

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

TESE

Eficiência da alimentação *in vitro* de fêmeas de
***Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae)**

Charles Passos Rangel

2011



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

**EFICIÊNCIA DA ALIMENTAÇÃO *IN VITRO* DE
FÊMEAS DE *Rhipicephalus microplus*
(ACARI: IXODIDAE)**

CHARLES PASSOS RANGEL

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, Área de Concentração em Parasitologia Veterinária.

Seropédica, RJ
Julho de 2011

595.425

R196e

T

Rangel, Charles Passos, 1980-.

Eficiência da alimentação in vitro de fêmeas de *Rhipicephalus microplus* (Acari : Ixodidae) / Charles Passos Rangel - 2011. 72 f.: il.

Orientador: Adivaldo Henrique da Fonseca.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Bibliografia: f. 53-60.

1. Carrapato - Alimentação artificial-Teses. 2. Carrapato - ixodídeos - Teses. 3. *Rhipicephalus* - Alimentação in vitro-Teses. I. Fonseca, Adivaldo Henrique da, 1953-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso 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

CHARLES PASSOS RANGEL

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

TESE APROVADA EM 19/07/2011



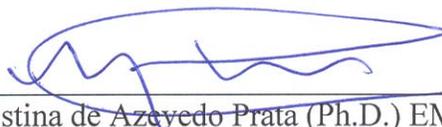
Adivaldo Henrique da Fonseca (Ph.D.) UFRRJ
(Orientador)



Darci Moraes Barros-Batesti (Ph.D.) BUTANTAN



John Furlong (Ph.D.) EMBRAPA-CNPGL



Márcia Cristina de Azevedo Prata (Ph.D.) EMBRAPA-CNPGL



Thaís Ribeiro Correia Azevedo (Ph.D.) UFRRJ

DEDICATÓRIA

Dedico esta obra

À Deus, que me proporcionou a vida e me deu força interior para superar as dificuldades, mostrar os caminhos nas horas incertas e me supriu em todas as minhas necessidades;

Aos meus avôs, Otacílio Vieira Passos (*in memoriam*) e Ruth Ribeiro Passos, por terem me proporcionado o privilégio do convívio, compartilhar suas experiências de vida e, principalmente, pela amizade, incentivo e carinho dedicados por todos esses anos;

Aos meus pais, José Bodart Rangel e Gilda Ribeiro Passos, pelo apoio e atenção que tiveram comigo em todos os momentos da minha vida;

Aos meus irmãos, Otacílio José Passos Rangel, Rafael Passos Rangel, Thiago da Silva Rangel e Thialy da Silva Rangel, que me apoiaram em todos os momentos;

À minha sobrinha e afilhada Isabela Furtado Passos Rangel e ao meu sobrinho Gabriel Teixeira Passos Rangel, fontes de luz da minha vida;

À flor mais linda, minha noiva, Amanda Akemi Braga Kitada, com quem quero compartilhar cada instante da minha vida.

AMO TODOS VOCÊS!

AGRADECIMENTOS

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

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.

Aos amigos do laboratório de Doenças Parasitárias do Prédio do Projeto Sanidade Animal, Bruna de Azevedo Baêta, Fábio Jorge Moreira da Silva, Jania de Rezende, Jenevaldo Barbosa da Silva e Rafaella Câmara Teixeira pelo auxílio indispensável durante toda a fase experimental deste trabalho. Ao António Amélia Mucalane Tembue, Carla Carolina Dias Uzedo, Fabiano Soares da Silva, Jaqueline Rodrigues de Almeida Valim, Matheus Dias Cordeiro, Vanessa de Almeida Raia, Gustavo Nunes de Santana Castro e Ricardo de Oliveira Barbosa por estarem sempre dispostos a ajudar.

À Empresa de Pesquisa Agropecuária do Rio de Janeiro, em especial a pesquisadora Rosane Scatamburlo Lizieire Fajardo, por gentilmente ceder o animal utilizado neste estudo.

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

Às grandes amigas do Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UFRRJ, Gisele Santos Meireles, Patrícia Barizon Cepeda e Renata Kazuko Sakai pelas horas de estudo e de descontração compartilhadas.

Aos grandes e eternos amigos conquistados desde a minha chegada à Universidade Rural, Allan Karl Zubiate, Carlos Augusto Furtado da Cunha, Diogo Mendes de Paiva, José Fausto Guimarães Silva, Flávia de Azevedo Campos Lucindo, Fernanda Fátima Delgado de Almeida, Guilherme Rodrigues Brito, Tatiane Kawamura de Almeida, Camila de Carvalho Ramiro, Camilla Pedreira da Silva, Daniela Correa de Barros, Fernanda Gomes Castelan, Helio Oliveira Neves, Luis Gustavo Velloso de Paiva e Priscilla Aguiar de Paula.

Aos amigos Daniel da Silva Guedes Júnior, Fabíola da Nascimento Correa e Nathalie Costa da Cunha, pela amizade e boa convivência durante esses anos.

Ao funcionário José de Oliveira (*in memoriam*) cuja presteza e amizade estão fazendo muita falta a todos os membros do Laboratório de Doenças Parasitárias.

Aos amigos da Universidad Agraria de la Habana-Cuba que sempre torceram por mim e se preocuparam comigo. Os professores Jorge Demédio Lorenzo, Jorge Luis Sanabria Cruz, Teresa Meireles Rodríguez, Maylin González Navarrete, Oneida Lucia Madero Mantilla, Walberto Lóriga Pena e Dasiel Obregón Alvarez. E os estudantes Julio David Caballero, Olga Leonida Garcete, Laura Lorena Portillo Navarro e Carlos Amilcar Pinelo.

Aos pesquisadores do Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de Cuba, Carlos Montero Espinosa, Milagros Vargas Hernández, Hector Machado Morales, Marisela Suárez Pedroso, Yousmel Sordo Puga e Danny Pérez Pérez por compartilharem suas experiências e entusiasmo na alimentação artificial de carrapatos.

Aos pesquisadores Rafael de La Vega Ruibal e Graciella Diaz, pelo incentivo ao desenvolvimento deste estudo.

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

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

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior - CAPES, pela concessão da bolsa de estudo durante o Doutorado.

MEU MUITO OBRIGADO!

BIOGRAFIA

Charles Passos Rangel, filho de José Bodart Rangel e Gilda Ribeiro Passos, nasceu em 20 de Outubro de 1980, no município de Guarapari, Estado do Espírito Santo, onde cursou o ensino fundamental e médio no Colégio Cenecista Doutor Roberto Calmon, concluindo-os em 1995 e 1998, respectivamente.

Em maio de 2002 ingressou no Curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). Durante a realização do curso foi estagiário do Setor de Bovinocultura de Leite do Instituto de Zootecnia e participou da Comissão Organizadora da XX Semana do Médico Veterinário. De agosto de 2003 a fevereiro de 2007, foi bolsista de Iniciação Científica no Laboratório de Doenças Parasitárias, sob a orientação do professor Adivaldo Henrique da Fonseca. Este período foi marcante por ter possibilitado o contato direto com atividades de pesquisa, ensino e extensão.

Graduou-se Médico Veterinário em março de 2007 e ingressou imediatamente no curso de Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Parasitologia Veterinária em nível de Mestrado, sob orientação do professor Adivaldo Henrique da Fonseca. Seu trabalho de dissertação teve como tema a alimentação artificial de fêmeas parcialmente ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* por meio de tubos capilares. Este trabalho de pesquisa contribuiu com resultados originais e motivou a investigação de novos estudos, os quais foram apresentados em congressos e publicados em revistas científicas. Durante a realização do curso, foi bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior - CAPES.

Concluiu o Mestrado em agosto de 2008, após a defesa da dissertação intitulada “Alimentação artificial de fêmeas parcialmente ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) por meio de tubos capilares”, ingressando automaticamente no Doutorado pelo Programa de Transferência de Nível da CAPES. O ingresso no curso de Doutorado propiciou a continuidade da linha de pesquisa iniciada no Mestrado. No período de março de 2009 a fevereiro de 2010 foi vice-representante dos discentes do Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UFRRJ. Do mês de maio a julho de 2010, realizou estágio de Doutorado Sanduíche na Universidad Agraria de la Habana - Cuba, onde teve a oportunidade de compartilhar experiências com pesquisadores especialista no assunto proposto para a tese de Doutorado.

Desde a graduação até o presente momento, publicou artigos científicos em revistas, participou de eventos científicos, nos quais apresentou e publicou resumos. Participa ativamente no Grupo de Pesquisa intitulado “Estudo das hemoparasitoses e seus vetores e controle das parasitoses em animais de produção”, sob a coordenação do professor Adivaldo Henrique da Fonseca.

RESUMO

RANGEL, Charles Passos. **Eficiência da alimentação *in vitro* de fêmeas de *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae)**. 2011. 60p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias, Parasitologia Veterinária). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2011.

A técnica de alimentação artificial constitui uma importante ferramenta por possibilitar a análise dos aspectos biológicos e a avaliação da eficiência dos carrapatos como vetores de bioagentes. Objetivou-se avaliar o efeito da faixa de peso, o intervalo entre a coleta e o início da alimentação artificial, bem como a influência de diferentes formas de apresentação do sangue bovino, temperaturas e dispositivos adaptados para a alimentação artificial de fêmeas parcialmente ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*. Inicialmente, as fêmeas foram lavadas em água destilada, avaliadas quanto à integridade do gnatossoma, pesadas e fixadas em bandejas com a face ventral voltada para cima. Foram realizados cinco experimentos adotando-se o delineamento inteiramente casualizado. No primeiro, verificou-se o efeito da faixa de peso sobre a alimentação *in vitro* das fêmeas parcialmente ingurgitadas. No segundo, foi avaliado o intervalo entre a coleta dos carrapatos e o início da alimentação artificial. No terceiro experimento, determinou-se o efeito de diferentes formas de apresentação de sangue bovino sobre a eficiência da alimentação artificial das fêmeas. Nos três primeiros experimentos, os carrapatos foram alimentados com sangue bovino, por meio de tubos capilares por 24 horas. Durante este período, os capilares foram trocados a cada 60 minutos e os grupos mantidos em estufa à temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade de $80 \pm 5\%$. No quarto experimento, foi avaliada a influência de diferentes temperaturas sobre a alimentação das fêmeas. Os carrapatos foram mantidos sob temperaturas de 32 e 37°C e umidade de $80 \pm 5\%$, sendo avaliado, em cada temperatura, a alimentação com sangue bovino, por meio de tubos capilares por 12 e 24 horas. No quinto e último experimento foi avaliada a utilização de tubos capilares e ponteiras plásticas, na alimentação artificial de fêmeas de *R. microplus*, com sangue bovino. Os carrapatos foram mantidos, em estufa, à temperatura controlada de 37°C e umidade de $80 \pm 5\%$, sendo alimentados nos períodos de 12 e sete horas por meio de tubos capilares e ponteiras plásticas, respectivamente. Ao término dos três últimos experimentos, os carrapatos foram fixados em placas de Petri e incubados à temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade de $80 \pm 5\%$, para acompanhamento dos aspectos biológicos. Foi constatado que as fêmeas com peso inicial de 40 a 69mg apresentaram maior tendência de ganho de peso sendo capazes de retomar seu processo de alimentação, após um intervalo de até 12 horas. Além disso, verificou-se que independente da forma como o sangue bovino foi apresentado, os carrapatos alcançaram grau de ingurgitamento equivalente. Quando alimentados sob temperatura de 37°C , não foi observada diferença estatística entre o peso das fêmeas alimentadas por 12 e 24 horas. A utilização de ponteiras plásticas permitiu a ingestão contínua de sangue, sem que fosse necessário realizar trocas, de forma que fêmeas com peso médio inicial de 48,9mg apresentaram peso médio final de 200,17mg. A técnica não apresentou efeito deletério sobre os aspectos biológicos da fase não-parasitária de *R. microplus*.

Palavras-chave: Ixodídeo, carrapato, alimentação artificial

ABSTRACT

RANGEL, Charles Passos. **Feeding efficiency *in vitro* of females of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae)**. 2011. 60p. Thesis (Doctor Science in Veterinary Science, Veterinary Parasitology). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2011.

