

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

DISSERTAÇÃO

Resposta celular e metabólica de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* expostas ao Fluazuron

Mariana Silva Revoredo Alves

2019



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**RESPOSTA CELULAR E METABÓLICA DE FÊMEAS
INGURGITADAS DE *Rhipicephalus microplus* EXPOSTAS AO
FLUAZURON**

MARIANA SILVA REVOREDO ALVES

Sob a Orientação do Professor
Fabio Barbour Scott

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2019

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

A474r Alves, Mariana Silva Revoredo, 1988-
 Resposta celular e metabólica de fêmeas
 ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* expostas ao
 Fluazuron / Mariana Silva Revoredo Alves. - Rio de
 Janeiro, 2019.
 54 f.: il.

 Orientador: Fábio Barbour Scott.
 Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal Rural
 do Rio de Janeiro, Programa de Pós-graduação em
 Ciências Veterinárias, 2019.

 1. Carrapatos. 2. Metabolismo energético. 3.
 Hemócitos. I. Scott, Fábio Barbour, 1966-, orient. II
 Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
 Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias III.
 Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

MARIANA SILVA REVOREDO ALVES

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 27/02/2019



Fabio Barbour Scott, Dr., UFRRJ
(Orientador)



Lilian Cristina de Sousa Oliveira Batista Cirne, Dra., CESVA - FAA



Bárbara Rauta de Avelar, Dra., UFRRJ

Dedico ao meu velhinho, meu companheiro de jornada. Que tanto me ensina e tanto me alegra. Ao meu grande amigo, Max.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me guiar para o cumprimento de mais um objetivo nesta jornada.

À minha família pelo apoio e carinho que sempre dedicam a mim. Em especial aos meus pais, Tereza e Wagner, aos meus irmãos Maiza e Júnior, e ao meu marido Jônatas.

Aos meus colegas de trabalho e de profissão que partilharam de momentos mais que especiais durante este árduo caminho em busca do melhoramento profissional e também pessoal, em especial aos colegas Diefrey Campos, Bárbara Rauta, Andressa Reis e Marisa Rocha pelo apoio durante a execução deste projeto.

Aos professores com quem tive o privilégio de conviver e aprender a cada dia. Em especial ao meu orientador professor Fabio Barbour Scott, sou muito grata pelos ensinamentos, pela paciência e pela dedicação.

À Professora Isabele da Costa Angelo e à pós-graduanda Jéssica Fiorotti pelo compartilhamento de conhecimento técnico e por sua disponibilidade.

Agradeço aos animais de todas as espécies, raças e tamanhos que nos lembram todos os dias o valor das coisas mais simples da vida, e as que mais valem a pena, amizade, companheirismo e alegria.

A Fundação de Apoio à Pesquisa da Universidade Rural (FAPUR) pelo incentivo financeiro na modalidade de bolsista do programa de pós-graduação.

Ao Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária (LQEPPV) e todos os seus colaboradores por compartilhar de seus recursos por todo período do mestrado.

E à Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro agradeço por mais uma etapa concluída.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, agradeço o financiamento desta pesquisa.

BIOGRAFIA

Mariana Silva Revoredo Alves, filha de Wagner Revoredo Alves e Tereza Cristina Silva Revoredo Alves, nasceu em 22 de novembro de 1988, na cidade do Rio de Janeiro, Estado do Rio de Janeiro.

Cursou o Ensino Fundamental no Colégio Vieirense e concluiu o Ensino Médio na Escola Santa Bárbara no ano de 2006, ambas as instituições no bairro Campo Grande, na cidade do Rio de Janeiro. Em 2009 ingressou na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), município de Seropédica, no curso de Medicina Veterinária, graduando-se no ano de 2014.

Interessou-se pela área laboratorial no terceiro ano de graduação, realizando estágios nos Laboratórios de Doenças Parasitárias e Micologia Veterinária. No último ano cumpriu estágio supervisionado na área de Patologia Clínica Veterinária na Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus Jaboticabal e no setor de análises clínicas do Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária (LQEPV), da UFRRJ.

No ano de 2015 ingressou no Programa de Residência Multiprofissional em Área de Saúde, da UFRRJ, na área de Patologia Clínica Veterinária sob a orientação da professora Dra. Cristiane Divan Baldani. No ano de 2017 apresentou sua Monografia intitulada “Influência do tempo e da temperatura de armazenamento na determinação de parâmetros bioquímicos séricos de cães da raça Beagle” para obtenção do título de Especialista em Diagnóstico em Medicina Veterinária – Patologia Clínica Veterinária. Neste mesmo ano iniciou o Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, nível de Mestrado, da UFRRJ, sob orientação do professor Dr. Fabio Barbour Scott, com previsão de conclusão no ano de 2019.

RESUMO

ALVES, Mariana Silva Revoredo. **Resposta celular e metabólica de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* expostas ao Fluazuron**. 2019. 43p Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

Este trabalho tem como objetivo avaliar a hemolinfa coletada de fêmeas ingurgitadas do carrapato *Rhipicephalus microplus* após a exposição destas a um regulador de crescimento, o fluazuron, e compará-la à hemolinfa de carrapatos da mesma espécie sem o tratamento com o regulador de crescimento através da caracterização e contagem celular e dosagens bioquímicas. Foram realizados testes de imersão com as fêmeas ingurgitadas em dois grupos, controle e tratado com fluazuron 1.000 ppm. Foi coletada hemolinfa para contagem total e diferencial de hemócitos e avaliação do metabolismo energético através da dosagem de glicose e proteína total (PT) e atividade das enzimas lactato desidrogenase (LDH) e aspartato aminotransferase (AST), nos tempos de 24 e 48 horas após a imersão. Quando comparados os dois grupos, controle e tratado com fluazuron, a contagem total de hemócitos foi menor no grupo tratado tanto em 24 quanto em 48 horas e houve diminuição das contagens de granulócitos e aumento das contagens de esferulócitos em ambos os tempos de análise, também no grupo tratado. Houve redução dos valores de glicose e PT tanto no grupo controle quanto tratado nas avaliações de 48 horas quando comparadas às avaliações de 24 horas, e não houve alterações nas atividades de LDH e AST em ambos os grupos nos dois tempos de análise em relação à ação do fluazuron. O fluazuron não foi capaz de promover mudanças no metabolismo energético dos carrapatos nas condições estabelecidas neste estudo, porém, quanto à dinâmica de hemócitos, o regulador de crescimento demonstrou-se capaz de promover alterações.

Palavras-chave: carrapato, metabolismo energético, hemócitos.

ABSTRACT

ALVES, Mariana Silva Revoredo. **Cellular and metabolic response of engorged *Rhipicephalus microplus* females exposed to Fluazuron.** 2019. 43p Dissertation (Masters in Veterinary Sciences). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

This work aims to evaluate the hemolymph collected from engorged females of the tick *Rhipicephalus microplus* after their exposure to a growth regulator, fluazuron, and to compare it to the hemolymph of ticks of the same species without treatment with the growth regulator through cell characterization and counting and biochemical measurements. Immersion tests were performed with engorged females in two groups, control and fluazuron 1.000 ppm. Hemolymph was collected for total and differential counts of hemocytes and evaluation of energy metabolism through glucose and total protein (PT) and lactate dehydrogenase (LDH) and aspartate aminotransferase (AST) enzyme activity, at 24 and 48 hours after the immersion. When comparing the two groups, control and fluazuron, the total hemocyte count was lower in the fluazuron group in both 24 and 48 hours and there was a decrease in granulocyte counts and increase in spherulocyte counts at both analysis times, also in the group fluazuron. There was a reduction in glucose and PT values in both groups, control and treated, at the 48 hour evaluations when compared to the 24 hour evaluations, and there were no changes in LDH and AST activities in both groups in the two analysis times in relation to the action of fluazuron. Fluazuron was not able to promote changes in the energetic metabolism of ticks under the conditions established in this study, but for the dynamics of hemocytes the growth regulator was able to promote changes.

Key words: tick, energetic metabolism, hemocytes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Carrapatos da espécie <i>Rhipicephalus microplus</i> . Parte dorsal (A) e ventral (B) de macho adulto; Parte dorsal (C) e ventral (D) de fêmea adulta. (Fonte: discoverlife.org).....	03
Figura 2: Ciclo evolutivo de <i>Rhipicephalus microplus</i> . (Fonte: Fortes, 2004).....	05
Figura 3: Classificação geral da diferenciação celular dos hemócitos em insetos. (Fonte: Strand, 2008).....	07
Figura 4: Catabolismo de proteínas, lipídeos e carboidratos durante os três estágios da respiração celular. (Fonte: Nelson; Cox, 2014).....	09
Figura 5: Principais vias de utilização da glicose. (Fonte: Nelson; Cox, 2014).....	10
Figura 6: Hemócitos de hemolinfa fresca para contagem em Câmara de Neubauer. Aumento de 400x. (Fonte: LQEPV, 2018).....	15
Figura 7: Hemócitos em esfregaço corado por Giemsa. A – Granulócito (seta) e Plasmatócito (cabeça de seta); B – Esferulócito (seta) e Pró-hemócito (cabeça de seta); C – Granulócito (seta) e Esferulócitos (cabeça de seta). Aumento de 1.000x (Fonte: LQEPV, 2018).....	20

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores médios de Glicose da hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i> nos tempos de 24 e 48 horas após o teste de imersão dos grupos controle e tratado com Fluazuron.....	17
Tabela 2. Valores médios de Proteína Total (PT) da hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i> nos tempos de 24 e 48 horas após o teste de imersão dos grupos controle e tratado com Fluazuron.....	18
Tabela 3. Valores médios de Lactato Desidrogenase (LDH) da hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i> nos tempos de 24 e 48 horas após o teste de imersão dos grupos controle e tratado com Fluazuron.....	18
Tabela 4. Valores médios de Aspartato Aminotransferase (AST) da hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i> nos tempos de 24 e 48 horas após o teste de imersão dos grupos controle e tratado com Fluazuron.....	19
Tabela 5. Contagem total de hemócitos da hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i> nos tempos de 24 e 48 horas após o teste de imersão dos grupos controle e Fluazuron.....	20
Tabela 6. Quantificação de granulócitos presentes na hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i> nos tempos de 24 e 48 horas após o teste de imersão dos grupos controle e Fluazuron.....	21
Tabela 7. Quantificação de plasmatócitos presentes na hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i> nos tempos de 24 e 48 horas após o teste de imersão dos grupos controle e Fluazuron.....	22
Tabela 8. Quantificação de esferulócitos presentes na hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i> nos tempos de 24 e 48 horas após o teste de imersão dos grupos controle e Fluazuron.....	22
Tabela 9. Quantificação de pró-hemócitos presentes na hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i> nos tempos de 24 e 48 horas após o teste de imersão dos grupos controle e Fluazuron.....	23

LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS

AchE – acetilcolinesterase

AST – alanina aminotransferase

CDH – contagem diferencial de hemócitos

CTH – contagem total de hemócitos

GABA – ácido gama-aminobutírico

g/L – gramas por litro

IGR – *insect growth regulator*

LDH – lactato desidrogenase

mg/dL – miligramas por decilitro

ppm – partes por milhão

PT – proteína total

TPB – tristeza parasitária bovina

U/L – unidades por litro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 <i>Rhipicephalus microplus</i>.....	3
2.2 Hemolinfa.....	6
2.2.1 Hemócitos	6
2.2.2 Metabolismo energético	7
2.3 Controle Químico de <i>Rhipicephalus microplus</i>	11
2.4 Reguladores de Crescimento de Insetos (IGR).....	12
2.4.1 Fluazuron.....	12
3 MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1 Procedência das Fêmeas Ingurgitadas	14
3.2 Obtenção da Formulação de Fluazuron.....	14
3.3 Exposição das Fêmeas Ingurgitadas ao Fluazuron	14
3.4 Coleta de Hemolinfa.....	15
3.4.1 Contagem total de hemócitos	15
3.4.2 Contagem diferencial de hemócitos	15
3.4.3 Avaliação do metabolismo energético	15
3.5 Análise Estatística	16
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
4.1 Análises Bioquímicas.....	17
4.2 Quantificação Celular	19
4.2.1 Contagem total de hemócitos	20
4.2.2 Contagem diferencial de hemócitos	21
5 CONCLUSÕES.....	24
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	25
7 REFERÊNCIAS	26
8 ANEXOS	37

1 INTRODUÇÃO

Carrapatos são ectoparasitas hematófagos obrigatórios e causam infestações tanto em animais domésticos quanto silvestres. Possuem distribuição mundial, principalmente em áreas tropicais e subtropicais que possuem condições climáticas favoráveis para sua reprodução e sobrevivência. *Rhipicephalus microplus* é a espécie de carrapato mais importante em rebanhos bovinos, são popularmente chamados de “carrapatos do boi”. São responsáveis por prejuízos econômicos na produção bovina relacionados à grande morbidade e mortalidade.

O rebanho bovino no Brasil é composto por diversas raças (zebuínos, taurinos, mestiços) e essa diversidade possui influência direta na susceptibilidade e desenvolvimento do carrapato, nas suas formas parasitárias e não parasitárias. De maneira geral, os principais danos causados pelas infestações de *R. microplus* estão relacionadas à espoliação da pele dos animais por ação direta do carrapato, levando ao prurido intenso, aparecimento de miíases, estresse e perda de peso, tendo como consequência a queda na produção, depreciação do couro e até mesmo a morte do animal.

