

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

TESE

Transmissão Experimental de *Rickettsia parkeri* para *Rhipicephalus sanguineus* e
Amblyomma sculptum por Meio da Alimentação Artificial

Jaqueline Rodrigues de Almeida Valim

2018



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

Transmissão Experimental de *Rickettsia parkeri* para *Rhipicephalus sanguineus* e *Amblyomma sculptum* por Meio da Alimentação Artificial

JAQUELINE RODRIGUES DE ALMEIDA VALIM

Sob a Orientação do Professor
Adivaldo Henrique da Fonseca

Tese submetida como requisito parcial
para obtenção do grau de **Doutor em**
Ciências, no Curso de Pós-Graduação
em Ciências Veterinárias.

Seropédica, RJ
Março de 2018

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

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

R172t Rodrigues de Almeida Valim, Jaqueline , 1984-
Transmissão experimental de *Rickettsia parkeri*
para *Rhipicephalus sanguineus* e *Amblyomma sculptum*
por meio da alimentação artificial / Jaqueline
Rodrigues de Almeida Valim. - 2018.
71 f.: il.

Orientador: Adivaldo Henrique da Fonseca.
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do Rio
de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Veterinárias, 2018.

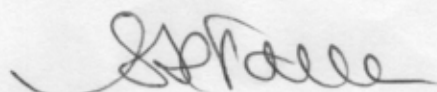
1. Ixodídeos. 2. Alimentação artificial. 3.
Caracterização. 4. Transmissão experimental. 5.
Vetores. I. Henrique da Fonseca, Adivaldo, 1953-,
orient. II Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Ciências
Veterinárias III. Título.

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

JAQUELINE RODRIGUES DE ALMEIDA VALIM

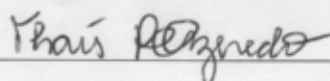
Tese submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Doutor em ciências**, no
Curso do Pós-graduação em Ciências Veterinárias.

TESE APROVADA EM 01/03/2018

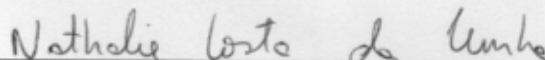


ADIVALDO HENRIQUE DA FONSECA (Dr). UFRRJ

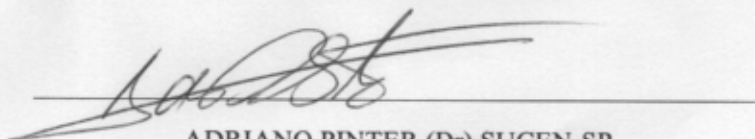
Orientador



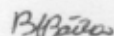
THAÍS RIBEIRO CORREIA AZEVEDO (Dr^a) UFRRJ



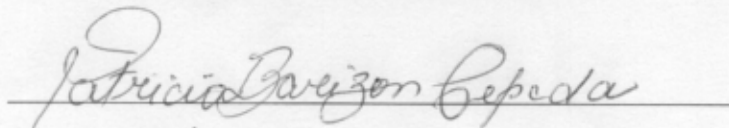
NATHALIE COSTA DA CUNHA (Dr^a) UFF



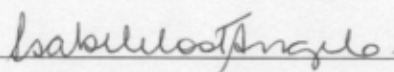
ADRIANO PINTER (Dr) SUCEN-SP



BRUNA DE AZEVEDO BAÊTA (Dr^a) USS



PATRÍCIA BARIZON CEPEDA (Dr^a) UBM



ISABELE DA COSTA ANGELO (Dr^a) UFRRJ

Aos meus pais, José de Almeida Valim e Irene Rodrigues de Almeida, pelo apoio e atenção que tiveram comigo em todos os momentos da minha vida sem o qual tudo isso jamais faria sentido;

"... Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus , não sou o que era antes..." Martin Luther King

É proibido

É proibido chorar sem aprender,

Levantar-se um dia sem saber o que fazer

Ter medo de suas lembranças.

É proibido não rir dos problemas

Não lutar pelo que se quer,

Abandonar tudo por medo,

Não transformar sonhos em realidade.

É proibido não demonstrar amor

Fazer com que alguém pague por tuas dúvidas e mau-humor.

É proibido deixar os amigos

Não tentar compreender o que viveram juntos

Chamá-los somente quando necessita deles.

É proibido não ser você mesmo diante das pessoas,

Fingir que elas não te importam,

Ser gentil só para que se lembrem de você,

Esquecer aqueles que gostam de você.

É proibido não fazer as coisas por si mesmo,

Não crer em Deus e fazer seu destino,

Ter medo da vida e de seus compromissos,

Não viver cada dia como se fosse um último suspiro.

É proibido sentir saudades de alguém sem se alegrar,

Esquecer seus olhos, seu sorriso, só porque seus caminhos se desconstruíram,

Esquecer seu passado e pagá-lo com seu presente.

É proibido não tentar compreender as pessoas,

Pensar que as vidas deles valem mais que a sua,

Não saber que cada um tem seu caminho e sua sorte.

É proibido não criar sua história,

*Deixar de dar graças a Deus por sua vida,
Não ter um momento para quem necessita de você,
Não compreender que o que a vida te dá, também te tira.
É proibido não buscar a felicidade,
Não viver sua vida com uma atitude positiva,
Não pensar que podemos ser melhores,
Não sentir que sem você este mundo não seria igual.*

Poema: É proibido

Autor: Pablo Neruda

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus que com seu amor sublime para com a minha vida me concede força pra superar os obstáculos e dificuldades da vida cotidiana.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, por oferecer um ensino público, gratuito e de qualidade, fundamental para minha formação profissional e por esses anos de amadurecimento.

Ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias e todo seu corpo docente pela minha formação na docência e na pesquisa.

Ao meu orientador, o professor Adivaldo Henrique da Fonseca, pela oportunidade oferecida, pelos ensinamentos e principalmente pelo bom convívio durante esses anos de trabalho e pela amizade sendo mais que um orientador, um grande amigo.

À professora Maria de Lurdes Azevedo Rodrigues por ter me acolhido no início dos meus passos no setor de Parasitologia Animal.

Aos colaboradores do laboratório de Doenças Parasitárias do Prédio do Projeto Sanidade Animal, Matheus Dias Cordeiro, Priscila Nunes, Carolina Marotta, Juliana Ferreira, Yuri Miguez, Priscila Ferreira, Yasmin Kalouchi, Izabela Mesquita, Márcio Barizon e Michele Bahia pelo auxílio indispensável durante toda a fase experimental deste trabalho e por estarem sempre dispostos a ajudar e principalmente a Charles Passos Rangel que mesmo estando longe contribuiu com incentivo e ânimo para o desenvolvimento do estudo e manutenção desta linha de pesquisa.

A todos os funcionários da secretaria do DPA pelo auxílio e demais funcionários do Departamento de Parasitologia Animal, em especial aos funcionários Ivan Serafim, Maurício Souza e Ivone pelo carinho.

Ao setor de cunicultura em especial aos funcionários Sr. Pedro e Sr. Natalino pelo fornecimento dos animais utilizados no estudo.

À Marília Massard da Fonseca, pela forma amorosa que sempre nos recebeu em sua casa.

À professora Lucia Pintos do Departamento de Microbiologia e Imunologia da UFRRJ pelo interesse por esta linha de pesquisa e pela parceria.

Aos grandes amigos do Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UFRRJ, Vivian Suane, Aline Quintanilha, Patrícia Barizon Cepeda, Camila Pantoja, Thiago Pedro, Marcio Barizon Cepeda, Paulo César Magalhães Mattos, Andrea Silveira, Jenevaldo Barbosa da Silva, Neide Gomes e Fabíola Mattos pelos momentos de descontração compartilhados e por me ajudarem a evoluir emocional e espiritualmente.

Aos grandes e eternos amigos conquistados desde a minha chegada à Universidade Rural, Renata Lanna dos Santos, Natália Lores, Ana Carolina de Moraes, Daniele Regis, Simone Bizerra Calado, Jully Aparecida Silva de Moraes, Fabrícia Ferreira e Ferreira, George Eduardo Gabriel Kluck, Guinever Eustáquio do Império, Gabrielle Friess, Aluísio Alves, Nathalia Carvalho, Jéssica Ferreira, Constanza Villardi, Andressa Guimarães, Andressa Mothé, Dwany Carvalho, Gabriela Oliveira, Monique Lambert, Leonardo Rossini, Ricardo Oliveira, Taiana

Rodrigues e Adriano Coimbra bem como os demais integrantes da turma Med. Vet. 2006 I pelos 6 anos de convivência.

À Jéssica Natasha e Sheila Segóvia pela amizade, carinho e lealdade durante todos esses anos.

Ao professor Sérgio Reys que desde a graduação contribui para meu crescimento pessoal e acadêmico com seus sábios conselhos.

À professora, amiga e Personal English Leila do Valle pelas excelentes aulas de inglês que foram fundamentais para meu desempenho na rotina em laboratório no país que fiquei, como também pela amizade leal e muito divertida.

Aos meus amigos de infância Leonardo Valentim e Grasielle Lacerda por sempre estarem presentes como também pela amizade e boa convivência durante esses anos e por compartilharem suas experiências e entusiasmo pela vida.

A minha grande amiga Jamili Suhel Mussi por sua amizade fiel e por compartilhar experiências profissionais e pessoais nestes muitos anos.

A todos os meus familiares, que sempre incentivaram e apoiaram meu crescimento pessoal e profissional.

Aos amigos Fábio Braga e família, Keise Macêdo, Deise Braga, Jéssica da Silva, Geraldo Santana e Família, Ellen, Maria Cristina, Tânia bem como todos aqueles com quem convivi durante minha estadia e pelo cuidado durante todos estes anos no município de Seropédica.

Aos animais que mesmo sem escolha contribuíram para a realização deste estudo.

À toda equipe do laboratório do professor Libor Grubhofer por todo apoio durante o período que estive na República Tcheca.

Aos amigos Paula Castanera (Hello Kit), Juliana Rangel (Guria) e Παναγιώτης Κοσμάς (Baby) que conheci durante meu período de doutorado sanduíche na República Tcheca e que foram fundamentais para meus crescimentos pessoal e social, nos reencontraremos em algum lugar do mundo para compartilharmos momentos inesquecíveis como os que foram vividos durante esse período. See you somewhere in the world!!!

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior - CAPES, pela concessão da bolsa de estudo durante o Doutorado como também pelo financiamento no primeiro semestre de 2017 no programa PDSE doutorado Sanduíche no exterior.

Meus respeitosos agradecimentos pela contribuição da banca do exame de qualificação e pela participação dos membros da banca examinadora da defesa.

Estes quatro anos que estive desenvolvendo esta pesquisa foram uma árdua jornada de desafio, construção, autoconhecimento e amadurecimento, mais uma etapa foi vencida! Sei que é só o começo...MEUS SINCEROS AGRADECIMENTOS!

BIOGRAFIA

Jaqueline Rodrigues de Almeida Valim, filha de José de Almeida Valim e Irene Rodrigues de Almeida, nasceu no município de Belford Roxo, Estado do Rio de Janeiro. cursou o ensino fundamental no Colégio São Francisco de Assis. Em 2001 concluiu o ensino médio no Centro de Ensino Atualizado no Bairro de Heliópolis, Município de Belford-Roxo, Estado do Rio de Janeiro. No ano de 2006, ingressou no curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), colando grau e obtendo o título de Médica Veterinária em dezembro de 2011. Durante o período acadêmico realizou estágios em diversas áreas, dentre elas: Clínica e Cirurgia de pequenos e grandes animais, setor de Reprodução animal. Foi monitora das disciplinas de Parasitologia II por dois anos consecutivos e Doenças Parasitárias durante um ano. Em março de 2012 ingressou no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, na Área de Parasitologia Animal, ao nível de Mestrado, da UFRRJ, onde foi Bolsista da CAPES. Dando continuidade aos avanços acadêmicos, defendeu sua dissertação de mestrado em fevereiro de 2014, já em Março de 2014 ingressou no doutorado desta instituição, ainda no ano de 2014 sua tese foi agraciada com a premiação de menção honrosa no simpósio da pós-graduação da UFRRJ com destaque em ética na pesquisa com o título de sua tese de doutorado. No início do primeiro semestre do ano de 2017 foi contemplada com a bolsa de Doutorado Sanduíche da CAPES e desenvolveu durante o período de Março a Setembro de 2017 parte de seu projeto de Doutorado na University of South Bohemia na cidade de Ceske Budejovice na República Tcheca sob orientação dos professores e doutores Libor Grubhofer e Jan Sterba. Durante a vida acadêmica publicou artigos científicos em revistas nacionais e internacionais, além de participar ativamente de eventos científicos e grupos de pesquisa.

RESUMO

VALIM, Jaqueline Rodrigues de Almeida. Transmissão experimental de *Rickettsia parkeri* para *Rhipicephalus sanguineus* e *Amblyomma sculptum* por meio da alimentação artificial 2018. 71 p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

As técnicas de alimentação artificial de artrópodes hematófagos constituem em uma importante ferramenta por possibilitar a análise dos aspectos biológicos e a avaliação da eficiência dos artrópodes como vetores de bioagentes. Ponteiras plástica constituem-se em alternativa concreta, pois possibilita avaliar a relação entre vetores e agentes patogênicos, aspectos biológicos, testar acaricidas e minimizar a utilização de animais em estudos científicos. Os objetivos deste trabalho foram padronizar a utilização de ponteiras plásticas na alimentação artificial de *Amblyomma sculptum*, realizar a transmissão experimental de *Rickettsia parkeri* para *A. sculptum* e *Rhipicephalus sanguineus* por meio da alimentação artificial e proceder a caracterização de proteínas na interação desta *Rickettsia* com os respectivos ixodídeos, além de analisar a massa de ovos e o ritmo de postura da fase não parasitária das fêmeas dos ixodídeos infectadas experimentalmente. Para as infestações, foram utilizados coelhos jovens da espécie *Oryctolagus cuniculus*. No nono dia de infestação nos coelhos, as fêmeas parcialmente ingurgitadas de *A. sculptum* foram coletadas e separadas em duas faixas de peso inicial e submetidas à alimentação artificial pelos tempos de 6, 12 e 24 horas. Após a padronização, a faixa utilizada para *A. sculptum* foi 55-150 mg por um período de 12 horas. Para o ixodídeo *R. sanguineus*, a faixa de peso e o tempo de alimentação utilizada para a infecção já haviam sido padronizados anteriormente, sendo adotada a faixa de peso de 36-80 mg por um período de 12 horas. Após a infecção pela alimentação artificial as fêmeas foram dissecadas através do método do esgotamento, os órgãos ovários, glândula salivar e intestino foram separados para a caracterização de proteínas utilizando a técnica de SDS-PAGE. Os parâmetros biológicos na padronização não sofreram influência da alimentação artificial com o dispositivo, pela primeira vez exemplares de partenóginas de *A. sculptum* apresentaram ingurgitamento completo quando alimentadas *in vitro*, em se tratando da infecção experimental por *R. parkeri* as duas espécies de ixodídeos apresentaram alteração na massa de ovos e no tempo de postura/oviposição, apresentando diminuição na quantidade e os picos de postura foram o quarto dia para *R. sanguineus* e o sétimo dia para *A. sculptum*. Estes resultados contribuirão para o aprofundamento nos estudos envolvendo a transmissão de patógenos *in vitro*, bem como minimizar a utilização de animais na experimentação animal. No perfil protéico foram encontradas bandas nos géis de poliacrilamida com padrões de peso variando de 40kDa até 170kDa.

Palavras-chave: ixodídeos, alimentação artificial, caracterização, infecção

ABSTRACT

VALIM, Jaqueline Rodrigues de Almeida. Transmissão experimental de *Rickettsia parkeri* para *Rhipicephalus sanguineus* e *Amblyomma sculptum* por meio da alimentação artificial 2018. 71p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

Artificial feeding techniques of hematophagous arthropods constitute an important tool for making possible the analysis of biological aspects and the evaluation of the efficiency of arthropods as vectors of bioagents. Plastic tips are a concrete alternative, as it makes it possible to evaluate the relationship between vectors and pathogens, biological aspects, to test acaricides and to minimize the use of animals in scientific studies. The objectives of this study were to standardize the use of plastic tips on the artificial feeding of *Amblyomma sculptum*, to carry out the experimental study of *Rickettsia parkeri* for *A. sculptum* and *Rhipicephalus sanguineus* by feeding and characterization of proteins in the interaction of this *Rickettsia* with the in addition to analyzing the egg mass and the rhythm of posture of the non-parasitic phase of the females of experimentally infected ixodids. For infestations rabbits were used young of the species *Oryctolagus cuniculus*. On the ninth day of infestation in rabbits, females partially of *A. sculptum* were collected and separated into two bands of initial weight and submitted to artificial feeding for the times of 6, 12 and 24 hours. After standardization, the range used for *A. sculptum* was 55-150 mg for a period of 12 hours. For the ixodídeo *R. sanguineus*, the weight range and the time for the infection had previously been standardized, adopted the weight range of 36-80 mg for a period of 12 hours. After infection by feeding artificial females were dissected through the method of exhaustion, the organs ovaries, gland salivary gut and intestine were separated for characterization of proteins using the SDS-PAGE technique. The biological parameters in the standardization were not influenced by artificial feeding with the device, for the first time specimens of *A. sculptum* parthenogens presented complete engorgement when fed in vitro, in the case of the experimental infection by *R. parkeri*, the two species of ixodids presented alterations in the egg mass and in the posture / oviposition, showing a decrease in quantity and posture peaks were the fourth day for *R. sanguineus* and the seventh day for *A. sculptum*. These results will contribute to the studies involving the transmission of pathogens in vitro, as well as minimizing the use of animals in animal experimentation. In the protein profile, bands were found in the polyacrylamide with weight standards ranging from 40kDa to 170kDa.

Key Words: Ixodidae, Artificial feeding, Molecular characterization, infection

LISTA DE ABREVIACOES

BOD	“Biological Oxygen Demand”-Demanda Biológica de Oxignio
IEN	Índice de Eficiência Nutricional
IPO	Índice de produção de ovos
LDP	Laboratório de Doenças Parasitárias
°C	graus Celsius
mg	miligramas
µL	microlitro
mM	milimolar
n	quantidade
h	hora
SRD	Sem raça definida
T	Temperatura
UFRRJ	Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
U	Umidade
%	Porcentagem
kDa	kilodaltons
V	volts
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gels electrophoresis

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Pesos médio de fêmeas *Amblyomma sculptum* na faixa de peso inicial de 42,40-108mg, antes e depois da alimentação artificial, bem como o ganho médio de peso após exposição às ponteiras plásticas pelos períodos de 6,12 e 24 horas. 29
- Tabela 2.** Pesos médio de fêmeas *Amblyomma sculptum* na faixa de peso inicial de 112-169,60mg, antes e depois da alimentação artificial, bem como o ganho médio de peso após exposição às ponteiras plásticas pelos períodos de 6,12 e 24 horas. **30**
- Tabela 3.** Parâmetros biológicos da fase não parasitária de fêmeas parcialmente ingurgitadas de *Amblyomma sculptum* submetidos a alimentação artificial por meio de ponteiras plásticas na faixa de peso inicial de 42,40 – 108,00mg nos períodos de 6, 12 e 24 horas..... 32
- Tabela 4.** Parâmetros biológicos da fase não parasitária de fêmeas parcialmente ingurgitadas de *Amblyomma sculptum* submetidos a alimentação artificial por meio de ponteiras plásticas na faixa de peso inicial de 112,00 – 169,60mg nos períodos de 6, 12 e 24 horas..... **34**

LISTA DE QUADROS

- QUADRO 1. volumes dos reagentes empregados na reação em cadeia da polimerase (PCR).25
- QUADRO 2. Protocolo do termociclador, de acordo com o gene alvo utilizado na PCR25
- QUADRO 3. Resultado da PCR de larvas, ovos e adultos de *Rhipicephalus sanguineus* infectados por *Rickettsia parkeri* por meio da alimentação artificial..... 39
- QUADRO 4. Resultado da PCR de ovos e adultos de *Amblyomma sculptum* infectados por *Rickettsia parkeri* por meio da alimentação artificial..... 40

LISTA DE TABELAS

- Figura 1.** Manutenção do isolado de *Rickettsia parkeri* em linhagem de células VERO. A figura A representa a troca de meio realizada semanalmente e a figura B representa o repique de células-vero infectadas.. **18**
- Figura 2.** Disposição das ponteiras plásticas sobre o aparelho bucal de fêmeas parcialmente ingurgitadas de *A. sculptum* submetidas à técnica de alimentação artificial.. **21**
- Figura 3.** Procedimento de dissecação de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* e *Amblyomma sculptum*. Na figura A é demonstrado o início da dissecação dos exemplares através do método de esgotamento. Na figura B é representado o esgotamento das estruturas internas em placa de Petri contendo água Miliqui. Na figura C é representada a separação das estruturas ovário, intestino e glândula salivar. Na figura D, estão representadas as estruturas separadas..... **26**
- Figura 4.** Ganho médio de peso de fêmeas *Amblyomma sculptum*, nas faixas de peso inicial de 42,40-108,00mg e 112,00-169,60mg, alimentadas artificialmente por meio de ponteiras plásticas, pelos períodos de 6, 12 e 24 horas **30**
- Figura 5.** Ritmo de postura diário de fêmeas de *Amblyomma sculptum*, com faixa de peso inicial de 42,40-108,00mg, alimentadas por meio de ponteiras plásticas nos períodos de 6, 12 e 24 horas..... **33**
- Figura 6.** Ritmo de postura diário das fêmeas de *Amblyomma sculptum* com faixa de peso inicial de 112,00-169,60mg, alimentadas por meio de ponteiras plásticas nos períodos de 6, 12 e 24 horas..... **35**
- Figura 7.** Ritmo de postura diário de fêmeas *Amblyomma sculptum* e *Rhipicephalus sanguineus* infectadas experimentalmente por meio da técnica de alimentação que utiliza ponteiras plásticas pelo período de 12 horas..... **36**
- Figura 8.** Fotografia de eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado com Brometo de Etídio, evidenciando a amplificação do gene 17k em quenóginas de *Rhipicephalus sanguineus* infectadas por *Rickettsia parkeri* por meio da técnica de alimentação artificial que utiliza ponteiras plásticas; LD: Ladder de 500pb, C+: controle positivo, amostras 1-32 quenóginas de *Rhipicephalus sanguineus* **37**
- Figura 9.** Fotografia de eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado com Brometo de Etídio, evidenciando a amplificação gene *gltA* em quenóginas do *Rhipicephalus sanguineus* infectadas por *Rickettsia parkeri* por meio da técnica de alimentação artificial que utiliza ponteiras

plásticas; LD: Ladder de 100pb, C+: controle positivo, C-: controles negativos, amostras 1-32.
..... 38

Figura 10. Fotografia de eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado com Brometo de Etídio, evidenciando a amplificação do gene *gltA* e do gene 17k em quenóginas de *Amblyomma sculptum* infectadas por *Rickettsia parkeri* por meio da técnica de alimentação artificial que utiliza ponteiros plásticas; LD: Ladder de 100pb, C+: controle positivo, C-: controles negativo, amostras 1-12..... 39

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1 O carrapato <i>Amblyomma sculptum</i>	2
2.1.1 Taxonomia do <i>Amblyomma sculptum</i>	2
2.1.2 Aspéctos epidemiológicos referente do <i>Amblyomma sculptum</i>	2
2.1.3 Ciclo biológico do <i>Amblyomma sculptum</i>	3
2.2 O carrapato <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	4
2.2.1 Taxonomia referente ao <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	5
2.2.2 Aspectos epidemiológicos referentes ao <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	6
2.2.3 Ciclo biológico do <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	7
2.3 <i>Rickettsia parkeri</i>	8
2.4 Infecção experimental em animais por <i>Rickettsia</i> spp.	9
2.4.1 Estudos envolvendo a infecção experimental de carrapatos por <i>Rickettsia</i> spp.	9
2.5 Infecção <i>in vitro</i> por patógenos envolvendo a alimentação artificial	10
2.6 Fatores envolvidos na transmissão de patógenos	13
2.7 Perfil de proteínas em carrapatos	13
2.8 Período de transmissão e fatores biológicos do carrapato envolvidos	15
3 MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1 Local de execução	17
3.2 Manutenção do isolado de <i>Rickettsia parkeri</i> em linhagem de células VERO	17
3.3 Obtenção e manutenção dos animais	18
3.4 Obtenção e manutenção das colônias de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> e de <i>Amblyomma sculptum</i>	18
3.5 Delineamento Experimental	20
3.5.1 Padronização da técnica de alimentação artificial utilizando ponteiras plásticas para <i>Amblyomma sculptum</i>	20
3.5.2 Parâmetros biológicos analisados:	22
Os seguintes parâmetros foram analisados:	22
Parâmetros relativos à postura:	22
3.5.3 Infecção experimental de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> e de <i>Amblyomma sculptum</i> por <i>Rickettsia parkeri</i> através da alimentação artificial utilizando ponteiras plásticas	22
3.5.3.1 Amostras de sangue	22
3.5.3.2 Preparo do inóculo de <i>Rickettsia parkeri</i>	23

3.5.3.3 Infecção experimental de partenóginas de <i>A. sculptum</i> por meio da alimentação artificial	23
3.5.3.4 Infecção experimental de partenóginas de <i>R. sanguineus</i> por meio da alimentação artificial	23
3.5.3.5 Extração e Detecção de DNA de <i>R. parkeri</i> nas larvas e ovos	24
3.5.3.6 Perfil de proteínas em glândula salivar, ovários e intestinos de carrapatos <i>Amblyomma sculptum</i> e <i>Rhipicephalus sanguineus</i> infectados experimentalmente por <i>R. parkeri</i>	26
3.5.3.7 Extração das proteínas totais	27
3.5.4 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE).....	27
3.5.4.1 Corrida eletroforética	27
3.5.4.2 Coloração dos géis	27
3.5.4.3 Coloração “Coomassie Brillant Blue R”	27
3.5.4.4 Coloração de prata	27
3.6 Análise estatística.....	28
4 RESULTADOS	29
4.1 Padronização da técnica de alimentação artificial de fêmeas parcialmente ingurgitadas de <i>A. sculptum</i> por meio de ponteiras plásticas.	29
4.1.3 PCR de ovos e adultos de <i>Amblyomma sculptum</i>	39
4.1.4 PCR de larvas, ovos e adultos de <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	40
4.1.5 Perfil de proteínas em amostras de órgãos de <i>R. sanguineus</i> e <i>A. sculptum</i> através da técnica de SDS-PAGE.	40
5. DISCUSSÃO	41
5.1. Avaliação do ganho de peso de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> e <i>Amblyomma sculptum</i>..	41
5.1.2 Avaliação do Peso Inicial de Fêmeas Parcialmente Ingurgitadas de <i>Amblyomma sculptum</i> Sobre o Ganho Médio de Peso quando Submetidas a Alimentação Artificial por meio de Ponteiras Plásticas.....	42
5.1.3 Avaliação da influência da Alimentação Artificial de Fêmeas Parcialmente Ingurgitadas de <i>A. sculptum</i> Obtidas de Infestação Experimental em Coelho nos períodos de 6, 12 e 24 horas.....	44
5.1.4 Avaliação da infecção in vitro de <i>Rickettsia parkeri</i> para quenóginas, larvas e ovos de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> e <i>Amblyomma sculptum</i>	47
5.1.5 Detecção de DNA de <i>Rickettsia parkeri</i> nos carrapatos infectados.....	47
5.1.6 Infecção Artificial de <i>Rickettsia parkeri</i> em <i>Amblyomma sculptum</i> e <i>Rhipicephalus sanguineus</i> por meio da alimentação artificial	48
5.2. Considerações finais	51
6 Conclusões	52
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

1. INTRODUÇÃO

Muitos patógenos como, vírus, bactérias, protozoários e riquetsias estão frequentemente associados a transmissão por carrapatos, incluindo vários agentes recentemente identificados em humanos e animais domésticos (CHOMEL, 2011). Graças ao seu hábito alimentar hematófago, os carrapatos representam o primeiro grupo como fonte de patógenos transmitidos para animais e o segundo para os seres humanos, perdendo apenas para os mosquitos (SHAW et al., 2001).