The technique of artificial feeding is an important tool for enabling the analysis of biological and evaluating the efficiency of ticks as vectors of bio-agents. The objective was to evaluate the effect of weight range, the interval between collection and beginning of artificial feeding, as well as the influence of different forms of presentation of bovine blood, temperatures and adapted devices for artificial feeding of partially engorged females of *Rhipicephalus microplus*. Preliminarily, the females were washed in distilled water and evaluated for integrity gnathosoma, weighed and fixed in trays with the ventral surface facing up. Five experiments were carried out by adopting a completely randomized design. At the first was verified the effect of the weight range on the *in vitro* feeding of partially engorged females. In the second, we measured the interval between the collection of ticks and the beginning of artificial feeding. The third was to determine the effect of different forms of presentation of bovine blood on the effectiveness of artificial feeding of females. In the first three experiments, ticks were fed with bovine blood through capillary tubes for 24 hours. During this period, the capillaries were changed every 60 minutes and the groups kept in greenhouse at $27 \pm 1^\circ\text{C}$ and humidity of $80 \pm 5\%$. In the fourth experiment, we evaluated the influence of different temperatures on the feeding of females. Ticks were kept at temperatures between 32 and 37°C and humidity $80 \pm 5\%$, being evaluated, in each temperature, the feeding with bovine blood through capillary tubes for 12 and 24 hours. In the fifth and last experiment was evaluated the use of capillary tubes and plastic pipette tips, in the artificial feeding of female *R. microplus* with bovine blood. Ticks were kept in a greenhouse at a controlled temperature of 37°C and humidity of $80 \pm 5\%$ and fed in periods of 12 and seven hours through capillary tubes and plastic pipette tips, respectively. At the end of the last three experiments, ticks were fixed in Petri dishes and incubated at a temperature of $27 \pm 1^\circ\text{C}$ and humidity of $80 \pm 5\%$ for biological monitoring. It was found that females with an initial weight of 40 to 69mg were more likely to gain weight being able to resume their feeding process, after an interval of 12 hours. In addition, was found that regardless of how the bovine blood was presented, the degree of tick engorgement achieved was equivalent. When fed at a temperature of 37°C , there was no statistical difference between the weight of females fed for 12 and 24 hours. The use of plastic pipet allowed the continuous intake of blood, without the need of exchange, so the females with average initial weight of 48.9 mg had an average weight of 200.17 mg. The technique didn't showed deleterious effects on the biological aspects of non-parasitic phase of *R. microplus*.

Key-words: Ixodid, tick, artificial feeding

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Influência do peso inicial na alimentação artificial de fêmeas *Rhipicephalus microplus*, por meio de tubos capilares. **29**

Tabela 2. Efeito do intervalo entre a coleta e início da alimentação artificial de fêmeas parcialmente ingurgitadas do carrapato *Rhipicephalus microplus*, por meio de tubos capilares. **35**

Tabela 3. Efeito de diferentes formas de apresentação do sangue bovino sobre a alimentação artificial de fêmeas parcialmente ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*, por meio de tubos capilares. **37**

Tabela 4. Aspectos biológicos da fase não-parasitária de fêmeas *Rhipicephalus microplus* alimentadas, com sangue bovino total, diluído em anticoagulantes e desfibrinado, por meio de tubos capilares. **39**

Tabela 5. Efeito de diferentes temperaturas sobre a alimentação artificial de fêmeas parcialmente ingurgitadas do carrapato *Rhipicephalus microplus*, por meio de tubos capilares. **41**

Tabela 6. Efeito de dispositivos utilizados para a alimentação de fêmeas parcialmente ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*. **45**

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Síntese da literatura sobre a alimentação artificial por meio de tubos capilares de diferentes espécies de carrapatos em jejum. **8**

Quadro 2. Síntese da literatura sobre a alimentação artificial por meio de tubos capilares de fêmeas parcialmente ingurgitadas de diferentes espécies carrapatos. **11**

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ganho médio de peso dos principais carrapatos de animais domésticos após os períodos de seis, 12 e 24 horas de alimentação artificial por meio de tubos capilares. (Dados compilados de RANGEL, 2008; RANGEL et al., 2008; SAKAI, 2010; ABEL et al., em análise). **13**

Figura 2. Preparação da unidade de alimentação artificial de fêmeas parcialmente ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*. A – Materiais necessários para preparação da bandeja; B – Fixação de fita adesiva dupla face no verso de uma tira de papel utilizada para a identificação dos carrapatos; C e D – Posicionamento do papel no centro da bandeja e posterior aplicação de fita adesiva dupla face; E – Fixação dos carrapatos na bandeja; F – Imobilização das pernas dos carrapatos com a utilização de fita adesiva de papel crepado. **22**

Figura 3. Alimentação artificial de fêmeas parcialmente ingurgitadas do carrapato *Rhipicephalus microplus*. A – Preparação do material para o preenchimento dos tubos capilares com sangue citratado bovino; B – Posicionamento dos tubos capilares sobre o aparelho bucal dos carrapatos; C e D – Espécimes durante o processo de alimentação artificial por meio de tubos capilares. **24**

Figura 4. Alimentação artificial de fêmeas parcialmente ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* por meio de ponteiras plásticas. A e B – Fêmeas *R. microplus* fixadas em bandejas de poliestireno expandido com ponteiras plásticas apoiadas sobre blocos de massa de modelar e posicionadas sobre o hipostômio dos carrapatos; C e D – Ponteiras plásticas preenchidas com 0,5mL de sangue citratado bovino posicionadas sobre os palpos e as quelíceras dos carrapatos. **25**

Figura 5. Excreção de guanina em fêmea de *Rhipicephalus microplus* alimentada por meio de ponteira plástica, com capacidade de 1000µL, utilizadas para micropipetas automáticas. **28**

Figura 6. Relação entre a faixa de peso inicial e o ganho médio de peso das fêmeas parcialmente ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* alimentadas por meio de tubos capilares. **30**

Figura 7. Relação entre a faixa de peso inicial e o ganho médio de peso das fêmeas parcialmente ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* alimentadas por meio de tubos capilares. Os grupos I, II, III, IV e V representam as faixas de peso 10-39, 40-69, 70-99, 100-129 e 130-159mg, respectivamente. **31**

Figura 8. Relação entre a faixa de peso inicial e a perda de peso das fêmeas parcialmente ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* mantidas em jejum por um período de 24 horas (Grupo Controle A). **32**

Figura 9. Relação entre a faixa de peso inicial e o percentual do peso das fêmeas adquirido durante a alimentação artificial. Os grupos I, II, III, IV e V representam as faixas de peso 10-39, 40-69, 70-99, 100-129 e 130-159mg, respectivamente. **33**

Figura 10. Valores médios das fêmeas de *Rhipicephalus microplus* alimentadas artificialmente sob às temperaturas de 32°C e 37°C, durante os períodos de 12 e 24 horas e grupo controle. **42**

Figura 11. Ganho médio de peso de fêmeas de *Rhipicephalus microplus* alimentadas artificialmente por meio de tubos capilares, nos períodos de 12 e 24 horas, sob condições controladas de temperaturas de 27, 32 e 37°C. Os resultados obtidos à temperatura de 27°C foram compilados de Rangel (2008). **43**

Figura 12. Elevação do histerossoma de fêmea de *Rhipicephalus microplus* alimentada por meio de ponteira plástica e desprendimento da fita de papel crepado da bandeja. **44**

Figura 13. Fêmea de *Rhipicephalus microplus* antes (A) e após (B) alimentação artificial por meio de ponteiras plásticas. **46**

Figura 14. Peso médio das fêmeas alimentadas artificialmente por meio de diferentes dispositivos e temperaturas e o peso médio de suas respectivas massas de ovos. **49**

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 O Carrapato <i>Rhipicephalus microplus</i>	3
2.1.1 Fase parasitária	3
2.1.2 Fase não-parasitária de <i>Rhipicephalus microplus</i>	4
2.2 Técnica de Alimentação Artificial por Meio de Tubos Capilares	6
2.2.1 Ingurgitamento e aspectos biológicos de carrapatos alimentados <i>in vitro</i>	7
2.2.1.1 Carrapatos em jejum	7
2.2.1.2 Carrapatos parcialmente ingurgitados	10
2.2.2 Aplicações da técnica	15
2.2.2.1 Transmissão <i>in vitro</i> de patógenos	16
3 MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1 Local de Execução	20
3.2 Animais	20
3.3 Colônia de <i>Rhipicephalus microplus</i>	20
3.4 Infestações Experimentais e Obtenção das Fêmeas Parcialmente Ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i>	21
3.5 Amostras de Sangue	21
3.6 Execução da Técnica de Alimentação Artificial	21
3.7 Aspectos Biológicos Analisados	26
3.8 Análise Estatística	26
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
4.1 Técnicas de Alimentação <i>in vitro</i> de Fêmeas Parcialmente Ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i>	27
4.1.1 Tubos capilares	28
4.1.2 Ponteiras plásticas	28
4.2 Efeito das Faixas de Peso Inicial	28
4.3 Intervalo entre a Coleta e o Início da Alimentação Artificial	34
4.4 Efeito de Diferentes Formas de Apresentação do Sangue Bovino	36
4.5 Influência de Diferentes Temperaturas	40
4.6 Dispositivos de Alimentação	44
4.7 Aspectos Biológicos da Fase não-Parasitária de Fêmeas de <i>Rhipicephalus microplus</i>	46
6 CONCLUSÕES.....	52
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

1 INTRODUÇÃO

Rhipicephalus microplus (Canestrini, 1887) é uma espécie de carrapato que apresenta como hospedeiro natural os bovinos das regiões tropicais e subtropicais localizadas entre os paralelos 32°N e 32°S. Devido à sua importância econômico-sanitária, tem recebido grande atenção principalmente com relação à sua biologia, epidemiologia e controle. No Brasil, os prejuízos causados por este ixodídeo foram estimados em dois bilhões de dólares ao ano (GRISI et al., 2002).

A manutenção de colônias de *R. microplus* em laboratório apresenta custo elevado em decorrência da necessidade de infra-estrutura, mão-de-obra especializada, aquisição e manutenção de bovinos. A utilização de hospedeiros alternativos é ineficiente, uma vez que a recuperação e o peso das fêmeas ingurgitadas são geralmente inferiores aos relatados para espécimes ingurgitados em bovinos (LOOMIS, 1971).

A crescente preocupação com questões relacionadas à ética tem estimulado cada vez mais a substituição do uso de animais na experimentação científica por métodos alternativos. Desta forma, a alimentação artificial surge como uma importante ferramenta por possibilitar a análise dos aspectos biológicos e a avaliação da eficiência de *R. microplus* como vetor, além de tornar possível a redução do número de animais de laboratório necessários em pesquisas que envolvam a transmissão de bioagentes.

A manutenção de carrapatos através da alimentação artificial tem sido útil em pesquisas envolvendo a sensibilidade e a resistência aos acaricidas sistêmicos, reduzindo gastos econômicos, e na determinação da concentração mínima de um patógeno necessária para infectá-los. O estudo dos componentes da saliva possibilitou a elucidação de estruturas biologicamente ativas secretadas que podem levar ao desenvolvimento de novas drogas. Ensaio *in vitro* também são utilizados para realização de estudos sobre a dinâmica da transmissão de patógenos, na ausência das interações parasito-hospedeiro, e para investigação e determinação de substâncias fago-estimulantes e das exigências nutricionais dos carrapatos (KRÖBER; GUERIN, 2007).

Muitas tentativas de alimentação e infecção artificial de carrapatos ixodídeos e argasídeos com bioagentes vêm sendo conduzidas utilizando tubos capilares, membranas naturais e artificiais (WALADDE et al., 1996; KOCAN et al., 2005). No Brasil, estudos referentes à alimentação artificial de carrapatos obtiveram êxito com o uso de membranas artificiais e tubos capilares (MOURA et al., 1997; FONSECA et al., 1999; ABEL, 2004; RANGEL, 2008; RANGEL et al., 2008).

As dificuldades inerentes ao estabelecimento de protocolos alternativos para a manutenção de carrapatos em laboratório utilizando membranas dependem essencialmente da adequação da textura e espessura das membranas, da temperatura e umidade relativa do ar nos sistemas de alimentação, das dietas utilizadas, do controle de bactérias e fungos e dos fago-estimulantes. Entretanto, ainda não foram descritos os fatores responsáveis pelo sucesso da técnica de alimentação artificial por meio de tubos capilares.

Na literatura são encontrados registros de alimentação artificial por meio de tubos capilares de estágios imaturos e adultos jovens do carrapato *R. microplus* (PIERCE; PIERCE, 1956; KEMP, 1975; WALKER et al., 1979; DE LA VEGA et al., 2000), porém, ainda não foram obtidos espécimes completamente ingurgitados. Recentemente, Rangel (2008) propôs a adaptação da técnica de tubos capilares, para a alimentação artificial de fêmeas parcialmente ingurgitadas de *R. microplus*. Este resultado contribuiu para o aperfeiçoamento e maior eficiência da técnica de alimentação *in vitro* de carrapatos.

Desta forma, o presente estudo teve como objetivos avaliar o efeito da faixa de peso inicial, o intervalo entre a coleta e o início da alimentação *in vitro*, bem como a influência de diferentes dietas, temperaturas e dispositivos adaptados para a alimentação artificial de fêmeas parcialmente ingurgitadas de *R. microplus*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O Carrapato *Rhipicephalus microplus*

A partir de análises morfológicas e moleculares, o carrapato *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*, anteriormente denominado como *Boophilus microplus*, foi reclassificado como pertencente ao gênero *Rhipicephalus*, subgênero *Boophilus* (MURRELL; BARKER, 2003). Sendo assim, ao longo deste estudo, optou-se pela utilização da nomenclatura *Rhipicephalus microplus* para esse carrapato.

