

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

**DISSERTAÇÃO**

**Caracterização Molecular e Toxicológica de  
*Ctenocephalides felis felis* Frente ao Fipronil**

**Guilherme Mota Maciel do Rêgo Barros**

**2025**



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

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E TOXICOLÓGICA DE *Ctenocephalides felis felis* FRENTE AO FIPRONIL**

**Guilherme Mota Maciel do Rêgo Barros**

*sob a orientação da Professora  
Thaís Ribeiro Correia Azevedo*

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 2025

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

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

B277c Barros, Guilherme Mota Maciel do Rêgo, 1995-  
Caracterização Molecular e Toxicológica de  
Ctenocephalides felis felis Frente ao Fipronil / Guilherme  
Mota Maciel do Rêgo Barros. - Seropédica RJ, 2025.

47 f.: il.

Orientadora: Thaís Ribeiro Correia Azevedo.

Dissertação(Mestrado). -- Universidade Federal Rural do  
Rio de Janeiro, Ciências Veterinárias, 2025.

1. Resistência parasitária. 2. Ectoparasitos. 3.  
Fenilpirazol. 4. Endossimbionte. I. Azevedo, Thaís Ribeiro  
Correia, 1978-, orient. II Universidade Federal Rural do  
Rio de Janeiro. Ciências Veterinárias III. Título.



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

ATA N° 524 / 2025 - PPGCV (12.28.01.00.00.00.50)

Nº do Protocolo: 23083.009626/2025-71 Seropédica-RJ, 26 de Fevereiro de 2025.  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

# **GUILHERME MOTA MACIEL DO RÊGO BARROS**

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

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 25/02/2025

(Assinado digitalmente em 27/02/2025 11:42 )  
TASSIA TORRES FURTADO  
TECNICO DE LABORATORIO AREA  
DeptPA (12.28.01.00.00.00.55)  
Matricula: ####667#2

*(Assinado digitalmente em 27/02/2025 09:28 )*  
THAIS RIBEIRO CORREIA AZEVEDO  
*PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR*  
*DeptPA (J2.28.01.00.00.00.55)*  
*Matrícula: ####298#9*

(Assinado digitalmente em 10/03/2025 16:38 )  
**ROVAINA LAUREANO DOYLE**  
ASSINANTE EXTERNO  
ROVAINA LAUREANO DOYLE

Visualize o documento original em  
<https://sipac.ufrrj.br/public/documentos/index.jsp> informando  
seu número: **524**, ano: **2025**, tipo: **ATA**, data de emissão:  
**26/02/2025** e o código de verificação: **ed3b0e0a27**

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus. A fé se tornou minha maior força para superar os desafios que surgiram ao longo desse caminho. Mesmo nos momentos em que me senti perdido, acreditar que tudo ficaria bem me trouxe a tranquilidade necessária para seguir em frente.

À minha família, minha mãe Simone e meus irmãos Felipe e Leonaldo, deixo aqui minha profunda gratidão. Ter uma família unida e forte foi meu maior alicerce e vocês foram meu bote salva-vidas em diversos momentos durante a realização deste mestrado.

Meu sincero agradecimento a Matheus, pelo companheirismo e pelo escapismo que me proporcionou durante esse segundo ano de mestrado.

A toda a equipe do Setor de Delineamento e Análises Farmacêuticas, que me auxiliou na parte toxicológica deste projeto, deixo meu agradecimento. Em especial, agradeço a Ingrid Lis, por sua imensa disposição e prontidão sempre que precisei de você. Também agradeço a equipe da colônia, a todos os colaboradores que auxiliaram na manutenção da mesma para que pudesse coletar pulgas viáveis.

Sou grato também a todos que contribuíram para a etapa molecular deste trabalho, desde minha vivência prática durante o período de residência até a realização do projeto. Obrigado Tássia Furtado, Huarrisson Azevedo, Patrícia Paulino e Bruno Telles. E, é claro, um agradecimento especial ao Prof. Douglas, quem me ajudou tanto nesse projeto, registro aqui minha gratidão e admiração!

À minha orientadora, Profª. Thaís Azevedo, sou grato pela confiança e pela oportunidade de desenvolver este projeto incrível.

A toda a equipe do LQEPV, meu muito obrigado. Durante o tempo que convivi com vocês, aprendi de tantas formas diferentes e enfrentei desafios que contribuíram enormemente para meu crescimento pessoal e profissional.

Um agradecimento especial aos meus amigos e colegas, pessoas que me inspiram e me ajudam a ser alguém melhor. Meu carinho e reconhecimento a Debora Borges, Isabelle Vilela, Anna Júlia Bessa, Ramon Bezerra, Gabriela Ferreira, Gabriela Almeida, Jéssica Lobato, Jéssica D'Ávila, Aline Pereira, Viviane Magalhães, Thaís Paes, Carlos Eduardo, Jéssica D'Ávila, Vinícius Monteiro, Breno Gava,

Ygor Silva, Monique, Fernando Monteiro, Marisa Beatriz, Fernanda Campos, Dandara Rosa, Clara Dutra e Ana Carolina Rojas.

Por fim, agradeço ao Prof. Fábio Scott que, em tão pouco tempo, conseguiu elevar o nível do LQEPV, liderando uma equipe tão diversificada e que constante cresce cada vez mais. Obrigado por todo suporte e confiança!

Foi uma honra fazer parte desse time.

Agradeço à UFRRJ e ao programa de Ciências Veterinárias

Um agradecimento especial pelo financiamento desta pesquisa à Fundação de Apoio à Pesquisa Científica e Tecnológica (FAPUR) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ).

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

## **BIOGRAFIA**

Guilherme Mota Maciel do Rêgo Barros, filho de Leonaldo Mário Maciel do Rêgo Barros e de Simone Mota Santos do Rêgo Barros, nasceu na cidade de Pesqueira, localizada no agreste, interior de Pernambuco. Cursou o ensino fundamental no Colégio e Curso Nossa Senhora das Graças (CENSG) e o ensino médio na Escola de Referência em Ensino Médio José de Almeida Maciel (EREMJAM), ambos colégios localizados em Pesqueira-PE. Em 2020, concluiu sua graduação em medicina veterinária na Universidade Federal Rural de Pernambuco – Unidade Acadêmica de Garanhuns, faculdade esta localizada na cidade de Garanhuns-PE. Durante sua graduação realizou projetos de iniciação científica e estágios relacionados à área de Parasitologia, sob a orientação do Prof. Dr. Rafael Antonio Nascimento Ramos. Após a graduação, foi residente em Diagnóstico em Parasitologia Animal na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), realizando a vivência no Laboratório em Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária (LQEPM), finalizando a residência em 2022. No mesmo ano, ingressou no mestrado pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV) da UFRRJ, sendo bolsista pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), sob a orientação da Prof. Dra. Thaís Ribeiro Correia Azevedo.

## RESUMO

BARROS, Guilherme Mota Macielo do Rêgo. **Caracterização molecular e toxicológica de *Ctenocephalides felis felis* frente ao Fipronil.** 2025. 47p. Dissertação (Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2025.

A pulga é um importante ectoparasita que pode causar enfermidades em animais domésticos. *Ctenocephalides felis felis* é a espécie mais comum nesses animais e o Fipronil, um fenilpirazol, atua nos canais de cloro ativados pelo GABA (ácido gama-aminobutírico), levando à morte da pulga por hiperexcitação. Diante da possibilidade de resistência ao Fipronil em *C. felis felis*, é necessário monitorar essa questão. Assim, o objetivo deste estudo foi caracterizar, por meio de bioensaios, a susceptibilidade de *C. felis felis* ao Fipronil em uma cepa laboratorial. Além disso, buscou-se detectar a possível presença de mutações no gene *Rdl* (*Resistance to Dieldrin*) na mesma cepa laboratorial e em uma cepa de campo. O estudo também investigou a presença de *Rickettsia felis*, uma bactéria de importância veterinária, cujo principal hospedeiro é *C. felis felis*. Para a cepa laboratorial, foram determinados os valores de concentração letal (CL) para *C. felis felis*, sendo a CL50 de 10,39 ppm e a CL90 de 23,71 ppm. Nas análises moleculares, verificou-se que 94,73% (36/38) das pulgas da cepa laboratorial apresentavam homozigose para a mutação de resistência no gene *Rdl*. Na cepa de campo, esse mesmo genótipo foi encontrado em 90,83% (109/120) das pulgas. Além disso, 5% (6/120) das pulgas da cepa de campo apresentaram heterozigose para a mutação, enquanto 4,16% (5/120) possuíam homozigose para alelos sem a mutação associada à resistência. A presença de DNA de *R. felis* foi detectada em 94,73% (36/38) das pulgas da cepa laboratorial e em 27,50% (33/120) das pulgas da cepa de campo. Em comparação com outros estudos toxicológicos, a colônia laboratorial foi caracterizada como suscetível ao Fipronil, apesar da predominância do genótipo de resistência para o gene *Rdl*. Na cepa de campo, também houve predomínio desse genótipo. Com base nesses resultados, conclui-se que a mutação no gene *Rdl*, isoladamente, não é suficiente para conferir resistência ao Fipronil em *C. felis felis*. Neste estudo, a presença de *R. felis* pode ter influenciado a susceptibilidade das pulgas ao inseticida. Além disso, verificou-se que essa mutação é predominante tanto em populações laboratoriais quanto em populações de campo.

**Palavras-chave:** Resistência parasitária; Ectoparasitos; Fenilpirazol; Endossimbionte.

## ABSTRACT

BARROS, Guilherme Mota Maciel do do Rêgo. **Molecular and Toxicological Characterization from *Ctenocephalides felis felis* to Fipronil.** 2025. 47p. Dissertation (Veterinary Science). Instituto de Veterinária. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2025.

The flea is an important ectoparasite that can cause diseases in domestic animals. *Ctenocephalides felis felis* is the most common species found in these animals, and Fipronil, a phenylpyrazole, acts on chloride channels activated by GABA (gamma-aminobutyric acid), leading to flea death through hyperexcitation. Given the potential for Fipronil resistance in *C. felis felis*, it is necessary to monitor this issue. Thus, the objective of this study was to characterize, through bioassays, the susceptibility of *C. felis felis* to Fipronil in a laboratory strain. Additionally, the study aimed to detect the possible presence of mutations in the *Rdl* (*Resistance to Dieldrin*) gene in both a laboratory strain and a field strain. Another objective was to investigate the presence of *Rickettsia felis*, an important bacterium for veterinary medicine, whose primary host is *C. felis felis*. For the laboratory strain, lethal concentration (LC) values were determined for *C. felis felis*, with LC<sub>50</sub> at 10.39 ppm and LC<sub>90</sub> at 23.71 ppm. Molecular analyses revealed that 94.73% (36/38) of the fleas from the laboratory strain were homozygous for the resistance mutation in the *Rdl* gene. In the field strain, the same genotype was found in 90.83% (109/120) of the fleas. Furthermore, 5% (6/120) of the fleas from the field strain were heterozygous for the mutation, while 4.16% (5/120) were homozygous for alleles without the resistance-associated mutation. The presence of *R. felis* DNA was detected in 94.73% (36/38) of the fleas from the laboratory strain and in 27.50% (33/120) of the fleas from the field strain. Compared to other toxicological studies, the laboratory colony was characterized as susceptible to Fipronil, despite the predominance of the resistance genotype in the *Rdl* gene. In the field strain, this genotype was also predominant. Based on these results, it can be concluded that the *Rdl* gene mutation alone is not sufficient to confer resistance to Fipronil in *C. felis felis*. In this study, the presence of *R. felis* may have played a role in the susceptibility of *C. felis felis* to the insecticide. Additionally, it was observed that this mutation is predominant in both laboratory and field flea populations.

**Keywords:** parasitic resistance; ectoparasites; phenylpyrazole; endosymbiont.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estrutura química do Fipronil.....	10
<b>Figura 2.</b> Fitas de papel filtro impregnadas com diferentes concentrações de fipronil secando no ambiente (A); Tubos de ensaio contendo <i>Ctenocephalies felis felis</i> e fitas impregnadas já secas (B).....	16
<b>Figura 3.</b> Pulgas submetidas a um desafio toxicológico e incubadas em uma câmara de temperatura e umidade controladas (A); Avaliação em 48 horas onde é possível ver uma pulga sobrevivente ao teste (B).....	17
<b>Figura 4.</b> Tubo de tampa rosca contendo pulga da subespécie <i>C. felis felis</i> com glass beads e PBS, pouco antes de ser colocado no Bead-beater-16.....	18
<b>Figura 5.</b> Capela de exaustão durante a realização dos procedimentos envolvendo fenol e fenol-clorofórmio devido à toxicidade destes compostos.....	19
<b>Figura 6.</b> Produto de amplificação de 285 pb pelo primer Exon 7, amostras 1-7; 12-21 (cepa campo), 22, 23, 24 8-9 (cepa laboratorial), 10-11 (cepa California), o controle positivo de DNA de <i>Ctenocephalides felis felis</i> foi feito diferentes diluições, com a finalidade de calcular o limite de detecção do DNA: -1 (1:10), -2 (1:100), -3 (1:1000), AF (água de fora) e AD (água de dentro).....	27
<b>Figura 7.</b> Em relação a identificação das amostras: 1-5 (cepa campo), 6-19 (cepa laboratorial), 20 (cepa Califórnia). Já as bandas de DNA após digestão, gerou os genótipos RR para as amostras 1-12; 14-15; 17-19 (produtos de 135 e 150 pb gerados), genótipo SS para as amostras 13 e 16 (produtos não digeridos de 285 pb) e genótipo RS para a amostra 20 (um produto não cortado de 285 e dois produtos de 135 e 150 pb) (Daborn, 2004).....	28

## LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Graus celsius
µL	Microlitros
BE	Brometo de Etídio
BOD	Câmara climatizada com demanda bioquímica de oxigênio
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CL	Concentração Letal
DAPE	Dermatite alérgica à picada de pulga
DDI	Disruptores de desenvolvimento de insetos
DDT	Dicloro-Difenil-Tricloroetano
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPA	Departamento de Parasitologia Animal
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EUA	Estados Unidos da América
FeLV	Vírus da leucemia felina
GABA	Ácido gama-aminobutírico
IV	Instituto de Veterinária
Kdr	<i>Knockdown resistance</i>
LASAVE	Laboratório de sanidade avícola
LBioMol	Laboratório multiusuário de biologia molecular
LQEPV	Laboratório de quimioterapia experimental em parasitologia veterinária
MIP	Manejo integrado de Pragas
OMS	Organização Mundial de Saúde
SSCP	Polimorfismo de conformação de filamento
PASA	Amplificação de alelos específicos
PBS	Solução tamponada de fosfato
pb	Pares de base
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
PPM	Partes por milhão
Rdl	<i>Resistance to dieldrin</i>
Skdr	<i>Super knockdown resistance</i>
TAE	Tris-Aacetato com EDTA
TNT	Tecido não tecido
TBE	Tris-Borato com EDTA
UFRRJ	Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Eficácia do Fipronil em teste toxicológico <i>in vitro</i> em <i>Ctenocephalides felis felis</i> através da exposição a tiras de papel impregnadas com o princípio ativo em diferentes concentrações após períodos de 24 horas e 48 horas.....	25
<b>Tabela 2.</b> Estimativa de concentrações letais de Fipronil para <i>Ctenocephalides felis felis</i> após 48 horas de exposição.....	26
<b>Tabela 3.</b> Distribuição do número de pulgas pertencentes a cepa laboratorial e a cepa campo, classificando as pulgas com alelos que tornam suscetíveis ao Fipronil (SS), gene heterozigoto com um dos alelos que tornam as pulgas resistentes ao Fipronil (RS) e genes homozigotos para resistência (RR).....	29

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	3
2.1 A Pulga.....	3
2.2 A Pulga e a Sociedade.....	4
2. 3 <i>Ctenocephalides felis felis</i> .....	5
2.4 Prevenção e Controle de Pulgas.....	8
2. 5 Fenilpirazoles .....	9
2.6 Resistência à Inseticidas.....	11
2.7 Detecção de Resistência a Inseticidas .....	13
3 MATERIAL E MÉTODOS .....	15
3.1 Local da Experimentação.....	15
3.2 Obtenção de Pulgas mantidas em condições laboratoriais.....	15
3.3 Obtenção de Pulgas em nível de campo.....	15
3.4 Avaliação <i>in vitro</i> da atividade do Fipronil sobre Adultos de <i>C. felis felis</i> .....	16
3.5 Extração de DNA genômico .....	18
3.6 Análises Moleculares .....	20
3.6.1 Avaliação da Qualidade de Extração.....	20
3.6.2 Detecção da mutação do gene <i>Rdl</i> por PCR RFLP .....	21
3.6.3 Detecção de <i>Rickettsia</i> spp em amostras de DNA de pulgas .....	23
4 RESULTADOS .....	25
4.1 Ensaio Toxicológico .....	25
4.2 Análises Moleculares .....	27
5 DISCUSSÃO .....	30
6 CONCLUSÃO .....	34
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	35
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	36

## 1 INTRODUÇÃO

As pulgas são um dos principais parasitos que afligem os animais domésticos. Esses organismos são capazes de transmitir doenças aos animais e também aos seres humanos, além de elevar gastos econômicos na prevenção e no tratamento contra esses artrópodes, como também nos patógenos transmitidos por eles. Atualmente, *Ctenocephalides felis felis* é a espécie de pulga prevalente em animais de companhia, sendo um parasito Eurixeno que se adapta também a diferentes condições climáticas, o tornando cosmopolita.

No presente momento, há disponível diferentes métodos de combater as pulgas, sejam eles físicos, químicos e biológicos. Os métodos químicos são os mais preconizados por estarem bem estabelecidos no mercado, tendo como maior foco o uso de fármacos adulticidas no hospedador em que a pulga está presente. Os fenilpirazóis são dos mais comumente utilizados, agindo nos canais de cloreto ativado pelo GABA (Ácido gama-aminobutírico), causando morte das pulgas por hiperexcitação. O Fipronil é um fenilpirazol aplicado amplamente como ectoparasiticida para animais domésticos, possuindo efeito acaricida e inseticida.

Apesar da eficiência do Fipronil, o uso irresponsável pode acarretar consequências indesejáveis como contaminação ambiental, intoxicação de vertebrados e resistência inseticida e acaricida aos parasitos. Associado principalmente ao uso preventivo, ectoparasitos podem adquirir tolerância a doses anteriormente mortais a esse composto. Tolerância essa que pode ser adquirida por diferentes vias, através de mudança de microbiota, presença de enzimas desintoxicantes ou fatores genéticos que causem mudança do sítio de ação do fármaco.

É indispensável realizar o monitoramento de possível resistência a inseticidas para assim, garantir que as atuais estratégias de controle continuem viáveis e evitar o defasamento de fármacos, já que o desenvolvimento de novas moléculas podem demorar décadas para serem desenvolvidas. Entre os métodos de identificar resistência podem ser empregados os bioensaios, assim como a busca por marcadores genéticos que identificam possíveis genes que estejam causando resistência nesses parasitos.

O objetivo desse trabalho foi caracterizar através de teste *in vitro* a susceptibilidade de *C. felis felis* a fipronil em uma colônia laboratorial, como também identificar possíveis mutações no gene *Rdl* (*Resistance to Dieldrin*), a qual causa resistência cruzada à Fipronil em outros insetos. A detecção no gene *Rdl* foi investigada em pulgas da colônia laboratorial,

como também em pulgas coletadas na Região metropolitana do Rio de Janeiro. Outro propósito do estudo foi detectar através de ferramentas moleculares a presença de bactérias do gênero *Rickettsia* nas amostras das pulgas e correlacionar a possível influência desses micro-organismos na resistência ao Fipronil.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 A Pulga**

As pulgas estão entre os ectoparasitos mais estudados na ciência, elas são insetos holometábolos pertencentes à ordem Siphonaptera (do grego *siphon* = sifão e *aptera* = sem asas) e à família Pulicidae. Esse grupo de artrópodes possui como características morfológicas gerais, de quando adultas, o corpo comprimido lateralmente, tamanho de 2,5-3,0 mm de comprimento em média, coloração castanha, serem providos de cerdas orientadas para o lado posterior de corpo e de possuir o aparelho bucal sugador-pungitivo (Linardi; Guimarães, 2000). Esses indivíduos apesar de não voarem, se locomovem em grandes distâncias através do salto, característica essa essencial para pousarem em potenciais hospedeiros em movimento. A altura do salto assim como a distância, se deve a uma modificação do terceiro par de pernas, mas também pela presença de uma proteína denominada resilina, localizada no arco pleural (Bennet-Clark; Lucey, 1967; Linardi; Guimarães, 2000).

Mais de 2500 espécies de pulgas já foram descritas no mundo e estão distribuídas em aproximadamente 15 famílias (Russell, 2013). Uma parcela relevante dessas espécies de pulgas tem alta especificidade, essenciais para sua sobrevivência e também garantir a geração de ovos férteis, auxiliando até no diagnóstico da espécie estudada (Medvedev, 2002; Wall; Shearer, 1997). Porém, na falta de oferta de alimento, elas podem parasitar espécies não-alvo de hospedeiro (Wall; Shearer, 1997). Essa mudança de hospedeiro pode ter diversas consequências, como por exemplo promovendo *spillover* de patógenos que anteriormente, eram exclusivos em um hospedeiro em específico (Ellwanger; Chies, 2021).

Os mamíferos e as aves são os hospedeiros essenciais das pulgas, os répteis são descritos como hospedeiros accidentais e também já foi relatado pulgas se alimentando da hemolinfa de artrópodes (Krasnov, 2009). A pulga é considerada um ectoparasito somente em sua vida adulta, sendo ambos machos e fêmeas hematófagos (Linadri; Guimarães, 2000). Elas podem ser classificadas como penetrantes, quando a fêmea penetra na pele no seu hospedeiro até a derme (Sachse, 2007), ou como não penetrantes, quando a pulga permanece sobre a superfície do hospedeiro para se alimentar.

## 2.2 A Pulga e a Sociedade

Devido a sua biologia como um ectoparasito hematófago obrigatório, a pulga pode afetar a saúde de seus hospedeiros em maneiras diferentes. Uma pulga fêmea de *C. felis felis* pode ingerir aproximadamente 13,6 $\mu$ L de sangue do seu hospedeiro por dia (Dryden; Gaafar, 1991) e em casos de alta carga parasitária, pode ser o suficiente para causar anemia espoliativa, atingindo principalmente animais jovens, inclusive em animais de produção (Araújo, 1998).

As pulgas podem desencadear reações inflamatórias intensas através de diferentes mecanismos, a picada da pulga pode causar reações de alergenicidade devido a componentes imunogênicos em sua saliva (Halliwell, 1984). Esses componentes podem consequentemente causar dermatite e prurido intenso que pode levar a autoflagelação, caracterizando assim, a DAPE (Dermatite alérgica à picada de ectoparasito) (Scheidt, 1988). Reações inflamatórias causadas por pulgas também são problema central na tungíase, o agente etiológico da doença é a espécie *Tunga penetrans*, conhecida popularmente como “Bicho-do-pé”, sendo esta uma pulga penetrativa que causa intensa reação inflamatória no local do tecido no qual a fêmea se insere, a tungíase é uma doença zoonótica considerada negligenciada na saúde pública, afetando principalmente cidadãos em situação de vulnerabilidade (Eisele, 2003).

Outro impacto que a pulga gera na sociedade é como vetor, seja mecânico ou biológico, transmitindo agentes etiológicos de classes diferentes aos seus hospedeiros e também por diferentes vias. O cestoide *Dipylidium caninum* é um platelminto de importância para os cães e gatos, além de ser um agente zoonótico. A transmissão desse verme intestinal ocorre após a ingestão da pulga do gato (*C. felis felis*) contendo o cisticercóide desse endoparasito (Alho, 2015; Bowman, 2013), a repercussão clínica da infecção por *D. caninum* varia desde assintomático até anorexia, prurido anal, perda de peso e anorexia (Roussaeu, 2022). *Acanthocheilonema reconditum* é uma espécie de helminto transmitido por pulgas de importância na medicina veterinária, mais especificamente em cães. Esse nematóide em sua fase adulta, está localizado no tecido subcutâneo dos cães, sendo as pulgas, mais especificamente *C. felis felis*, responsáveis por ingerir as microfilárias circulantes no sangue do animal e transmitir esse agente para outros hospedeiros (Napoli, 2014). Não foi comprovado até o momento se a transmissão do helminto para os cães é através da inoculação realizada pela própria pulga ou através da

ingestão da mesma (Lindermann; McCall, 1984), apesar de não haver um repercução clínica relevante se avaliada isoladamente, a detecção de *A. reconditum* possui importância no diagnóstico diferencial de *Dirofilaria immitis*.

É consenso que a doença de maior importância já transmitida pela pulga foi a peste, a espécie *Xenopsylla cheopis*, conhecida como pulga do rato, foi considerada o principal propagador de *Yersinia pestis* no velho mundo, bactéria essa que quando transmitida pela pulga através da espoliação sanguínea, causa o que foi chamada da forma bubônica da peste (Kugeler, 2015). A doença causou um grande impacto mundial na saúde e também na cultura, sendo uma das pandemias mais mortais da história, ela se tornou infame por causar a morte de  $\frac{1}{4}$  da população da Europa. Apesar de outras formas transmissão da bactéria entre humanos foi através do contágio e pela transmissão de outros ectoparasitos como *Pulex irritans* e *Pediculus humanus humanus*, foi estabelecido que a pulga foi o principal veículo de transmissão da bactéria do século 14 ao 19 (Dean, 2018).

Atualmente, um dos maiores desafios da sociedade contra a pulga está no mercado veterinário de pequenos animais, diferentes espécies e subespécies podem parasitar esses animais como *Ctenocephalides canis*, *Pulex irritans*, *Echidnophaga gallinacea* e principalmente *C. felis felis* (Dryden, 1993). No ano de 2022 foi estimado um gasto de 3,5 bilhões de dólares na compra de produtos e serviços relacionados ao controle de pulgas em animais domésticos (Verified market reports, 2024) ( Apesar de serem conhecidas diversas formas de se combater as pulgas, o controle de *C. felis felis* continua sendo um desafio atual para a sociedade.

## 2. 3 *Ctenocephalides felis felis*

*Ctenocephalides* é um gênero de pulga caracterizado principalmente pela presença de ctenídeos em seu corpo, possui grande importância na medicina veterinária, mais especificamente na medicina de animais de companhia, isso porque esse gênero engloba a pulga do cão (*C. canis*) e a pulga do gato (*C. felis felis*). *C. canis*, apesar de também ser cosmopolita, ela está mais restrita a ambientes rurais e a animais criados fora de casa (Ahn, 2018), já *C. felis felis* é mais prevalente que *C. canis*, se adaptando melhor às diferentes variações de temperatura, umidade e quantidade de hospedeiros, uma vez que *C. canis* está mais restrito a carnívoros domésticos (Cruz-Vasquez, 2001; Linardi; Santos, 2012). Por isso é importante enfatizar que mesmo *C. canis* ser conhecida popularmente como pulga do

cão, a espécie de pulga mais detectada em infestações de cães é *C. felis felis* (Dryden, 1993). A qual é mais relevante epidemiologicamente na infestação e na transmissão de doenças para animais e humanos no Brasil (Linardi; Santos, 2012).

Morfologicamente, algumas das características de *C. felis felis* é possuir a largura da cabeça 2 vezes maior que a altura, os dois primeiros ctenídos genais terem o mesmo comprimento, apresentar 1-2 cerdas na área metanotal lateral e, nos machos, o formato do manúbrio do clasper não contém expansão apical, e o edeago revelar ter o comprimento do hamulus duas vezes e meio maior que a largura (Linardi; Santos 2012; Ménier; Beaucournu, 1998).

*C. felis felis* é uma espécie bem adaptada em infestar o ambiente *indoor*, sendo capaz de gerar numerosos descendentes em um período curto de tempo, porém é uma espécie bastante adaptável, também sendo encontrada infestando interior de matas e pocilgas (Dryden, 2015; Linardi; Guimarães, 2000). No Brasil, *C. felis felis* já foi detectada parasitando as mais diferentes grupos de mamíferos como primatas humanos e não-humanos, mustelídeos, capivaras, coelhos, lebres, tatus, bichos-preguiça, coelhos, lebres, pequenos roedores silvestres, gambás e evidentemente canídeos e felídeos, sejam eles domésticos ou silvestres (Linardi; Guimarães, 2000).