O gênero *Rickettsia* é formado por bactérias intracelulares obrigatórias, pleomórficas gram-negativas, e dividem-se em quatro grupos de acordo com padrões antigênicos, morfológicos, moleculares e ecológicos: o Grupo Tifo, o qual compreende as espécies *Rickettsia prowazekii* e *Rickettsia typhi*, associadas primariamente com piolhos e pulgas, respectivamente; e o Grupo da Febre Maculosa (GFM), composto por mais de 20 espécies, estando a grande maioria associada primariamente a carrapatos. O carrapato vermelho ou carrapato marrom do cão, *Rhipicephalus sanguineus* pertence à família Ixodidae, e apresenta distribuição cosmopolita. *Amblyomma sculptum* também conhecido como “carrapato estrela” é originário da América do Sul (NAVA, SANTIAGO et al., 2014).

O principal foco nos métodos alternativos de experimentação animal são justamente obedecer ao princípio dos 3Rs, ou seja, Redução, Aprimoramento e substituição de animais nos estudos experimentais. Dentre os dispositivos utilizados, as membranas naturais e artificiais para alimentação de argasídeos têm apresentado grandes avanços. A transmissão experimental de patógenos pela alimentação artificial possibilita e amplia o estudo da interação patógeno-vetor bem como a avaliação dos parâmetros biológicos.

Os objetivos do presente estudo foram padronizar a utilização de ponteiras plásticas na alimentação artificial de *A. sculptum*, seguido da realização da transmissão experimental de *Rickettsia parkeri* para o ixodídeo em questão, bem como realizar a transmissão experimental de *R. parkeri* para *R. sanguineus* por meio desta mesma técnica, e posteriormente, proceder a caracterização de proteínas na interação desta riquetsia com os respectivos ixodídeos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O carrapato *Amblyomma sculptum*

O carrapato até então denominado de *Amblyomma cajennense*, por se tratar de uma espécie de ampla distribuição geográfica e de suma importância no âmbito de saúde animal e principalmente na saúde pública, sempre foi alvo de estudos despertando interesse na comunidade científica para melhor caracterizá-lo. Diante de tal realidade houve uma reavaliação da sua variabilidade genética por meio de estudos moleculares, análises morfológicas e biológicas. Esta reavaliação foi realizada em vários países e localidades onde essa espécie de carrapato ocorre. A partir do estudo realizado por NAVA, SANTIAGO et al. (2014) foi proposto que o carrapato *A. cajennense* é na verdade um complexo de seis espécies. Com essa recente classificação foi possível redescrever *A. cajennense*, validar as duas espécies *Amblyomma mixtum* e *A. sculptum*, e descrever e definir três novas espécies, *Amblyomma tonelliae*, *Amblyomma interandinum* e *Amblyomma patinoi*.

2.1.1 Taxonomia do *Amblyomma sculptum*

Entre os membros da família Ixodidae, a sistemática de *Amblyomma* é bem complexa. Primeiramente em um estudo realizado por BEATI et al. (2013), observou-se que havia segregação genética em diferentes clados, a partir das análises filogenéticas realizadas de espécimes de *A. cajennense*, e os autores concluíram que este ixodídeo constitui um complexo de espécies, cada uma associada a uma região biogeográfica particular. Posteriormente, NAVA, SANTIAGO et al. (2014), realizaram análises morfológicas demonstrando que *A. cajennense* representam um complexo onde cada uma das espécies está associada a ecorregiões particulares com zona de hibridização estreita. Finalmente, MARTINS et al. (2016) observaram que existem diferenças morfológicas entre *A. sculptum* e *A. cajennense* no Brasil, e a partir daí este estudo caracterizou a distribuição geográfica das duas espécies.

2.1.2 Aspectos epidemiológicos referente do *Amblyomma sculptum*

Cada uma das espécies relatadas tem uma distribuição geográfica distinta, sendo que a nova classificação determinou que *A. cajennense* somente é encontrado na região amazônica da América do Sul, englobando Venezuela, Guianas e parte do Brasil (NAVA, SANTIAGO et al., 2014). Especificamente no Brasil, essa espécie está restrita aos estados do Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins. *Amblyomma sculptum* está distribuído desde áreas úmidas do norte da Argentina, Bolívia, Paraguai até áreas peri-amazônicas no Brasil, englobando os estados do Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Pernambuco, Piauí, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Goiás (NAVA, SANTIAGO et al., 2014).

Como citado anteriormente apenas duas espécies do complexo *A. cajennense* são relatadas no Brasil. Sendo *A. sculptum* a espécie de maior distribuição entre os estados brasileiros e é reconhecido como sendo um carrapato sabidamente de grande importância, tanto para saúde animal quanto para a saúde pública, por se tratar do principal vetor da Febre Maculosa Brasileira, a qual acomete seres humanos. A bactéria *R. rickettsii* é transmitida através da picada do carrapato em qualquer uma das fases de vida do vetor (larva, ninfa ou adulto) sendo, no Brasil, *A. sculptum* o principal vetor da Febre Maculosa Brasileira, carrapato que é considerado muito agressivo aos seres humanos (DEL FIOLE et al., 2010);(GUEDES et al., 2005).

Na fase adulta *A. sculptum* é popularmente conhecido como “carrapato-do-cavalo”, “rodoleiro” ou “carrapato-estrela”, e na fase larval é denominado de “micuim” ou “carrapato pólvora”, enquanto as ninfas são conhecidas como “carrapatinho” (ARAGÃO, 1936), carrapato vermelho ou simplesmente vermelhinho. De acordo com LABRUNA et al. (2001) os equinos, capivaras e antas são considerados os principais hospedeiros para todos os estágios parasitários dessa espécie de carrapato, porém, devido à sua baixa especificidade parasitária, em especial nas fases imaturas, outras espécies de animais também podem servir como hospedeiros para este ectoparasito, inclusive os seres humanos (ARAGÃO, 1936; LABRUNA et al., 2001). A presença de equinos, capivaras e/ou antas, são essenciais para a multiplicação da fase adulta de *A. sculptum* (SOUZA et al., 2006). Recentemente, foi conduzido um estudo por LUZ et al. (2016), onde foram registrados larvas, ninfas e adultos de *A. sculptum* em duas espécies de aves terrícolas em duas áreas do bioma Cerrado.

Apesar de sua ampla distribuição, vale ressaltar que *A. sculptum*, curiosamente, não é encontrado no interior da Mata Atlântica. Segundo SZABÓ, M. P.J. et al. (2009), essa ausência pode ser devido à alta umidade, reduzida entrada de luz e/ou temperaturas mais baixas no interior da floresta que impedem o seu estabelecimento. Em contrapartida, nos entornos de Mata Atlântica, em regiões desmatadas e áreas antropizadas essa espécie de carrapato é facilmente encontrada.

2.1.3 Ciclo biológico do *Amblyomma sculptum*

Amblyomma sculptum é uma espécie de carrapato que possui ciclo de vida trioxeno, ou seja, necessita de três hospedeiros para completar seu ciclo. O ciclo de vida se inicia com a fêmea ingurgitada e completamente alimentada, denominada teleógina, que se desprende do animal e cai no solo, preferencialmente nos horários mais frescos do dia, no início da manhã ou final da tarde e início da noite. Nesse ambiente a teleógina busca um local protegido entre a vegetação e o solo e ali permanece até o término da postura. Após o final da postura a teleógina morre, deixando seus ovos para iniciar uma nova fase do ciclo de vida desse carrapato (BARROS-BATTESTI; ARZUA; BECHARA, 2006b). Desses ovos, dependendo das condições ambientais e também do microambiente favoráveis, eclodem as larvas que, após atingirem a maturação, sobem no capim ou nas folhas de plantas baixas permanecendo nas pontas dessas folhas em aglomerados de larvas, que são denominados de “bolinhos de larva”, até que algum potencial hospedeiro passe e as larvas entrem em contato com esse animal e possam se fixar nele. No hospedeiro essas larvas realizam o repasto sanguíneo até ficarem completamente ingurgitadas, período esse denominado ingurgitamento. As larvas completamente ingurgitadas se desprendem e voltam ao solo em busca de um local seguro para realização da ecdise (LABRUNA et al., 2002)

Após a primeira ecdise surgem as ninfas, que por sua vez, assim como as larvas, sobem nas folhas do capim e plantas, e ficam à espera de algum hospedeiro. Esse comportamento é denominado de hábito de espreita ou tocaia, característica comum às espécies de carrapatos desse gênero. Essas ninfas podem também realizar busca ativa por hospedeiros, percorrendo curtas distâncias sobre o solo. Quando em contato com o hospedeiro, essas ninfas se fixam, realizando o repasto sanguíneo e após completamente alimentadas se desprendem do animal e, no solo, realizam a segunda ecdise, tornando-se, assim, adultas (LABRUNA et al., 2002; SOUZA et al., 2006)

Das ninfas surgem as formas sexuadas. Assim como as larvas e ninfas, os adultos têm o hábito de subir nas folhas permanecendo ali à espreita de um hospedeiro, mas também ao

detectar a presença de um animal, podem caminhar sobre o solo e realizar busca ativa pelo hospedeiro demonstrando, para isso, grande mobilidade. Encontrando um hospedeiro, machos e fêmeas se fixam no animal iniciando o repasto sanguíneo e a cópula. Após o completo ingurgitamento da fêmea ela se desprende do animal, caindo sobre o solo iniciando um novo ciclo biológico. Enquanto isso, o macho permanece sobre o hospedeiro por um período mais longo à espera de outras fêmeas. Vale ressaltar que um dos mecanismos utilizados pelos carrapatos que auxiliam na localização do hospedeiro é uma estrutura denominada de Órgão de Haller situado na extremidade do primeiro par de pernas cujos quimiorreceptores ajudam na detecção dos hospedeiros (BARROS-BATTESTI et al., 2006b). Considerando o caráter sazonalidade, os carrapatos adultos podem ocorrer durante todo o ano, porém como citado anteriormente, apresentam pico de infestação nos meses referentes à primavera/verão. As fases imaturas dos carrapatos predominam nas estações do outono/inverno (LABRUNA et al., 2002; OLIVEIRA, P. et al., 2003; OLIVEIRA, P. et al., 2000).

O fato dessa espécie de carrapato realizar apenas uma geração anual em condições naturais é explicado devido às larvas apresentarem um comportamento denominado de diapausa comportamental (LABRUNA et al., 2003). Esse período de diapausa corresponde ao tempo em que essas larvas permanecem no solo em “repouso” sem apresentarem comportamento de busca por hospedeiros aumentando, conseqüentemente, o período sem alimentação dos carrapatos (CABRERA; LABRUNA et al., 2002). Segundo LABRUNA et al. (2002) esse comportamento de repouso pode perdurar de 9 a 11 semanas. A diminuição da temperatura média, diminuição do fotoperíodo diário e início do período seco do ano, acima definido, favorecem o comportamento de busca por hospedeiros iniciado pelas larvas. Foi constatado que larvas que eclodiram nos períodos de primavera/verão mantinham-se em repouso em “bolinhos” ou com mínima atividade caminhando sobre o solo, até o período do outono quando ocorre seu período de grande atividade, fato este que justifica, também, o período do ano de maior ocorrência de larvas.

2.2 O carrapato *Rhipicephalus sanguineus*

Rhipicephalus sanguineus compreende um complexo de espécies cujo “status” taxonômico não é bem caracterizado. Deve-se considerar, porém, que a determinação e diferenciação de espécies de carrapatos é tradicionalmente baseada em características morfológicas e ecológicas. Técnicas fenotípicas baseadas em tais características são substancialmente limitadas por variações intraespecíficas em caracteres diagnósticos. Entre os carrapatos pertencentes à família Ixodidae, a sistemática de *Rhipicephalus* é provavelmente uma das mais complexas. Cerca de 32 das, aproximadamente, 79 espécies de *Rhipicephalus* têm sido incluídas em 8 grupos ou complexos de espécies – grupo *Rhipicephalus simus*, grupo *R. sanguineus*, grupo *Rhipicephalus appendiculatus*, grupo *Rhipicephalus cliffordisenegalensis*, grupo *Rhipicephalus pravus*, grupo *Rhipicephalus evertsi*, grupo *Rhipicephalus kochi* e grupo *Rhipicephalus tricuspis* (MURRELL; CAMPBELL; BARKER, 2000).

2.2.1 Taxonomia referente ao *Rhipicephalus sanguineus*

No chamado complexo ou grupo *R. sanguineus* encontramos *R. sanguineus* (Latreille, 1806) *sensu stricto*, *Rhipicephalus turanicus* (Pomerantsev, 1936), *Rhipicephalus rossicus* (Yakimov e Kol-Yakimova, 1911), *Rhipicephalus pumilio* (Schluze, 1935), *Rhipicephalus leporis* (Pomerantsev, 1946), *Rhipicephalus schulzei* (Olenev, 1929), *Rhipicephalus pussillus* (Gil Collado, 1936), *Rhipicephalus sulcatus* (Neumann, 1908), *Rhipicephalus guilhoni* (Morel e Vassiliades, 1963), *Rhipicephalus moucheti* (Morel, 1965), *Rhipicephalus bergeoni* (Morel e Balis, 1976) e *Rhipicephalus camicasi* (Morel, Mouchet e Rodhain, 1976), e todos os representantes dessas espécies são endêmicos nas regiões tropical e subtropical (BERNASCONI et al., 2002).

O posicionamento de vários exemplares dentro do complexo *R. sanguineus* tem estado entre as mais controversas e confusas questões nesse gênero, e nesse grupo ou complexo há vários questionamentos sobre a validade das taxa (WALKER, A. R., 2003). Por isso, essas dúvidas em torno desse complexo têm sido submetidas a debate contínuo e frequentes revisões. Primeiramente, PEGRAM et al. (1987) revisaram criticamente a literatura sobre esse complexo, ilustraram a morfologia e distribuição geográfica, bem como forneceram listas de hospedeiros de seis das espécies de carrapatos do complexo, incluindo *R. sanguineus sensu stricto*. Segundo estes autores, *R. turanicus* existe semelhança rigorosa entre *R. turanicus* e *R. sanguineus*. As espécies do complexo *R. sanguineus*, que tem *R. sanguineus sensu stricto* como espécie tipo, têm como características comuns entre os machos e as fêmeas.

Com as observações morfológicas, WALKER, J. B.; KEIRANS; HORAK (2005) reforçaram que, *R. sanguineus* compreende um complexo de espécies cujo posicionamento taxonômico da maioria delas ainda é muito difícil de ser determinado e que tal fato leva a identificações errôneas.

Na Europa, por exemplo, já que pertencem ao mesmo complexo, *R. sanguineus* e *R. turanicus* são simpátricos, e podem facilmente ser confundidos devido a características morfológicas similares. Entretanto estas espécies têm características próprias quanto aos seus hospedeiros preferenciais e distribuição, e na morfologia *R. turanicus* possuem maior quantidade de pontuações no escudo e a abertura genital da fêmea é geralmente em forma de “U” mais estreito quando comparada com o formato em “U” mais largo dos representantes de *R. sanguineus*; ambos os sexos de *R. turanicus* têm placas espiraculares com caudas largas como o festão adjacente, enquanto em *R. sanguineus* são mais estreitas (WALKER, A. R., 2003).

Dentro deste contexto de complexidade de diferenciação entre espécies do complexo *R. sanguineus* o fato de que ainda há dúvidas sobre a validação de algumas das espécies pertencentes ao gênero *Rhipicephalus* (BARKER, 1998), em função de que algumas de suas espécies apresentam problemas de classificação pela dificuldade de serem determinadas por métodos fenotípicos, para termos uma visão bastante crítica e cautelosa durante os estudos taxonômicos e uso de índices de caracteres para diferenciação de indivíduos deste grupo de carrapatos, inclusive relacionados a marcadores moleculares disponíveis ou em estudo. As maiores dificuldades de diagnóstico dentro do complexo *R. sanguineus* ocorrem, particularmente, entre *R. sanguineus* e *R. turanicus*, duas espécies bastante próximas, que habitam as mesmas áreas e os mesmos habitats, onde coexistem, e que podem ser encontradas nos mesmos hospedeiros. Essas dificuldades de distinção são marcantes e isto foi verificado por (ZAhLER et al., 1997), *R. sanguineus* e *R. turanicus*. Além disso, experimentos de cruzamentos realizados por PAPERNA; GILADI (1974), entre indivíduos representativos

destas espécies, sustentam a indicação de co-especificidade de *R. sanguineus* e *R. turanicus*, o que foi constatado por ZAHLER et al. (1997) através de dados moleculares, a partir de análise da ITS2 (“second internal transcribed spacer” ou segundo espaço interno transcrito). Em relação a *R. sanguineus* no Brasil, RIBEIRO, A.; FACCINI; DAEMON (1996) realizando estudo da morfologia dos adultos, detectaram, entre oito amostras estudadas, variações, tanto intra quanto inter-específicas, nas placas adanais e placas estigmáticas dos machos, nas placas estigmáticas de fêmeas, quanto a fileira de cerdas ventro-internas dos palpos e na abertura genital das fêmeas. Embora os autores tenham observado tais variações, essas ocorreram de forma aleatória de modo a não dar suporte a hipótese da presença de outra espécie do gênero no país.

SZABÓ, M. P. J. et al. (2005) posteriormente, ao comparar dados já publicados, observaram que fêmeas ingurgitadas de *R. sanguineus* do Brasil pesavam cerca de 50% menos que fêmeas dos Estados Unidos e Japão. Em função dessas e outras observações, (SZABÓ, M. P. J. et al., 2005) e OLIVEIRA, P. R. et al. (2005) compararam uma população de *R. sanguineus* oriunda de Jaboticabal, São Paulo, Brasil com uma de Rafaela, Santa Fé, Argentina. OLIVEIRA, P. R. et al. (2005) observaram diferenças na morfologia externa de fêmeas semi-ingurgitadas (tamanho do corpo, forma do poro genital e estruturas sensoriais, por exemplo), através de microscopia eletrônica, enquanto SZABÓ, M. P. J. et al. (2005), em trabalho mais complexo, destacaram diferenças biológicas, genótípicas e morfológicas dando suporte mais consistente de que as duas populações poderiam pertencer a espécies diferentes.

2.2.2 Aspectos epidemiológicos referentes ao *Rhipicephalus sanguineus*

Em relação a distribuição geográfica deste ixodídeo, o carrapato *R. sanguineus* foi introduzido na América no Sul durante as colonizações, provavelmente junto com seu hospedeiro habitual, o cão. Um aspecto importante abordado por SZABÓ, M. P. J. et al. (2005) relata que diferentes rotas estiveram envolvidas na colonização deste “subcontinente”. A presença de *R. sanguineus* no Brasil foi registrada no início do século XX e, segundo ARAGÃO (1936), em 1907 esta espécie era rara no Rio de Janeiro e não existia em São Paulo, em Minas Gerais e nos estados do Sul, mas já era conhecida nos estados do Norte e Nordeste, do Pará até a Bahia; de 1907 a 1936 tornou-se abundante no Rio de Janeiro, em Minas Gerais, em São Paulo e nos estados do sul do país, e espalhou-se por todos os demais Estados onde até então não haviam indícios de sua existência.

Na América do Sul, especificamente na Argentina sua presença foi assinalada, na cidade de Buenos Aires, em 1938 ROVEDA (1954), e o primeiro registro no Chile ocorreu em Santiago em 1974 (TAGLE, 1976). Tendo supostamente o continente africano como centro de origem, *R. sanguineus* se encontra amplamente distribuído pela África, América, Europa, Ásia e Austrália e é provavelmente a mais prevalente entre todas as espécies de ixodídeos. Sua linha de distribuição parece estar entre os paralelos 50° norte e 35° sul, e uma vez que se estabeleça em uma localidade, rapidamente se propaga (PEGRAM et al., 1987)

Estudos demonstram convicção de que *R. sanguineus sensu stricto* é o único representante do gênero na América do Sul. No entanto, no Brasil, algumas importantes diferenças regionais foram inicialmente detectadas em meados dos anos 1990. RIBEIRO, A. et al. (1996), observaram variações morfológicas entre *R. sanguineus* de vários estados no Brasil. Após a constatação dessas dissimilaridades a este respeito, mais recentemente, foi

registrada variações morfológicas, biológicas e genéticas quando confrontaram uma amostra do Brasil com uma da Argentina. Tal fato gerou questionamentos, levando inclusive a suposição de que poderia haver outra espécie de *Rhipicephalus* na América do Sul. Vale ressaltar que as prováveis diferenças existentes entre populações podem significar, além da presença de uma outra espécie, diferenças no potencial biológico dessas populações de *R. sanguineus* em transmitir agentes patogênicos para os animais e humanos e potencialidade para transmissão de outros bioagentes.

2.2.3 Ciclo biológico do *Rhipicephalus sanguineus*

Assim como os demais membros da família Ixodidae, a espécie *R. sanguineus* apresenta quatro estágios no desenvolvimento de seu ciclo vital, sendo que três destes são ativos e dependem do repasto sanguíneo para desempenho pleno de suas funções biológicas (BARROS-BATTESTI; ARZUA; BECHARA, 2006a). Os estágios comuns aos ixodídeos são o ovo embrionado, a larva, a ninfa e os adultos (MARCONDES, 2009; SONENSHINE, 1991).

Durante seu ciclo de vida os carrapatos apresentam duas fases distintas, a de vida livre e a parasitária (MARCONDES, 2009). Ambas as fases são importantes no desenvolvimento do parasito e se complementam. Na fase parasitária os carrapatos podem apresentar dois ciclos vitais distintos, monoxeno quando parasitam apenas um hospedeiro se fixando neste ainda como larva e o abandonando já na fase adulta, ou podem ser heteroxenos quando se fixam e abandonam os hospedeiros para realizar a ecdise no ambiente, podendo neste caso apresentar-se como di-heteroxenos ou tri-heteroxenos (MARCONDES, 2009; SONENSHINE, 1991). *R. sanguineus* é uma espécie de carrapato trioxeno, pois depende de três hospedeiros para concluir seu ciclo de vida (DANTAS-TORRES, 2008; GUGLIELMONE; SZABÓ; MARTINS).

As teleóginas de *R. sanguineus* podem chegar a pesar até 250 mg e chegam a ovipor cerca de 4.000 ovos durante uma postura ininterrupta. A quantidade de ovos que uma fêmea de carrapato ovipõe está diretamente ligada ao seu peso corporal (DANTAS-TORRES, 2008;2010; GUGLIELMONE et al.). Após seu desprendimento a teleógina busca abrigos onde passa pelo período de pré-oviposição. Estes abrigos são estratégias que este carrapato utiliza para fugir de possíveis predadores e depositar seus ovos o mais perto possível de prováveis hospedeiros (DANTAS-TORRES, 2010). O período de pré-oviposição pode variar entre três a 14 dias e a oviposição pode durar até 21 dias. As larvas e as ninfas quando fixadas em seus hospedeiros alimentam-se de três a cinco dias e de cinco a sete dias, respectivamente. Uma vez fora de seus hospedeiros as metalarvas e metaninfas fazem a ecdise em um período aproximado de oito a 11 dias e de 11 a 23 dias, respectivamente, sob condições ideais (DANTAS-TORRES, 2008; GUGLIELMONE et al.; MARCONDES, 2009).

Rhipicephalus sanguineus é um carrapato extremamente adaptado ao ambiente urbano e peri-urbano e de hábitos nidícolas, ou seja, tende a se esconder em frestas e buracos próximos aos seus hospedeiros naturais. Devido ao seu grande poder de adaptação e à sua grande distribuição, alguns autores questionam se ocorre diapausa em algum de seus estágios e quantas gerações este carrapato poderia gerar durante um ano. Sabe-se que assim como outros carrapatos, *R. sanguineus* sofre grande influência da temperatura e umidade do ambiente, pois ele passa grande parte de sua vida fora do hospedeiro (DANTAS-TORRES,

2010). A depender da região onde esses carrapatos se desenvolvem, eles podem ter aproximadamente de 2,5 até quatro gerações em um ano (GUGLIELMONE et al.; LOULY, 2003).

Durante a busca por hospedeiros os carrapatos utilizam várias estratégias como comportamentos de busca ativa e de emboscada. Independente de qual seja a estratégia principal adotada pelo carrapato ele se utiliza de situações inerentes ao metabolismo de seus hospedeiros, como substâncias eliminadas ou até mesmo mecanismos de regulação térmica (MARCONDES, 2009). *R. sanguineus* é um carrapato que preferencialmente adota a estratégia de busca ativa por seus hospedeiros, usando como estímulos o CO₂ e o som de latidos (LOULY, 2003; SONENSHINE, 1991), porém pode utilizar a emboscada como tática para localizar seus hospedeiros. Esses padrões comportamentais foram adquiridos de acordo com a evolução das duas espécies envolvidas na relação parasito-hospedeiro (DANTAS-TORRES, 2010).

2.3 *Rickettsia parkeri*

Recentemente, as espécies de rickettsias são classificadas em quatro grupos, Grupo da Febre Maculosa (GFM), Grupo Tifo (GT), Grupo *Rickettsia belli* e Grupo *Rickettsia canadensis* (MERHEJ; RAOULT, 2011). Dentro do GFM, destaca-se *Rickettsia rickettsii*, uma espécie altamente patogênica, letal a humanos e de ocorrência em grande parte da América Latina (PAROLA, P. et al., 2013). *Rickettsia parkeri* é outra rickettsia patogênica, porém de baixa letalidade pertencente ao GFM que merece destaque. Conhecida por ter patogenicidade, porém sem letalidade, essa espécie já foi detectada e isolada em diferentes regiões do território americano (GODDARD, J.; NORMENT, 1986; NAVA, S. et al., 2008; ROMER et al., 2011; SILVEIRA et al., 2007; VARELA-STOKES et al., 2011; VENZAL, 2003).

Rickettsia parkeri foi isolada pela primeira vez nos EUA no ano de 1937 de um *A. maculatum* coletado de bovino, sendo inicialmente tratada como não patogênica (PADDOCK, 2005). Só foi reconhecida como uma rickettsia patogênica no ano de 2004 (PADDOCK et al., 2004).

Na América do Sul foi detectada pela primeira vez no Uruguai em *Amblyomma triste* por VENZAL, J. M. et al. (2004), segundo os autores existe uma associação epidemiológica desse achado com um caso relatado de rickettsiose humana. No Brasil, há relatos de casos não fatais dessa rickettsiose possivelmente ligados a uma cepa de *R. parkeri* denominada de cepa Mata Atlântica tendo o carrapato *Amblyomma ovale* como principal vetor (SABATINI et al., 2010; SZABÓ, M. et al., 2013). Porém *A. triste* pode estar envolvido em algumas regiões. Outras espécies de carrapatos, como *Amblyomma aureolatum* e *Amblyomma nodosum*, também foram encontradas infectadas por *R. parkeri* (MEDEIROS et al., 2011; OGRZEWALSKA et al., 2009).

A prevalência desta rickettsia, entre os principais vetores, *A. triste* e *A. ovale*, é alta (NAVA, S. et al., 2008; VENZAL, J. et al., 2004), quando comparada a de *R. rickettsii* (GUEDES et al., 2005). Porém, a patogenicidade conferida ao carrapato *A. triste* pela *R. parkeri*, sugere que, na história natural dessa rickettsia, provavelmente, também se faz necessário um hospedeiro amplificador para a sua manutenção na natureza (NIERI-BASTOS et al., 2013).

2.4 Infecção experimental em animais por *Rickettsia* spp.

Alguns membros do gênero *Rickettsia* são conhecidos como patógenos de humanos transmitidos principalmente por artrópodes hematófagos. *Rickettsia rickettsii* é a espécie mais patogênica, e pode causar uma doença aguda que possui alta taxa de letalidade, podendo passar de 80% (ANGERAMI et al., 2006). Porém, a patogenia através da infecção com outras espécies pode variar sendo geralmente sem letalidade. Existem pelo menos 14 doenças rickettsiais reconhecidas (PAROLA, P. et al., 2013).

Vários estudos demonstram que na maioria das espécies de rickettsia ocorre transmissão transovariana e a perpetuação transestadial. Porém, devido a patogenicidade conferida ao carrapato, a taxa de infecção de *R. rickettsii* geralmente se encontra no entorno de 1% (BURGDORFER, W, 1988; GUEDES et al., 2005; NIEBYLSKI; PEACOCK; SCHWAN, 1999). Essa patogenicidade impede que sua estabilidade enzoótica ocorra apenas por transmissão transovariana e perpetuação transestadial. Neste caso, a participação de amplificadores (animais vertebrados que desenvolvem uma rickettsemia em alguns dias) é crucial, pois novos indivíduos não infectados tornam-se infectados e iniciam novas linhagens de infectados dentro de uma população de carrapatos (LABRUNA, 2009). Desta forma, a procura de hospedeiros amplificadores tornou-se importante para o conhecimento da ecologia das rickettsias.