Rhipicephalus microplus (Canestrini, 1887) é um carrapato homoxeno, isto é, necessita de apenas um hospedeiro para completar seu ciclo biológico, durante o qual ingere linfa, substratos teciduais e sangue. Seu ciclo de vida divide-se em fase de vida parasitária e de vida livre ou não parasitária (LAHILLE, 1905).

Em termos econômicos, *R. microplus* é considerado o carrapato mais importante para a indústria bovina mundial (PRUETT et al., 2008). No Brasil, os prejuízos causados por este ixodídeo foram estimados em dois bilhões de dólares ao ano (GRISI et al., 2002). Tais prejuízos podem comprometer a produção de carne, leite e a qualidade da pele do animal e são determinados principalmente pela ingestão de sangue do hospedeiro, inoculação de toxinas e transmissão de agentes patogênicos, principalmente *Anaplasma* sp. e *Babesia* spp. (JONGEJAN; UILENBERG, 2004).

2.1.1 Fase parasitária

A fase parasitária tem início com a fixação das larvas no hospedeiro susceptível e termina quando os adultos, incluindo as fêmeas fecundadas e ingurgitadas se desprendem desse hospedeiro (PEREIRA et al., 2008). No Brasil, Gonzales et al. (1974) ao estudarem a duração da fase parasitária de *R. microplus*, após a infestação experimental de larvas em bovinos estabulados verificaram que a muda larval teve início no quarto e término no sétimo dia decorrido da infestação, respectivamente. Enquanto, a muda ninfal ocorreu do nono ao 17^o dias, quando foi detectada a predominância de formas adultas jovens. Os autores observaram, ainda, que a queda das fêmeas ocorreu entre o 18^o e o 35^o dias após a infestação, sendo em média no 21^o dia.

Nesta fase, o carrapato é pouco afetado pelas condições climáticas ambientais (RIEK, 1965). No corpo do hospedeiro apresentam preferência por regiões da pele onde a temperatura varia de 31 a 38°C (DOUBE; KEMP, 1979).

A nutrição dos estágios evolutivos de carrapatos ixodídeos é um processo gradual até o último dia, em que o ingurgitamento é muito mais acentuado (LAHILLE, 1905; RIEK, 1965; TATCHEL et al., 1972; LONDT; ARTHUR, 1975; DE LA VEGA et al., 2003). As larvas se alimentam preferencialmente de plasma, enquanto, nos estágios finais que precedem o rápido ingurgitamento das ninfas e das fêmeas, o sangue se torna o principal constituinte alimentar (TATCHEL et al., 1972).

Balashov (1972) e Sonenshine (1991) caracterizaram o repasto sanguíneo de fêmeas de carrapatos ixodídeos em três fases. A primeira fase, chamada de fase preparatória, representa as primeiras 24-36 horas de fixação dos carrapatos nos hospedeiros vertebrados. Nesta fase ocorre pequena ou nenhuma ingestão de sangue, uma vez que as atividades predominantes são a inserção do aparelho bucal do carrapato na pele do hospedeiro, a secreção de cemento e a formação da lesão de alimentação. Tatchell et al. (1972) afirmaram

que fêmeas de *R. microplus* durante os primeiros seis dias de fixação ingerem apenas 3,8µL de sangue.

Nas fases seguintes, os carrapatos iniciam o processo contínuo de ingestão de sangue e outros fluidos (BALASHOV, 1972; SONENSHINE, 1991). Estes autores relataram que a diferença entre as fases finais do processo de alimentação está relacionada à velocidade com que os carrapatos se alimentam.

A segunda fase, conhecida como fase lenta, apresenta duração de sete a nove dias, período no qual a fêmea acasalada cresce cerca de dez vezes o seu peso corporal em jejum, atingindo o chamado “peso crítico” (HARRIS; KAUFMAN, 1984).

Na terceira fase, chamada de fase rápida dura de 12-36 horas e a fêmea pode aumentar dez vezes o peso corporal obtido na fase lenta. O sinal para o início da ingestão rápida de sangue ocorre pela liberação do espermátforo no trato reprodutivo. Segundo Legg (1930), Oliver Jr. (1974), Balashov (1972) e Diehl et al. (1982), somente após a fertilização, que ocorre a partir do 17^o dia após a infestação (LONDT; ARTHUR, 1975), a fêmea atinge o grau máximo de ingurgitamento. Se as fêmeas não forem fecundadas, geralmente permanecem fixadas no hospedeiro, porém não completam o ingurgitamento (ANDERSON, 1974). Caso consigam completar o ingurgitamento, o processo alimentar torna-se mais prolongado e o peso médio das fêmeas significativamente menores quando comparado com fêmeas fecundadas (RIEK, 1959; STONE, 1963; OLIVER Jr, 1974).

No estudo sobre a dinâmica da alimentação de *R. microplus*, observou-se que nos primeiros três dias as fêmeas não apresentaram ganho de peso constante, o que só foi verificado a partir do quarto dia de alimentação. Do sétimo para o oitavo dia, os carrapatos apresentaram significativo ganho de peso (DE LA VEGA et al., 2003).

O ingurgitamento e a queda de fêmeas de *R. microplus* são bastante rápidos, como demonstrados por Wharton e Utech (1970) ao verificarem que fêmeas ingurgitadas com tamanho de quatro a seis milímetros (10-30mg) podem atingir um rápido ingurgitamento final, chegando de oito a onze milímetros (150-250mg). Segundo Tatchell et al. (1972), a fêmea de *R. microplus* nas horas finais que precedem a queda podem chegar a ingerir 300-500µL de sangue. Essa grande ingestão de sangue é necessária para promover o funcionamento de órgãos e vias metabólicas responsáveis por converter os nutrientes em ovos (BENNETT, 1974).

O peso dos carrapatos ao final do ingurgitamento pode variar de acordo com a espécie de carrapato e o tipo de hospedeiro. Da primeira à última fase do repasto sanguíneo, as fêmeas têm um aumento total de cerca de 100 vezes (SONENSHINE, 1991; FRIESEN; KAUFMAN, 2009), ou até mesmo 200 vezes o seu peso corporal (KEMP et al., 1982).

2.1.2 Fase não-parasitária de *Rhipicephalus microplus*

A fase de vida não parasitária do carrapato *R. microplus* tem início quando a fêmea completamente ingurgitada desprende-se do hospedeiro e cai no solo (LAHILLE, 1905).

As condições de temperatura e umidade relativa do ar, nas quais fêmeas de *R. microplus* apresentaram melhor desempenho na fase não-parasitária, foram determinadas por Hitchcock (1955) e Bennett (1974) como sendo 27-30°C e 80-90%, respectivamente.

Na Austrália, Hitchcock (1955) e Sutherst et al. (1978), ao estudarem os aspectos biológicos do carrapato *R. microplus* encontraram fêmeas ingurgitadas com peso médio variando de 213 a 246mg. Em estudos sobre a oviposição e sazonalidade de *R. microplus*, Costa (1982) observou um peso médio de 223,3mg.

Benavides (1984) recuperou fêmeas ingurgitadas com peso médio de 245,5mg ao infestar experimentalmente bovinos na Colômbia. Bittencourt (1990) recuperou fêmeas ingurgitadas com peso médio de 258,2mg, semelhante ao peso médio de 256,4mg encontrado por Barreira (2001), em fêmeas de *R. microplus* não infectadas com *Babesia bovis* (Babés, 1888) e *Babesia bigemina* (Smith; Kilborne, 1893). No estudo da dinâmica de alimentação de *R. microplus*, De La Vega et al. (2003) verificaram fêmeas com peso médio de 228mg. De La Vega et al. (2007) ao compararem a diferença no peso de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* do Brasil e de Cuba observaram peso médio de 258,7mg para carrapatos provenientes do Brasil e de 233,9mg para os carrapatos oriundos de Cuba.

O intervalo entre o desprendimento natural da fêmea do hospedeiro até o seu primeiro dia de postura corresponde ao período de pré-postura, que tem em média duração de dois a três dias (HITCHCOCK, 1955; RIEK, 1965; BENNETT, 1974). Este período é necessário para que ocorra a maturação do ovário da fêmea, a produção e a maturação dos ovos, bem como sua passagem através dos ovidutos (LAHILLE, 1905). De acordo com Nagar (1968), o período de pré-postura é curto e particular para cada espécie de ixodídeo, sendo que a uma mesma temperatura, excetuando variações individuais na taxa metabólica, os carrapatos de uma espécie requerem semelhante intervalo de tempo para a produção dos ovos.

Alvarado e Gonzales (1979) e Davey et al. (1980) registraram período médio de pré-postura de três dias, com variação de 3,0 a 3,2 dias observada pelo último autor. Posteriormente, Davey et al. (1984) encontraram período de pré-postura variando de dois a seis dias. Avaliando o nível de resistência de bovinos ao carrapato *R. microplus*, Meléndez et al. (1998) verificaram um período de pré-postura de dois a quatro dias. Costa (1982), Magalhães (1989), Bittencourt (1990) e Furlong (1990) relataram períodos de pré-postura de 4,17; 7,0; 2,8 e 3,27 dias respectivamente, em condições experimentais. Glória et al. (1993), comparando a biologia da fase não-parasitária de duas cepas de *R. microplus* utilizando diferentes temperaturas, observaram que, a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa do ar de $80 \pm 10\%$, a duração do período de pré-postura foi de 2,91 dias, em média, para fêmeas sensíveis à carrapaticida e 2,73 dias para fêmeas resistentes à carrapaticida. Barreira (2001) relatou um período médio de pré-postura de 2,29 dias em carrapatos livres de infecção por *B. bovis* e *B. bigemina*. Na Costa Rica, Álvarez et al. (2007) observaram período médio de pré-postura de 4,3 dias.

A produção dos ovos é dependente da fêmea estar ou não fertilizada, havendo correlação positiva entre o peso das fêmeas ingurgitadas e o número de ovos produzidos (HITCHCOCK, 1955). É também indispensável que as fêmeas ingiram um volume limiar crítico de sangue para que a postura possa se iniciar (OLIVER Jr., 1974).

O peso da postura de fêmeas de *R. microplus* foi determinado por Davey et al. (1984), no México, quando estudaram os aspectos biológicos da fase não-parasitária em cepas deste ixodídeo mantidas em laboratório e de cinco diferentes áreas geográficas. Estes autores observaram posturas viáveis com peso variando de $167 \pm 46\text{mg}$ a $114 \pm 36\text{mg}$ para fêmeas das cinco áreas geográficas e $215 \pm 51\text{mg}$ para fêmeas mantidas em laboratório. No mesmo ano, Benavides (1984) encontrou peso médio de postura de 245,5mg em fêmeas oriundas de infestação artificial de bovinos na Colômbia.

No Brasil, Bittencourt (1990) observou peso médio de postura de 151,0mg para fêmeas de *R. microplus* de origem bovina, enquanto Furlong (1990), ao avaliar o comportamento de *R. microplus* em infestações simultâneas ou consecutivas com *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787), encontrou massa de ovos com média de 111,52mg. Glória et al. (1993), analisando a biologia da fase não parasitária de fêmeas de *R. microplus* sob diferentes temperaturas, encontraram um período médio de postura de 155,6mg para

fêmeas sensíveis à carrapaticida e de 140,08mg para fêmeas resistentes à carrapaticida. Barreira (2001) encontrou peso médio de postura de fêmeas *R. microplus* não infectadas por *B. bovis* e *B. bigemina* de 91,31mg.

A partir dos aspectos peso da fêmea ingurgitada e da postura, Bennett (1974) estabeleceu o índice de produção de ovos para avaliar a capacidade de uma fêmea converter o sangue ingerido em ovos. Este autor observou máxima conversão em fêmeas com intervalo de peso de 160-300mg.

Davey et al. (1980) relataram um índice de produção de ovos de 57,95% em infestações artificiais de bovinos, enquanto Costa (1982) encontrou um índice médio de 45,8%. Nas observações realizadas por Benavides (1984) sobre os aspectos biológicos de *R. microplus*, verificou-se índice médio de produção de ovos de 48,5%, percentual inferior ao observado por Bittencourt (1990), que encontrou índice médio de 58,5% para fêmeas de *R. microplus* obtidas de bovinos infestados com larvas de origem bovina. Glória et al. (1993) verificaram um índice de produção de ovos de 78,70% para fêmeas sensíveis à carrapaticida e 78,60% para fêmeas resistentes à carrapaticida. Barreira (2001) relatou índice de produção de ovos de 41,87% para fêmeas não infectadas por *B. bovis* e *B. bigemina*.