Além das consequências relacionadas à ação direta do carrapato, estes também podem atuar como vetores de agentes patogênicos causadores de doenças como a Tristeza Parasitária Bovina (TPB), um complexo de doenças causadas por um ou mais agentes infecciosos, entre eles a riquetsia *Anaplasma marginale* e os protozoários *Babesia bigemina* e *Babesia bovis*.

O controle das infestações em rebanhos de produção normalmente é feito com uso de carrapaticidas químicos, como os organofosforados, amidinas, piretróides, lactonas macrocíclicas, fenilpirazóis e os reguladores de crescimento de insetos, entre eles o fluazuron, que pertence ao grupo das benzoilfenilureias, um inibidor da síntese de quitina.

A escolha da melhor estratégia de controle é complexa e deve envolver as características do rebanho, como a raça dos animais, tipo de manejo e época do ano. O uso excessivo e sem controle dos acaricidas aumenta a pressão de seleção entre os carrapatos, o que leva à resistência ao produto de forma mais rápida.

O aparecimento da resistência aos produtos leva ao aumento da frequência de utilização dos mesmos, o que leva a questão da contaminação ambiental e a presença de resíduos nos alimentos que são comercializados, como carne e leite. Pesquisas são realizadas atualmente na busca de estratégias que possibilitem combinar o uso racional dos compostos e minimizar os casos de resistência.

A redução da eficiência e da vida útil dos compostos químicos disponíveis comercialmente se deve principalmente pela falta de embasamento científico e técnico na escolha das medidas de controle das infestações por carrapatos. Nos últimos anos estudos mostram o aumento dos casos de resistência do *R. microplus* às bases disponíveis no mercado. Os custos para o desenvolvimento de novas bases com compostos ativos que não apresentem problemas de resistência podem chegar a milhões de dólares, além de anos para que sejam colocados para comercialização.

As vias moleculares de desenvolvimento da resistência vêm sendo estudadas, e os mecanismos estão associados principalmente ao aumento da capacidade de detoxificação dos compostos no metabolismo do carrapato e pela modificação dos sítios de ação alvo dos

produtos. Porém, ainda existem muitos esclarecimentos a serem feitos a cerca da imunologia e fisiologia envolvida nesses mecanismos.

Um dos meios de esclarecimento desses processos é através da avaliação da hemolinfa dos carrapatos. A hemolinfa é um fluido que irriga e nutre seus tecidos, além de permitir o transporte de moléculas diversas, como os fatores envolvidos na resposta imunológica do carrapato, que podem lhe conferir defesa não só contra agentes patogênicos aos quais é exposto, mas também contra antiparasitários.

Desta forma se fazem necessários estudos que busquem maiores esclarecimentos sobre a resposta metabólica e imunológica destes ácaros, os quais estão mais avançados em insetos e crustáceos, mas ainda escassos em carrapatos.

O objetivo deste trabalho é avaliar o metabolismo energético e a resposta celular na hemolinfa de adultos de *R. microplus* após a exposição dos mesmos a um regulador de crescimento, o fluazuron.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Rhipicephalus microplus*

Este carrapato pertence ao gênero *Rhipicephalus*, subgênero *Boophilus*, inserido na família Ixodidae, ordem Ixodida, classe Arachnida, filo Arthropoda do reino Animalia (NAVA et al., 2017). (Figura 1)

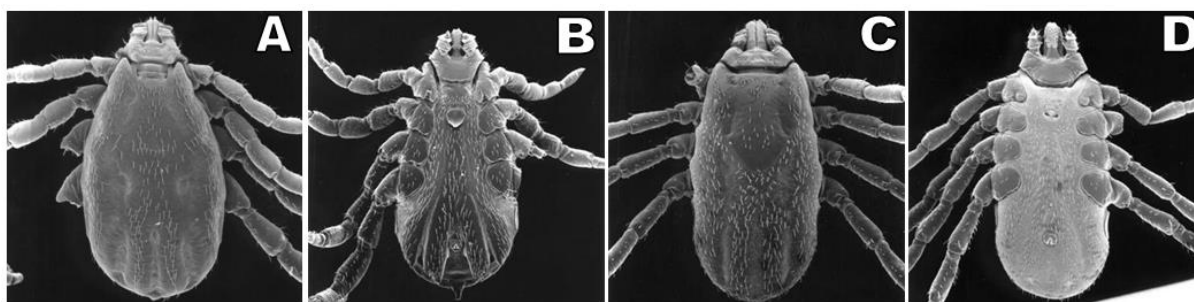


Figura 3: Carrapatos da espécie *Rhipicephalus microplus*. Parte dorsal (A) e ventral (B) de macho adulto; Parte dorsal (C) e ventral (D) de fêmea adulta. (Fonte: discoverlife.org)

Animais pertencentes ao filo Arthropoda são invertebrados com exoesqueleto quitinoso, corpo segmentado (metaméricos), membros articulados e também possuem apêndices (espinhos, cerdas e pêlos). O exoesqueleto fornece suporte e proteção aos tecidos, é uma estrutura composta por camadas de cutícula secretadas pela epiderme. As camadas mais internas da cutícula são compostas por quitina, e também possuem poros que permitem a passagem de secreções da epiderme para o meio externo. Na cutícula também estão presentes aberturas denominadas de estigmas, por onde ocorrem as trocas gasosas (TAYLOR; COOP; WALL, 2014).

Possuem uma série de cavidades ou seios centrais compondo seu sistema circulatório, a chamada hemocele. Na hemocele flui a hemolinfa, que seria correspondente ao “sangue” dos carrapatos, por onde são transportados nutrientes e são removidos resíduos. A hemolinfa contém hemócitos e numerosas proteínas em sua composição, possui grande importância na imunidade inata (SONENSHINE; ROE, 2014).

Os artrópodes também possuem intestino em tubo simples, dividido em três sessões, anterior, média e posterior. Também possuem receptores sensoriais que estão relacionados a modificações no exoesqueleto quitinoso, os mais comuns são as cerdas, pêlos e espículas. A maioria dos artrópodes apresenta olhos, cujo grau de complexidade pode variar. Em ácaros, piolhos e carrapatos os olhos podem ser muito pequenos ou ausentes. Em relação à reprodução, os sexos são separados e há acasalamento para a produção de ovos (SONENSHINE; ROE, 2014).

Dentro do filo Arthropoda está a classe Arachnida, representada por um grupo muito diverso de artrópodes predominantemente carnívoros. Não apresentam antenas nem asas, seu grupo de maior importância é a subclasse Acari onde estão inseridos ácaros e carrapatos (GUGLIELMONE et al., 2013).

Na subclasse Acari geralmente as seções do corpo são fundidas, fazendo com que este pareça simples, com formato de saco. Existem duas linhagens principais de ácaros, os Parasitiformes e os Acariformes (DUNLOP et al., 2008.).

Dentro do grupo dos Parasitiformes estão inseridos os carrapatos da Ordem Ixodida ou Metastigmata. (GUIMARÃES; TUCCI; BARROS-BATTESTTI, 2001).

Entre as principais famílias da ordem Ixodida estão Ixodidae e Argasidae. A mais importante, Ixodidae, é conhecida pelos “carrapatos duros”. Isso se deve pela presença de um escudo rígido de quitina que cobre a superfície dorsal do macho adulto. Nas outras formas evolutivas e fêmeas adultas, o escudo protege apenas uma pequena parte do dorso, o que permite a expansão de seu abdome após a alimentação (GUIMARÃES; TUCCI; BARROS-BATTESTTI, 2001; SERRA-FREIRE, 2011).

Carrapatos da família Ixodidae podem medir de 02 a 20 mm, com corpo achatado dorsoventralmente. São parasitas temporários, majoritariamente permanecem por pouco tempo nos hospedeiros. Durante a passagem de estágios, os ixodídeos realizam muitos repastos sanguíneos, alternados por longos períodos sem alimentação (SONENSHINE, 2014).

Esses carrapatos desenvolveram uma grande variedade de ciclos e formas de alimentação. O número de hospedeiros pode variar de um a três, e são classificados como carrapatos de um hospedeiro (de larva até adulto no mesmo hospedeiro), de dois hospedeiros (larva e ninfa em um hospedeiro e adulto em outro hospedeiro) e de três hospedeiros (cada estágio em um hospedeiro) (TAYLOR; COOP; WALL, 2014).

Os ciclos evolutivos nos artrópodes envolvem basicamente quatro estágios, que são de ovo, larva, ninfa e adulto. As larvas possuem seis pernas e as ninfas e adultos possuem oito pernas cada um (SONENSHINE, 2014).

Carrapatos da espécie *Rhipicephalus microplus* possuem ciclo evolutivo com apenas um hospedeiro (Figura 2). As fêmeas adultas após alimentação deixam o hospedeiro e fazem postura de milhares de ovos no ambiente. Após a eclosão das larvas, elas se aderem ao hospedeiro, se alimentam e sofrem muda para ninfa e depois para adulto. O acasalamento entre adultos ocorre sobre o hospedeiro. Depois de ingurgitada a fêmea pode chegar a pesar até 250 vezes mais que seu peso quando não alimentada (GUIMARÃES; TUCCI; BARROS-BATTESTTI, 2001; PEREIRA et al., 2008; SERRA-FREIRE, 2011).

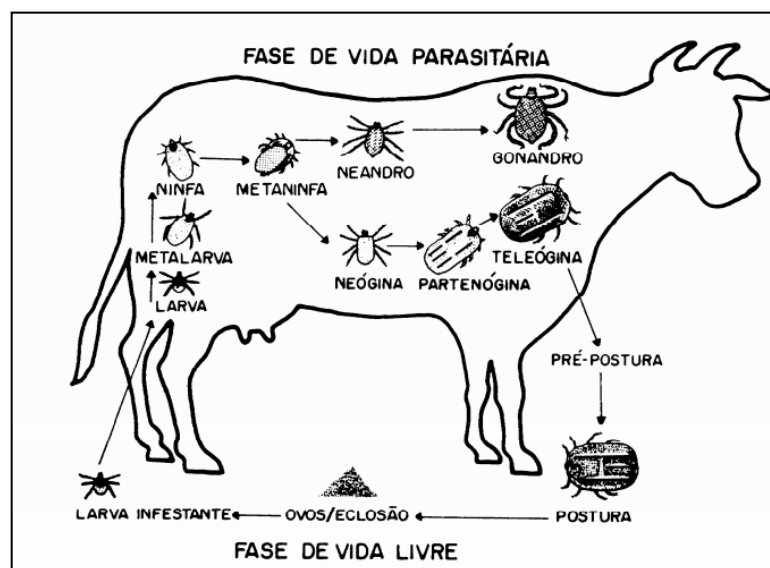


Figura 4: Ciclo evolutivo de *Rhipicephalus microplus*. (Fonte: Fortes, 2004)

Na fase parasitária as evoluções morfológicas ocorrem sobre o hospedeiro (larva, ninfa e adulto) e dura em média 22 dias. Já a fase de vida livre (não parasitária) compreende a pré-postura e eclosão dos ovos e depende fundamentalmente das condições climáticas, podendo durar de dois a três meses (ESTRADA-PEÑA, 2015).

Sendo os carrapatos ectoparasitas hematófagos obrigatórios, sua picada pode causar lesões na pele dos hospedeiros, irritações, hipersensibilidade, depreciação do couro e predisposição a miíases e abscessos (MASSARD, 2004).

Em casos de intensas infestações podem causar, em animais de produção, a queda da produtividade, anemia e até levar a morte. Durante o repasto sanguíneo os carrapatos também são capazes de transmitir vírus, bactérias, riquetsias e protozoários causadores de doenças (TAYLOR; COOP; WALL, 2014).

Dentro do gênero *Rhipicephalus* (*Boophilus*) estão vetores importantes de *Babesia spp.* e *Anaplasma marginale* em bovinos, principalmente em países tropicais e subtropicais (MARTINS, 2006). Essa espécie de carrapatos possui grande importância para o gado brasileiro e responde por perdas econômicas que chegam a 3,24 bilhões de dólares por ano (GRISI et al. 2014).

Na década de 80 tiveram início estudos sobre a biologia do carrapato bovino, que se tornaram fundamentais para seu controle, através da criação de estratégias de tratamento nos períodos mais desfavoráveis do seu ciclo biológico (FURLONG et al., 2002).

2.2 Hemolinfa

O carrapato possui em seu interior uma cavidade aberta onde seus órgãos são envolvidos por um fluido livre, denominado hemolinfa, constituída por plasma e uma variedade de células, os hemócitos. Promove proteção contra injúrias físicas e invasões por agentes patogênicos (GULLAN; CRANSTON, 2010). Nos ixodídeos o volume da hemolinfa compreende cerca de 20% a 30% de seu peso corporal (KAUFMAN; PHILLIPS, 1973).

Nos últimos anos, o conhecimento dos mecanismos imunológicos em invertebrados tem sido mais estudado, motivado pela importância vetorial dos mesmos, assim como pelo fato de serem hospedeiros intermediários na transmissão de patógenos de doenças graves (RIVERO, 2006).

A natureza de sua resposta imune inata envolve dois componentes principais, as defesas celulares (fagocitose, encapsulamento e nodulação) e respostas humorais envolvendo a secreção de proteínas de reconhecimento padrão (destinado a bactérias e fungos) e outros peptídeos como lisozima, lectinas e inibidores de proteases (em resposta ao desafio patogênico) (GRIESCH et al., 2000; SONENSHINE et al., 2008).