2.4.1 Estudos envolvendo a infecção experimental de carrapatos por *Rickettsia* spp.

Além de vetores, os carrapatos ixodídeos podem atuar como reservatórios e amplificadores de rickettsias do GFM (BACELLAR, 1996; PAROLA, PHILIPPE; PADDOCK; RAOULT, 2005). É provável de que a associação entre os membros da família Rickettsiaceae com invertebrados seja evolutivamente antiga, pois os artrópodes não apresentam patologias evidentes associadas à infecção por alguns destes microrganismos atuando, portanto, como vetores ou hospedeiros primários (HOOGSTRAAL, 1967). Os carrapatos podem adquirir rickettsias através do repasto sanguíneo em um hospedeiro rickettsêmico, pela co-alimentação com carrapatos infectados, transmissão venérea e a transmissão transovariana.

Visto a importância de se conhecer a interação entre as rickettsias e seus vetores, estudos foram desenvolvidos promovendo a infecção experimental de artrópodes com bactérias do gênero *Rickettsia* (MACALUSO, K.R et al., 2001; MACALUSO, KEVIN R et al., 2002).

A metodologia experimental mais usada para a infecção por rickettsias em carrapatos livres é a utilização de hospedeiros mamíferos susceptíveis. O mamífero susceptível desenvolve uma rickettsaemia, mesmo que transitória e por um curto período, de modo que, infestações durante esse período sejam suficiente para infectar a maior parte dos carrapatos nele alimentado. A espécie mamífera mais usada como fonte de infecção de *R. rickettsii* à carrapatos é o roedor *Cavia porcellus aperea* (cobaio de laboratório) (LABRUNA et al., 2008; SAKAI, R. K. et al., 2014) (GILFORD; PRICE, 1955); (SPENCER; PARKER, 1923).

Com o intuito de estudar a participação do carrapato *Amblyomma dubitatum* na epidemiologia da Febre Maculosa Brasileira, SAKAI, R. K. et al. (2014), testou a competência vetorial desse carrapato. Os espécimes de *A. dubitatum*, adquiridos de infestações naturais em capivaras, já se encontravam infectados naturalmente com *Rickettsia bellii*. Os carrapatos foram infestados em cobaios infectados experimentalmente por duas cepas de rickettsia, *R. rickettsii* Cepa Taiacu (PINTER; LABRUNA, 2006) e *R. rickettsii* Cepa Itu (KRAWCZAK et al., 2014). Após a aquisição da *R. rickettsii* foi possível observar perpetuação transestadial e transmissão dessa bactéria infectada artificialmente à cobaios não infectados. Porém, a transmissão transovariana foi inibida pela presença da *R. bellii* que primariamente infectavam os carrapatos.

GODDARD, JEROME (2003) constatou que o cobaio de laboratório também pode ser um bom modelo experimental para infecção de *R. parkeri* em carrapatos livres de rickettsias. O autor observou que os cobaios infectados previamente com *R. parkeri* desenvolveram uma rickettsaemia suficiente para infectar carrapatos *Amblyomma americanum*.

2.5 Infecção *in vitro* por patógenos envolvendo a alimentação artificial

Em estudos iniciais foram propostas modificações na técnica de alimentação artificial estabelecida por CHABAUD (1950), BURGDORFER, W. (1957), na tentativa de infectar *in vitro* dos carrapatos *Dermacentor andersoni* por *Leptospira pomona* e o vírus da raiva, assim como infectar *Amblyomma maculatum* (Koch, 1844) por *Leptospira pomona*. Alekseev (1971) demonstrou a possibilidade de alimentar o carrapato *Ixodes persulcatus* (Schulze, 1930) por meio de tubos capilares contendo suspensão do vírus responsável por encefalite. Ao realizar tentativas de alimentar *in vitro* larvas, ninfas, adultos em jejum e parcialmente alimentados. PURNELL (1970) e WALKER, A. et al. (1979) realizaram estudos semelhantes na tentativa de promover e infecção *in vitro* de ninfas do carrapato *R. appendiculatus* com *T. parva*. No primeiro estudo PURNELL (1970) utilizou a metodologia descrita por PURNELL; JOYNER (1967), onde os carrapatos foram contidos com auxílio de massa de modelar e alimentados por meio de tubos capilares, contendo sangue infectado ou papa de eritrócitos infectados ressuspensos em soro bovino. O autor utilizou em seus experimentos ninfas parcialmente alimentadas em coelhos por quatro, cinco e seis dias, além de ninfas em jejum que após a exposição aos capilares foram infestadas em coelhos para completar o ingurgitamento.

WALKER, A. et al. (1979) utilizaram sangue citratado de bovino experimentalmente infectado. As ninfas, previamente alimentadas em coelhos, foram coletadas quando atingiram o ingurgitamento parcial e contidas com a face dorsal voltada para cima, em fita adesiva sobre uma lâmina de microscopia. Tubos capilares foram dispostos sobre o hipostômio e as quelíceras das ninfas, por um período de 24 horas a temperatura de 25°C e 80% de umidade relativa do ar. A maioria dos tubos tiveram que ser reabastecidos com sangue pelo menos uma vez durante este período devido a perdas relacionadas com a ingestão e extravasamento.

Na década de 90 a técnica de tubos capilares foi utilizada para infectar os carrapatos *Ixodes ricinus*, *Ixodes hexagonus*, *Ixodes loricatus*, *Ixodes pacificus* e *Ixodes scapularis*, com *Borrelia burgdorferi* (GERN; ZHU; AESCHLIMANN, 1990; HU; GERN; AESCHLIMANN, 1992; HU et al., 1996).

A partir dos estudos relatados acima, a crescente preocupação envolvendo questões relacionadas à ética tem estimulado cada vez mais a substituição do uso de animais na experimentação científica por métodos alternativos obedecendo ao princípio dos 3Rs (Reduction, Replacement, Refinement, ou seja, Redução, substituição e refinamento). Desta forma, a alimentação artificial surge como uma importante ferramenta, por possibilitar a análise dos parâmetros biológicos e a avaliação da eficiência de artrópodes como vetores, além de tornar possível a redução do número de animais de laboratório necessários em pesquisas que envolvam a transmissão de bioagentes (RANGEL, C.P., 2011). No que diz respeito ao estudo de rickettsias, a alimentação artificial, também facilita o estudo da infecção de rickettsias não patogênicas em artrópodes, uma vez que, essas rickettsias não promovem rickettsaemias em hospedeiros vertebrados para infectar carrapatos livres (HORTA et al., 2010).

Por meio da alimentação artificial, vários estudos foram desenvolvidos no sentido de testar novos hospedeiros para o agente e, também interação entre o patógeno e o artrópode (CORDEIRO, MATHEUS DIAS et al., 2015; RIBEIRO, C. C. D. U. et al., 2014), (GODDARD, J. et al., 2012; MACALUSO, K.R et al., 2001; MACALUSO, KEVIN R et al., 2002; REIF et al., 2011).

Na demonstração da infecção *in vitro* de *I. ricinus* com diferentes cepas e clones de *Borrelia afzelii* e *Borrelia garinii*, FINGERLE et al. (2002) adotaram a metodologia descrita por GERN et al. (1990). Os carrapatos foram alimentados por um período de três a quatro horas, a temperatura de 33°C e em câmara úmida. Após o período de exposição aos capilares, realizou-se a dissecação dos carrapatos nos tempos de zero, seis, 12, 18, 24, 48, 72, 96 horas e no 14º dia. Todas as cepas e clones avaliados foram capazes de causar infecção no intestino e glândulas salivares dos carrapatos. A única exceção foi o clone PKo345 de *B. afzelii*, que não apresentou eficiência em disseminar-se para a glândula salivar.

INOKUMA; KEMP (1998) propuseram o estabelecimento de uma colônia de *R. microplus* infectados *in vitro* com *B. bigemina*, a partir da técnica de alimentação artificial por meio de tubos capilares. Para a obtenção do sangue, os autores utilizaram um bovino não esplenectomizado e infectado experimentalmente. RECHAV et al. (1999) e MACALUSO, K.R et al. (2001) empregaram a mesma técnica para transmitir *in vitro Ehrlichia chaffeensis* e outras riquetsias como *Rickettsia montana* e *Rickettsia rhipicephali*.

Fêmeas em jejum dos carrapatos *A. americanum*, *D. variabilis* e *R. sanguineus* e ninfas de *A. americanum* foram utilizadas por RECHAV et al. (1999), com objetivo de verificar a aplicação da técnica de tubos capilares na infecção *in vitro* de *E. chaffeensis*. Para a alimentação artificial, os carrapatos adultos foram fixados, com a face ventral voltada para cima, em lâminas de microscopia e submetidos aos tubos capilares contendo uma suspensão de cultura de células infectada por *E. chaffeensis*, por um período de 24 horas.

A partir da alimentação artificial usando tubos capilares, MACALUSO, K.R et al. (2001) infectaram fêmeas parcialmente ingurgitadas do carrapato *Dermacentor variabilis* com *Rickettsia montana* e *R. rhipicephali* cultivadas *in vitro*. Os autores observaram que a infecção por rickettsias no intestino, hemolinfa e glândula salivar ocorreu em 40% dos carrapatos. A eficiência da transmissão transovariana de rickettsias em carrapatos foi verificada, através da PCR, em 85% e 69% dos carrapatos infectados por *R. montana* e *R. rhipicephali*, respectivamente. Porém, quando testados pela reação de Imunofluorescência direta, 100% das amostras de ovos testadas foram positivas. Os autores avaliaram ainda o volume da solução ingerida pelos carrapatos utilizando aminoácidos marcados diluído no meio BSK,

suplementado com soro de coelho. Após o período de 24 horas, os carrapatos ingeriram um volume médio de $1,35 \pm 2,15\mu\text{L}$ da solução.

Em seguida, usando a mesma metodologia, MACALUSO, KEVIN R et al. (2002) infectaram *R. rhipicephali* em *D. variabilis* previamente infectados com *R. montana* e, também foi feito o oposto. Os autores identificaram que as rickettsias, *R. montana* e *R. rhipicephali* são refratárias às respectivas rickettsias desafiadas, pois a taxa de infecção dos ovos tanto na primeira geração quanto na geração seguinte foi apenas da rickettsia primariamente infectada. Estes resultados possibilitaram sugerir que as infecções de rickettsias no ovário dos carrapatos podem alterar a expressão molecular dos oócitos de tal maneira que uma infecção secundária não será possível.

Com o objetivo de criar um modelo alternativo para o estudo das interações carrapatos-patógenos, KOCAN et al. (2005) promoveram a infecção *in vitro* de *D. variabilis* com *Anaplasma marginale* (Theiler, 1910). O sistema de alimentação artificial por meio de tubos capilares foi desenvolvido segundo BROADWATER et al. (2002).

Utilizando um sistema de alimentação artificial, REIF et al. (2011) avaliou a capacidade das pulgas do gato (*Ctenocephalides felis felis*) adquirirem *Rickettsia felis* durante a alimentação e em seguida transmitirem de maneira vertical a bactéria. Para isso pulgas livres de rickettsias foram expostas à sangue infectado com *R. felis*, a infecção foi monitorada em intervalos semanais, durante 4 semanas. A partir do 7º dia pós-exposição, 52% das pulgas adquiriram com sucesso rickettsias e o DNA de *R. felis* foi detectado nas fezes das pulgas. Apesar de ter sido detectado a rickettsia em pulgas adultas não foi possível observar transmissão transovariana na geração F1. Os autores concluíram que este estudo poderá servir como um modelo futuro para uma abordagem da avaliação da transmissão desta rickettsia entre hospedeiros vertebrados e artrópodes.

Na tentativa de elucidar o potencial mecânico e biológico das doenças transmitidas por percevejos, GODDARD, J. et al. (2012) avaliaram a capacidade de sobrevivência da *R. parkeri* em *Cimex lectularius* após a alimentação artificial com sangue de galinha usando membranas artificiais feitas com Parafilm M®. Porém, a rickettsia não resistiu à passagem de estágio dos percevejos da fase imatura e apenas dois adultos alimentados (2/15) apresentaram-se positivos, tanto na PCR quanto na imunofluorescência direta duas semanas após a infecção. Apesar de ter havido sobrevivência de *R. parkeri* em dois percevejos por duas semanas, a viabilidade dessas bactérias foi questionada, pois não se conseguiu um novo cultivo nos espécimes testados.

Ainda dentro de estudos envolvendo a transmissão de patógenos pela alimentação artificial, FOURIE et al. (2013) utilizaram membrana de silicone para transmitir *Erlischia canis* para ninfas do ixodídeo *R. sanguineus*, neste estudo foi observado que a transmissão em condições experimentais deste membro da família Anaplasmatacea começa poucas horas após a fixação dos exemplares no aparato de alimentação artificial.

RIBEIRO, C. C. D. U. et al. (2014) padronizou uma metodologia de alimentação artificial para *Ornithodoros rostratus* usando membranas artificiais de silicone. Essa metodologia permitiu infectar experimentalmente essa espécie de argásídeo com *R. parkeri* cepa at24. A riquetsia infectada permaneceu infectando o carrapato após a mudança de estágio (Ninfa de instar número 5 para adulto). Os carrapatos adultos infectados experimentalmente transmitiram *R. parkeri* à cobaias não infectados. Porém não houve a

transmissão transovariana, provavelmente devido a presença de uma riquetsia, ainda não identificada, que infectava naturalmente a colônia utilizada.

CORDEIRO, M.D. (2015) avaliou, através da alimentação artificial, a interação entre *R. parkeri* e o carrapato monoxeno *R. microplus*, bem como avaliou a infecção desta *Rickettsia* em *Monodelphis domestica*. A infecção no ixodídeo causou diminuição na postura e proporcionou o primeiro relato da transmissão transovariana de uma rickettsia nesse carrapato. No mesmo ano, ANTUNES et al. (2015), alimentaram fêmeas parcialmente ingurgitadas de *R. microplus* por meio de tubos capilares, com o objetivo principal de avaliar a interação patógeno/vetor através da proteína calreticulina e compreender a capacidade imunogênica desta proteína.

2.6 Fatores envolvidos na transmissão de patógenos

Uma vez ingerido pelo carrapato, os patógenos devem se adaptar a ambientes extremos, incluindo variações de temperatura e umidade aos prolongados períodos em que o carrapato não se alimenta. O patógeno pode ficar latente no carrapato para sobreviver às condições entre as refeições de sangue. Quando o carrapato começar a ingerir outra refeição de sangue, o patógeno precisará se reativar, um processo que pode incluir replicação, alteração física, maturação e relocação do intestino do carrapato para os ovários e glândulas salivares. Demonstrou-se que o movimento do patógeno do intestino do carrapato para o tecido salivar não ocorre até após o carrapato tornar a fixar-se a um hospedeiro vertebrado e começar a se alimentar. O comportamento do patógeno tem um impacto sobre a velocidade da infecção do hospedeiro durante a alimentação inicial do carrapato. Os patógenos que infectam células mononucleares do carrapato como *Ehrlichia spp.*, *Anaplasma spp.* e *Rickettsia spp.*, podem mover-se mais rapidamente dentro do carrapato por meio de transporte pela hemolinfa do carrapato (PIESMAN, JOSEPH, 1995).

Os patógenos que se movem por migração no caso específico da *Borrelia spp.* tendem a se dispersar através dos tecidos do carrapato mais lentamente (MONTGOMERY; MALAWISTA, 1994) e podem demorar mais tempo para alcançar uma dose infecciosa nas glândulas salivares. Alguns patógenos podem estar presentes nas glândulas salivares de carrapatos no momento da alimentação, enquanto que outros (*B. burgdorferi*) não são encontrados no tecido salivar, durante a fixação inicial do carrapato, mas podem ser encontrados em números substancialmente maiores, 72 horas mais tarde (PIESMAN, JOSEPH, 1995). Dessa forma, após a fixação do carrapato, os patógenos que se disseminam rapidamente irão infectar o hospedeiro mais rápido. No estudo conduzido por SARAIVA et al. (2015) foi observado que *A. aureolatum* transmitiu *R. rickettsii* para hospedeiros humanos em 10 minutos.

2.7 Perfil de proteínas em carrapatos

Até o momento não existiam estudos em nosso laboratório envolvendo a caracterização de proteínas em órgãos de carrapatos ixodídeos infectados por *R. parkeri*, com isso estas foram pesquisas preliminares e pioneiras relacionadas ao referido assunto no Laboratório de Doenças Parasitárias. Na literatura estão disponíveis estudos que apenas envolvem a caracterização e estudos de proteômica mais aprofundados em linhagem de cultivo de células.

Estudos envolvendo a caracterização proteômica do corpo gorduroso de ixodídeos foram desenvolvidos com o intuito de avaliar os mecanismos envolvidos no processo de vitelogênese como também verificar qual o órgão relacionado com a síntese de proteínas (DENARDI; BECHARA; CAMARGO-MATHIAS, 2009). Análises proteômicas de espécies de riquétsias são escassos, porém tem alcançado avanços no que diz respeito a caracterização de proteínas. PORNWIROON et al. (2009) realizaram a análise proteômica de uma cepa de *R. parkeri*, o mapa de proteínas revelou a presença de 28 proteínas de superfície e 91 proteínas distintas, estes dados contribuem para o entendimento da patogênese de *R. parkeri*.

Atualmente, o estudo do conjunto de proteínas expressas no genoma ou tecido dos artrópodes tem sido amplamente explorado e representa as condições nas quais o indivíduo se encontra (ANGELO, 2011). No entanto, estudos envolvendo especificamente órgãos de carrapatos infectados com *R. parkeri* são escassos, de modo que são necessários estudos que possam contribuir de maneira pioneira para desvendar e caracterizar as proteínas envolvidas na interação patógeno/vetor. Desta maneira, através de estudos do proteoma, poderemos entender o funcionamento dessas proteínas e fazer uma comparação entre as proteínas encontradas no carrapato sadio e as encontradas no carrapato infectado, o que poderá ajudar na descoberta de novos alvos a serem utilizados no controle deste parasito.

Com o intuito de analisar as diferenças proteômicas de *R. prowazekii* propagada em diversos hospedeiros, TUCKER et al. (2011) definiram o perfil proteico desta espécie de riquétsia contribuindo para ajudar a identificar proteínas importantes no crescimento intracelular e mecanismo de virulência. O estudo permitiu demonstrar as proteínas que variavam entre as duas diferentes amostras e como as riquétsias crescem em diferentes hospedeiros.

Visando compreender a proteômica de espécies de *Amblyomma*, VILLAR et al. (2014), desenvolveram um estudo de comparação proteômica. Este foi o primeiro registro da análise proteica de espécies de *Amblyomma*, o qual contribuiu para o melhor entendimento da fisiologia, desenvolvimento e evolução destas espécies de carrapatos. Objetivando solucionar lacunas do ciclo biológico de *Ixodes ricinus*, SCHWARZ et al. (2014), realizaram uma abrangente análise proteômica deste importante vetor, através deste estudo foi possível ampliar os estudos envolvendo o desenvolvimento de métodos alternativos para o controle de doenças transmitidas por carrapatos.

Muitos estudos na Europa buscam avaliar a interação patógeno/vetor através da análise proteômica de órgãos de carrapatos. DI VENERE et al. (2015) dissecaram exemplares do ixodídeo *Ixodes ricinus*, e extraíram ovários e tecidos para realizar uma análise proteômica comparativa destes órgãos na presença de uma bactéria simbiote, tendo contribuído desde então para o melhor entendimento da biologia deste vetor.

Um estudo proteômico envolvendo a saliva de ninfas e adultos (fêmeas) de *Haemaphysalis longicornis* foi descrito por TIRLONI et al. (2015), onde um total de 275 proteínas foram identificadas, e destas proteínas, 30 foram identificadas exclusivamente na saliva de ninfas ingurgitadas, 74 proteínas em fêmeas ingurgitadas e 31 proteínas foram detectadas em ambos estágios. Estes achados contribuem para o entendimento da biologia de *H. longicornis*, que é o principal vetor da *Theileria* spp., *Anaplasma phagocytophilum*, *Babesia* spp. e *Coxiella burnetti* nos países do leste da Ásia.

Os estudos que dizem respeito a caracterização de proteínas em carrapatos são recentes e pioneiros, VILLAR et al. (2015) com o objetivo principal de abordar a proteômica

e caracterizar as proteínas envolvidas durante a multiplicação de *A. phagocytophilum* no carrapato vetor *Ixodes scapularis*, constataram um aumento do nível de certas proteínas de resposta ao estresse bacteriano e proteínas de superfície na interação patógeno/vetor.

Não só ixodídeos estão sendo avaliados nestes estudos de proteômica, OLEAGA et al. (2015) caracterizaram a proteômica do intestino médio do argasídeo *Ornithodoros erraticus* antes e depois da ingestão de sangue tentando elucidar as alterações induzidas após o repasto sanguíneo. Com isso os autores relataram pela primeira vez a proteômica do intestino médio de um argasídeo, fornecendo assim informações importantes envolvidas na digestão de sangue nestes carrapatos. Esta informação representa um ponto de partida para a identificação e seleção de novos alvos para o desenvolvimento de medidas de controle alternativas.

Mais recentemente, MOREIRA et al. (2017), realizaram uma análise profunda quanto as proteínas expressas no intestino, ovários e nas glândulas salivares de *Amblyomma sculptum*, este estudo revelou vários processos metabólicos específicos importantes na biologia deste ixodídeo que é considerado o mais importante vetor de rickettsioses nas Américas do Sul e Central.

2.8 Período de transmissão e fatores biológicos do carrapato envolvidos

Existe uma demora entre o momento da fixação do carrapato e a transmissão do patógeno ao hospedeiro, embora este tempo possa variar de organismo para organismo e de espécie para espécie de carrapato. Este período de carência propicia a oportunidade de evitar a transmissão da doença às pessoas e animais de estimação através do uso de acaricidas sistêmicos ou tópicos e remoção adequada e oportuna do carrapato. Existem vários fatores que podem afetar o tempo que um carrapato precisa se fixar a fim de transmitir efetivamente um patógeno. Portanto, o momento de transmissão para cada patógeno pode variar consideravelmente e não pode ser previsto com precisão em nenhuma situação específica. No entanto, acredita-se que, geralmente, o tempo de transmissão de *Babesia spp.* e *Borrelia spp.* são mais longos do que o tempo de transmissão de *Ehrlichia spp.*, *Anaplasma spp.* ou *Rickettsia spp.* Em condições experimentais carrapatos *I. scapularis* precisaram se alimentar por 24 a 48 horas para garantir a transmissão eficaz de *B. burgdorferi* (PEGRAM et al., 1987). No entanto, este tempo de alimentação pode não ser necessário em todas as circunstâncias e *I. ricinus* tem se mostrado transmissor de *B. burgdorferi* ou *B. afzelii* em menos de 24 horas (KAHL et al., 1998); (CRIPPA; RAIS; GERN, 2002). Além disso, em condições experimentais, parcialmente alimentados, os carrapatos *I. scapularis* transmitiram *B. burgdorferi* em menos de 24 horas, quando eles tornaram a fixar-se a um segundo hospedeiro vertebrado (SHIH; SPIELMAN, 1993). A previsão é que esporozoítos de *Babesia canis canis* não são transmitidas pelo carrapato até 48 horas ou mais após a fixação do carrapato (HEILE et al., 2007). Estudos em cães com *Rickettsia spp.*, *Anaplasma sp.* e *Ehrlichia spp.* também indicaram que o tempo de transmissão pode ser inferior a 24 horas (FOURIE et al., 2013); (HEILE et al., 2007); (KATAVOLOS et al., 1998) e que *Rhipicephalus sanguineus* transmitiu *E. canis* aos cães dentro de 3 horas da fixação do carrapato (Fourie et al., 2013). Em geral, a maioria dos estudos indicam que são necessárias 12-18 horas da fixação do carrapato para transmitir eficazmente os patógenos, e que tempos mais longos são normalmente necessários para *Borrelia spp.* (KATAVOLOS et al., 1998; PIESMAN, JOSEPH, 1995; PIESMAN, J et al., 1987)

No estudo conduzido por SHIH; SPIELMAN (1993), dois pontos adicionais necessitam ser considerados. Foi demonstrado que uma ninfa de carrapato que tenha a

alimentação interrompida procurará novo repasto sanguíneo. Isso ocorre porque a ativação do patógeno já ocorreu durante a alimentação inicial do carrapato e o tempo de transmissão é mais rápido ao tornar a fixar-se em um novo hospedeiro com isso o risco deste fenômeno ocorrer na situação natural não é claro. A segunda consideração é que a manipulação por humanos de um carrapato em alimentação durante o esforço de retirá-lo pode aumentar o risco de injeção de patógenos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local de execução

O experimento foi realizado no Laboratório de Doenças Parasitárias, Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública do Instituto de Veterinária, Anexo I da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), situada no município de Seropédica, RJ.

Os grupos controles foram estabelecidos a partir da dissecação e coleta dos órgãos de partenóginas *A. sculptum* e *R. sanguineus*, oriundas de infestação experimental em coelhos e comprovadamente livres de infecção por *R. parkeri*. A caracterização de proteínas dos órgãos infectados carrapatos foi realizada no Institute of Chemistry and Biochemistry na University of South Bohemia (Instituto de Química e Bioquímica da Universidade do Sul da Boêmia) e com a colaboração do Institute of Parasitology da Academy of Sciences of the Czech Republic (Instituto de Parasitologia da Academia de Ciências da República Tcheca), em Budweis, República Tcheca.

Aprovação do Comitê de Ética do Uso Animal (CEUA)

Esse estudo foi realizado em concordância com os princípios éticos e de experimentação animal sendo aprovado pelo Comitê de ética ao uso de animais da UFRRJ sob o protocolo número 062/2014 em reunião extraordinária (Anexo F).

O bem-estar de todos animais envolvidos foi preservado e não sofreram nenhum tipo de estresse que pudesse comprometer a saúde e os resultados dos experimentos.

3.2 Manutenção do isolado de *Rickettsia parkeri* em linhagem de células VERO

A linhagem de células VERO, originária de rim de macaco *Cercopithecus aethiops* (African green monkey), foi cedida gentilmente pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ – RJ). Esta linhagem foi mantida em meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado, pH 7,45. As células foram incubadas em estufa do tipo B.O.D a 37°C e 5% de CO₂ e o meio de cultura trocado semanalmente. Subculturas foram realizadas a partir da formação de monocamadas celulares, sendo desprendidas do fundo do frasco com auxílio de raspadores apropriados ou solução de tripsina e transferidas para novos frascos.

O crescimento do cultivo de *Rickettsia parkeri* foi acompanhado diariamente, a partir da coloração de Giménez (Giménez, 1964) e observado em microscopia óptica, até que a infecção estivesse em 100% das células, por volta do sexto ao sétimo dia. No momento em que a monocamada apresentou-se 100% infectada, a cultura foi desprendida do fundo do frasco, transferida para um tubo falcon 15 mL e centrifugada a 400 xg por 10 minutos, à temperatura de 4 °C. O meio Dubecco's modified Eagle's medium (DMEM) foi totalmente retirado e as células ressuspendidas em sangue de cão para o ixodídeo *R. sanguineus* e sangue bovino para *A. sculptum*, numa concentração de 5 x 10⁵ de células Vero infectadas com *R. parkeri*, por mL de sangue.

O crescimento foi quantificado pela proporção de células VERO infectadas. No momento em que a monocamada desta primeira passagem apresentou um mínimo de 80% de

infecção, alíquotas de seu sobrenadante foram inoculadas em novas monocamadas não-infectadas, a fim de estabelecer passagens do isolado, como demonstrado na Figura 1.

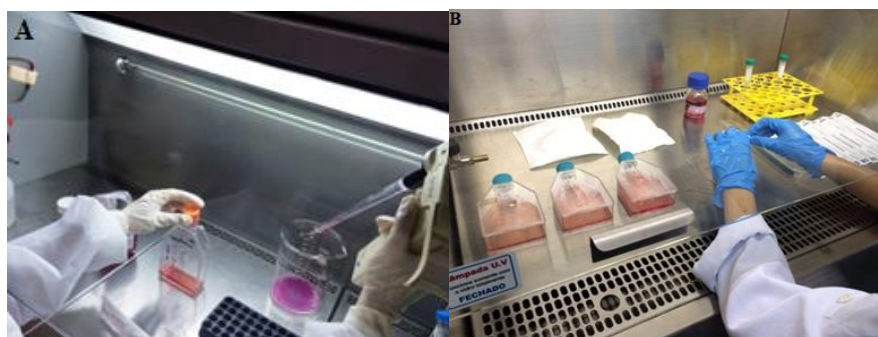


Figura 1. Manutenção do isolado de *Rickettsia parkeri* em linhagem de células VERO. A figura A representa a troca de meio realizada semanalmente e a figura B representa o repique de células-vero infectadas.