O tempo de duração e como ocorre o ciclo biológico de *C. felis felis* é afetado por diferentes fatores químicos, físicos e biológicos. Porém, de uma maneira geral, é que os ovos da pulga do gato são brancos perolados, ovalados, com comprimento médio de 0,5 milímetros, a larva pode eclodir em até 1 dia e meio em condições ótimas de temperatura (Silverman, 1981). As larvas de *C. felis felis* são morfologicamente esguias, brancas e segmentadas, e sendo também cobertas por pêlos curtos e possuem aparelho bucal do tipo mastigador (Dryden, 1993). As larvas são caracterizadas por serem de vida livre e se alimentam predominantemente de matéria orgânica presente no ambiente e de fezes de pulgas adultas, adquirindo assim uma coloração mais escura em seu corpo (Dryden, 1993). As larvas de pulgas são fotofóbicas e possuem geotropismo, o tempo de duração dessa fase é de aproximadamente de 5 a 11 dias, e elas passam por 3 ínstaques no total (Dryden, 1993). As larvas expulsam todo conteúdo digestivo, produzindo um fio sedoso e aderente em volta de seu corpo, formando assim a pupa (Silverman, 1981). Após um período de aproximadamente 5 dias, as pulgas adultas emergem das pupas, sua emergência está principalmente relacionada com estímulos como vibrações físicas, presença de calor e dióxido de carbono (Silverman; Rust 1985), estímulos estes, relacionados principalmente à

presença de um hospedeiro em potencial e, então as pulgas quase que de forma imediata saltam para o hospedeiro para realizarem a espoliação sanguínea (Dryden, 1993), a cópula acontece quando as pulgas estão no hospedeiro e a postura de ovos inicia de 24 a 48 horas após o primeiro repasto (Rust, 2017).

*C. felis felis* é importante epidemiologicamente para a transmissão de diferentes agentes patogênicos em animais e humanos, alguns deles já citados como *D. caninum*. É importante citar que a pulga do gato é um vetor competente para a transmissão de bactérias do gênero *Bartonella*, que inclui *Bartonella henselae*, *Bartonella clarridgeiae* e *Bartonella koehlerae*, sendo que essas três espécies possuem o gato doméstico como hospedeiro reservatório (Moore, 2024). Sendo a mais estudada *B. henselae*, uma espécie de bactéria gram-negativa que já foi isolada em diferentes hospedeiros mamíferos incluindo humanos, sendo caracterizado como um agente zoonótico, responsável pela doença da arranhadura do gato (Gutpill, 2012). A transmissão de *B. henselae* ocorre quando a bactéria está presente nas fezes da pulga, então no momento em que o gato se arranha por conta do prurido causado pela pulga, a bactéria penetra na pele pela solução de continuidade (Finkelstein, 2002). Clinicamente, os gatos são pouco afetados pela infecção por *B. henselae*, sendo relatado pouca sintomatologia clínica como linfoadenomegalia e febre transitória (Abbott, 1997), porém como o gato é considerado um hospedeiro reservatório, ele possui uma importância muito grande na transmissão para humanos, tendo repercussão clínica mais agressiva, como angiomatose, febre recorrente com bacteremia, endocardite, neurite óptica, distúrbios do sistema nervoso central, granuloma e osteomielite (Florin, 2008).

A subespécie *C. felis felis* também é considerada um vetor competente para transmissão de riquétsias. Os organismos da família Rickettsiae são coco bacilos intracelulares gram-negativos, que estão associadas com doenças caracterizadas por manifestações clínicas inespecíficas e que afetam tanto os animais e humanos em diferentes níveis de gravidade (Blanton, 2019). Sendo a pulga *C. felis felis* considerada vetor hematófago de organismos do tipo *Rickettsia felis*, que incluem *R. felis*, *Rickettsia asemboensis* e *Candidatus Rickettsia senegalensis* (Reif; Macaluso, 2009; Moore, 2024). *R. felis* é considerada um agente zoonótico, causando manifestações clínicas como febre, desde leve a moderada, erupção cutânea e sinais clínicos neurológicos e digestivos (Socolovschi, 2010). Já foi relatado que cão doméstico é possivelmente o reservatório principal *R. felis* (Ng-nguyen, 2020), porém, ainda há questões abertas de qual é o

hospedeiro reservatório definitivo desse patógeno tanto em ambientes urbanos como silvestres (Martinez, 2021), também são escassos os estudo que definem qual é o seu possível papel como endossimbionte em diferentes artrópodes (Behar, 2010).

*Rickettsia typhi* é o agente etiológico do Tifo murinho, que apresenta sinais clínicos inespecíficos. Epidemiologicamente, há mais informações sobre *R. typhi* que em outras espécies do gênero *Rickettsia*, sendo roedores sinantrópicos e silvestres os principais reservatórios da bactéria e a pulga *X. cheopis* o principal vetor (Martinez, 2021), porém é importante citar que estudos indicam que os gambás são considerados hospedeiros amplificadores, os quais inserem a pulga *C. felis felis*, no ciclo urbano e periurbano na transmissão dessa bactéria (Azad, 1990). Não há evidências que sustentem o papel epidemiológico de cães e gatos na transmissão de *R. typhi* para humanos. O principal modo de transmissão de *R. typhi* para os hospedeiros vertebrados é através da inoculação da bactéria presente nas fezes da pulga, penetrando na pele não íntegra do hospedeiro (Dyer, 1932).

Diversos estudos indicam *C. felis felis* como um possível vetor de diferentes agentes como vírus da leucemia felina (FeLV), *Coxiella burnetii* e *Leishmania* spp. (Rust, 2017), porém é importante destacar que a maioria desses estudos estão relacionados ao uso de técnicas moleculares, e como um ectoparasito hematófago, provavelmente todos os microorganismos presentes no sangue dos hospedeiros de *C. felis felis*, podem ser detectados nessa mesma pulga, porém ela não ser o vetor. *C. felis felis* já foi descrita como um possível vetor de *Y. pestis*, mas devido ao seu hábito de se alimentar frequentemente, isso impede o estabelecimento de biofilme formado pelas bactérias no organismo da pulga, tornando esta um vetor pobre da peste (Bland; Hinnebusch, 2016). Devido à diversidade de doenças causadas por *C. felis felis*, assim como a adaptabilidade deste ectoparasito, é necessário desenvolver métodos de controle que desejam efetivos no combate dessa pulga.

## 2.4 Prevenção e Controle de Pulgas

Atualmente existem inúmeras alternativas de estratégias e de produtos que podem ser utilizados para prevenir ou controlar uma já estabelecida infestação por *C. felis felis*, na literatura há registros de métodos físicos, químicos ou biológicos. Maior parte dos estudos de métodos biológicos estão relacionados a testes *in vitro*, com agentes de diferentes classificações taxonômicas sendo utilizados para controle de pulga no ambiente, como o

nematóide *Steinernema feltiae* e o fungo *Metarhizium robertsii* se mostrando promissores no controle de pulgas em suas fases imaturas e adultas respectivamente (Samish, 2020). Os métodos biológicos de controle estão cada vez sendo mais estudados por serem em teoria métodos mais sustentáveis de combate a insetos sem o uso de produtos químicos (Shorette, 2012).

Entre os métodos físicos, o que mais se destaca é o uso de aspirador de pó, porque ele remove principalmente as formas imaturas de pulgas que estão no ambiente, o que inclui ovos, larvas e pupas, que compõe a maior fração de pulgas em um ambiente infestado, sendo necessário o descarte adequado do material aspirado (Hink; Needham, 2007). As pulgas intensificam sua postura de ovos no local de descanso de seu hospedeiro (Osbrink, 1986), por este motivo a lavagem de roupas de cama, chão de madeira e tapetes também são formas de controle físico.

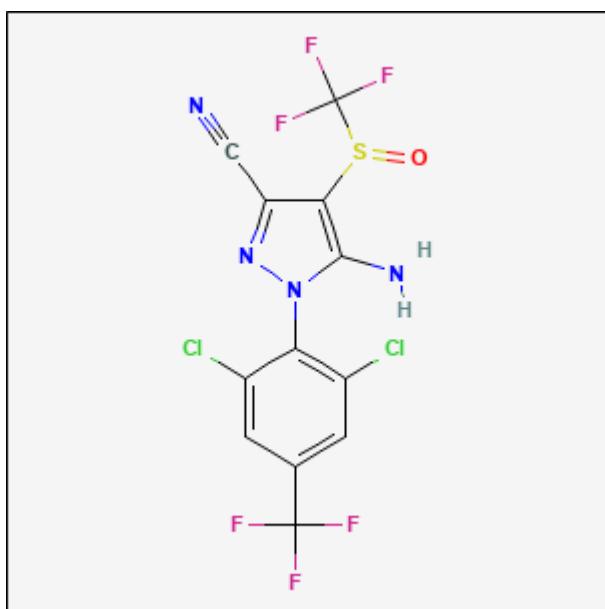
Os métodos químicos de controle de pulgas são os mais amplamente utilizados, sendo o maior foco atual do uso desses métodos visando a morte das pulgas enquanto presente em seus hospedeiros (Rust, 2020). Os produtos químicos podem controlar as pulgas em diferentes fases da vida, os disruptores de desenvolvimento de insetos (DDIs) como novaluron e piriproxino por exemplo, são compostos que atingem as fases imaturas das pulgas através da inibição da síntese da quitina e da inibição da muda (Berti, 2013). Porém a maior parcela de variedade de inseticidas disponíveis no mercado são de adulticidas, pois o principal objetivo visado é fornecer um alívio instantâneo ao animal infestado por pulgas (Marsella, 1999).

As formulações adulticidas possuem diferentes tipos de mecanismos, entre eles estão os ativadores de canal de cloreto (avermectinas), antagonistas do canal de cloreto controlado por GABA (isoxazolinas e fenilpirazoís), agonistas de receptores nicotínicos de acetilcolina (neonicotinóides), moduladores do canal de sódio (piretróides) e bloqueadores de canais de sódio dependentes de voltagem (Indoxacarb) (Paterson, 2019). Diferentes métodos de controle devem ser aplicados para controlar a pulga tanto no animal como no ambiente para prevenir reinfestações, cada situação deve ser analisada de forma cuidadosa para definir qual método de controle deve ser empregado.

## **2. 5 Fenilpirazoles**

Os Fenilpirazoles são uma classe de químicos com alta atividade pesticida, incluindo herbicidas, acaricidas e inseticidas. A ação inseticida está relacionada ao químico ser um antagonista potente do canal cloreto ativado pelo GABA em insetos (Cole, 1993). O bloqueio leva um aumento intraneuronal da concentração de íons de cloreto, levando à hiperpolarização do neurônio, e assim consequentemente interrompe a função nervosa do sistema nervoso central através da hiperexcitação, levando a paralisia e morte (Medel-Matus, 2011). O sítio de ação do fipronil é comum aos ciclodienos e os t-butilbiciclofosforionato (Rust, 2005). Embora os canais de canais de cloreto controlados pelo GABA estarem presentes em vertebrados e invertebrados, o Fipronil possui uma afinidade maior com pelos receptores GABA de insetos do que os receptores presentes em vertebrados, garantindo maior segurança no uso desses produtos em mamíferos (Stehr, 2006).

O Fipronil é um fenilpirazole que foi desenvolvido primeiramente para combater insetos como o escaravelho-da-batata (*Leptinotarsa decemlineata*) na metade da década de 1990, substituindo inseticidas ao quais algumas pestes agrícolas já estavam resistentes (Narahashi, 2010). Posteriormente o Fipronil passou a ser utilizado para controlar não apenas pragas agrícolas, mas também pragas urbanas como baratas, mosquitos, gafanhotos, cupins, tripes, carapatos e pulgas (Gunasekara, 2007). Sua estrutura química é o (5-amino-1-[2,6-dicloro-4-(trifluorometil)fenil]-4-[(trifluorometil)sulfinil]-1H-pirazol), como representados na **Figura 1** (PubChem, 2025).



**Figura 1.** Estrutura química do Fipronil (Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Fipronil>).

No mercado veterinário, o Fipronil é aplicado como ectoparasiticida tanto para animais de produção como animais de companhia, tendo efeito acaricida e inseticida para parasitos como *Ctenocephalides* spp., *Rhipicephalus sanguineus* e *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Wang, 2016). Esse composto químico está presente em diferentes produtos ectoparasiticidas como Frontline, Certifect e Parastar plus (Gupta; Anadon, 2018). Os produtos à base de Fipronil podem ter diferentes administrações como spray e spot-on para cães e gatos (Rust, 2005).

Apesar do fipronil ser eficiente para o controle de ectoparasitos, o uso irresponsável dessa substância pode gerar consequências indesejáveis, podendo causar contaminação de corpos de água através do banho e também pelo hábito de natação de cães com formulações spot-on do produto, assim como resíduos biológicos como pêlos, fezes e urina do animal pode contaminar o ambiente terrestre (Diepens, 2023).

Há evidências de que a exposição accidental, o uso incorreto de Fipronil, o descarte inadequado desse ectoparasiticida no solo e na água, pode levar a uma série de efeitos tóxicos em animais e humanos, como neurotoxicidade, hepatotoxicidade, nefrotoxicidade, desordem neurológica assim como citotoxicidade em organismos vertebrados e invertebrados (Wang, 2016). Visando minimizar os efeitos de diferentes inseticidas em organismos não-alvo, foi desenvolvido o Manejo Integrado de Pragas (MIP), que visou o uso responsável de técnicas químicas e biológicas para o controle de pestes (Zhu, 2016).

## 2.6 Resistência a Inseticidas

Tanto em ambientes urbanos como agrícolas tem-se acesso a inseticidas com facilidade e muitas vezes devido ao seu uso fácil, baixo custo e ação rápida, eles são utilizados de formas inadequadas, formas estas associadas com o uso preventivo desses produtos (Robinson, 1996). Porém o uso contínuo e exacerbado pode intensificar a seleção de indivíduos resistentes (Whalon, 2008).

Resistência por definição da OMS (Organização Mundial de Saúde) é o desenvolvimento da habilidade de cepas de determinados organismos em tolerar doses padronizadas de substâncias, as quais são tóxicas para a maioria de indivíduos em uma população normal de uma mesma espécie (Krämer, Mencke 2012). O desenvolvimento de resistência de insetos a inseticidas é um processo dinâmico e também complexo, está associado a fatores relacionados ao uso do inseticida (método, frequência, tempo de

exposição) e fatores intrínsecos ao inseto (genética, fisiologia, microbiota, comportamento e ecologia) (Zhu, 2016).