As informações sobre a resposta imune inata em carrapatos é bastante fragmentada e permite apenas comparações com outras espécies de invertebrados, especialmente artrópodes, no entanto, mesmo esses dados dispersos indicam que os carrapatos possuem mecanismos de defesa contra infecções e patógenos (KOPACEK et al., 2010; SONENSHINE; HYNES, 2008).

2.2.1 Hemócitos

Os hemócitos constituem a parte celular da hemolinfa dos carrapatos. Estes apresentam diversas funções, como defesa do organismo e transporte de substâncias como hormônios, enzimas e materiais a serem excretados (ARAÚJO, 2007).

Diversos tipos celulares já foram descritos utilizando-se características morfológicas, funcionais e bioquímicas. Em ixodídeos os tipos celulares frequentemente encontrados são os pró-hemócitos, esferulócitos, granulócitos, plasmatócitos e oenocitóides (BRINTON, 1971; CARNEIRO, 2001; DOLP, 1970).

Os hemócitos representam enorme papel no que diz respeito aos mecanismos de defesa dos carrapatos. Essas células são responsáveis pelos processos de fagocitose, nodulação e encapsulamento que têm como objetivo a eliminação de patógenos (GUPTA, 2009).

Em insetos há vários tipos de hemócitos descritos, incluindo granulócitos, oenocitóides e plasmatócitos (Figura 3) (VLISIDOU et al., 2015). Essa classificação dos hemócitos, baseada na morfologia, nem sempre se correlaciona bem com a função celular (LAVINE et al., 2002).

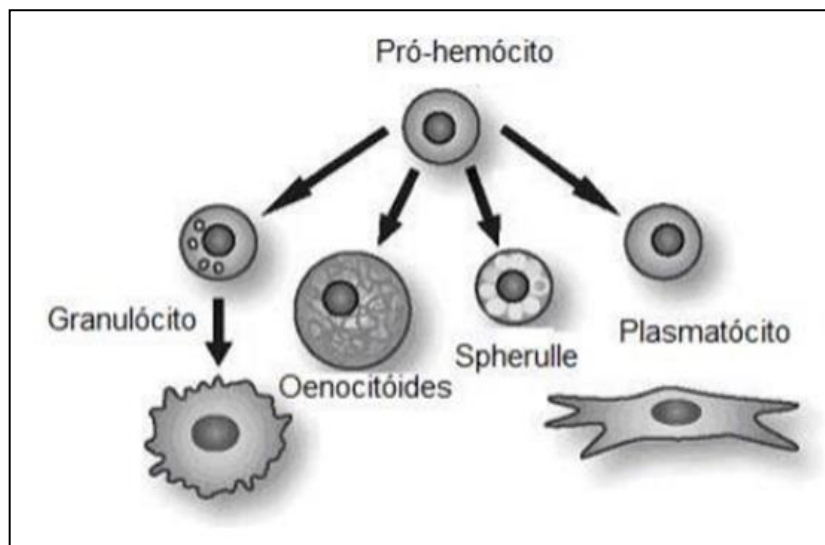


Figura 3: Classificação geral da diferenciação celular dos hemócitos em insetos. (Fonte: Strand, 2008)

Estudos realizados em insetos caracterizam os granulócitos e plasmatócitos como células granulares que expressam receptores fagocíticos e eliminam a maioria das partículas invasoras por fagocitose ou nodulação (NAGAOSA et al., 2011).

O processo de nodulação acontece quando a resposta imune fagocitária não é suficiente, principalmente em infecções bacterianas. A nodulação envolve a formação de agregados multicelulares de hemócitos, eles cercam a partícula invasora e depois se juntam a outros hemócitos para formar pequenos agregados. Esses agregados celulares continuam crescendo, adicionando mais hemócitos até que grandes nódulos sejam formados. No final, o nódulo é melanizado. A formação dos nódulos melanizados parece ser eficiente, embora seu processo de formação ainda não seja completamente caracterizado (SHRESTHA, 2009; ZHAO, 2009).

Para patógenos maiores, como parasitas, protozoários e nematóides, os hemócitos respondem formando uma cápsula em múltiplas camadas celulares ao redor do organismo estranho, no processo chamado encapsulamento (LING et al., 2006).

No caso dos carrapatos, que comparados aos insetos, possuem ainda menos estudos relacionados à composição celular da hemolinfa, a descrição da função específica de cada tipo de hemócito não é bem definida (CARNEIRO et al., 2001).

2.2.2 Metabolismo energético

Todas as atividades realizadas pelos artrópodes, assim como em outros animais, demandam aporte energético. Ixodídeos, como o *R. microplus*, precisam ingerir grandes volumes de sangue durante sua alimentação, pois é desta fonte que serão obtidos os nutrientes e substratos energéticos de que necessita (MORAES, 2007). Neste processo são ingeridos

pelo carrapato carboidratos, lipídeos e proteínas que são os substratos energéticos fundamentais para a maior parte dos organismos (NELSON; COX, 2008; GUIZZO et al., 2012).

Nos carrapatos a glicose é o carboidrato encontrado em quantidade mais abundante na hemolinfa, sendo assim sua principal fonte energética (SONENSHINE, 2014). Possui papel central no metabolismo de animais, plantas e diversos microrganismos. Sua oxidação completa ocorre com alta produção de energia. Seu armazenamento em forma de glicogênio nos carrapatos pode suprir grandes demandas energéticas quando necessário tanto de forma aeróbia quanto anaeróbia (NELSON; COX, 2014).

Para o fornecimento de energia da qual necessita o organismo, têm papel fundamental a glicólise, o Ciclo do ácido cítrico, a Cadeia transportadora de elétrons e a fosforilação oxidativa. Os metabólitos nestas vias convergem para a formação do acetil-CoA, um intermediário comum a estas. No Ciclo do ácido cítrico o acetil-CoA é totalmente oxidado, e há transferência de elétrons na Cadeia transportadora de elétrons nas cristas mitocondriais, gerando a síntese de ATP ao final do processo (Figura 4).

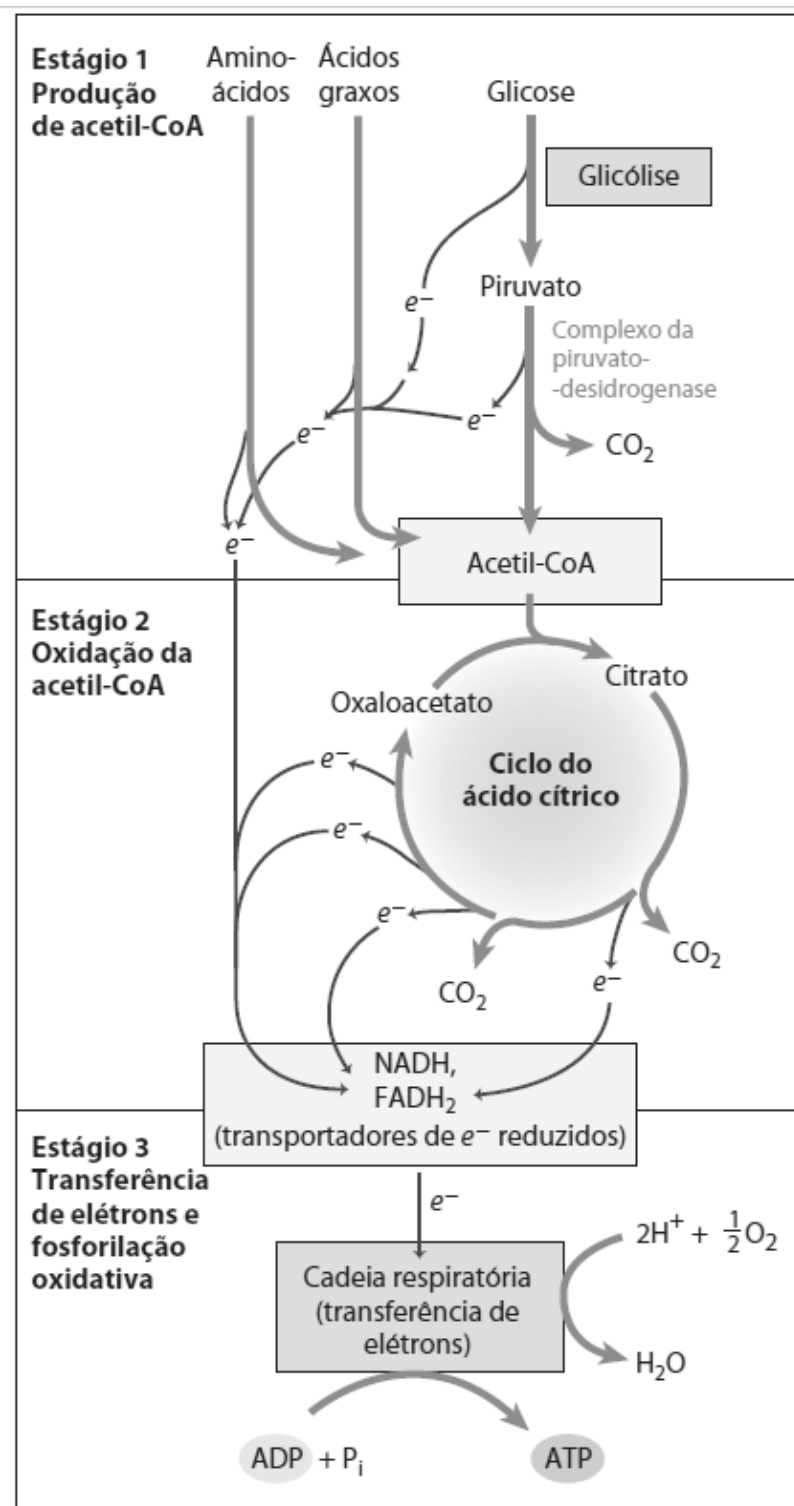


Figura 4: Catabolismo de proteínas, lipídeos e carboidratos durante os três estágios da respiração celular. (Fonte: Nelson; Cox, 2014)

A reserva energética nos ixodídeos é feita pelo corpo gorduroso. Nos períodos de não-alimentação, este tende a acumular grandes estoques de gotículas de gordura, assim como glicogênio e proteínas (SONENSHINE, 1991). A glicose pode ser estocada em forma de polissacarídeo e ser oxidada em ácido pirúvico, através da glicólise, para se obter ATP ou ser oxidada pela via da pentose-fosfato (NELSON; COX, 2008) (Figura 5).



Figura 5: Principais vias de utilização da glicose. (Fonte: Nelson; Cox, 2014)

Assim como a glicose, o ácido pirúvico pode seguir diversos caminhos de acordo com a necessidade metabólica. Pode, por exemplo, ser convertido à glicose e glicogênio ou oxidado para produzir acetil-CoA, tendo como objetivo a produção de energia. Também pode ser reduzido a ácido láctico através da fermentação láctica, reação que é catalisada pela enzima lactato desidrogenase (LDH) (TUNHOLI-ALVES et al., 2014).

No início da embriogênese se inicia o catabolismo de aminoácidos para obtenção de glicose, através da gliconeogênese. A enzima aspartato aminotransferase (AST) é responsável pela conversão do aminoácido aspartato em oxalacetato, um metabólito que será utilizado na gliconeogênese. Sendo assim, a AST tem sua atividade aumentada durante a embriogênese, quando a gliconeogênese se torna mais necessária (GUIZZO et al., 2012).

Segundo Donohue et al. (2008) entre as proteínas mais abundantes presentes na hemolinfa estão a proteína comum ou transportadora (CP) e a vitelogenina (Vg), importante no momento do desenvolvimento dos óvulos nas fêmeas (MAYA-MONTEIRO et al., 2000).

A composição de proteínas na hemolinfa de carrapatos não é bem conhecida, quando comparada a de insetos, sendo a vitelogenina (Vg) a mais estudada. A Vg é sintetizada pelo corpo gorduroso da fêmea após se alimentar de sangue (GUDERRA et al., 2002).

O conhecimento sobre as proteínas da hemolinfa do carrapato é muito escasso em relação a outros artrópodes, como os insetos, mesmo os carrapatos sendo de grande importância como vetores de doenças, (GUDDERRA et al., 2002).

2.3 Controle Químico de *Rhipicephalus microplus*

Para realizar o controle de infestações por ectoparasitas nos animais, se faz uso em sua maioria de produtos químicos. Dentre as classes de acaricidas mais utilizados em bovinos para o controle químico no Brasil estão organofosforados, piretróides, amidínicos, fenilpirazóis, lactonas macrocíclicas e benzoilfenilureias (ANDREOTTI, 2010).

Os organofosforados inibem uma enzima do sistema nervoso chamada acetilcolinesterase (AChE) acarretando o acúmulo de acetilcolina nas junções nervosas (sinapses), o que impede a interrupção da propagação do impulso elétrico e com isso o sistema nervoso é estimulado continuamente, resultando na morte do inseto (BRAGA et al., 2007).

Um dos problemas na utilização desta base química é sua toxicidade (RAMÍREZ et al., 2001). A intoxicação, tanto do animal quanto do aplicador, pode ocorrer uma vez que a enzima alvo (AChE) está presente em diversos animais, incluindo os mamíferos (FUKUTO, 1990). Sinais clínicos mais comuns de intoxicação são salivação, paralisia e rigidez dos músculos, problemas respiratórios e protração da língua (ABDULLAHI, 2004).