Para determinar o índice de eficiência reprodutiva, ou seja, a capacidade das fêmeas converterem seu peso em ovos, expressões matemáticas foram propostas por Drummond et al. (1971), Bennett (1974) e Meléndez et al. (1998). Seguindo a metodologia proposta por Drummond et al. (1971), os autores Davey et al. (1980) e Barreira (2001) encontraram índice de eficiência reprodutiva médio de 56,50 e 55,65%, respectivamente. Glória et al. (1993), ao adotar referência metodológica de Bennett (1974), verificaram índice de 58,07% para carrapatos resistentes e 58,18% para carrapatos sensíveis à carrapaticidas. Na Venezuela, Meléndez et al. (1998) observaram índice de eficiência reprodutiva variando de 7,4 a 26%.

Borges et al. (2001) avaliaram a influência do peso inicial de fêmeas *R. microplus* na conversão de ovos. Os autores verificaram que fêmeas ingurgitadas com peso entre 151 e 360mg alcançaram um índice mais alto de eficiência reprodutiva, com variação de 44,9% a 51,4%, enquanto que aquelas mais leves apresentaram uma menor capacidade de conversão em ovos, variando de 31,4 a 39,0%.

Imediatamente após a postura tem início o período embrionário, que resulta na eclosão das larvas. Taxas de eclosão larval de 80 e acima de 90% foram obtidas para carrapatos *R. microplus* mantidos sob temperatura de 27°C e umidade relativa do ar de 80% por Costa (1982) e Davey et al. (1984), respectivamente. Bittencourt (1990) verificou 94,6% e 93% de eclosão para larvas oriundas da postura de fêmeas provenientes de bovinos e de equinos, respectivamente. Em estudo realizado por Glória et al. (1993), larvas oriundas de fêmeas sensíveis à carrapaticidas apresentaram 100% de eclosão, enquanto em carrapatos resistentes a taxa de eclosão foi de 98,33%. Barreira (2001) verificou uma taxa de eclosão média de 89% para larvas provenientes de fêmeas livres de *B. bovis* e *B. bigemina*.

2.2 Técnica de Alimentação Artificial por Meio de Tubos Capilares

A técnica de alimentação artificial de carrapatos por meio de tubos capilares foi descrita pela primeira vez por Gregson (1937). O princípio desta técnica consiste na fixação e imobilização dos carrapatos sobre placas de Petri, lâminas de microscopia ou bandejas de poliestireno expandido, com auxílio de fita adesiva dupla-face ou massa de modelar. Em seguida, tubos capilares repletos da dieta a ser ingerida são posicionados sobre o aparelho bucal dos carrapatos, por períodos que variam de acordo com o propósito experimental (ABEL, 2004).

2.2.1 Ingurgitamento e aspectos biológicos de carrapatos alimentados *in vitro*

Tentativas de ingurgitamento e avaliação dos aspectos biológicos em carrapatos alimentados artificialmente têm sido realizadas com o objetivo de minimizar o número de hospedeiros vertebrados necessários à manutenção de colônias desses artrópodes em laboratório. Nesses estudos podem ser utilizados carrapatos em diferentes estágios de desenvolvimento. Em geral, são utilizados carrapatos adultos em jejum, que logo após exposição aos capilares são colocados sobre seus hospedeiros para completarem sua alimentação, ou, então, carrapatos adultos previamente alimentados, por algumas horas, em animais de laboratório. Neste caso, os períodos de exposição ao hospedeiro variam de acordo com a espécie de carrapato e com os objetivos do estudo (KOCAN et al., 2005).

2.2.1.1 Carrapatos em jejum

Existem poucos registros sobre a utilização de carrapatos em jejum em estudos envolvendo a alimentação artificial por meio de tubos capilares. No Quadro 1, foram agrupados os principais fatores descritos na literatura para o processo de alimentação *in vitro* de carrapatos em jejum, tais como, a espécie e o estágio de desenvolvimento dos carrapatos, origem dos capilares e suas dimensões, dietas fornecidas, intervalos de substituição dos capilares, períodos de alimentação, temperatura e umidade relativa do ar e os critérios adotados para avaliar a ingestão das dietas.

Chabaud (1950) realizou a primeira tentativa de promover o ingurgitamento *in vitro* de ninfas inicialmente em jejum de *Ornithodoros moubata* (Murray, 1877), *Ornithodoros parkeri* (Cooley, 1936), *Ornithodoros erraticus* (Koch, 1844) e *Ornithodoros talaje* (Guérin-Méneville, 1849), e adultos *Hyalomma anatolicum excavatum* (Koch, 1844), *Hyalomma dromedarii* (Koch, 1844), *Dermacentor reticulatus* (Fabricius, 1794), *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) e *Ixodes hexagonus* (Leach, 1815). Neste trabalho o processo de alimentação artificial foi dividido em duas etapas. Na primeira, o autor relatou a preparação das espécies para o início da alimentação *in vitro*. Os argasídeos foram fixados pela parte dorsal do idiossoma sobre uma gota de parafina depositada em lâmina para microscopia e, no caso dos ixodídeos, para obter melhores resultados, além do idiossoma, os três últimos pares de pernas também foram imobilizados. Na segunda etapa, foi realizada a alimentação artificial propriamente dita com o posicionamento da extremidade de menor diâmetro de pipetas Pasteur sobre o aparelho bucal dos carrapatos. Para tanto, os palpos foram mantidos fora da pipeta, enquanto as quelíceras e o hipostômio permaneceram em contato com a dieta à base de solução fisiológica ou soro/sangue desfibrinado de cobaias ou líquido proveniente de ascite em ratos. Durante a alimentação artificial, os carrapatos foram mantidos em estufa a uma temperatura controlada de 27°C em ambiente úmido. O autor verificou que, independente da dieta oferecida, os resultados foram substancialmente os mesmos. Os argasídeos apresentaram uma ingestão insatisfatória e, mesmo nos casos mais favoráveis, o grau de ingurgitamento não foi adequado para garantir a muda. Além disso, foi observada uma grande dificuldade no posicionamento das pipetas sobre o aparelho bucal dos membros desta família, devido à localização do gnatossoma em algumas espécies, como *O. erraticus* e *O. talaje*. Os carrapatos ixodídeos machos alcançaram ingurgitamento completo entre 12 e 18 horas e as fêmeas, mesmo após um período de 18 a 48 horas na estufa, apresentaram ingurgitamento parcial. Embora não tenha obtido o ingurgitamento total dos carrapatos em ambas as famílias, o autor defendeu a importância da técnica devido a sua simplicidade, assim como sua aplicação em estudos envolvendo fisiologia dos carrapatos e transmissão de patógenos.

Quadro 1. Síntese da literatura sobre a alimentação artificial por meio de tubos capilares de diferentes espécies de carrapatos em jejum.

	CHABAUD (1950)	RAU e HANNOUN (1968)	DE LA VEGA et al. (2000)	ABEL et al. (2008)
Espécie/ Estágio evolutivo	<i>Ornithodoros moubata</i> , <i>Ornithodoros parkeri</i> , <i>Ornithodoros erraticus</i> , <i>Ornithodoros talaje</i> , <i>Hyaloma excavatum</i> , <i>Hyaloma dromedarii</i> , <i>Dermacentor pictus</i> , <i>Rhipicephalus sanguineus</i> e <i>Ixodes hexagonus</i> /Ninfa e Adulto	<i>Argas reflexus reflexus</i> / Adulto e Ninfa de segundo estágio	<i>Rhipicephalus microplus</i> /Ninfa	<i>Amblyomma cajennense</i> /Adulto
Dispositivo de alimentação/ Dimensão (mm)	Pipetas Pasteur/ *	Pipetas Pasteur/ 75,0 x 1,0	Tubo capilar / *	Tubo capilar / 75,0 x 1,0 x 1,5
Dietas	Solução fisiológica, soro e sangue desfibrinado de cobaias e líquido proveniente de ascite em ratos	Sangue heparinizado de frango ou pombo	Sangue heparinizado e desfibrinado de bovino	Sangue citratado de bovino
Intervalos de substituição dos dispositivos	*	*	*	A cada 12 horas nos grupos alimentados de forma contínua por 24 e 48 horas
Períodos de alimentação	Argasídeos Ninfa - poucos minutos	Adulto- 7 minutos	35 minutos	Grupos com alimentação ininterrupta por 12, 24 e 48 horas
	Ixodídeos Macho- 12 a 18 horas Fêmea- 18 a 48 horas	Ninfa- 5 minutos		Grupos alimentados 2 e 6 horas durante 8 dias consecutivos
Temperatura e Umidade relativa do ar	27°C e ambiente úmido	*	*	27°C e 80%
Crítérios adotados para avaliar a ingestão das dietas	Acompanhamento da continuidade do ciclo biológico dos carrapatos – muda e postura	Ganho de peso e acompanhamento da continuidade do ciclo biológico dos carrapatos – muda e postura	Ganho de peso, eliminação de excretas e acompanhamento dos aspectos biológicos da fase não- parasitária	Ganho de peso, eliminação de excretas e acompanhamento dos aspectos biológicos da fase não- parasitária

*Não mencionado(s) pelo(s) autor(es).

O aperfeiçoamento da técnica por Rau e Hannoun (1968) garantiu o sucesso da alimentação artificial do carrapato *Argas reflexus* (Fabricius, 1794). Esses autores realizaram uma série de experimentos, onde carrapatos adultos de ambos os sexos e ninfas de segundo estágio foram inicialmente pesados e colocados com a face ventral voltada para cima no dispositivo de alimentação montado sobre um bloco de vidro. Tubos capilares obtidos a partir das extremidades de pipetas Pasteur com um milímetro de diâmetro e 50 a 75mm de comprimento foram preenchidos com sangue heparinizado de frango ou de pombo e, fixados com auxílio de massa de modelar ao bloco perfazendo um ângulo de 45° em relação ao aparelho bucal dos carrapatos. Em microscópio de dissecação, os autores realizaram uma leve pressão com o dedo indicador na extremidade posterior dos carrapatos pressionando o aparelho bucal e introduzindo as quelíceras e o hipostômio nos tubos capilares. Durante o período de ingurgitamento, os carrapatos permaneceram quase imóveis com as pernas esticadas. Em cerca de cinco minutos para ninfas, e sete minutos para adultos, os carrapatos alcançaram pleno ingurgitamento. Após a ingestão de sangue, os carrapatos foram novamente pesados e verificou-se que os adultos ingeriram entre 30 e 40mg de sangue, enquanto as ninfas de 10 a 35 mg. Os carrapatos sobreviveram bem a alimentação artificial, as fêmeas realizaram posturas viáveis e as ninfas foram capazes de realizar mudas, o que garantiu a continuidade do ciclo biológico da espécie.

Testes realizados por De La Vega et al. (2000) demonstraram que fêmeas recém mudadas de *R. microplus* foram capazes de completar o ingurgitamento em bovinos mesmo após um período de alimentação artificial por meio de micropipetas, além disso, avaliaram a influência de duas diferentes dietas sobre os aspectos biológicos desta espécie. Para obtenção dos espécimes, ninfas coletadas no 14° dia após uma infestação experimental em bovino, realizaram muda sob condições de laboratório. As fêmeas recém-mudadas foram então pesadas e separadas em três grupos, sendo dois alimentados por meio de micropipetas, durante 35 minutos, com sangue desfibrinado e heparinizado de bovino e um terceiro grupo não alimentado utilizado como controle. Terminado o tempo estabelecido para a alimentação artificial, carrapatos de todos os grupos foram novamente pesados e acondicionados juntamente com machos sexualmente competentes em isoladores fixados à pele de bovinos, para completarem o ingurgitamento. A ingestão das dietas foi confirmada pelo ganho significativo de peso observado nos grupos alimentados e pela diminuição no grupo controle. Foi observado que 49% dos carrapatos submetidos às dietas contidas nas micropipetas eliminaram excretas, fato este considerado um critério adicional para comprovação da ingestão de sangue. Na fase parasitária, os autores observaram que os aspectos referentes a tempos de cópula e ingurgitamento, mortalidade de carrapatos e peso das fêmeas ingurgitadas não diferiram do grupo controle, assim como os aspectos da fase não-parasitária, tais como período de pré-postura, eficiência de postura e período de eclosão. Em relação à fertilidade dos ovos, a diferença observada entre os carrapatos alimentados com sangue desfibrinado e os outros dois grupos foi explicada pela ausência de estímulo inicial para ingestão de sangue no grupo controle e por um possível efeito tóxico da heparina sobre o desenvolvimento embrionário dos carrapatos. A alimentação artificial por meio de micropipetas não comprometeu a continuidade do ciclo biológico das fêmeas de *R. microplus*, independente da utilização de sangue heparinizado ou desfibrinado.