Em insetos, a resistência pode então surgir de acordo com uma única origem ou como uma associação de diferentes mecanismos, como a redução da absorção do inseticida pelo inseto através de alteração da cutícula, presença em seu organismo de enzimas desintoxicantes como Esterases, Glurationa S-transferases e monooxigenases; e alterações do sítio onde o produto químico tem sua ação (Hemingway, 2004).

Os endossimbiontes desempenham um papel essencial na vida do inseto, ao protegê-los de diversas fontes de estresse presente no ambiente como inimigos naturais, clima, nutrição e substâncias químicas (Liu; Guo, 2019). Sendo esses mesmos organismos podem participar no metabolismo dos pesticidas, podendo assim auxiliar no desenvolvimento da resistência em insetos a esses químicos (Siddiqui, 2022), como também pode potencializar o efeito dos inseticidas. Na literatura por exemplo, há relato sugerindo de que a presença de *Rickettsia* spp. aumenta a susceptibilidade da mosca-branca (*Bemisia tabaci*) a inseticidas como acetamiprido, tiameksam, espiromesifeno e piriproxifeno (Kontsedalov, 2008).

Em relação a pulgas, os primeiros casos registrados de suspeita de resistência à inseticidas foi na década de 1950, com as espécies *P. irritans*, *X. cheopis*, *Ceratophyllus* spp. e *Polygenis* spp. não respondendo de forma adequada ao DDT (Dicloro-Difenil-Tricloroetano) (Saenz Vera, 1954). Já em relação a *C. felis*, o primeiro relato ocorreu no sudeste dos Estados Unidos em 1952, quando o uso de DDT em pó não foi capaz de controlar infestações de pulgas em cães (Brown; Pal, 1971). *C. felis felis* tem mostrado capacidade em desenvolver resistência a inseticidas como ciclodienos, carbamatos, organofosforados e piretróides (Bossard, 2002). Sendo importante citar que a resistência conferida ao ciclodienos pode conferir resistência cruzada ao fipronil (Rust, 2014).

O Monitoramento da possível resistência a inseticidas é importante para determinar quais serão os melhores métodos a serem selecionados para desenvolver estratégias de controle de pulgas, já que elas possuem uma população heterogênea que respondem diferentemente a determinados químicos dependendo de qual população ela pertence (Rust, 2005).

## 2.7 Detecção de Resistência a Inseticidas

A OMS desenvolveu na década de 1950, kits de teste de detecção de resistência a inseticidas para mosquitos adultos que foram muito bem aceitos por diferentes partes do mundo. Essa técnica, baseada na impregnação de papéis com inseticidas, logo foi adaptada para testar a susceptibilidade ou resistência em piolhos, hemípteros e pulgas (Busvine; Lien 1961). Para definir a presença de resistência é necessário padronizar protocolos para a realização de testes toxicológicos em pequena escala com diferentes produtos químicos para testar diferentes cepas (Burden; Smittle, 1968).

Já foi demonstrado que pulgas podem adquirir rapidamente resistência a inseticidas em até 5 gerações quando constantemente expostas a esses compostos, sendo então importante o monitoramento desses ectoparasitos (Collart; Hink, 1986). O princípio central dos testes *in vitro* de resistência está baseado no contato dos insetos com os químicos e avaliação da morte desses organismos (Moyses; Gfeller, 2001; Hamza, 2018). A susceptibilidade é medida através do percentual de mortalidade ou avaliada através de análises de *probit* para obter a taxa de resistência (Bossard, 1988).

Outro método de detecção de destaque é o monitoramento da presença de marcadores genéticos contendo possíveis genes de resistência, sendo importante detectar esses genes antes mesmo da diminuição total do efeito do inseticida no artrópode (WHO, 2012). Métodos moleculares e genéticos incluindo isolamento do DNA (Ácido desoxirribonucleico), PCR (Reação em cadeia de Polimerase), clonagem e sequenciamento, são alguns dos métodos que podem ser utilizados para identificar possível resistência de pulgas a inseticidas (Hamza, 2018). Há estudos envolvendo mutações em genes de insetos que conferem resistência, em pulgas ainda são pouco estudados em comparação a outros artrópodes, sendo atualmente conhecidos na literatura 3 genes que podem estar envolvidos no desenvolvimento de resistência a inseticidas.

1- O “Knockdown resistance” (*kdr*), está associado à resistência de insetos e DDT ou piretróides, devido à redução da sensibilidade desses químicos no sistema nervoso central do artrópode (Davies, 2008). As alterações envolvendo o gene *kdr* são mutações pontuais na proteína do canal de sódio regulado por voltagem, sendo essas presentes nas membranas das células nervosas, que as deixam menos sensíveis à ação de inseticidas (Bass, 2004). Detalhes do mecanismo de *kdr*, envolve a alterações no domínio II (S4-S6) da região do gene da proteína do canal, e a mutação que confere resistência está associada

à troca de aminoácidos em resíduos responsáveis pela resistência em piretróides (Bass, 2004; Hamza, 2018).

2- Outra mutação importante ocorre no gene do “Super knockdown resistance” (*skdr*), sendo considerada uma variação mais forte do *kdr*, conferindo uma resistência ainda mais intensa a concentrações mais altas de piretróides e a químicos semelhantes ao DDT (Sawicki, 1978).

3- O gene de “Resistance to dieldrin” (*Rdl*) codifica subunidade do receptor GABA em insetos, receptor esse alvo da ação de químicos como ciclodienos e também resistência cruzada a outros químicos de mecanismo de ação semelhantes, como o supracitado Fipronil (Taylor-Wells, 2015). Estudos anteriores sugerem que mutações nesse gene em específico estão sendo associadas a geração de resistência a inseticidas em diferentes espécies de insetos como mosca-das-frutas (*Drosophila melanogaster*), barata (*Periplaneta americana*), pulgão (Superfamília Aphidoidea) e traça (*Plutella xylostella*) (Brunet, 2009).

É importante citar que a resistência a esses inseticidas está relacionada com uma mutação pontual ou por polimorfismo de nucleotídeo único, presentes no domínio transmembrana M<sub>2</sub> do canal de cloreto do GABA e, como consequência, a substituição do aminoácido alanina 302 por serina ou por glicina, sendo o suficiente para causar dessensibilização para diferentes inseticidas (Brunet, 2009). Há diferentes técnicas que podem ser utilizadas para detectar mutações associadas com essa resistência em específica, incluindo a Reação em cadeia da polimerase (PCR), Amplificação de alelos específicos (PASA), PCR seguido por análise de endonuclease de restrição (PCR RFLP) ou Polimorfismo de conformação de filamento único (SSCP) (Coustau; Ffrench-Constans, 1995).

Mutações no gene *Rdl* presentes no DNA *C. felis felis* já foram detectadas em pulgas de diferentes colônias laboratoriais e também coletadas em clínicas veterinárias na América do norte, Europa e Oceania (Rust, 2015; Daborn 2003; Bass, 2004), não havendo um consenso definitivo sobre a mutação causar resistência em *C. felis felis*. Até o momento, não há estudos disponíveis sobre a presença de mutações no gene *Rdl* no Brasil.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Local da Experimentação**

O estudo foi realizado no Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária (LQEPV) e no Laboratório Multiusuário de Biologia Molecular (LBioMol), ambos localizados no Departamento de Parasitologia Animal (DPA) e no Laboratório de Sanidade Avícola (LASAVE) no Instituto de Veterinária (IV). Sendo esses os laboratórios pertencentes à Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), localizado no município de Seropédica-RJ.

#### **3.2 Obtenção de Pulgas mantidas em condições laboratoriais**

As formas adultas das pulgas *C. felis felis* foram obtidas de uma colônia laboratorial mantida nas dependências do LQEPV desde 1998 aprovada pela CEUA-IV-UFRRJ sob o número 4313110419 (Anexo I) e cadastrada no SisGen sob o número A85009C. As pulgas caracterizadas como cepa controle positivo para mutação no gene *Rdl*, foram obtidas através de doação da colônia de *C. felis felis* proveniente do Departamento de Entomologia da Universidade da Califórnia, Riverside, preservada em etanol absoluto.

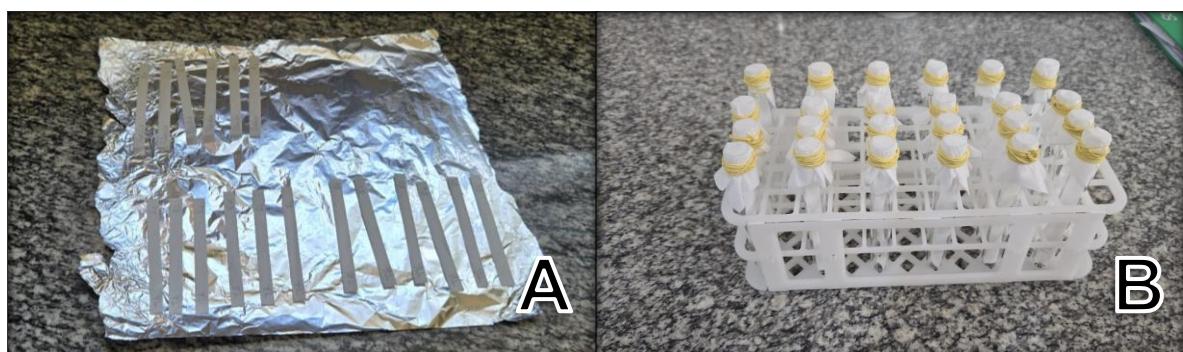
#### **3.3 Obtenção de Pulgas em nível de campo**

Foram obtidas por um período de 1 ano, formas adultas de pulgas através de espécimes encaminhadas ao setor de Parasitologia do LQEPV para a diagnóstico. Após a caracterização morfológica, as pulgas identificadas como *C. felis felis* foram cedidas. Todas as pulgas foram coletadas de cães ou gatos localizados na região metropolitana do Rio de Janeiro. Foram obtidas 120 pulgas de uma população de 60 animais, as pulgas foram armazenadas em Álcool 70% para a preservação do DNA genômico.

### **3.4 Avaliação *in vitro* da atividade do Fipronil sobre Adultos de *C. felis felis***

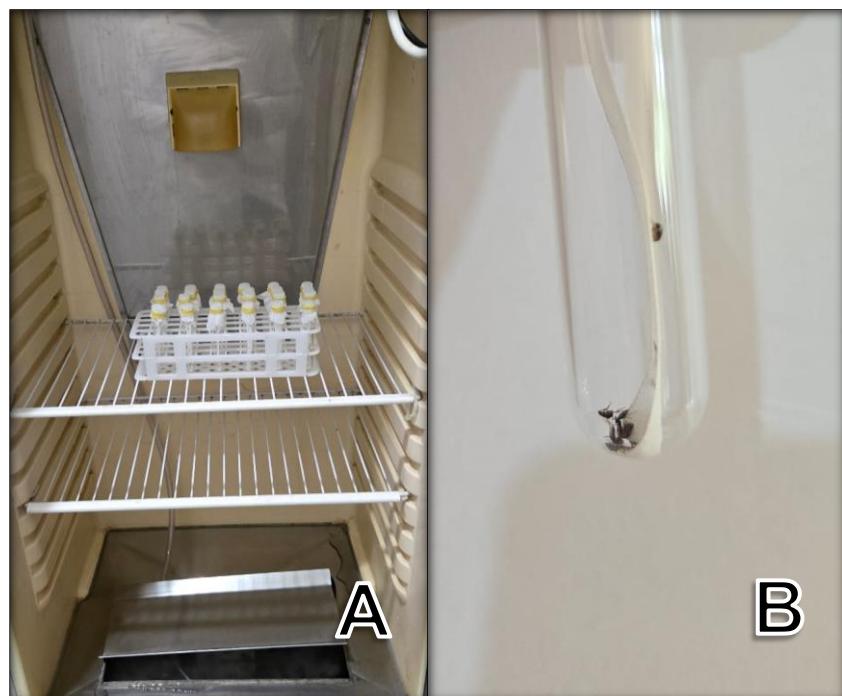
Para a realização da avaliação toxicológica de cepa laboratorial de *C. felis felis*, foram impregnadas soluções de diferentes concentrações de Fipronil em fitas de papel filtro com dimensões de 10 cm<sup>2</sup>, cada fita foi impregnada com 200 µL da solução (**Figura 2A**). As concentrações de Fipronil (Sigma-Aldrich) foram testadas na unidade de Partes por milhão (ppm), concentrações essas de: 0,091, 1,5625; 3,125; 6,25; 12,5; 25 e 50. O solvente utilizado no estudo foi Acetona P.A., sendo a própria acetona utilizada como grupo placebo, já no grupo controle não foi utilizada qualquer impregnação para avaliar a viabilidade das pulgas utilizadas no momento do estudo.

Para cada tratamento e para os grupos controle e placebo, foram realizadas 6 repetições no total, as fitas impregnadas foram posteriormente colocadas em tubos de ensaio contendo em seu interior 10 pulgas adultas não alimentadas provenientes da colônia laboratorial de pulgas do LQEPM (**Figura 2B**). Os tubos selados com uso de tecido do tipo TNT junto com elástico foram armazenados em câmara climatizada com demanda bioquímica de oxigênio (BOD) em uma temperatura de 27±1°C e 75%±10 de umidade (**Figura 3A**).



**Figura 2.** Fitas de papel filtro impregnadas com diferentes concentrações de fipronil secando no ambiente (A); Tubos de ensaio contendo *Ctenocephalies felis felis* e fitas impregnadas já secas (B).

Cada grupo foi avaliado após um período de 24 e de 48 horas, com a finalidade de avaliar a mortalidade das pulgas, sendo consideradas mortas as pulgas que não apresentarem qualquer tipo de movimento (**Figura 3B**). Foram separadas as pulgas vivas das mortas após o período de 48 horas, sendo ambas armazenadas em microtubos de 1,5 mL.



**Figura 3.** Pulgas submetidas a um desafio toxicológico e incubadas em uma câmara de temperatura e umidade controladas (A); Avaliação em 48 horas onde é possível ver uma pulga sobrevivente ao teste (B).

Para a determinação da toxicidade, foram realizados diferentes cálculos para obter a concentração letal 50% (CL<sub>50</sub>), 90% (CL<sub>90</sub>), 95% (CL<sub>95</sub>) e 99% (CL<sub>99</sub>). Cálculos esses com intervalo de confiança de 95%, foram determinados através de um modelo de regressão linear do tipo *probit*, foi utilizado o programa estatístico PoloPlus Version 1.0. Após a determinação das CLs, foi realizado um novo teste *in vitro* com os valores obtidos das CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub>, a finalidade desse novo teste foi coletar as pulgas após a finalização teste, tanto as pulgas vivas como as mortas, e realizar as análises moleculares desses parasitos para avaliar a possível influência na sobrevivência das pulgas em determinadas concentrações de Fipronil.