Na década de 1970, outra base química foi inserida no mercado de antiparasitários com o intuito de reduzir os casos de resistência aos produtos organofosforados, além de causar menor toxicidade. Vários estudos foram conduzidos para elucidar o mecanismo de ação dos amidínicos, imaginando-se que estivesse relacionado a efeitos tóxicos em receptores da octopamina (ABBAS et al., 2014; JONSSON et al., 2018). Este grupo que têm como principal representante o amitraz. Atua causando hiperexcitabilidade neuronal e morte do parasito, e tem sido amplamente utilizado para combate de *Rhipicephalus microplus* (ANDREOTTI, 2010; MENDONÇA, 2010).

Já os piretróides são utilizados principalmente pelo seu efeito repelente, e atuam como neurotoxinas do sistema neuroendócrino e sistema nervoso central. Mantém os canais de sódio abertos e estimulam as células nervosas a produzir descargas repetitivas, causando paralisia (PALCHICK, 1996). Com relação à toxicidade, com o advento do piretroide sintético, além da maior estabilidade e durabilidade, estes compostos passaram a ser menos tóxicos. Em estudo realizado por Soderlung et al. (2002), os piretroides foram classificados com toxicidade moderada para os mamíferos, além de não acumularem no tecido animal.

Dentro do grupo das lactonas macrocíclicas podemos encontrar, principalmente, quatro subgrupos no Brasil, são eles a ivermectina, abamectina, moxidectina e doramectina. Segundo o Sindan (2018), a abamectina e ivermectina são os mais encontrados nos ectoparasiticidas comerciais registrados e a via de aplicação mais comum é a injeção subcutânea. Atuam nos canais de cloreto-glutamato (Glu-Cl), a abertura desses canais causa

um lento e irreversível aumento na condutância da membrana, causando paralisia muscular e morte do parasito (TAYLOR, 2001).

Quando utilizados sob a forma subcutânea apresentam uma maior segurança ao aplicador, quando comparado à pulverização. No entanto, a contaminação ambiental também está presente nas lactonas macrocíclicas, uma vez que o animal tratado excreta resíduos do acaricida na urina e, principalmente, nas fezes (GONZÁLEZ-CANGA et al., 2009).

Os fenilpirazóis, representados pelo fipronil, bloqueiam a transmissão de sinais pelo GABA, um neurotransmissor inibitório, levando a hiperexcitabilidade do sistema nervoso do carrapato (BECKEL et al., 2006).

Já as benzoilfenilureias, as quais pertencem entre outros o fluazuron, lufenuron e diflubenzuron, são inibidores da formação de quitina e pertencem ao grupo de reguladores de crescimento de insetos (IGR). Apresentam ampla ação contra insetos, porém baixa eficácia contra ácaros e carrapatos, com exceção do fluazuron, que possui maior atividade contra estes últimos (COOP; WALL, 2014).

2.4 Reguladores de Crescimento de Insetos (IGR)

São utilizados em todo o mundo e constituem uma categoria que não mata diretamente o parasita, porém interfere no seu desenvolvimento. Sua atuação se dá principalmente em estágios imaturos do parasita, e com base em sua ação se classificam como inibidores de síntese de quitina, inibidores da quitina e análogos do hormônio juvenil (TAYLOR; COOP; WALL, 2014). São compostos seguros para utilização em mamíferos, pois estes não apresentam hormônios juvenis e estruturas de quitina, e tão pouco receptores para estas moléculas (BOWMAN, 2003).

A quitina é um aminopolissacarídeo que compõe a cutícula de insetos. A cada nova muda esta deve ser formada mais uma vez, e é neste processo onde atuam as benzoilfenilureias. Elas inibem a síntese de quitina, quando estágios imaturos entram em contato com os compostos são incapazes de completar a ecdise adequadamente, morrendo durante o processo (GRAF, 1993; TAYLOR, 2001).

Além de agirem sobre o desenvolvimento de larvas e mudas, podem interferir nos parâmetros reprodutivos, tais como a postura. O desenvolvimento dos ovos prossegue, porém a larva recém-desenvolvida não é capaz de eclodir (GRAF et al., 2004). É recomendado que seu uso seja feito em associação, uma vez que necessita de tempo para realizar controle eficaz (TAYLOR, 2001).

2.4.1 Fluazuron

Os mecanismos pelos quais as benzoilfenilureias atuam, grupo o qual pertence o fluazuron, têm sido alvo de estudos, sendo levantadas questões sobre o envolvimento destes compostos com a síntese de quitina (COHEN, 2001). Por interferir no processo de síntese da

quitina, substância que possibilita o endurecimento da cutícula dos carrapatos, o composto impede que realizem as mudas e cresçam dando continuidade ao seu desenvolvimento (FURLONG, 2007).

Durante a muda nos artrópodes esses compostos modulam a expressão de hormônios de desenvolvimento, bloqueando a formação cutânea, incluindo a síntese de quitina, possivelmente pela inibição da conversão da glicose em frutose-6-fosfato, no início da síntese (PALLI-RETNAKARAN, 1999).

O fluazuron é um representante atípico dentro desta classe dos reguladores de crescimento, pois apresenta maior eficácia contra ácaros e carrapatos e menor eficácia contra insetos (GRAF, 1993). Foi o primeiro regulador de crescimento de ácaros a ser registrado para o controle de carrapatos ixodídeos (BULL et al., 1996).

Possui especificidade muito estreita que inibe a formação de quitina possivelmente através da inibição de enzimas específicas envolvidas no processo de muda (KEMP et al., 1990). O mesmo é bastante utilizado para controle do carrapato do boi, *R. microplus*, agindo principalmente sobre larvas e ninfas (MACIEL et al., 2016).

Fêmeas em contato com o fluazuron apresentam dificuldade de ingurgitamento e seus ovos não originam larvas viáveis. Ele não atua no sistema nervoso do parasito, ele interrompe o ciclo das formas interferindo na formação da cutícula durante o ingurgitamento e muda. Age principalmente por ingestão, mas em algumas espécies ele suprime a fecundidade e exibe toxicidade ovicida e de contato (GHANIM, 2011).

Diversos estudos com relação à eficácia e resistência de *R. microplus* aos acaricidas vêm sendo conduzidos no país. Artigos científicos foram analisados e estratificados por estados quanto à presença de resistência no Brasil e demonstraram que já foi relatada em 15 estados brasileiros a pelo menos uma das bases químicas usadas para controle de infestações (HIGA, et al., 2015).

Dentro dessa realidade no panorama nacional e internacional do controle químico, ficam evidenciadas a importância e a necessidade de estratégias para otimizar o uso dos acaricidas a fim de burlar os mecanismos de resistência (ANDREOTTI et al., 2019).

3 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado no Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária (LQEPV), do Departamento de Parasitologia Animal (DPA), Instituto de Medicina Veterinária (IV). Todas as dependências localizadas na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), município de Seropédica – RJ.

A colônia utilizada para este experimento faz parte do projeto aprovado pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (CEUA-UFRRJ) sob a numeração 092/2014.

3.1 Procedência das Fêmeas Ingurgitadas

As fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* foram coletadas do chão das baias dos bovinos infestados artificialmente e mantidos estabulados com alimentação de volumoso e concentrado, e água *ad libitum*.

Após serem recolhidas do piso, as fêmeas ingurgitadas foram higienizadas em água corrente, secas com papel toalha, pesadas, identificadas e acondicionadas em placas de Petri com temperatura e umidade controladas.

Foram formados dois grupos, cada um contendo 60 carrapatos (peso médio estabelecido de 250mg por carrapato), sendo um grupo controle (apenas o diluente) e um grupo tratado (Fluazuron). Foram feitas seis repetições de cada grupo para a realização das análises estatísticas e para as avaliações bioquímicas. Para as quantificações celulares foram utilizadas 10 fêmeas por repetição de cada grupo.

3.2 Obtenção da Formulação de Fluazuron

Uma solução com 1.000 ppm de Fluazuron foi obtida a partir de diluição mãe a 5%, ou seja, apresentava 50.000 µg/mL (50.000 ppm). Para obter a solução foram utilizados Fluazuron 05%, DMSO 40%, acetona 12,5%, Triton 02% e N-metil como diluentes.

Diluyente sem acaricida e com água destilada foi utilizado como controle no teste.

3.3 Exposição das Fêmeas Ingurgitadas ao Fluazuron 1.000 ppm

A imersão das fêmeas ingurgitadas seguiu o Guia de Manejo Integrado e Controle de Pragas em Ruminantes, preconizado pela FAO (2004), com as fêmeas ingurgitadas mantidas

imersas em contato com a solução por um minuto. Após esse tempo elas foram secas em papel toalha e acondicionadas em temperatura e umidade adequadas (27° C, 80% de umidade).

3.4 Coleta de Hemolinfa

A hemolinfa foi coletada através de uma perfuração da cutícula na parte dorsal do carrapato com agulha de 0,3mm de diâmetro, seguida de uma leve pressão exercida sobre o carrapato facilitando a drenagem desta. Após a perfuração, com auxílio de um tubo capilar de vidro (CTech Glass[®]) de 0,3mm de diâmetro acoplado a uma borracha flexível (ANGELO et al., 2010), a hemolinfa foi depositada em microtubo, que permaneceu acondicionado em gelo durante toda a coleta.

Para as avaliações bioquímicas a hemolinfa foi coletada junto à 30µl de coquetel inibidor de proteases (Inhibit[®] Sigma-Aldrich) e dosada sem a parte celular. Já as avaliações celulares foram feitas com hemolinfa fresca recém coletada. Os intervalos de coleta para avaliação bioquímica e celular foram de 24 horas e 48 horas após a imersão, para ambos os grupos (controle e tratado).

3.4.1 Contagem total de hemócitos

A contagem total de hemócitos (CTH) foi realizada com hemolinfa fresca recém coletada, com auxílio de Câmara de Neubauer e microscópio óptico (Figura 6).

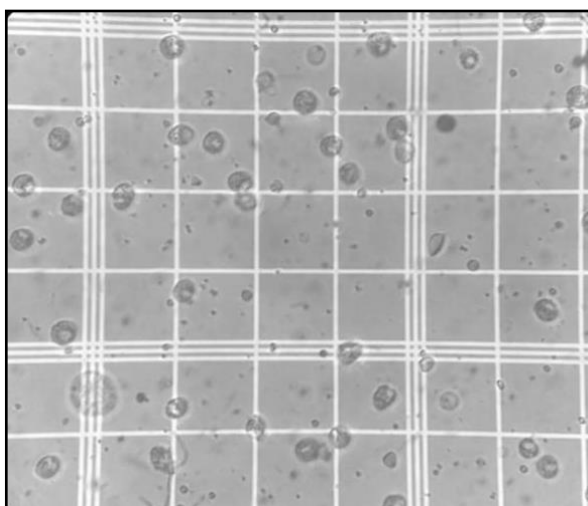


Figura 6: Hemócitos de hemolinfa fresca para contagem em Câmara de Neubauer. Aumento de 400x. (Fonte: LQEPV, 2018)

3.4.2 Contagem diferencial de hemócitos

Para a identificação dos hemócitos, uma gota de hemolinfa foi colocada diretamente em lâmina de vidro e a partir desta foi confeccionado um esfregaço. O mesmo foi seco ao ar, fixado em metanol por um minuto e depois corado em solução de Giemsa (diluição 9:1) por aproximadamente 15 minutos. Depois de corado o material foi lavado em água destilada para retirar o excesso de corante e as lâminas foram depositadas em estante para secagem natural.

A contagem diferencial de hemócitos (CDH) foi feita com base na morfologia em microscópio óptico através da identificação das 100 primeiras células encontradas no esfregaço corado (SILVA, 2006).

3.4.3 Avaliação do metabolismo energético

Para as avaliações bioquímicas foi utilizado analisador bioquímico automatizado (A-15 Biosystems®) com kits de mesma marca do equipamento. Foram realizadas dosagens de glicose pelo método de glicose oxidase/peroxidase, proteína total pelo método biureto, atividade enzimática de AST pelo método de IFCC sem piridoxal fosfato e de LDH pelo método piruvato.

3.5 Análise Estatística

Foi utilizado para as análises estatísticas o programa Bioestat 5.0. Os dados foram testados quanto a sua normalidade (Shapiro-Wilk) e posteriormente foi realizado o Teste t.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análises Bioquímicas

Para as análises do metabolismo energético foram dosadas a glicose, proteínas totais (PT) e avaliadas as atividades das enzimas aspartato aminotransferase (AST) e lactato desidrogenase (LDH).

Em relação às dosagens da concentração de glicose houve redução significativa ao longo dos tempos de análise, tanto no grupo controle quanto no grupo fluazuron (Tabela 01).

Tabela 1. Valores médios de Glicose da hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* nos tempos de 24 e 48 horas após o teste de imersão dos grupos controle e tratado com Fluazuron.

GRUPOS	GLICOSE (mg/dL)	
	24 horas	48 horas
Controle	58,0 ^{aC}	42,0 ^{aD}
Fluazuron	55,3 ^{aC}	40,8 ^{aD}

Letras minúsculas referem-se à comparação nas colunas entre os tratamentos dentro de cada tempo de avaliação (a e b). Letras maiúsculas referem-se à análise entre as linhas do mesmo grupo de cada parâmetro avaliado (C e D); Letras diferentes representam diferença significativa segundo o Teste t ($p < 0,05$).