A possibilidade de utilizar a alimentação artificial no desenvolvimento de um modelo experimental para o estudo *in vitro* da relação *Amblyomma*-patógeno, motivou Abel et al. (2008) a adaptarem a técnica para fêmeas de *A. cajennense*. A metodologia utilizada foi semelhante à proposta por De La Vega et al. (2000), com modificações principalmente no que diz respeito ao dispositivo de alimentação e ao tempo de exposição dos carrapatos aos

capilares. Neste estudo, fêmeas com peso médio inicial de 6,06mg foram divididas em cinco grupos experimentais, dos quais três receberam dietas ininterruptamente por 12, 24 e 48 horas e os demais grupos alimentados duas e seis horas por dia, durante oito dias consecutivos. Como etapa preparatória para a alimentação artificial, os carrapatos foram fixados em bandejas de poliestireno expandido (19cm x 10cm) com auxílio de fita adesiva dupla face. Em seguida, tubos capilares de determinação de hematócrito sem anticoagulante foram preenchidos com sangue citratado de bovino e posicionados sobre o aparelho bucal dos carrapatos, formando um ângulo de aproximadamente 30° com a bandeja. Apenas nos grupos alimentados de forma contínua por 24 e 48 horas, realizou-se a troca dos capilares em intervalos de 12 horas. Durante a alimentação os grupos foram mantidos em estufa a 27°C e umidade relativa do ar de 80%. Posterior a pesagem, fêmeas de *A. cajennense* de todos os grupos foram infestadas juntamente com machos sobre o dorso de coelhos, para completarem o ingurgitamento. O critério empregado para a determinação do ganho dos carrapatos foi estabelecido pela diferença de peso dos carrapatos antes e após a alimentação *in vitro*. Os autores apontaram ainda o arredondamento do idiossoma e a eliminação de excretas como critérios adicionais para a observação da ingestão de sangue. O peso dos carrapatos foi significativamente maior após um período de 24 horas de exposição aos capilares, embora não tenha sido observada relação direta entre o ganho de peso e os tempos de alimentação. A técnica de alimentação artificial não interferiu na habilidade das fêmeas de *A. cajennense* em completar o ingurgitamento após a infestação em coelhos, assim como nos aspectos biológicos referentes à fase não-parasitária.

2.2.1.2 Carrapatos parcialmente ingurgitados

A prévia alimentação dos carrapatos sobre hospedeiros constituiu um estímulo para que estes continuassem seu processo de ingurgitamento *in vitro*. No Quadro 2, foram agrupados os principais fatores descritos na literatura para a alimentação artificial de carrapatos parcialmente ingurgitados, tais como, a espécie e o estágio de desenvolvimento dos carrapatos, origem dos capilares e suas dimensões, dietas fornecidas, intervalos de substituição dos capilares, períodos de alimentação, temperatura e umidade relativa do ar e os critérios adotados para avaliar a ingestão das dietas.

O primeiro relato da utilização de carrapatos parcialmente ingurgitados, no sistema de alimentação artificial por meio de tubos capilares foi feito por Gregson (1937), ao utilizar fêmeas de *Dermacentor andersoni* (Stiles, 1908). Neste estudo, os espécimes foram individualmente contidos em tubos de vidro afunilados nas duas extremidades apoiados sobre massa de modelar. Para evitar o recuo dos carrapatos, a extremidade de maior diâmetro do tubo foi vedada com auxílio de algodão. A haste capilar oriunda de um pequeno funil, repleto de sangue desfibrinado de ovino, foi inserida através da extremidade do tubo de vidro de menor diâmetro e posicionada sobre o hipostômio dos carrapatos. Após 30 horas de exposição aos capilares em temperatura ambiente, os autores verificaram que apenas um carrapato havia retomado o processo de ingurgitamento.

Para estudar o comportamento alimentar *in vitro* de *Rhipicephalus appendiculatus* (Neumann, 1901) Joyner e Purnell (1968) agruparam fêmeas parcialmente ingurgitadas em quatro grupos. O primeiro formado por carrapatos, infectados com *Theileria parva* (Theiler, 1902) e previamente alimentados por quatro dias em coelhos. No segundo utilizaram-se carrapatos não infectados e previamente alimentados em coelhos por quatro dias. Enquanto o quarto e o quinto grupos foram constituídos por carrapatos não infectados e previamente alimentados por cinco dias em coelhos e bovinos respectivamente. Terminado os períodos de

Quadro 2. Síntese da literatura sobre a alimentação artificial por meio de tubos capilares de fêmeas parcialmente ingurgitadas de diferentes espécies carrapatos.

	LÖSEL et al. (1993)	RANGEL (2008)	RANGEL et al. (2008)	SAKAI (2010)	ABEL et al. (em análise)
Espécie	<i>Rhipicephalus appendiculatus</i>	<i>Rhipicephalus microplus</i>	<i>Dermacentor nitens</i>	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	<i>Amblyomma cajennense</i>
Peso inicial (mg)	35-70	40,6- 69,7	40-60 e 61-100	20 -80 oriundas de coelhos e cães	44,5-108 e 108,2-246,1
Capilar/ Dimensões (mm)	*	75,0 x 1,0 x 1,5	75,0 x 1,0 x 1,5	75 x 1,0 x 1,5	75 x 1,0 x 1,5
Dietas	Soro de coelho e de bovino	Sangue citratado de bovino	Sangue citratado de bovino	Sangue citratado de cão	Sangue citratado de bovino
Intervalos de substituição dos dispositivos	*	30 minutos	60 minutos	60 minutos	60 minutos
Períodos de alimentação	18 horas	6, 12, 24 e 36 horas	6, 12, 24 e 36 horas	6, 12, 24, 36 e 48 horas	6,12 e 24 horas
Temperatura e Umidade	28 ± 1°C e 98%	27 ± 1°C e > 80%			
Crítérios adotados para avaliar a ingestão das dietas	Diferença no peso antes e após a exposição aos capilares	Diferença no peso antes e após a exposição aos capilares	Diferença de peso antes e após a exposição aos capilares	Diferença de peso antes e após a exposição aos capilares	Diferença no peso antes e após a exposição aos capilares

*Não mencionado(s) pelo(s) autor(es).

alimentação nos hospedeiros vertebrados, os carrapatos foram contidos com a face ventral voltada para cima sobre um bloco de massa de modelar. Os tubos capilares foram fabricados de modo que fosse possível determinar o ganho de peso dos carrapatos a partir da medição do comprimento da coluna das dietas oferecidas. Em cada grupo, os carrapatos foram submetidos a dietas constituídas por soro, plasma, sangue desfibrinado e heparinizado de bovinos. Tubos capilares preenchidos com as dietas a serem ingeridas foram posicionados sobre o aparelho bucal dos carrapatos, por um período de 24 horas. Durante a alimentação artificial, os carrapatos foram mantidos sob condição controlada de temperatura a 27-29°C. Os autores verificaram melhores resultados utilizando-se fêmeas não infectadas com *T. parva* e pré-alimentadas em coelhos por quatro ou cinco dias, submetidas à alimentação artificial com dietas a base de soro e plasma.

Através da técnica de tubos capilares, Willadsen et al. (1984) avaliaram a especificidade de fêmeas do carrapato *R. microplus* alimentando-as com sangue de bovinos, coelhos, ratos e porcos da Índia. Os carrapatos foram previamente alimentados em bovinos até o dia anterior ao término do ingurgitamento, quando apresentavam peso entre 40 e 50mg. O dispositivo de alimentação foi constituído por uma lâmina de vidro, onde carrapatos com a face ventral voltada para cima foram fixados com auxílio de fita adesiva dupla face. Utilizaram-se capilares com diâmetro externo de $0,25 \pm 0,035\text{mm}$ e diâmetro interno de $0,20 \pm 0,025\text{mm}$, confeccionados a partir de pipetas Pasteur. Os capilares preenchidos com 0,5microlitros de sangue heparinizado das quatro espécies avaliadas foram posicionados sobre o hipostômio dos carrapatos deixando-se de fora as quelíceras e os palpos. Estes foram mantidos com uma angulação aproximada de 45°, apoiados em um bloco de massa para modelar depositada sobre a mesma lâmina de microscopia onde se encontravam os carrapatos. A alimentação *in vitro* das fêmeas de *R. microplus* ocorreu em ambiente controlado, a temperatura de $37 \pm 1^\circ\text{C}$ “overnight”. Os autores utilizaram a determinação do ganho de peso e a avaliação dos aspectos biológicos dos carrapatos como critérios para verificar a eficiência do sistema de alimentação artificial. Verificou-se que independente do tipo de sangue, os carrapatos conseguiram se alimentar, no entanto, quando se empregou sangue de animais de laboratório os carrapatos apresentaram ganho de peso significativamente inferior. Após alimentação artificial com sangue bovino, os carrapatos com peso médio inicial de 45,5mg, chegaram a um peso médio final de 189,8mg. A alimentação artificial não provocou efeitos deletérios nos aspectos biológicos de fêmeas de *R. microplus*.

Com o objetivo de avaliar o efeito do soro de coelhos e bovinos submetidos a múltiplas infestações por carrapatos, Losel et al. (1993) realizaram um ensaio de alimentação *in vitro* com fêmeas de *R. appendiculatus*. Carrapatos previamente alimentados em coelhos por seis dias, com peso inicial de 35 a 70mg foram alimentados por meio de tubos capilares por um período de 18 horas, em ambiente com temperatura de $28 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa do ar de 98%. A determinação da ingestão dos soros foi garantida pela pesagem dos carrapatos no início e ao final da alimentação com os capilares. Os carrapatos alimentados com soro proveniente de coelhos após a segunda infestação apresentaram ganho de peso três vezes menor que aqueles alimentados com soro dos mesmos coelhos antes da primeira infestação. Em contraste, quando se utilizou soro de bovino não foi verificada diferença significativa no ganho de peso dos carrapatos alimentados com soro de animais antes e após as infestações. Os autores concluíram que, em coelhos, a resposta imune é induzida pelo contato prévio com os carrapatos.

No Brasil, o aperfeiçoamento da técnica de alimentação artificial por meio de tubos capilares tem apresentado desempenho relevante (Figura 1), como observado em estudos

envolvendo as principais espécies de carrapatos ixodídeos do país (RANGEL, 2008; RANGEL et al., 2008; CUNHA et al., 2010; SAKAI, 2010; ABEL et al., em análise).

No estudo sobre a alimentação artificial de fêmeas parcialmente ingurgitadas de *R. microplus* Rangel (2008) objetivou completar o ingurgitamento *in vitro* dos carrapatos a partir da técnica de tubos capilares, além de verificar a influência da técnica, nos aspectos biológicos da fase não-parasitária desta espécie. Fêmeas pesando entre 40,6 e 69,7mg foram separadas em quatro grupos de peso homogêneo e fixadas em bandejas de poliestireno expandido, com auxílio de fita adesiva dupla face. Para alimentação artificial, tubos capilares contendo sangue citratado bovino foram posicionados sobre o aparelho bucal dos carrapatos. Os grupos foram alimentados por seis, 12, 24 e 36 horas, sendo mantidos em estufa, à temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade superior a 80%. Durante a alimentação artificial, realizou-se a troca dos capilares a cada 30 minutos. Após o término dos períodos de alimentação estabelecidos, os carrapatos foram pesados para verificação da ingestão de sangue e incubados nas mesmas condições de temperatura e umidade descritas acima, para acompanhamento dos aspectos biológicos. A relação entre o peso das fêmeas e o período de exposição aos capilares mostrou acréscimo no ganho de peso das fêmeas à medida que se aumentou o tempo de alimentação artificial. Partindo de um peso médio inicial de 52,17mg os carrapatos alimentados por meio de tubos capilares, alcançaram um peso médio final de 131,64mg, após 36 horas de exposição aos capilares. Neste período de alimentação fêmeas de *R. microplus* atingiram 63,64% do peso médio observado nos carrapatos do grupo controle. Embora as fêmeas alimentadas artificialmente por meio de tubos capilares não tenham atingido ingurgitamento total, os resultados apresentados demonstraram que a técnica não apresentou efeito deletério sobre os aspectos biológicos da espécie.

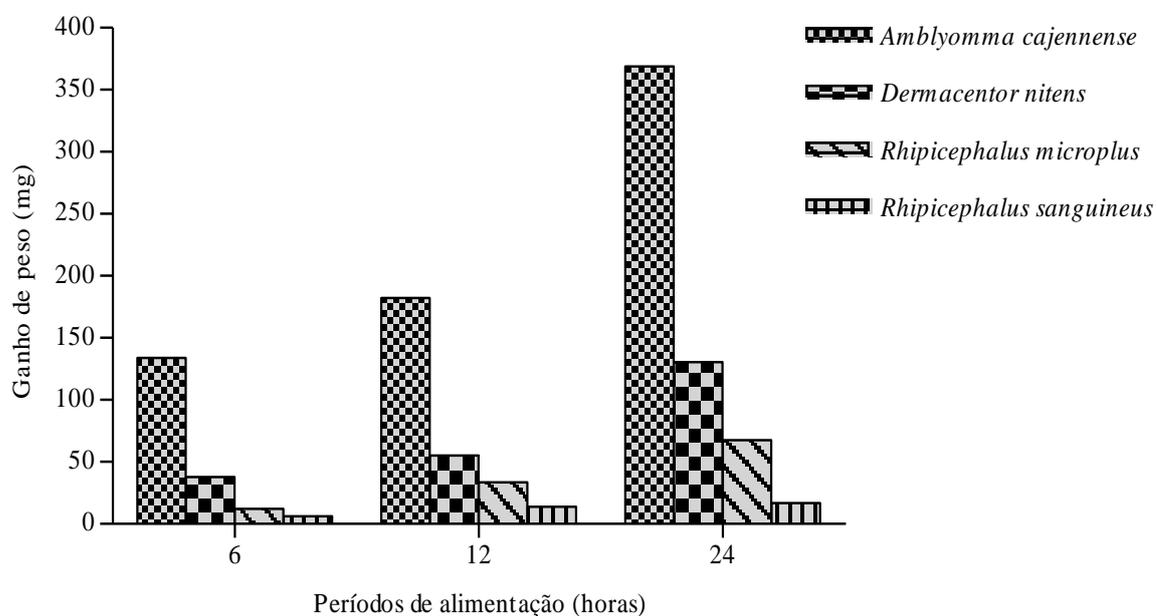


Figura 1. Ganho médio de peso dos principais carrapatos de animais domésticos após os períodos de seis, 12 e 24 horas de alimentação artificial por meio de tubos capilares. (Dados compilados de RANGEL, 2008; RANGEL et al., 2008; SAKAI, 2010; ABEL et al., em análise).