### 3.5 Extração de DNA genômico

Para a obtenção de DNA genômico de *C. felis felis* foi utilizada a técnica de extração de fenol:clorofórmio. Um total de 160 espécimes *C. felis felis* foram selecionados para ter seu DNA extraído: 120 pulgas provenientes de animais que residem no município de Seropédica-RJ, 38 pulgas da colônia laboratorial do LQEPV e 2 pulgas da colônia da Universidade da Califórnia. As pulgas inicialmente estavam armazenadas em álcool 70°, as pulgas então foram realocadas isoladamente em tubos de plástico e então colocadas em estufa à 56°C por um período mínimo de 5 minutos para secar totalmente o álcool usado como conservante. As pulgas já totalmente secas foram colocadas em tubo de tampa rosca com volume de 1,5 mL juntos com aproximadamente 50 mg “*glass beads*” (425-600 µm; Sigma-Aldrich) e 250 µL de Solução tamponada de fosfato (PBS) estéril (7,4 pH). O conteúdo do tubo foi homogeneizado por inversão e então foram posicionados no mini-Beadbeater-16 (Biospec; Bartlesville, OK, USA) e as pulgas foram maceradas por 2 ciclos de 1 minuto, sendo entre cada ciclo, os tubos contendo as amostras foram posicionadas em uma rack de gelo por 2 minutos (**Figura 4**).



**Figura 4.** Tubo de tampa rosca contendo pulga da subespécie *Ctenocephalides felis felis* com *glass beads* e PBS, pouco antes de ser colocado no Bead-beater-16.

Após o término da maceração no mini-beadbeater, foi realizado um “*spin*” das amostras em uma centrífuga por 10 segundos. Após isso, foi pipetado em cada um dos tubos, 20 µL de proteinase K (20 µg mL<sup>-1</sup>; Sigma-Aldrich) e 250 µL de tampão de lise 2 vezes (Tris-HCl 20mM pH 8,0, EDTA 20 mM pH 8,0, NaCl 400 mM e Dodecil Sulfato de Sódio 1%), foi realizado novamente o *spin* das amostras e foram incubados na estufa a 56°C *overnight*.

Foi realizado em uma capela de exaustão devido a toxicidade do Fenol, a fase de purificação, onde inicialmente foi pipetado 500 µL de Fenol tamponado (pH 7,4-7,8 BioAgency product # 11593) em cada tubo, os tubos foram homogeneizados no Bulletblender (Next Advance) na velocidade 5 por 1 minuto. Após a homogeneização, os tubos foram centrifugados em 16000 g x 10 minutos. Após a centrifugação, os tubos contendo as amostras passaram a apresentar duas fases no líquido, foi então pipetado 450 µL do líquido sobrenadante em um novo tubo, e nesse novo tubo foi adicionado 450 µL de fenol:clorofórmio (BioAgency product # 3879), o conteúdo foi novamente homogeneizado por agitação no Bulletblender na velocidade 5 por 1 minuto e, posteriormente, centrifugado a 16000 g x 10 minutos. O líquido apresentou duas fases, sendo pipetado 400 µL do sobrenadante em um novo tubo e foi adicionado 400 µL de isopropanol (MERCK) (**Figura 5**).



**Figura 5.** Capela de exaustão durante a realização dos procedimentos envolvendo fenol e fenol-clorofórmio devido à toxicidade destes compostos.

Então se aguardou um período de 20 minutos do tubo com o DNA e o isopropanol, após esse período os tubos foram centrifugados em 16000 g x 20 minutos, em seguida foi descartado o sobrenadante. Foi pipetado para dentro dos tubos, 750 µL de álcool 70°, sem

homogeneizar, os tubos foram centrifugados em 16000 g x 5 minutos. O processo foi repetido com o descarte do sobrenadante, a adição de 750 µL de álcool 70° e a centrifugação em 16000g x 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e os tubos ficaram invertidos sobre uma superfície coberta de papel toalha para escorrer o álcool, em seguida os tubos foram postos em uma estufa a 56°C para secar totalmente o álcool dos tubos, ficando apenas o DNA. Com a finalidade de ressuspender o DNA, foi então pipetado em cada tubo, 50 µL de solução tampão AE (Qiagen©), as amostras então foram refrigeradas *overnight*. No dia seguinte, as amostras foram aquecidas na estufa à 56°C por 10 minutos, foi dado um golpe sutil com o dedo indicador na amostra, foi realizado um *spin* e então as amostras foram congeladas.

### **3.6 Análises Moleculares**

#### **3.6.1 Avaliação da Qualidade de Extração**

Com a finalidade de avaliar a viabilidade do DNA 18S, foi realizada uma triagem com as amostras de DNA extraídas, foram submetidas a uma PCR para a identificação de sequências de DNA específicas para o gênero *Ctenocephalides* como descrito por Marrugal *et al.* (2013), os primers utilizados no estudo foi o forward NC5 (5'-GTAGGTGAAACCTGCGGAAGGATCATT-3') correspondendo à extremidade 3' conservada do ITS1 que flanqueiam a região 18S (Gasser, 1996) e o primer reverse foi ITS1rev (5'- GCT GCG TTC TTC ATC GACCC-3') correspondendo à extremidade 5' do gene 5.8S (Vobis, 2004).

##### *Mix da reação*

O mix utilizado na reação para cada amostra foi: Tampão de enzima 10x, 10 mM de dNTP; 50 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,5 mM de P1/P2, 1,5 µL DNA molde; 2,5 unidades de Taq DNA polymerase; e água para biologia molecular (Ultrapure DNase/Rnase Free). Para a PCR também foram colocados dois controles negativos denominados de água de dentro e água de fora. Sendo a água de dentro utilizada para confirmar que os elementos do mix estavam livres de DNA, já a água de fora, foi um tubo contendo água posto no ambiente para comprovar que o ambiente de processamento de amostras estavam livres de contaminação de DNA. Como controle positivo foram utilizadas pulgas recém coletadas da

colônia de *C. felis felis* do LQEPV e previamente congeladas, sem o uso de qualquer conservante.

### *PCR*

A região do DNA ribossomal (rDNA) foi amplificada com a utilização do termociclador (Biometra T-Gradient), com as seguintes condições: 94°C por 5 minutos (desnaturação), 35 ciclos de 94°C/15 segundos (s), 58°C/15s (anelamento), 72°C/25s (extensão) e após as repetições, 72°C/5 minutos. O produto esperado da reação é de aproximadamente 700 pares de base (pb).

### *Verificação em Gel de Agarose*

Foram coletados 5 µL do *amplicon* juntamente com 5 µL do tampão de amostra para DNA, para então serem posicionados nos poços do gel de agarose 1,5% contendo o tampão de corrida Tris-Aacetato com EDTA (TAE) (1X=40 mM Tris base; 40 mM ácido acético; 1 mM EDTA pH 8,0). O peso molecular dos *amplicons* foram estimados através da comparação com o marcador de peso molecular 100 pb GeneRuler Ladder DNA (Thermo Scinetific product # SM024). A corrida de eletroforese foi realizada com a tensão elétrica de 5V/cm. Após a corrida, os fragmentos de DNA junto ao gel foram colocados em um recipiente contendo Brometo de Etídio (BE: 0,5 µg/mL) por 10 minutos e então foi lavado em um recipiente contendo água por 30 minutos para tirar o excesso do Brometo de etídio. A leitura do gel foi realizada com o transiluminador (Loccus Biotecnologica).

### **3.6.2 Detecção da mutação do gene *Rdl* por PCR RFLP**

O protocolo seguido no presente estudo foi adaptado de Daborn *et al.* (2004), onde primer *forward* para a amplificação da região Exon 7 do *Rdl* foi o Ex7F (GAA ACT ATT CTC GCC TGG CGT GCG AG) e o *Reverse* foi o Exon7R (CTA ATA AAC TAG CGA ACA CCA TTA CG). Para a realização dessa reação foi utilizado um mix composto por: 10 x Tampão de enzima, 10 mM de dNTP, 50 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,5 mM de P1/P2, 1,5 unidades de Taq DNA polymerase; e água para biologia molecular (Ultrapure DNase/Rnase Free). Para cada reação foram utilizados 2,0 µL de DNA. Na reação da PCR foram utilizados dois controles negativos, a água de dentro e a água de fora, e como

controle positivo foi selecionada amostra de *C. felis felis* da colônia da Universidade da Califórnia, Riverside, a qual sabidamente contém a mutação no gene *Rdl* para resistência.

#### *PCR da reação*

A região do gene *Rdl* foi amplificado sobre as seguintes condições: 95°C por 5 minutos (desnaturação), 40 ciclos de 95°C/15s , 57°C/15s (anelamento), 72°C/15s (extensão), e após as repetições, 72°C por 5 minutos. O Produto estimado da reação é de 285 pb.

#### *Verificação em Gel de Agarose para amplificação do gene*

Para cada amostra, foram coletados 5,0 µL do *amplicon* e adicionados com 1,66 µL do tampão de amostra e 3,34 µL de água para biologia molecular para então serem posicionados nos poços do gel de agarose 1,5% contendo o tampão TAE. O peso molecular foi estimado através do marcador de peso molecular 100 pb GeneRuler Ladder DNA (Thermo Scinetific). A corrida de eletroforese foi feita por com a tensão elétrica de 5V/cm. Após a corrida, os fragmentos de DNA junto ao gel foram colocados em um recipiente contendo Brometo de Etídio (BE: 0,5 µg/mL) por 10 minutos e então foi lavado em um recipiente contendo água por 30 minutos para tirar o excesso do Brometo de etídio. A leitura do gel foi realizada através do transiluminador (Loccus Biotecnologica).

#### *Digestão por enzimas de restrição e Verificação em Gel de agarose*

Após a leitura do gel e a identificação de amostras que amplificaram, foram pipetadas 5,0 µL do *amplicon*, 5,68 µL de água para biologia molecular, 1,2 µL de tampão de enzima e 0,12 µL da enzima *BsmAI* (10 U/ mL). A nova mistura após homogeneizada e centrifugada, foi incubada por um período de duas horas para que ocorresse o processo de digestão. Posteriormente as amostras foram posicionadas nos poços do gel de agarose 2,5% contendo o tampão de corrida Tris-Borato com EDTA (TBE) (1X=89 mM Tris; 89 mM Ácido Bórico; 2 mM EDTA pH 8,0). A corrida de eletroforese foi realizada com uma tensão elétrica de 5V/cm por duas horas. Após a corrida, os fragmentos de DNA junto ao gel foram colocados em um recipiente contendo Brometo de Etídio por um período de 10 minutos, e então foi lavado em um recipiente contendo água por um período de 30 minutos para tirar o excesso do Brometo. A leitura do gel foi realizada através do transiluminador (Loccus Biotecnologica). Na ausência da mutação que confere resistência a inseticidas, as

pulgas revelam seus dois alelos como susceptíveis (SS), o gene *Rdl* permanece íntegro com 285 pb. Porém na presença de alteração do alelo conferindo resistência, o DNA é fragmentado em dois produtos (de 135 e 150 pb) pela enzima *BsmAI*. Enzima essa que tem como sítio de ação a sequência específica “5’-GTCTC (N1/5)-3’”. Há também a possibilidade das pulgas possuírem ambos os alelos contendo a mutação (RR) ou heterozigotos para apenas um alelo com a mutação (RS).

### **3.6.3 Detecção de *Rickettsia* spp em amostras de DNA de pulgas**

É protocolo de rotina do LBioMOL realizar PCR RFLP para a detecção de *Rickettsia* spp. em DNA de ectoparasitos que são extraídos no próprio laboratório. Com a finalidade de enriquecer mais o trabalho, foi realizado o protocolo de Santolin *et al.* (2013). Primeiramente, o objetivo foi amplificar os genes *htrA* e *ompB*, a quais estão presentes em todas as espécies de *Rickettsia*. Os primers utilizados para *htrA* foram *forward* 17KD (GGA ACC AGG CGG TAT GAA TAA) e o *reverse* 17KD (ACT TGC CAT AGT CCG TCA GG). Já o gene *ompB*, possui como primer *forward* 120-M9f (ATG GCG AAT ATT TCT CCA AAA) e como *reverse* R .r 120-807 (5’AGT GCA GCA TTC GCT CCC CCT). Para a amplificação de ambos os genes, foi utilizado um mix composto por: Tampão de enzima 1x, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 μM de dNTP, 20 pmoles de cada um dos primers, 1 unidade de DNA Taq polimerase, 2,0 μL de DNA e água para biologia molecular (Ultrapure DNase/Rnase Free).

#### *PCR da reação*

As regiões dos genes *htrA* e *ompB* foram amplificadas sobre as seguintes condições: 95°C por 5 minutos (desnaturação), 40 ciclos de 95°C/20s, 52°C/20s (extensão), e após as repetições 72°C por 5 minutos. Os produtos estimados são de 407 e 856 pb para *htrA* e *ompB* respectivamente.

#### *Verificação em Gel de Agarose para amplificação do gene*

Os produtos da PCR foram posicionados no gel de agarose 1,5% contendo tampão de TAE. O peso molecular foi estimado através do molecular 100 pb GeneRuler Ladder DNA. A corrida de eletroforese foi realizada com tensão elétrica de 5V/cm por 60 minutos. Após a corrida, os fragmentos de DNA foram colocados no BE durante 10 minutos, em

seguida foram submersos em água destilada por 30 minutos para remoção do excesso de BE. A análise do gel foi realizada através do transiluminador (Loccus Biotecnologica).

#### *Digestão por enzimas de restrição e Verificação em Gel de agarose*

Após a confirmação da amplificação do DNA para *Rickettsia*, foi empregado a técnica do uso de endonucleases de restrição *MspI* e *Rsal* para gerar novos fragmentos de banda de DNA, os quais foram usados para identificar as espécies de *Rickettsia*. As espécies de *Rickettsia* investigadas foram: “*Candidatus Rickettsia amblyomii*”, *Rickettsia belli*, *Rickettsia felis*, *Rickettsia massilae*, *Rickettsia monteiroi*, *Rickettsia parkeri*, *Rickettsia rhipicephali*, *Rickettsia rickettsii* e *Rickettsia* cepa sp. Pampulha.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Ensaio Toxicológico

Após o período de 24 horas da exposição das pulgas a diferentes concentrações de Fipronil, foi avaliada a proporção de pulgas vivas e pulgas mortas em cada grupo. O valor de eficácia foi calculado através da fórmula: Eficácia (%) = [(número médio de pulgas vivas no grupo controle – número médio de pulgas vivas no grupo tratado) / número médio de pulgas vivas do no grupo controle] x 100 (Abbot, 1925). Foi realizada então uma nova análise 48 horas após a incubação das pulgas junto com o Fipronil. Os valores estão descritos na **Tabela 1**.