3.3 Obtenção e manutenção dos animais

Para as infestações e manutenção das colônias das duas espécies de ixodídeos, foram utilizados coelhos da espécie *Oryctolagus cuniculus*) mestiços (Califórnia x Nova Zelândia), cedidos pelo Setor de Cunicultura do Instituto de Zootecnia da UFRRJ, com idade de 60 a 90 dias, de ambos os sexos, pesando entre 1,5 a 3,0 kg e sem contato prévio com carrapatos ou produtos acaricidas.

Durante todo o período do experimento, os coelhos foram mantidos em gaiolas individuais pertencente ao Laboratório de Doenças Parasitárias com comedouro e bebedouro individuais, onde receberam ração peletizada e água *ad libitum*. Diariamente e cuidadosamente, um colaborador realizou limpeza das gaiolas para remoção de sobras de ração, fezes e urina.

3.4 Obtenção e manutenção das colônias de *Rhipicephalus sanguineus* e de *Amblyomma sculptum*

Os espécimes de *R. sanguineus* usados no presente estudo foram derivados de fêmeas ingurgitadas, coletadas de infestação natural em cães domiciliados do município de Seropédica-RJ.

A obtenção dos espécimes de *A. sculptum* ocorreu através da coleta de teleóginas provenientes de infestações naturais de equinos pertencentes ao setor de matrizes do Instituto de Zootecnia da UFRRJ.

As colônias de *R. sanguineus* e *A. sculptum* foram mantidas no Laboratório de Doenças Parasitárias (LDP) em Demanda Biológica de Oxigênio “Biological Oxygen Demand” (B.O.D.) à temperatura de $27\pm 1^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa acima de 80% até a vigésima

geração de *R. sanguineus* e a terceira geração de *A. sculptum* quando foram realizadas as infestações em coelhos para assim obtermos as fêmeas parcialmente ingurgitadas que foram utilizadas no estudo.

Para certificar que estavam livres de infecção por *Rickettsia spp*, as fêmeas ingurgitadas de *R. sanguineus* e *A. sculptum* foram testadas após o fim da oviposição através da reação em cadeia de polimerase (PCR) usando como alvo o gene *gltA* e do gene 17k (REGENERY et al., 1991), que resultou em produtos não amplificados.

Nas infestações experimentais, larvas e ninfas submetidas a um jejum de 20 dias foram depositadas em coelhos conforme metodologia proposta por (NEITZ; BOUGHTON; WALTERS, 1971) com modificações, ou seja, as infestações foram feitas no dorso do animal ao invés de serem feitas na orelha utilizando uma cola específica produzida no próprio laboratório cuja formulação está descrita no Anexo A.

As posturas das fêmeas foram acompanhadas até que se finalizasse a oviposição. Posteriormente, um pool de 100 mg de ovos oriundos das fêmeas foi separado e acondicionado em seringas hipodérmicas, cortadas na parte oposta ao êmbolo, vedadas com buchas de algodão e observadas até a eclosão larval.

As larvas eclodidas foram infestadas no dorso dos coelhos. As larvas ingurgitadas foram recuperadas, do terceiro ao quinto dia após a infestação, e acondicionadas em seringas vedadas com bucha de algodão devidamente identificadas.

Após a ecdise e o período de jejum acima mencionado, as ninfas foram infestadas em coelhos por meio da técnica do saco de pano aderido ao dorso de coelhos descrita por (NEITZ et al., 1971). A recuperação das ninfas ingurgitadas começou do quarto ao quinto dia após a infestação, sendo estas acondicionadas em seringas vedadas com bucha de algodão.

Com a obtenção dos exemplares adultos foi realizada a sexagem para separação dos casais de carrapatos a serem dispostos sobre o dorso dos coelhos. Nas infestações experimentais por *R. sanguineus* cada coelho recebeu 30 casais enquanto que nas infestações por *A. sculptum* foram utilizados 15 casais por coelho.

Todos os carrapatos foram mantidos, durante a fase não parasitária, em estufas tipo BOD (Biological Oxygen Demand) em condições controladas à temperatura de 27°C e umidade relativa superior a 80%.

Foram utilizadas fêmeas dos carrapatos *Amblyomma sculptum* e *Rhipicephalus sanguineus* de uma colônia pré-estabelecida e livre de infecção por *Rickettsia spp*, conforme resultados de análises feitas através da técnica de reação em cadeia de polimerase.

Para obtenção do sangue utilizado na alimentação artificial de *A. sculptum* foram mantidos bezerros alojados em baias pertencentes ao Laboratório de Doenças Parasitárias, onde recebiam feno, ração peletizada e água ad libitum. Diariamente foi realizada a limpeza das baias para remoção de fezes, urina e restos de alimentos.

3.5 Delineamento Experimental

3.5.1 Padronização da técnica de alimentação artificial utilizando ponteiras plásticas para *Amblyomma sculptum*.

No nono dia após a infestação em coelhos, as fêmeas parcialmente ingurgitadas de *Amblyomma sculptum* foram coletadas em duas faixas distintas de peso inicial com o objetivo de determinar a melhor faixa de peso para alimentação artificial por meio de ponteiras plásticas.

Os pesos iniciais foram estipulados de acordo com a uniformidade e quantidade de fêmeas parcialmente ingurgitadas, após observação de que no sétimo e oitavo dia a quantidade de fêmeas parcialmente ingurgitadas era insuficiente dificultando a formação de grupos homogêneos para padronização de tempo e faixa de peso, com isso foram formadas duas faixas de peso: 42,40 - 108mg e 112 - 169mg. O grupo controle foi formado a partir de fêmeas ingurgitadas desprendidas naturalmente dos animais infestados, este grupo foi composto por 11 exemplares.

Posteriormente, as fêmeas selecionadas foram levadas ao LDP, lavadas em água destilada, secas em papel filtro, e examinadas em microscópio estereoscópico (Wild Heerbrugg) para verificação da integridade do aparelho bucal. Para as duas faixas de peso inicial foram formados 3 (três) grupos, constituídos por 11 (onze) espécimes cada, que foram submetidos a alimentação nos tempos de 6, 12 e 24 horas.

Na fase preparatória do processo de alimentação artificial os carrapatos foram fixados em bandejas de isopor com auxílio de fita adesiva dupla face e as ponteiras plásticas posicionadas sobre os aparelhos bucais dos mesmos (Figura 2). Nesta etapa houve a necessidade de se utilizar massa de modelar como suporte para possibilitar a sustentação das ponteiras sobre as peças bucais dos carrapatos e, assim evitar o extravasamento do sangue contido no dispositivo.

Antes do início da alimentação artificial todas as fêmeas foram pesadas e os pesos iniciais registrados em planilhas para avaliação do ganho de peso após a realização da técnica.



Figura 2. Utilização de ponteiras plásticas para alimentação artificial de fêmeas parcialmente ingurgitadas de *Amblyomma sculptum*.

O sangue utilizado na alimentação artificial foi coletado com Vaccuntainer[®], acoplado ao tubo de 5mL contendo anticoagulante citrato de sódio, diretamente da veia cefálica de um bezerro sadio sabidamente não tratado com produtos acaricidas. Os tubos de sangue foram armazenados sob refrigeração a 4°C por no máximo 24 horas.

Para preenchimento das ponteiras plásticas, os tubos contendo sangue foram retirados da geladeira e mantidos à temperatura ambiente momentos antes do início da alimentação. Os dispositivos de alimentação citados acima foram preenchidos com 250 microlitros de sangue citratado de bovino e dispostos sobre o aparelho bucal dos carrapatos previamente fixados nas bandejas de poliestireno (Figura 3). Durante o período de alimentação os carrapatos foram mantidos no interior de câmara climatizada do tipo B.O.D (temperatura de 37°C e umidade acima de 80%), conforme o período de tempo estabelecido para a alimentação de cada um dos grupos avaliados.

Ao final do período de alimentação as ponteiras plásticas foram retiradas, e os carrapatos descolados da fita adesiva foram pesados em balança analítica, para avaliação do ganho de peso.

Posteriormente, as fêmeas alimentadas artificialmente foram fixadas em Placas de Petri e acondicionadas em câmara climatizada do tipo (B.O.D), à 27°C e 80% de umidade relativa, para avaliação diária dos parâmetros biológicos relativos à fase não parasitária.

3.5.2 Parâmetros biológicos analisados:

Os seguintes parâmetros foram analisados:

Parâmetros relativos à postura:

- a. **Peso das fêmeas ingurgitadas:** média de peso das fêmeas em mg de cada cada fêmea de cada grupo após a alimentação artificial;
 - b. **Período de pré-postura:** número de dias decorridos entre o final da alimentação artificial e a postura do primeiro ovo;
 - c. **Período de postura:** número de dias entre a postura do primeiro e do último ovo, para cada fêmea;
 - d. **Peso da postura:** peso total das posturas diárias para cada fêmea;
 - e. **Índice de Eficiência nutricional (IEN):** calculados segundo Bennet (1974):
$$\text{Peso da massa de ovos (mg)} / \text{peso inicial das teleóginas(mg)} \times \% \text{ eclosão}$$
 - f. **Índice de produção de ovos (IPO):** Calculados segundo Bennet (1974):
$$\text{Peso da massa de ovos (mg)} / \text{peso inicial das teleóginas(mg)} \times 100$$
- Parâmetros relativos ao processo de eclosão larval:
- g. **Percentual de eclosão:** estimativa visual da quantidade de larvas eclodidas em relação à massa de ovos de cada fêmea.

4.5.3 Infecção experimental de *Rhipicephalus sanguineus* e de *Amblyomma sculptum* por *Rickettsia parkeri* através da alimentação artificial utilizando ponteiras plásticas

3.5.3.1 Amostras de sangue

Foram utilizadas amostras de sangue de bovinos e cães como fonte de alimentação para fêmeas de *A. sculptum* e de *R. sanguineus*, respectivamente.

O sangue bovino foi selecionado para alimentação artificial de fêmeas de *A. sculptum* por atender as necessidades em termos de volume e facilidade de obtenção. A coleta do sangue ocorreu de forma asséptica da veia jugular de bezerros com idade inferior a 12 meses, mestiço (Holandês x Zebu), em boas condições orgânicas, clinicamente saudável e não tratado com produtos acaricidas. Este sangue foi coletado com Vaccuntainer[®], acoplado ao tubo de 5mL contendo anticoagulante citratato de sódio.

Para a alimentação artificial de fêmeas de *R. sanguineus* foi utilizado sangue de cães coletado, assepticamente, da veia cefálica destes animais pelo sistema Vaccuntainer[®], acoplado ao tubo de 5mL contendo anticoagulante citratato de sódio. Estes animais foram gentilmente cedidos por um proprietário no município de Seropédica.

As amostras de sangue foram preparadas para a alimentação dos carrapatos, de acordo com os grupos experimentais, para avaliar a ingestão e conversão do sangue ingerido nos parâmetros biológicos dos carrapatos alimentados artificialmente. Este material foi

identificado e utilizado logo após a coleta ou conservado sob a refrigeração à temperatura de 4 °C, por um tempo máximo de 24 horas.

3.5.3.2 Preparo do inóculo de *Rickettsia parkeri*

A cepa At24 de *R. parkeri*, originalmente isolada do carrapato *A. triste* no município de Paulicéia, estado de São Paulo, Brasil (SILVEIRA et al., 2007) foi usada como modelo de rickettsia patogênica para a infecção dos carrapatos. Essa cepa de rickettsia foi cedida pelo Dr. Adriano Pinter da SUCEN no ano de 2014 e tem sido mantida em nosso laboratório através de passagens *in vitro* em células VERO à 30°C e em nitrogênio líquido.

Para o nosso estudo, um estoque da cepa At24 *Rickettsia parkeri* congelado em nitrogênio líquido foi descongelado e inoculado em um frasco de 75 cm² contendo uma monocamada de células VERO.

Assim que era observado a formação da monocamada e que esta apresentava 100% de células infectadas (7º dia pós-infecção), foi feito o desprendimento do fundo do frasco e logo depois a transferência para um tubo Falcon 15 e centrifugação à 8000rpm por 10 minutos à uma temperatura de 4°C, em seguida o meio Dubecco's modified Eagle's medium (DMEM) foi todo retirado e as células ressuspensas em sangue bovino e canino à concentração de 10⁶ de células VERO infectadas com *R. parkeri* por mL de sangue.

3.5.3.3 Infecção experimental de partenóginas de *A. sculptum* por meio da alimentação artificial

No nono dia de após a infestação, foram recuperadas 11 fêmeas parcialmente ingurgitadas de *A. sculptum* com peso entre 55 e 110mg.

Após a execução da técnica de alimentação artificial as fêmeas foram pesadas para avaliação do ganho de peso e submetidas a um protocolo de lavagem com solução de hipoclorito de sódio 1%, álcool 70% e água destilada para remoção de possíveis rickettsias que poderiam estar sobre a cutícula das mesmas.

Posteriormente, as fêmeas foram fixadas em placa de Petri para realização da postura e acondicionadas em B.O.D a 27° C e umidade de 80% para avaliação dos parâmetros biológicos referentes á ritmo de postura.

Diariamente durante o período de postura foi realizada coleta das massas de ovos das fêmeas em eppendorffs individuais. Ao término das posturas, os eppendorffs contendo a massa de ovos, foram congelados a -20⁰ C, as fêmeas ainda vivas foram fixadas em álcool isopropílico para execução da PCR e constatação da infecção *in vitro* por *R. parkeri* pela técnica de PCR.

3.5.3.4 Infecção experimental de partenóginas de *R. sanguineus* por meio da alimentação artificial

Na infecção experimental do ixodídeo *R. sanguineus* o tempo de exposição (12 horas) às ponteiras plásticas, a faixa de peso das fêmeas (36 -80mg) e a técnica de alimentação artificial utilizados foram baseados nos achados de (VALIM et al., 2017).

Para a infecção experimental foram estabelecidos dois grupos com 10 carrapatos cada. Um grupo foi infectado artificialmente para obtenção de ovos e o outro de larvas, ambos com o objetivo de avaliar a transmissão transovariana de *R. parkeri*.

Após alimentação as fêmeas foram pesadas para avaliação do ganho de peso e submetidas a um protocolo de lavagem com solução de hipoclorito de sódio 1%, álcool 70% e água destilada para remoção de possíveis rickettsias que poderiam estar sobre a cutícula das mesmas. Essas fêmeas foram então fixadas com esparadrapos em placas de Petri e mantidas em B.O.D. à temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa de 80% para subsequente avaliação dos parâmetros biológicos referentes á ritmo de postura.

A massa de ovos de cada fêmea foi individualizada em tubos de ensaio devidamente identificados, tampados com algodão e mantido na BOD à temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa de 80% até a eclosão das larvas. Depois de eclodidas, metade do pool de larvas de cada grupo foi imerso em álcool isopropílico, e em seguida conservado em RNA later® à -20°C até o momento da extração do DNA e realização da PCR.

Para verificação da infecção artificial dos carrapatos por *R. parkeri*, no segundo dia após o término da postura, as fêmeas de *R. sanguineus* dos dois grupos foram pesadas, imersas em álcool isopropílico e conservadas individualmente em eppendorfs, até o momento da extração do DNA, em freezer à -20°C .

3.5.3.5 Extração e Detecção de DNA de *R. parkeri* nas larvas e ovos

As larvas e os ovos mantidos em RNA later® após descongelamento foram lavados em água destilada por três vezes e reidratadas em 200 μL de PBS (phosphate buffered saline). Em seguida foram adicionadas sete esferas de óxido de zircônio de 2 mm e 80 mg de esferas de vidro para a trituração em Minibeadbeater BIOSPEC® por 1 minuto.

Para a extração do DNA foi utilizado o kit Qiagen®. Em cada bateria de extração de DNA havia algumas amostras de carrapatos não infectados, utilizadas como controle.

A presença de DNA rickettsial foi detectada por reação em cadeia da polimerase (PCR) usando os primers CS-78 (GCAAGTATCGGTGAGGATGTAAT) e CS-323 (GCTTCCTTAAAATTCAATAAATCAGGAT) que amplifica um fragmento de 401 pb do gene rickettsial *gltA* (LABRUNA et al., 2004); os primers 17kd1 (GCTCTTGCAACTTCTATGTT) e 17kd2 (CATTGTTCGTCAGGTTGGCG) que amplifica o fragmento de 434pb do gene *htrA*; e os primers Rr190.602n (AGTGCAGCATTTCGCTCCCCCT) e Rr190.70p (ATGGCGAATATTTCTCCAAAA) que amplifica um fragmento de 532 pb do gene *ompA* (REGENERY et al., 1991).

Cada tubo de reação continha 3 μL de DNA (amostra padronizada a 100 ng/ μL). As condições da PCR são encontradas no Quadro 1.

Quadro 1. Reagentes empregados na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para detecção de infecção experimental de *Rickettsia parkeri* em *Amblyomma sculptum* e *Rhipicephalus sanguineus* após alimentação artificial utilizando ponteiras plásticas.

Reagentes	<i>gltA</i>	<i>OmpA</i>	<i>17k</i>
Tampão “buffer” 10 X	2,5 µL	2,5 µL	2,5 µL
Nucleotídeos trifosfatados (Dntp 2,5 mM)	1 µL	1 µL	1 µL
MgCl ₂ (50 mM)	0,625 µL	0,625 µL	0,625 µL
primers (10 mM F+R)	1 µL	1 µL	1 µL
Taq Platinum polimerase	0,075 µL	0,075 µL	0,075 µL
H ₂ O mili Q q.s.p.	6,3 µL	6,3 µL	6,3 µL
TOTAL	11,5 µL	11,5µL	11,5µL

Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose 1,5% corados com brometo de etídio e visualizados sob a luz ultravioleta. As condições de termociclagem estão disponíveis no Quadro 2.

Quadro 2. Protocolo do termociclador, de acordo com os genes alvo (*17k*, *gltA*, *OmpA* utilizados na PCR).

Etapas	Temperatura	Número de ciclos	Tempo
Desnaturação inicial	95 °C		5 min
Desnaturação	95 °C		40 segundos
Anelamento	60 °C	40	45 segundos
Extensão	72 °C		45 segundos
Extensão final	72 °C		5 minutos

Como controle positivo das reações foi utilizado DNA de *Rickettsia parkeri* cepa At24 isolada por Silveira et al. (2007) e como controle negativo foi aplicado água DNA-*free* dentro e fora da capela de exaustão.

3.5.3.6 Perfil de proteínas em glândula salivar, ovários e intestinos de carrapatos *Amblyomma sculptum* e *Rhipicephalus sanguineus* infectados experimentalmente por *R. parkeri*

Para a caracterização das proteínas dos órgãos dos ixodídeos infectados por *R. parkeri* através da técnica de alimentação artificial através de ponteiras plásticas, foram dissecadas 15 fêmeas de *A. sculptum* 30 horas após a alimentação artificial e 12 fêmeas de *R. sanguineus*, sendo metade dissecada 9 horas e a outra 30 horas após a alimentação artificial.

A dissecação foi realizada a partir do método do esgotamento, conforme representado na Figura 3. Durante a dissecação das partenóginas foram obtidos ovários, glândulas salivares e intestinos, separados em “pools” conforme a natureza dos órgãos. As amostras foram mantidas imersas em inibidor de protease e congeladas em freezer a -20°C . Seguindo a mesma metodologia descrita acima, os grupos controles foram estabelecidos a partir da dissecação e coleta dos órgãos de partenóginas *A. sculptum* e *R. sanguineus*, oriundas de infestação experimental em coelhos e comprovadamente livres de infecção por *R. parkeri*.

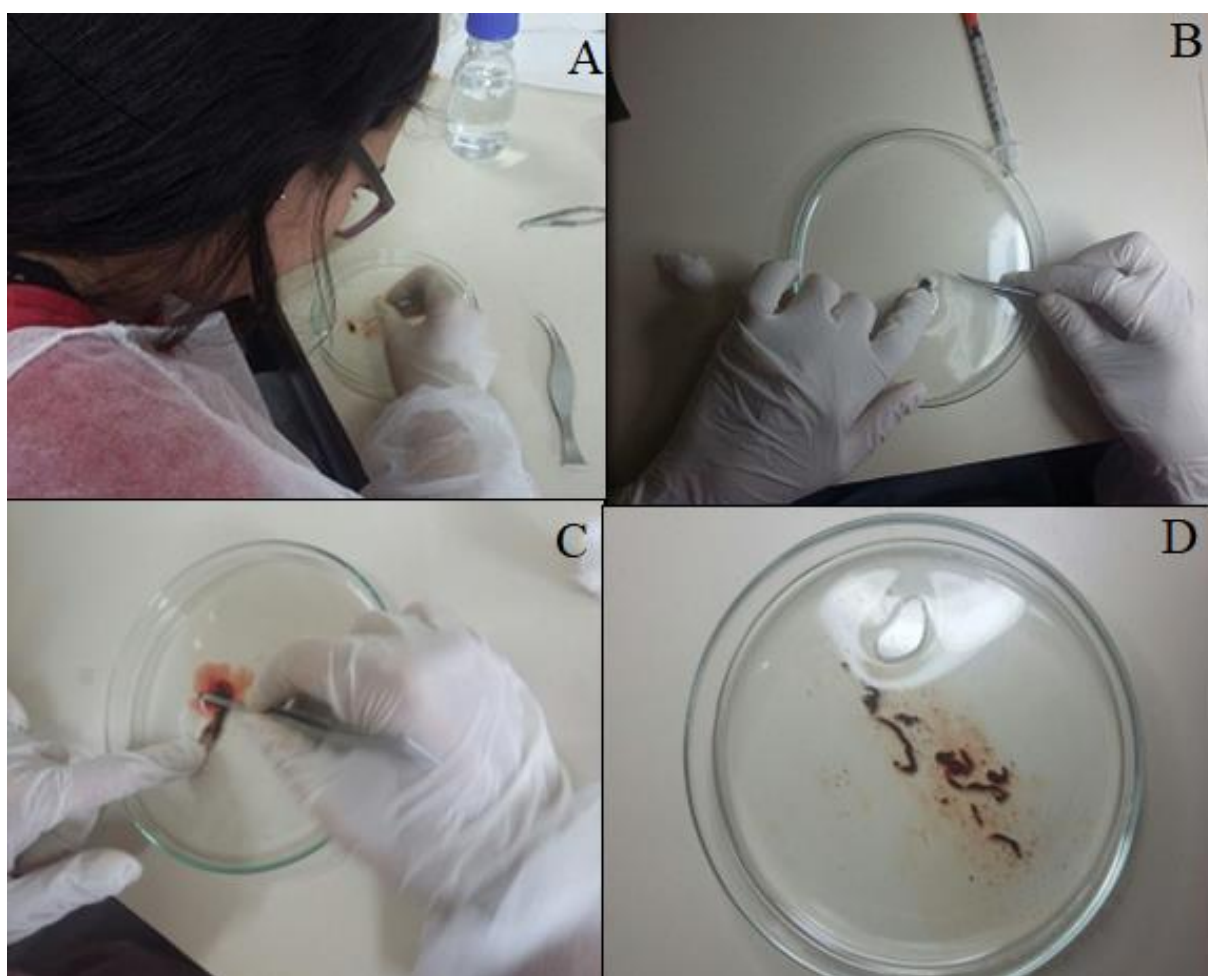


Figura 3. Procedimento de dissecação de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* e *Amblyomma sculptum*. Na figura A é demonstrado o início da dissecação dos exemplares através do método de esgotamento. Na figura B é representado o esgotamento das estruturas internas em placa de Petri contendo água Miliqui. Na figura C é representada a separação das estruturas ovário, intestino e glândula salivar. Na figura D, estão representadas as estruturas separadas.

3.5.3.7 Extração das proteínas totais

A extração de proteínas foi conduzida segundo o protocolo no anexo B baseado no Manual de Munique e com sugestões pela bula do kit de purificação de proteínas (Life Technologies®). Nesta etapa houveram adaptações para que simultaneamente fosse feita a extração de DNA das amostras junto com a extração de proteínas das amostras de órgãos.

3.5.4 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)

Amostras de órgãos de *R. sanguineus* e *A. sculptum* foram analisadas através da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS), de acordo com (LAEMMLI, 1970). Nos géis com tamanho de 10cm x 8cm de foram aplicados 30 µg de proteína total da amostra. Os órgãos foram analisados em SDS-PAGE 12%.

O padrão de peso utilizado variou de 10kDa a 245 kDa (Bio-Rad®).

3.5.4.1 Corrida eletroforética

No gel de empacotamento 5% (Anexo C), as amostras foram submetidas à corrente de 80 V, 25 mA e 20 W. Quando o padrão de peso molecular se encontrou no limite entre o gel de empacotamento e o gel de corrida (Anexo D), a corrida foi realizada sob corrente de 100 V, 30 mA e 20 W durante 1 hora e 20 minutos.

3.5.4.2 Coloração dos géis

Os géis foram corados por “Coomassie Brilliant Blue R” (Coomassie Blue R-250 0,25%, metanol 45%, água destilada 45% e ácido acético 10%) e descorados em água e etanol 10% e posteriormente corados com nitrato de Prata (Anexo E).

3.5.4.3 Coloração “Coomassie Brillhant Blue R”

O gel foi retirado do aparato de eletroforese vertical e submerso por 1 hora na solução fixadora. Após esse período, o gel foi submerso em overnight em solução corante de 0,5% Coomassie Brillhant Blue. Para a revelação, foi utilizada a solução fixadora que vai descorando o gel lentamente, até a visualização das bandas correspondentes às proteínas por transiluminação com luz visível.

3.5.4.4 Coloração de prata

O gel foi submerso em solução fixadora por 1 hora, sendo posteriormente lavado por 20 minutos 3 vezes em solução de etanol 50%. Foi realizado um pré-tratamento do gel com solução de tiosulfato de sódio por 1 minuto e feitos 3 enxagues com água destilada por apenas 20 segundos cada um. A impregnação com nitrato de prata foi realizada por 20 minutos, seguida de 2 lavagens com água destilada por 20 segundos. A revelação foi acompanhada visualmente para evitar que o gel ficasse muito escuro (aproximadamente 10 minutos), sendo feitas duas lavagens com água destilada e posterior submersão do gel em solução de parada. O gel foi mantido em solução de etanol 50% durante a transiluminação com luz visível.

3.6 Análise estatística

Os dados do presente estudo foram testados pelo teste de normalidade Kolmogorov-smirnov.

A comparação entre as médias aritméticas foi realizada a partir do teste não-paramétrico Kruskal-Wallis, em nível de significância de 95%. As médias foram consideradas significativamente distintas quando $p < 0,05$. A escolha dos testes estatísticos foi realizada conforme Sampaio (2002). Na avaliação dos aspectos biológicos da fase não-parasitária peso da postura, índices de produção de ovos e de eficiência reprodutiva, que apresentaram uma distribuição normal aplicou-se o teste de Duncan com nível de 5% de significância. No caso dos aspectos referentes ao período de pré-postura e percentual de eclosão larval, que apresentaram distribuição não normal pelo teste Kolmogorov-Smirnov, a estratégia de análise foi não paramétrica, a partir do teste de Kruskal-Wallis a nível de significância de 5%. A análise estatística dos dados obtidos nos parâmetros biológicos da fase não parasitária das fêmeas de *A. sculptum* foi realizada através do programa estatístico BioEstat 5.0.

4 RESULTADOS

4.1 Padronização da técnica de alimentação artificial de fêmeas parcialmente ingurgitadas de *A. sculptum* por meio de ponteiras plásticas.

Na tabela 1 encontram-se os valores médios, desvios padrão e limites mínimos e máximos de pesos das fêmeas de *A. sculptum* (n=11), na faixa de peso inicial de 42,40-108mg, obtidas de infestação experimental em coelhos antes e depois da alimentação artificial bem como os valores das médias de ganho de peso.

Tabela 1. Pesos médio de fêmeas *Amblyomma sculptum* na faixa de peso inicial de 42,40-108mg, antes e depois da alimentação artificial, bem como o ganho médio de peso após exposição às ponteiras plásticas pelos períodos de 6,12 e 24 horas.