A alimentação artificial de fêmeas parcialmente ingurgitadas de *Dermacentor nitens* (Neumann, 1897) provenientes de equinos naturalmente infestados foi objeto do estudo realizado por Rangel et al. (2008). Os autores verificaram a influência da técnica de tubos capilares sobre o ganho de peso e os aspectos biológicos da espécie. Os carrapatos foram coletados, pesados, examinados quanto à integridade do aparelho bucal. O experimento foi dividido em duas etapas, a primeira utilizando-se carrapatos com faixa de peso inicial de 40 a 60mg e a segunda de 61 a 100mg. O sistema de alimentação por meio de tubos capilares foi conduzido conforme descrito por Abel (2004), com modificações. Os carrapatos foram fixados em bandejas de poliestireno expandido com a face ventral voltada para cima, com auxílio de fita adesiva dupla face. Para cada faixa foram formados quatro grupos de peso homogêneo, alimentados nos períodos de seis, 12, 24 e 36 horas por meio de tubos capilares contendo sangue citratado bovino. Durante o período de alimentação artificial, os capilares foram trocados a cada intervalo de 60 minutos, e os grupos mantidos a temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa superior a 80%. Ao término dos referidos tempos de exposição, as fêmeas foram pesadas para verificação da ingestão de sangue e fixadas em placas de Petri para análise dos aspectos biológicos. O ganho de peso dos carrapatos foi crescente à medida que se aumentou o tempo de exposição aos capilares, observando-se diferença estatística a partir de 24 horas de alimentação nas duas faixas de peso estudadas. Os grupos de carrapatos com peso de 61 a 100mg apresentaram maior ganho de peso em todos os períodos de alimentação artificial em relação aos grupos pesando entre 40 e 60mg. Verificou-se que carrapatos com peso inicial de 61 a 100mg atingiram ingurgitamento dentro da faixa normal para a espécie, após 24 horas de exposição aos capilares. Os carrapatos alimentados artificialmente por períodos mais prolongados apresentaram aspectos da fase não-parasitária próximos aos observados em condições de laboratório para essa espécie.

Sakai (2010) utilizou a técnica de tubos capilares para alimentar fêmeas de *Rhipicephalus sanguineus*, parcialmente ingurgitadas em coelhos e cães, com o objetivo de avaliar o ganho de peso dos carrapatos e a influência da técnica nos aspectos biológicos da fase não parasitária desta espécie. Inicialmente realizou-se uma série de experimentos para determinar as faixas de peso com melhor ganho de peso após 24 horas de exposição aos capilares. Em seguida, avaliou-se o comportamento alimentar dos carrapatos nos períodos de seis, 12, 24, 36 e 42 horas. Para alimentação artificial, fêmeas de *R. sanguineus* foram fixadas com a face ventral voltada para cima em bandejas de poliestireno expandido com auxílio de fita adesiva dupla face. Tubos capilares contendo sangue citratado de cão foram posicionados sobre o aparelho bucal dos carrapatos. O dispositivo de alimentação foi mantido a temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa do ar superior a 80%. Após alimentação artificial, os carrapatos foram pesados para avaliação do ganho de peso, fixados em placas de Petri e mantidos sob as mesmas condições controladas de temperatura e umidade citadas anteriormente, para acompanhamento dos aspectos biológicos. A autora não observou diferença estatística na ingestão de sangue das diferentes faixas de peso dos carrapatos previamente alimentados em coelhos, entretanto, nos carrapatos oriundos de infestação natural de cães observou-se maior tendência a ingestão de sangue nos espécimes com faixa de peso de 20 a 50mg. Independente da origem, nos carrapatos expostos aos capilares por períodos mais prolongados verificou-se maior ingestão de sangue. Embora fêmeas de *R. sanguineus* não tenham apresentado ingurgitamento total, a técnica de alimentação em tubos capilares não desencadeou efeitos deletérios sobre os aspectos biológicos da fase não parasitária dessa espécie.

Estudo semelhante foi desenvolvido por Cunha et al. (2010), onde fêmeas parcialmente ingurgitadas de *R. sanguineus* previamente alimentadas por sete dias em coelhos foram separadas em quatro grupos de peso homogêneo e fixadas em bandejas de poliestireno

expandido, com a face ventral voltada para cima usando fita adesiva dupla face. Tubos capilares preenchidos com sangue citratado de cães foram dispostos sobre o aparelho bucal dos carrapatos, nos períodos de duas, seis, 12 e 24 horas. Realizou-se a substituição dos tubos capilares a cada 30 minutos para evitar a obstrução do fluxo sanguíneo. Durante a alimentação artificial, os carrapatos permaneceram a temperatura de 27°C e umidade relativa do ar de 85±5%. Ao término dos períodos de alimentação, os carrapatos foram novamente pesados para avaliação do ganho de peso e incubados sob as mesmas condições de temperatura e umidade mencionadas acima. O ganho de peso dos grupos apresentou correlação positiva com o tempo de exposição dos carrapatos aos capilares. Não foi possível a obtenção de ingurgitamento completo dos espécimes, no entanto, verificou-se que os carrapatos alimentados *in vitro* foram capazes de estabelecer uma nova geração. Os autores concluíram que a técnica de alimentação artificial, por meio de tubos capilares, foi de fácil execução e eficiente para ingestão de sangue por carrapatos da espécie *R. sanguineus*. Além disso, enfatizaram o potencial da técnica para o desenvolvimento de estudos que visem à transmissão de patógenos.

Carrapatos da espécie *A. cajennense*, foram utilizados por Abel et al. (em análise) no aprimoramento do sistema de alimentação artificial por meio de tubos capilares. Neste estudo, carrapatos com 45 dias de jejum foram previamente alimentados em coelhos por seis dias. Na fase preparatória da alimentação artificial, os carrapatos foram pesados e separados nas faixas de peso de 44,4-108 e 108,2-246mg. Para cada faixa foram formados três grupos de peso homogêneo, alimentados nos períodos de seis, 12 e 24 horas por meio de tubos capilares contendo sangue citratado bovino. O dispositivo de alimentação foi mantido a temperatura de 27°C e umidade relativa do ar acima de 80%. Observações periódicas foram conduzidas a fim de realizar a troca dos capilares que se apresentavam vazios. Finalizados os períodos de alimentação artificial os carrapatos foram pesados e incubados sob as mesmas condições descritas anteriormente para o acompanhamento dos aspectos biológicos. Os autores verificaram correlação positiva entre o ganho de peso e os períodos de exposição dos carrapatos aos capilares. Os grupos de carrapatos com peso de 108,2 a 246mg apresentaram maior ganho de peso em todos os períodos de alimentação artificial em relação aos grupos pesando entre 44,4 e 108mg. Verificou-se que carrapatos com peso inicial de 108,2 a 246mg atingiram ingurgitamento dentro da faixa normal para a espécie, após 24 horas de exposição aos capilares. Os carrapatos alimentados artificialmente por períodos mais prolongados apresentaram aspectos da fase não-parasitária próximos aos observados em condições de laboratório para essa espécie.

2.2.2 Aplicações da técnica

A técnica de alimentação artificial por meio de tubos capilares tem sido aplicada em estudos sobre as propriedades antigênicas e do conteúdo de prostaglandinas E2 da saliva dos carrapatos (BENAVIDES; WALKER, 1992; INOKUMA et al., 1994). Almazán et al. (2005) alimentaram artificialmente o carrapato *Ixodes scapularis* por meio de tubos capilares para a detecção de antígenos capazes de induzir uma resposta vacinal a várias espécies de carrapatos. No entanto, uma maior aplicabilidade desta técnica está associada a estudos envolvendo a transmissão *in vitro* de agentes patogênicos.

2.2.2.1 Transmissão *in vitro* de patógenos

A partir de modificações na técnica de alimentação artificial proposta por Chabaud (1950), Burgdorfer (1957) desenvolveu uma metodologia para infecção *in vitro* dos carrapatos *Dermacentor andersoni* por *Leptospira pomona* e o vírus da raiva, e *Amblyomma maculatum* (Koch, 1844) por *Leptospira pomona*. Os carrapatos foram fixados sobre uma camada de massa de modelar depositada em uma lâmina de microscopia e, imobilizados pressionando-se a massa de modelar sobre os três últimos pares de pernas. Tubos capilares de vidro, preenchidos com as suspensões infecciosas foram depositados sobre o hipostômio e as quelíceras dos carrapatos. Blocos formados por massa de modelar foram utilizados para fornecer a angulação necessária entre os capilares e o dispositivo onde estavam fixados os carrapatos. Na transmissão de *L. pomona*, carrapatos das duas espécies e de ambos os sexos foram capazes de ingerir, via capilar, 0,01 a 0,03mL de uma suspensão dessa bactéria em meio Verwoort, por um período máximo entre quatro e seis horas, em temperatura ambiente. O processo de alimentação foi raramente observado após esse período, a menos que suspensões frescas fossem oferecidas. Nenhum dos carrapatos alimentados artificialmente atingiram o ingurgitamento. Após o período de exposição aos capilares, os carrapatos foram acondicionados em jarra dessecadoras, por 14 dias e, em seguida, infestados em porcos da Índia para avaliar a capacidade de transmissão do patógeno. Todos os carrapatos completaram o ingurgitamento e várias cobaias foram infectadas com *L. pomona*. O mesmo autor obteve sucesso no estudo da infecção *in vitro* do carrapato *D. andersoni* com o vírus da raiva. Os carrapatos foram alimentados com suspensão de cérebros de camundongos infectados e sangue de coelho desfibrinado.

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. Realizou tentativas de alimentar *in vitro* larvas, ninfas e adultos em jejum e parcialmente alimentados. Os carrapatos foram fixados pela face dorsal e, em seguida, tubos capilares graduados, contendo uma suspensão de cérebro de rato diluída em sangue deste mesmo animal foram dispostos sobre o aparelho bucal dos artrópodes. O autor não teve como objetivo a obtenção de carrapatos completamente ingurgitados. Portanto, a ingestão da dieta foi considerada suficiente quando se observou a ingestão de 0,25-0,5µL nos carrapatos adultos e 0,1-0,2 µL nas ninfas. Foi possível alimentar por meio de tubos capilares carrapatos adultos e ninfas, no entanto, a alimentação das larvas pareceu ser impraticável, visto que nenhum dos espécimes avaliados foi capaz de ingerir a suspensão. A utilização da técnica de alimentação artificial permitiu quantificar a dose da suspensão ingerida e observar a presença do vírus na saliva e fezes dos carrapatos.

Purnell (1970) e Walker 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 e 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. O período de alimentação artificial variou de 20 a 30 horas, de acordo com as etapas do estudo. Após a muda, os carrapatos infectados artificialmente foram infestados em bovinos susceptíveis para avaliar a eficiência na transmissão de *T. parva*, o que também serviu de referencial para demonstrar o sucesso da técnica de alimentação artificial. Todos os bovinos infestados com

ninfas inicialmente alimentadas em coelhos manifestaram sintomatologia. No entanto, os carrapatos submetidos aos capilares ainda em jejum não foram competentes na transmissão de *T. parva*.

Walker 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. Após a alimentação, as ninfas foram incubadas nas mesmas condições de temperatura e umidade acima mencionadas, para realização da muda. A confirmação da infecção ocorreu através do exame das glândulas salivares e infestação dos carrapatos em bovinos susceptíveis. A glândula salivar de apenas um carrapato foi positiva e o bovino infestado manifestou sintomatologia clássica da doença.

Na década de 90 a técnica de tubos capilares foi utilizada para infectar os carrapatos *Ixodes ricinus* (Linnaeus, 1758), *Ixodes hexagonus* (Leach, 1815), *Ixodes loricatus* (Neumann, 1899), *Ixodes pacificus* (Cooley e Kohls, 1943) e *Ixodes scapularis* (Say, 1821), com *Borrelia burgdorferi* (Johnson et al., 1984) (GERN et al., 1990, 1991; HU et al., 1992; TOUTOUNGI; GERN, 1993; HU et al., 1996).