No grupo controle no tempo de 24 horas apresentou média de 58,0mg/dL, e foi reduzida a 42,0mg/dL na análise de 48 horas. As dosagens do grupo fluazuron foram de 55,3mg/dL e 40,8mg/dL nas análises de 24 e 48 horas, respectivamente.

Moraes et al. (2007) demonstraram, em *R. microplus*, alterações no metabolismo da glicose no período de embriogênese. Os autores relataram redução significativa no conteúdo de glicogênio nos estágios iniciais do desenvolvimento embrionário em resposta ao aumento da celularização.

Os carboidratos são a principal fonte de energia utilizada na segmentação do embrião na ausência de nutrientes exógenos (CAMPOS et al., 2006). Na primeira fase da embriogênese as reservas maternas estocadas, principalmente o glicogênio, são a principal fonte energética (MORAES et al, 2007).

Sendo assim, a queda na concentração de glicose em ambos os grupos (controle e tratado) se justifica pelo fato do embrião de *R. microplus* utilizar a glicose materna para a obtenção de energia durante a fase inicial da embriogênese.

O mesmo ocorreu nas avaliações de PT (Tabela 2). O grupo controle demonstrou queda nos valores ao longo do tempo de análise, de 5,5g/L (24 horas) para 4,6g/L (48 horas).

No tempo de 24 horas do grupo fluazuron foi obtido o valor de 5,2g/L de PT, demonstrando queda para 4,4g/L na análise de 48 horas.

Tabela 2. Valores médios de Proteína Total (PT) da hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* nos tempos de 24 e 48 horas após o teste de imersão dos grupos controle e tratado com Fluazuron

GRUPOS	PT (g/L)	
	24 horas	48 horas
Controle	5,5 ^{aC}	4,6 ^{aD}
Fluazuron	5,2 ^{aC}	4,4 ^{aD}

Letras minúsculas referem-se à comparação nas colunas entre os tratamentos dentro de cada tempo de avaliação (a e b). Letras maiúsculas referem-se à análise entre as linhas do mesmo grupo de cada parâmetro avaliado (C e D); Letras diferentes representam diferença significativa segundo o Teste t ($p < 0,05$).

A redução de proteínas totais em ambos os grupos possivelmente é fisiológica, devido ao período de pré-postura e consumo de proteína para a formação e maturação dos ovos (SEIXAS et al., 2010).

No presente estudo a atividade enzimática da LDH não mostrou alteração significativa nos grupos expostos ao fluazuron comparado ao grupo controle nos dois tempos de análise.

Houve queda da atividade de LDH tanto no controle (de 289,5U/L para 143,8U/L) quanto no grupo tratado (de 298,8U/L para 155,7U/L) quando comparadas as análises de 24 e 48 horas, respectivamente (Tabela 03).

Tabela 3. Valores médios de Lactato Desidrogenase (LDH) da hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* nos tempos de 24 e 48 horas após o teste de imersão dos grupos controle e tratado com Fluazuron

GRUPOS	LDH (U/L)	
	24 horas	48 horas
Controle	289,5 ^{aC}	143,8 ^{aD}
Fluazuron	298,8 ^{aC}	155,7 ^{aD}

Letras minúsculas referem-se à comparação nas colunas entre os tratamentos dentro de cada tempo de avaliação (a e b). Letras maiúsculas referem-se à análise entre as linhas do mesmo grupo de cada parâmetro avaliado (C e D); Letras diferentes representam diferença significativa segundo o Teste t ($p < 0,05$).

Baixa atividade de LDH pode indicar uma diminuição no metabolismo energético através das vias oxidativas e conseqüentemente permitir a adaptação ao metabolismo anaeróbico como medida compensatória para superar o estresse metabólico (NATH, 2000).

Em relação à atividade da enzima AST não houve alterações significativas nos valores obtidos neste estudo (Tabela 4). Nas análises de 24 horas apresentaram valores de 131,5U/L (controle) e 118,2U/L (tratado), e nas análises de 48 horas 136,8U/L (controle) e 102,7U/L (tratado).

Tabela 4. Valores médios de Aspartato Aminotransferase (AST) da hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* nos tempos de 24 e 48 horas após o teste de imersão dos grupos controle e tratado com Fluazuron

GRUPOS	AST (U/L)	
	24 horas	48 horas
Controle	131,5 ^{aC}	136,8 ^{aC}
Fluazuron	118,2 ^{aC}	102,7 ^{aC}

Letras minúsculas referem-se à comparação nas colunas entre os tratamentos dentro de cada tempo de avaliação (a e b). Letras maiúsculas referem-se à análise entre as linhas do mesmo grupo de cada parâmetro avaliado (C e D); Letras diferentes representam diferença significativa segundo o Teste t ($p < 0,05$).

A não alteração da atividade de AST pode ser explicada pelo tempo em que ocorreram as coletas e avaliações, podendo este não ser suficiente para demonstrar mudanças significativas. O aumento da atividade de AST é consequência do processo de gliconeogênese durante o catabolismo de aminoácidos, que se acentua no decorrer da embriogênese (GUIZZO et al., 2012).

Gaudêncio (2016) também não observou diferença estatística significativa na avaliação dos níveis de AST na hemolinfa de *R. microplus* durante sua avaliação dos efeitos do fluazuron em fêmeas oriundas de bovinos tratados com o ativo, corroborando com os dados aqui observados.

Os dados detalhados estão demonstrados nas tabelas presentes no Anexo B.

4.2 Quantificação Celular

Nas avaliações celulares foram feitas contagens do número total de hemócitos e contagem diferencial dos tipos celulares encontrados em esfregaço corado (Figura 6).

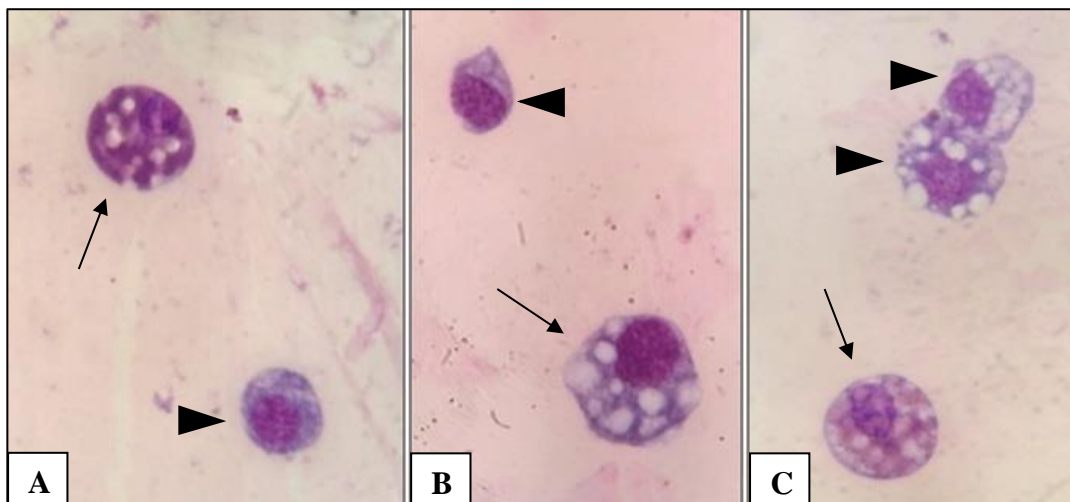


Figura 7: Hemócitos em esfregaço corado por Giemsa. A – Granulócito (seta) e Plasmatócito (cabeça de seta); B – Esferulócito (seta) e Pró-hemócito (cabeça de seta); C – Granulócito (seta) e Esferulócitos (cabeça de seta). Aumento de 1.000x (Fonte: LQEPV, 2018).

4.2.1 Contagem total de hemócitos

Tanto no tempo de 24 horas ($4,86 \times 10^3/\mu\text{l}$) quanto no tempo de 48 horas ($2,03 \times 10^3/\mu\text{l}$) o fluazuron causou redução do número total de hemócitos em relação à contagem do controle, $8,75 \times 10^3/\mu\text{l}$ e $3,49 \times 10^3/\mu\text{l}$, respectivamente (Tabela 5).

Tabela 5. Contagem total de hemócitos da hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* nos tempos de 24 e 48 horas após o teste de imersão dos grupos controle e fluazuron.

GRUPOS	CONTAGEM TOTAL DE HEMÓCITOS ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	
	24 horas	48 horas
Controle	8,75 ^{aC}	3,49 ^{aD}
Fluazuron	4,86 ^{bC}	2,03 ^{bD}

Letras minúsculas referem-se à comparação nas colunas entre os tratamentos dentro de cada tempo de avaliação (a e b). Letras maiúsculas referem-se à análise entre as linhas do mesmo grupo de cada parâmetro avaliado (C e D); Letras diferentes representam diferença significativa segundo o Teste t ($p < 0,05$).

A redução da contagem total de hemócitos deste estudo revela a capacidade do fluazuron de imunossuprimir a resposta celular destes artrópodes. A queda nas contagens do grupo tratado foi progressiva também ao longo do tempo e se acentuou de 24 para 48 horas de avaliação ($4,86 \times 10^3/\mu\text{l}$ e $2,03 \times 10^3/\mu\text{l}$, respectivamente).

Feitosa et al. (2015) observou, no quinto dia pós infecção, queda da contagem total de hemócitos em *Rhipicephalus sanguineus* desafiados com *Leishmania infantum*. Freitas et al. (2015) ao quantificar os hemócitos de fêmeas de *R. microplus* expostas a *Beauveria bassiana*, constatou significativa redução das contagens totais do grupo inoculado com a solução fúngica em relação ao grupo controle.

4.2.2 Contagem diferencial de hemócitos

Em relação à quantificação diferencial de hemócitos no presente estudo, quatro tipos celulares foram encontrados, são eles os pró-hemócitos, plasmatócitos, granulócitos e esferulócitos. Carneiro e Daemon (1997) caracterizaram os tipos celulares encontrados na hemolinfa de *R. sanguineus* em diferentes fases nutricionais e descreveram a presença de pró-hemócitos, plasmatócitos, granulócitos, esferulócitos, adipohemócitos e oenocitóides.

Plasmatócitos e granulócitos são descritos como hemócitos responsáveis pela resposta fagocitária, nodulação e encapsulamento na presença de patógenos (Pereira et al. 2001).

A diminuição nas contagens de granulócitos no grupo tratado, de 75% para 61% em 24 horas e de 64% para 46% em 48 horas (Tabela 6), e a não alteração nas contagens de plasmatócitos, 04% nos dois grupos em 24 horas e 04% e 05% no controle e tratado, respectivamente, na análise de 48 horas (Tabela 7), neste estudo, diferem das respostas celulares apresentadas em estudos com agentes patogênicos, como revela o estudo de SILVA, et al. (2006), demonstrando que o estímulo gerado a partir do teste de imersão com o fluazuron não acentuou a resposta destas linhagens celulares.

Tabela 6. Quantificação média de granulócitos presentes na hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* nos tempos de 24 e 48 horas após o teste de imersão dos grupos controle e Fluazuron.

GRUPOS	GRANULÓCITOS (%)	
	24 horas	48 horas
Controle	75 ^{aC}	64 ^{aC}
Fluazuron	61 ^{bC}	46 ^{bD}

Letras minúsculas referem-se à comparação nas colunas entre os tratamentos dentro de cada tempo de avaliação (a e b). Letras maiúsculas referem-se à análise entre as linhas do mesmo grupo de cada parâmetro avaliado (C e D); Letras diferentes representam diferença significativa segundo o Teste t ($p < 0,05$).

Tabela 7. Quantificação média de plasmatócitos presentes na hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* nos tempos de 24 e 48 horas após o teste de imersão dos grupos controle e Fluazuron.

GRUPOS	PLASMATÓCITOS (%)	
	24 horas	48 horas
Controle	04 ^{aC}	04 ^{aC}
Fluazuron	04 ^{aC}	05 ^{aC}

Letras minúsculas referem-se à comparação nas colunas entre os tratamentos dentro de cada tempo de avaliação (a e b). Letras maiúsculas referem-se à análise entre as linhas do mesmo grupo de cada parâmetro avaliado (C e D); Letras diferentes representam diferença significativa segundo o Teste t ($p < 0,05$).

SILVA, et al. (2006), em seu estudo de avaliação da resposta celular de fêmeas de *R. microplus* após a inoculação de *Metarhizium anisopliae* e *Penicillium* sp., descreveu aumento acentuado de granulócitos após 72 horas da inoculação fúngica e que não houve diferença significativa nas contagens de esferulócitos entre grupo tratado e controle.

Porém, no presente estudo o fluazuron estimulou a diferenciação de hemócitos do tipo esferulócitos, variando de 18% (controle) a 32% (tratado) nas análises de 24 horas, e 29% (controle) e 47% (tratado) em 48 horas (Tabela 8).

Tabela 8. Quantificação média de esferulócitos presentes na hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* nos tempos de 24 e 48 horas após o teste de imersão dos grupos controle e Fluazuron.

GRUPOS	ESFERULÓCITOS (%)	
	24 horas	48 horas
Controle	18 ^{aC}	29 ^{aC}
Fluazuron	32 ^{bC}	47 ^{bD}

Letras minúsculas referem-se à comparação nas colunas entre os tratamentos dentro de cada tempo de avaliação (a e b). Letras maiúsculas referem-se à análise entre as linhas do mesmo grupo de cada parâmetro avaliado (C e D); Letras diferentes representam diferença significativa segundo o Teste t ($p < 0,05$).