**Tabela 1.** Eficácia do Fipronil em teste toxicológico *in vitro* em *Ctenocephalides felis felis* através da exposição a tiras de papel impregnadas com o princípio ativo em diferentes concentrações após períodos de 24 horas e 48 horas.

Grupo	Número de pulgas desafiadas	Número de pulgas mortas		Eficácia(%)	
		24 horas	48 horas	24 horas	48 horas
Controle	120	2	2	-	-
Concentração de Fipronil (ppm)					
0,091	120	2	6	0	0,03
1,5625	120	7	11	0,04	0,07
3,125	120	1	8	0,00	0,05
6,25	120	11	31	0,07	0,24
12,5	120	15	76	0,11	0,62
25	120	30	110	0,23	0,91
50	120	86	118	0,71	0,98

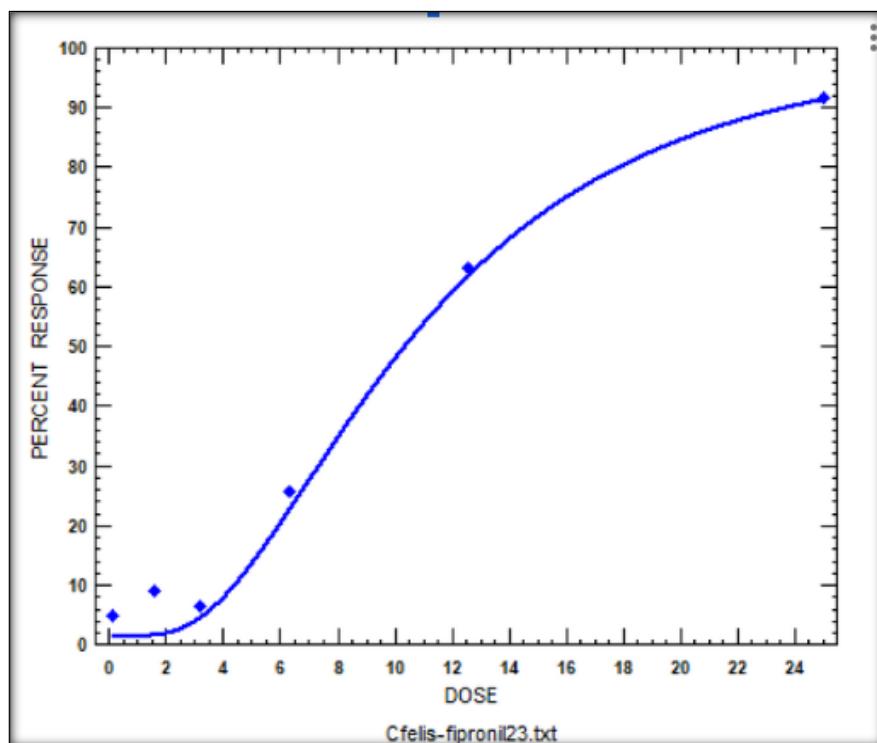
Com os dados de avaliação em 48 horas, foi determinada através da análise de Probit pelo programa PoloPlus a concentração letal de 50% ( $CL_{50}$ ), 90% ( $CL_{90}$ ), 95% ( $CL_{95}$ ) e 99% ( $CL_{99}$ ) de Fipronil para *C. felis felis* da colônia laboratorial UFRRJ. O Ensaio foi realizado em dois momentos diferentes, sendo utilizadas 60 pulgas em cada um deles, a **Tabela 2** detalha os resultados do teste.

**Tabela 2.** Estimativa de concentrações letais de Fipronil para *Ctenocephalides felis felis* após 48 horas de exposição.

$CL_{50}$ (IC 50%) ppm	$CL_{90}$ (IC 90%) ppm	$CL_{95}$ (IC 95%) ppm	$CL_{99}$ (IC 99%) ppm	Qui- Quadrado	Heterogeneidade
10,39 (8,23 – 12,66)	23,71 (18,41 – 37,5)	29,95 (22,19- 53,17)	46,43 (31,13- 103,544)	7,08	1,77

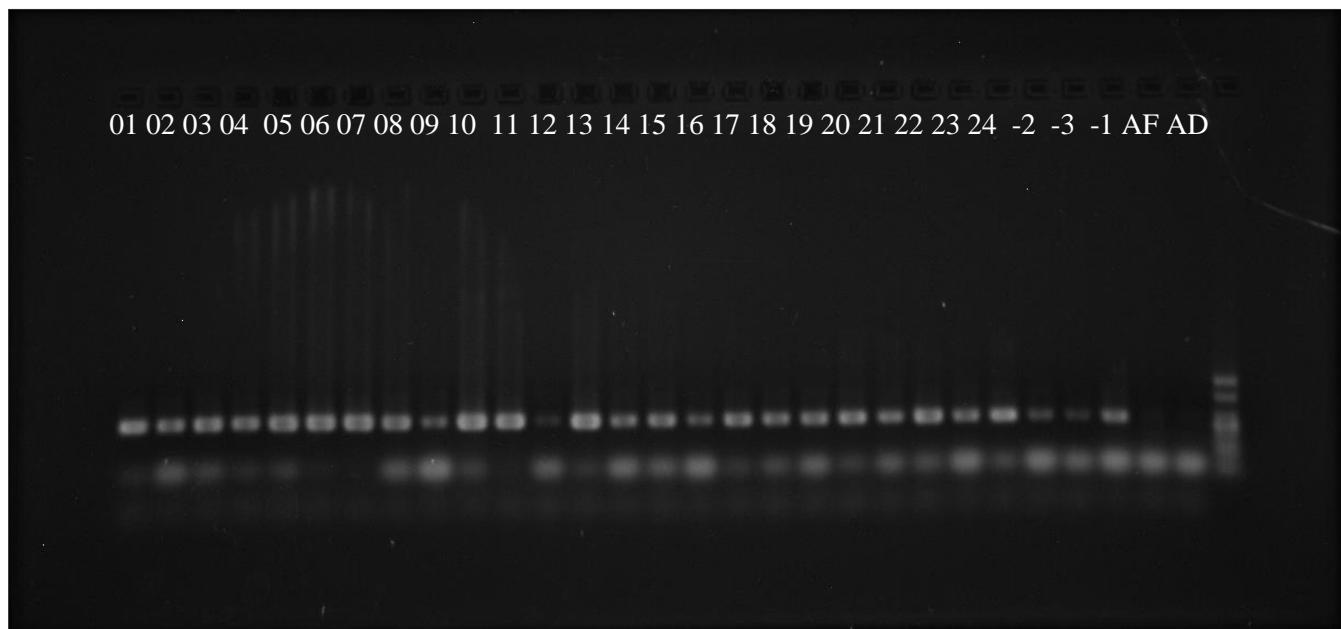
O **Gráfico 1** apresenta a relação entre a concentração do Fipronil e a mortalidade observada nas pulgas submetidas ao teste.

**Gráfico 1.** Curva gerada pelo programa PoloPlus Version 1.0, apresenta um padrão de toxicidade levando em consideração o percentual de pulgas mortas (eixo Y) e dose em ppm de Fipronil (eixo X).



## 4.2 Análises Moleculares

Um total de 158 amostras de DNA de *C. felis felis* da cepa laboratorial e cepa campo foram analisadas junto com 2 pulgas de controle positivo, todas as pulgas amplificaram para gene *Rdl* através do primer Exon 7 como exemplificado na **Figura 6**.



**Figura 6.** Produto de amplificação de 285 pb pelo primer Exon 7, amostras 1-7; 12-21 (cepa campo), 22, 23, 24 8-9 (cepa laboratorial), 10-11 (cepa California), o controle positivo de DNA de *Ctenocephalides felis felis* foi feito diferentes diluições, com a finalidade de calcular o limite de detecção do DNA: -1 (1:10), -2 (1:100), -3 (1:1000), AF (água de fora) e AD (água de dentro).

Após a confirmação da amplificação, os *amplicons* passaram pelo processo de digestão pela enzima *BsmAI*, a visualização da corrida no gel pode ser exemplificada na **Figura 7**.



**Figura 7** – Em relação a identificação das amostras: 1-5 (cepa campo), 6-19 (cepa laboratorial), 20 (cepa Califórnia). Já as bandas de DNA após digestão, gerou os genótipos RR para as amostras 1-12; 14-15; 17-19 (produtos de 135 e 150 pb gerados), genótipo SS para as amostras 13 e 16 (produtos não digeridos de 285 pb) e genótipo RS para a amostra 20 (um produto não cortado de 285 e dois produtos de 135 e 150 pb) (Daborn, 2004).

Foram analisadas um total de 158 amostras, sendo 120/158 (75,94%) amostras provenientes de pulgas da cepa campo e 38/158 (24,05%) foram originadas da colônia laboratorial do LQEPM. Os genótipos para pulgas nesse estudo foram classificadas como homozigotos, heterozigotos e susceptíveis. Foram avaliados diferentes genótipos do gene *Rdl* para cada uma das amostras, estando os resultados descritos na **Tabela 3**.

É importante citar que desse total de 38 pulgas da cepa laboratorial, 24 pulgas foram coletadas após o bioensaio envolvendo a CL<sub>50</sub> e a CL<sub>90</sub> calculada através do primeiro teste *in vitro*, foram analisadas seis pulgas vivas e seis pulgas mortas de cada concentração letal para avaliar possível diferença nos genes, mas todas as amostras possuíam genes homozigotos que deveriam tornar as pulgas totalmente resistentes ao Fipronil. As outras 14 pulgas restantes da colônia, foram pulgas aleatórias testadas para o estudo.

**Tabela 3.** Distribuição do número de pulgas pertencentes a cepa laboratorial e a cepa campo, classificando as pulgas com alelos que tornam suscetíveis ao Fipronil (SS), gene heterozigoto com um dos alelos que tornam as pulgas resistentes ao Fipronil (RS) e genes homozigotos para resistência (RR).

Cepa	Genótipo			Total
	SS	RS	RR	
<b>Campo</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>109</b>	<b>120</b>
<b>Laboratorial</b>	<b>2</b>	-	<b>36</b>	<b>38</b>
<b>Total</b>	<b>7</b>	<b>6</b>	<b>145</b>	<b>158</b>

Foram utilizadas para análises moleculares duas pulgas por animal de um total de 60 animais provenientes da região metropolitana do Rio de Janeiro. Sendo 91,67% (55/60) das pulgas estavam parasitando cães, e 8,33% (5/60) das pulgas foram encontradas em gatos. Considerando que das 120 pulgas totalizadas no estudo, 110 são de cães e 10 são de gatos, a distribuição de pulgas em cães ficou com 90,90% (100/110) para pulgas com o genótipo de RR, 4,54% (5/110) para SS e 4,54% (5/110) para RS. Já em gatos, a proporção ficou de 90% (9/10) para RR e 10% (1/10) para RS.

Em relação a detecção de bactérias do gênero *Rickettsia* a única espécie detectada foi *Rickettsia felis*, a identificação desta espécie foi realizada através da técnica de Santolin *et al.* (2013), amplicon *htrA* foi fragmentado pela enzima *MspI* (gerando 250, 157 e 50 pb) e pela *RsaI* (298, 82, 27 PB). O amplicon *ompB* também foi digerido pela *MspI* (363, 309, 87, 63 e 40 pb) e *RsaI* (599, 174 e 89 pb). Das pulgas da colônia do LQEPV, 94,73% (36/38) possuíam DNA de *R. felis*. As duas pulgas consideradas negativas para esse micro-organismo foram recuperadas do teste *in vitro*, que foram uma pulga viva recuperada da CL<sub>90</sub> e uma pulga morta recuperada da CL<sub>50</sub>. Na análise em pulgas da cepa campo, 27,50% (33/120) das pulgas possuíram o DNA amplificado para *R. felis*. Essas mesmas pulgas distribuídas em 40,0% (24/60) animais.

## 5 DISCUSSÃO

O presente estudo estimou uma variedade de resultados de concentrações letais para que pudessem ser comparadas com outros dados de maneiras diferentes. A técnica de impregnação em papel filtro é recomendada pela OMS para a avaliação de susceptibilidade ou resistência em artrópodes para diferentes inseticidas (WHO, 2012) e por ser um método que expõe o químico diretamente às pulgas, pode fornecer dados com menos fatores de interferência em relação à susceptibilidade das pulgas ao Fipronil. As diferentes concentrações utilizadas foram essenciais para estimar com maior precisão os valores de concentração letal. Em relação às análises moleculares, realizar a triagem através do método de Marrugal *et al.* (2013) foi necessário para analisar a qualidade de extração do DNA das amostras, em especial porque algumas pulgas permaneceram conservadas no álcool 70° por um período longo aproximado de 1 ano.

No que se refere à caracterização toxicológica da cepa laboratorial de *C. felis felis*, o estudo estimou a CL<sub>99</sub> em 46,43 ppm, um valor inferior aos 400 ppm estabelecidos por Batista *et al.* (2016), concentração essa para estabelecer uma mortalidade de 100% de *C. felis felis* expostas ao Fipronil através da mesma técnica de bioensaio. Já no estudo de Rust *et al.* (2015), os testes toxicológicos foram realizados em pulgas da colônia laboratorial de Auburn, sendo conduzido através da exposição de cada pulga a diferentes concentrações de Fipronil. O estudo de Rust *et al.* resultou em uma estimativa de CL<sub>95</sub> de 0,76 ng/µL (76 ppm), sendo nesse mesmo estudo, as pulgas foram classificadas como sensíveis ao Fipronil. Esse valor é mais que o dobro dos 29,95 ppm estimados para a CL<sub>95</sub> em pulgas da colônia do LQEPV, sugerindo que, para análises toxicológicas, as pulgas avaliadas podem ser consideradas sensíveis ao Fipronil.

