dr. Caio Marcio de Oliveira Monteiro**, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pela orientadora e pela coordenação do PPGCA, em substituição aos membros externos, aos **vinte e sete dias do mês de agosto de dois mil e vinte e um**.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA



Documento assinado eletronicamente por **Thiago Lopes Rocha, Professor do Magistério Superior**, em 27/08/2021, às 16:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Caio Márcio De Oliveira Monteiro, Professor do Magistério Superior**, em 27/08/2021, às 16:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Pedro Vale De Azevedo Brito, Professor do Magistério Superior**, em 27/08/2021, às 16:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 2290476 e o código CRC B0B2E0CB.

Dedico este trabalho a Deus, meus pais e minhas filhas, aos meus amigos do LABEC, em memória de Susy das Graças Alecrim Alves e a todos que de alguma forma contribuíram para realização desse trabalho

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela oportunidade de conhecer e vivenciar a área da parasitologia, que me trouxe conhecimento na área da pesquisa, no âmbito profissional e pessoal.

Aos meus pais, Nesley Marinho Vieira e Cleuza de Lourdes Secchis Vieira, que sempre me apoiaram e me ajudaram de todas as formas possíveis.

As minhas duas filhas maravilhosas, Manuela Secchis Toledo e Isis Secchis Toledo, que com muito amor me deram força para não desistir.

A todos os membros do Centro de Parasitologia Veterinária, que me apoiaram e estiveram juntos comigo em todas as atividades como parceiros de trabalho e principalmente como grandes amigos.

Ao Dr. Caio Márcio de Oliveira Monteiro que acreditou em mim e deu a oportunidade de estar aqui.

Ao Dr. Thiago Lopes Rocha, pelos ensinamentos e o espaço cedido em seu laboratório que foram importantes para conclusão desse projeto.

À Dra. Walkiria Arruda, por ceder seu conhecimento, tempo e espaço no laboratório para realização desse projeto.

À Dra. Renata da Silva Matos por me guiar nos primeiros passos na área de histologia.

À Universidade Federal de Goiás (UFG) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (PPGCA) pela oportunidade de aprendizado.

“Nunca tenha certeza de nada,
por que a sabedoria começa com a dúvida”

Freud

SUMÁRIO

CAPÍTULO I - CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	15
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	16
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1 <i>Rhipicephalus microplus</i>	18
2.2 Fipronil e Fluazuron.....	20
2.3 Anatomia e fisiologia dos ovários dos carrapatos.....	24
2.4 Alterações histopatológicas ocasionadas por carrapaticidas em ovários de carrapatos.....	29
3 OBJETIVOS.....	31
3.1 Objetivo Geral.....	31
3.2 Objetivos Específicos.....	31
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32
CAPITULO II - AVALIAÇÃO DA BIOLOGIA REPRODUTIVA E HISTOPATOLOGIA DOS OVÁRIOS DE FÊMEAS INGURGITADAS DE <i>Rhipicephalus microplus</i> SUBMETIDAS A UMA FORMULAÇÃO CONTENDO FIPRONIL E FLUAZURON.....	40
RESUMO.....	41
ABSTRACT.....	42
1 INTRODUÇÃO.....	43
2 METODOLOGIA.....	45
2.1 Obtenção dos carrapatos.....	45
2.2 Infestação e tratamento dos bovinos.....	46
2.3 Recuperação das fêmeas ingurgitadas para análise de biologia reprodutiva.....	46
2.4 Recuperação das fêmeas ingurgitadas para histologia.....	48
2.5 Avaliação histológica dos ovários.....	49
2.6 Análise estatística.....	50
3 RESULTADOS.....	50
3.1 Avaliação da biologia reprodutiva.....	50

3.2 Alterações morfológicas dos oócitos.....	56
3.3 Quantificação dos oócitos.....	53
4 DISCUSSÃO.....	57
5 CONCLUSÕES.....	63
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I - CONSIDERAÇÕES GERAIS

Figura 1	Ciclo de vida do carrapato dos bovinos, <i>Rhipicephalus microplus</i>	19
Figura 2	Modo de ação do fipronil nos receptores GABA ou glutamato nos artrópodes.....	21
Figura 3	Biossíntese do polímero de quitina em carrapatos.....	23
Figura 4	Sistema reprodutivo de fêmeas de carrapatos.....	25
Figura 5	Diagrama da oogênese (A-E) do ovário de <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	27
Figura 6	Microscopia eletrônica de transmissão do cório do oócito do <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	28
Figura 7	Diagrama da regulação endócrina da vitelogênese em carrapatos através dos ecdisteróides.....	29

CAPÍTULO II

Figura 1	Cortes histológicos de oócitos (corados com azul de toluidina) de fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i> recuperadas nos dias 0 (controle = CTR) e +4, de bovinos artificialmente infestados e tratados com formulação carrapaticida comercial pour on contendo fipronil (1,25 mg/kg) + fluazuron (2,5 mg/kg).....	54
Figura 2	Cortes histológicos de oócitos (corados com azul de toluidina) de fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i> recuperadas nos dias +12 e +20, de bovinos artificialmente infestados e tratados com formulação carrapaticida comercial pour on contendo fipronil (1,25 mg/kg) + fluazuron (2,5 mg/kg).....	55
Figura 3	Quantificação de oócitos de fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i> recuperadas (dias 0, +4, +12 e +20) de bovinos artificialmente infestados e tratados com formulação carrapaticida comercial pour on contendo fipronil (1,25 mg/kg) + fluazuron (2,5 mg/kg).....	57

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I - CONSIDERAÇÕES GERAIS

Tabela 1	Principais classes/moléculas utilizadas como ingredientes ativos de carrapaticidas disponíveis no mercado mundial.....	20
----------	--	----

CAPÍTULO II

Tabela 1	Parâmetros biológicos de fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i> recuperadas nos dias 0, +5, +10 e +20, de bovinos artificialmente infestados e tratados com formulação carrapaticida comercial pour on contendo fipronil e fluazuron.....	50
Tabela 2	Alterações morfológicas de oócitos de fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i> recuperadas nos dias 0 (controle), +4, +12 e +20, de bovinos artificialmente infestados e tratados com formulação carrapaticida comercial pour on (1,25 mg/kg) + fluazuron (2,5 mg/kg).....	56

RESUMO

Rhipicephalus microplus (Canestrini, 1888) é um importante ectoparasito na criação de bovinos em regiões tropicais, subtropicais e temperadas no mundo. Esse carrapato atua na transmissão de patógenos, levando a quadros patológico em bovinos, e diminuindo a produtividade na bovinocultura de corte e de leite. Como o carrapato *R. microplus* possui importância médico veterinária, elevando os custos de produção de bovinos, torna-se importante a realização de controle, que é atualmente realizado quase que exclusivamente com a utilização de carrapaticidas organossintéticos. Atualmente, existem formulações comerciais disponíveis para controle de *R. microplus* com base na associação dos princípios ativos, fipronil e fluazuron, que tem sido amplamente utilizada. Contudo, não existem informações a respeito das alterações histológicas dessas moléculas sobre esse carrapato, e tais estudos permitirão melhor compreensão do mecanismo de ação e toxicidade desses ingredientes ativos em diferentes órgãos. Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar o potencial efeito na biologia reprodutiva e histológico de uma formulação comercial, contendo fipronil e fluazuron em ovários de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*. Para a realização do estudo, três bezerros foram infestados com aproximadamente 5.000 larvas nos dias -24, -21, -19, -17, -14, -12, -10, -7, -5 e -3, considerando o dia 0, o dia do tratamento. O tratamento consistiu na aplicação da formulação carrapaticida comercial contendo fipronil (1,25 %) e fluazuron (2,5%) (Tick Gard[®]- MSD Saúde Animal). Antes da aplicação da formulação carrapaticida, foram recuperadas 20 fêmeas ingurgitadas, naturalmente desprendidas dos bovinos, para formação do grupo controle. Após a aplicação da formulação comercial, foram coletadas fêmeas ingurgitadas naturalmente desprendidas dos animais nos dias +5, +10 e +20 para acompanhamento da biologia reprodutiva e +4, +12 e +20 para avaliação da histologia dos ovários. As fêmeas coletadas para acompanhamento da biologia reprodutiva foram mantidas em câmara climatizada para oviposição, posteriormente, incubação desses ovos, enquanto as fêmeas utilizadas para as análises histológicas foram mantidas em câmara climatizada por 4 dias e após esse período, foram dissecadas. Na avaliação da biologia reprodutiva, foi observado que as fêmeas provenientes dos grupos tratados produziram uma menor quantidade de ovos ($p < 0,05$) e esses ovos apresentaram uma menor viabilidade ($p < 0,5$), quando comparados com o grupo controle. Todos os grupos tratados (G2 - dia+4; Grupo 3 - dia +12 e grupo 4 - +20) tiveram alterações morfológicas consideráveis. As alterações foram: desorganização citoplasmática, degradação citoplasmática, formato irregular do oócito, vesícula germinativa com formato irregular, redução dos grânulos de vitelo, vacuolização dos grânulos de vitelo e rompimento do oócito. Também foi observado um menor número de oócitos em todos estágios de desenvolvimento (I, II, III, IV e V) e um maior número de oócitos indeterminados, nos ovários de fêmeas provenientes dos grupos tratados ($p < 0,05$), quando comparados com o grupo controle. A partir desses resultados, é possível concluir que a formulação comercial contendo fipronil e fluazuron apresentou afetou a biologia reprodutiva e causou alterações histológica nos ovários de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, levando a redução no número de oócitos.

Palavras chave: Carrapato dos bovinos, benzoilureia, fenilpirazol, histologia

ABSTRACT

Rhipicephalus microplus is an important ectoparasite inside cattle breeding in tropical, subtropical and temperate region in the world. This tick is responsible for pathogens transmission, inducing a cattle pathological condition that can lead to a drop in meat and milk productivity. The *R. microplus* represents a great importance regarding to livestock cost, thus it is important control this ectoparasite which is done almost exclusively with chemical acaricide. Currently, there are commercial formulations for *R. microplus* control that contain, associated or not, fipronil and fluzuron. However there isn't any information regarding cytotoxic effects of these molecules on ticks. Research on morphological changes caused by these two products allows a better understanding of how these active ingredients act in different tick organs. Thus, the objective of this study was to evaluate the reproductive biology and histological effects of a commercial formulation, containing fipronil and fluzuron on the ovary of *R. microplus* engorged females. Three calves were infested with approximately 5.000 larvae on days -24, -21, -19, -17, -14, -12, -10, -7, -5 and -3, considering day 0, the treatment day. The treatment consisted on the application of a commercial acaricidal formulation with fipronil (1,25 %) and fluzuron (2,5%) (Tick Gard®- MSD Saúde Animal). Before application of acaricidal formulation, 20 engorged females, naturally detached from the cattle, were recovered, to form the control group. After application of the commercial formulation, engorged females naturally detached from the animals were collected on days +5, +10 and +20 for reproductive biology monitoring and on days +4, +12 and +20 for ovaries histology evaluation. The females collected for reproductive biology monitoring were kept in a climate-controlled chamber for oviposition, subsequently incubating these eggs, while the females used for histological analysis were kept in a climate-controlled chamber for 4 days and then dissected. In reproductive biology evaluation, it was observed that females from the treated groups produced a smaller amount of eggs ($p < 0.05$) and these eggs had a lower viability ($p < 0.5$) when compared to the control group. All treatment group had considerable morphological change. In the histological analysis, many alterations were observed in the oocytes of females from all treated groups, including irregularly shaped oocyte, irregularly shaped germinal vesicle, yolk granules reduction, yolk granules vacuolization and oocyte disruption. It was also observed a smaller number of oocytes in all stages of development (I, II, III, IV and V) and a greater number of indeterminate oocytes on ovaries of females from the treated groups ($p < 0.05$), when compared with the control group. From these results, it is possible to conclude that the commercial formulation containing fipronil and fluzuron affected the reproductive biology and caused histological alterations in the ovaries of engorged females of *R. microplus*, leading to a reduction in the number of oocytes.

Keywords: Cattle tick, benzoylurea, phenylpyrazole, histopathology.

CAPÍTULO I
CONSIDERAÇÕES GERAIS

1 INTRODUÇÃO GERAL

Os carrapatos pertencem ao filo Artropoda, classe Aracnida, subclasse Acari, ordem Ixodida, e família Ixodidae. A família Ixodidae possui o maior número de espécies descritas dentre as quatro famílias, com cerca de 702 espécies¹. As outras três famílias são Argasidae, Nuttalliellidae e uma família já extinta, denominada de Deinocrotonidae². Os carrapatos são artrópodes hematófagos, em que pelo menos em uma das fases de vida irá parasitar o hospedeiro e são o principal grupo de vetores de agentes patogênicos para animais, e o segundo para o humanos, fazendo com que esses ectoparasitos tenham grande importância em saúde pública e saúde animal¹.

Rhipicephalus microplus (Canestrini, 1888) é um carrapato originário da Ásia, sendo considerado o mais importante ectoparasito na criação de bovinos em regiões tropicais, subtropicais e temperadas ao redor do mundo³. Esse carrapato é responsável por grandes perdas econômicas, ocasionadas pela ação direta e indireta. Os prejuízos diretos são decorrentes da espoliação sanguíneas e estresse, levando a debilidade, anemia e perda de peso, predisposição a miíases e infecções secundárias⁴. De forma indireta, os prejuízos referem-se a transmissão de patógenos, como *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *Anaplasma marginale*, que isoladamente ou associados, podem causar sintomas como febre, depressão, hemoglobinúria, icterícia, anemia, diarreia, aborto, tremores, convulsões e coma, podendo até levar o animal a morte. Também estão incluídos entres os prejuízos indiretos os gastos com carrapaticidas, medicamentos, infraestrutura e mão de obra para tratamento dos animais⁵.

Atualmente, o controle de *R. microplus* é feito predominantemente com a utilização de carrapaticidas químicos, compostos por ingredientes ativos pertencentes a sete classes, incluindo as lactonas macrocíclicas, organofosforados, formamidinas, piretróides sintéticos, fenilpirazóis e inibidores de crescimento (Tabela 1). Entretanto, a utilização constante dos carrapaticidas, as vezes sem critérios técnicos adequados, tem resultado na seleção de populações de carrapatos resistentes^{6,7}. Enquanto novas tecnologias de controle, como utilização de agentes biológicos, extratos vegetais, óleos essenciais e vacinas ainda se encontram na fase de pesquisa^{8,9,10,11}, empresas tem adotado como alternativa, lançar novos produtos carrapaticidas a partir da associação de mais de um ingrediente ativo, visando o aumento da eficácia das formulações¹². Nesse sentido, uma das associações disponíveis comercialmente para o controle de *R. microplus* é a combinação do fipronil (fenilpirazol) com o fluazuron (inibidor de crescimento)¹³.

O fipronil (5-amino-1-[2,6-dicloro-4-(trimethylmethyl)sulfinil]-1H-pirazol-3-carbonitrila) é uma molécula do grupo dos fenilpirazóis utilizado para controle de pragas tanto na área da agricultura, como na área de medicina veterinária¹⁴. Atua nos receptores GABA (ácido g-aminobutírico), bloqueando o canal de cloro. O GABA é um neurotransmissor inibitório da junção neuromuscular e sinapse do sistema nervoso de artrópodes¹⁵, incluindo o singânglio de carrapatos¹⁶. Já o fluazuron pertence ao grupo das benzoilfeniluréias, atuando como reguladores do crescimento¹⁷, alterando o processo de muda, afetando o metabolismo de quitina e hormônios envolvidos nesse processo, prejudicando a formação e eclosão das larvas e o crescimento e desenvolvimento dos carrapatos¹⁸.

Nas formulações comerciais com a associação de fipronil + fluazuron, a ação carrapaticida se dá de forma sistêmica, uma vez que os carrapatos entraram em contato com essas moléculas por meio da ingestão de sangue do bovino tratado. A concentração plasmática máxima do fipronil em bovinos ocorre cerca de 2,5 dias após a aplicação do produto, e a meia-vida é de 19 dias após o tratamento. Já a concentração plasmática máxima do fluazuron ocorre cerca de 6 dias após aplicação do produto, e a meia-vida é de cerca de 24 dias¹³.

Pesquisas histológicas têm demonstrado que ingredientes ativos presentes nos carrapaticidas ocasionam importantes alterações em órgãos internos, incluindo ovários, glândulas salivares, singânglio, tegumento e intestino^{19-23,24-26}. Não existem dados na literatura a respeito do efeito histopatológico da associação do fipronil e fluazuron nos órgãos internos de *R. microplus*, bem como, estudos avaliando o efeito de uma formulação comercial, contendo fluazuron e fipronil, sobre carrapatos. Assim, o presente trabalho tem como objetivo verificar as alterações morfológicas em ovário de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* expostas ao fluazuron e fipronil.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Rhipicephalus microplus*

O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é um ectoparasito hematófago obrigatório que possui os bovinos como hospedeiros primários. Essa espécie está classificada na família Ixodidae, subfamília Rhipicephalinae, gênero *Rhipicephalus* e subgênero *Boophilus*. Curtice, 1981 classificou essa espécie no gênero *Boophilus*, porém, com base em estudos filogenéticos atuais, o táxon *Boophilus* foi reclassificado como um subgênero, e as espécies que pertenciam a esse antigo gênero foram reclassificadas no gênero *Rhipicephalus*²⁷. Essa espécie de carrapato é considerada a mais importante do ponto de vista econômico, na América Latina. Isso se dá, devido a sua alta capacidade de adaptação, podendo se espalhar rapidamente em uma região ou país, capacidade de atuar como vetor de agentes patogênicos de grande importância na bovinocultura, tais como, *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *Anaplasma marginale*²⁸ e pela alta incidência de resistência que populações desse ectoparasito apresentam a diversas classes de carrapaticidas^{6,7,29,30}.

O Brasil é um dos principais países produtores de carne³¹, sendo cada vez mais comum, a introdução de raças europeias nos cruzamentos industriais, tornando os animais mais susceptíveis ao parasitismo por *R. microplus*³². Raças europeias e seus cruzamentos com zebuínos perdem cerca de 6,89% do peso corporal devido infestação por carrapatos³³, e o parasitismo por *R. microplus* também ocasiona uma redução na produção de leite e redução no peso de vacas leiteiras³⁴. A irritação causada pelos carrapatos também leva a redução do consumo alimentar dos animais, reduzindo a produtividade e o status imunológico, predispondo os bovinos a outras patologias⁴. Estimativas recentes indicam que as perdas econômicas na bovinocultura de corte e de leite, decorrentes do parasitismo por *R. microplus*, chegam a US\$ 3.236,35 por ano⁴.