Broadwater et al. (2002) realizaram um estudo semelhante com o objetivo de infectar *in vitro* os carrapatos *I. scapularis* e *Dermacentor variabilis* (Say, 1821) com *B. burgdorferi*. Os autores inovaram o dispositivo de alimentação artificial utilizando duas lâminas de microscopia unidas com fita adesiva dupla face, de tal forma que a lâmina superior permanecesse fixada seis milímetros de distância da borda lateral da lâmina inferior. Os carrapatos foram imobilizados com a face ventral voltada para cima sobre a lâmina superior com o uso de fita adesiva dupla face. Em seguida, o conjunto formado pelas lâminas contendo os carrapatos imobilizados foi acondicionado em placa de Petri. Tubos capilares com capacidade de cinco microlitros foram preenchidos e posicionados sobre o aparelho bucal dos carrapatos. Na borda da placa fixou-se massa de modelar para evitar o deslocamento dos capilares. Durante o processo de alimentação, o dispositivo foi inserido em câmara úmida selada, mantida a temperatura controlada de 37°C. Após o período estabelecido para a alimentação, os carrapatos que apresentaram capilares deslocados do aparelho bucal foram descartados. A ingestão da solução foi determinada com a utilização de aminoácidos marcados, sendo observado o consumo médio de $0,03 \pm 0,018 \mu\text{L}$. Para avaliação do período mínimo de alimentação necessário para promover a infecção, ninfas em jejum de *I. scapularis* foram expostas aos capilares por 15, 30, 60, 150 e 780 minutos. A alimentação capilar pelo período mínimo de 15 minutos resultou na infecção de 37,5% das ninfas. Além disso, períodos de alimentação superiores a 150 minutos não aumentaram a prevalência da infecção. Ninfas parcialmente alimentadas submetidas à infecção capilar por quatro horas apresentaram prevalência de infecção semelhante. As ninfas em jejum e parcialmente ingurgitadas infectadas *in vitro* mantiveram a infecção por pelo menos dez dias e quando infestadas em camundongos foram capazes de transmitir a infecção. Ao analisar a glândula salivar e o intestino de ninfas infectadas *in vitro*, os autores verificaram sucesso na infecção em apenas 29% dos intestinos e 14% das glândulas. Fêmeas parcialmente ingurgitadas em coelhos foram alimentadas com solução de espiroquetas, seguindo a metodologia descrita anteriormente, sendo encontrada infecção apenas em carrapatos *I. scapularis*.

Na demonstração da infecção *in vitro* de *I. ricinus* com diferentes cepas e clones de *Borrelia afzelii* (Canica et al., 1994) e *Borrelia garinii* (Baranton et al., 1992), 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 e 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. O sangue coletado em tubos contendo heparina como anticoagulante foi, em seguida, diluído em sangue bovino sabidamente não parasitado. Desta forma, os autores obtiveram três amostras com diferentes graus de parasitemia 2×10^5 , 2×10^4 e 2×10^3 eritrócitos infectados/mL. Fêmeas do carrapato foram previamente alimentadas em bovinos sendo coletadas quando atingiram entre quatro e seis milímetros de comprimento. Seis carrapatos foram preparados para cada concentração de eritrócitos infectados. Tubos capilares contendo 500µL de sangue foram posicionados sobre aparelho bucal dos carrapatos, que permaneceram incubados a uma temperatura de 35°C, por um período de 18 horas. Após o término da alimentação com os capilares, os carrapatos passaram a ser incubados a 28°C e 90% de umidade relativa para realização de postura. A infecção das fêmeas de *R. microplus* por *B. bigemina*, foi determinada a partir do exame da hemolinfa dos carrapatos no quinto dia após a alimentação *in vitro* e por esfregaço das larvas no décimo dia após a eclosão. A reação em cadeia da polimerase (PCR) também foi utilizada para detectar fragmentos de DNA de *B. bigemina* nos carrapatos. Os autores relataram que apenas nos carrapatos alimentados com sangue nas concentrações de 2×10^5 e 2×10^4 eritrócitos infectados/mL, foi possível detectar a infecção por *B. bigemina*.

Rechav et al. (1999) e Macaluso et al. (2001) empregaram a mesma técnica para transmitir *in vitro Ehrlichia chaffeensis* (Anderson et al., 1992) e outras riquetsias como *Rickettsia montana* (Lackman et al., 1965) e *Rickettsia rhipicephali* (Weiss e Moulder, 1988).

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. Metodologia semelhante foi desenvolvida com as ninfas, onde os períodos de alimentação variaram de duas a quatro horas. Os autores verificaram que 70% das ninfas e fêmeas alimentadas artificialmente ganharam peso. E ainda, detectaram a persistência da infecção por *E. chaffeensis* nos carrapatos por pelo menos sete dias.

Macaluso et al. (2001) infectaram fêmeas parcialmente ingurgitadas do carrapato *D. variabilis* com *Rickettsia rickettsii* (Brumpt, 1922) e *R. rhipicephali* cultivadas *in vitro*. Os autores avaliaram ainda o volume da solução ingerida pelos carrapatos, a disseminação das riquetsias do intestino para outros órgãos dos carrapatos e a ocorrência de transmissão transovariana. Para quantificar o volume médio da solução ingerida pelos carrapatos, utilizou-se aminoácido marcado diluído em meio BSK, suplementado com soro de coelho. Fêmeas de *D. variabilis*, previamente alimentadas em coelhos foram lavadas, pesadas e fixadas com a

face ventral voltada para cima em placa de Petri, com o auxílio de fita adesiva dupla face. Os tubos capilares foram posicionados sobre o aparelho bucal dos carrapatos e imobilizados a partir da inclusão de massa de modelar sobre a borda da placa. Após o período de 24 horas, a temperatura de 27°C e umidade relativa de 92%, os carrapatos ingeriram volume médio de $1,35 \pm 2,15\mu\text{L}$ da solução. No entanto, a ingestão da solução não apresentou correlação positiva com o ganho de peso durante a alimentação. Nos experimentos envolvendo a transmissão de *R. rickettsii* e *R. rhipicephali* para fêmeas parcialmente ingurgitadas de *D. variabilis*, os autores utilizaram o mesmo dispositivo de alimentação artificial acima citado, porém o período de exposição aos capilares foi reduzido para 12 horas. Ao término da alimentação *in vitro*, os carrapatos foram infestados em coelhos para completarem o ingurgitamento. Foi observada a infecção por riquetsias no intestino, hemolinfa e glândula salivar de 40% dos carrapatos. A eficiência da transmissão transovariana de riquetsias em carrapatos foi verificada através da PCR em 85% e 69% dos carrapatos infectados por *R. rickettsii* e *R. rhipicephali*, respectivamente. Enquanto que pela reação de Imunofluorescência Indireta 100% das amostras de ovos testadas foram positivas.

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). Antes de serem submetidos aos capilares, os carrapatos foram pré-alimentados em ovelhas por três dias. Neste estudo, os autores testaram como dietas sangue bovino e cultivos de células de carrapatos, ambos infectados com *A. marginale*. O processo de alimentação teve duração de quatro dias e, portanto, trocas diárias dos capilares foram necessárias para garantir o acesso dos carrapatos a dietas frescas. A confirmação da ingestão das dietas foi feita a partir da utilização de microesferas fluorescentes adicionadas as amostras de sangue e cultivo celular. Além disso, a visualização da diminuição da coluna das dietas contidas nos capilares constituiu outra forma para determinar o sucesso da alimentação artificial. Ao comparar a infectividade de *A. marginale* em *D. variabilis* machos alimentados *in vitro* e em bovinos, os autores observaram diferenças. A infecção intestinal dos carrapatos alimentados por meio de tubos capilares somente foi detectada na PCR quando o sangue utilizado apresentou alta riquetsemia. Enquanto, os carrapatos alimentados em bovinos foram positivos para a PCR independentemente do grau de parasitemia no momento da alimentação. Nenhum dos carrapatos alimentados, por meio de tubos capilares, desenvolveram infecção da glândula salivar. Apesar das diferenças verificadas na infecção de carrapatos, os autores ressaltaram que este sistema de alimentação artificial pode apresentar uso potencial para identificar aspectos de interações patógeno-vetor que não são reconhecidas nos carrapatos alimentados naturalmente.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local de Execução

O experimento foi realizado no Laboratório de Doenças Parasitárias do Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública (DESP) do Instituto de Veterinária (IV) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), localizado no prédio do Projeto Sanidade Animal - convênio UFRRJ/Embrapa, situado no município de Seropédica, Rio de Janeiro.

3.2 Animais

Para obtenção de fêmeas *Rhipicephalus microplus* parcialmente ingurgitadas foi utilizado um bezerro, com idade inferior a 12 meses, mestiço (Holandês x Zebu), em boa condição orgânica e clinicamente saudável. O bezerro foi gentilmente cedido pela Dra. Rosane Scatamburlo Lizieire Fajardo, pesquisadora da Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro, Pesagro-Rio.

O bezerro foi considerado livre de infecção por *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* e *Anaplasma marginale* a partir dos resultados negativos observados na Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), realizada no Laboratório de Biologia Molecular Multiusuário, do Departamento de Parasitologia Animal (DPA), IV/UFRRJ. Durante todo o período do experimento, o bovino foi mantido em baia individual pertencente ao Laboratório de Doenças Parasitárias, medindo 2,5 x 3m, com comedouro e bebedouro individuais, onde recebeu feno Coast Cross, ração peletizada e água *ad libitum*. Diariamente foi realizada limpeza da baia para remoção de sobras de ração, fezes e urina.

3.3 Colônia de *Rhipicephalus microplus*

Os carrapatos utilizados neste estudo pertenciam a uma colônia mantida no Laboratório de Doenças Parasitárias, originada de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* coletadas em bovinos livres de acaricidas e naturalmente infestados, do Sistema Integrado de Produção Animal (SIPA) – convênio Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária e UFRRJ, ambas localizadas no município de Seropédica, Rio de Janeiro.

No Laboratório de Doenças Parasitárias, as fêmeas foram lavadas com água destilada e secas com papel filtro. A identificação dos carrapatos foi realizada de acordo com a chave dicotômica de suas características morfológicas (GUGLIELMONE et al., 2006). Para realização das posturas, as fêmeas foram fixadas em placas de Petri e mantidas em câmara climatizada com Demanda Biológica de Oxigênio (BOD), à temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa do ar de $80 \pm 5\%$. Os carrapatos foram considerados livres de infecção por *B. bovis* e *B. bigemina* e *A. marginale* a partir dos resultados negativos observados na PCR, realizada no Laboratório de Biologia Molecular Multiusuário.

Ao final do terceiro dia de postura, os ovos foram coletados e separados com auxílio de balança analítica (Shimadzu, AY 220) em alíquotas de um grama. Em seguida, foram acondicionados em seringas descartáveis adaptadas, devidamente identificadas e vedadas com algodão hidrófilo, nas mesmas condições controladas de temperatura e umidade anteriormente citadas.

Observações diárias foram realizadas para estabelecer o dia de início da eclosão das larvas, o que tornou possível determinar a idade das larvas utilizadas para as infestações experimentais.

3.4 Infestações Experimentais e Obtenção das Fêmeas Parcialmente Ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*

Nas infestações foram utilizadas larvas oriundas de um grama de ovos ou aproximadamente 20.000 larvas (SUTHERST et al.,1978), com 15 dias de eclodidas. As larvas foram distribuídas ao longo da linha dorso-lombar do animal, segundo Riek (1954). Foi respeitado um intervalo de 45 dias entre as infestações experimentais.

No 20º dia após a infestação experimental do bovino realizou-se a coleta das fêmeas parcialmente ingurgitadas. Este procedimento foi realizado baseado em Gonzales et al. (1974), os quais observaram que no Brasil, o dia modal para o ingurgitamento e a queda das fêmeas de *R. microplus* ocorrem no 21º dia após a infestação. Desta forma, a formação dos grupos experimentais a partir de fêmeas parcialmente ingurgitadas coletadas no 20º dia após a infestação experimental do bovino, aumentou as chances de que as fêmeas fossem removidas do hospedeiro em estágio final de ingurgitamento e antes do desprendimento natural.

No laboratório, os carrapatos foram lavados com água destilada, secos, examinados quanto à integridade do aparelho bucal com auxílio de lupa estereoscópica (Heerbrugg, M5-48490) e pesados em balança analítica.

3.5 Amostras de Sangue

O sangue utilizado nos experimentos de alimentação artificial das fêmeas parcialmente ingurgitadas foi coletado assepticamente da veia jugular de um bovino. A escolha do anticoagulante, assim como sua concentração, variou de acordo com o objetivo de cada experimento. Em geral, trabalhou-se com sangue bovino total desfibrinado ou diluído em citrato de sódio ou heparina sódica. As amostras de sangue foram conservadas sob refrigeração a 4 °C e aquecidas em banho-maria a 37°C, momentos antes do início da alimentação artificial dos carrapatos.