Por outro lado, as CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub> foram estimadas para se poder realizar um novo teste *in vitro*, dessa vez com a finalidade foi recuperar pulgas vivas e mortas do ensaio para posteriormente realizar as análises moleculares. Além da finalidade de detectar a presença da mutação nas pulgas da colônia do LQEPV, realizar o teste em pulgas vivas e mortas poderia oferecer com mais precisão o grau de tolerância de resistência, por esse motivo foram selecionadas essas concentrações em específico. No presente estudo, todas as pulgas vivas ou mortas recuperadas no bioensaio, possuíam o genótipo RR. Esses dados sugerem que essa mutação que confere resistência a outros insetos como a mosca-doméstica (*Musca domestica*), barata americana (*Periplaneta americana*) e *Aedes aegypti* (Bass, 2004), pode

não ser o suficiente para conferir resistência em *C. felis felis* ao Fipronil no presente estudo.

Zhao *et al.* (2004) descreve que o Fipronil possui outros dois sítios de ação em artrópodes além dos canais de cloreto do GABA, sendo eles os canais de cloreto controlados por glutamato. Sugerindo que, apesar da mutação do GABA, o Fipronil tem outros alvos para atingir os insetos. É importante citar que mais estudos como o sequenciamento do gene estudado pode detectar outros possíveis pontos de mutação que possam estar presentes apenas nas pulgas vivas recuperadas no bioensaio, conferindo a resistência. Entre os fatores que podem interferir nessa resistência é a presença de endossimbiontes facultativos como *Wolbachia* e *Rickettsia*. Essa interação com diferentes microorganismos podem tanto aumentar ou diminuir a susceptibilidade aos inseticidas através de efeitos no sistema imune, metabolismo e expressão gênica nos insetos (Liu,.; Guo, 2019).

Os resultados deste estudo demonstram que a mutação no gene *Rdl* para resistência a ciclodienos está presente no Brasil. Em relação às pulgas da cepa laboratorial, 94,73% (36/38) eram homozigotas para mutação no gene, esses resultados são semelhantes a de outras colônias laboratoriais descritas na literatura. Daborn *et al.* (2004) descreveu que 97,4% das pulgas de colônia laboratorial da Califórnia (EUA) eram homozigotas para a mutação. No estudo de Brunet *et al.* (2009), todas as 6 colônias laboratoriais localizadas na Europa e nos EUA testadas, apresentaram 100% das pulgas com homozigose para a mutação. Os autores supracitados mencionam que essas colônias como isoladas e com pulgas livres de tratamento para Ciclodienos ou para Fipronil, sendo algumas dessas colônias fundadas na década de 80 e 90. A colônia laboratorial do LQEPV foi criada em 1998, e é uma colônia livre do tratamento de Ciclodienos, isso sugere que no momento que as pulgas obtidas a décadas atrás já estavam sob pressão de seleção para esse gene em específico.

A classificação de uma cepa como resistente ou suscetível pode utilizar diferentes critérios, os estudos de Brunet *et al.* (2009), Bass *et al.* (2004) e Daborn *et al.* (2004) apenas classificam cepas como resistentes após a recuperação de pulgas vivas de animais após 28 dias após o tratamento com Fipronil. As colônias laboratoriais do estudo de Brunet *et al.* (2009), classificou as 6 colônias estudadas como suscetíveis apesar de 100% de todas as pulgas possuírem homozigose para os alelos RR. Mas é importante citar que diversos fatores podem influenciar na quantidade de pulgas, como resistência individual

dos animais à infestação, interação de animais com o ambiente e a outros animais, tipo do pelo, histórico de tratamento, entre outros (Marchiondo, 2013). Esses fatores podem sugerir que a quantidade de pulgas recuperadas nos animais que não estejam exclusivamente relacionada à resistência/susceptibilidade de ectoparasitos a fármacos, apesar de também ser um indício importante.

A predominância da mutação em pulgas da cepa campo (90,83%) para a homozigose pode sugerir que esse perfil genômico continua estável no ambiente. Pelo fato do uso de ciclodienos no tratamento contra pulgas estará defasado (Bass *et al.*, 2004) isso abre questionamentos se a predominância desse genótipo está relacionada a fatores como: seleção cruzada por outros fármacos como o Fipronil, contato de pulgas em um mesmo ambiente onde ciclodienos são utilizados no controle de outros insetos (como formigas, baratas e cupins) (Bass *et al.*, 2004), ou uma estabilidade genotípica garantida pelo uso de ciclodienos décadas atrás. É importante citar que no estudo de Rust *et al.* (2015), 10 cepas diferentes de pulgas obtidas de diferentes continentes (Oceania, Europa e América do norte), tiveram diferentes percentuais para predominância do genótipo RR, de 0-100% das amostras analisadas.

A associação entre *C. felis* e *R. felis*, foi descrita, sendo o único ectoparasito confirmado como transmissor dessa bactéria em estudo experimental, tanto transmissão vertical como horizontal (Legendre; Macaluso, 2017). Espécies de *Rickettsia* podem permanecer em pulgas por toda sua vida sem causar dano direto (Azad, 1997), porém ainda não está totalmente esclarecido o papel dela na epidemiologia das pulgas. Pelo fato de *R. felis* ser encontrada em 94,73% (36/38), surge o questionamento de que a presença da bactéria pode estar relacionada à susceptibilidade das pulgas frente a inseticidas. Diferentes espécies de *Rickettsia* foram associadas com o aumento da susceptibilidade de insetos a diferentes inseticidas (Kontsedalov, 2008). Havendo então a possibilidade de que a presença de *Rickettsia* poderia sobressair ao fator genético de resistência. A predominância de *R. felis* nas pulgas de cepa laboratorial também pode indicar que o gato doméstico (*Felis catus*), pode ter papel na epidemiologia de *R. felis*, uma vez que as pulgas do laboratório são recuperadas de gatos.

O percentual de *R. felis* em pulgas da colônia laboratorial é considerado alto em comparação ao percentual de detectado em pulgas no campo (27,50%), isso pode ser explicado por ser uma colônia isolada, onde não há introdução de novas cepas de pulgas, esse fato contribui pelas pulgas possuírem características semelhantes em relação a sua

microbiota. O percentual de detecção de *Rickettsia felis* pode variar de acordo com a região de coleta, o estudo de Horta *et al.* (2014) desmonstrou percentuais entre 19,7 e 71,2% em diferentes regiões do Brasil, sendo a cidade do Rio de Janeiro com 11,50% das pulgas com amplificação para *R. felis*. O papel de *R. felis* para *C. felis felis* ainda não é bem esclareida, e esses diferentes percentuais podem sugerir que *R. felis* não seja um endossimbionte obrigatório para pulgas.

## **6 CONCLUSÃO**

Pode-se concluir que a cepa laboratorial de *C. felis felis*, pertencente ao LQEPV, ainda é considerada susceptível ao Fipronil em comparação a outros cepas laboratoriais no mundo.

A mutação do gene *Rdl* foi detectada na grande maioria das pulgas da cepa laboratorial, sendo assim, a mutação de forma isolada não confere resistência de *C. felis felis* ao Fipronil.

O genótipo RR foi detectado em na grande maioria das pulgas pertencentes a cepa laboratorial e a cepa campo, podendo significar que as pulgas passam constatadamente por pressão de seleção.

A presença de *R. felis* pode estar influenciando na susceptibilidade de *C. felis felis* ao Fipronil.

## **7 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

As perspectivas futuras desse trabalho envolve a investigação de outras possíveis mutações possam estar envolvidados na susceptibilidade de pulgas ao Fipronil. Essa abordagem pode caracterizar possíveis marcadores moleculares que possam ser usado no monitoramento de *C. felis felis*.

Outro aspecto importante é possível desempenho que os micro-organismos podem ter na susceptibilidade ou resistência das pulgas aos fármacos. Seriam necessários novos ensaios toxicológicos com grupos de pulgas com a presença e a ausência desses organismos.

Sendo assim, seriam necessários novos estudos para dar continuidade a investigação dos mecanismos de resistência que as pulgas possuem contra o Fipronil.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, W. S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **Journal of Economic Entomology**, v. 18, n. 2, p. 265-267, 1925.

ABBOTT, R. C. et al. Experimental and natural infection with *Bartonella henselae* in domestic cats. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 20, n. 1, p. 41-51, 1997.

AHN, K.-S. et al. *Ctenocephalides canis* is the dominant flea species of dogs in the Republic of Korea. **Parasites & Vectors**, v. 11, n. 1, 2018.

ALHO, A. M. et al. Dipylidium caninum, da ingestão da pulga ao controle do cestóide mais comum do cão e do gato. **Clínica Animal**, v. 1, p. 26-29, 2015.

ARAÚJO, F. R. et al. Severe cat flea infestation of dairy calves in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 80, n. 1, p. 83–86, 1998.

AZAD, A. F. Epidemiology of murine typhus. **Annual Review of Entomology**, v. 35, n. 1, p. 553–569, 1990.

AZAD, A. F. et al. Flea-borne rickettsioses: ecologic considerations. **Emerging Infectious Diseases**, v. 3, n. 3, p. 319-327, 1997.

BASS, C. et al. Identification of mutations associated with pyrethroid resistance in the para-type sodium channel of the cat flea, *Ctenocephalides felis*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 34, n. 12, p. 1305–1313, 2004.

BEHAR, A. et al. *Rickettsia felis* infection in a common household insect pest, *Liposcelis bostrychophila* (Psocoptera: Liposcelidae). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 7, p. 2280–2285, 2010.

BENNET-CLARK, H. C.; LUCEY, E. C. A. The jump of the flea: A study of the energetics and a model of the mechanism. **The Journal of Experimental Biology**, v. 47, n. 1, p. 59–76, 1967.

BERTI, J.; MANZO, D.; RAMOS, M.; GUERRA, L. A. Eficacia y actividad residual del regulador de crecimiento pyriproxyfen sobre larvas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) en condiciones de laboratorio. **Boletín de Malariología y Salud Ambiental**, v. 53, n. 1, p. 56–64, 2013.

BLAND, D. M.; HINNEBUSCH, B. J. Feeding Behavior Modulates Biofilm-Mediated Transmission of *Yersinia pestis* by the Cat Flea, *Ctenocephalides felis*. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 10, n. 2, 2016.

BLANTON, L. S. The rickettsioses: A practical update. **Infectious disease clinics of North America**, v. 33, n. 1, p. 213–229, 2019.

BOSSARD, R. L. et al. Insecticide susceptibilities of cat fleas (Siphonaptera: Pulicidae) from several regions of the United States. **Journal of Medical Entomology**, v. 39, n. 5, p. 742–746, 2002.

BOSSARD, R. L. et al. Review of insecticide resistance in cat fleas (Siphonaptera: Pulicidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 35, n. 4, p. 415–422, 1998.

BOWMAN, D. D. **Georgis' Parasitology for Veterinarians - Elsevier eBook on Vitalsource (Retail Access Card)**. 10. ed. [s.l.] Saunders, 2013.

BROWN, A.W.A.; PAL, R. **Resistência a inseticidas em artrópodes**. 2<sup>a</sup> ed. Genebra: Organização Mundial da Saúde; 1971.

BRUNET, S. et al. *Rdl* gene polymorphism and sequence analysis and relation to in vivo fipronil susceptibility in strains of the cat flea. **Journal of Economic Entomology**, v.102, n. 1, p. 366-372, 2009.

BURDEN, G. S.; SMITTLE, B. J. Laboratory methods for evaluation of toxicants for the bed bug and the oriental rat flea. **Journal of Economic Entomology**, v. 61, n. 6, p. 1565–1567, 1968.

BUSVINE, J. R.; LIEN, J. Methods for measuring insecticide susceptibility levels in bed-bugs, cone-nosed bugs, fleas and lice. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 24, p. 509–517, 1961.

COLE, L. M. et al. Action of phenylpyrazole insecticides at the GABA-gated chloride channel. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 46, n. 1, p. 47–54, 1993.

COLLART, M. G.; HINK, W. F. Development of resistance to malathion in cat flea (Siphonaptera: Pulicidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 79, n. 6, p. 1570–1572, 1986.

COUSTAU, C.; FFRENCH-CONSTANT, R. Detection of cyclodiene insecticide resistance-associated mutations by single-stranded conformational polymorphism analysis. **Pesticide Science**, v. 43, n. 4, p. 267–271, 1995.

CRUZ-VAZQUEZ, C. et al. Seasonal occurrence of *Ctenocephalides felis felis* and *Ctenocephalides canis* (Siphonaptera:Pulicidae) infesting dogs and cats in an urban area in Cuernavaca, Mexico. **Journal of Medical Entomology**, v. 38, n. 1, p. 111–113, 2001.

CUNNINGHAM, J. et al. Residual efficacy of Frontline Top Spot for the control of fleas and ticks in the dog. **Proceedings of the North American Veterinary Conference**, Orlando, 11-15, 1997.

DABORN, P. et al. Detection of insecticide resistance-associated mutations in cat flea *Rdl* by TaqMan-allele specific amplification. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 79, n. 1, p. 25–30, 2004.

DAVIES, T. G. E. et al. Knockdown resistance to DDT and pyrethroids: from target-site mutations to molecular modelling. **Pest Management Science**, v. 64, n. 11, p. 1126–1130, 2008.

DEAN, K. R. et al. Human ectoparasites and the spread of plague in Europe during the Second Pandemic. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115, n. 6, p. 1304–1309, 2018.

DIEPENS, N. J. et al. Pet dogs transfer veterinary medicines to the environment. **The Science of the Total Environment**, v. 858, n. 1, 2023.

DRYDEN, M. Biology of fleas of dogs and cats. **Compendium of Continuing Education Practice Veterinarian**, [s.l.], v. 15, p. 569–579, 1993.

DRYDEN, M. W. et al. Efficacy of fluralaner flavored chews (Bravecto) administered to dogs against the adult cat flea, *Ctenocephalides felis felis* and egg production. **Parasites & Vectors**, v. 8, n. 1, p. 364, 2015.

DRYDEN, M. W.; GAAFAR, S. M. Blood consumption by the cat flea, *Ctenocephalides felis* (Siphonaptera: Pulicidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 28, n. 3, p. 394–400, 1991.

DYER, R. E. et al. Typhus fever: Transmission of endemic typhus by rubbing either crushed infected fleas or infected flea feces into wounds. **Public Health Reports**, v. 47, n. 3, p. 131, 1932.

EISELE, M. et al. Investigations on the biology, epidemiology, pathology and control of *Tunga penetrans* in Brazil: I. Natural history of tungiasis in man. **Parasitology Research**, v. 90, n. 2, p.87-99, 2003.