R. microplus tem os bovinos como hospedeiro preferencial, porém pode parasitar outros animais como bubalinos, equídeos, ovinos, caprinos e cervídeos. O seu ciclo de vida é monoxeno, podendo ser dividido em fase não parasitária e parasitária³⁵. A fase de vida não parasitária se inicia a partir do momento em que a teleógena (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 hospedeiro³⁶. Segundo Rocha et al.³⁷, uma teleógena pode fazer postura de 2.631 até 7.759 ovos. As larvas se tornam infestantes entre 4 a 6 dias, após a eclosão, quando ocorre a finalização do processo de enrijecimento da cutícula (deposição da quitina)³⁸. Uma vez que essas larvas se tornam

infestantes, elas sobem na vegetação (fototropismo positivo), de forma mais ativa nas primeiras horas da manhã e ao final da tarde, períodos com temperatura mais amenas e menor incidência de radiação ultravioleta³⁹ (Figura 1).

A fase de vida parasitária se inicia com as larvas sobre os animais, e inclui os estágios de larva, ninfa e adultos, terminado com desprendimento das fêmeas ingurgitadas e morte dos machos. Todas as mudanças de estágio e a cópula ocorrem sobre um mesmo hospedeiro, não sendo necessário o desprendimento para realização das mudas de larva para ninfa e de ninfa para adulto no solo, como ocorre nos carrapatos trioxenos. A duração dessa fase de vida é relativamente constante, levando cerca de 21 dias³, sendo regulado pela temperatura corporal do hospedeiro, que é constante. Já a fase não parasitária dura aproximadamente 70 dias, podendo ocorrer até 5 gerações por ano⁴⁰. A duração do ciclo biológico sofre alterações principalmente na fase não parasitária, pois, fatores como temperatura ambiental, humidade relativa, tipo de forrageira e manejo da pastagem afetam diretamente essa fase⁴¹. Um outro aspecto importante que merece ser mencionado é que segundo Gonzales³⁶, cerca de 95% dos carrapatos estão no ambiente (Figura 1).

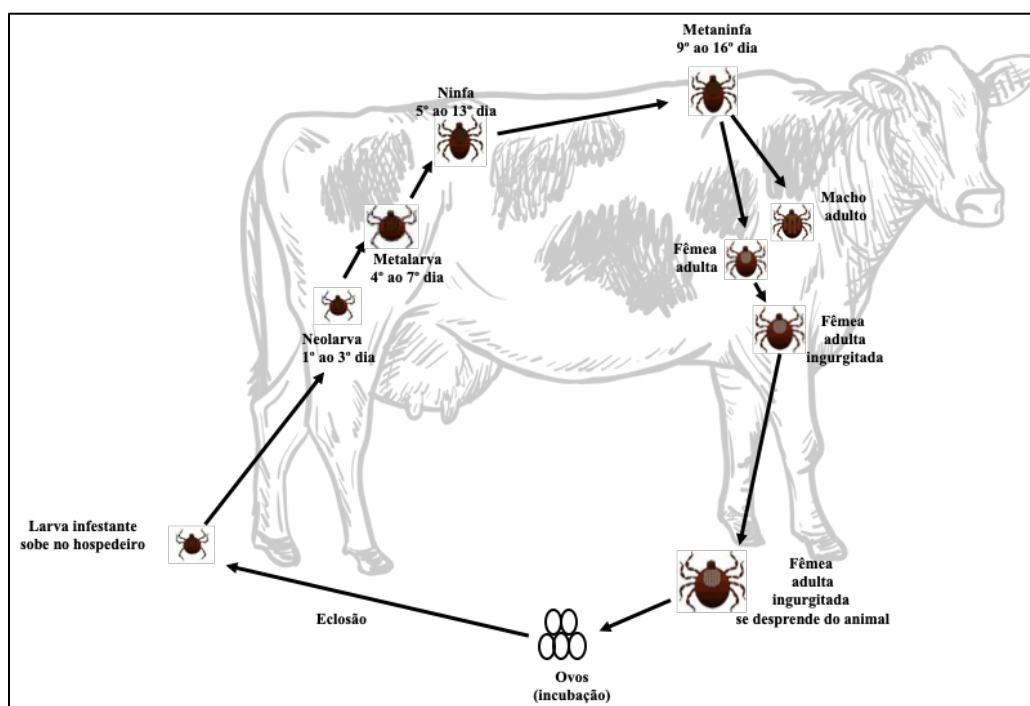


Figura 1 – Ciclo de vida do carrapato dos bovinos, *Rhipicephalus microplus*.

Fonte: modificada de https://www2.ufersa.edu.br/porta1/view/uploads/setores/98/entomologia/carrapatos_ahid.pdf

O conhecimento da ecologia de *R. microplus*, buscando interromper seu ciclo de vida, principalmente na fase parasitária, pode propiciar um controle mais eficiente, com menor custo e impacto ambiental, devido a diminuição da quantidade de acaricida utilizada, além de

desacelerar o processo de resistência dos carrapatos^{6,42,43}. O controle desse ectoparasito é amplamente dependente de carrapaticidas químicos, e a grande maioria desse carrapaticidas atua como agente neurotóxicos⁴⁴. No Brasil, resistência à diversos acaricidas, tais como clorpirifós, amitraz, cipermetrina, fluazuron e o fipronil já foram descritas em vários estados^{6,45-47,48-50}.

2.2 Fipronil e Fluazuron

As principais moléculas utilizadas atualmente como ingredientes ativos de carrapaticidas comerciais, disponíveis no mercado mundial, estão classificadas em sete classes químicas, e dentro de cada classe existem diferentes moléculas (Tabela 1).

Tabela 1 - Principais classes/moléculas utilizadas como ingredientes ativos de carrapaticidas disponíveis no mercado mundial.

Classe Química	Princípio Ativo
Piretróides	Alfacipermetrina, Deltametrina, Cipermetrina, Permetrina, Flumetrina
Formamidinas	Amitraz
Organofosforados	Clorpirifós, Clorfenvinfós, Cumafós, Diazinón, Ethion, Fenthión, Triclorfon, Diclorvós
Lactonas Macroclílicas	Abamectina, Doramectina, Eprinomectina, Ivermectina, Selamectina, Moxidectina, Milbemicina, Oxima
Fenilpirazois	Fipronil
Reguladores de crescimento	Fluazuron, Diflubenzuron, Lufenuron, Novaluron
Isoxazolinás	Afoxolaner, Fluralaner, Lotilaner, Sarolaner

O fipronil é inseticida desenvolvido por uma empresa francesa, a Rhône-Poulenc (atual Bayer Crop Science) entre 1985 e 1987 e lançado no mercado em 1993⁵¹. Esse composto atua ligando-se aos receptores ácido gama-aminobutírico e glutamato ligados aos canais iônicos

de cloreto⁵². O GABA é um dos principais neurotransmissores inibitórios do sistema nervoso central da maioria dos invertebrados⁵³. Este neurotransmissor transmite sinais que inibem a atividade nas células pós-sinápticas levando o parasito a uma superestimulação e convulsão⁵⁴. Esse receptor também é encontrado em vertebrados, porém o receptor GABA em vertebrados são molecularmente e farmacologicamente diferentes dos receptores GABA_A dos insetos, tornando o fipronil menos tóxicos para os mamíferos e outros vertebrados⁵⁵. Nos invertebrados, além de ser encontrado no sistema nervoso central, é encontrado também nas junções neuromusculares periféricas⁵⁶.

O fipronil, além de bloquear os canais de cloro ligados ao GABA, também bloqueia dois tipos de canais de cloro ligados ao glutamato⁵⁴. Uma classe de receptores L-glutamato, o canal de cloro ligado ao L-glutamato (GluCl), é unicamente presente em insetos⁵⁷ e também em carrapatos⁵⁸. O receptor de glutamato exerce efeito inibitório na atividade muscular (Figura 2)⁵⁷.

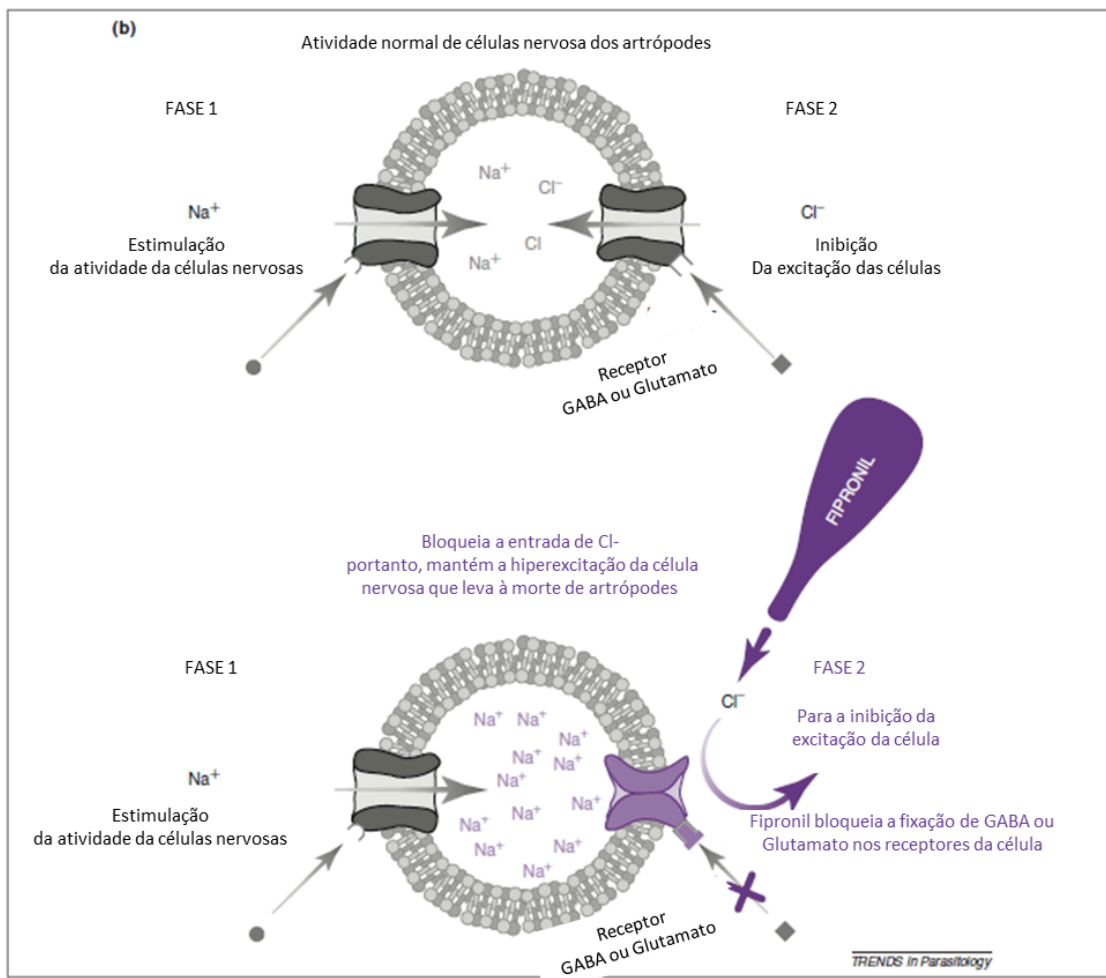


Figura 2: Modo de ação do fipronil nos receptores GABA ou glutamato nos artrópodes. Fonte: adaptado de Beugnet; Franc, 2012.

O fluazuron é uma molécula pertencente ao grupo de benzoilfeniluréia (regulador de crescimento de insetos), que atua inibindo a síntese de quitina⁵⁹. O efeito das benzoilfeniluréias no desenvolvimento dos artrópodes foi descoberto em 1970⁶⁰, e em 1994, o fluazuron foi introduzido no mercado para utilização nos animais⁶¹. A quitina é um aminopolissacarídeo de N-acetil-D-glicosamina (GlcNAc) e sua síntese envolve reações enzimáticas que convertem diferentes açúcares (glicose, glicogênio ou trealose) em polímeros de GlcNAc. As unidades de glicose são convertidas em GlcNAc, ligadas a uridina trifosfato (UTP), transportadas na célula (conjugada a dolicol fosfato) polimerizada em quitina, e através de ligações covalente com proteínas, forma as miofibrilas de quitina⁶² (Gaudêncio, 2016). A enzima quitina-sintetase (glicosiltransferases) catalisa a formação de quitina a partir de 5'-uridina difosfato-N-acetil-D-glicosamina (UDP-GlcNAc) ⁶³ (figura 3).

Os inibidores da síntese de quitina afetam a eficiência reprodutiva em fêmeas através da inibição da eclosão das larvas e a muda entre os estágios de vida dos carrapatos, dessa forma não possui efeito “knock-down”, sendo assim, sua atividade acaricida ocorre a longo prazo. Segundo Gaudêncio et al.⁴⁵ houve uma diminuição do peso das fêmeas ingurgitadas coletadas após 15 dias da aplicação do produto comercial contendo o fluazuron. Também houve diminuição do índice da produção de ovos em fêmeas coletadas com 8 dias após o tratamento. O fluazuron é uma molécula altamente lipofílica e quando administrada no hospedeiro, é acumulada no tecido adiposo o qual é lentamente liberada para a corrente sanguínea⁶⁴.

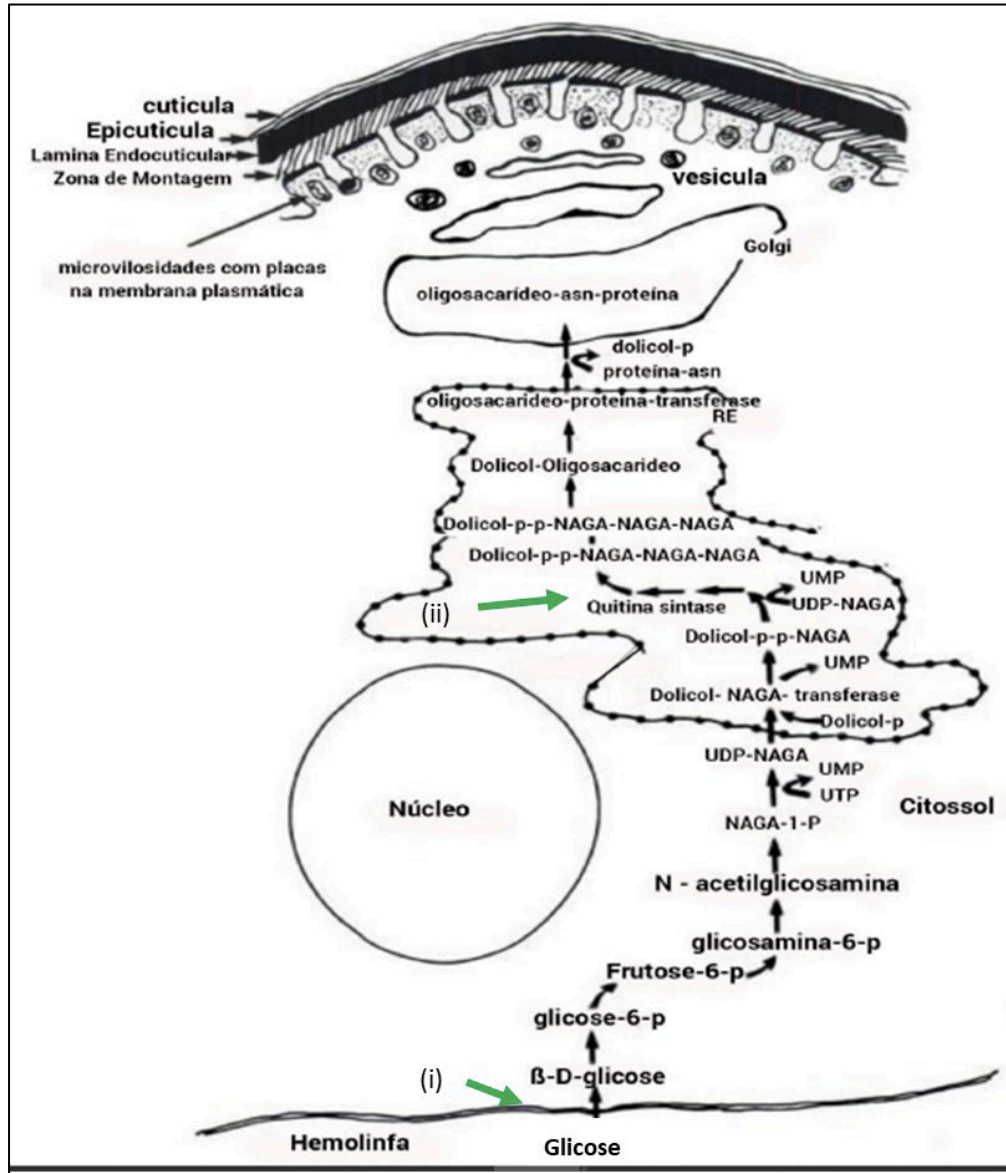


Figura 3: Biossíntese do polímero de quitina em carrapatos.
 Fonte: adaptado de Palli e RetnaKaran

Existe atualmente no mercado três produtos comerciais que contêm a associação entre fipronil e o fluazuron, o Tick Gard[®] (1,25% de fipronil + 2,5 de fluazuron 2,5%) MSD Saúde Animal, Fiprotack (5% de fipronil e 12,5% de fluazuron), da Clarion e o Superhion[®] (1% de fipronil e 3% de fluazuron), da Ouro Fino, ambos administrada via pour-on. A combinação possui atividade acaricida contra as formas imaturas e adulta dos carrapatos. Quando esses compostos são administrados em uma mesma formulação a concentração sanguínea plasmática máxima do fipronil em bovinos foi de 73,7 g/L após 2,5 dias após a aplicação do produto nos animais via pour-on. Já o fluazuron, a concentração sanguínea plasmática máxima foi 26,1 µg/L, ocorrendo após 6 dias da administração do produto. A meia

vida do fipronil foi de 19 dias (± 2 dias) e a do fluazuron foi de 24,5 dias ($\pm 3,5$ dias) após a administração do produto¹³.

2.3 Anatomia e fisiologia dos ovários dos carrapatos

Nos ixodídeos, o ovário se apresenta como uma estrutura oca, tubular, em forma de “U”, e juntamente com um par de ovidutos, um útero, uma vagina, um par de glândulas acessórias e a abertura genital, formam o aparelho reprodutor feminino. O ovário é constituído por um epitélio simples, que forma a parede que delimita o lúmen; células intersticiais, que recobrem o lúmen e preenchem os espaços entre as oogonias; e os oócitos primários⁶⁵. As oogonias fixam-se na parede do ovário por uma estrutura chamada de pedicelo (prolongamento das células do epitélio ovariano) e permanecem fixadas nessa estrutura até a sua liberação para o interior do lúmen^{65,66} (Figura 4).

Nos estágios juvenis e em fêmeas não ingurgitadas, o ovário exibe uma estrutura tubular simples. No estágio de ninfa o ovário possui somente oogônia e células intersticiais indiferenciadas. Quando a ninfa realiza a muda para fase de fêmea, já é observado o desenvolvimento de oócitos primários, circundada por uma única camada de célula epitelial⁶⁶. O ovário é envolto por uma única camada de células epiteliais e ocasionalmente células musculares lisas, túnica própria acelular, bainha de tecido conectivo com 4 a 5 camadas de material fibrilar. A túnica própria recobre cada oócito e recobre a parte externa à medida que eles aumentam de tamanho. Acredita-se que túnica própria seja permeável a vitelogenina e outras proteínas da hemolinfa que são utilizadas pelo oócito para a vitelogênese (formação de grânulos de vitelo necessário para o desenvolvimento embrionário)⁶⁶ (Figura 5).