Este tipo celular não possui função específica descrita na literatura em relação à defesa celular (LANOT et al., 2001; LAVINE et al., 2002). Pode estar relacionado à renovação tecidual, produção de proteínas na hemolinfa e transporte de hormônios (NEGREIRO et al., 2004).

As contagens de pró-hemócitos não evidenciaram diferença estatística entre os grupos controle (04% e 03%) e fluazuron (03% e 02%) em 24 e 48 horas, respectivamente (Tabela 9).

Tabela 9. Quantificação média de pró-hemócitos presentes na hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* nos tempos de 24 e 48 horas após o teste de imersão dos grupos controle e Fluazuron.

GRUPOS	PRÓ-HEMÓCITOS (%)	
	24 horas	48 horas
Controle	04 ^{aC}	03 ^{aC}
Fluazuron	03 ^{aC}	02 ^{aC}

Letras minúsculas referem-se à comparação nas colunas entre os tratamentos dentro de cada tempo de avaliação (a e b). Letras maiúsculas referem-se à análise entre as linhas do mesmo grupo de cada parâmetro avaliado (C e D); Letras diferentes representam diferença significativa segundo o Teste t ($p < 0,05$).

Os pró-hemócitos, segundo Sonenshine (1991), são células das quais todos os outros tipos celulares se diferenciam. Os pró-hemócitos são pouco frequentes na hemolinfa dos artrópodes e representam menos de 5% da população total (MANACHINI et al., 2011).

Os dados detalhados estão demonstrados nas tabelas presentes no Anexo C.

5 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos neste trabalho é possível concluir que o fluazuron não foi capaz de causar alterações no metabolismo energético.

Já na contagem total de hemócitos causou redução significativa quando comparado ao grupo controle, em ambos os tempos de coleta.

Nas contagens diferenciais dois tipos celulares sofreram alterações ao longo do tempo de exposição, houve redução nas contagens de granulócitos e aumento nas contagens de esferulócitos.

O Fluazuron foi capaz de promover alterações na dinâmica de hemócitos destes carrapatos.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As avaliações bioquímicas empregadas neste estudo não mostraram alterações no metabolismo energético dos carrapatos influenciadas pelo fluazuron. Porém, como demonstrado em literatura, existem alterações causadas por reguladores de crescimento em marcadores do metabolismo energético dos carrapatos em diferentes condições. Isso mostra que é possível desvendar outras alterações na biologia do artrópode que podem levar a descobertas importantes em relação ao seu controle e desenvolvimento de resistência.

Foi possível evidenciar a capacidade do fluazuron em interferir na resposta celular dos carrapatos promovendo diminuição da quantidade total de hemócitos de forma progressiva nos tempos de avaliação.

Também foi possível evidenciar sua ação na resposta imune ao suprimir a diferenciação de hemócitos do tipo granulócitos e estimular a diferenciação de hemócitos do tipo esferulócitos nos períodos de 24 e 48 horas de avaliação após exposição pelo teste de imersão de teleóginas com fluazuron, abrindo caminho para novas descobertas a cerca da dinâmica hemocitária em carrapatos.

Os resultados deste trabalho mostram a importância do estudo e do conhecimento mais aprofundado acerca da biologia, metabolismo e resposta imune dos carrapatos, para que assim novos métodos de controle de infestações sejam desenvolvidos, evitando assim, consequentes prejuízos econômicos e em saúde.

7 REFERÊNCIAS

- ABBAS, R. Z.; ZAMAN, M. A.; COLWELL D. C.; GILLEARD J.; IQBAL Z. Acaricide resistance in cattle ticks and approaches to its management: The state of play. **Veterinary Parasitology**, v. 203, n. 1-2, jun. 2014. 6-20 p
- ABDULLAHI, U. S. Acute organophosphorus compound poisoning in cattle: a case report. **Nigerian Veterinary Journal**, v. 25, n. 1, 2004. 49-52 p.
- ANDREOTTI, R.; GARCIA, M. V.; KOLLER, W. W. Carrapatos na cadeia produtiva de bovinos. Brasília, DF: **Embrapa**, 2019. 240 p.
- ANDREOTTI, R. Situação atual da resistência do carrapato-do-boi (*Rhipicephalus Boophilus*) microplus aos acaricidas no Brasil. – Dados eletrônicos. – Campo Grande, MS: **Embrapa Gado de Corte**, 2010. 36 p.; 21 cm. (Documentos / Embrapa Gado de Corte, ISSN 1983-974X; 180).
- ANGELO, I.C.; GÔLO, P.S.; CAMARGO, M.G.; KLUCK, G.E.G.; FOLLY, E; BITTENCOURT, V.R.E.P. Haemolymph protein and lipid profile of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infected by fungi. **Transboundary and Emerging Diseases**. v.57, n.1-2, p.79-83, 2010.
- ALVES-BRANCO, F. de P.; PINHEIRO, A. da C.; SAPPER, M. de F. M. Os programas estratégicos para o controle do carrapato dos bovinos. Bagé: **Embrapa Pecuária Sul**, 2001. 3p. (Embrapa Pecuária Sul. Comunicado técnico, 43).
- BHAGYALAKSHMI, A.; REDDY, P. S.; RAMAMURTHI, R. Subacute stress induced by sumithion on certain biochemical parameters in *Oziotelphusa senex senex*, the fresh-water rice field crab, *Toxicol. Lett.* 21, 127, 1984.
- BIEGELMEYER, P.; NIZOLIB, L. Q.; DA SILVAB, S. S.; DOS SANTOSB, T. R. B.; DIONELLOA, N. J. L.; GULIAS-GOMESC, C. C.; CARDOSO, F. F. Bovine Genetic Resistance Effects on Biological Traits of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Parasitology**. v.208, n.3-4, p.231–237, 2015.
- BLAGBURN, B. L.; DRYDEN, M. W. Biology, treatment, and control of flea and tick infestations. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, v. 39, n. 6, p. 1173-1200, 2009.
- BOWMAN, D. D. **Georgis' Parasitology For Veterinarians**. 8ªed. Editora Elsevier Science (Usa), 2003, 422p.
- BOWERS, W. S. Phytochemical resources for plant protection. **Recent Advances in the Chemistry of Insect Control**, v.1, p.272-292, 1985.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Portaria nº 48 de 12 de maio de 1997. **Diário Oficial da União**. Brasília, 12 de maio de 1997. Seção I, n.92, p. 10165-10169.

BROVINI, C. N.; FURLONG, J; CHAGAS, A. C. DE S. Influência dos Fatores Climáticos na Biologia e no Comportamento de Fêmeas Ingurgitadas de *Boophilus microplus* a Campo. **Bioscience Journal**, v.19, n.1, p.71-76, 2003.

BULL, M. S.; SWINDALE, S.; DOVEREND, D.; HESS, E. A. Suppression of *Boophilus Microplus* Populations With Fluazuron; An Acarine Growth Regulator. **Australian Veterinary Journal**. v.74, n.6, p.468-470, 1996.

CALLIGARIS, I. B.; OLIVEIRA, P. R. DE; ROMA, G. C.; BECHARA, G. H.; CARMAGOMATHIAS, M. I. Action of the Insect Growth Regulator Fluazuron, the Active Ingredient of the Acaricide acatakvr, in *Rhipicephalus sanguineus* Nymphs (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). **Microscopy Research And Technique**. v.76, n.1, p.1177-1185, 2013.

CARNEIRO, J. C.; COSTA, E. G. L.; VASCONCELOS, V. DE O.; OLIVEIRA, N. J. F. DE; DUARTE, E. R. Diagnóstico do controle e eficácia de acaricidas para o carrapato bovino no Semiárido do Norte de Minas Gerais. **Acta Scientiae Veterinariae**. v.43, n.1, p.1-10, 2015.

CARNEIRO, M. E., DAEMON, E. Influência de diferentes temperaturas sobre os tipos celulares presentes na hemolinfa de adultos de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (IXODOIDEA: Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, BR, v. 10, n. 1, p. 21-27, 2001.

CATTO, J. B.; ANDREOTTI, R.; KOLLER, W. W. Atualização sobre o controle estratégico do carrapato-do-boi. Campo Grande: Embrapa: CNPGC, 2010. 6 p. (**Embrapa-CNPGC. Comunicado técnico, 123**).

CID, Y. P.; MAGALHÃES, V. S.; SILVA, D. D.; LAMBERT, M. M.; SCOTT, F. B. Eficácia in vitro de lactonasmacrocíclicas sobre teleóginas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 32, supl. 1, p. 7-10, 2010.

COELHO, C. N.; CORREIA, T. R.; OLIVEIRA, G. F.; COUMENDOUROS, K.; TAVEIRA, M. T.; CALADO, S. B.; AVELAR, B. R de; NASCIMENTO, C. G.; SCOTT, F. B. Associação de Abamectina com Fluazuron no Controle do Carrapato *Rhipicephalus microplus* em Bovinos Naturalmente Infestados. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**. v.37, n.1, p.51-54, 2015.

CORRÊA, R. R.; LOPES, W. D. Z.; TEIXEIRA, W. F. P.; CRUZ, B. C.; GOMES, L. V. C.; FELIPPELLI, G.; MACIEL, W. G. M.; FÁVERO, F. C.; BUZZULINI, C.; BICHUETTE, M. A. B.; SOARES, V. E.; COSTA, A. J. A. Comparison of three different methodologies for

evaluating *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* susceptibility to topical spray compounds. **Veterinary Parasitology**. v.207, n.1-2, p.115-124, 2015.

COURE, U.; SOLARI, M. A.; TRELLES, A. Current Status of Resistance and First Diagnostic of Multiple Resistance *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* Tick Simultaneously Resistant to Five Drugs In Uruguay. **Veterinária**. v.53, n.205, p.13-19, 2017.

CRUZ, B. C. **Aspectos ecológicos, biológicos e de resistência de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) na região de Jaboticabal, São Paulo, Brasil**. Tese (doutorado) 146 p. Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2017.

CRUZ, B. C.; BUZZULINIA, C.; LOPES, W. D. Z.; MACIEL, W. G.; BICHUETTE, M. A.; FELIPPELLI, G.; TEIXEIRA, W. F. P.; SOARES, V. E.; GOMES, L. V. C.; PRANDO, L.; CAMPOS, G. P.; COSTA, A. J. Effects of Different Spray Formulations on the Reproductive parameters of Engorged *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* Females Detached From Experimentally Infested Cattle. **Preventive Veterinary Medicine**. v.122, n.1-2, p.70-75, 2015.

DAHER, D. H.; BERTOLUCCI, A. V.; LOPES, E.; GUIMARÃES, A. M.; ROCHA, C. M.B. M. Fatores Associados à Resistência do *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) no Sul de Minas Gerais. **Revista Verde**. v.7, n.1, p. 102 – 115, 2012.

DRUMMOND, R. O.; ERNST, S. E.; TREVINO, J. L.; GLADNEY, W. J.; GRAHAN, O. H. *Boophilus annulatus* and *B. microplus* Laboratory Tests of Insecticides. **Journal Of Economic Entomology**. v.66, n.1, p.130-133, 1973.

DUNLOP, J.A.; ALBERTI, G. **The affinities of mites and ticks: a review**. *J Zool Syst Evol Res* 2008, 46:1-18.

ESTRADA-PEÑA, A. Ticks as vectors: taxonomy, biology and ecology. **Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)**, v. 34, n. 1, p. 53- 65, 2015.

FIGUEIREDO, A. **Avaliação dos Efeitos de Princípios Fitoterápicos e Homeopáticos no Controle de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e Comparação de Técnicas para Estimativa de Eclosão de Larvas *in vitro***. 2017. 73f Dissertação (mestrado): Jaboticabal - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2017.

FIGUEIREDO, A.; NASCIMENTO, L. M.; LOPES, L. G.; GIGLIOTTI, R.; ALBUQUERQUE, R. D. D. G.; SANTOS, M. G.; FALCÃO, D. Q.; NOGUEIRA, J. A. P.; ROCHA, L.; CHAGAS, A. C. S. First Report of The Effect of *Ocotea Elegans* Essential Oil on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Parasitology**. v.252, n.1., p.131-136, 2018.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO), 2004. Resistance Management and Integrated Parasite Control in Ruminants – Guidelines, Module 1 – Ticks: Acaricide

Resistance: Diagnosis, Management and Prevention. **Food and Agriculture Organization, Animal Production And Health Division**, Rome, p. 25–77. 2014.

FORTES, E.; **Parasitologia Veterinária**. 4^a ed. Editora Icone. São Paulo, 2004.

FREITAS, M. G.; COSTA, H. M. A.; COSTA, J. O.; IIDE, P. **Entomologia e acarologia Médica e Veterinária**. 4 ed. Belo Horizonte, 1978. p.252

FUKUTO, T. R. Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. **Environmental Health Perspectives**, v. 87, 1990. 245-254 p.

FURLONG, J.; CHAGAS, A. C. S.; NASCIMENTO, C. B. Comportamento e ecologia de larvas do carrapato *Boophilus microplus* em pastagem de *Brachiariadecumbens*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 39, n. 4, p. 213- 217, 2002.

FURLONG, J.; MARTINS, J.R. de S.; PRATA, M.C. de A. Carrapato dos bovinos: controle estratégico nas diferentes regiões brasileiras. Juiz de Fora: **Embrapa Gado de Leite**, 2003. 6p. (Embrapa Gado de Leite. Comunicado Técnico, 36).