Grupos – Períodos (horas)	Peso antes	Peso depois	Ganho de peso
	Média±DP	Média±DP	Média±DP
	(mín - máx)	(mín - máx)	(mín - máx)
Controle	-	434,21 ^a ±83,10 (350,20-632,30)	
Grupo 1 – 6h	78,81 ^a ±16,47 (57,90-106,80)	139,61 ^b ±46,90 (91,80-262,20)	60,80 ^b ±41,79 (14,20-169,20)
Grupo 2 – 12 h	79,10 ^a ±12,95 (48,50-94,80)	181,28 ^b ±51,50 (127,20-264,30)	102,18 ^b ±55,86 (43,4-192,10)
Grupo 3 – 24 h	78,25 ^a ±19,73 (42,40-108,00)	358,00 ^a ±78,52 (272,20-466,00)	279,75 ^a ±91,52 (185,60-402,20)

*DP: desvio padrão. Nas colunas, médias com pelo menos uma letra minúscula comum são equivalentes ($p > 0,05$)

Após a alimentação artificial de fêmeas de *A. sculptum*, por meio de ponteiras plásticas, foi verificada diferença estatística significativa no peso médio dos carrapatos a partir do período de 24 horas de alimentação com valores de $p < 0,05$. As fêmeas do grupo 3 (24h) apresentaram peso médio estatisticamente semelhante aos carrapatos do grupo controle.

Houve ingestão de sangue satisfatória em todos os grupos. O ganho médio de peso de fêmeas de *A. sculptum*, na faixa de peso inicial de 42,40-108,00mg, foi de 60,80mg, 102,18mg, 279,75mg, após alimentação por 6, 12 e 24 horas respectivamente. Foi verificada diferença estatística no ganho médio de peso no período de 24 horas de exposição das fêmeas de *A. sculptum* ao dispositivo de alimentação artificial.

Para os grupos de fêmeas de *A. sculptum*, da faixa de peso inicial de 112,00-169,60mg, foi verificada diferença estatística significativa no peso médio a partir da exposição dos carrapatos às ponteiras plásticas pelo período de 12 horas (Tabela 2).

Tabela 2. Pesos médio de fêmeas *Amblyomma sculptum* na faixa de peso inicial de 112-169,60mg, antes e depois da alimentação artificial, bem como o ganho médio de peso após exposição às ponteiras plásticas pelos períodos de 6,12 e 24 horas.

Grupos – Períodos (horas)	Peso antes	Peso depois	Ganho de peso
	Média±DP	Média±DP	Média±DP
	(mín - máx)	(mín - máx)	(mín - máx)
Controle	-	434,2 ^a ±83,10 (350,20-632,30)	-
Grupo 1 – 6h	133,53 ^a ±18,08 (112,00-169,60)	276,24 ^b ±78,51 (105,80-360,90)	142,70 ^b ±71,60 (-6,00-230,60)
Grupo 2 – 12 h	131,36 ^{b,c} ±17,84 (112,00-159,50)	440,21 ^a ±86,42 (262,20-586,00)	308,85 ^a ±91,65 (104,40-456,2)
Grupo 3 – 24 h	140,77 ^{b,c} ±16,75 (119,10-168,80)	506,51 ^a ±151,05 (156,20-718,10)	365,74 ^a ±156,53 (-9,00-599,00)

*DP: desvio padrão. Nas colunas, médias com pelo menos uma letra minúscula comum são equivalentes ($p > 0,05$)

As fêmeas dos grupos alimentados artificialmente por 12 e 24 horas foram capazes de ingerir volume de sangue suficiente para atingir peso médio semelhante ao do grupo controle ($p > 0,05$).

A ingestão de sangue foi satisfatória para as fêmeas de *A. sculptum*, da faixa de peso inicial de 112,00-169,60mg, alimentadas artificialmente nos períodos de 6,12 e 24 horas. Foi constatada diferença estatística significativa no ganho médio de peso das fêmeas expostas às ponteiras plásticas a partir de um período de 12 horas.

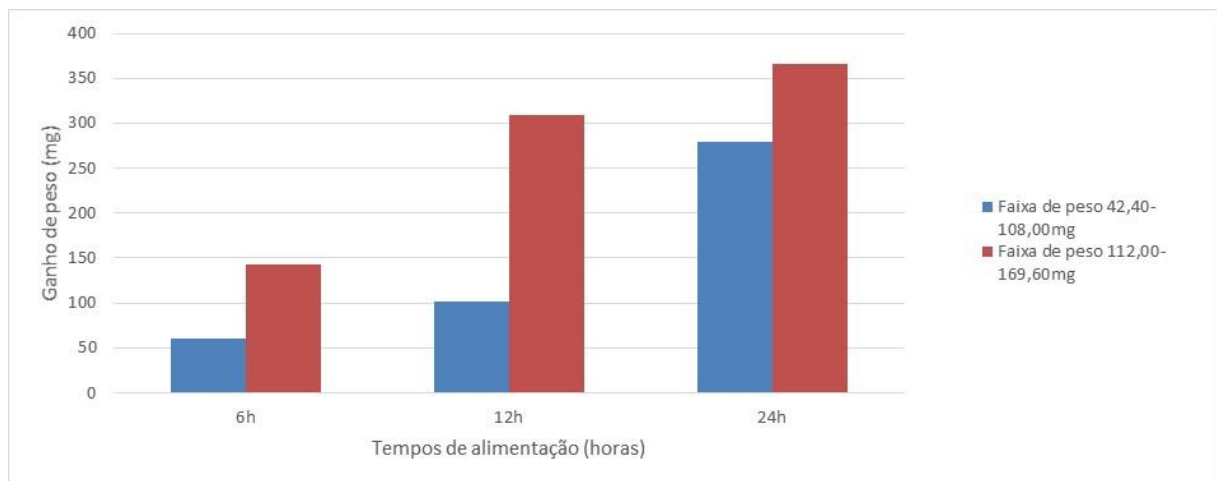


Figura 4. Ganho médio de peso de fêmeas *Amblyomma sculptum*, nas faixas de peso inicial de 42,40-108,00mg e 112,00-169,60mg, alimentadas artificialmente por meio de ponteiras plásticas, pelos períodos de 6, 12 e 24 horas.

4.1.1 Parâmetros biológicos da fase não-parasitária de fêmeas de *A. sculptum*, da faixa de peso inicial de 42,40-108,00mg, alimentadas artificialmente nos períodos de 6, 12 e 24 horas.

A avaliação dos parâmetros biológicos da fase não-parasitária das fêmeas de *A. sculptum*, da faixa de peso inicial de 42,40-108,00mg, alimentadas artificialmente nos períodos de 6, 12 e 24 horas foi representada na tabela 3.

Tabela 3. Parâmetros biológicos da fase não parasitária de fêmeas parcialmente ingurgitadas de *Amblyomma sculptum* submetidos a alimentação artificial por meio de ponteiras plásticas na faixa de peso inicial de 42,40 – 108,00mg nos períodos de 6, 12 e 24 horas.

Parâmetros biológicos	Períodos de exposição das fêmeas de <i>Amblyomma sculptum</i> à alimentação artificial por meio de ponteiras plásticas							
	6 horas		12 horas		24 horas		Controle	
	N/n	Média±DP (mín - máx)	N/n	Média±DP (mín - máx)	N/n	Média±DP (mín - máx)	N/n	Média±DP (mín - máx)
Peso das fêmeas alimentadas (mg)	11/11	139,6 ^b ±46,9 (91,8-262,20)	11/11	181,2 ^b ±51,5 (127,2-264,3)	11/11	358,0 ^a ±78,5 (272,2-466,0)	11/11	436,2 ^a ±83,0 (350,2- 632,3)
Período de pré-postura (dias)	11/10	13,5 ^a ±3,4 (9-18)	11/9	9,0 ^{a,b} ±2,4 (7-15)	11/10	8,1 ^b ±2,1 (6-13)	11/11	6,9 ^b ±0,5 (6-8)
Período de postura (dias)	11/10	9,1 ^c ±1,0 (8-10)	11/9	11,0 ^{b,c} ±3,0 (7-14)	11/10	16,9 ^{a,b} ±4,1 (9-21)	11/11	21,3 ^a ±3,7 (15-26)
Peso da massa de ovos	11/10	45,60 ^b ±30,00 (18,2-121,7)	11/9	42,1 ^b ±33,4 (0,5-89,3)	11/10	145,33 ^{a,b} ±59,40 (57,5-233,7)	11/11	359,0 ^a ±72,3 (264,5-469,60)
Índice de Eficiência Nutricional (%)	11/10	24,98 ^b ±6,52 (14,57-34,81)	11/9	21,52 ^b ±16,82 (0,18-51,36)	11/10	36,93 ^{a,b} ±14,84 (13,37-52,18)	11/11	74,4 ^a ±24,59 (31,37-110,77)
Índice de Produção de ovos (%)	11/10	29,65 ^b ±8,59 (18,21-46,41)	11/9	23,01 ^b ±16,41 (0,18-51,88)	11/10	44,35 ^b ±19,93 (13,51-69,58)	11/11	86,1 ^a ±25,6 (41,8-130,3)
Percentual de eclosão (%)	11/10	85,20 ^a ±10,21 (75-99)	11/9	90,90 ^a ±10,8 (75-99)	11/10	85,70 ^a ±10,00 (75-99)	11/11	86,00 ^a ±10,95 (75-99)

DP: desvio padrão. Nas linhas, médias com pelo menos uma letra minúscula comum são equivalentes ($p < 0,05$).

N, número de fêmeas expostas a ponteiras plásticas; n, número de fêmeas alimentadas.

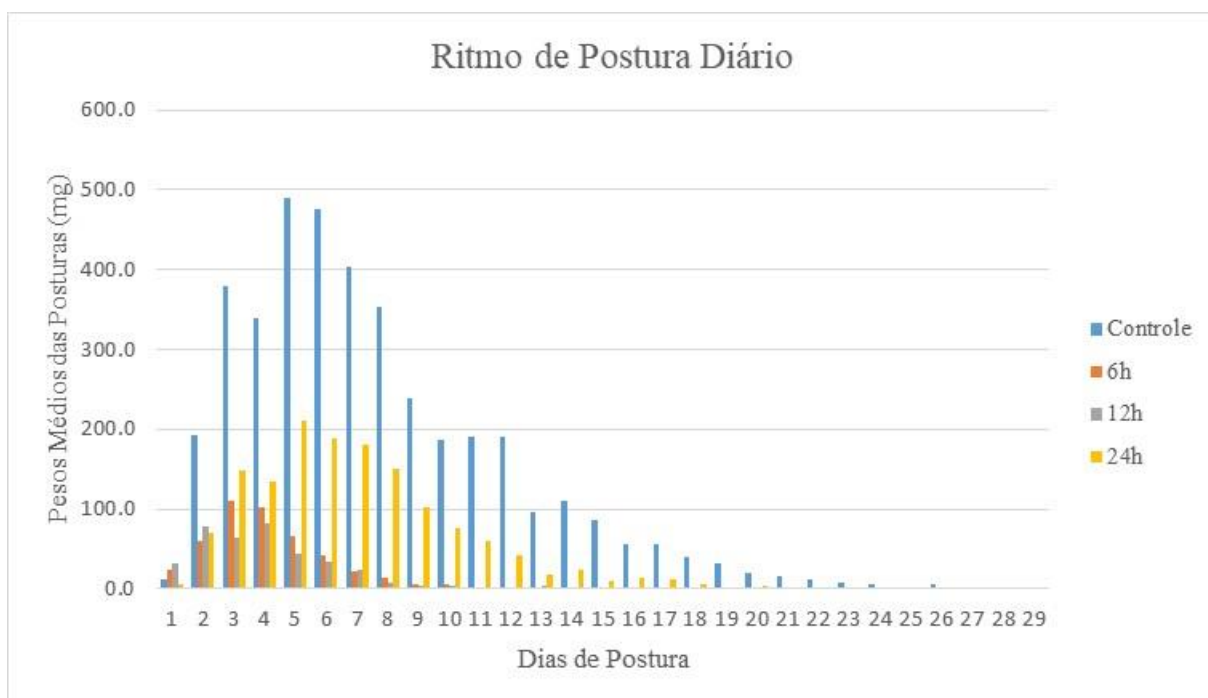


Figura 5. Ritmo de postura diário de fêmeas de *Amblyomma sculptum*, com faixa de peso inicial de 42,40-108,00mg, alimentadas por meio de ponteiras plásticas nos períodos de 6, 12 e 24 horas, mantidos sob 27⁰C e UR > 80%.

A avaliação dos parâmetros biológicos da fase não parasitária das fêmeas de *A. sculptum*, na faixa de peso inicial de 112,00-169,60mg, alimentados artificialmente nos períodos de 6, 12 e 24 horas foi demonstrada na Tabela 4.

Tabela 4. Parâmetros biológicos da fase não parasitária de fêmeas parcialmente ingurgitadas de *Amblyomma sculptum* submetidos a alimentação artificial por meio de ponteiras plásticas na faixa de peso inicial de 112,00 – 169,60mg nos períodos de 6, 12 e 24 horas.

Parâmetros biológicos	Períodos de exposição das fêmeas de <i>Amblyomma sculptum</i> à alimentação artificial por meio de ponteiras plásticas							
	6 horas		12 horas		24 horas		Controle	
	N/n	Média±DP (mín - máx)	N/n	Média±DP (mín - máx)	N/n	Média±DP mín - máx)	N/n	Média±DP (mín - máx)
Peso das fêmeas alimentadas (mg)	11/11	276,2 ^b ±78,5 (105,8-360,9)	11/11	440,2 ^a ±86,4 (262,2-586,0)	11/11	506,5 ^a ±151,0 (156,2-718,1)	11/11	434,2 ^a ±83,1 (350,2-632,3)
Período de pré-postura (dias)	11/11	7,6 ^a ±0,5 (7-8)	11/10	7,1 ^a ±0,7 (6-8)	11/10	7,6 ^a ±1,6 (6-11)	11/11	6,9 ^a ±0,5 (6-8)
Período de postura (dias)	11/11	16,4 ^b ±2,6 (12-20)	11/10	18 ^{a,b} ±3,6 (13-24)	11/10	18,3 ^{a,b} ±3,3 (13-23)	11/11	21,3 ^a ±3,7 (15-26)
Peso da massa de ovos	11/11	113,8 ^c ±45,6 (26,2-178,4)	11/10	180,7 ^{b,c} ±37,1 (132,8-242,7)	11/10	204,4 ^b ±52,9 (97,2-279)	11/11	359 ^a ±72,3 (264,5-469,6)
Índice de Eficiência Nutricional (%)	11/11	30,3 ^b ±15,4 (6,5-58,2)	11/10	37,7 ^{a,b} ±9,2 (24,2-50,8)	11/10	30,8 ^b ±7,2 (20,6-41,5)	11/11	74,4 ^a ±24,6 (31,4-110,8)
Índice de Produção de ovos (%)	11/11	42,6 ^b ±16,9 (11,7-73,5)	11/10	42,6 ^b ±8,5 (28,4-53,4)	11/10	38,2 ^b ±9,3 (20,8-49,5)	11/11	86,1 ^a ±25,6 (41,8-130,3)
Percentual de eclosão (%)	11/11	90,8 ^a ±10 (75-99)	11/10	89,2 ^a ±10,2 (75-99)	11/10	81,7 ^a ±7,3 (75-99)	11/11	86 ^a ±10,9 (75-99)

*DP: desvio padrão, Nas linhas, médias com pelo menos uma letra minúscula comum são equivalentes ($p < 0,05$). N, número de fêmeas expostas a ponteiras plásticas; n, número de fêmeas alimentadas.

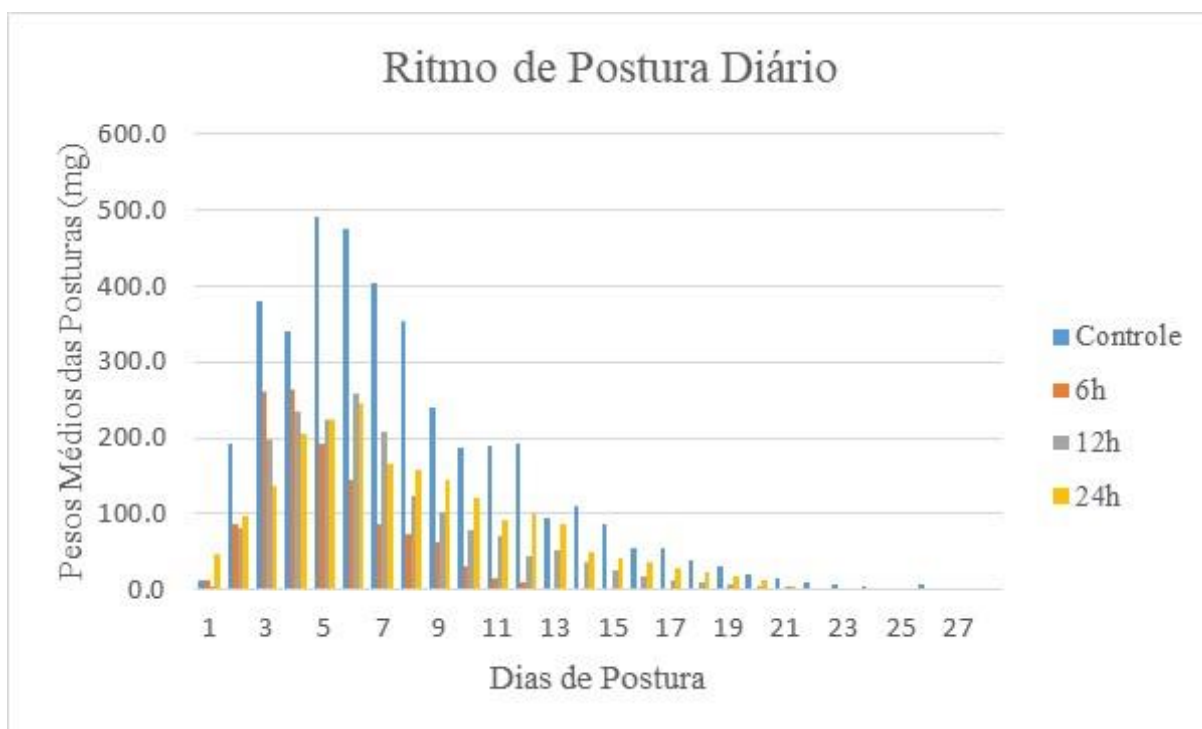


Figura 6. Ritmo de postura diário das fêmeas de *Amblyomma sculptum* com faixa de peso inicial de 112,00-169,60mg, alimentadas por meio de ponteiras plásticas nos períodos de 6, 12 e 24 horas sob 27°C e UR > 80%.

4.1.2 Infecção experimental de fêmeas de *Amblyomma sculptum* e *Rhipicephalus sanguineus* por *Rickettsia parkeri* através da técnica de alimentação artificial que utiliza ponteiras plásticas

Tanto as fêmeas de *R. sanguineus* quanto as de *A. sculptum* apresentaram uma ingestão satisfatória de sangue após o período de 12 horas de exposição as ponteiras plásticas.

Na figura 7 foi demonstrado o ritmo de postura das fêmeas de *A. sculptum* e *R. sanguineus* infectadas por *Rickettsia parkeri* através da alimentação artificial.

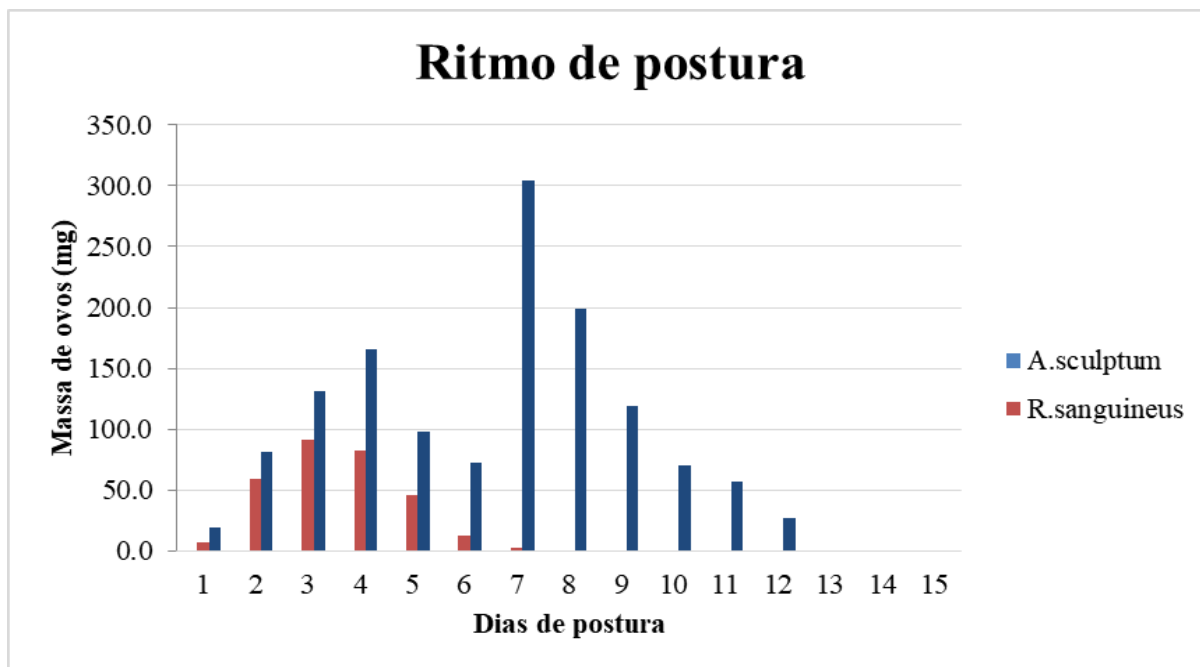


Figura 7. Ritmo de postura diário de fêmeas *Amblyomma sculptum* e *Rhipicephalus sanguineus* infectadas experimentalmente por meio da técnica de alimentação que utiliza ponteiras plásticas pelo período de 12 horas sob 27⁰C e UR > 80%.

Todas as 43 amostras de quenóginas infectadas artificialmente por *R. parkeri* amplificaram na PCR para os gens 17k (Figura 7) e gltA (Figura 8), sendo 31 amostras de *R. sanguineus* e 12 de *A. sculptum*.

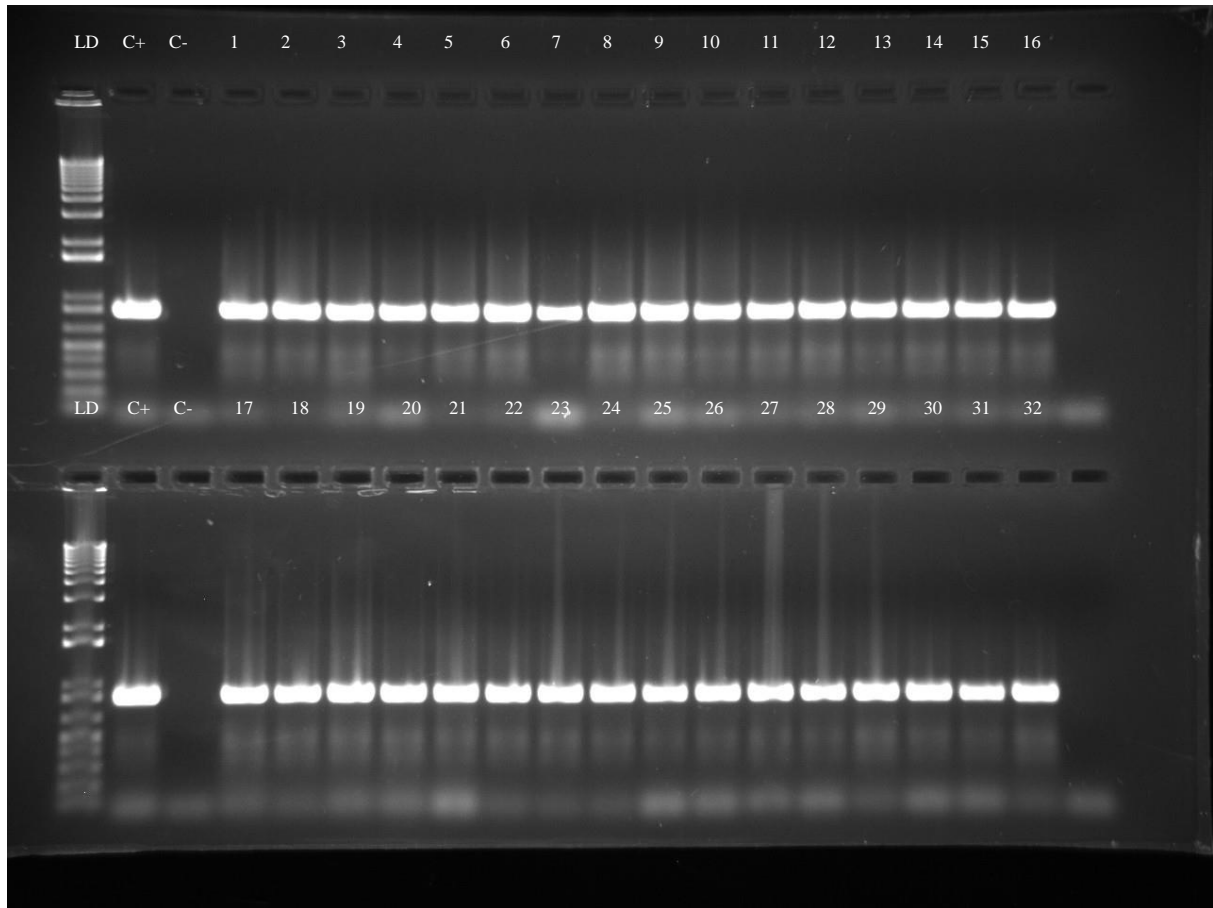


Figura 8. Fotografia de eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado com Brometo de Etídio, evidenciando a amplificação do gene 17k em quenóginas de *Rhipicephalus sanguineus* infectadas por *Rickettsia parkeri* por meio da técnica de alimentação artificial utilizando ponteiros plásticos; LD: Ladder de 500pb, C+: controle positivo, amostras 1-32 quenóginas de *Rhipicephalus sanguineus*.

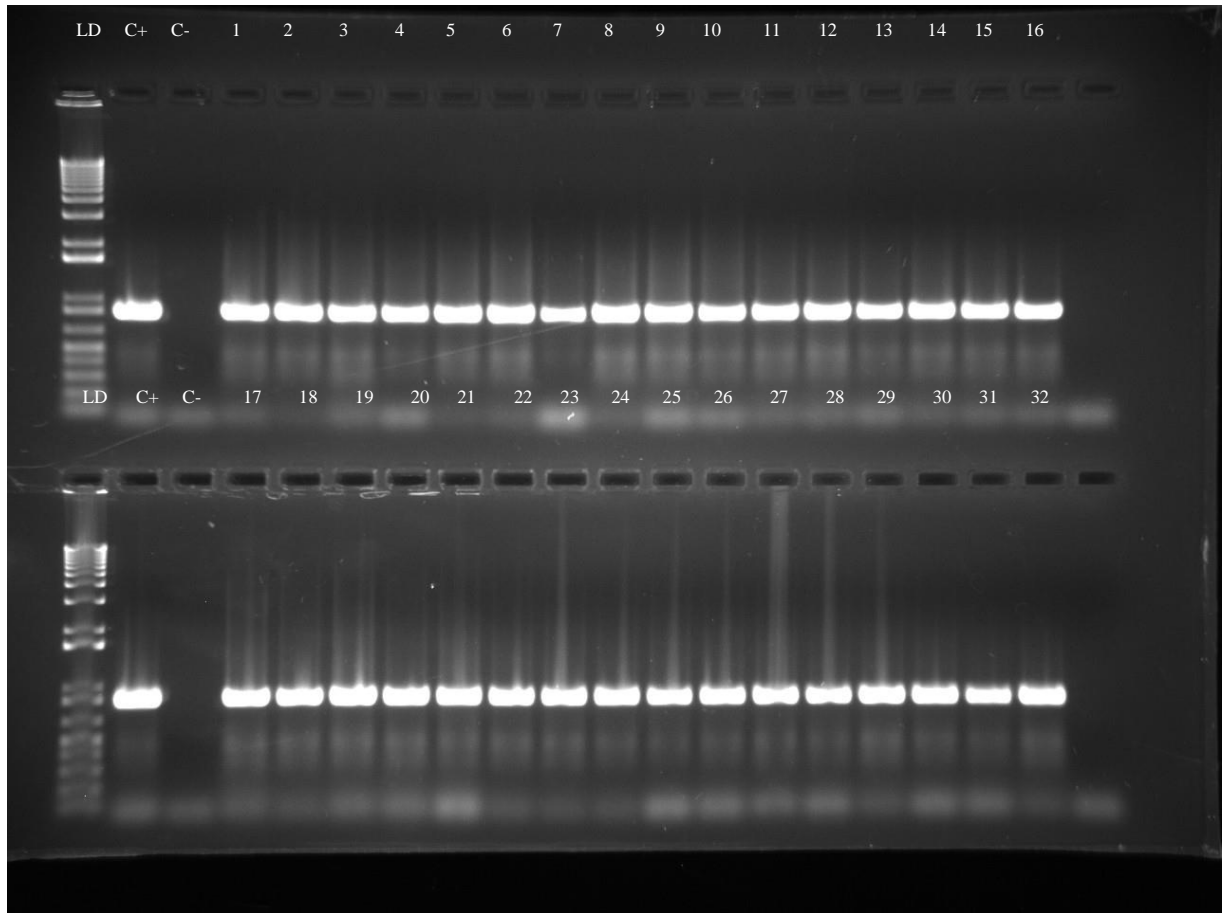


Figura 9. Fotografia de eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado com Brometo de Etídio, evidenciando a amplificação gene *gltA* em quenóginas do *Rhipicephalus sanguineus* infectadas por *Rickettsia parkeri* por meio da técnica de alimentação artificial utilizando ponteiros plásticos; LD: Ladder de 100pb, C+: controle positivo, C-: controles negativos, amostras 1-32.