Os oócitos passam por mudanças morfológicas importantes e necessárias para que sua fertilização ocorra. A classificação dos oócitos variam de oócito I até o oócito V e essa classificação é feita de acordo com a aparência do citoplasma, presença de vesícula germinativa, presença e tamanho dos grânulos de vitelo e presença ou ausência do cório⁶⁷ (Figura 5).

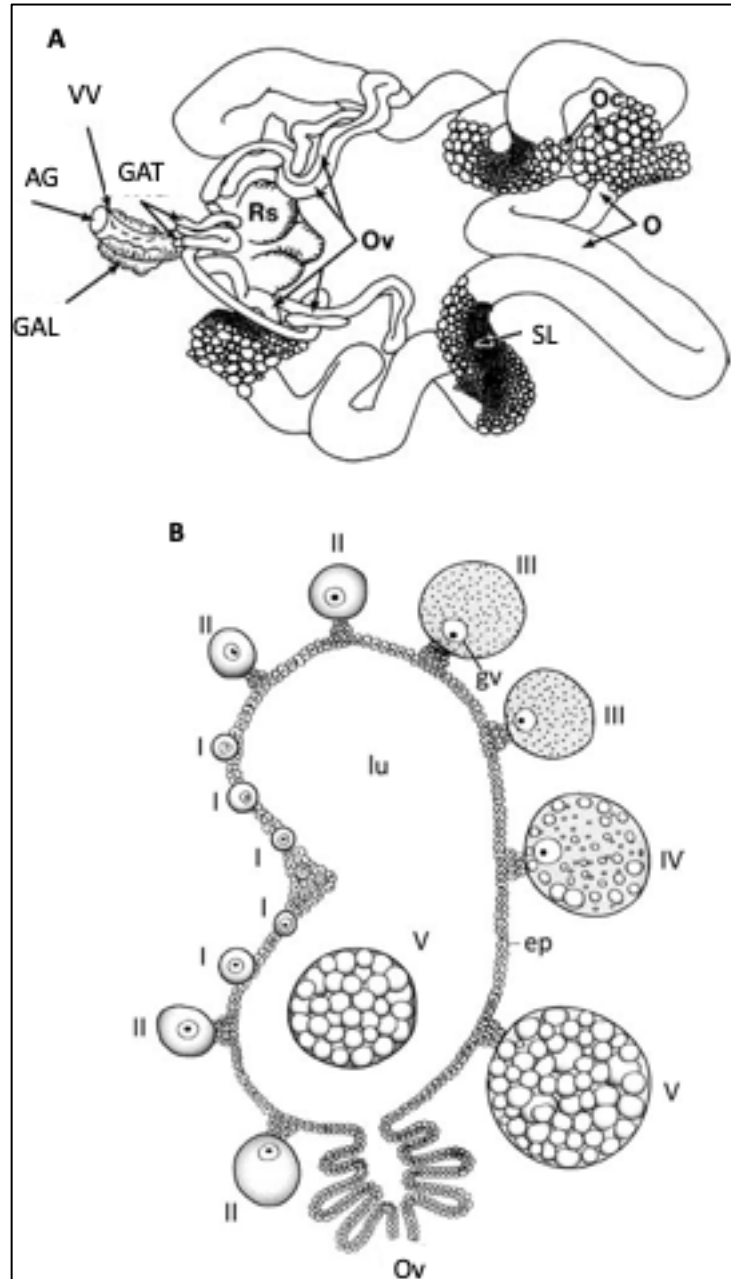


Figura 4 – Sistema reprodutivo de fêmeas de carrapatos. A: Diagrama da vista dorsal do sistema reprodutivo de fêmeas de ixodídeos (AG: abertura genital; GAL: glândula acessória lobular; SL: sulco longitudinal; O: ovário; Oc: oócitos; Ov: ovidutos; Rs: receptáculo seminal; GAT: glândula acessória tubular; VV: vagina vestibular). B: Diagrama do ovário de *Rhipicephalus microplus* mostrando os estágios de desenvolvimento inicial do oócito até a ovulação (I-V) (I: oócito I; II: oócito II; III: oócito III; IV: oócito IV; V: oócito V; ep: epitélio; lu: lúmen; ov: oviduto; gv: vesícula germinativa).

Fonte: Adaptada de Ogihara e Taylor⁶⁸.

O oócito I é pequeno e seu formato varia de redondo a elíptico; a vesícula germinativa é facilmente visualizada. Não há visualização de grânulos de vitelo e a membrana plasmática nesse estágio é delgada. O oócito II é maior que o oócito I e no citoplasma começa a aparecer pequenos grânulos de vitelo. A membrana plasmática é mais espessa que no estágio anterior e a vesícula germinativa ainda é observada⁶⁷. Ribossomos e polissomos se acumulam no citoplasma e grandes quantidades de mitocôndrias também estão presentes nessa região. Nessa fase, com o crescimento do oócito, a área de superfície se torna maior e ocorre produção de microvilos abaixo da túnica própria ou lâmina basal⁶⁵(Figura 4).

O oócito III é maior que o estágio anterior, e nessa fase a vesícula germinativa é difícil de ser visualizada, há deposição de grânulos de vitelo no citoplasma e a membrana plasmática continua se espessando, mostrando característica do cório. Esse estágio é chamado de estágio vitelogênico (oócito III para oócito IV), pois inicia-se a deposição de grânulos de vitelo no interior do oócito. Nessa fase, o núcleo do oócito migra em direção ao pedicelo⁶⁹ (Figura 5).

No oócito IV já há deposição de grânulos de vitelo de vários tamanhos e os grânulos maiores ficam na periferia, e em algumas espécies esse é o último estágio de desenvolvimento. O oócito V é o estágio final de desenvolvimento na maioria das espécies, onde há grandes grânulos de vitelo distribuídos por todo o citoplasma. O cório apresenta-se espesso e possui duas camadas distintas, uma externa, que está em contato com as células epiteliais da parede ovariana, chamada de exocório, e uma mais interna, que está em contato com o oócito, chamada de endocório. Nesse estágio o oócito já se encontra no lúmen ovariano⁶⁷ (Figura 4).

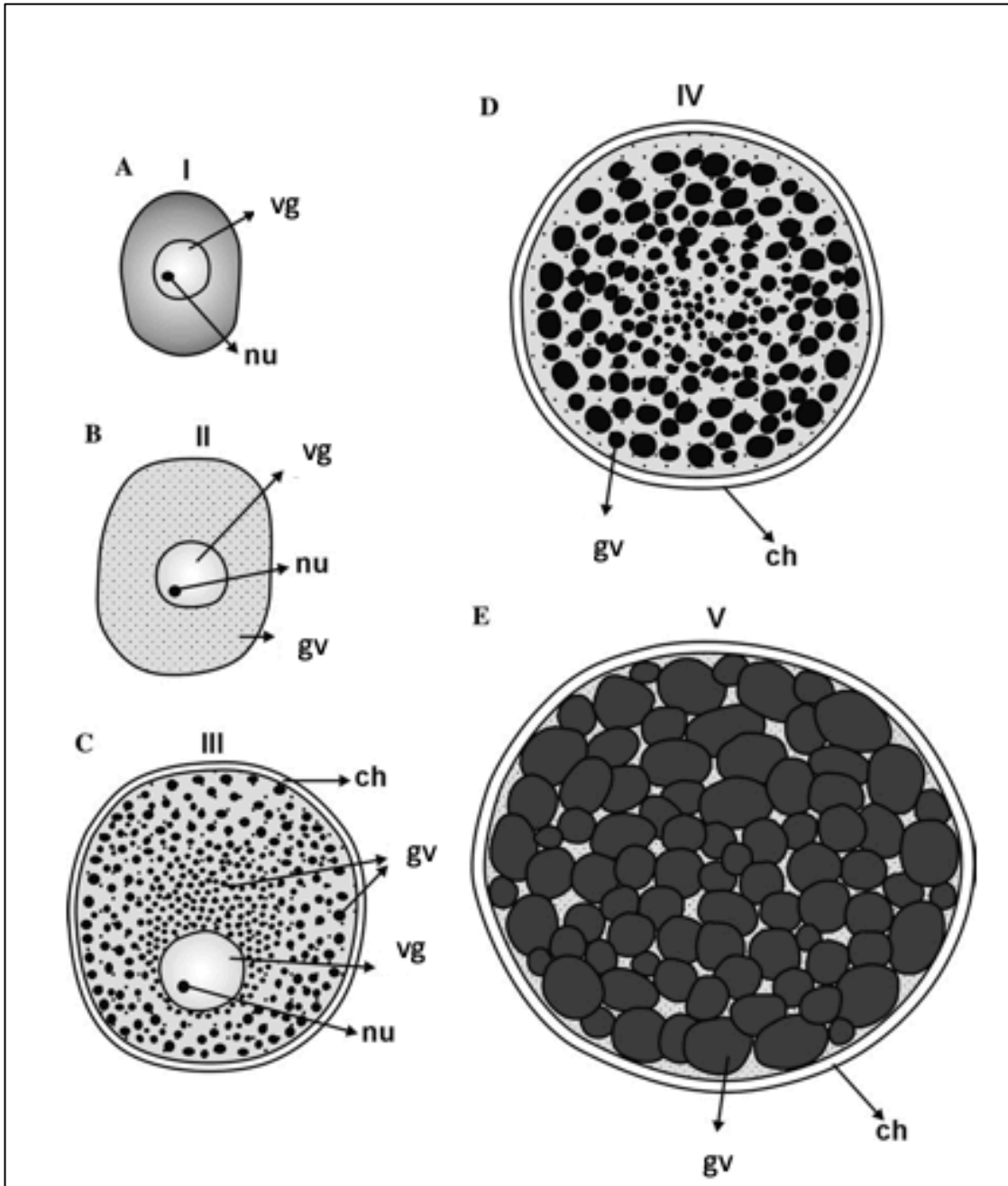


Figura 5 – Diagrama da ovogênese (A-E) do ovário de *Rhipicephalus sanguineus* (I: oócito I; II: oócito II; III: oócito III; IV: oócito IV; V: oócito V; ch: cório; vg: vesícula germinativa; nu: nucléolo; gv: grânulos de vitelo.). Fonte: Adaptado de Roma et al, 2013.

A figura 6 apresenta uma imagem de microscopia eletrônica do cório do oócito de *Rhipicephalus sanguineus*:

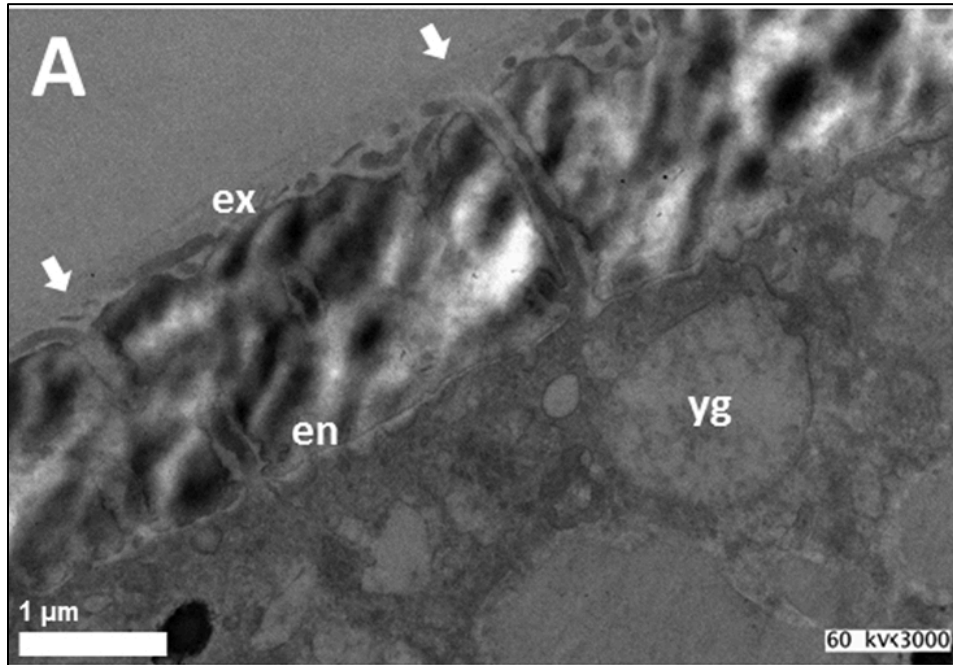


Figura 6: Microscopia eletrônica de transmissão do cório do oócito do *Rhipicephalus sanguineus*. Ex= exocório, em= endocório, yg grânulo de vitelo, seta= mostra canal do cório. Fonte: Iturbe-Requena et al⁷⁰, 2020.

O principal nutriente para o desenvolvimento embrionário dos artrópodes, incluindo os carrapatos, é a vitelina, que tem como precursora uma proteína chamada de vitelogenina. A síntese da vitelogenina ocorre no intestino e no corpo gorduroso das fêmeas, sendo liberada na hemolinfa e captada pelo ovário via receptores. Dentro dos oócitos, a vitelogenina acumula-se, formando grânulos de vitelo⁷¹. O pedicelo também parece estar envolvido na síntese de parte dos elementos vitelogênicos que são transportados de forma ativa para o oócito. A grande quantidade de mitocôndrias presentes no citoplasma das células do pedicelo, sugerem que essas organelas participam do transporte ativo dos precursores de vitelo em *Amblyomma triste*⁷².

Muitos estudos apontam que os hormônios ecdisteróides possuem um papel importante na regulação do desenvolvimento do oócito e na vitelogênese (Figura 7)⁷¹. Quando a fêmea inicia o processo de ingurgitamento, após a cópula⁶⁹. Fêmeas de *Amblyomma hebraeum*, ao atingirem o peso crítico, após a cópula, desencadearam o processo de vitelogênese e o desenvolvimento oocitário⁷³. Durante a cópula, substâncias, chamadas de fatores de ingurgitamento, oriundas do trato reprodutivo masculino, são transferidas para a

fêmea juntamente com os espermatozoides e induzem o ingurgitamento completo e a síntese de ecdisona⁷¹.

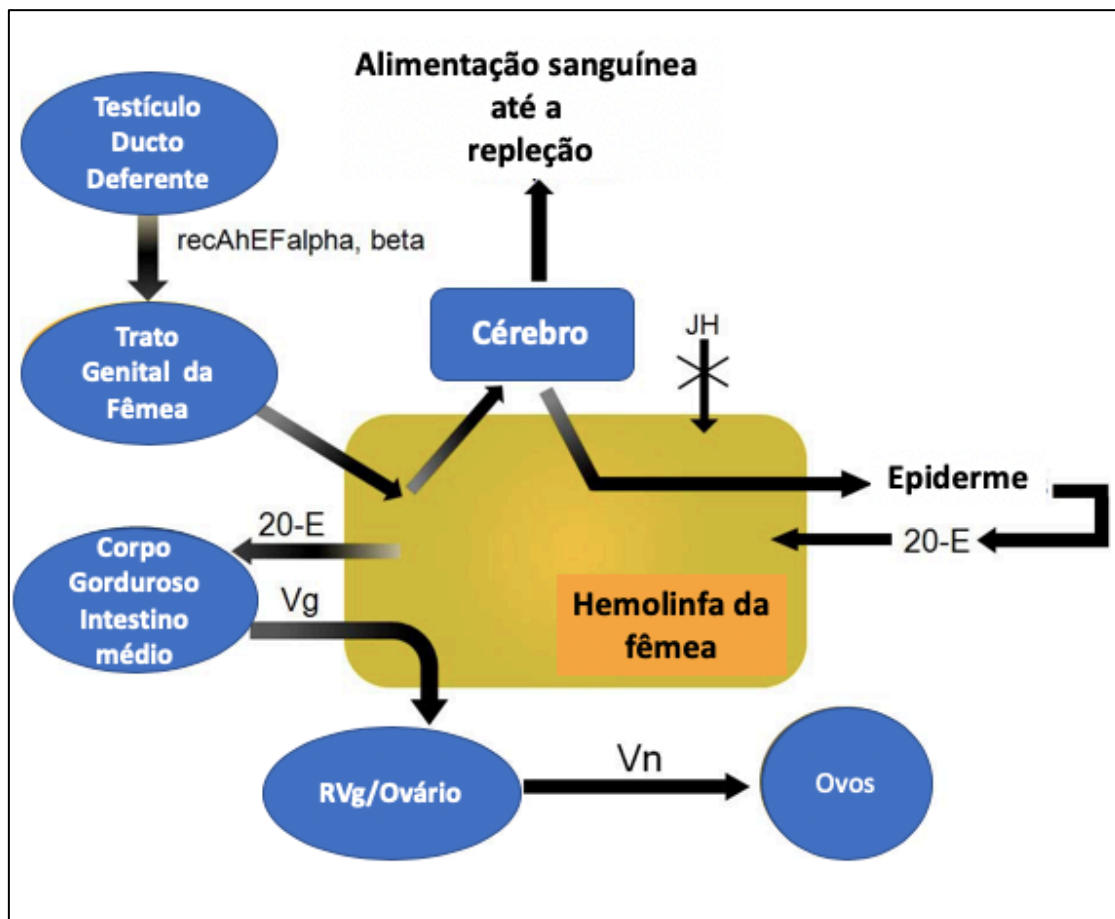


Figura 7 – Diagrama da regulação endócrina da vitelogenese em carrapatos através dos ecdisteróides. recAhE α , β : feromônio sexual proteico masculino alfa e beta; Vg: vitelogenina; VgR: receptor de vitelogenina; Vn: vitelina; 20-E: 20-hidroxiecdisona; JH: hormônio juvenil. Fonte: adaptada de Roe et al⁷¹.

2.4 Alterações histopatológicas ocasionadas por carrapaticidas em ovários de carrapatos

Em relação aos ovários, existem estudos mostrando os efeitos histopatológicos de moléculas carrapaticidas pertencentes a diferentes classes químicas, incluindo estudos com piretroides, organofosforados e fenilpirazóis. O alvo de ação dos piretróides são os canais de sódio (responsáveis pelo início e propagação do potencial de ação), inibindo sua desativação, dessa forma há um aumento do tempo de abertura dos canais de sódio⁷⁴. Alguns estudos relataram alterações histológicas em ovários de *Rhipicephalus sanguineus* causadas por deltametrina¹⁹. As alterações mais marcantes ocorreram nas concentrações mais altas da deltametrina (200 ppm), sendo observado oócitos com formato irregular, perdas da característica dos grânulos vitelínicos e presença de intensa vacuolização citoplasmática em

todos os oócitos. Além disso, os oócitos em estágio avançado de desenvolvimento apresentaram ruptura do cório e desorganização citoplasmática, perdendo características que conferem a viabilidade celular e o posterior desenvolvimento de um novo indivíduo. A deltametrina também afetou a vitelogênese, a formação do cório e causou danos na vesícula germinativa de alguns oócitos, levando a hipertrofia e fragmentação da cromátide dos oócitos.