FURLONG, J.; MARTINS, J. R. Resistência dos carrapatos aos carrapaticidas. Juiz de Fora, MG: **Embrapa Gado de Leite**, 2000, 25p (Embrapa Gado de Leite. Circular Técnica, 59).

GASSEL, M.; WOLF, C.; NOACK, S.; WILLIAMS, H.; ILG, T. The novel isoxazoline ectoparasiticide fluralaner: selective inhibition of arthropod γ -aminobutyric acid and l-glutamate-gated chloride channels and insecticidal/acaricidal activity. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 45, 111-124, 2014.

GAUDÊNCIO, F. N.; KLAFKE, G. M.; TUNHOLI-ALVES, V. M.; FERREIRA, T. P.; COELHO, C. N.; FONSECA, A. H. DA; ANGELO, I. DA C.; PINHEIRO, J. Activity of carboxylesterases, glutathione-S-transferase and monooxygenase on *Rhipicephalus microplus* exposed to fluzaron. **Parasitology International**. v. 66, n.5, p. 584-587, 2017.

GLORIA, M. A.; DAEMON, N.; FACCIN, J. L. H.; GRISSI, L. Influencia de Diferentes Temperaturas Sobre a Biologia da Fase não Parasitária de *Boophilus microplus* (Can. 1887) (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira De Parasitologia Veterinária**. v.2, n.2, p.85-91, 1993.

GOMES, A. **O carrapato do boi, Boophilus microplus: ciclo, biologia, epidemiologia, patogenia e controle**. In: KESSLER, R. H.; SHENK, M. A. M. (org). Carrapato, tristeza parasitária e tripanossomose dos bovinos. Campo Grande. EMBRAPA/CNPGC. p. 9-44, 1998.

GOMES, L. V. C; LOPES, W. D. Z.; CRUZ, B. C.; TEIXEIRA, W. F.; FELIPPELLI, G.; MACIEL, W. G.; BICHUETTE, M. A.; RUIVO, M. A.; COLLI, M. H. A.; CARVALHO, R. S.; MARTINEZ, A. C.; SOARES, V. E.; COSTA, A. J. da. Acaricidal Effects of Fluzaron (2.5 Mg/Kg) and a Combination of Fluzaron (1.6 Mg/Kg) + Ivermectin (0.63 Mg/Kg),

Administered at Different Routes, Against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* Parasitizing Cattle. **Experimental Parasitology**. v.153, n.1, p.22–28, 2015.

GOMES, L. V. C.; LOPES, W. D. Z.; TEIXEIRA, W. F. P.; MACIEL, W. G.; CAYEIRO CRUZ, B. C.; FELIPPELLI, G., BUZZULINI, C.; SOARES, V. E.; MELO, D. P. de; MURILBICHUETTE, M. A.; JUNIOR, G. G.; COSTA, A. J. da. Population Dynamics and Evaluation of The Partial Selective Treatment of Crossbreed Steers Naturally Infested with *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in a Herd From The State of Minas Gerais in Brazil. **Veterinary Parasitology**. v.220, n.1, p.72–76, 2016.

GONZÁLEZ-CANGA, A.; FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, N.; SAHAGÚN-PRIETO, A.; DIEZ-LIÉBANA, M. J.; SIERRA-VEJA, M.; GARCIA-VIEITEZ, J. A review of the pharmacological interactions of ivermectin in several animal species. **Current Drug Metabolism**, v. 10, 2009. 359-368 p.

GONZALES, J. C., SILVA, N. R., FRANCO, N. (1974) A vida livre do *Boophilus microplus*. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**. RG. 3: 21-28.

GRAF, J.F.; GOGOLEWSKI, R.; LEACH-BING, N.; SABATINI, G.A.; MOLENTO, M.B.; BORDIN, E.L.; ARANTES, G.J. Tick Control: An Industry Point of View. **Parasitology**, v. 129, n.1, p.427-442, 2004.

GRAF J. F The Role Of Insect Growth Regulators In Arthropod Control. **Parasitology Today**. v.9, n.12, p.12, 1993.

GRISI L.; LEITE R. C.; MARTINS, J. R. de S.; BARROSA, A. T. M. de B.; ANDREOTTI, R.; CANÇADO, P. H. D.; LEÓN. A. A. P. de; PEREIRA, J. B., VILLELA, H. S. Reassessment of the Potential Economic Impact of Cattle Parasites in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v.23, n.2, p.150-156, 2014.

GRISI, L.; MASSARD, C. L.; MOYA BORJA, G. E.; PEREIRA, J. B. Impacto Econômico das Principais Ectoparasitoses em Bovinos no Brasil. **Hora Veterinária**, v.21, n.125, p.8- 10, 2002.

GUERRERO, F. D.; LOVIS, L.; MARTINS, J. R. Acaricide resistance mechanisms in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21, p. 1-6, 2012.

GUGLIELMONE, A. A.; ROBBINS, R. G.; APANASKEVICH, D. A.; PETNEY, T. N.; ESTRADA-PEÑA, A.; HORAK, I. G. The hard ticks of the world (Acari: Ixodida: Ixodidae). New York: **Springer Science & Business Media**, 2013. p. 1-7.

GUIMARÃES, J. H.; TUCCI, E. C.; BARROS-BATTESTI, D.M. **Ectoparasitos De Importância Veterinária**. São Paulo. Editora PLÊIADE/FAPESP. 1ªed. 2001. p.218.

HIGA, L. O. S.; GARCIA, M. V.; BARROS, J. C.; KOLLER, W. W.; ANDREOTTI, R. Acaricide resistance status of the *Rhipicephalus microplus* in Brazil: a literature overview. **Medicine Chemistry**, v. 5, 2015. 326-333 p.

HOLDSWORTH P. A.; KEMP, D.; GREEN, P.; PETER, R. J.; BRUIN, C. de; JONSSON, N. N.; LETONJA, T.; REHBEIN, S.; VERCRUYSSSE, J. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) Guidelines for Evaluating the Efficacy of Acaricides Against Ticks (Ixodidae) on Ruminants. **Veterinary Parasitology**.v.136, n.1, p.29–43, 2006.

HORAK, I. G.; CAMICAS, J. L.; KEIRANS, J. E. The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida): a world list of valid tick names. **Experimental and Applied Acarology**, v. 28, p. 27-54, 2002.

JONGEJAN, F.; UILENBERG, G. The global importance of ticks. **Parasitology**, Cambridge,v. 129, p. 3-14, 2004.

JONSSON, N. N.; KLAFKE, G.; CORLEY, S. W.; TIDWELL, J.; BERRY, C. M.; KOHTAN, H. H. C. Molecular biology of amitraz resistance in cattle ticks of the genus *Rhipicephalus*. **Frontiers in Bioscience**, v. 23, n. 2, 2018. 796-810 p.

JONSSON, N.N.; MILLER, R.J.; ROBERTSON, J.L. Critical evaluation of the modified-adult immersion test with discriminating dose bioassay for *Boophilus microplus* using American and Australian isolates. **Veterinary Parasitology**, v. 146, p. 307–315, 2007.

KLAFKE, G.; WEBSTER, A.; DALL AGNOL, B.; PRADEL, E.; SILVA, J.; LA CANAL, L. H. de; BECKER, M.; OSÓRIO, M. F.; MANSSON, M.; BARRETO, R.; SCHEFFER, R.; SOUZA, U. A.; CORASSINI, V. B.; SANTOS, J. dos; RECK, J.; MARTINS, J. R. Multiple Resistance to Acaricides in Field Populations of *Rhipicephalus microplus* From Rio Grande do Sul State, Southern Brazil. **Ticks And Tick-Borne Diseases**. v. 8, n.2-4, p.73–80, 2017.

KROBER, T.; GUERIN, P. M. An *in vitro* Feeding Assay to Test Acaricides for Control of Hard Ticks. *Pest Management Science*. v. 63, n.1, p.17–22, 2007.

LANOT, R.; ZACHARY, D.; HOLDER, F.; MEISTER, M. Postembryonic hematopoiesis in *Drosophila*. **DevBiol** 230: 243-257, 2001.

LAVINE, M.D.; STRAND, M.R. Insect hemocytes and their role in immunity. **Insect Biochem. Mol. Biol.** 2002; 32:1295–1309.

LEAL, A.T.; FREITAS, D. R. J.; VAZ JUNIOR, I.S. Perspectivas para o controle do carrapato bovino. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 31, n. 1, p. 1-11, 2003.

LE GALL, V. L. **Bases Moleculares da Resistência a Ivermectina em *Rhipicephalus microplus***. 2016. 113f. Dissertação (Mestrado): São Paulo. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo Departamento de Genética e Biologia, 2016.

LING, E.; YU, X.Q. Cellular encapsulation and melanization are enhanced by immunectins, pattern recognition receptors from the tobacco hornworm *Manduca sexta*. **Dev. Comp. Immunol.** 2006; 30:289–299.

MACHADO, F. A.; PIVOTO, F. L.; FERREIRA, M. S. T. F.; GREGORIO, F. de V.; VOGEL, F. S. F.; L. A. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in the Western-Central Region of Rio Grande do Sul, Brazil: Multiresistant Tick. **Revista Brasileira de Parasitologia**, v. 23, n. 3, p.337-342, 2014.

MACIEL, W. G.; LOPES, W. D. Z.; GOMES, L. V. C.; CRUZ, B. C.; FELIPPELLI, G.; SANTOS, I. B. dos; A, BORGES, F. de A.; JUNIORD, W. A. C. A.; SCARPA, A. B.; NICARETTA, J. E.; BASTOSB, T. S. A.; COSTA, A. J. da. Susceptibility of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* to Fluazuron(2.5 Mg/Kg) and a Combination of Novaluron(2.0 mg/Kg) + Eprinomectin (0.36 mg/Kg) in Field Studies in Brazil. **Preventive Veterinary Medicine.** v.135, n.1, p.74–86, 2016.

MARTINS, J. R. S. **Carrapato *Boophilus microplus* (Can. 1887) (Acari: Ixodidae) resistente a ivermectina, moxidectina e doramectina**. Rio Grande do Sul, Brasil. 2006. 74 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Medicina Veterinária Preventiva e Epidemiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2006.

MELO, R. M. P. dos S. **Morfologia e Biologia de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille) (Acari: Ixodidae) submetido ao Regulador de Crescimento de Artrópodes Fluazuron**. 2007. 43f. Dissertação (mestrado). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Veterinária, Seropédica, 2007.

MENDONÇA, R. P de. **Atividade Endectocida, Segurança Clínica e Farmacocinética de Resíduos de Uma Nova Alternativa Terapêutica (Fluazuron + Abamectina) em Bovinos**. 2010, 167f. TESE (Doutorado): Jaboticabal. Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2010.

MONTEIRO, S.V. **Parasitologia na Medicina Veterinária**. São Paulo. Editora Roca. 1ªed. 2010. p.368

MOORTHY, K. S.; NAIDU, M. D.; CHETTY, C. S.; SWAMI, K. S. Changes in carbohydrate metabolism in tissues of fresh water mussel (*Lamellidens marginalis*) exposed to phosphamidon, Bull. Environ. Contam. Toxicol. 30, 219, 1983.

MORAES, J. ; GALINA, A. ; ALVARENGA, P. H. ; REZENDE, G. L. ; MASUDA, A. ; VAZ JR, I. S. ; LOGULLO, C. . Glucose metabolism during embryogenesis of the hard tick

Boophilus microplus. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v.146(4), p. 528-533, 2007.

MURREL, A.; BARKER, S. C. Synonymy of *Boophilus* Curtice, 1891 with *Rhipicephalus* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae) **Systematic Parasitology**.v.56, n.3, p.169–172, 2003.

NAGAOSA, K.; OKADA, R.; NONAKA, S.; TAKEUCHI, K.; FUJITA, Y.; MIYASAKA, T.; MANAKA, J.; ANDO, I.; NAKANISHI, Y. Integrin β v-mediated phagocytosis of apoptotic cells in *Drosophila* embryos. **J. Biol. Chem.** 2011; 286:25770–25777.

NATH, B.S. Changes in carbohydrate metabolism in hemolymph and fat body of the silkworm, *Bombyx mori* L., exposed to organophosphorus insecticides. **Pestic Biochem Physiol** 68:127–137, 2000.

NAVA, S.; MANGOLD, A.J.; CANEVARI, J.; MOREL, N.; GUGLIELMONE, A.A. Strategic Treatments with Systemic Biocides to Control *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) in Northwestern Argentina. **Investigation Veterinária**, v.16, n.1, p.23-30, 2014.

NAVA, S.; VENZAL, J. M.; GONZÁLEZ-ACUÑA, D.; MARTINS, T. F.; GUGLIELMONE, A. A. **Ticks of the southern cone of America: diagnosis, distribution, and hosts with taxonomy, ecology and sanitary importance**. London, UK: Academic Press, Elsevier, 2017, 348 p.

NEGREIRO, M. C. C., ANDRADE, F. G., FALLEIROS, A. M. F. Sistema imunológico de defesa em insetos: Uma abordagem em lagartas da soja, *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae), resistentes ao AgMNPV. **Semina: Ciências Agrárias**. v.25(4), p. 293–308, 2004.

PALLI, S.R.; RETNAKARAN, A. Molecular and Biochemical Aspects of chitin Synthesis Inhibition. p. 85-98, 1999. In: JOLLES, P.; MUZZARELLI, R.A.A (Eds.), **Chitin and Chitinases**. BirkauserVerlag, Basel, 1999.