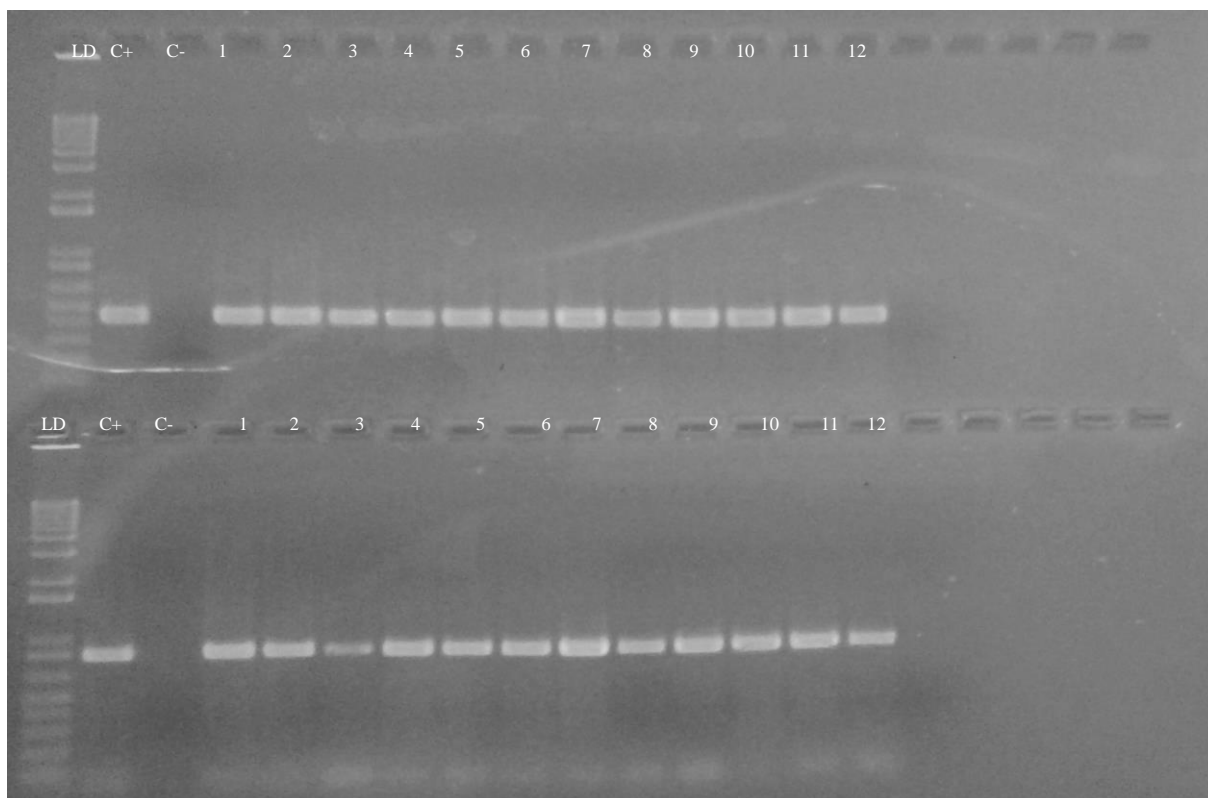


Figura 10. Fotografia de eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado com Brometo de Etídio, evidenciando a amplificação do gene *gltA* e do gene 17k em quenóginas de *Amblyomma sculptum* infectadas por *Rickettsia parkeri* por meio da técnica de alimentação artificial utilizando ponteiras plásticas; LD: Ladder de 100pb, C+: controle positivo, C-: controles negativo, amostras 1-12.

4.1.3 PCR de ovos e adultos de *Amblyomma sculptum*

Todas as 12 quenóginas de *A. sculptum* amplificaram para os gens *gltA* e 17k. Com relação as 10 amostras de ovos de *A. sculptum*, apenas uma amostra amplificou para os gens 17k, *gltA* e *OmpA*. Os resultados estão expostos no quadro abaixo.

Quadro 3. Resultado da PCR de ovos e adultos de *Amblyomma sculptum* infectados por *Rickettsia parkeri* por meio da alimentação artificial.

	Nº de carrapatos positivos/testados		
<i>A. sculptum</i>	Gene <i>gltA</i>	Gene 17k	Gene <i>ompA</i>
Ovos	1/12	1/12	1/12
Adultos	12/12	12/12	-

4.1.4 PCR de larvas, ovos e adultos de *Rhipicephalus sanguineus*

Todas as 32 amostras quenóginas de *R. sanguineus* amplificaram para os gens *gltA* e *17k*. Na avaliação da infecção das larvas de *R. sanguineus*, todas as 10 amostras não amplificaram para os gens citados acima ao passo que das 21 amostras de ovos de *R. sanguineus* apenas 6 foram positivas para os gens *gltA*, *17k* e *OmpA*. Os valores estão expostos no quadro abaixo.

Quadro 4. Resultado da PCR de larvas, ovos e adultos de *Rhipicephalus sanguineus* infectados por *Rickettsia parkeri* por meio da alimentação artificial utilizando ponteiras plásticas.

<i>R. sanguineus</i>	N ^o de carrapatos Positivos /testados		
	Gene <i>gltA</i>	Gene <i>17k</i>	Gene <i>ompA</i>
Ovos	6/21	6/21	6/21
Larvas	0/12	0/12	0/12
Adultos	32/32	32/32	-

4.1.5 Perfil de proteínas em amostras de órgãos de *R. sanguineus* e *A. sculptum* através da técnica de SDS-PAGE.

Na análise das amostras de órgãos de *A. sculptum* e *R. sanguineus*, observou-se que das 10 amostras de órgãos de *R. sanguineus* submetidas a técnica de SDS-PAGE, 5 amostras de ovário apresentaram bandas no gel de poliacrilamida com peso molecular variando de 170kDa, 70 kDa e 22 kDa e as amostras de glândula salivar apresentaram bandas com peso molecular variando de 170kDa, 130kDa, 70 kDa e 22kDa.

Em se tratando das amostras infectadas de *R. sanguineus*, das 14 amostras submetidas a técnica tanto as que foram dissecadas nove horas após a infecção artificial quanto as que foram dissecadas após 30 horas após esta infecção, apresentaram os mesmos padrões moleculares no gel de poliacrilamida com grupos de proteínas variando de 170kDa, 30kDa, 32kDa e 22kDa. Das amostras de *A. sculptum* avaliadas, apenas as amostras de intestino apresentaram bandas com proteínas de peso molecular variando de 93kDa, 30kDa e 22kDa, as outras duas amostras de ovário e outras duas de glândula salivar não apresentaram nenhum padrão molecular no gel.

5. DISCUSSÃO

5.1. Avaliação do ganho de peso de *Rhipicephalus sanguineus* e *Amblyomma sculptum*.

O carrapato ixodídeo *Rhipicephalus sanguineus* apresentou resultados satisfatórios quando submetido a técnica de alimentação artificial como observado nos estudos de CUNHA et al. (2010), SAKAI, R., K. (2010) e VALIM et al. (2017) tanto usando tubos capilares quanto ponteiras plásticas, nestas avaliações de ganho de peso pelos espécimes foram empregados aparatos de fornecimento de sangue, na ocasião foram utilizados tubos capilares e as ponteiras plásticas.

BURGDORFER, W. (1957) em seus experimentos, observou que a alimentação dos carrapatos ocorreu rapidamente quando foram oferecidas suspensões frescas. Segundo o autor, o fornecimento de sangue fresco é fundamental para o bom desempenho de ganho de peso pelos carrapatos.

No presente estudo, as ponteiras plásticas foram trocadas com intervalos de 1h durante a alimentação, a partir daí os carrapatos receberam sangue fresco frequentemente, analisamos também que este tempo de verificação pode ser estendido, objetivando tornar a execução da técnica mais prática, já que os exemplares obtiveram um bom aproveitamento na ingestão do sangue fornecido.

As faixas de peso e os períodos de alimentação usados neste estudo para fêmeas de *R. sanguineus* foram aqueles estabelecidos por VALIM et al. (2017) estudando o mesmo ixodídeo, sendo consideradas a faixa de peso 36 – 80mg e o período de 12 horas submetidos a alimentação artificial. Em relação ao ixodídeo *A. sculptum*, os critérios adotados para a formação dos grupos para a infecção de partenóginas levamos em consideração o tempo de exposição, a mão de obra utilizada, o fato de haver extravasamento de sangue caso as fêmeas da faixa mais pesada fossem escolhidas e a análise estatística significativa.

A partir destas análises, o tempo escolhido foi de 12 horas e a faixa de peso para formação dos grupos foi de 55-150mg. Na análise estatística quanto ao ganho de peso, observamos que entre os grupos 12 e 24 horas não havia diferença significativa, logo a escolha de qualquer um dos dois tempos viabilizaria a execução da técnica. Levamos em consideração também o fato de a maioria dos patógenos necessitar de um tempo de no mínimo 3 horas ou cima quando fixados naturalmente no hospedeiro para transmitir um agente, tal afirmação foi verificada por FOURIE et al. (2013) ao trabalhar com ninfas e adultos de *R. sanguineus* na transmissão de *Ehrlichia canis* por meio de membrana de silicone e HOJGAARD; EISEN; PIESMAN (2008), cujo principal objetivo foi verificar a rápida transmissão de *Borrelia burgdorferi* por ninfas do carrapato *Ixodes*, o tempo mínimo necessário para a transmissão do patógeno foi de 12 horas.

O ressecamento observado durante o período de alimentação artificial dos carrapatos foi mínimo na parte final do novo dispositivo em contato com o aparelho bucal do espécime, o que foi solucionado com um fio de aço para a desobstrução das ponteiras. No estudo

desenvolvido por PURNELL; JOYNER (1967) foi explicado que isto ocorre devido ao cimento produzido pelo carrapato, o acúmulo desta substância obstrui o dispositivo de alimentação dificultando a ingestão de sangue. Neste estudo a utilização das ponteiras plásticas, possibilitou o ingurgitamento completo de 3 fêmeas de *A. sculptum* do grupo onde a faixa de peso compreendida de 112-169,60mg, o dispositivo de alimentação foi altamente eficiente para as fêmeas do ixodídeo *A. sculptum* porque possibilitou uma maior ingestão de sangue pelos carrapatos.

O tempo de alimentação foi suficiente para que as fêmeas de *R. sanguineus* se tornassem infectadas por *R. parkeri*. Ao trabalhar com *A. sculptum* para padronização da técnica de alimentação artificial utilizando ponteiras plásticas, observamos que o desempenho deste ixodídeo foi satisfatório quanto ao ganho de peso ao ser exposto ao dispositivo e o tempo e a faixa de peso adotados para estes exemplares foi suficiente para que as fêmeas se tornassem infectadas pelo patógeno em questão.

5.1.2 Avaliação do Peso Inicial de Fêmeas Parcialmente Ingurgitadas de *Amblyomma sculptum* Sobre o Ganho Médio de Peso quando Submetidas a Alimentação Artificial por meio de Ponteiras Plásticas.

Assim como em outros estudos, até o momento a maneira mais apropriada para avaliar a ingestão de sangue das fêmeas alimentadas é a pesagem destas antes e após a alimentação artificial, uma vez que esta metodologia demonstrou baixo custo, simplicidade e facilidade de execução na avaliação deste parâmetro.

Nas análises de ganho de peso desenvolvidas pelos estudos de ABEL (2004), DE LA VEGA; DIAZ; FINLAY (2000), RIBEIRO, C. C. D. U. et al. (2014), SAKAI, R., K. (2010) empregou-se a pesagem dos carrapatos antes e após como método confirmatório da ingestão de sangue pelos carrapatos alimentados artificialmente.

No entanto, outras metodologias também demonstraram êxito na avaliação do ganho de peso dos carrapatos submetidos a alimentação *in vitro*. Um estudo realizado por PURNELL; JOYNER (1967) utilizou tubos capilares com uma especificação padrão para que o volume ingerido pelo carrapato pudesse ser avaliado através da medição do comprimento da coluna no tubo. Anos mais tarde, KOCAN et al. (2005) trabalhou com microesferas fluorescentes para observar a ingestão de sangue, neste estudo os autores objetivaram desenvolver o sistema de alimentação artificial utilizando tubos capilares para infectar os carrapatos com *A. marginale*, assim as microesferas foram implementadas para confirmar a infecção nos esfregaços de tecidos dos ixodídeos.

No estudo realizado por CUNHA et al. (2010) o ganho médio de peso de fêmeas parcialmente ingurgitadas de *R. sanguineus* alimentadas artificialmente por meio de tubos capilares foi inferior aos encontrados no presente estudo.

Essa diferença pode ter ocorrido porque no trabalho de CUNHA et al. (2010) não foi definida a faixa de peso inicial das fêmeas, além de utilizarem espécimes com grandes variações de peso inicial e os dispositivos de alimentação foram diferentes, observamos embora não fossem testados os tubos capilares para avaliação do ganho de peso por *A. sculptum*, ao se utilizar ponteiras plásticas para esta espécie, os exemplares demonstraram boa

adaptação quanto a ingestão de sangue e resultados de ganho de peso satisfatórios quanto a análise estatística.

Na execução da técnica de alimentação artificial é extremamente importante determinarmos o peso médio inicial das fêmeas, pois somente desta maneira podemos avaliar em qual faixa de peso dos carrapatos será possível alcançar os objetivos do estudo que se pretende desenvolver.

RANGEL, C. P. et al. (2008) utilizaram duas faixas de peso inicial do carrapato *D. nitens*, esses autores notaram que os grupos de carrapatos com peso de 61 a 100mg, apresentaram maior ganho médio de peso em relação aos grupos que pesavam inicialmente entre 40 a 60mg, quando alimentados artificialmente por meio de tubos capilares.

Os resultados obtidos para os carrapatos da faixa de peso inicial de 42,40-108,00mg - grupo 24 horas e para os carrapatos da faixa de peso inicial de 112,00-169,60mg - grupos 12 e 24 horas, sugerem a possibilidade de se completar a fase rápida de alimentação deste ixodídeo em condições artificiais, com a obtenção de espécimes completamente ingurgitados. Até o momento ainda não existiam relatos na literatura de ingurgitamento completo pela alimentação artificial desta espécie de carrapato.

Nos carrapatos da faixa de peso inicial de 112,00-169,60mg alimentados por um período de 24 horas foi observada uma ingestão média de 750µl de sangue citratado bovino. Este resultado demonstra o sucesso da utilização da técnica de alimentação artificial, por meio de ponteiros plásticas, para minimizar os danos causados pelo repasto sanguíneo desta espécie de ixodídeo em seus hospedeiros.

Na comparação entre o ganho médio de peso das fêmeas de *A. sculptum*, das duas faixas de peso avaliadas, foi verificada diferença estatística significativa nos três períodos aos quais os carrapatos foram submetidos à alimentação artificial. Como demonstrado na Figura 4, o ganho médio de peso foi crescente a medida em que se aumentou a faixa de peso e o tempo de exposição das fêmeas de *A. sculptum* ao dispositivo de alimentação artificial.

O peso das fêmeas foi crescente a medida em que se aumentou o tempo de exposição ao dispositivo, sendo observado que o grupo alimentado por 24 horas apresentou peso médio estatisticamente semelhante ao do grupo controle.

Entre as fêmeas dos grupos experimentais foi verificado que 01 fêmea não realizou postura nos grupos 6 e 24 horas e que 02 fêmeas não iniciaram a postura no grupo 12 horas.

As fêmeas do grupo alimentado artificialmente por 6 horas apresentaram período médio de pré-postura mais prolongado, sendo constatada diferença estatística significativa entre estas e os grupos 24 horas e controle. No período médio de postura dos grupos 6 e 12 horas apresentou diferença estatística em relação ao grupo controle.

Nos parâmetros referentes ao peso médio da massa de ovos e ao índice de eficiência nutricional as fêmeas de *A. sculptum* dos grupos 6 e 12 horas apresentaram diferença estatística significativa em relação ao grupo controle.

A comparação entre os índices médios de produção de ovos dos carrapatos dos grupos alimentados artificialmente demonstrou valores estatisticamente similares na conversão do sangue ingerido em ovos. No entanto, apresentaram diferença significativa em relação ao grupo controle.

O percentual de eclosão não apresentou diferença significativa entre os grupos testados e grupo controle revelando que a técnica não influenciou na capacidade no seu potencial biótico de fêmeas de *A. sculptum*.

O ritmo de postura diária não sofreu influência da alimentação artificial, o grupo 24 horas não apresentou diferença estatística em relação ao grupo controle quanto ao período médio de postura e o peso médio da massa de ovos (figura 5).

Os carrapatos do grupo 24 horas e do grupo controle apresentaram pico de postura no quinto dia enquanto os carrapatos dos grupos 6 e 12 horas apresentaram pico de postura no terceiro e quarto dia, respectivamente.

No parâmetro peso médio das fêmeas foi constatada diferença estatística significativa entre o grupo 6 horas e o grupo controle.

Na comparação entre os períodos médios de pré-postura dos grupos experimentais não foi verificada diferença estatística significativa, assim quando comparadas as médias destes com a do grupo controle. No período de postura apenas o grupo 6 horas apresentou diferença significativa quando comparado ao grupo controle.

O parâmetro peso médio da massa de ovos apresentou diferença estatística significativa entre os grupos experimentais e o grupo controle. Na avaliação do índice de eficiência nutricional, houve diferença estatística significativa entre o grupo controle e os grupos 6 e 24 horas. Analisando o índice de produção de ovos, todos os grupos diferiram significativamente do grupo controle. O percentual de eclosão não apresentou diferença estatística significativa entre os grupos testados e o grupo controle revelando que a técnica não influenciou na capacidade do carrapato ingerir sangue e no seu potencial biótico de fêmeas de *A. sculptum*.

Neste estudo, os autores observaram que as duas faixas de peso (42,40-108mg e 112,00-169,60 mg) de fêmeas de *A. sculptum* oriundas de infestação em coelhos ao serem analisadas e alimentadas artificialmente com ponteiras o ganho médio de peso de fêmeas de *A. sculptum*, na faixa de peso inicial de 42,40-108,00mg, foi de 60,80mg, 102,18mg e 279,75mg, após alimentação por 6, 12 e 24 horas respectivamente e as fêmeas na faixa inicial de 112,00-169,60mg o ganho médio de peso foi de 142,70mg, 308,85mg e 365,74mg nos mesmos períodos de alimentação, respectivamente. Foi verificada diferença estatística no ganho médio de peso a partir do período de 24 horas de exposição das fêmeas de *A. sculptum* ao dispositivo de alimentação artificial.

Para os grupos de fêmeas de *A. sculptum*, da faixa de peso inicial de 112,00-169,60mg, foi verificada diferença estatística significativa no peso médio a partir da exposição dos carrapatos às ponteiras plásticas pelo período de 12 horas, isto demonstra que o peso inicial exerce forte influência sobre o ganho de peso.

5.1.3 Avaliação da influência da Alimentação Artificial de Fêmeas Parcialmente Ingurgitadas de *A. sculptum* Obtidas de Infestação Experimental em Coelhos nos períodos de 6, 12 e 24 horas.

Analisando os diferentes períodos de alimentação foi observado ganho médio de peso crescente à medida que se aumentou o tempo de alimentação artificial, estes dados estão de acordo com os registrados por CUNHA et al. (2010), RANGEL, C.P. (2011), RIBEIRO, C. C.

D. U. et al. (2014) e VALIM et al. (2017), ao trabalharem com *R.sanguineus*, *Rhipicephalus microplus* e *Dermacentor nitens*.

O peso médio final das fêmeas após alimentação artificial encontrado por CUNHA et al. (2010) foram 66,0mg, 69,9mg e 73,6mg quando alimentados por 6,12 e 24 horas, respectivamente, estes valores foram muito semelhantes aos encontrados por (SAKAI, R., K., 2010) com peso médio final de 61,32mg, 69,73mg e 70,80mg nos períodos citados acima e utilizando o mesmo dispositivo, tubos capilares, porém no estudo conduzido por (VALIM et al., 2017) com a adaptação das ponteiras plásticas, os valores foram discretamente superiores, uma vez que ponteiras plásticas suportam um volume maior de sangue e maior ingestão de sangue pelos exemplares de ixodídeos.

A partir de 24 horas de alimentação artificial por meio de ponteiras plásticas não foi observada diferença significativa entre o ganho médio de peso dos grupos no estudo realizado por VALIM et al. (2017) trabalhando com o ixodídeo *R.sanguineus*, porém no presente estudo para a espécie *A. sculptum*, foi verificada diferença estatística no ganho médio de peso a partir do período de 24 horas de exposição das fêmeas de *A. sculptum* ao dispositivo de alimentação artificial na faixa de peso compreendida entre (42,40-108mg) e esta diferença estatística na faixa de peso compreendida entre 112,00-169,60mg ocorreu a partir de 12 horas de exposição ao dispositivo de alimentação artificial.

Há que se ressaltar que a ingestão significativa de sangue pode variar conforme a espécie de carrapato. RANGEL, C. P. et al. (2008) e RIBEIRO, C. C. D. U. et al. (2014), ao trabalharem com alimentação artificial de *R. microplus* e *D. nitens*, respectivamente, observaram ingestão significativa de sangue a partir de 24 horas.

O desempenho de *A. sculptum* quanto a ingestão de sangue foi considerado altamente eficiente visto que 3 exemplares de fêmeas alcançaram o ingurgitamento total, outros fatores que favorecem *A.sculptum* quando exposto ao dispositivo, é que sua estrutura morfológica e o tamanho do aparelho bucal contribuem para a melhor adaptação das fêmeas nos estudos empregando a técnica *in vitro*.

A técnica de alimentação artificial por meio de ponteiras plásticas não permitiu o ingurgitamento total de *R. sanguineus* em nenhum dos períodos de alimentação no estudo conduzido por VALIM et al. (2017), no entanto, esse resultado era esperado por ser tratar de uma situação artificial. Além disso, mesmo não havendo ingurgitamento total de todos os exemplares, houve sucesso na técnica, uma vez que as fêmeas parcialmente ingurgitadas ingeriram quantidade significativa de sangue, suficiente para realizarem postura.

Quanto ao parâmetro de postura, o fato de os grupos experimentais não atingirem o ingurgitamento total demonstra que ocorre influência, havendo uma leve diminuição em relação ao grupo controle, porém essa diferença não afetaria a manutenção da colônia ou estudos de transmissão de patógenos, demonstrando ser uma técnica viável e segura.

A postura das fêmeas mante-se viável após a execução da técnica. Não há na literatura estudos sobre a alimentação artificial de *A. sculptum* que avaliaram a influência da técnica sobre a biologia da fase não parasitária desta espécie de carrapatos. Portanto, parte das referências utilizadas nesta discussão foi baseada nos grupos experimentais de artigos que descreveram os aspectos biológicos de *R. sanguineus*, *R. microplus* e *D. nitens* quando submetidos a alimentação artificial por meio de ponteiras plásticas.

Os pesos médios das fêmeas alimentadas artificialmente por diferentes períodos de tempo diferiram estatisticamente do peso médio dos carrapatos do grupo controle. Esses

resultados foram semelhantes aos observados por (BELLATO; DAEMON, 1997; COELHO, 1993) quando trabalharam com o ixodídeo *R.sanguineus*.

O ingurgitamento total de todos os exemplares talvez não pôde ser atingido porque ao adquirir um certo grau de ingurgitamento através da alimentação artificial, observa-se que não ocorre o favorecimento do encaixe do dispositivo no aparelho bucal do carrapato, o que inviabiliza a continuidade da ingestão de sangue, esta observação foi crucial para a escolha da faixa de peso para realização da infecção de partenóginas de *A. sculptum*, optou-se por escolher uma faixa intermediária compreendida entre 55-150mg, uma vez que fêmeas pesando valores maiores que 150mg apresentaram o idiossoma muito arredondado o que dificultou o posicionamento e encaixe do dispositivo de alimentação artificial no aparelho bucal das fêmeas.

Nos estudos conduzidos por COELHO (1993) e PINTO (2000) com a mesma espécie foi observado que o período médio de pré-postura também foi menor que o das fêmeas do grupo alimentado artificialmente por 6 horas.

Quando foi avaliada a influência da técnica de alimentação in vitro por meio do dispositivo para *A. sculptum* observou-se primeiramente que na faixa de peso compreendida entre 42,40-108mg, as fêmeas do grupo alimentado artificialmente por 6 horas apresentaram período médio de pré-postura mais prolongado, sendo constatada diferença estatística significativa entre estas e os grupos 24 horas e controle.

No período médio de postura dos grupos 6 e 12 horas apresentou diferença estatística em relação ao grupo controle. Nos parâmetros referentes ao peso médio da massa de ovos e ao índice de eficiência nutricional as fêmeas de *A. sculptum* dos grupos 6 e 12 horas apresentaram diferença estatística significativa em relação ao grupo controle.

A comparação entre os índices médios de produção de ovos dos carrapatos dos grupos alimentados artificialmente demonstrou valores estatisticamente similares na conversão do sangue ingerido em ovos. No entanto, apresentaram diferença significativa em relação ao grupo controle.

O percentual de eclosão não apresentou diferença significativa entre os grupos testados e grupo controle revelando que a técnica não influenciou na capacidade biológica e no seu potencial biótico nas fêmeas de *A. sculptum*.

O ritmo de postura diária não sofreu influência da alimentação artificial, o grupo 24 horas não apresentou diferença estatística em relação ao grupo controle quanto ao período médio de postura e o peso médio da massa de ovos.

Os carrapatos do grupo 24 horas e do grupo controle apresentaram pico de postura no quinto dia enquanto os carrapatos dos grupos 6 e 12 horas apresentaram pico de postura no terceiro e quarto dia, respectivamente.

Os valores dos parâmetros dos grupos alimentados artificialmente foram superiores aos observados por CUNHA et al. (2010), RIBEIRO, C. C. D. U. (2015) e VALIM et al. (2017). Merece destaque o fato de que não houve grandes influências da alimentação artificial neste parâmetro biológico, ou seja, o potencial biótico da espécie não foi afetado, porém é importante destacar que os parâmetros relativos a postura vão sofrer uma alteração devido ao não ingurgitamento total dos carrapatos.

No que se refere ao período médio de postura, os grupos alimentados artificialmente apresentaram valores menores aos do grupo controle, assim quando comparado com COELHO (1993) Coelho (1993), para a espécie *R. sanguineus*. Em relação aos parâmetros referentes aos IPOs e IENs, estes não sofreram nenhum processo que pudesse prejudicar o desenvolvimento normal, demonstrando que o novo dispositivo é adequado para alimentar artificialmente os carrapatos não afetando o potencial biótico da espécie em questão quando submetida a alimentação artificial destacando-se o fato de as posturas estarem viáveis.

Os carrapatos com faixa de peso inicial de 112,00-169,60mg obtiveram resultados satisfatórios em relação ao ritmo de postura diária. Este resultado sugere que não houve influência da alimentação artificial sobre o potencial biótico. Os carrapatos do grupo 24 horas e do grupo controle apresentaram pico de postura no oitavo e quinto dia, respectivamente, enquanto os carrapatos dos grupos 6 e 12 horas apresentaram pico de postura no quarto dia.

Estes resultados reforçam a hipótese de que a técnica não exerce influência alguma sobre os aspectos biológicos que não estão ligados diretamente à postura. Isso ressalta que a influência sobre os aspectos biológicos esta ligada ao grau de ingurgitamento dos carrapatos e não a técnica de alimentação artificial.