Roma *et.al.*²¹ avaliaram a ação da permetrina nos ovários de *R. sanguineus* s.l. e também encontraram resultados similares. As alterações mais acentuadas, similar ao trabalho citado anteriormente, ocorreram no tratamento com maior concentração do composto (2062 ppm), incluindo a presença de vacúolos no citoplasma e formato irregular em todos os estágios oocitários; em oócitos II a vesícula germinativa tornou-se mais larga e elíptica; em oócito III um maior número de vacúolos foram observados na região do pedicelo; poucos grânulos de vitelo e presença de vacúolos no citoplasma nos oócitos IV; e finalmente, perda completa do formato e vacúolos na periferia e dentro dos grânulos vitelínicos (menos evidente) do oócitos V.

Buczek *et.al.*⁷⁵ avaliou a biologia reprodutiva e o percentual de eclosão em *Ixodes ricinus* submetidos a diferentes concentrações de alfacipermetrina e deltametrina, e observaram redução significativa da taxa de postura dos ovos e de eclosão das larvas até mesmo em doses mais baixas.

Em uma pesquisa com fêmeas tratadas com amitraz (formamidinas), foi avaliado alterações oocitárias, das quais foram encontradas: bordas onduladas, regiões onde havia descontinuidade da margem, e perda da integridade do vitelo em oócitos nos estágios IV e V. Essas alterações provavelmente foram causadas pela entrada do composto tóxico através da hemolinfa, uma vez que a deposição do cório também foi alterada, permitindo dessa forma, a passagem do amitraz para o interior do oócito^{20,76}.

O fipronil (fenilpirazól) também ocasiona alterações nos ovários. Em um estudo com *R. sanguineus* s.l., concentrações baixas de fipronil já foram capazes de causar alterações nesses órgãos. Na concentração de 10 ppm de fipronil, 75% dos oócitos II e III possuem vacúolos em grande parte do citoplasma, com poucos grânulos vitelínicos e espaços vazios em toda célula. Nos oócitos IV e V de fêmeas submetidas a 10 ppm de fipronil, houveram grande aumento de vacúolos. Os oócitos V se tornaram enrugados pela ruptura dos grânulos de vitelo²⁵. Essas alterações, estão de acordo com o resultado obtido por Davey *et.al.*⁷⁷, onde foi demonstrado uma redução da capacidade reprodutiva de fêmeas *R. microplus* tratadas com fipronil.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar se a formulação comercial contendo fipronil + fluazuron ocasiona alterações na biologia reprodutiva e morfologia em ovários de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*.

3.2 Objetivo específico

- Avaliar se a formulação comercial contendo fipronil + fluazuron ocasiona alterações na biologia reprodutiva de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*;
- Avaliar se a formulação comercial contendo fipronil + fluazuron ocasiona alterações histopatológicas em ovários de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*
- Avaliar se existe correlação entre as alterações na biologia reprodutiva e alterações histopatológicas, ocasionadas pela associação de fipronil + fluazuron

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Guglielmone AA, Robbins RG, Apanaskevich DA, Petney TN, Estrada-Peña A, Horak IG, et al. The argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world: A list of valid species names. *Zootaxa*. 2010;28(2528):1–28.
2. Dantas-Torres F, Fernandes Martins T, Muñoz-Leal S, Onofrio VC, Barros-Battesti DM. Ticks (Ixodida: Argasidae, Ixodidae) of Brazil: Updated species checklist and taxonomic keys. *Ticks Tick Borne Dis*. 2019;
3. Nuñez JL, Muñoz Cobenas ME, Moltedo HL. *Boophilus microplus*, la garrapata comun del Ganado vacuno. *Buenos Aires Hemisfério Sur*,. 1982;19.
4. Grisi L, Leite RC, Martins JR de S, de Barros ATM, Andreotti R, Cançado PHD, et al. Reavaliação do potencial impacto econômico de parasitos de bovinos no Brasil. *Rev Bras Parasitol Vet*. 2014;23(2):150–6.
5. Esteves E, Bastos C V., Zivkovic Z, de La Fuente J, Kocan K, Blouin E, et al. Propagation of a Brazilian isolate of *Anaplasma marginale* with appendage in a tick cell line (BME26) derived from *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Vet Parasitol*. 2009;161(1–2):150–3.
6. Reck J, Klafke GM, Webster A, Dall’Agnol B, Scheffer R, Souza UA, et al. First report of fluazuron resistance in *Rhipicephalus microplus*: A field tick population resistant to six classes of acaricides. *Vet Parasitol* [Internet]. 2014;201(1–2):128–36. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.01.012>
7. Klafke G, Webster A, Dall Agnol B, Pradel E, Silva J, de La Canal LH, et al. Multiple resistance to acaricides in field populations of *Rhipicephalus microplus* from Rio Grande do Sul state, Southern Brazil. *Ticks Tick Borne Dis* [Internet]. 2017;8(1):73–80. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.09.019>
8. Merino O, Almazán C, Canales M, Villar M, Moreno-Cid JA, Estrada-Peña A, et al. Control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infestations by the combination of subolesin vaccination and tick autocidal control after subolesin gene knockdown in ticks fed on cattle. *Vaccine*. 2011;29(12):2248–54.
9. Fernandes ÉKK, Bittencourt VREP, Roberts DW. Perspectives on the potential of entomopathogenic fungi in biological control of ticks. *Exp Parasitol*. 2012;130(3):300–5.

10. Kanapadinchareveetil S, Chandrasekhar L, Pious A, Kartha HS, Ravindran R, Juliet S, et al. Molecular, histological and ultrastructural characterization of cytotoxic effects of amitraz on the ovaries of engorged females of *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus*. *Exp Parasitol* [Internet]. 2019;204(July):107732. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2019.107732>
11. Nwanade CF, Wang M, Wang T, Yu Z, Liu J. Botanical acaricides and repellents in tick control: current status and future directions. *Exp Appl Acarol* [Internet]. 2020;81(1):1–35. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10493-020-00489-z>
12. Furlong J, Martins JR, Prata MCA. O carrapato dos bovinos e a resistência: temos o que comemorar? *A Hora Veterinária* [Internet]. 2007;159:1–7. Available from: <http://r1.ufrj.br/adivaldofonseca/wp-content/uploads/2014/06/Artigo-A-Hora-Veterinária-Set-07.pdf>
13. Lopes WDZ, Chiummo RM, Vettorato LF, de Castro Rodrigues D, Sonada RB. The effectiveness of a fixed-dose combination pour-on formulation of 1.25% fipronil and 2.5% fluazuron against economically important ectoparasites and associated pharmacokinetics in cattle. *Parasitol Int*. 2017;66(5):627–34.
14. Hodgson E. Biotransformation of Individual Pesticides: Some Examples [Internet]. First Edit. Vol. 1, Pesticide Biotransformation and Disposition. Elsevier Inc.; 2012. 195–208 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-385481-0.00009-5>
15. Rauh JJ, Lummis SCR, Sattelle DB. Pharmacological and biochemical properties of insect GABA receptors. *Trends Pharmacol Sci*. 1990;11(8):325–9.
16. Lucien J, Reiffenstein R, Zbitnew G, Kaufman WR. γ -Aminobutyric acid (GABA) and other amino acids in tissues of the tick, *Amblyomma hebraeum* (Acari: Ixodidae) throughout the feeding and reproductive periods. *Exp Appl Acarol*. 1995;19(11):617–31.
17. Coop RL, Taylor MA, Jacobs DE, Jackson F. Ectoparasites: Recent advances in control. *Trends Parasitol*. 2002;18(2):55–6.
18. Graf JF, Gogolewski R, Leach-Bing N, Sabatini GA, Molento MB, Bordin EL, et al. Tick control: An industry point of view. *Parasitology*. 2004;129(SUPPL.).
19. Camargo-Mathias MI, Pereira NRC, da Silva Reis C, de Almeida CR, dos Santos Mendes DR, de Araújo GB, et al. Deltamethrin as inductor agent of precocious ovarian degeneration in *Rhipicephalus sanguineus* s.l. (Acari: Ixodidae) ticks. *Exp Appl Acarol*. 2017;72(2):161–9.
20. Sreelekha K, Chandrasekhar L, Kartha HS, Ravindran R, Juliet S, Ajithkumar KG, et

- al. Ultrastructural analysis of oocytes of *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus* during postengorgement period as a tool to evaluate the cytotoxic effects of amitraz and deltamethrin on the germinative cells. *Vet Parasitol* [Internet]. 2017;247(October):113–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.10.006>
21. Roma GC, Furquim KCS, Bechara GH, Mathias MIC. Cytotoxic effects of permethrin in oocytes of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) fully engorged females: I. Direct or indirect action of the acaricide in germ cells? *Exp Appl Acarol*. 2011;53(3):287–99.
 22. Prado-Ochoa MG, Ramírez-Noguera P, Díaz-Torres R, Garrido-Fariña GI, Vázquez-Valadez VH, Velázquez-Sánchez AM, et al. The action of two ethyl carbamates on acetylcholinesterase and reproductive organs of *Rhipicephalus microplus*. *Vet Parasitol*. 2014;199(3–4):215–24.
 23. Sreelekha K, Chandrasekhar L, Pious A, Kartha HS, Ravindran R, Juliet S, et al. Molecular, histological and ultrastructural characterization of cytotoxic effects of amitraz on the ovaries of engorged females of *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus*. *Exp Parasitol* [Internet]. 2019;204(July):107732. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2019.107732>
 24. Nodari EF, Roma GC, Furquim KCS, Bechara GH, Camargo-Mathias MI. Action of permethrin on *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) semi-engorged females: Morpho-physiological evaluation of salivary glands. *Ticks Tick Borne Dis* [Internet]. 2012;3(4):219–26. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2012.03.008>
 25. Oliveira PR, Bechara GH, Camargo-Mathias MI. Evaluation of cytotoxic effects of fipronil on ovaries of semi-engorged *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) tick female. *Food Chem Toxicol*. 2008;46(7):2459–65.
 26. De Oliveira PR, Calligaris IB, Roma GC, Bechara GH, Camargo-Mathias MI. Fluazuron-induced morphophysiological changes in the cuticle formation and midgut of *Rhipicephalus sanguineus* Latreille, 1806 (Acari: Ixodidae) nymphs. *Parasitol Res*. 2013;112(1):45–58.
 27. Murrell A, Barker SC. Synonymy of *Boophilus* Curtice, 1891 with *Rhipicephalus* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). *Syst Parasitol*. 2003;56(3):169–72.
 28. CDC. Centers for Disease Control and Prevention. 2019.
 29. Guerrero FD, Lovis L, Martins JR. Mecanismos de resistência aos acaricidas em *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Rev Bras Parasitol Vet*. 2012;21(1):1–6.

30. Cruz BC, Lopes WZ, Maciel WG, Felippelli G, Fávero FC, Teixeira WFP, et al. Susceptibility of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* to ivermectin (200, 500 and 630µg/kg) in field studies in Brazil. *Vet Parasitol* [Internet]. 2015;207(3–4):309–17. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.12.012>
31. Gomes RDC, Feijó GLD, Chiari L. *Evolução e Qualidade da Pecuária Brasileira*. 2017;2–5.
32. Andreotti R, Barros JC, Garcia MV, Da Silva Rodrigues V, De Oliveira Souza Higa L, Duarte PO, et al. Cattle tick infestation in brangus cattle raised with Nelore in central Brazil. *Semin Agrar*. 2018;39(3):1099–113.
33. Calvano MPCA, Brumatti RC, Garcia MV, Barros JC, Andreotti R. Economic efficiency of *Rhipicephalus microplus* control and effect on beef cattle performance in the Brazilian Cerrado. *Exp Appl Acarol* [Internet]. 2019;79(3–4):459–71. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10493-019-00446-5>
34. Jonsson NN, Mayer DG, Matschoss AL, Green PE, Ansell J. Production effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation of high yielding dairy cows. *Vet Parasitol*. 1998;78(1):65–77.
35. Ferretto R. Revisão de Literatura sobre *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. 2013;46.
36. Gonzales JC. O ciclo parasitário do *Boophilus microplus* (can 1887) em bovinos estabulados. MESTRE JOU, editor. *Arq fac vet*. 1974;2(1):25–34.
37. Rocha UF, Banzatto DA, Woelz CR, Bechara GH, Galluzzi FD, Garcia MCC. 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.
38. Gonzales JC. O carrapato do boi: vida, resistência, controle. Embrapa Ce. São Paulo; 1975. 104 p.
39. Waladde SM, Rice M. Physiology of Ticks. In: Obenchain F., Galun R, editors. *Physiology of Ticks*. New York: Pergamon Press Ltd.; 1982.
40. Cruz BC, de Lima Mendes AF, Maciel WG, dos Santos IB, Gomes LVC, 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*. 2020;119(8):2421–30.
41. Veríssimo O.; Odessa CJN. *Resistência e Controle do Carrapato-do-boi*. 2015.
42. Andreotti R, Garcia MV, Koller WW. Carrapatos na cadeia produtiva de bovinos. Vol. 1. 2019. 1–240 p.

43. Souza Higa L de O. Acaricide Resistance Status of the *Rhipicephalus microplus* in Brazil: A Literature Overview. *Med Chem (Los Angeles)*. 2015;5(7):326–33.
44. Eto M. Biochemical Mechanisms of Resistance to Insecticides. In: *Chemistry of Plant Protection*. Berlin: Springer, Berlin, Heidelberg; 1990. p. 67–8.
45. Gaudêncio FN, Klafke GM, Tunholi-Alves VM, Ferreira TP, Coelho CN, da Fonseca AH, et al. Activity of carboxylesterases, glutathione-S-transferase and monooxygenase on *Rhipicephalus microplus* exposed to fluazuron. *Parasitol Int* [Internet]. 2017;66(5):584–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.parint.2017.04.006>
46. Gomes A, Koller WW, de Barros ATM. Suscetibilidade de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* a carrapaticidas em Mato Grosso do Sul, Brasil. *Cienc Rural*. 2011;41(8):1447–52.
47. Campos Júnior DA, Oliveira PR de. Avaliação in vitro da eficácia de acaricidas sobre *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) de bovinos no município de Ilhéus, Bahia, Brasil. *Ciência Rural*. 2005;35(6):1386–92.
48. Raynal, José Tadeu; Silva AAB Da. from Bahia state North-Central region. *Rev Bras Parasitolol*. 2013;2961:71–7.
49. Wouflan Silva W, Célia A, Athayde R, Gleiton ;, Batata De Araújo M, Dantas V, et al. Resistência de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* e *Rhipicephalus sanguineus* (ACARI: IXODIDAE) a carrapaticidas no semi-árido paraibano: efeito da cipermetrina e do amitraz. *Agropecuária Científica no Semi-árido* [Internet]. 2005;01:59–62. Available from: www.cstr.ufcg.edu.br/acsa
50. de Santana BB, Ramos RAN, Santana M de A, Alves LC, de Carvalho GA. Susceptibility of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) to pyrethroids and their associations in Pernambuco, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet*. 2013;22(2):276–80.
51. Tingle CCD, Rother JA, Dewhurst CF, Lauer S, King WJ. Fipronil: environmental fate, ecotoxicology, and human health concerns. *Rev Environ Contam Toxicol*. 2003;176:1–66.
52. Cole, L.M; Nicholson, R.A; Casida JE. Action of Phenylpyrazole Insecticides at the GABA-Gated Chloride Channel. *Pestic Biochem Physiol*. 1993;46:47–54.
53. Ilg T, Berger M, Noack S, Rohwer A, Gaßel M. Glutamate decarboxylase of the parasitic arthropods *Ctenocephalides felis* and *Rhipicephalus microplus* : Gene identification , cloning , expression , assay development , identification of inhibitors by high throughput screening and comparison with the . *Insect Biochem Mol Biol* [Internet].

- 2013;43(2):162–77. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibmb.2012.11.001>
54. Manual TT. Insecticide Mode of Action. Insectic Mode Action. 1982;
 55. Millar NS, Buckingham SD, Sattelle DB, B PRSL. Stable Expression of a Functional Homo-Oligomeric Drosophila GABA Receptor in a Drosophila Cell Line. 1994;307–14.
 56. Lummis SCR. Mini-review gaba receptors in insects. *Comp Biochem Physiol Part C, Comp.* 1990;95(I):1–8.
 57. Beugnet F, Franc M. Insecticide and acaricide molecules and/or combinations to prevent pet infestation by ectoparasites. *Trends Parasitol.* 2012;28(7):267–79.
 58. Simo, Ladislav; Sonenshine, Daniel; Park, Yoonseong; Zitnan D. Nervous, Function, Genomic and Proteomics. In: Sonenshine D, editor. *Biology of ticks*, second edition. 2nd ed. New York: Oxford University Press; 2014. p. 309–67.
 59. Graf JF. The role of insect growth regulators in arthropod control. *Parasitol Today.* 1993;9(12):471–4.
 60. Verloop A, City K. Benzoylphenyl Ureas—A New Group of Larvicides Interfering with Chitin Deposition. 1977;19111(I).
 61. Junquera P, Hosking B, Gameiro M, MacDonald A. Benzoylphenyl ureas as veterinary antiparasitics. An overview and outlook with emphasis on efficacy, usage and resistance. *Parasite.* 2019;26.
 62. Gaudêncio FN. Efeito do fluazuron sobre ovos , larvas e fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* [Internet]. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; 2016. Available from: <https://tede.ufrj.br/jspui/handle/jspui/1804>
 63. Cohen E. Chitin synthesis and inhibition: A revisit. *Pest Manag Sci.* 2001;57(10):946–50.
 64. Taylor MA. Recent Developments in Ectoparasiticides. 2001;253–68.
 65. Diehl PA, Aeschlimann A. Tick Reproduction: Oogenesis and Oviposition. In: *Physiology of ticks*. New York: Pergamon Press Ltd.; 1982. p. 278–313.
 66. Oliveira P. Dinâmica da vitelogêneses de carrapatos *Amblyomma triste* (Koch, 1844) (Acari: Ixodidae). *Aleph.* 2006;
 67. Denardi SE, Bechara GH, Oliveira PR De, Nunes ÉT, Saito KC, Camargo Mathias MI. Morphological characterization of the ovary and vitellogenesis dynamics in the tick *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). *Vet Parasitol.* 2004;125(3–4):379–95.
 68. Ogihara, Mari; Taylor D. Female Reproductive System. In: Sonenshine DE, editor. *Biology of ticks*, second edition. 2nd ed. New York: Oxford University Press; 2014. p.