PEREIRA, A. A. **Aspectos Da Ecologia De *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acarina: Ixodidae) No Município De Franca, Nordeste De São Paulo– Jaboticabal**, 2008. 106 f. Tese (Doutorado) Jaboticabal. Universidade Estadual Paulista, Faculdade De Ciências Agrárias e Veterinárias, 2008.

PEREIRA, M. C.; LABRUNA, M. B.; SZABÓ, M. P. J.; KLAFKE, G. M. ***Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: Biologia, Controle e Resistência**. São Paulo. Editora MedVet Livros, 2008. 1ªed. p.169.

PINHEIRO, M. C.; SÁ-HUNGARO, I. J.; MARTINS, C. D.; RAIÁ, V. R.; FAMADAS, K. M. Capacidade de Sobrevivência do Embrião de *Rhipicephalus microplus* (Canestrini, 1887)

(Acari: Ixodidae) a Alterações Bruscas de Temperatura. **Archives of Veterinary Science**. v.19, n.1, p.17-23, 2014.

PIRES, A. V. **Bovinocultura de Corte**. Piracicaba: FEALQ, v. II, p.761 – 1510, 2010.

POUND, M. J.; OLIVER, J. H. Juvenile Hormone: Evidence of its Role in the Reproduction of Ticks. **Science**. v.206, n.4416, p.355–357, 1979.

RAMÍREZ, J.; LACASA, M. Plaguicidas: clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición. **Archivos de Prevención de Riesgos Laborales**, v. 4, n. 2, 2001. 67-75 p.

RECK, J.; KLAFKE, G. M.; WEBSTER, A.; DALL'AGNOL, B.; SCHEFFER, R.; SOUZA, U. A.; CORASSINI, V. B.; VARGAS, R.; SANTOS, J. S. dos; MARTINS, J. R. First Report of Fluazuron Resistance in *Rhipicephalus microplus*: a Field Tick Population Resistant to Six Classes of Acaricides. **Veterinary Parasitology**. v.201, n.1-2, p.128–136, 2014.

RESENDE, P. de L. C. **Controle do Carrapato *Rhipicephalus microplus* na América Latina: Antígenos e Ensaios Vacinais Analisados em Uma Revisão Sistemática**. 2016. 96f. Dissertação (Mestrado): Florianópolis. Universidade Federal De Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós Graduação em Agroecossistemas. 2016.

RIVERO, A. Nitric oxide: an antiparasitic molecule of invertebrates. **Trends Parasitology** v22, p.219–225, 2006.

ROCHA, C. N. C. da. **Eficácia da Associação de Abamectina com Fluazuron no Controle de *Rhipicephalus Microplus*, *Dermatobia Hominis* e Nematóides Gastrointestinais em Bovinos**. 2016.153f. Tese (Doutorado): Seropédica. Universidade Federal Rural Do Rio De Janeiro, Curso De Pós-Graduação Em Ciências Veterinárias, 2016.

RODRIGUES, D. S; LEITE, R. C. Impacto Econômico de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: Estimativa de Redução de Produção de Leite. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.65, n.5, p.1570-1572, 2013.

SANTAREM, V. A.; SATOR, I. F. The Free-Living Phase and Seasonal Variation of *Boophilus microplus* in Botucatu, São Paulo State, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v.24, n.1, p.11-20, 2003.

SANTOS, F. C. C. dos; VOGEL, F. S. F.; ROLL, V. F. B.; MONTEIRO, S. G. *In vitro* Effect of the Association of Citronella, Santa Maria Herb (*Chenopodium ambrosioides*) and Quassia Tincture on Cattle Tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Ciência Animal Brasileira**. v.14, n.1, p.113-119, 2013.

SEIXAS, A.; OLDIGES, D. P.; DA SILVA VAZ JR., I.; TERMIGNONI, C. Endocrinologia e Controle da Vitelogênese em Carrapatos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 38, n. 2, p.95-111, 2010.

SERRA-FREIRE, N. M. Ácaros (Carrapatos e outros). **In: Entomologia Médica e Veterinária**. MARCONDES, C. B. Editora Ateneu, 2º ed, 2011, 379-428.

SERRA-FREIRE, N. M.; MELLO, R. P. Entomologia & Acarologia na medicina veterinária. **LF Livros, Rio de Janeiro**, p. 200, 2006.

SHRESTHA, S.; KIM, Y.J. Various eicosanoids modulate the cellular and humoral immune responses of the beet armyworm, *Spodoptera exigua*. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 2009; 73:2077–2084.

SILVA, S.B., SAVASTANO, G., BITTENCOURT, V.R.E.P. Tipos celulares envolvidos na resposta imune de fêmeas de *Boophilus microplus* inoculados com *Metarhizium anisopliae* e *Penicillium sp.* **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.15, p. 128-131, 2006.

SINDAN – Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal. **Mercado Brasil 2017 e Anuário, 2018**. Disponível em: <http://www.sindan.org.br/mercado-brasil-2017/>. Acesso em: 26 out. 2018.

SODERLUNG, D. M.; CLARK, J. M.; SHEETS, L. P.; MULLIN, L. S.; PICCIRILLO, V. J.; SARGENT, D.; STEVENS, J. T.; WEINER, M. L. Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. **Toxicology**, v. 171, 2002. 3-59 p.

SONENSHINE, DANIEL E.; LANE, ROBERT S.; NICHOLSON, WILLIAM L. Ticks (Ixodida). **In: Medical and veterinary entomology**. 2002. p. 517-558.

SONENSHINE, D. E.; ROE, R. M. **Biology of Ticks**. Volume 1. 2ºed. Cidade. Editora Oxford University Press. 2014. p.540

SOUZA, A. P. DE; BELLATO, V.; SARTOR, A. A.; KOLLING, A. Comparação da Eficácia de Carrapaticidas em Testes a Campo Com o Tempo de Imersão “*in vitro*”. **Revista de Ciências Agroveterinárias**. v.3, n.2, p. 131-134, 2004.

STRAND, M. R. The insect cellular immune response. **Insect Science**. 2008; 15:1 – 14.

TAYLOR, M. A.; COOP, R. L.; WALL, R. L. **Parasitologia Veterinária**. Rio De Janeiro. 3ed. Editora Guanabara Koogan. 2014. p.902.

TAYLOR, M. A. Recent Developments in Ectoparasiticides. **The Veterinary Journal**, v.161, n.3, p.253-268, 2001

VIEIRA, V. P. da C. **Atividade do Fluazuron Administrado por Via Oral no Controle de Rhipicephalus sanguineus em Cães**. 2012. (56 f.). Tese (PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, [Seropédica-RJ].

VLISIDOU, I.; WOOD, W. Drosophila blood cells and their role in immune responses. **FEBS J.** 2015; 282:1368–1382.

WALL, R.; SHEARER, D. **Veterinary Ectoparasites: Pathology, Biology and Control.** Second edition. United Kingdom: Blackwell Science, 2001. p. 55-57, 65-66, 76, 181-185.

ZHAO, F.; STANLEY, D.; WANG, Y.; ZHU, F.; LEI, C.L. Eicosanoids mediate nodulation reactions to a mollicute bacterium in larvae of the blowfly, *Chrysomya megacephala*. **J. Insect Physiol.** 2009; 55:192–196.

8 ANEXOS

ANEXO A. Dados de análises bioquímicas de aspartato aminotransferase (AST), glicose, lactato desidrogenase (LDH) e proteínas totais (PT) na hemolinfa de teleóginas de *R. (Boophilus) microplus* após 24 horas e 48 horas de exposição ao Fluazuron.

	AST (24 horas)	
	Controle (U/L)	Fluazuron (U/L)
Repetição 01	142,0	86,0
Repetição 02	160,0	133,0
Repetição 03	129,0	164,0
Repetição 04	172,0	146,0
Repetição 05	106,0	104,0
Repetição 06	80,0	76,0
Média	131,5	118,2

	AST (48 horas)	
	Controle (U/L)	Fluazuron (U/L)
Repetição 01	128,0	114,0
Repetição 02	195,0	89,0
Repetição 03	109,0	114,0
Repetição 04	108,0	84,0
Repetição 05	119,0	73,0
Repetição 06	162,0	142,0
Média	136,8	102,7

	GLICOSE (24 horas)	
	Controle (mg/dL)	Fluazuron (mg/dL)
Repetição 01	65,0	51,0
Repetição 02	62,0	44,0
Repetição 03	64,0	66,0
Repetição 04	62,0	70,0
Repetição 05	52,0	56,0
Repetição 06	43,0	45,0
Média	58,0	55,3

GLICOSE (48 horas)		
	Controle (mg/dL)	Fluazuron (mg/dL)
Repetição 01	54,0	41,0
Repetição 02	43,0	43,0
Repetição 03	43,0	38,0
Repetição 04	34,0	47,0
Repetição 05	38,0	40,0
Repetição 06	40,0	36,0
Média	42,0	40,8

LDH (24 horas)		
	Controle (U/L)	Fluazuron (U/L)
Repetição 01	238,0	165,0
Repetição 02	259,0	191,0
Repetição 03	173,0	336,0
Repetição 04	264,0	204,0
Repetição 05	326,0	438,0
Repetição 06	477,0	459,0
Média	289,5	298,8

LDH (48 horas)		
	Controle (U/L)	Fluazuron (U/L)
Repetição 01	166,0	242,0
Repetição 02	135,0	139,0
Repetição 03	145,0	188,0
Repetição 04	163,0	95,0
Repetição 05	123,0	100,0
Repetição 06	131,0	170,0
Média	143,8	155,7

PT (24 horas)		
	Controle(g/L)	Fluazuron(g/L)
Repetição 01	5,8	5,3
Repetição 02	6,3	5,3
Repetição 03	5,8	5,2
Repetição 04	4,6	4,5
Repetição 05	5,1	6,0
Repetição 06	5,1	5,1
Média	5,5	5,2

	PT (48 horas)	
	Controle(g/L)	Fluazuron(g/L)
Repetição 01	5,6	5,8
Repetição 02	5,0	4,4
Repetição 03	4,1	3,9
Repetição 04	4,1	3,7
Repetição 05	3,9	3,5
Repetição 06	4,6	4,8
Média	4,6	4,4

ANEXO B. Dados de contagem total de hemócitos (CTH) e contagem diferencial de hemócitos (CDH) na hemolinfa de teleóginas de *R. (Boophilus) microplus* após 24 horas e 48 horas de exposição ao Fluazuron.

	CTH (24 horas)	
	Controle	Fluazuron
Repetição 01	163	72
Repetição 02	137	100
Repetição 03	188	106
Repetição 04	210	105
Repetição 05	169	102
Repetição 06	183	98
Média	175,0	97,2
Valor final*	8,75(x10³/µl)	4,86(x10³/µl)

*Valor corrigido por fórmula matemática segundo as instruções do fabricante após a contagem em Câmara de Neubauer.

	CTH (48 horas)	
	Controle	Fluazuron
Repetição 01	80	31
Repetição 02	59	40
Repetição 03	69	50
Repetição 04	65	34
Repetição 05	71	49
Repetição 06	74	39
Média	69,7	40,5
Valor final*	3,49 (x10³/µl)	2,03 (x10³/µl)

* Valor corrigido por fórmula matemática segundo as instruções do fabricante após a contagem em Câmara de Neubauer

	CDH - Prohemócitos (24 horas)	
	Controle (%)	Fluazuron (%)
Repetição 01	9	4
Repetição 02	5	4
Repetição 03	1	1
Repetição 04	4	4
Repetição 05	1	3
Repetição 06	1	2
Média	4	3

CDH - Prohemócitos (48 horas)		
	Controle (%)	Fluazuron (%)
Repetição 01	2	2
Repetição 02	3	2
Repetição 03	1	3
Repetição 04	2	2
Repetição 05	4	2
Repetição 06	3	2
Média	3	2

CDH - Granulócitos (24 horas)		
	Controle (%)	Fluazuron (%)
Repetição 01	62	62
Repetição 02	73	47
Repetição 03	79	69
Repetição 04	80	61
Repetição 05	76	68
Repetição 06	82	59
Média	75	61

CDH - Granulócitos (48 horas)		
	Controle (%)	Fluazuron (%)
Repetição 01	69	30
Repetição 02	63	46
Repetição 03	39	53
Repetição 04	68	48
Repetição 05	76	50
Repetição 06	70	50
Média	64	46

CDH - Plasmatócitos (24 horas)		
	Controle (%)	Fluazuron (%)
Repetição 01	6	3
Repetição 02	6	2
Repetição 03	2	4
Repetição 04	1	5
Repetição 05	5	3
Repetição 06	2	6
Média	4	4

CDH - Plasmatócitos (48 horas)		
	Controle (%)	Fluazuron (%)
Repetição 01	3	9
Repetição 02	6	4
Repetição 03	2	1
Repetição 04	4	4
Repetição 05	5	6
Repetição 06	6	4
Média	4	5

CDH - Esferulócitos (24 horas)		
	Controle (%)	Fluazuron (%)
Repetição 01	23	30
Repetição 02	16	47
Repetição 03	18	26
Repetição 04	15	30
Repetição 05	18	26
Repetição 06	15	32
Média	18	32

CDH – Esferulócitos(48 horas)		
	Controle (%)	Fluazuron (%)
Repetição 01	26	59
Repetição 02	28	48
Repetição 03	58	43
Repetição 04	26	46
Repetição 05	15	42
Repetição 06	21	44
Média	29	47