O percentual médio de eclosão se aproximou do valor obtido para o grupo controle, se aproximando também dos valores observados por Coelho (1993), Bellato e Daemon (1997), , (PINTO, 2000)Pinto (2000) e , (RANGEL, C.P., 2011), (RIBEIRO, C. C. D. U. et al., 2014) e (VALIM et al., 2017). Portanto, percentual médio de eclosão das larvas não sofreu influência da técnica utilizando ponteiras plásticas para a execução da alimentação artificial não causando dessa maneira interferência no potencial biótico da espécie.

5.1.4 Avaliação da infecção in vitro de *Rickettsia parkeri* para quenóginas, larvas e ovos de *Rhipicephalus sanguineus* e *Amblyomma sculptum*

5.1.5 Detecção de DNA de *Rickettsia parkeri* nos carrapatos infectados

Este é o primeiro estudo experimental envolvendo a infecção por *R. parkeri* para *Amblyomma sculptum* e *R. sanguineus* utilizando a técnica *in vitro*. O estudo elaborado por GODDARD, J. et al. (2012) foi o único na literatura que visou desenvolver técnicas para a transmissão experimental de *R. parkeri* por meio de alimentação artificial, contudo esse estudo se constituiu na avaliação de uma possível capacidade vetorial desse patógeno por percevejos.

CORDEIRO, M.D. (2015) com grande êxito realizou um estudo utilizando a alimentação artificial por meio de ponteiras plásticas e posteriormente conduziu a infecção *in vitro* de *R. parkeri* para o carrapato monoxeno *R. microplus*. Os resultados obtidos no presente estudo indicaram que *R. parkeri* pode persistir nos carrapatos *R. sanguineus* e *A. sculptum* alimentado artificialmente com sangue infectado, após a o término da alimentação artificial. Este fato foi verificado por meio da realização da PCR em 12 amostras de carrapatos *A. sculptum* infectados (fêmeas) e 10 amostras de ovos.

A técnica detectou positividade para 12 (92,8 %) das quenóginas e 1 ovos (10 %) dos carrapatos infectados por meio artificial, utilizando os marcadores que amplificam os genes *gltA* , *17k* e *OmpA* para *A. sculptum*. Foi possível afirmar que não houve positividade em

carrapatos do grupo-controle quando realizada a PCR, utilizando o marcador *gltA*, 17k e *OmpA*. Desse modo, o estudo demonstrou que houve transmissão transovariana pela alimentação artificial para este ixodídeo. GODDARD, J. et al. (2012), avaliaram de igual forma a transmissão artificial de *R. parkeri* em um vetor não incriminado.

Os autores indicaram que nenhum percevejo imaturo foi positivo na PCR, sugerindo que, possivelmente, os organismos não sobreviveram ao processo de muda, entretanto foi verificado que em adultos houve a persistência do patógeno até duas semanas após a infecção, por meio de alimentação artificial, fato que também ocorreu no presente estudo para os adultos de *A. sculptum* e *R. sanguineus*, evidenciando perpetuação transestadial.

Os resultados do estudo desenvolvido por RIBEIRO, C. C. D. U. (2015), podem ser confrontados com infecções experimentais que avaliaram a transmissão transestadial de *R. parkeri* à espécies altamente susceptíveis, como *A. ovale* e *A. triste*, no Brasil. Esses estudos verificaram que houve 100% de transmissão transestadial de *R. parkeri* cepa Mata Atlântica e *R. parkeri* cepa At 24, em *A. ovale* e *A. triste*, respectivamente (NIERI-BASTOS et al., 2013)(NIERI, 2013).

As amostras de larvas do carrapato *R. sanguineus* oriundas de fêmeas infectadas artificialmente por *R. parkeri* pela alimentação artificial foram considerada negativa pela técnica da PCR convencional e pela Nested PCR, utilizando o marcador do gene *gltA*, 17k e *omapA* respectivamente, possivelmente não foi amplificada em função da presença de contaminantes observada em grande quantidade, durante a dosagem, utilizando espectrofotômetros.

5.1.6 Infecção Artificial de *Rickettsia parkeri* em *Amblyomma sculptum* e *Rhipicephalus sanguineus* por meio da alimentação artificial

O primeiro relato de um estudo experimental avaliando aspectos biológicos envolvendo uma espécie de rickettsia patogênica (*R. parkeri*) foi com o carrapato monoxeno, *Rhipicephalus microplus* no estudo conduzido por CORDEIRO, M.D. (2015).

Antes deste estudo isso só foi possível, graças a infecção experimental de carrapatos por rickettsias patogênicas, geralmente utilizando um hospedeiro mamífero susceptível amplificador (SAKAI, R. K. et al., 2014). A escassez de dados de espécies de mamíferos amplificadores de *R. parkeri* dificulta a realização de infecções dessa rickettsia à carrapatos para estudos de sua interação.

A cepa de *R. parkeri* utilizada no presente estudo foi isolada de *Amblyomma triste* coletado de uma área alagada do Município de Paulicéia-SP (SILVEIRA et al., 2007). Nessas áreas, o Cervo-do-Pantanal (*Blastocerus dichotomus*) tem sido implicado como o principal hospedeiro da fase adulta deste carrapato (SZABÓ, MATIAS P. J. et al., 2007). Por meio da técnica de alimentação artificial foi possível infectar 100% das fêmeas parcialmente ingurgitadas, após o período de exposição mesmo algumas fêmeas não ganhando peso MACALUSO, K.R et al. (2001) e MACALUSO, KEVIN R et al. (2002) também utilizaram tubos capilares para infectar *D. variabilis* com *Rickettsia ontana* e *Rickettsia rhipicephali*.

Porém, ao invés de sangue foi utilizado o meio de cultivo e apesar de ter infectado 100% das fêmeas, a ingestão mensurada por MACALUSO, K.R et al. (2001) foi pequena (1.37 µl em média). A transmissão transovariana ocorrida nos carrapatos da espécie *R. microplus* infectados artificialmente pode ser considerada um dado importante observado no

estudo de CORDEIRO, M.D. (2015). No presente estudo apenas 28,57% das amostras de ovos de *R. sanguineus* amplificaram para os genes alvo e apenas 10% das amostras de ovos de *A. sculptum* foram positivas para os genes alvo.

Transmissão transovariana de diferentes agentes rickettsiais tem sido relatadas em muitas espécies de carrapatos (SOARES et al., 2012). Segundo Burgdorferi; Brinton (1975) a infecção transovariana da *R. rickettsii* em fêmeas do carrapato *Dermacentor andersoni* depende diretamente da fase em que o carrapato infectou-se com a bactéria, sendo que quando isto ocorre na fase adulta a transmissão é inexistente ou muito baixa, pois não haveria tempo suficiente para colonizar o ovário e penetrar nos ovócitos.

No estudo desenvolvido por CORDEIRO, M.D. (2015), essa infecção ocorreu no período final da alimentação da fase adulta, mesmo assim, houve a transmissão da rickettsia pela maioria das progenitoras para suas progênes e, em uma fêmea, essa transmissão ocorreu de forma contundente. O principal destaque no desempenho da oviposição de *R. sanguineus* e *A. sculptum* infectadas por *R. parkeri* pela alimentação artificial foi a diminuição da massa de ovos e do tempo de postura, sendo este reduzido por praticamente a metade com pico de postura no sétimo dia de oviposição para *A. sculptum* e no quarto dia para *R. sanguineus*.

No entanto, podemos concluir que pela quantidade das amostras de ovos de *R. sanguineus* e *A. sculptum* que amplificaram na técnica de PCR, evidencia que o DNA de *R. parkeri* estava viável.

5.1.7 Análise do perfil de proteínas nas amostras de órgãos de *R.sanguineus* e *A.sculptum* através da técnica de SDS-PAGE.

Recentemente na literatura estão disponíveis apenas estudos que envolvem a caracterização e proteômica mais aprofundados em linhagem de cultivo de células. No presente estudo, na análise das amostras de órgãos de *A. sculptum* e *R. sanguineus*, das 10 amostras de órgãos de *R. sanguineus* submetidas a técnica de SDS-PAGE, 5 amostras de ovário apresentaram bandas no gel de poliacrilamida com peso molecular variando de 170kDa, 70 kDa e 22 kDa e as amostras de glândula salivar apresentaram bandas com peso molecular variando de 170KDa, 130kDa, 70 kDa e 22kDa.

Análises proteômicas de espécies de riquétsias são escassos, porém tem alcançado avanços no que diz respeito a caracterização de proteínas. No presente estudo, em se tratando das amostras infectadas de *R. sanguineus*, das 14 amostras submetidas a técnica tanto as que foram dissecadas 9 horas após a infecção artificial quanto as que foram dissecadas após 30 horas após esta infecção, apresentaram os mesmos padrões moleculares no gel de poliacrilamida com grupos de proteínas variando de 170kDa, 30kDa, 32kDa e 22kDa.

Das amostras de *A. sculptum* avaliadas, apenas as amostras de intestino apresentaram bandas com proteínas de peso molecular variando de 93kDa, 30kDa e 22kDa, as outras duas amostras de ovário e outras duas de glândula salivar não apresetaram nenhum padrão molecular no gel. Num estudo mais abrangente em relação a proteômica de órgãos de *A.sculptum*, mais recentemente, MOREIRA et al. (2017), realizaram uma análise profunda quanto as proteínas expressas no intestino nos ovários e nas glândulas salivares deste ixodídeo, este estudo revelou vários processos metabólicos específicos importantes na biologia deste ixodídeo que é considerado o mais importante vetor de rickettsioses nas Américas do Sul e Central.

A importância de estudos como este e o conduzido por MOREIRA et al. (2017) que trata da transcriptoma de órgãos, revela que existem processos metabólicos específicos que podem expandir o conhecimento da biologia do carrapato e a patogênese da doença por ele transmitida.

Visando compreender a proteômica de espécies de *Amblyomma*, VILLAR et al. (2014), desenvolveram um estudo de comparação proteômica. Este foi o primeiro registro da análise proteica de espécies de *Amblyomma*, o qual contribuiu para o melhor entendimento da fisiologia, desenvolvimento e evolução destas espécies de carrapatos.

Objetivando solucionar lacunas do ciclo biológico de *Ixodes* SCHWARZ et al. (2014) realizaram uma abrangente análise proteômica deste importante vetor, através deste estudo foi possível ampliar os estudos envolvendo o desenvolvimento de métodos alternativos para o controle de doenças transmitidas por carrapatos.

Muitos estudos na Europa buscam avaliar a interação patógeno/vetor através da análise proteômica, (DI VENERE et al., 2015) dissecaram exemplares do ixodídeo *Ixodes ricinus*, e extraíram ovários e tecidos para realizar uma análise proteômica comparativa destes órgãos na presença de uma bactéria simbiote, tendo contribuído desde então para o melhor entendimento da biologia deste vetor.

Os estudos que dizem respeito a caracterização de proteínas em carrapatos são recentes e pioneiros, (VILLAR et al., 2015) com o objetivo principal de abordar a proteômica e caracterizar as proteínas envolvidas durante a multiplicação de *A. phagocytophilum* no carrapato vetor *Ixodes scapularis*, constataram um aumento do nível de certas proteínas de resposta ao estresse bacteriano e proteínas de superfície na interação patógeno/vetor.

Não só ixodídeos estão sendo avaliados nestes estudos de proteômica, OLEAGA et al. (2015) caracterizaram a proteômica do intestino médio do argasídeo *Ornithodoros erraticus* antes e depois da ingestão de sangue tentando elucidar as alterações induzidas após o repasto sanguíneo.

Com isso os autores relataram pela primeira vez a proteômica do intestino médio de um argasídeo, fornecendo assim informações importantes envolvidas na digestão de sangue nestes carrapatos. Esta informação representa um ponto de partida para a identificação e seleção de novos alvos para o desenvolvimento de medidas de controle alternativas.

No entanto, estudos envolvendo especificamente órgãos de carrapatos infectados com *R. parkeri* são escassos, de modo que são necessários estudos que possam contribuir de maneira pioneira para desvendar e caracterizar as proteínas envolvidas na interação patógeno/vetor. Desta maneira, através de estudos do proteoma, poderemos entender o funcionamento dessas proteínas e fazer uma comparação entre as proteínas encontradas no carrapato sadio e as encontradas no carrapato infectado, o que poderá ajudar na descoberta de novos alvos a serem utilizados no controle deste parasito.

5.2. Considerações finais

A abordagem proteômica tem permitido estudos em larga escala da expressão proteica em diferentes tecidos e fluidos corporais, em condições e/ou momentos distintos. O recente progresso de metodologias nessa área tem aberto novas oportunidades para obtenção de informações relevantes sobre processos normais e anormais que ocorrem no organismo humano.

Apesar desses desafios, não existem dúvidas de que os resultados de abordagens proteômicas são potencialmente úteis em diversas áreas da pesquisa clínica, entre elas, diagnóstico, monitoramento de resposta à terapia, predição de desfecho clínico, classificação de subtipos de doenças, determinação de riscos, caracterização de vias metabólicas, quantificação de biomarcadores e geração de alvos terapêuticos.

O termo proteômica pode ser definido como a comparação quantitativa e qualitativa dos proteomas para identificar mecanismos celulares envolvidos em processos biológicos. Além disso, tal abordagem permite um estudo de suas estruturas proteicas, localização, modificação, interação, atividade e funções. Esta ferramenta tem -se apresentado de grande importância na biotecnologia da reprodução animal, uma vez que, em diversas espécies com alto valor econômico, técnicas avançadas de proteômica têm sido empregadas para a detecção de marcadores bioquímicos da fertilidade. Outra importante contribuição das análises proteicas diz respeito ao melhor entendimento da relação patógeno e vetor como também da patogênese das doenças.

A proteômica vai permitir um maior entendimento da interação rickettsia-carrapato, compreensão da resposta imune destes artrópodes bem como da capacidade vetorial de ixodídeos.

6 Conclusões

Fêmeas de *A. sculptum* e *R. sanguineus* de ambas faixas de peso alimentadas por meio de ponteiras plásticas foram capazes de ingerir quantidade significativa de sangue o que viabiliza o emprego desta técnica em estudos envolvendo a transmissão de patógenos;

O sistema de alimentação artificial por meio de ponteiras plásticas foi capaz de promover a infecção *in vitro* de *R. parkeri* para fêmeas dos carrapatos *R. sanguineus* e *A. sculptum*;

As ponteiras plásticas podem ser utilizadas para alimentação artificial de fêmeas de *A. sculptum*;

Possíveis estudos com transmissão de patógenos utilizando a alimentação artificial com ponteiras plásticas são viáveis, consistentes e contribuem para minimizar o uso de animais na experimentação animal;

Houve transmissão transovariana de *R. parkeri* para os exemplares de *R. sanguineus* e *A. sculptum*;

Este estudo envolvendo transmissão de patógeno pode contribuir para o desenvolvimento de pesquisas utilizando colônias infectadas;

No perfil protéico foram encontradas bandas nos géis de poliacrilamida com padrões de peso variando de 40kDa até 170kDa;

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEL, I. **Alimentação artificial de fêmeas de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787)(Acari: Ixodidae) através de tubos capilares.** 2004. 63 f. 2004. (PhD). Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

ANGELO, I. D. C. Avaliação dos Perfis Protéico e Lipídico na Resposta de *Rhipicephalus Microplus* à Infecção com Fungos. 2011.

ANGERAMI, R. N.; RESENDE, M. R.; FELTRIN, A. F. C.; KATZ, G.; NASCIMENTO, E. M.; STUCCHI, R. S. B.; SILVA, L. J. Brazilian spotted fever: a case series from an endemic area in southeastern Brazil: epidemiological aspects. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1078, p. 170, 2006.

ANTUNES, S.; MERINO, O.; LÉRIAS, J.; DOMINGUES, N.; MOSQUEDA, J.; DE LA FUENTE, J.; DOMINGOS, A. Artificial feeding of *Rhipicephalus microplus* female ticks with anti calreticulin serum do not influence tick and *Babesia bigemina* acquisition. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 6, n. 1, p. 47-55, 2015.

ARAGÃO, H. B. Ixodidas brasileiros e de alguns países limitrofes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 31, p. 759-843, 1936.

BACELLAR, F. **Rickettsias isoladas em Portugal. Contribuição para a identificação e classificação de estirpes.** 1996. (PhD). University of Evora, Dissertação para obtenção de grau de Doutor em Biologia, Évora, Evora, Portugal.

BARKER, S. C. Distinguishing species and populations of rhipicephaline ticks with its 2 ribosomal RNA. **The Journal of parasitology**, p. 887-892, 1998.

BARROS-BATTESTI, D. M.; ARZUA, M.; BECHARA, G. H. Carrapatos de importância médico-veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies. 2006a.

_____. **Carrapatos de importância médico-veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies.** São Paulo: Vox/ICTTD-3/Butantan, 2006b.

BEATI, L.; NAVA, S.; BURKMAN, E. J.; BARROS-BATTESTI, D. M.; LABRUNA, M. B.; GUGLIELMONE, A. A.; CACERES, A. G.; GUZMAN-CORNEJO, C. M.; LEON, R.; DURDEN, L. A.; FACCINI, J. L. *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae), the Cayenne tick: phylogeography and evidence for allopatric speciation. **BMC Evol Biol**, v. 13, p. 267, 2013.

BELLATO, V.; DAEMON, E. Efeitos de tres temperaturas sobre a fase nãol parasitárias *Rhipicephalus sanguineus* (LATREILLE, 1806)(ACARI: IXODIDAE). **Revista Brasileira de Parasitologia Velerinária.**, v. 6, n. 1, p. 21-27, 1997.

BERNASCONI, M. V.; CASATI, S.; PÉTER, O.; PIFFARETTI, J.-C. *Rhipicephalus* ticks infected with *Rickettsia* and *Coxiella* in Southern Switzerland (Canton Ticino). **Infection, Genetics and Evolution**, v. 2, n. 2, p. 111-120, 2002/12/01/ 2002.

BROADWATER, A. H.; SONENSHINE, D. E.; HYNES, W. L.; CERAUL, S.; DE SILVA, A. M. Glass capillary tube feeding: a method for infecting nymphal *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) with the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. **Journal of medical entomology**, v. 39, n. 2, p. 285-292, 2002.

BURGDORFER, W. Artificial feeding of ixodid ticks for studies on the transmission of disease agents. **The Journal of infectious diseases**, p. 212-214, 1957.

BURGDORFER, W. Ecological and epidemiological considerations of Rocky Mountain spotted fever and scrub typhus. **Biology of rickettsial diseases**, v. 1, p. 33-50, 1988.

CABRERA, R. R. **Influência do fotoperíodo e da temperatura na diapausa comportamental de larvas não-alimentadas de *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) provenientes de Pirassununga, São Paulo, Brasil.** (PhD). Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade de São Paulo, São Paulo.

CHABAUD, A. Sur la nutrition artificielle des tiques. **Annals Parasitology Human and Compare**, v. 25, p. 142-147, 1950.

CHOMEL, B. Tick- borne infections in dogs—An emerging infectious threat. **Veterinary Parasitology**, v. 179, n. 4, p. 294-301, 2011.

COELHO, C. **Biologia da Fase Não Parasitária de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806)(Acari, Ixodidae) sob condições de laboratório: aspectos da oviposição.** 1993. (Doctor of Scientiae). Pos-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

CORDEIRO, M. D. **Infecção experimental do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e do marsupial *Monodelphis domestica* por *Rickettsia parkeri*.** 2015. 76 (Doctor Scientiae). Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias., Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

CORDEIRO, M. D.; ALMEIDA RAIA, V.; PINTER, A.; CUNHA, N. C.; SOUZA, C. E.; FONSECA, A. H. Soroprevalência de *rickettsia* spp. e estudo da fauna de carrapatos em cães no Município de Seropédica, Estado do Rio de Janeiro. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 36, n. 6, p. 3787-3794, 2015.

CRIPPA, M.; RAIS, O.; GERN, L. Investigations on the mode and dynamics of transmission and infectivity of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto and *Borrelia afzelii* in *Ixodes ricinus* ticks. **Vector borne and zoonotic diseases**, v. 2, n. 1, p. 3-9, 2002.

CUNHA, N. C.; RANGEL, C. P.; PIRANDA, E. M.; DE REZENDE, J.; TEIXEIRA, R. C.; DA FONSECA, A. H. Assessment of weight gain and biological parameters of *Rhipicephalus sanguineus* females fed artificially via capillary tubes. **Cienc. Rural**, v. 40, n. 4, p. 928-933, 2010.

DANTAS-TORRES, F. Canine vector-borne diseases in Brazil. **Parasit Vectors**, v. 1, 2008// 2008.

_____. **Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus***. Parasites Vectors. 3 2010.

DE LA VEGA, R.; DIAZ, G.; FINLAY, L. Artificial feeding in *Boophilus microplus* (Acari:Ixodidae) through micropipettes. **Annals New York Academy of Science**, v. 916, p. 315-9, 2000.

DEL FIOLE, F.; JUNQUEIRA, F.; ROCHA, M.; TOLEDO, M.; FILHO, S. Febre maculosa no Brasil. **Rev Panam Salud Publica**, v. 27, p. 461 - 466, 2010.

DENARDI, S. E.; BECHARA, G. H.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Fat body cells of *Amblyomma cajennense* partially engorged females (Acari: Ixodidae) and their role on vitellogenesis process. **Experimental parasitology**, v. 121, n. 3, p. 213-218, 2009.

DI VENERE, M.; FUMAGALLI, M.; CAFISO, A.; DE MARCO, L.; EPIS, S.; PLANTARD, O.; BARDONI, A.; SALVINI, R.; VIGLIO, S.; BAZZOCCHI, C. *Ixodes ricinus* and its endosymbiont midichloria mitochondrii: a comparative proteomic analysis of salivary glands and ovaries. **PloS one**, v. 10, n. 9, p. e0138842, 2015.

FINGERLE, V.; RAUSER, S.; HAMMER, B.; KAHL, O.; HEIMERL, C.; SCHULTE-SPECHTEL, U.; GERN, L.; WILSKE, B. Dynamics of dissemination and outer surface protein expression of different European *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains in artificially infected *Ixodes ricinus* nymphs. **Journal of clinical microbiology**, v. 40, n. 4, p. 1456-1463, 2002.

FOURIE, J. J.; STANNECK, D.; LUUS, H. G.; BEUGNET, F.; WIJNVELD, M.; JONGEJAN, F. Transmission of *Ehrlichia canis* by *Rhipicephalus sanguineus* ticks feeding on dogs and on artificial membranes. **Veterinary Parasitology**, v. 197, n. 3-4, p. 595-603, 11/8/ 2013.

GERN, L.; ZHU, Z.; AESCHLIMANN, A. Development of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* females during blood feeding. **Annales de Parasitologie humaine et comparée**, v. 65, n. 2, p. 89-93, 1990.

GILFORD, J. H.; PRICE, W. H. Virulent-avirulent conversions of *Rickettsia rickettsii* in vitro. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 41, n. 11, p. 870, 1955.

GODDARD, J. Experimental infection of lone star ticks, *Amblyomma americanum* (L.), with *Rickettsia parkeri* and exposure of guinea pigs to the agent. **Journal of medical entomology**, v. 40, n. 5, p. 686-689, 2003.

GODDARD, J.; NORMENT, B. Spotted fever group rickettsiae in the lone star tick, *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae). **Journal of medical entomology**, v. 23, n. 5, p. 465-472, 1986.

GODDARD, J.; VARELA-STOKES, A.; SMITH, W.; EDWARDS, K. T. Artificial infection of the bed bug with *Rickettsia parkeri*. **Journal of medical entomology**, v. 49, n. 4, p. 922, 2012.

GUEDES, E.; LEITE, R.; PRATA, M.; PACHECO, R.; WALKER, D.; LABRUNA, M. Detection of *Rickettsia rickettsii* in the tick *Amblyomma cajennense* in a new Brazilian spotted fever-endemic area in the state of Minas Gerais. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 841 - 845, 2005.

GUGLIELMONE, A.; SZABÓ, M.; MARTINS, J. Estrada-Pe na, A., 2006. Diversidade e importância de carrapatos na sanidade animal. **Carrapatos de Importância médico veterinária da região neotropical: Um guia ilustrado para identificação de espécies. Vox/ICTTD-3/Butantan, São Paulo**, p. 115-138,

HEILE, C.; HOFFMANN-KOHLER, P.; WIEMANN, A.; SCHEIN, E. Transmission time of tick-borne disease agents in dogs: *Borrelia*, *Anaplasma/Ehrlichia* and *Babesia*. **PRAKTISCHE TIERARZT-HANNOVER-**, v. 1, n. 8, p. 584-592, 2007.

HOJGAARD, A.; EISEN, R. J.; PIESMAN, J. Transmission Dynamics of *Borrelia burgdorferi* s.s. During the Key Third Day of Feeding by Nymphal *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 45, n. 4, p. 732-736, 2008/07/01 2008.

HOOGSTRAAL, H. Ticks in relation to human diseases caused by *Rickettsia* species. **Annual Review of Entomology**, v. 12, n. 1, p. 377-420, 1967.

HORTA, M. C.; SABATINI, G. S.; MORAES - FILHO, J.; OGRZEWALSKA, M.; CANAL, R. B.; PACHECO, R. C.; MARTINS, T. F.; MATUSHIMA, E. R.; LABRUNA, M. B.; MORAES-FILHO, J. Experimental infection of the opossum *Didelphis aurita* by *Rickettsia felis*, *Rickettsia bellii*, and *Rickettsia parkeri* and evaluation of the transmission of the infection to ticks *Amblyomma cajennense* and *Amblyomma dubitatum*. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 10, n. 10, p. 959, 2010.

HU, C. M.; GERN, L.; AESCHLIMANN, A. Changes in the protein profile and antigenicity of different *Borrelia burgdorferi* strains after reintroduction to *Ixodes ricinus* ticks. **Parasite immunology**, v. 14, n. 4, p. 415-427, 1992.

HU, C. M.; GERN, L.; SIMON, M.; KRAMER, M. Tick factors and in vitro cultivation influence the protein profile, antigenicity and pathogenicity of a cloned

Borrelia garini isolate from *Ixodes ricinus* hemolymph. **Infection**, v. 24, n. 3, p. 251-257, 1996.

INOKUMA, H.; KEMP, D. H. Establishment of *Boophilus microplus* infected with *Babesia bigemina* by using in vitro tube feeding technique. **Journal of veterinary medical science**, v. 60, n. 4, p. 509-512, 1998.

KAHL, O.; JANETZKI-MITTMANN, C.; GRAY, J.; JONAS, R.; STEIN, J.; DE BOER, R. Risk of infection with *Borrelia burgdorferi* sensu lato for a host in relation to the duration of nymphal *Ixodes ricinus* feeding and the method of tick removal. **Zentralblatt für Bakteriologie**, v. 287, n. 1-2, p. 41-52, 1998.

KATAVOLOS, P.; ARMSTRONG, P. M.; DAWSON, J. E.; TELFORD III, S. R. Duration of tick attachment required for transmission of granulocytic ehrlichiosis. **The journal of infectious diseases**, v. 177, n. 5, p. 1422-1425, 1998.

KOCAN, K. M.; DE LA FUENTE, J.; BLOUIN, E. F.; GARCIA-GARCIA, J. C. *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae): recent advances in defining host-pathogen adaptations of a tick-borne rickettsia. **Parasitology**, v. 129, n. S1, p. S285-S300, 2005.

KRAWCZAK, F.; NIERI-BASTOS, F. A.; NUNES, F.; SOARES, J. P. G.; MORAES-FILHO, J.; LABRUNA, M. B. Rickettsial infection in *Amblyomma cajennense* ticks and capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) in a Brazilian spotted fever-endemic area. **Parasites & Vectors**, v. 7, n. 1, p. 7, 2014.

LABRUNA, M. B. Ecology of rickettsia in South America. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1166, p. 156-166, 2009.

LABRUNA, M. B.; AMAKU, M.; METZNER, J. A.; PINTER, A.; FERREIRA, F. Larval behavioral diapause regulates life cycle of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) in Southeast Brazil. **Journal of medical entomology**, v. 40, n. 2, p. 170-178, 2003.

LABRUNA, M. B.; KASAI, N.; FERREIRA, F.; FACCINI, J. L. H.; GENNARI, S. M. Seasonal dynamics of ticks (Acari: Ixodidae) on horses in the state of São Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 105, n. 1, p. 65-77, 2002.

LABRUNA, M. B.; KERBER, C. E.; FERREIRA, F.; FACCINI, J. L. H.; DE WAAL, D. T.; GENNARI, S. M. Risk factors to tick infestations and their occurrence on horses in the state of São Paulo, Brazil. **Veterinary parasitology**, v. 97, n. 1, p. 1-14, 2001.