- 557.
69. Ogihara MH, Taylor D. Female reproductive system: Anatomy, physiology and molecular biology. In: Biology of ticks, second edition. New York: Oxford University Press; 2014. p. 449–83.
 70. Iturbe-Requena SL, Prado-Ochoa MG, Velázquez-Sánchez AM, García-Hernández F, Cossío-Bayúgar R, Muñoz-Guzmán MA, et al. Oogenesis and embryogenesis inhibition induced by two new ethyl-carbamates in the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. Ticks Tick Borne Dis [Internet]. 2020;11(2):101326. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.101326>
 71. Roe RM, Donohue K V., Khalil SMS, Sonenshine DE. Hormonal regulation of metamorphosis and reproduction in ticks. Front Biosci. 2008;13(18):7250–68.
 72. Ricardo AJ, de Oliveira PR, Bechara GH, Mathias MIC. Ultrastructural detection of proteins, lipids and carbohydrates in oocytes of *Amblyomma triste* (Koch, 1844) (Acari; Ixodidae) during the vitellogenesis process. Tissue Cell. 2007;39(3):203–15.
 73. Weiss BL, Reuben Kaufman W. The relationship between “critical weight” and 20-hydroxyecdysone in the female ixodid tick, *Amblyomma hebraeum*. J Insect Physiol. 2001;47(11):1261–7.
 74. Wilks MF. Pyrethroid-induced paresthesia - A central or local toxic effect? J Toxicol - Clin Toxicol. 2000;38(2):103–5.
 75. Buczek A, Bartosik K, Buczek W, Buczek AM, Kuczyński P. The effect of sublethal concentrations of deltamethrin and alphacypermethrin on the fecundity and development of *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) eggs and larvae. Exp Appl Acarol [Internet]. 2019;78(2):203–21. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10493-019-00381-5>
 76. Ajith AK, Fular A, Chigure G, Sharma AK, Nagar G, Souza FF, et al. Comparative impact of coumaphos, amitraz and plant extract of *Ageratum conyzoides* on the oogenesis of *Rhipicephalus microplus*. Ticks Tick Borne Dis [Internet]. 2019;10(5):1085–95. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.06.003>
 77. Davey RB, Ahrens EH, George JE, Hunter JS, Jeannin P. Therapeutic and persistent efficacy of fipronil against *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) on cattle. Vet Parasitol. 1998;74(2–4):261–76.
 78. Roma GC, Camargo-Mathias MI, de Oliveira PR, Furquim KCS, Bechara GH. Neurotoxic action of permethrin in *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) female ticks. Morphological and cytochemical evaluation of the central

- nervous system. *Vet Parasitol* [Internet]. 2013;196(3–4):482–91. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.02.025>
79. Pereira MC, Gasparotto AE, Jurgilas JP, da Silva LAC, Pereira MC, Silveira SS, et al. Detrimental effect of deltamethrin on the central nervous system (synganglion) of *Rhipicephalus sanguineus* ticks. *Exp Appl Acarol*. 2017;71(2):159–69.

CAPITULO II

AVALIAÇÃO DA BIOLOGIA REPRODUTIVA E HISTOPATOLOGIA DOS OVÁRIOS DE FÊMEAS INGURGITADAS DE *Rhipicephalus microplus* SUBMETIDAS A UMA FORMULAÇÃO CONTENDO FIPRONIL E FLUAZURON

RESUMO

O objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos de uma formulação comercial, contendo fipronil e fluazuron, sobre a biologia reprodutiva e histologia de ovários de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*. Três bezerros foram infestados artificialmente com aproximadamente 5.000 larvas nos dias -24, -21, -19, -17, -14, -12, -10, -7, -5 e -3, sendo o dia 0, o dia do tratamento. O tratamento consistiu na aplicação de uma formulação comercial contendo fipronil (1,25% e fluazuron (2,5%) (Tick Gard[®]- MSD Saúde Animal). Antes da aplicação da formulação comercial, 20 fêmeas ingurgitadas, despendidas naturalmente dos bovinos, foram coletadas, formando o grupo controle. Após a aplicação da formulação comercial, as fêmeas ingurgitadas despendidas naturalmente foram recuperadas nos dias +5, +10 e +20 para avaliação da biologia reprodutiva e nos dias +4, +12 e +20 para avaliação histológica dos ovários. As fêmeas coletadas para biologia reprodutiva foram mantidas em câmara climatizada para oviposição, subsequentemente, para incubação dos ovos, enquanto as fêmeas para análise histológica foram mantidas em câmara climatizadas por 4 dias e posteriormente, dissecadas. Os ovários foram retirados e armazenados em eppendorf com solução formalina tamponada 3%, e mantidas durante 2 semanas a 4° C. Posteriormente, os ovários foram desidratados de forma seriada em etanol (70%, 80%, 90%, 95% e 100%) durante 15 minutos em cada concentração, e incluídos em Historesin (Leica[®]) durante 2 semanas a 4° C. Posteriormente, os órgão foram transferidos para moldes de silicone com resina de polimerização para formação dos blocos. Os blocos foram seccionados na espessura de 4 µm, usando um micrótomo (Leica RM 2145) e distribuído em lâminas de microscopia 26x76 mm com ponta fosca. Os cortes foram corados com azul de toluidina 1%. Na avaliação da biologia reprodutiva, foi observado que as fêmeas provenientes dos grupos tratados produziram uma menor quantidade de ovos ($p < 0,05$) e esses ovos apresentaram uma menor viabilidade ($p < 0,05$), quando comparados com o grupo controle. Na análise histológica, todos os grupos tratados (G2 - dia+4; Grupo 3 - dia +12 e grupo 4 - +20) tiveram alterações morfológicas consideráveis. As alterações foram: desorganização citoplasmática, degradação citoplasmática, formato irregular do oócito, vesícula germinativa com formato irregular, redução dos grânulos de vitelo, vacuolização dos grânulos de vitelo e rompimento do oócito. Também foi observado um menor número de oócitos em todos estágios de desenvolvimento (I, II, III, IV e V) e um maior número de oócitos indeterminados, nos ovários de fêmeas provenientes dos grupos tratados ($p < 0,05$), quando comparados com o grupo controle. A partir desses resultados, é possível concluir que a formulação comercial contendo fipronil e fluazuron afetou a biologia reprodutiva e causou alterações histológica nos ovários de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, levando a redução no número de oócitos.

Palavras-chave: Carrapato dos bovinos, inibidores de crescimento, fenilpirazol, histopatologia

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the reproductive biology and histological effects of a commercial formulation, containing fipronil and fluazuron on the ovary of *R. microplus* engorged females. Three calves were infested with approximately 5.000 larvae on days -24, -21, -19, -17, -14, -12, -10, -7, -5 and -3, considering day 0, the treatment day. The treatment consisted on the application of a commercial acaricidal formulation with fipronil (1,25 %) and fluazuron (2,5%) (Tick Gard[®]- MSD Saúde Animal). Before application of acaricidal formulation, 20 engorged females, naturally detached from the cattle, were recovered, to form the control group. After the commercial formulation was applied, engorged females naturally detached from the animals were collected on days +5, +10 and +20 for reproductive biology monitoring and on days +4, +12 and +20 for ovaries histology evaluation. The females collected for reproductive biology monitoring were kept in a climate-controlled chamber for oviposition, subsequently incubating these eggs, while the females used for histological analysis were kept in a climate-controlled chamber for 4 days and then dissected. The ovaries were dissected and stored in Eppendorf with buffered formalin 3%, which were remained for 2 weeks at 4°C. Subsequently, the ovaries were dehydrated serially in ethanol (70%, 80%, 90%, 95% and 100%) during 15 minutes interval, and included in Historesin (Leica[®]) for another 2 weeks at 4° C. After this period, the organs were transferred to silicone molds with polymerization resin to form blocks. The blocks were sectioned at thickness of 4,0 µm, using a microtome (Leica RM 2145) and distributed on microscope slides 26x76 mm with a matte tip. The sections were stained with toluidine blue (1%). In reproductive biology evaluation, it was observed that females from the treated groups produced a smaller amount of eggs ($p<0.05$) and these eggs had a lower viability ($p<0.5$) when compared to the control group. In the histological analysis, many alterations were observed in the oocytes of females from all treated groups, including irregularly shaped oocyte, irregularly shaped germinal vesicle, yolk granules reduction, yolk granules vacuolization and oocyte disruption. It was also observed a smaller number of oocytes in all stages of development (I, II, III, IV and V) and a greater number of indeterminate oocytes on ovaries of females from the treated groups ($p<0.05$), when compared with the control group. From these results, it is possible to conclude that the commercial formulation containing fipronil and fluazuron affected the reproductive biology and caused histological alterations in the ovaries of engorged females of *R. microplus*, leading to a reduction in the number of oocytes.

Keywords: Cattle tick, benzoylurea, phenylpyrazole, histopathology

1. INTRODUÇÃO

Rhipicephalus (Boophilus) microplus (Canestrini, 1888), é um ectoparasito que tem os bovinos como hospedeiros preferenciais. Esse carrapato está amplamente distribuído em países localizados em regiões tropicais, subtropicais e temperadas (Pereira, 2008). Do ponto de vista médico veterinário, essa espécie é considerada a mais importante na região Neotropical, a ponto de centralizar a atenção de instituições de pesquisa e empresas que produzem antiparasitários (Martins et al., 2006).

R. microplus causa perdas econômicas diretas devido a espoliação sanguínea e suas consequências, como perda de sangue, estresse dos bovinos, danos no couro, propensão a miíases, reações alérgicas, reações inflamatórias e anemia. O estresse causado pelos carrapatos também leva a redução do consumo de alimentos, queda na produtividade (Furlong et al., 2004; Grisi et al., 2014). Também existem prejuízos indiretos relacionados com a transmissão de agentes patogênicos (*Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *Anaplasma marginale*), gastos com carrapaticidas, medicamentos, equipamentos e mão de obra para tratamento dos animais (Furlong et al., 2004).

A utilização de carrapaticidas químicos é a principal forma de controle desse ectoparasito, e as principais classes de acaricidas utilizadas são as lactonas macrocíclicas, organofosforados, formamidinas, piretróides sintéticos, fenilpirazóis e inibidores de crescimento. A utilização contínua, ao longo de vários anos, e muitas vezes de sem critérios técnicos, tem resultado na seleção de populações resistentes (Campos Júnior e Oliveira, 2005; Silva et al., 2005; Gomes et al., 2011; Raynal et al., 2013; Santana et al., 2013; Reck et al., 2014; Klafke et al., 2017). Novas tecnologias de controle, como utilização de agentes biológicos, extratos vegetais, óleos essenciais e vacinas, ainda se encontram em fase de pesquisa (Monteiro et al., 2010; Merino et al., 2011; Fernandes et al., 2012; Ghosh et al., 2015; Nwanade et al., 2020). Assim, as empresas farmacêuticas têm buscado vencer esse desafio de

populações resistentes com o desenvolvimento formulações carrapaticidas a partir da associação de moléculas de diferentes grupos químicos (Furlong et al., 2007). Nesse sentido, uma das associações disponíveis comercialmente para o controle de *R. microplus* é a combinação do fipronil (fenilpirazol) com o fluazuron (inibidor de crescimento) (Lopes et al., 2017).

O fipronil é uma molécula pertencente ao grupo dos fenilpirazóis que age nos receptores GABA (ácido g-aminobutírico – neurotransmissor inibidor de sinapse no sistema nervoso de artrópodes), bloqueando o canal de cloro, e foi introduzido no mercado em 1993 para o controle de pragas agrícolas e parasitos de importância médico-veterinária (Rauh et al., 1990; Moffat, 1993). Mais recentemente, os canais de cloro ativados por glutamato (outro neurotransmissor) também foram reconhecidos como alvos importante do fipronil (Zhao et al., 2004). O fluazuron faz parte do grupo das benzoilfeniluréias, e atua como regulador de crescimento (Coop et al., 2002), impactando o processo de muda, alterando o metabolismo de quitina e/ou a produção dos hormônios envolvidos nesse processo, prejudicando a formação e eclosão das larvas, bem como, o crescimento e desenvolvimento dos carrapatos (Graf et al., 2004; Fournet et al., 1995; Hoffmann & Lorenz, 1998; Pawar et al., 1995). O fluazuron não possui efeito *knock-down*, agindo de forma lenta e gradativa, apresentando baixa toxicidade em vertebrados (Taylor, 2001).

Estudos histológicos têm demonstrado que os acaricidas químicos causam alterações morfológicas em vários órgãos dos carrapatos, como no singânglio (Roma et al., 2013; Pereira et al., 2017), ovários (Camargo-Mathias et al., 2017; Kanapadinchareveetil et al., 2017; Roma et al., 2011; Prado-Ochoa et al., 2014) e glândulas salivares (Kanapadinchareveetil et al., 2019; Nodari et al., 2012). Pesquisas com o fipronil, demonstraram que essa molécula ocasiona alterações nos ovários de fêmeas semi-ingurgitadas de *R. sanguineus* sensu lato (s.l.) (Oliveira et al., 2008), enquanto o fluazuron ocasiona efeito deletério na cutícula e intestino de ninfas

desse mesmo carrapato (Oliveira et al., 2013). Atualmente, não existem dados na literatura a respeito alterações histopatológicas que essas moléculas ocasionam em tecidos/órgãos internos de *R. microplus*, bem como, estudos avaliando o efeito de uma formulação comercial, com a associação dessas duas moléculas sobre carrapatos. Assim, o presente trabalho tem como objetivo verificar alterações na biologia reprodutiva e morfológicas em ovário de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, expostas ao fluazuron e fipronil. A hipótese é que haja alterações deletérias nos ovários, em decorrência da exposição do carrapato ao fipronil e fluazuron, alterando a morfologia dos oócitos, impactando a biologia reprodutiva de fêmeas *R. microplus*.

2 METODOLOGIA

2.1 Obtenção dos carrapatos

Os carrapatos (cepa Gyn) utilizados para a realização do estudo foram obtidos de colônia mantida através de infestação artificial em bovinos estabulados em baias na Estação de Experimentação Animal da Escola de Veterinária e Zootecnia (EVZ) da Universidade Federal de Goiás (UFG). Esse procedimento foi aprovado de pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA 075/2018). As fêmeas ingurgitadas desprendidas naturalmente dos animais foram levadas para o laboratório, lavadas com água destilada, e mantidas em câmara climatizada do tipo B.O.D (SOLAB 200/364), com temperatura e humidade controladas ($27\pm 1^\circ\text{C}$ e UR $80\pm 10\%$), para realização de postura. Após 15 dias, os ovos obtidos foram pesados e fracionados em quantidades de 250 mg (equivalente a 5.000 larvas) e acondicionados em seringas de 5 mL, com extremidade distal cortada, vedadas com algodão hidrófilo e mantidas nas mesmas condições de temperatura e umidade citadas anteriormente. Após cerca de 21 dias, foi realizada a avaliação da eclosão larval por meio de estimativa visual, sendo selecionadas

para infestação dos animais e realização do estudo, somente as seringas contendo amostras com percentual de eclosão larval superior a 95%.

2.2 Infestação e tratamento dos bovinos

Foram utilizados três bezerros machos, sem raça definida (cruzado), com idade entre 8 a 10 meses e peso entre 150 a 180 kg. Esses bezerros foram estabulados individualmente em baias na Estação Experimental Animal da EVZ/UFG e receberam como alimento, silagem de milho, ração balanceada contendo sal mineral e água *ad libitum*. A limpeza das baias onde os animais foram mantidos foi realizada diariamente.

As infestações seguiram as recomendações de Portaria número 48/1997 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, para registro de produtos antiparasitários (MAPA, 1997). Para infestação dos animais foram utilizadas larvas com idades entre 15 a 21 dias após a eclosão, e cada bezerro foi infestado com aproximadamente 5.000 larvas (250 mg), nos dias -24, -21, -19, -17, -14, -12, -10, -7, -5 e -3. No dia 0, foi realizada a aplicação da formulação carrapaticida pour on (Tick Gard[®], MSD Saúde Animal) contendo fipronil (1,25 mg/kg) + fluazuron (2,5 mg/kg) como ingredientes ativos. A aplicação do carrapaticida foi realizada na dosagem de 1 ml para cada 10 kg, correspondente a 2,5 mg/kg de fluazuron e 1,25 mg/kg de fipronil. Para isso, os animais foram pesados, e em seguida, foi feita aplicação no dorso do animal, utilizando um volume entre 15 a 18 ml em cada animal.

2.3 Recuperação das fêmeas ingurgitadas para análises de biologia reprodutiva

Para avaliação da biologia reprodutiva, foram recuperadas 10 fêmeas ingurgitadas (desprendidas naturalmente) do chão das baias (pelo menos três carrapatos de cada animal). O grupo controle foi formado com 10 fêmeas ingurgitadas recuperadas no dia 0, antes do tratamento dos bovinos. Após o tratamento dos animais, foram recuperadas 10 fêmeas

ingurgitadas nos dias +5, +10 e +20 para avaliar o efeito da formulação sobre a biologia reprodutiva das fêmeas ingurgitadas, permitindo a formação de 04 grupos com pesos homogêneos ($p > 0,05$). As baias foram lavadas diariamente, garantindo a recuperação de fêmeas desprendidas exatamente nos dias determinados. Assim, foram formados os seguintes grupos:

- G1 (Controle): Fêmeas ingurgitadas recuperadas antes do tratamento dos animais;
- G2: Fêmeas ingurgitadas recuperadas no dia +5;
- G3: Fêmeas ingurgitadas recuperadas no dia +10;
- G4: Fêmeas ingurgitadas recuperadas no dia +20.

Os quatro grupos formados, com pesos homogeneizados ($p > 0,05$), foram mantidos em câmara climatizada do tipo B.O.D (SOLAB 200/364), com temperatura e umidade controladas ($27 \pm 1^\circ\text{C}$ e UR $80 \pm 10\%$) para avaliação dos parâmetros biológicos. Após 15 dias, foi realizada a pesagem dos ovos, que em seguida, foram acondicionados em seringas plásticas com extremidade distal cortadas, vedadas com algodão hidrófilo e incubadas nas mesmas condições de temperatura e umidade para avaliação do percentual de eclosão (21 dias após a pesagem dos ovos). Foram avaliados os seguintes parâmetros:

- Peso inicial (PI) - Peso da fêmea ingurgitada antes da oviposição (mg);
- Peso da massa de ovos (PM) – peso da massa de ovos produzido pelas fêmeas ingurgitadas (mg);
- Percentual de eclosão larvas (PE) – contagem dos ovos e das larvas eclodidas (%) (Figueredo et al., 2017);

A partir desses valores foi feito o cálculo do índice de produção de ovos (IPO% - Bennet, 1971), reprodução estimada e percentual de controle (Drummond et al., 1973).

$$\text{Índice de produção de ovos (IPO)} = \frac{\text{PM}}{\text{PI}} \times 100$$

$$\text{Reprodução estimada (RE)} = \left(\frac{\text{PM}}{\text{PI}}\right) \times \text{PE} \times 20.000$$

$$\text{Percentual de controle (\%C)} = \frac{(\text{RE do grupo controle} - \text{RE do grupo tratado})}{\text{RE do controle}} \times 100$$

2.4 Recuperação das fêmeas ingurgitadas para histologia

Para avaliação dos efeitos da formulação carrapaticida sobre os ovários de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, foram coletados 20 carrapatos no chão das baias (pelo menos seis de cada animal). O grupo controle foi formado com carrapatos recuperados no dia 0, antes do tratamento dos animais. Os grupos tratados foram formados por carrapatos recuperados nos dias +4, +12 e +20. As baias também foram lavadas diariamente, garantindo a recuperação de fêmeas desprendidas exatamente nos dias determinados. Assim, foram formados os seguintes grupos:

- G1 (Controle): Fêmeas ingurgitadas recuperadas antes do tratamento dos animais;
- G2: Fêmeas ingurgitadas recuperadas no dia +4;
- G3: Fêmeas ingurgitadas recuperadas no dia +12;
- G4: Fêmeas ingurgitadas recuperadas no dia +20.