ELLWANGER, J. H.; CHIES, J. A. B. Zoonotic spillover: Understanding basic aspects for better prevention. **Genetics and Molecular Biology**, v. 44, n. 1 Suppl 1, p. e20200355, 2021.

FELDMEIER, H. et al. Investigations on the biology, epidemiology, pathology and control of *Tunga penetrans* in Brazil: IV. Clinical and histopathology. **Parasitology Research**, v. 94, n. 4, p. 275–282, 2004.

- FINKELSTEIN, J. L. et al. Studies on the growth of *Bartonella henselae* in the cat flea (Siphonaptera: Pulicidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 39, n. 6, p. 915–919, 2002.
- FLORIN, T. A. et al. Beyond cat scratch disease: widening spectrum of *Bartonella henselae* infection. **Pediatrics**, v. 121, n. 5, p. e1413-25, 2008.
- GASSER, R. B. et al. Fingerprinting sequence variation in ribosomal DNA of parasites by DGGE. **Molecular Cell Probes**, v. 10, p. 99–105, 1996.
- GUNASEKARA, A. S. et al. Environmental fate and toxicology of fipronil. **Journal of Pesticide Science**, v. 32, n. 3, p. 189–199, 2007.
- GUPTA, R. C.; ANADÓN, A. Fipronil. **Veterinary Toxicology**, p. 533–538, 2018.
- GUPTILL, L. Bartonella infections in cats: what is the significance? **In practice**, v. 34, n. 8, p. 434–445, 2012.
- HALLIWELL, R. E. W. Factors in the development of flea-bite allergy. **Veterinary Clinics of North America**, v. 79, p.1273- 1278, 1984.
- HAMZA, L. et al. WITHDRAWN: Understanding the epidemiology and molecular basis of the insecticides-resistance mechanisms in fleas. **New Microbes and New Infections**, 2018.
- HEMINGWAY, J. et al. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 34, n. 7, p. 653–665, 2004.
- HESS, A. D. Current status of insecticide resistance in insects of public health importance. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 2, n. 2, p. 311–318, 1953.

HINK, W. F.; NEEDHAM, G. R. Vacuuming is lethal to all postembryonic life stages of the cat flea, *Ctenocephalides felis*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 125, n. 2, p. 221–222, 2007.

HORTA, M. C. et al. *Rickettsia felis* in *Ctenocephalides felis felis* from Five Geographic Regions of Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 91, n. 1, p. 96–100, 2014.

KONTEDALOV, S. et al. The presence of Rickettsia is associated with increased susceptibility of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) to insecticides. **Pest Management Science**, v. 64, n. 8, p. 789-792, 2008.

KRÄMER, F.; MENCKE, N. **Flea Biology and Control: The biology of the cat flea control and prevention with imidacloprid in small animals**. 2001. ed. Berlim, Germany: Springer, 2012.

KRASNOV, B. R. **Functional and Evolutionary Ecology of Fleas: A model for ecological parasitology**. Cambridge, England: Cambridge University Press, 2009.

KUGELER, K. J. et al. Epidemiology of human plague in the United States, 1900-2012. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 1, p. 16–22, 2015.

LEGENDRE, K. P.; MACALUSO, K. R. *Rickettsia felis*: a review of transmission mechanism of na emerging pathogen, **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 2, n. 4, p. 64, 2017.

LINARDI, P. M.; GUIMARÃES, L. R. **Sifonápteros do Brasil**. In: MUSEU DE ZOOLOGIA USP/FAPESP (Org.). São Paulo: [s.n.], 2000. 155 p.

LINARDI, P. M.; SANTOS, J. L. C. *Ctenocephalides felis felis* vs. *Ctenocephalides canis* (Siphonaptera: Pulicidae): some issues in correctly identify these species. **Revista**

**Brasileira de Parasitologia Veterinaria [Brazilian Journal of Veterinary Parasitology]**, v. 21, n. 4, p. 345–354, 2012.

LINDEMANN, B. A.; MCCALL, J. W. Experimental *Dipetalonema reconditum* infections in dogs. **The Journal of Parasitology**, v. 70, n. 1, p. 167–168, 1984.

LIU, X. D.; GUO, H. F. Importance of endosymbionts *Wolbachia* and *Rickettsia* in insect resistance development. **Current Opinion in Insect Science**, v. 33, p. 84-89, 2019.

MARCHIONDO, A. A. et al. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) second edition: Guidelines for evaluating the efficacy of parasiticides for the treatment, prevention and control of flea and tick infestations on dogs and cats. **Veterinary Parasitology**, v. 194, p. 84-97, 2013.

MARSELLA, R. Advances in flea control. **The Veterinary clinics of North America. Small Animal Practice**, v. 29, n. 6, p. 1407–1424, 1999.

MARRUGAL, A. et al. Morphological, biometrical, and molecular characterization of *Ctenocephalides felis* and *Ctenocephalides canis* isolated from dogs from different geographical regions. **Parasitology Research**, v. 112, p. 2289–2298, 2013.

MARTINEZ, M. A. C. et al. Manifestations and management of flea-borne rickettsioses. **Research and Reports in Tropical Medicine**, v. 12, p. 1–14, 2021.

MEDEL-MATUS, J. S. et al. Receptor Gaba: implicaciones farmacológicas a nivel central. **Archivos de Neurociencia (Mex)**, v. 16, n. 1, p. 40-45, 2011.

MEDVEDEV, S. G. Specific features of the distribution and host associations of fleas (Siphonaptera). **Entomological Review**, v. 82, p. 1165-1177, 2002.

MÉNIER, K.; BEAUCOURNU, J.-C. Taxonomic study of the genus *Ctenocephalides* stiles & Collins, 1930 (Insecta: Siphonaptera: Pulicidae) by using aedeagus characters. **Journal of Medical Entomology**, v. 35, n. 5, p. 883–890, 1998.

MOORE, C. O. et al. Vector biology of the cat flea *Ctenocephalides felis*. **Trends in Parasitology**, v. 40, n. 4, p. 324–337, 2024.

NAPOLI, E. et al. Development of *Acanthocheilonema reconditum* (Spirurida, Onchocercidae) in the cat flea *Ctenocephalides felis* (Siphonaptera, Pulicidae). **Parasitology**, v. 141, n. 13, p. 1718–1725, 2014.

NARAHASHI, T. Neurophysiological effects of insecticides. Em: **Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology**. [s.l.] Elsevier, 2010. p. 799–817.

NG-NGUYEN, D. et al. Domestic dogs are mammalian reservoirs for the emerging zoonosis flea-borne spotted fever, caused by *Rickettsia felis*. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 4151, 2020.

OSBRINK, W. L.; RUST, M. K.; REIERSON, D. A. Distribution and control of cat fleas in homes in Southern California (Siphonaptera: Pulicidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 79, n. 1, p. 135–140, 1986.

PATERSON, S. Canine flea control: too much choice? **Companion Animal**, v. 24, n. 9, p. 452–457, 2019.

REIF, K. E.; MACALUSO, K. R. Ecology of *Rickettsia felis*: A review. **Journal of Medical Entomology**, v. 46, n. 4, p. 723–736, 2009.

ROBINSON, W. H. Integrated pest management in the urban environment. **American Entomologist**, v. 42, n. 2, p. 76–78, 1996.

ROUSSEAU, J. et al. *Dipylidium caninum* in the twenty-first century: epidemiological studies and reported cases in companion animals and humans. **Parasites & Vectors**, v. 15, n. 1, 2022.

RUSSELL, R.; OTRANTO, D.; WALL, R. **Encyclopedia of Medical and Veterinary Entomology**. Wallingford, England: CABI Publishing, 2013.

RUST, M. K. Advances in the control of *Ctenocephalides felis* (cat flea) on cats and dogs. **Trends in Parasitology**, v. 21, n. 5, p. 232–236, 2005.

RUST, M.K. The Biology and Ecology of Cat Fleas and Advancements in Their Pest Management: A Review. **Insects**, v. 8, n. 4, p. 118, 2017.

RUST, M. K. et al. Susceptibility of cat fleas (Siphonaptera: Pulicidae) to fipronil and imidacloprid using adult and larval bioassays. **Journal of Medical Entomology**, v. 51, n. 3, p. 638–643, 2014.

RUST, M. K. et al. Susceptibility of adult cat fleas (Siphonaptera: Pulicidae) to insecticides and status of insecticide resistance mutations at the rdl and knockdown resistance loci. **Parasitology Research**, v. 114, n. S1, p. 7–18, 2015.

RUST, M. K. Recent Advancements in the Control of Cat Fleas. **Insects**, v. 11, n. 10, p. 668, 2020.

SACHSE, M. M.; GULDBAKKE, K. K.; KHACHEMOUNE, A. *Tunga penetrans*: a stowaway from around the world. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology: JEADV**, v. 21, n. 1, p. 11–16, 2007.

SAENZ VERA, C. DDT in prevention of plague in Ecuador. **Boletin de la Oficina Sanitaria Panamericana. Pan American Sanitary Bureau**, v. 36, n. 2, p. 193–195, 1954.

SAMISH, M. et al. Biocontrol of the cat flea, *Ctenocephalides felis*, by entomopathogenic nematodes and fungi. **Biological Control: theory and applications in pest management**, v. 149, n. 104301, p. 104301, 2020.

SANTOLIN, I. D. A. C. et al. Detection and identification of *Rickettsia* agents in ticks collected from wild birds in Brazil by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) analysis. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 35, n. 2, 2013.

SAWICKI, R. M. Unusual response of DDT-resistant houseflies to carbinol analogues of DDT. **Nature**, v. 275, n. 5679, p. 443–444, 1978.

SCHEIDT, V. J. Flea allergy dermatitis. **The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice**, v. 18, n. 5, p. 1023–1042, 1988.

SHORETTE, K. Outcomes of global environmentalism: Longitudinal and cross-national trends in chemical fertilizer and pesticide use. **Social Forces: a scientific medium of social study and interpretation**, v. 91, n. 1, p. 299–325, 2012.

SIDDQUI, J. A. et al. Role of insect gut Microbiota in pesticide degradation: A review. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, 2022.

SILVERMAN, J.; RUST, M. K. Extended longevity of the pre-emerged adult cat flea (Siphonaptera: Pulicidae) and factors stimulating emergence from the pupal cocoon. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 78, n. 6, p. 763–768, 1985.

SILVERMAN, J. et al. Influence of temperature and humidity on survival and development of the cat flea, *Ctenocephalides felis* (Siphonaptera: Pulicidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 18, n. 1, p. 78–83, 1981.

SOCOLOVSCHI, C. et al. *Rickettsia felis*-associated uneruptive fever, Senegal. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 7, p. 1140–1142, 2010.

STEHR, C. M. et al. The developmental neurotoxicity of fipronil: notochord degeneration and locomotor defects in zebrafish embryos and larvae. **Toxicological Sciences: an official journal of the Society of Toxicology**, v. 92, n. 1, p. 270–278, 2006.

TAYLOR-WELLS, J. et al. The neonicotinoid imidacloprid, and the pyrethroid deltamethrin, are antagonists of the insect Rdl GABA receptor. **Journal of Neurochemistry**, v. 135, n. 4, p. 705–713, 2015.

VERIFIED MARKET REPORTS. Flea Control Products and Services Market. 2024. Disponível em: <https://www.verifiedmarketreports.com/pt/product/flea-control-products-and-services-market/>. Acesso em: 31 mar. 2025.

VOBIS, M. et al. Molecular phylogeny of isolates of *Ctenocephalides felis* and related species based on analysis of ITS1, ITS2 and mitochondrial 16S rDNA sequences and random binding primers. **Parasitology Research**, v. 94, p. 219–226, 2004.

WALL, R.; SHEARER, D. **Veterinary Entomology: Arthropod ectoparasites of veterinary importance**. Dordreque, Netherlands: Springer, 1997.

WANG, X. et al. Fipronil insecticide toxicology: oxidative stress and metabolism. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 46, n. 10, p. 876–899, 2016.

WHALON, M. E.; MOTA-SANCHEZ, D.; HOLLINGWORTH, R. M. (EDS.). **Global Pesticide Resistance in Arthropods**. [s.l.] Cabi, 2008.

WHO. Global Plan for Insecticide Resistance Management. 2012.

ZHAO, X.; YEH, J. Z.; SALGADO, V. L.; NARAHASHI, T. Fipronil is a potent open channel blocker of glutamate-activated chloride channels in cockroach neurons. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 310, n. 1, p. 192-201, 2004.

ZHU, F. et al. Insecticide resistance and management strategies in urban ecosystems. **Insects**, v. 7, n. 1, p. 2, 2016.

## ANEXO I – Certificado de aprovação da CEUA-IV-UFRRJ.



**UFRRJ**  
Universidade Federal Rural  
do Rio de Janeiro



Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

*Comissão de Ética no  
Uso de Animais*

### CERTIFICADO : EMENDA v22/12/2023

Certificamos que a EMENDA (versão de 22/12/2023) da proposta intitulada "Manutenção de colônia laboratorial da pulga Ctenocephalides felis felis em gatos", CEUA nº 4313110419 (ID 028407), sob a responsabilidade de **Thaís Ribeiro Correia Azevedo e equipe; Breno Gava Guimarães; Diefrey Ribeiro Campos** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos vigentes para sua apresentação, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), sendo assim **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (CEUA/UFRRJ) em 05/02/2024.

Pedido apresentado à CEUA: Venho por meio deste solicitar a prorrogação por mais 5 anos. A prorrogação se faz necessária por este projeto estar diretamente relacionado a execução de outros projetos de pesquisa que tem como parasito alvo a pulga Ctenocephalides felis felis. Exclusão de dois membros da equipe por obtenção do título.

Considerações da CEUA: Sugiro aprovação da emenda solicitando prorrogação do projeto. Relatório anterior enviado em novembro de 2023

Término previsto: 01/2029

Origem: Animais mantidos na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Espécie: Gatos sexo: Machos e Fêmeas idade: 6 a 96 meses Quantidade mantida: 0

Linhagem: Sem raça definida Peso: 2 a 7 kg

#### ANIMAIS UTILIZADOS

Gatos	Machos e Fêmeas	Total Aprovado	Quantidade Utilizada
		18	0

Seropédica, 15 de fevereiro de 2024

Prof. Dr. Fabio Barbour Scott  
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Viviane de Souza Magalhães  
Vice-Cordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