LABRUNA, M. B.; O., M.; MARTINS, T. F.; PINTER, A.; HORTA, M. C. Comparative Susceptibility of Larval Stages of *Amblyomma aureolatum*, *Amblyomma cajennense*, and *Rhipicephalus sanguineus* to Infection by *Rickettsia rickettsii*. **Journal of Medical Entomology**, v. 45, n. 6, p. 1156-1159, 2008/11/01 2008.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **nature**, v. 227, n. 5259, p. 680, 1970.

LOULY, C. **Dinâmica sazonal de *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) no canil da Polícia Militar do município de Goiânia-Goiás, Brasil**. 2003. (MsC). Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal, University of Goiania, Goiania.

LUZ, H. R.; FACCINI, J. L. H.; LANDULFO, G. A.; COSTA NETO, S. F.; FAMADAS, K. M. New records for *Amblyomma sculptum* (Ixodidae) on non-passerine birds in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 25, p. 124-126, 2016.

MACALUSO, K. R.; SONENSHINE, D. E.; CERAUL, S. M.; AZAD, A. F. Infection and transovarial transmission of rickettsiae in *Dermacentor variabilis* ticks acquired by artificial feeding. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, v. 1, n. 1, p. 45-53, 2001.

MACALUSO, K. R.; SONENSHINE, D. E.; CERAUL, S. M.; AZAD, A. F. Rickettsial infection in *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae) inhibits transovarial transmission of a second Rickettsia. **Journal of medical entomology**, v. 39, n. 6, p. 809-813, 2002.

MARCONDES, C. B. Doenças transmitidas e causadas por artrópodes. In: (Ed.). **Doenças transmitidas e causadas por artrópodes**, 2009.

MARTINS, T. F.; BARBIERI, A. R. M.; COSTA, F. B.; TERASSINI, F. A.; CAMARGO, L. M. A.; PETERKA, C. R. L.; RICHARD, C. P.; DIAS, R. A.; NUNES, P. H.; MARCILI, A.; SCOFIELD, A.; CAMPOS, A. K.; HORTA, M. C.; GUILLOUX, A. G. A.; BENATTI, H. R.; RAMIREZ, D. G.; BARROS-BATTESTI, D. M.; LABRUNA, M. B. Geographical distribution of *Amblyomma cajennense* (sensu lato) ticks (Parasitiformes: Ixodidae) in Brazil, with description of the nymph of *A. cajennense* (sensu stricto). **Parasites & Vectors**, v. 9, 2016/03/31/

// 2016.

MEDEIROS, A. P.; SOUZA, A. P.; MOURA, A. B.; LAVINA, M. S.; BELLATO, V.; SARTOR, A. A.; NIERI-BASTOS, F. A.; RICHTZENHAIN, L. J.; LABRUNA, M. B. Spotted fever group *Rickettsia* infecting ticks (Acari: Ixodidae) in the state of Santa Catarina, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, p. 926-930, 2011.

MERHEJ, V.; RAOULT, D. Rickettsial evolution in the light of comparative genomics. **Biological Reviews**, v. 86, n. 2, p. 379-405, 2011.

MONTGOMERY, R.; MALAWISTA, S. *Borrelia burgdorferi* and the macrophage: routine annihilation but occasional haven? **Parasitology Today**, v. 10, n. 4, p. 154-157, 1994.

MOREIRA, H. N. S.; BARCELOS, R. M.; VIDIGAL, P. M. P.; KLEIN, R. C.; MONTANDON, C. E.; MACIEL, T. E. F.; CARRIZO, J. F. A.; DE LIMA, P. H. C.; SOARES, A. C.; MARTINS, M. M. A deep insight into the whole transcriptome of midguts, ovaries and salivary glands of the *Amblyomma sculptum* tick. **Parasitology international**, v. 66, n. 2, p. 64-73, 2017.

MURRELL, A.; CAMPBELL, N. J. H.; BARKER, S. C. Phylogenetic Analyses of the Rhipicephaline Ticks Indicate That the Genus *Rhipicephalus* Is Paraphyletic. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 16, n. 1, p. 1-7, 2000/07/01/ 2000.

NAVA, S.; BEATI, L.; LABRUNA, M. B.; CÁCERES, A. G.; MANGOLD, A. J.; GUGLIELMONE, A. A. Reassessment of the taxonomic status of *Amblyomma cajennense* with the description of three new species, *Amblyomma tonelliae* n. sp., *Amblyomma interandinum* n. sp. and *Amblyomma patinoi* n. sp., and reinstatement of *Amblyomma mixtum*, and *Amblyomma sculptum* (Ixodida: Ixodidae). **Ticks and tick-borne diseases**, v. 5, n. 3, p. 252-276, 2014.

NAVA, S.; ELSHENAWY, Y.; EREMEEVA, M. E.; SUMNER, J. W.; MASTROPAOLO, M.; PADDOCK, C. D. *Rickettsia parkeri* in Argentina. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 12, p. 1894-1897, 2008.

NEITZ, W.; BOUGHTON, F.; WALTERS, H. Laboratory investigations on the life-cycle of the Karoo paralysis tick (*Ixodes rubicundus* Neumann, 1904). **The Onderstepoort journal of veterinary research**, v. 38, n. 3, p. 215-223, 1971.

NIEBYLSKI, M. L.; PEACOCK, M. G.; SCHWAN, T. G. Lethal effect of *Rickettsia rickettsii* on its tick vector (*Dermacentor andersoni*). **Applied and environmental microbiology**, v. 65, n. 2, p. 773, 1999.

NIERI-BASTOS, F.; SZABÓ, M.; PACHECO, R.; SOARES, J.; SOARES, H.; MORAES-FILHO, J.; DIAS, R.; LABRUNA, M. Comparative evaluation of infected and noninfected *Amblyomma triste* ticks with *Rickettsia parkeri*, the agent of an emerging rickettsiosis in the New World. **BioMed research international**, v. 2013, 2013.

OGRZEWALSKA, M.; PACHECO, R.; UEZU, A.; RICHTZENHAIN, L.; FERREIRA, F.; LABRUNA, M. Rickettsial infection in *Amblyomma nodosum* ticks (Acari: Ixodidae) from Brazil. **Annals of tropical medicine and parasitology**, v. 103, n. 5, p. 413-425, 2009.

OLEAGA, A.; OBOLO-MVOULOUGA, P.; MANZANO-ROMÁN, R.; PÉREZ-SÁNCHEZ, R. Midgut proteome of an argasid tick, *Ornithodoros erraticus*: a comparison between unfed and engorged females. **Parasites & vectors**, v. 8, n. 1, p. 525, 2015.

OLIVEIRA, P.; BORGES, L.; LEITE, R.; FREITAS, C. Seasonal dynamics of the Cayenne tick, *Amblyomma cajennense* on horses in Brazil. **Medical and veterinary entomology**, v. 17, n. 4, p. 412-416, 2003.

OLIVEIRA, P.; BORGES, L.; LOPES, C.; LEITE, R. Population dynamics of the free-living stages of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: ixodidae) on pastures of Pedro Leopoldo, Minas Gerais State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 92, p. 295 - 301, 2000.

OLIVEIRA, P. R.; BECHARA, G. H.; DENARDI, S. E.; SAITO, K. C.; NUNES, E. T.; SZABÓ, M. P. J.; MATHIAS, M. I. C. Comparison of the external morphology of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806)(Acari: Ixodidae) ticks from Brazil and Argentina. **Veterinary parasitology**, v. 129, n. 1-2, p. 139-147, 2005.

PADDOCK, C. D. *Rickettsia parkeri* as a paradigm for multiple causes of tick-borne spotted fever in the Western Hemisphere. **Rickettsioses: From Genome To Proteome, Pathobiology, And Rickettsiae As An**, v. 1063, p. 315-326, 2005.

PADDOCK, C. D.; SUMNER, J. W.; COMER, J.; ZAKI, SR.; GOLDSMITH, C. S.; GODDARD, J.; MCLELLAN, S.; TAMMINGA, C.; OHL, C. *Rickettsia parkeri*: A newly recognized cause of spotted fever rickettsiosis in the United States. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, n. 6, p. 805-811, 2004.

PAPERNA, I.; GILADI, M. Morphological variability, host range and distribution of ticks of the *Rhipicephalus sanguineus* complex in Israel. **Annales de parasitologie humaine et comparee**, v. 49, n. 3, p. 357-367, 1974.

PAROLA, P.; PADDOCK, C. D.; RAOULT, D. Tick-borne rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts. **Clinical microbiology reviews**, v. 18, n. 4, p. 719-756, 2005.

PAROLA, P.; PADDOCK, C. D.; SOCOLOVSKI, C.; LABRUNA, M. B.; MEDIANNIKOV, O.; KERNIF, T.; ABDAD, M. Y.; STENOS, J.; BITAM, I.; FOURNIER, P. E.; RAOULT, D. **Update on Tick-Borne Rickettsioses around the World: a Geographic Approach**. Clin. Microbiol. Rev. 26: 657-702 p. 2013.

PEGRAM, R.; CLIFFORD, C.; WALKER, J. B.; KEIRANS, J. Clarification of the *Rhipicephalus sanguineus* group (Acari, Ixodoidea, Ixodidae). *R. sulcatus* Neumann, 1908 and *R. turanicus* Pomerantsev, 1936. **Systematic Parasitology**, v. 10, n. 1, p. 3-26, 1987.

PIESMAN, J. Dispersal of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi* to salivary glands of feeding nymphal *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). **Journal of medical entomology**, v. 32, n. 4, p. 519-521, 1995.

PIESMAN, J.; MATHER, T. N.; SINSKY, R.; SPIELMAN, A. Duration of tick attachment and *Borrelia burgdorferi* transmission. **Journal of clinical microbiology**, v. 25, n. 3, p. 557-558, 1987.

PINTER, A.; LABRUNA, M. B. Isolation of *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia bellii* in cell culture from the tick *Amblyomma aureolatum* in Brazil. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1078, p. 523, 2006.

PINTO, F. S. **Investigações preliminares sobre a sensibilidade parasitária de duas raças de coelhos a *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806)(Acari: Ixodidae)**. 2000. (MsC). Curso de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

PORNWIROON, W.; BOURCHOOKARN, A.; PADDOCK, C. D.; MACALUSO, K. R. Proteomic analysis of *Rickettsia parkeri* strain portsmouth. **Infection and immunity**, v. 77, n. 12, p. 5262-5271, 2009.

PURNELL, R. Infection of the tick *Rhipicephalus appendiculatus* with *Theileria parva* using an artificial feeding technique. **The Veterinary Journal**, v. 11, n. 4, p. 403-405, 1970.

PURNELL, R.; JOYNER, L. Artificial feeding technique for *Rhipicephalus appendiculatus* and the transmission of *Theileria parva* from the salivary secretion. **Nature**, v. 216, n. 5114, p. 484, 1967.

RANGEL, C. P. **Eficiência da Alimentação in vitro de fêmeas de *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae)**. 2011. 73 (PhD). Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

RANGEL, C. P.; CUNHA, N. C.; REZENDE, J.; SILVA, F. J.; CORREA FDO, N.; TEIXEIRA, R. C.; SILVA, J. B.; BAETA BDE, A.; FONSECA, A. H. [Artificial feeding through capillaries tubes of engorged partially females of the tick *Dermacentor (Anocentor) nitens*]. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17 Suppl 1, p. 35-9, Sep 2008.

RECHAV, Y.; ZYZAK, M.; FIELDEN, L. J.; CHILDS, J. E. Comparison of methods for introducing and producing artificial infection of ixodid ticks (Acari: Ixodidae) with *Ehrlichia chaffeensis*. **Journal of medical entomology**, v. 36, n. 4, p. 414-419, 1999.

REIF, K. E.; KEARNEY, M. T.; FOIL, L. D.; MACALUSO, K. R. Acquisition of *Rickettsia felis* by cat fleas during feeding. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 11, n. 7, p. 963-968, 2011.

RIBEIRO, A.; FACCINI, J.; DAEMON, E. Estudo das variações morfológicas de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806)(Acari: Ixodidae) no Brasil. **Revista da Universidade Rural Ciência da Vida**, v. 18, p. 25-33, 1996.

RIBEIRO, C. C. D. U. **Alimentação de *Ornithodoros rostratus* (Acari: Argasidae) por meio de membranas de silicone: parâmetros biológicos e infecção in vitro de *Rickettsia parkeri***. 2015. 70p. (PhD). Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

RIBEIRO, C. C. D. U.; BAÊTA, B. A.; VALIM, J. R. A.; TEIXEIRA, R. C.; CEPEDA, P. B.; SILVA, J. B.; FONSECA, A. H. Use of plastic tips in artificial feeding of *Dermacentor (Anocentor) nitens* females Neumann, 1897 (Acari: Ixodidae). **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 5, n. 6, p. 689-692, 2014.

ROMER, Y.; SEIJO, A.; CRUDO, F.; NICHOLSON, W.; VARELA-STOKES, A.; LASH, R.; PADDOCK, C. D. *Rickettsia parkeri* Rickettsiosis, Argentina. **Emerg. Infect. Dis**, v. 17, n. 7, p. 1169-1173, 2011.

ROVEDA, R. Ixodoidea. Contribucion biológica. **Revista de Medicina Veterinaria**, v. 36, p. 105-112, 1954.

SABATINI, G.; PINTER, A.; NIERI-BASTOS, F. A.; MARCILI, A.; LABRUNA, M. B. Survey of Ticks (Acari: Ixodidae) and Their *Rickettsia* in an Atlantic Rain Forest Reserve in the State of Sao Paulo, Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 47, n. 5, p. 913-916, 2010.

SAKAI, R., K. **Alimentação Artificial de Fêmeas Parcialmente Ingurgitadas do Carrapato *Rhipicephalus sanguineus* por meio de Tubos Capilares**. 2010. 61 (Master of Scientiae). Curso de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

SAKAI, R. K.; COSTA, F. B.; UENO, T. E. H.; RAMIREZ, D. G.; SOARES, J. F.; FONSECA, A. H.; LABRUNA, M. B.; BARROS-BATTESTI, D. M. Experimental infection with *Rickettsia rickettsii* in an *Amblyomma dubitatum* tick colony, naturally infected by *Rickettsia bellii*. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 5, n. 6, p. 917-923, 10// 2014.

SCHWARZ, A.; TENZER, S.; HACKENBERG, M.; ERHART, J.; GERHOLD-AY, A.; MAZUR, J.; KUHAREV, J.; RIBEIRO, J. M.; KOTSYFAKIS, M. A systems level analysis reveals transcriptomic and proteomic complexity in *Ixodes ricinus* midgut and salivary glands during early attachment and feeding. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 13, n. 10, p. 2725-2735, 2014.

SHAW, S. E.; DAY, M. J.; BIRTLES, R. J.; BREITSCHWERDT, E. B. Tick-borne infectious diseases of dogs. **Trends Parasitol**, v. 17, n. 2, p. 74-80, Feb 2001.

SHIH, C. M.; SPIELMAN, A. Accelerated transmission of Lyme disease spirochetes by partially fed vector ticks. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 11, p. 2878, 1993.

SILVEIRA, I.; PACHECO, R. C.; SZABÓ, M. P. J.; RAMOS, H. G. C.; LABRUNA, M. B. *Rickettsia parkeri* in Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 7, p. 1111-1113, 2007.

SONENSHINE, D. **Biology of ticks, vol. 1 and 2**: Oxford University Press, New York 1991.

SOUZA, S. S. A. L.; SOUZA, C. E.; R., E. N. J.; PRADO, A. P. Dinâmica sazonal de carrapatos (Acari: Ixodidae) na mata ciliar de uma área endêmica para febre maculosa na região de Campinas, São Paulo, Brasil Seasonal dynamics of ticks (Acari:Ixodidae) in an endemic area for spotted fever in the Campinas region, state of São Paulo, Brazil. **Ciência Rural**, v. 36, n. 3, p. 887-891, 2006.

SPENCER, R.; PARKER, R. Rocky Mountain spotted fever: infectivity of fasting and recently fed ticks. **Public Health Rep**, v. 38, p. 333 - 339, 1923.

SZABÓ, M.; NIERI-BASTOS, F.; SPOLIDORIO, M.; MARTINS, T.; BARBIERI, A.; LABRUNA, M. In vitro isolation from *Amblyomma ovale* (Acari: Ixodidae) and ecological aspects of the Atlantic rainforest *Rickettsia*, the causative agent of a novel spotted fever rickettsiosis in Brazil. **Parasitology**, v. 140, n. 06, p. 719-728, 2013.

SZABÓ, M. P. J.; CASTRO, M. B.; RAMOS, H. G. C.; GARCIA, M. V.; CASTAGNOLLI, K. C.; PINTER, A.; VERONEZ, V. A.; MAGALHÃES, G. M.; DUARTE, J. M. B.; LABRUNA, M. B. Species diversity and seasonality of free-living ticks (Acari: Ixodidae) in the natural habitat of wild Marsh deer (*Blastocerus dichotomus*) in Southeastern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 143, n. 2, p. 147-154, 2007.

SZABÓ, M. P. J.; LABRUNA, M. B.; GARCIA, M. V.; PINTER, A.; CASTAGNOLLI, K. C.; PACHECO, R. C.; CASTRO, M. B.; VERONEZ, V. A.; MAGALHÃES, G. M.; VOGLIOTTI, A. Ecological aspects of the free-living ticks (Acari: Ixodidae) on animal trails within Atlantic rainforest in south-eastern Brazil. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 103, n. 1, p. 57-72, 2009.

SZABÓ, M. P. J.; MANGOLD, A. J.; JOÃO, C. F.; BECHARA, G. H.; GUGLIELMONE, A. A. Biological and DNA evidence of two dissimilar populations of the *Rhipicephalus sanguineus* tick group (Acari: Ixodidae) in South America. **Veterinary Parasitology**, v. 130, n. 1-2, p. 131-140, 6/10/2005.

TAGLE, I. Presencia accidental de *Rhipicephalus sanguineus* en un perro de Santiago de Chile. **Agricultura Técnica (Chile)**, v. 36, p. 137, 1976.

TIRLONI, L.; ISLAM, M. S.; KIM, T. K.; DIEDRICH, J. K.; YATES, J. R.; PINTO, A. F.; MULENGA, A.; YOU, M.-J.; VAZ, I. D. S. Saliva from nymph and adult females of *Haemaphysalis longicornis*: a proteomic study. **Parasites & vectors**, v. 8, n. 1, p. 338, 2015.

TUCKER, A. M.; DRISKELL, L. O.; PANNELL, L. K.; WOOD, D. O. Differential proteomic analysis of *Rickettsia prowazekii* propagated in diverse host backgrounds. **Applied and environmental microbiology**, v. 77, n. 14, p. 4712-4718, 2011.

VALIM, J. R. A.; RANGEL, C. P.; BAÊTA, B. D. A.; RIBEIRO, C. C. D. U.; CORDEIRO, M. D.; TEIXEIRA, R. C.; CEPEDA, P. B.; FONSECA, A. H. D. Using plastic tips in artificial feeding of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae) females. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 26, n. 1, p. 110-114, 2017.

VARELA-STOKES, A. S.; PADDOCK, C. D.; ENGBER, B.; TOLIVER, M. *Rickettsia parkeri* in *Amblyomma maculatum* ticks, North Carolina, USA, 2009-2010. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 12, p. 2350, 2011.

VENZAL, J.; PORTILLO, A.; ESTRADA-PENA, A.; CASTRO, O.; CABRERA, P. A.; OTEO, J. *Rickettsia parkeri* in *Amblyomma triste* from Uruguay. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, n. 8, p. 1493-1495, 2004.

VENZAL, J. M. Las garrapatas de Uruguay: especies, hospedadores, distribución e importancia sanitaria. **Veterinária (Montevideo)**, v. 10, n. 150-151, p. 11, 2003.

VENZAL, J. M.; PORTILLO, A.; ESTRADA-PEÑA, A.; CASTRO, O.; CABRERA, P. A.; OTEO, J. A. *Rickettsia parkeri* in *Amblyomma triste* from Uruguay. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, n. 8, p. 1493, 2004.

VILLAR, M.; AYLLÓN, N.; KOCAN, K. M.; BONZÓN-KULICHENKO, E.; ALBERDI, P.; BLOUIN, E. F.; WEISHEIT, S.; MATEOS-HERNÁNDEZ, L.; CABEZAS-CRUZ, A.; BELL-SAKYI, L. Identification and characterization of *Anaplasma phagocytophilum* proteins involved in infection of the tick vector, *Ixodes scapularis*. **PloS one**, v. 10, n. 9, p. e0137237, 2015.

VILLAR, M.; POPARA, M.; MANGOLD, A. J.; DE LA FUENTE, J. Comparative proteomics for the characterization of the most relevant *Amblyomma* tick species as vectors of zoonotic pathogens worldwide. **Journal of Proteomics**, v. 105, p. 204-216, 2014.

WALKER, A.; BROWN, C.; BELL, L.; MCKELLAR, S. Artificial infection of the tick *Rhipicephalus appendiculatus* with *Theileria parva*. **Research in veterinary science**, v. 26, n. 2, p. 264-265, 1979.

WALKER, A. R. **Ticks of domestic animals in Africa: a guide to identification of species**. Bioscience Reports Edinburgh, 2003. ISBN 095451730X.

WALKER, J. B.; KEIRANS, J. E.; HORAK, I. G. **The genus Rhipicephalus (Acari, Ixodidae): a guide to the brown ticks of the world**. Cambridge University Press, 2005. ISBN 1316583740.

ZAHLER, M.; FILIPPOVA, N. A.; MOREL, P. C.; GOTHE, R.; RINDER, H. Relationships between species of the *Rhipicephalus sanguineus* group: a molecular approach. **The Journal of parasitology**, p. 302-306, 1997.

ANEXOS

Anexo A. Protocolo de confecção da pasta para fixação das tocas nos coelhos para infestação de instares de carrapatos de acordo com o método proposto por Neitz (1971) com modificações.

100ml de glicerina

160ml de água destilada

80g de gelatina em pó incolor

60g de óxido de zinco

Modo de preparo: Colocar água na panela com antecedência para o banho-maria;

Misturar a glicerina e a água destilada para o banho-maria;

Misturar a glicerina e a água destilada (a frio);

Nesta mistura. acrescentar aos pouco a gelatina com a panela fora do banho-maria. Levar ao banho-maria somente quando a mistura endurecer. a ponto de dificultar o processo de homogeização.

Após terminar a gelatina. repetir o processo com o óxido de zinco.

Findo o óxido de zinco. deixar no banho-maria (mexendo um pouco) até obter o ponto de cola (quando formar uma linha que não arrebenta. entre os dedos polegar e indicador).

Anexo B. Protocolo de extração de DNA e proteínas de amostras

- 1) Transfira as amostras para microtubos de homogeneização de 2 ml;
- 2) Adicione 1 ml de RNA Azul em cada tubo e uma esfera de metal;
- 3) Homogeneizar no homogeneizador Retsch - 2 min. 30 Hz;
- 4) Deixe na bancada durante 5 min;
- 5) Adicionar 0.2 ml de clorofórmio e vortex intensamente por 15 segundos;
- 6) Deixe ficar na bancada por 5 min;
- 7) Centrifugar na velocidade máxima 10 min. 4 ° C - você irá obter três fases - fase aquosa superior sem cor; Interfase (precipitado branco); fase azul orgânica inferior [fase superior - ARN. interfase - DNA. fase inferior - proteínas];
- 8) Descarte a fase aquosa superior (certifique-se de não remover a fase intermediária e inferior);
- 9) Adicione 320 ul de etanol a 95%, misture extensivamente com as mãos;
- 10) Deixe na bancada durante 3 min;
- 11) Centrifugar a 2 000 xg. 5 min. 4 ° C;
- 12) Remover o sobrenadante para um tubo de 5 ml (contém proteínas) e guarde-o a 4 ° C;
- 13) Adicionar 1 ml de citrato de sódio 0.1 M em etanol a 10% para o sedimento de DNA e ressuspender;
- 14) Incubar durante 30 minutos com agitação ocasional;
- 15) Centrifugar a 2 000 xg. 5 min. 4 ° C;
- 16) Adicionar 1 ml 0.1 M de sódio citrato em etanol a 10% para o sedimento de DNA e ressuspender;
- 17) Incubar durante 30 minutos com agitação ocasional;
- 18) Centrifugar a 2 000 xg. 5 min. 4 ° C ;
- 19) Adicionar 1.5 ml de etanol a 75% ao sedimento de DNA, ressuspender e incubar 10-20 minutos com mistura ocasional. O DNA pode ser armazenado em 75% de etanol por meses na geladeira ou no freezer;
- 19) Antes do uso - centrifugue o DNA, descarte o sobrenadante, seque o pellet na bancada por 15 minutos e ressuspender em 150 ul de tampão TE.

Extração de proteínas

20) Ao sobrenadante do Passo 12, adicione 1.5 ml de álcool isopropílico, vortex e incube durante 10 minutos na bancada;

21) Centrifuga a 8 000 xg. 10 min. 4 ° C;

22) Descarte o sobrenadante;

23) Adicione 2 ml 0,3 M Gnd HCl em 95% de etanol para o sedimento, vortex, incubar 20 min na bancada;

24) Centrifugar a 7 500 xg. 5 min. 4 ° C;

25) Adicionar 2 ml 0.3 M Gnd HCl em etanol a 95% ao pelet, vortex, incubar 20 min na bancada;

26) Centrifugar a 7 500 xg. 5 min. 4 ° C 27) Adicionar 2 ml 0.3 M de Gnd HCl em etanol a 95% ao grânulo, vortex, incubar 20 min na bancada;

28) Centrifugar a 7 500 xg. 5 min. 4 ° C;

29) Adicionar 2 ml de etanol e vortex;

30) Centrifugar a 7 500 xg. 5 min. 4 ° C;

31) Descarte o sobrenadante e seque o pellet na bancada por 20 minutos;

32) Ressuspender em 50 ul 1% SDS / PBS;

33) Centrifuga para remover material insolúvel.

Anexo C. Soluções para o preparo do gel de empacotamento 5%.

Componentes	SDS-PAGE (Quantidade ml)
30% Acrilamida AA	660 μ l
4x separation stacking	1ml
Água destilada	2.3ml
10%APS	40 μ l
TEMED	4 μ l
TCE	20 μ l

Anexo D. Soluções para o preparo do gel de separação 12%

Componentes	SDS-PAGE (Quantidade ml)
30% Acrilamida (AA)	8ml
4x separation stacking	5ml
Água destilada	6.8ml
10% APS	200 μ l
TEMED	88 μ l
TCE	50 μ l

Anexo E. Protocolo para coloração de gel de poliacrilamida com nitrato de prata.

1- Fixar o gel em solução contendo 50% de metanol, 12% de ácido acético e 0.05% de formaldeído 37% durante 1 h.

2- Lavar o gel: 20 minutos em etanol 50% (2 vezes), 20 minutos em etanol 30%, 1 minuto em 0.2 g/L de tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) e 20 segundos em água destilada (3 vezes).

3- Corar o gel em solução contendo 2 g/L de nitrato de prata durante 10 minutos e em seguida lavar rapidamente (10 s) em água destilada para retirar o excesso de nitrato de prata da superfície.

4- Colocar o gel em solução de desenvolvimento contendo 60g/L de carbonato de sódio (Na_2CO_3), 0.05% de formaldeído 37% e 0.05% e 4mg/L de tiosulfato de sódio. Após a visualização das bandas, finalizar a reação com solução de ácido acético 10% durante um minuto.

5- Lavar o gel com água destilada por dois minutos (2 vezes).

Anexo F. Protocolo de aprovação CEUA.

Anexo F. Protocolo de aprovação CEUA.



Seropédica 14 de julho de 2014

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que foi aprovado o protocolo de número 062/2014 intitulado **“Transmissão experimental de rickettsias do grupo da febre maculosa (Rickettsiales: Rickettsiaceae) por meio da alimentação artificial e avaliação dos parâmetros biológicos de fêmeas artificialmente infectadas de Rhipicephalus sanguineus e Amblyomma cajennense (Acari: Ixodidae)”** encaminhado pelo Professor (a) do Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, Adivaldo Henrique da Fonseca. Informamos que foi aprovado em reunião ordinária da CEUA-IV realizada no dia 14 de julho de 2014, após avaliação do plenário da referida Comissão.

Fabio Barbour Scott
Coordenador CEUA-IV

Jonimar Pereira Paiva
Vice-Coodenador CEUA-IV