Após as coletas, as fêmeas ingurgitadas (20 por grupo) foram lavadas com água destilada, secas com papel toalha e acondicionadas em câmara climatizada do tipo B.O.D (SOLAB 200/364), com temperatura e umidade controladas ($27 \pm 1^\circ \text{C}$ e $\text{UR } 80 \pm 10\%$) durante quatro dias, para maturação final dos ovários. Após 4 dias, foram selecionadas aleatoriamente, cinco fêmeas ingurgitadas ainda vivas, para realização da dissecação e obtenção dos ovários.

2.5 Avaliação histológica dos ovários

Antes do processo de dissecação, as fêmeas foram mantidas na geladeira por no mínimo trinta minutos, para insensibilização por choque térmico. Para o processo de dissecação, fêmeas ingurgitadas foram colocadas em placa de Petri, embebecida com solução salina a 0,9% de cloreto de sódio, para evitar a desidratação dos órgãos.

Os ovários foram retirados e fixados por 2 semanas em solução de formalina tamponada 3% e armazenada a 4° C. Após esse período, foram desidratados em banhos de 15 minutos em soluções seriadas de etanol a 70%, 80%, 90% e 100% (2x). Posteriormente, os órgãos foram inclusos em resina glicolmetacrilato (Leica), de acordo com as recomendações do fabricante, e mantidos a 4°C, durante 2 semanas. Após esse período, os órgãos foram transferidos para moldes de silicone preenchidos previamente com resina Leica de polimerização.

Os blocos foram seccionados com auxílio de micrótomo Leica RM 2145, a 4 µm de espessura, e recolhidos em lâmina de vidro para microscopia (26 x 76 mm) com ponta fosca. Depois de secas, as lâminas foram coradas com azul de toluidina (1%), e as secções foram fotografadas em foto microscópico (ZEISS). Para análise quantitativa foram selecionados 3 cortes de cada repetição (fêmea ingurgitada), de acordo com a qualidade técnica de coloração. Como em cada grupo, haviam 5 repetições (5 fêmeas por tratamentos), obtivemos 15 cortes por grupo (15 cortes – 3 de cada fêmea). A medida que esses oócitos foram quantificados, em seus diferentes estágios de desenvolvimento, as alterações visualizadas em cada um deles, também foram quantificadas.

Foi realizada a quantificação dos diferentes estágios de desenvolvimento dos oócitos e frequência de alterações encontradas em cada tratamento. Para elaboração da tabela com as alterações morfológicas, foram consideradas apenas as alterações mais frequentes (frequência superior a 5% em pelo menos um dos tratamentos).

2.6. Análise estatística

Para realização da análise estatística de todos os experimentos, foi utilizado o software Biostat versão 5.0. Os dados adquiridos em porcentagem foram transformados em $\sqrt{\text{arco seno } x}$ e analisados por teste não paramétrico de Kruskal Wallis e Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$).

3. RESULTADOS

3.1 Avaliação da biologia reprodutiva

Não foram observadas diferenças ($p = 0,99$) em relação ao peso das fêmeas antes do início da oviposição, indicando que as demais alterações estão relacionadas ao efeito do tratamento. Em relação ao peso da massa de ovos e ao IPO, foram observadas diferenças ($p > 0,01$) entre os valores do grupo controle e dos grupos tratados, no entanto, entre os tratamentos, não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$).

Tabela 1 – Parâmetros biológicos de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* recuperadas nos dias 0, +5, +10 e +20, de bovinos artificialmente infestados e tratados com formulação carrapaticida comercial pour on contendo fipronil e fluazuron

Tratamentos (Dia)	Peso da fêmea antes da oviposição (mg)	Peso da massa de ovos (mg)	Índice de produção de ovos (IPO%)	Percentual de eclosão (%)	Percentual de controle (%)
Controle (dia 0)	207,9 ^a ±6,3	100,6 ^a ±20,0	48,3 ^a ±9,5	87,7 ^a ±16,2	
(n)	(10)	(10)	(10)	(10)	
Dia +5	207,8 ^a ±15,4	60,9 ^b ±41,8	29,0 ^b ±20,4	28,4 ^b ±40,8	80,7
(n)	(10)	(10)	(10)	(09)	
Dia +10	202,1 ^a ±23,8	65,5 ^b ±37,6	33,9 ^b ±19,4	35,7 ^b ±37,9	73,2
(n)	(10)	(10)	(10)	(10)	
Dia +20	210,4 ^a ±52,5	66,0 ^b ±72,3	26,8 ^b ±28,3	18,0 ^b ±33,8	86,5
(n)	(10)	(10)	(10)	(09)	

Médias seguidas de letras diferentes, na mesma coluna, não apresentam diferenças significativas a nível de 5%. Formulação comercial pour on contendo fipronil (1,25 mg/kg) + fluazuron (2,5 mg/kg).

Para o percentual de eclosão, foi observado diferenças ($p < 0,05$) entre o controle (87,7%) e os grupos tratados, sendo observado valores de 28,4; 35,7 e 18,0% nos tratamentos com carrapatos recuperados nos dias +5, +10 e +20, resultando em percentuais de controle de 80,7; 73,2 e 86,5%, respectivamente (Tabela 01).

3.2 Alterações morfológicas dos oócitos

Os oócitos do grupo controle apresentaram características típicas para oócitos de carrapatos do gênero *Rhipicephalus* (Figura 1).

Oócito I: oócito pequeno podendo apresentar formato arredondado ou elíptico, com vesícula germinativa facilmente visualizada. A vesícula germinativa está localizado na região central da célula, ocupando boa parte do citoplasma. O citoplasma se apresenta homogêneo e o limite celular é pouco evidente.

Oócito II: oócito maior em comparação com oócito I e com formato arredondado. A vesícula germinativa é encontrada na região central do citoplasma, ou em alguns casos, mais deslocada para margem da célula. O citoplasma possui uma discreta granulação. O limite celular também é pouco evidente.

Oócito III: oócito maior que o oócito II, apresentando formato arredondado. O citoplasma já possui grânulos vitelínicos com tamanhos variado ocupando grande parte do citoplasma. Quando o corte permite a visualização da vesícula germinativa, esta se encontra deslocada na região periférica, próxima ao pedicelo. O limite celular é mais evidente em comparação ao oócito II, devido a deposição do cório.

Oócito IV: oócito maior que o oócito III e possui formato arredondado. O citoplasma possui grânulos de vitelo maiores do que os observados nos oócitos III, e não é possível

visualizar a vesícula germinativa. O limite celular é bem evidente, devido a deposição do cório.

Oócito V: é o maior de todos os oócitos com formato arredondado. Os grânulos vitelínicos são grandes e tomam todo o citoplasma. A vesícula germinativa não é visualizada e assim como nos oócitos IV, o limite celular é bem evidente.

Nos grupos tratados foram observadas uma série de alterações morfológicas nos oócitos I, II, III, IV e V (figura 1 e 2), algumas em frequência elevada ($p < 0,05$), que serão apresentadas na sequência desse tópico (Tabela 2). Todas alterações morfológicas observadas nos grupos tratados, estavam presentes em baixa frequência ou ausentes no grupo controle, com exceção da presença de degradação citoplasmática em oócitos II (Tabela 2).

Nos oócitos I, as alterações mais frequentes foram presença de desorganização citoplasma, degradação citoplasmática, formato irregular do oócito e vesícula germinativa irregular (Figura 1 e 2). A frequência da desorganização citoplasmática foi maior ($p = 0,001$) nos tratamentos com carrapatos recuperados nos dias +4 e +20, quando comparado ao grupo controle, enquanto a degradação citoplasmática foi observada com maior a frequência ($p = 0,0006$) em todos os tratamentos (+4, +12 e +20). A presença de oócitos com formato irregular ($p = 0,0242$) foi mais frequente no grupo +20, quando comparado ao controle (Tabela 2). Nos oócitos II, foram observadas as mesmas alterações descritas para os oócitos I (Figura 1 e 2). A observação de desorganização citoplasmática foi maior em todos os grupos tratados ($p = 0,0256$), enquanto o formato irregular do oócito ($p = 0,0241$) e vesícula germinativa irregular ($p = 0,0203$) foram mais frequentes nos grupos +12 e +20 e +4 e +20, respectivamente (Tabela 2).

Nos oócitos III, as alterações morfológicas mais frequentes foram degradação citoplasmática, formato irregular do oócito, redução de grânulos de vitelo e vacuolização dos grânulos de vitelo (Figura 1 e 2). Houve maior quantidade de oócitos III com degradação

citoplasmática ($p=0,0447$) e formato irregular nos grupos +12 e +20 ($p=0,0205$), em relação ao grupo controle. A redução dos grânulos de vitelo foi maior ($p=0,0126$) em todos os grupos tratados, quando comparados ao grupo controle. A vacuolização dos grânulos de vitelo ocorreu em maior quantidade nos grupos +4 e +20, com diferença significativa ($p=0,0049$) em relação ao grupo controle (Tabela 2).

Nos oócito IV e V, as alterações morfológicas com maior frequência foram: degradação citoplasmática, formato irregular do oócito, redução dos grânulos de vitelo, rompimento do oócito e vacuolização do grânulo de vitelo (Figura 1 e 2). A quantidade de oócitos IV com degradação citoplasmática foi maior em todos os grupos tratados ($p=0,0322$), quando comparados com o grupo controle ($p>0,05$), enquanto nos grupos +12 e +20, as alterações formato irregular do oócito ($p=0,0428$) e redução do número de grânulos de vitelo ($p=0,0351$) foram mais frequentes. A maior frequência ($p<0,05$) de oócitos IV com vacuolização no grânulo de vitelo ($p=0,0046$) ocorreu nos grupos +4 e +20. Em relação aos oócitos V, a degradação citoplasmática ($p=0,0084$) e redução de grânulos de vitelo ($p=0,0084$) ocorreram com maior frequência nos grupos +12 e +20. O formato irregular do oócito foi observado com maior frequência em todos os grupos tratados ($p=0,012$), enquanto a presença de vacuolização do grânulo de vitelo foi mais frequente no grupo +4 ($p=0,0442$) (Tabela 2).

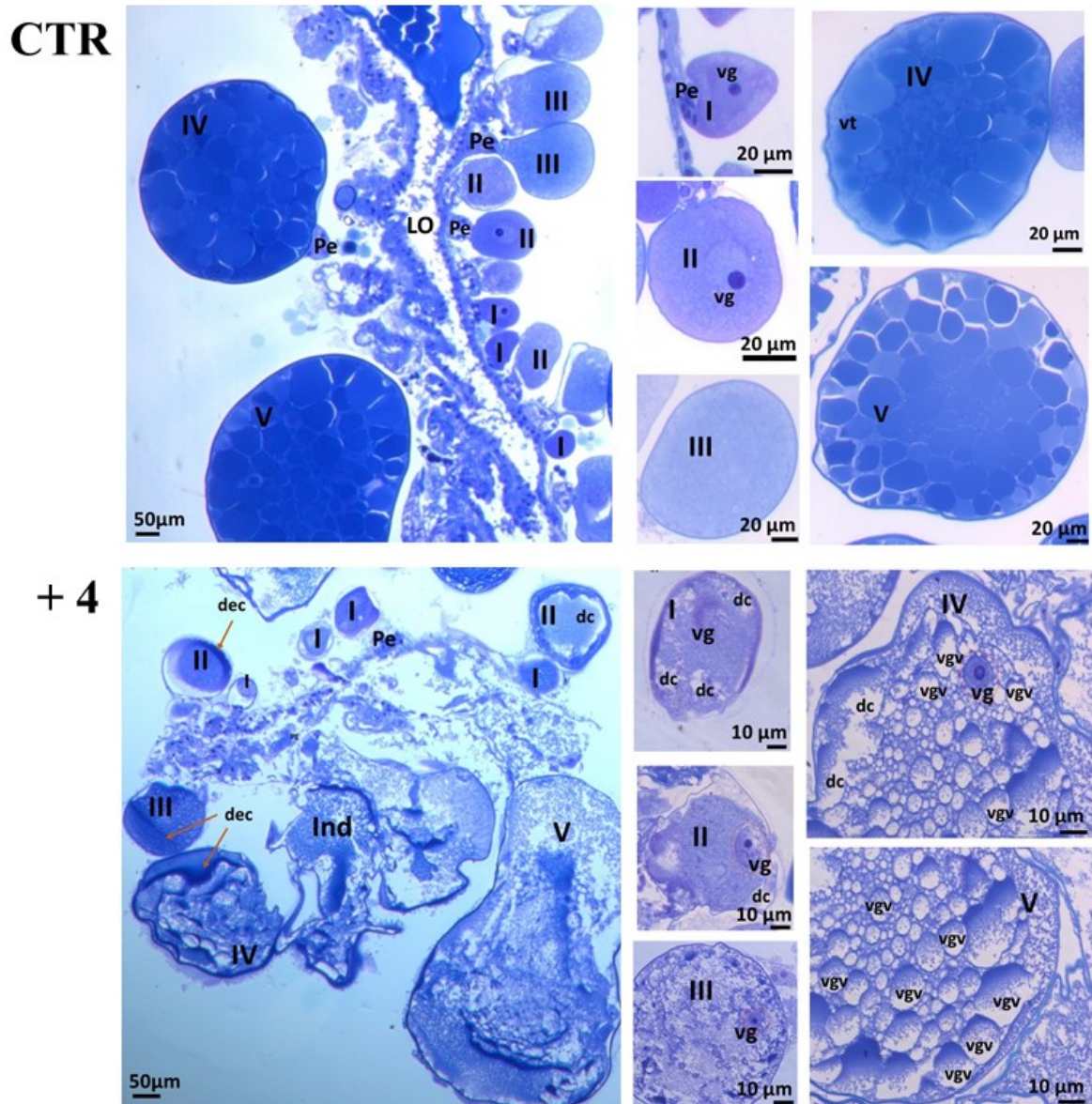


Figura 1 – Cortes histológicas de oócitos, corados com azul de toluidina, de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* recuperadas nos dias 0 (controle = CTR) e +4, de bovinos artificialmente infestados e tratados com formulação carrapaticida comercial pour on contendo fipronil (1,25 mg/kg) + fluazuron (2,5 mg/kg). I: oócito I; II: oócito II; III: oócito III; IV: oócito IV; V: oócito IV; Ind: oócito indeterminado; PE: pedicelo; LO: lúmen ovariano; vg: vesícula germinativa; vt: grânulo de vitelo; dc: degradação citoplasmática; dec: desorganização citoplasmática; vgv: vacuolização dos grânulos de vitelo.

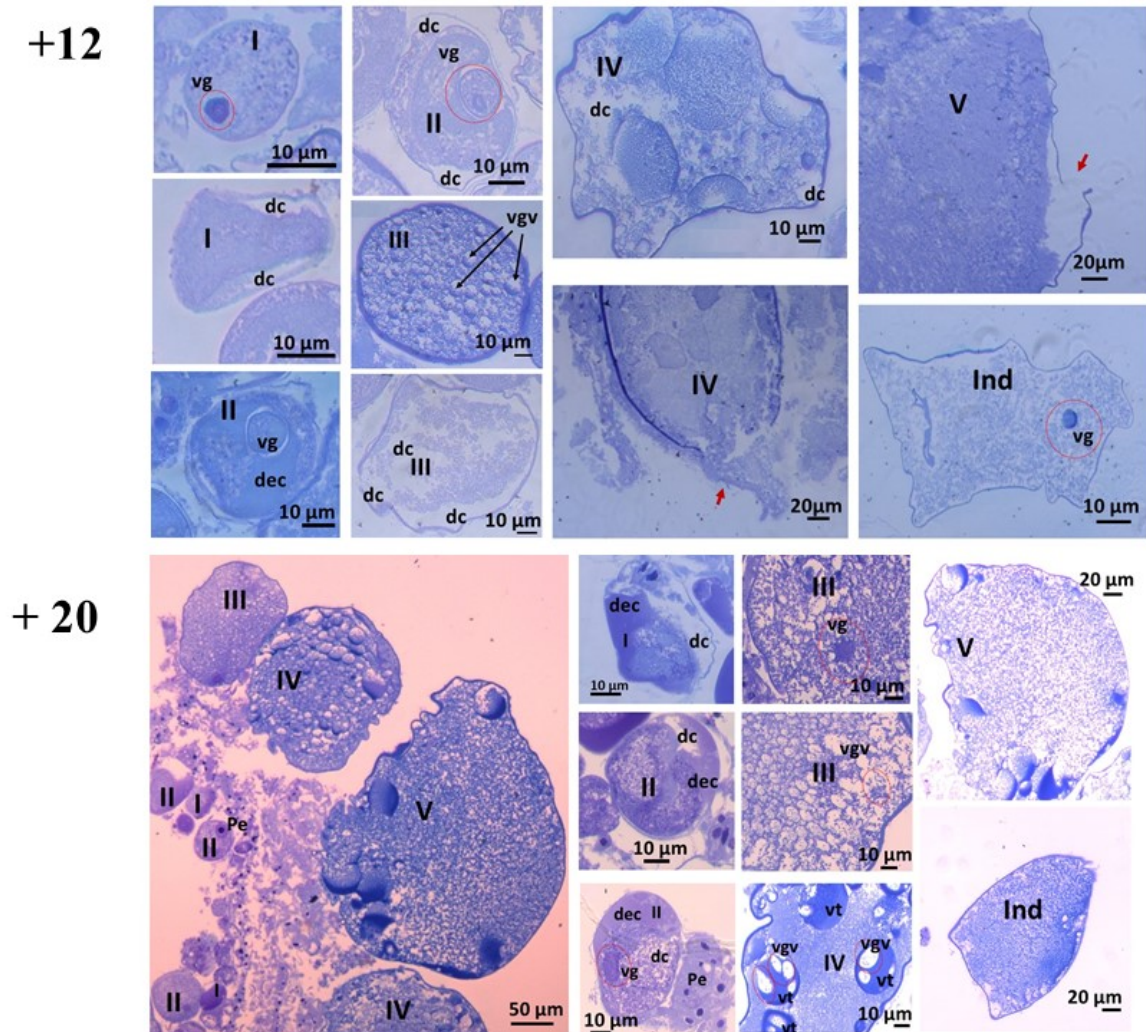


Figura 2 - Cortes histológicos de oócitos, corados com azul de toluidina, de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* recuperadas nos dias +12 e +20, de bovinos artificialmente infestados e tratados com formulação carrapaticida comercial pour on contendo (1,25 mg/kg) + fluazuron (2,5 mg/kg). I: oócito I; II: oócito II; III: oócito III; IV: oócito IV; V: oócito IV; Ind: oócito indeterminado. PE: pedicelo; vg: vesícula germinativa; dc: degradação citoplasmática; dec: desorganização citoplasmática; vgv: vacuolização dos grânulos de vitelo; seta vermelha: rompimento do oócito.

Tabela 2 – Alterações morfológicas de oócitos de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* recuperadas nos dias 0 (controle), +4, +12 e +20, de bovinos artificialmente infestados e tratados com formulação carrapaticida comercial pour on (1,25 mg/kg) + fluazuron (2,5 mg/kg).

Oócito	Alterações observadas	Controle (dia 0)	D +4	D+12	D+20
Oo I	Desorganização citoplasmática	4,7 ^a ±7,0	38,3 ^{bc} ±26,6	15,1 ^{ab} ±10,2	54,9 ^c ±18,2
	Degradação citoplasmática	11,3 ^a ±10,9	73,4 ^b ±25,4	75,7 ^b ±17,5	60,8 ^b ±22,0
	Formato irregular do oócito	0,0 ^a ±0,0	20,1 ^{ab} ±27,8	30,7 ^{ab} ±30,4	49,5 ^b ±26,7
	Vesícula germinativa com forma irregular	0,0 ^a ±0,0	8,4 ^a ±7,6	15,3 ^a ±12,3	14,0 ^a ±11,9
Oo II	Desorganização citoplasmática	0,0 ^a ±0,0	23,0 ^b ±6,8	27,5 ^b ±33,8	33,6 ^b ±20,1
	Degradação citoplasmática	31,8 ^a ±6,9	69,5 ^a ±8,6	69,5 ^a ±30,8	68,3 ^a ±16,9
	Formato irregular do oócito	0,0 ^a ±0,0	21,7 ^{ab} ±37,5	39,7 ^b ±25,0	22,4 ^b ±15,0
	Vesícula germinativa com forma irregular	0,0 ^a ±0,0	30,9 ^b ±13,4	19,3 ^{ab} ±12,9	25,9 ^b ±12,9
Oo III	Degradação citoplasmática	5,2 ^a ±5,3	19,0 ^{ab} ±14,4	38,1 ^b ±26,6	23,7 ^b ±23,0
	Formato irregular do oócito	0,0 ^a ±0,0	16,7 ^{ab} ±28,9	26,0 ^b ±20,2	38,7 ^b ±19,1
	Redução de grânulos de vitelo	0,0 ^a ±0,0	31,7 ^b ±17,6	42,1 ^b ±33,5	18,1 ^b ±6,4
	Vacuolização do grânulo de vitelo	0,0 ^a ±0,0	55,0 ^{bc} ±8,7	16,8 ^{ab} ±20,7	68,9 ^c ±13,6
Oo IV	Degradação citoplasmática	0,4 ^a ±1,0	41,2 ^b ±24,0	43,4 ^b ±30,5	53,3 ^b ±16,9
	Formato irregular do oócito	1,5 ^a ±3,4	28,8 ^{ab} ±15,8	57,1 ^b ±46,9	37,8 ^b ±25,3
	Redução de grânulos de vitelo	1,3 ^a ±1,9	51,0 ^{ab} ±32,1	65,1 ^b ±37,3	71,9 ^b ±10,9
	Rompimento do oócito	1,7 ^a ±2,4	4,6 ^a ±4,5	6,2 ^a ±10,8	13,2 ^a ±13,0
	Vacuolização do grânulo de vitelo	0,0 ^a ±0,0	48,5 ^c ±13,5	7,9 ^{ab} ±8,3	24,1 ^{bc} ±14,8
Oo V	Degradação citoplasmática	1,2 ^a ±1,1	33,2 ^{ab} ±24,8	56,3 ^b ±17,8	52,1 ^b ±29,8
	Formato irregular do oócito	0,5 ^a ±1,1	51,5 ^b ±22,4	67,6 ^b ±21,2	44,1 ^b ±35,2
	Redução de grânulos de vitelo	2,7 ^a ±4,7	46,0 ^{ab} ±43,2	92,7 ^b ±10,1	74,9 ^b ±12,5
	Rompimento do oócito	0,4 ^a ±0,8	1,6 ^a ±2,7	9,2 ^a ±11,1	25,6 ^a ±28,9
	Vacuolização do grânulo de vitelo	0,0 ^a ±0,0	27,9 ^b ±29,8	0,0 ^a ±0,0	11,4 ^{ab} ±17,0

Médias seguidas de letras diferentes, na mesma linha, apresentam diferenças significativas a nível de 5%.
Formulação commercial pour on contendo fipronil (1,25 mg/kg) + fluazuron (2,5 mg/kg).

3.3 Quantificação dos oócitos

Em relação ao número de oócitos I, não foi observado diferenças significativas ($p>0,05$) entre o grupo controle (dia 0) e os grupos tratados (+4, +12 e +20), sendo observado valores de 28,4; 19,3; 20,2 e 23,6 oócitos, respectivamente (Figura 3). No entanto, foi observado que todos os tratamentos apresentaram um menor número de oócitos II e III ($p<0,05$), quando comparados ao controle (Figura 3). Em relação aos oócitos IV, houve uma diminuição significativa ($p>0,05$) na quantidade de oócitos no grupo +12 (13,4) quando comparado ao grupo controle (38,8) (Figura 3). Todos os tratamentos (+4, +12 e +20) ocasionaram uma

redução no número de oócitos V ($p < 0,05$), quando comparados com o grupo controle (Figura 3).

Nos grupos tratados, não foi possível fazer a classificação de alguns oócitos, devido ao elevado grau de descaracterização morfológica. Esses oócitos também foram quantificados e foram classificados como oócitos indeterminados (Figura 1 e 2). O número de oócitos indeterminados foi significativamente maior ($p < 0,05$) nos grupos +4 e +12, com valores de 43,7 e 26,6 respectivamente. Não houveram oócitos indeterminados no grupo controle (Figura 3).

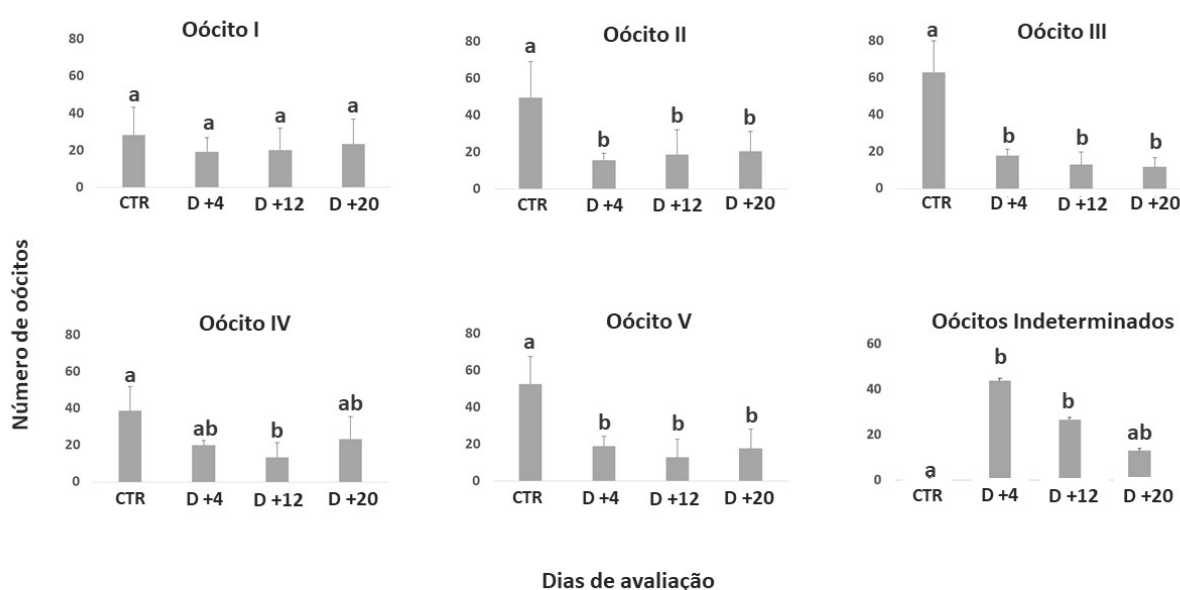


Figura 3 – Quantificação de oócitos de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* recuperadas (dias 0, +4, +12 e +20) de bovinos artificialmente infestados e tratados com formulação carrapaticida comercial pour on contendo fipronil e fluazuron. CTR = Grupo controle (carrapatos recuperados no dia 0, antes do tratamento).

4. DISCUSSÃO

A associação de moléculas de diferentes classes químicas em um mesmo produto comercial vem sendo utilizada com a finalidade de potencializar a ação de carrapaticidas comerciais, melhorando sua eficiência (Furlong, 2007). O fipronil e o fluazuron combinados, representam uma opção de complementação da atividade carrapaticida, já que estas duas moléculas pertencem a diferentes classes e atuam de forma diferente (Chavasse e Yap, 1997; Simon-Delson et al., 2015), com perfis farmacocinéticos distintos (Lopes et al., 2017). No

presente trabalho, apresentamos pela primeira vez os efeitos deletérios de uma formulação carrapaticida, contendo fipronil e fluazuron, sobre a biologia reprodutiva e morfologia dos ovários de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, descrevendo e quantificando as alterações morfológicas observadas.

Na avaliação da biologia reprodutiva, foi observado que as fêmeas ingurgitadas recuperadas de bovinos tratados com a formulação pour on contendo fipronil e fluazuron, nos dias +5, +10 e +20, produziram uma menor quantidade de ovos, e esses ovos apresentaram menor viabilidade, fato que está correlacionado com a ingestão de sangue dos bovinos dos animais tratados. Lopes et al. (2017), utilizando uma formulação comercial contendo fipronil (1.0 mg/kg) + fluazuron (2.5 mg/kg) (pour on), observaram que a concentração plasmática máxima dessas duas moléculas ocorreu após 2,5 e 6 dias, e a meia-vida foi de 19 e 24,5 dias, respectivamente. Esses dados, indicam que no presente estudo, os carrapatos recuperados entre os dias +4 e +20, estiveram em contato com essas moléculas por meio da ingestão do sangue dos bovinos, impactando diretamente na biologia reprodutiva desses carrapatos.

A alteração na biologia reprodutiva pode estar relacionada aos mecanismos de ação do fipronil e fluazuron, e como essas moléculas atuam nos diferentes órgãos de carrapatos. Mendonça (2010) também observou a redução na eclodibilidade de larvas provenientes de postura de fêmeas ingurgitadas recuperadas de bovinos tratados com fluazuron. Essa redução na eclodibilidade larval está relacionada ao bloqueio da síntese de quitina durante a embriogênese do carrapato, impedindo a formação do exoesqueleto das larvas (Bull et al., 1996), ou então, na síntese de quitina de estruturas presentes no órgão de Gené (Matos et al., 2018), fato que pode comprometer o funcionamento desse órgão na impermeabilização e lubrificação dos ovos. Cabe destacar que algumas fêmeas recuperadas no presente estudo apresentavam o órgão de Gené exteriorizado, com menor rigidez e mais disformes, possivelmente, devido a alguma alteração da síntese da cutícula, que é importante para maior

sustentação e funcionamento desse órgão (Matos et al., 2018). Essa redução na produção de ovos e eclodibilidade das larvas também está relacionada a ação do fipronil. Amithamol et al. (2012), em um estudo realizado com *Rhipicephalus annulatus*, observaram um percentual de inibição de fecundidade de 86,42% no grupo tratado com 0,5 ppm de fipronil, e atribuíram esse resultado ao efeito citotóxico do fipronil nos ovários, fato já bem documentado para *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (s.l.) (Oliveira et al., 2008; Oliveira et al., 2009) e reforçado no presente estudo.

Na avaliação histológica, os oócitos das fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* apresentaram características de acordo com o padrão da espécie, como descrito por Saito et al. (2005) e Prado Ochoa et al. (2014), e também de acordo com o que já foi descrito para outros carrapatos do gênero *Rhipicephalus* (Oliveira et al., 2008; Roma et al., 2010; Matos et al., 2014; Camargo-Mathias et al., 2017).

Na avaliação histológica dos ovários dos grupos tratados, foram observadas uma série de alterações morfológicas nos oócitos, fato que possivelmente está mais relacionado a ação do fipronil, cujo o efeito histopatológico em ovários de *R. sanguineus* s.l. já foi documentado (Oliveira et al. 2008; Oliveira et al., 2009). Nos oócitos I e II das fêmeas ingurgitadas dos grupos tratados, foi observado uma maior frequência de regiões do citoplasma coradas de forma mais intensa, indicando uma desorganização citoplasmática. Segundo Saito et al. (2005) e Camargo-Mathias et al. (2010), no estágio inicial dos oócitos (I e II), existe uma produção endógena de proteínas estruturais, incorporação exógena de elementos vitelínicos e aumento de algumas organelas. Essa desorganização citoplasmática, observada no presente trabalho, pode indicar alteração desse processo inicial, que é fundamental para desencadeamento do desenvolvimento dos oócitos, até chegarem ao estágio final (oócito V).

A degradação citoplasmática, que são áreas do citoplasma não coradas, sugerindo a formação de vacúolos, ocorreu em oócitos de todas as fases de desenvolvimento, e também

foi observado a presença de áreas de vacuolização nos grânulos de vitelo. Esse tipo de alteração morfológica tem sido observado em ovários de carrapatos expostos a diferentes moléculas com atividade carrapaticida, incluindo moléculas químicas sintéticas como o amitraz, etil-carbamato e permetrina (Kanapadinchareveetil et al., 2019; Iturbe-Requena et al., 2020; Roma et al., 2011) e também para moléculas de origem vegetal, como o timol (Matos et al., 2014). Oliveira et al. (2008), em estudo com a exposição de fêmeas de *R. sanguineus* s.l. a diferentes concentrações de fipronil, observaram essa mesma alteração em todos os grupos tratados. Esses vacúolos autofágicos são estruturas encontradas principalmente em células que precisam degradar ou reciclar porções do citoplasma, assim como organelas modificadas ou danificadas (Andrade e Jordão, 2012). Tal fato sugere que a presença de degradação citoplasmática e vacúolos nos grânulos podem ser uma resposta celular na tentativa de eliminar elementos danificados ou reciclar moléculas para manter o metabolismo celular. Em *R. sanguineus*, o processo de reabsorção de alguns oócitos provavelmente ocorrem como mecanismo de recuperação de alguns nutrientes (Oliveira et al., 2004).

A degradação citoplasmática nos oócitos II do grupo controle, observada nesse trabalho, foi de 31,8%, porém, na avaliação da biologia reprodutiva, não houve déficits consideráveis no percentual de eclosão do grupo controle. Na descrição ultraestrutural do ovário de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, Saito et al. (2005) observaram que pode ocorrer naturalmente a presença de alguns vacúolos na região ao redor da vesícula germinativa de alguns oócitos, sem causar grandes impactos na eficiência reprodutiva.

Foi possível observar alterações no formato da vesícula germinativa nos oócitos I e II. Alterações na forma da vesícula germinativa também foram observadas em estudos com exposição de fêmeas de *R. sanguineus* s.l. ao fipronil (Oliveira et al., 2009) e permetrina (Roma et al., 2011) e fêmeas de *R. annulatus* expostas ao amitraz (Kanapadinchareveetil et al., 2019). No estudo conduzido com fipronil, foi observado que os oócitos I, II e III de fêmeas de *R.*

sanguineus s.l. apresentaram dobras no envoltório da vesícula germinativa, conferindo um formato irregular (Oliveira et al., 2009). A produção de riboproteínas pelo núcleo e nucléolo do oócito são essenciais para maturação de ovos de carrapatos (Balashov, 1983), e alterações na vesícula germinativa podem gerar degeneração no material nuclear, ocasionando danos irreversíveis na célula germinativa (Roma et al., 2011).

Nesse trabalho foi observado uma redução dos grânulos de vitelo nos oócitos III, IV e V. Essa redução de grânulos de vitelo também já foi observada em ovários de carrapatos expostos a diferentes moléculas carrapaticidas, incluindo piretroides, amidínicos (Iturbe-Requena et al., 2020; Roma et al., 2010; Kanapadinchareveetil et al., 2017). Oliveira et al. (2008) observaram redução dos grânulos de vitelo no citoplasma dos oócitos II, IV e V de fêmeas de *R. sanguineus* s.l. expostas ao fipronil, sendo observado também o rompimento de alguns grânulos, liberando o conteúdo no citoplasma. Em um outro estudo, utilizando microscopia de transmissão, Oliveira et al. (2009) observaram redução e até ausência de microvilos nos oócitos II e III de fêmeas de *R. sanguineus* s.l. expostas ao fipronil, e essa alteração também pode ter ocorrido no presente estudo. Os microvilos se desenvolvem durante a vitelogênese na região entre a lâmina basal e a membrana plasmática, proporcionando aumento da área de superfície para transporte de proteínas (Ogihara e Taylor (2014), e sua diminuição podem levar ao comprometimento do transporte proteico para dentro do oócito e formação dos grânulos de vitelo (Roma et al., 2010).

Nesse estudo, foi observado que alguns oócitos de todas as fases de desenvolvimento apresentaram formato irregular. Oliveira et al. (2008) relataram que os oócitos I, de fêmeas de *R. sanguineus* s.l. expostas ao fipronil, adquiriram aspecto de massa disforme e formato irregular. Kanapadinchareveetil et al. (2019) também observaram alteração no formato de oócitos I, II e III em ovários de fêmeas de *R. annulatus* tratadas com amitraz (300 ppm). No oócitos IV e V de fêmeas de *R. sanguineus* s.l. expostas ao fipronil (10 ppm), a membrana dos

oócitos exibiram dobras, alterando o formato arredondado, apresentando naturalmente por esses oócitos. Além disso, foram observado que a membrana dos oócitos estava mais delgada (Oliveira et al., 2008). Resultados similares foram obtidos por Oliveira (2010), que relataram que o rompimento dos grânulos de vitelo no interior do citoplasma alteram o formato original do oócito (Oliveira et al., 2008).

A perda de integridade da membrana pode levar a alteração do formato do oócito, já que células submetidas a estresse químico, aumentam a permeabilidade da membrana, alterando sua capacidade de manter o equilíbrio osmótico (Proskuryakov et al., 2003). Alterações na deposição do cório também podem ter ocorrido no presente estudo, já que Oliveira et al. (2009) observaram o cório de oócitos V mais delgado e com muitas dobras. Vários acaricidas causam alteração no cório (Roma et al., 2010; Oliveira et al., 2009; Iturbe-Requena et al., 2020), com isso, ocorre uma facilitação da entrada de componentes químicos para dentro da célula (Roma et al., 2010; Oliveira et al., 2009), prejudicando também a permeabilidade seletiva da membrana, interferindo na passagem seletiva de nutrientes para o interior do oócito (Iturbe-Requena et al., 2020), fazendo com que o oócito perca seu formato original (Camargo-Mathias et al., 2017). O cório é sintetizado durante a maturação do oócito, a partir do oócito III, ocorrendo deposição de matriz cuticular ao redor da base dos microvilos (Ogihara & Taylor, 2014).

Em todos os grupos tratados, foi observado um maior número de oócitos com elevado grau de descaracterização morfológica, fato que impediu a classificação em oócitos I, II, III, IV e V; assim, esses oócitos foram classificados como indeterminados. No presente trabalho, também foi observado um bom número de oócitos rompidos. Além disso, a avaliação quantitativa dos oócitos, indicou uma redução no número de oócitos II, III, IV e V. Os danos nos oócitos observados no grupo tratados, podem ter levado a extensas alterações morfológicas dos oócitos, levando a sua total descaracterização, impedindo a classificação, ocasionando

consequentemente, a redução da quantidade de oócitos quantificados. Essa redução também pode estar relacionada ao rompimento de alguns oócitos dos grupos tratados, fato que também foi observado no presente estudo.

No presente estudo, os oócitos apresentaram alterações mais acentuadas em comparação com as alterações descritas por Oliveira et al. (2008). Essa diferença pode ter ocorrido devido a presença do fluazuron na formulação. Embora o fluazuron não tenha ação direta sobre os oócitos, seu efeito sobre a membrana periotrófica e no lúmen intestinal (Terra, 2011; Sonenshine e Anderson, 2014), pode ter alterado a função digestiva das células intestinais, levando a um comprometimento na absorção de nutrientes, bem como na síntese de vitelogenina. Além disso, esse efeito também pode estar relacionado a forma de contato dos carrapatos com os carrapaticidas, nos dois estudos. No estudo conduzido por Oliveira et al. (2008), as fêmeas foram imersas por 2 minutos na solução de fipronil, enquanto no presente estudo, os carrapatos dos grupos tratados passaram todo o período do estudo se alimentando de sangue de bovinos tratados com a formulação comercial contendo fipronil e fluazuron.

5. CONCLUSÕES

Concluimos que a formulação contendo fipronil + fluazuron afetou a biologia reprodutiva de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, ocasionando redução na quantidade e viabilidade dos ovos produzidos. As moléculas presentes na formulação também induziram a alterações morfológicas nos oócitos, assim como, uma redução no número de oócitos. As alterações mais frequentes foram degradação citoplasmática e oócitos com formato irregular. Esse impacto está primariamente relacionado ao efeito direto do fipronil no desenvolvimento dos ovários, já evidenciado na literatura para outras espécies de carrapatos, e descrito pela primeira vez para *R. microplus*, no presente estudo. O impacto na biologia reprodutiva também pode estar relacionado a consequências indiretas, que podem ocorrer por conta da ação do

fluazuron, devido bloqueio da síntese de quitina no intestino, órgão de Gené e na formação do exoesqueleto das larvas. Tais aspectos merecem ser investigados futuramente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Amithamol, K.K., Sunil, A.R., Kumar, K.G.A., Nair, S.N., Soorya, V.C., Chandrasekhar, L., Juliet, S., Ravindran, R., Ghosh, S. 2012. Effects of fipronil against *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus*. *Int J Acarol.* 38(8), 731-735.

Andrade, C.G.T., Jordão, B.Q., 2012. Organelas envolvidas na síntese e na degradação de macromoléculas. In: Junqueira, L.C., Carneiro, J. (Eds), *Biologia celular e molecular*, Rio de Janeiro, pp. 203-231.

Balashov, Y.S., 1983. An atlas of Ixodid tick ultrastructure. Entomological Society of America, 290.

Bennett, G.F., 1974. Oviposition of *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acari: Ixodidae). I. Influence of tick size on egg production. *Acarologia.* 16(1), 52-61.

Bull, M.S., Swindale, S., Overend, D., Hess, E.A. 1996. Suppression of *Boophilus microplus* populations with fluazuron-an acarine growth regulator. *Aust Vet J.* 74(6), 468-470.

Camargo-Mathias, M.I., Arnosti, A., Brienza, P.D., Furquim, K.C.S., Oliveira, P.R., Denardi, S.E., Bechara, G.H., 2010. The dynamics of RNA participation in the vitellogenesis of *Rhipicephalus sanguineus* tick Latreille 1806 (Acari: Ixodidae). I. Nucleoli or Cajal bodies? *Micron.* 41(7), 870-876.

Camargo-Mathias, M.I., Pereira, N.R.C., Reis, C.S., Almeida, C.R., Mendes, D.R.S., Araújo, G.B., Postali, L., Figueroa, T., Ferreira, A.R.F., Santos, J.P., Oliveira, P.R., 2017. Deltamethrin as inductor agente of precocious ovarian degeneration in *Rhipicephalus sanguineus* s.l. (Acari: Ixodidae) ticks. *Exp. Appl. Acarol.* 72(2), 161-169.

Campos Júnior, D.A., Oliveira, P.R., 2005. Avaliação *in vitro* da eficácia de acaricidas sobre *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) de bovinos no município de Ilhéus, Bahia, Brasil. *Cienc Rural.* 35(6), 1386-1392.

Chavasse, D.C.; Yap, H.H. 1997. Vectors and pest of public health importance. WHO/CTD/Whopes/97.2. Disponível em: <https://bvssp.icict.fiocruz.br/pdf/WHO_CTD_WHOPES_97.2.pdf>.

Coop, R.L., Taylor, M.A., Jacobs, D.E., Jackson, F., 2002. Ectoparasites: recent advances in control. *Trends Parasitol.* 18(2), 55-56.

Drummond, R.O., Ernst, S.E., Trevino, J.L., Gladney, W.J., Graham, O.H., 1976. Test of acaricides for control of *Boophilus annulatus* and *Boophilus microplus*. *J Econ Entomol.* 69, 37-40.

Fernandes, E.K.K., Bittencourt, V.R.E.P., Roberts, D.W. 2012. Perspectives on the potential of entomopathogenic fungi in biological control of ticks. *Exp Parasitol.* 130(3), 300-305.

Fournet, F.; Sannier, C.H., Moriniere, M.; Porcheron, P., Monteny, N., 1995. Effects of two insect growth regulators on ecdysteroid production in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol.* 32(5), 588-593.

Furlong, J., Martin, J.R.S., Prata, M.C.A., 2007. O carrapato dos bovinos e a resistência: temos o que comemorar? Controle estratégico do carrapato dos bovinos. *A Hora Veterinária*. 27(159), 26-32.

Furlong, J., Martins, J.R.S., Prata, M.C.A., 2004. Controle estratégico do carrapato dos bovinos. *A Hora Veterinária*. 23(159), 53-56.

Ghosh, S., Tiwari, S.S., Kumar, B., Srivastava, S., Sharma, A.K., Kumar, S., Bandyopadhyay, A.; Juliet, S., Kumar, R., Rawat, A.K.S., 2015. Identification of potential plant extracts for anti-tick activity against acaricide resistant cattle ticks, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Exp Appl Acarol*. 66(1), 159-171.

Gomes, A., Koller, W.W., Barros, A.T.M., 2011. Susceptibilidade de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* a carrapaticidas em Mato Grosso do Sul, Brasil. *Cienc Rural*. 41(8), 1447-1452.

Graf, J.F., Gogolewski, R., Leach-Bing, N., Sabatini, G.A., Molento, M.B., Bordin, E.L., Arantes, G.J., 2004. Tick control: an industry point of view. *Parasitology*. 129, 427-442.

Grisi, L., Leite, R.C., Martins, J.R.S., Barros, T.M., Andreotti, R., Cançado, P.H.D., León, A.A.P., Pereira, J.B., Villela, H.S., 2014. Reassessment of the potencial economic impact of cattle parasites in Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet*, 23(2), 150-156.

Hoffmann, K.H., Lorenz, M.W. 1998. Recent advances in hormones in insect pest control. *Phytoparasitica*. 26(4), 323-330.

Iturbe-Requena, S.L., Prado-Ochoa, M.G., Velázquez-Sánchez, A.M., García-Hernández, F., Cossío-Bayúgar, R., Muñoz-Guzmán, M.A., Ángeles, E., Alba-Hurtado, F., 2020. Oogenesis and embryogenesis inhibition induced by two new ethyl-carbamates in the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. *Ticks Tick Borne*, 11(2), 101326.

Ogihara, M.H., Taylor, D., 2014. Female reproductive system. In: Sonenshine, D.E., Roe, R.M. (Eds), *Biology of Tick*, New York, pp. 449-483.

Kanapadinchareveetil, S. K., Chandrasekhar, L., Kartha, H.S., Ravindran, R., Juliet, S., Ajithkumar, K.G., Nair, S.N., Ghosh, S. 2017. Ultrastructural analysis of oocytes of *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus* during postengorgement period as a tool to evaluate the cytotoxic effects of amitraz and deltamethrin on the germinative cells. *Vet Parasitol*. 247, 113-120.

Kanapadinchareveetil, S., Chandrasekhar, L., Pious, A., Kartha, H.S., Ravindran, R., Juliet, S., Nair, S.N., Ajithkumar, G., Ghosh, S. 2019. Molecular, histological and ultrastructural characterization of cytotoxic effects of amitraz on the ovaries of engorged females of *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus*. *Exp Parasitol*. 204, 107732

Klafke, G., Webster, A., Dall'Agnol, B., Pradel, E., Silva, J., LA Canal, L.H., Becker, M., Osório, M.F., Mansson, M., Barreto, R., Scheffer, R., Souza, U.A., Corassini, V.B., Santos, J., Reck, J., Martins, J.R., 2017. Multiple resistance to acaricides in field populations of

Rhipicephalus microplus from Rio Grande do Sul state, Southern Brazil. Tick Borne Dis. 8(1), 73-80.

Lopes, W.D.Z., Chiummo, R.M., Vettorato, L.F., Rodrigues, D.C., Sonada, R.B. 2017. The effectiveness of a fixed-dose combination pour-on formulation of 1,25% fipronil and 2,5% fluazuron against economically important ectoparasites and associated pharmacokinetics in cattle. Parasitol Int. 66(5), 627-634.

Brasil. Portaria nº 48 de 12 de maio de 1997 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Aprova o regulamento técnico para produção, controle e emprego de antiparasitários de uso veterinário. Brasília, 16 mai. 1997. Seção 2.3. 3-8.

Martins, J.R.S., Furlong, J., Leite, R.C., 2006. Controle de carrapatos. In: Barros-Battesti, D.M.B, Arzua, M, Brechara, G.H. (Eds.), Carrapatos de importância medico-veterinária da Região Neotropical. Um guia ilustrado para a identificação de espécies. Instituto Butantan, São Paulo, pp.145-153.

Matos, R.S., Daemon, E., Camargo-Mathias, M.I., Furquim, K., Sampieri, B., Remedio, R., Araújo, L.X., Novato, T.P.L., 2014. Histopathological study of ovaries of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) to different methods of dissolving thymol. J Parasitol Res, 113(2), 669-673.

Matos, R.S., 2018. Estudo morfofisiológico das glândulas salivares, singânglio, órgão de Genê e ovários de fêmeas de *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae) tratadas com diferentes concentrações de timol. Dissertação (Doutor em ciências biológicas), instituto de biociências do campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, 180 pp.

Mendonça, R.P., 2010. Atividade endectocida, segurança clínica e farmacocinética de resíduos de uma nova alternativa terapêutica (Fluazuron+Abamectina) em bovinos. Dissertação (Doutor em Medicina veterinária), área de patologia animal, Universidade Estadual Paulista, 168 pp.

Merino, O., Almazán, C., Canales, M., Villar, M., Moreno-Cid, J.A., Estrada-Peña, A.; Kocan, K.M., Fuente, J., 2011. Control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infestations by the combination of subolesin vaccination and tick autocidal control after subolesin gene knockdown in tick fed on cattle. Vaccine. 29(12), 2248-2254.

Moffat, M.S., 1993. New chemicals seek to outwit insect pests. Science. 261(5121), 550-551.

Monteiro, C.M.O., Furlong, J, Prata, M.C.A., Soares, A.E., Batistita, E.S.P., Dolinski, C. 2010. Evaluation of the action of *Heterorhabditis bacteriophora* (Rhabditida: Heterorhabditidae) isolate HP88 on the biology the biology of engorged females of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). Vet. Parasitol. 185(2-4), 355-358.

Nodari, E.F., Roma, G.C., Furquim, K.C.S., Bechara, G.H., Camargo-Mathias, M.I., 2012. Action of permethrin on *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) semi-engorged females: Morpho-physiological evaluation of salivary glands. Tick Borne Dis. 3(4), 219-226.

Nwanade, C.F., Wang, M., Wang, T., Yu, Z., Liu, J., 2020. Botanical acaricides and repellents in tick control: current status and future directions. Exp Appl Acarol. v. 81, p. 1-35, 2020.

Ogihara, M.H., Taylor, D., 2014. Female reproductive system. In: Sonenshine, D.E., Roe, R.M. (Eds), *Biology of Tick*, New York, pp. 449-483.

Oliveira, P.R., 2010. Avaliação dos efeitos do fipronil (ingrediente ativo do Frontline®) nos ovários de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) e no sangue periférico de roedores. Dissertação (Doutor em ciências biológicas), instituto de biociências do campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, 173 pp.

Oliveira, P. R., Bechara, G.H., Camargo-Mathias, M.I, 2008. Evaluation of cytotoxic effects of fipronil on ovaries of semi-engorged *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). *Food and Chem Toxicol.* 46(7), 2459-2465.

Oliveira, P.R., Bechara, G.H., Morales, M.A.M., Camargo-Mathias, M.I. 2009. Action of the chemical agent fipronil on the reproductive process of semi-engorged females of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). Ultrastructural evaluation of ovary cells. *Food Chem Toxicol.* 47(6), 1255-1264.

Oliveira, P.R., Calligaris, I.B., Roma, G.C., Bechara, G.H., Camargo-Mathias, M.I., 2013. Fluazuron-induced morphophysiological changes in the cuticle formation and midgut of *Rhipicephalus sanguineus* Latreille, 1806 (Acari: Ixodidae) nymphs. *Parasitol Res.* 112(1), 45-58.

Pawar, P.V., Pisale, S.P., Sharma, R.N., 1995. Effect of some new insect growth regulators on metamorphosis and reproduction of *Aedes aegypti*. *Indian J Med Res.* 101, 13-18.

Pereira, M.C., 2008. Introdução. In: Pereira, MC., Labruna, M.B., Szabó, M.P.J., Klafke, G.M. (eds), *Rhipicephalus (Boophilus) microplus: biologia, controle e resistência*. MEDVET, São Paulo, pp.1-5.

Pereira, M.C., Gasparotto, A.E., Jurgilas, J.P., Silva, L.A.C., Pereira, M.C., Silveira, S.S., Silva, T.N., Arnosti, A., Camargo-Mathias, M.I., 2017. Detrimental effect of deltamethrin on the central nervous system (synganglion) of *Rhipicephalus sanguineus* ticks. *Exp Appl Acarol.* 71(2), 159-169.

Prado-Ochoa, M.G., Noguera, P.R., Torres, R.D., Fariña, M.A.M., Angeles, E., Hurtado, F.A., 2014 The action of two ethyl carbamates on acetylcholinesterase and reproductive organs of *Rhipicephalus microplus*. *Vet Parasitol.* 199(3-4), 215-224.

Proskuryakov, S.Y., Konoplyannikov, A.G., Gabai, V.L., 2003. Necrosis: a specific form of programmed cell death? *Exp Cell Res*, 283, 1-16.

Rauh, J.J., Lummis, S.C.R., Sattelle, D.B., 1990. Pharmacological and biochemical properties of insect GABA receptors. *Trends Pharmacol Sci.* 11(8), 325-329.

Raynal, J.T., Silva, A.A.B., Sousa, T.J., Bahiense, T.C., Meyer, R., Portela, R.W. 2013. Acaricides efficiency on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* from Bahia state North-Central region. *Rev Bras Parasitol Vet.* 22(1), 71-77.

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. 2014. First report of fluazuron resistance in *Rhipicephalus microplus*: A field tick population resistant to six classes of acaricides. *Vet Parasitol.* 201(1-2), 128-136.
- Roma, G.C., Bechara, G.H., Camargo-Mathias, M.I. 2010. Permethrin-induced ultrastructural changes in oocytes of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) semi-engorged females. *Ticks Tick Borne Dis.* 1(3), 113-123.
- Roma, G.C., Furquim, K.C.S., Bechara, G.H., Camargo-Mathias, M.I., 2011. Cytotoxic effects of permethrin in oocytes of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) fully engorged females: I. Direct or indirect action of the acaricide in germ cells? *Exp Appl Acarol.* 53(3), 287-299.
- Roma, G.C., Camargo-Mathias, M.I., Oliveira, P.R., Furquim, K.C.S., Bechara, G.H., 2013. Neurotoxic action of permethrin in *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) female ticks. Morphological and cytochemical evaluation of the central nervous system. *Vet Parasitol.* 196(3-4), 482-491.
- Saito, K.C., Bechara, G.H., Nunes, E.T., Oliveira, P.R., Denardi, S.E., Camargo-Mathias, M.I. 2005. Morphological, histological and ultrastructural studies of the ovary of the cattle-tick *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). *Vet Parasitol.* 129(3-4), 299-311.
- Santana, B.B., Ramos, A.N., Santana, M.A., Alves, L.C.; Carvalho, G.A., 2013. Susceptibility of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) to pyrethroids and their associations in Pernambuco, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet.* 22(2), 276-280.
- Silva, W.W., Athayde, A.C.R., Araújo, G.M.B., Santos, V.D., Neto, A.B.S., 2005. Resistência de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* e *Rhipicephalus sanguineus* (ACARI: IXODIDAE) a carrapaticidas no semi-árido paraibano: efeito da cipermetrina e do amitraz. *Agropecuária Científica no Semi-Árido.* 1(1), 59-62.
- Simon-Delso, N., Amaral Rogers, V., Belzunces, L.P., Bonmatin, J.M., Chagnon, M., Downs, C., Furlan, L., Gibbons, D.W., Girolami, V., Goulson, D., Kreuzweiser, D.P., Krupke, C.H., Liess, M., Long, E., McField, M., Mineau, P., Mitchell, E.A.D., Morrissey, C.A., Noome, D.A., Pisa, L., Settele, J., Stark, J.D., Tapparo, A., Dyck, V.H., Praagh, J.V., Sluijs, V.D., Whitehorn, P.R., Wiemers, M., 2015. Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. *Environ Sci Pollut Res.* 22(1), 5-34.
- Sonenshine, D.E., Anderson, J.M., 2014. Mouthparts and digestive system. In: Sonenshine, D.E., Roe, R.M. (Eds), *Biology of Tick*, New York, pp. 123-162.
- Taylor, M.A. 2001. Recent developments in ectoparasiticides. *Vet J.* 161(3), 253-268.
- Terra, W.R., 2001. The origin and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. *Arch Insect Biochem.* 47(2), 47-61.
- Zhao, X., Yeh, J.Z., Salgado, V.L., Narahashi, T. 2004. Fipronil is a potent open channel blocker of glutamate-activated chloride channels in cockroach neurons. *J Pharmacol Exp Ther.* 310(1), 192-201.