3.6 Execução da Técnica de Alimentação Artificial

A técnica de alimentação artificial por meio de tubos capilares foi executada conforme descrito por Rangel (2008), com modificações relacionadas à imobilização das pernas dos carrapatos e dos tubos capilares.

3.6.1 Preparação das Unidades de Alimentação

Bandejas de poliestireno expandido (24cm x 12cm) foram devidamente preparadas para o início da alimentação artificial. Uma tira de papel numerada foi fixada na bandeja para facilitar a identificação dos carrapatos e, para promover a fixação dos carrapatos e dos capilares, fixou-se fita adesiva dupla face sobre a tira de papel e na borda da bandeja, respectivamente. Em seguida, com o auxílio de uma pinça oftalmológica, os carrapatos foram fixados com a região ventral voltada para cima e seus quatro pares de pernas imobilizados utilizando-se fita adesiva de papel crepado (Figura 2).

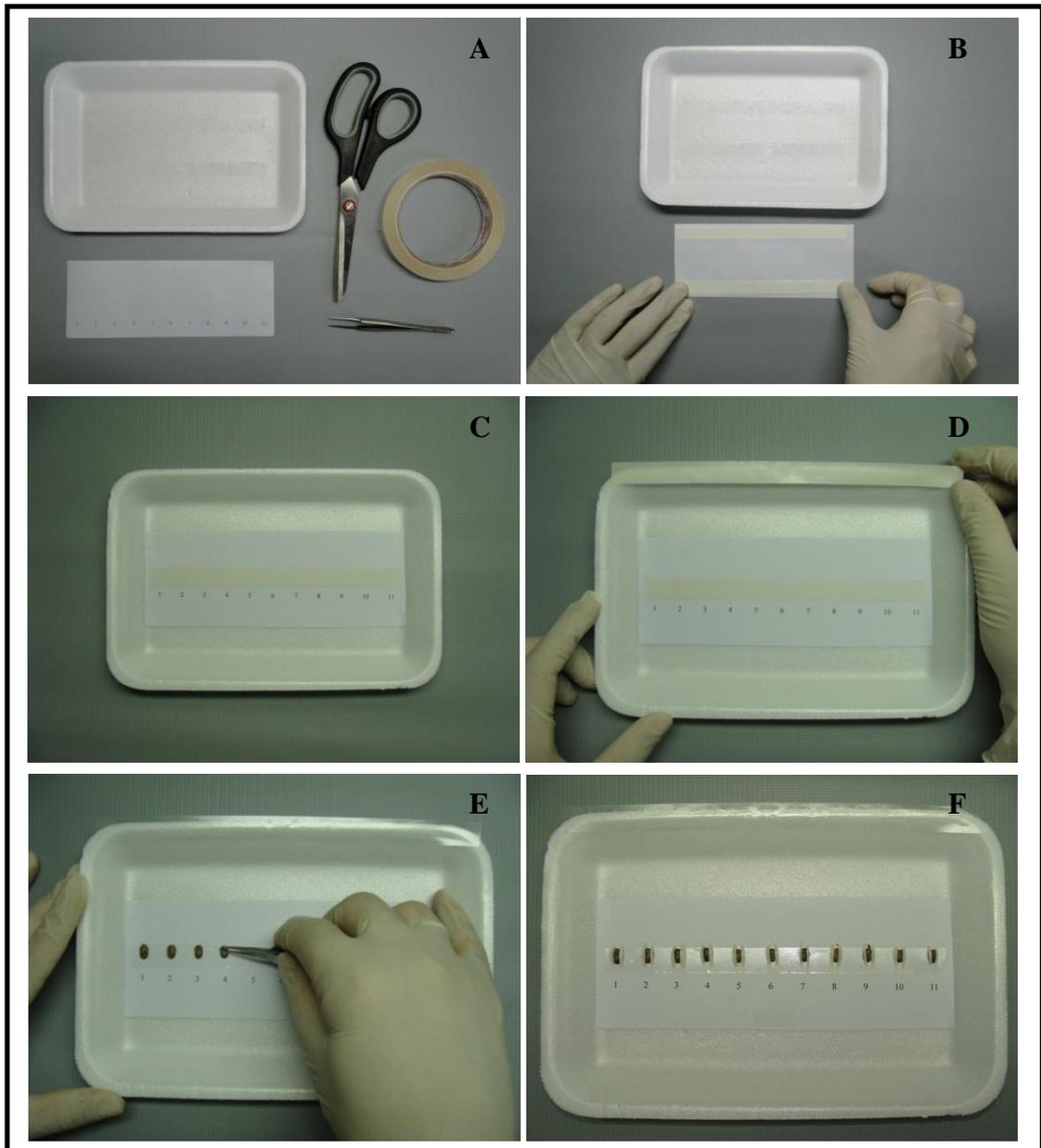


Figura 2. Preparação da unidade de alimentação artificial de fêmeas parcialmente ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*. A – Materiais necessários para preparação da bandeja; B – Fixação de fita adesiva dupla face no verso de uma tira de papel utilizada para a identificação dos carrapatos; C e D – Posicionamento do papel no centro da bandeja e posterior aplicação de fita adesiva dupla face; E – Fixação dos carrapatos na bandeja; F – Imobilização das pernas dos carrapatos com a utilização de fita adesiva de papel crepado.

3.6.2 Delineamento Experimental

Para a elucidação dos efeitos da faixa de peso inicial, do intervalo entre a coleta e o início da alimentação *in vitro*, bem como de diferentes dietas, temperaturas e dispositivos adaptados para a alimentação artificial de fêmeas parcialmente ingurgitadas de *R. microplus* foram realizados cinco experimentos. Em todos os experimentos o delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado.

No primeiro experimento foram formados cinco grupos experimentais, cada um constituído por 10 carrapatos, os quais foram agrupados de acordo com as faixas de peso iniciais de 10-39, 40-69, 70-99, 100-129 e 130-159mg. As faixas de peso dos grupos experimentais foram estabelecidas conforme Wharton e Utech (1970), os quais consideraram que, em condições naturais, as fêmeas parcialmente ingurgitadas de *R. microplus* pesavam entre 10 a 149mg. Utilizou-se dois grupos controle, o grupo A formado por fêmeas parcialmente ingurgitadas nas mesmas faixas de peso de cada grupo experimental utilizado para determinar a perda de peso dos carrapatos após 24 horas em jejum. Enquanto o grupo B constituído por fêmeas ingurgitadas alimentadas naturalmente sobre o bovino serviu como referência para estabelecer o grau de ingurgitamento alcançado pelos espécimes alimentados *in vitro*.

Para o segundo experimento, um total de 55 fêmeas com peso de 40 a 69mg foram separadas em cinco grupos de peso homogêneo, com 11 espécimes cada. Os carrapatos foram fixados em bandejas de poliestireno expandido e mantidos em estufa do tipo BOD à temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa de $80 \pm 5\%$. Os intervalos entre a coleta das fêmeas parcialmente ingurgitadas e o início de sua alimentação *in vitro* constituíram os tratamentos. Desta forma, cada intervalo de uma, três, seis, nove e 12 horas após a coleta correspondeu ao início da exposição aos capilares dos carrapatos em um dos grupos. Um grupo controle foi composto a partir de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* alimentadas naturalmente sobre o bovino, coletadas após queda natural.

Nos dois primeiros experimentos, os carrapatos foram alimentados com sangue citratado bovino por meio de tubos capilares de determinação de hematócrito (75mm x 1,0mm x 1,5mm), não heparinizados, os quais foram dispostos sobre os palpos e quelíceras dos carrapatos por um período de 24 horas (Figura 3). No decorrer deste período de alimentação, os capilares foram trocados a cada intervalo de 60 minutos e os grupos experimentais mantidos em estufa do tipo BOD, à temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa do ar de $80 \pm 5\%$.

No terceiro experimento foram formados cinco grupos experimentais de peso homogêneo, compostos por fêmeas parcialmente ingurgitadas com peso de 40 a 69mg, cada qual constituído por 11 espécimes, os quais foram alimentados com diferentes formas de apresentação de sangue bovino. As formas de apresentação avaliadas foram constituídas por sangue bovino total diluído no anticoagulante citrato de sódio, nas concentrações de um mililitro de citrato para 10 e para 20mL de sangue; sangue bovino total diluído em heparina sódica nas concentrações de três e 10,0 UI por mililitro de sangue; e de sangue total desfibrinado. Em todos os grupos, tubos capilares foram depositados sobre os palpos e as quelíceras dos carrapatos (Figura 3). No decorrer do período de 24 horas de alimentação artificial, os tubos capilares foram trocados a cada intervalo de 60 minutos e os grupos experimentais mantidos em estufa do tipo BOD, à temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa de $80 \pm 5\%$. O grupo controle foi composto a partir de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* alimentadas naturalmente sobre o bovino, coletadas após queda natural.

No quarto experimento foi avaliada a influência da temperatura sobre a alimentação artificial de fêmeas parcialmente ingurgitadas do carrapato *R. microplus*. Foram formados quatro grupos experimentais de peso homogêneo, cada qual constituído por 11 espécimes com peso de 40 a 69mg. Neste experimento, os carrapatos foram alimentados com sangue citratado bovino por meio de tubos capilares (Figura 3). Durante a alimentação *in vitro*, os tubos capilares foram substituídos a cada intervalo de 60 minutos e os carrapatos foram mantidos sob temperaturas de 32 e 37°C e umidade relativa de $80 \pm 5\%$, sendo avaliado, em cada faixa de temperatura, a alimentação nos períodos de 12 e 24 horas. O grupo controle foi composto a partir de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* alimentadas naturalmente sobre o bovino, coletadas após queda natural.

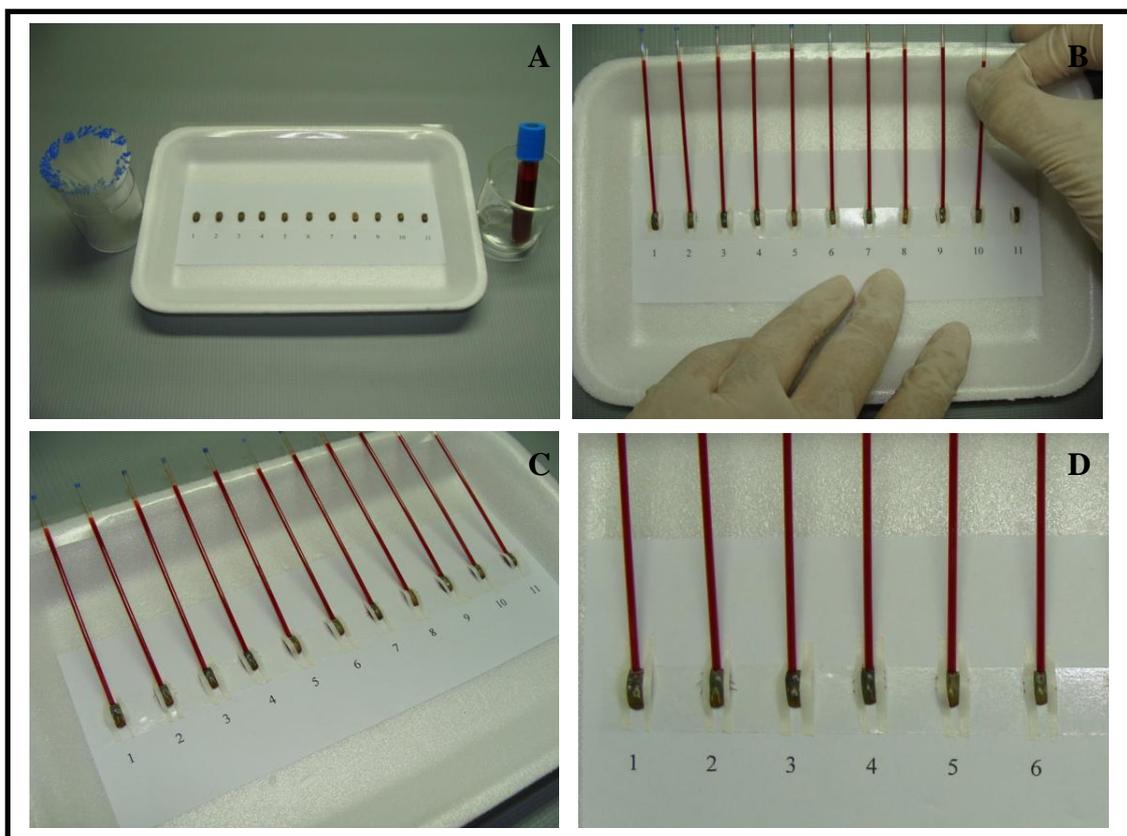


Figura 3. Alimentação artificial de fêmeas parcialmente ingurgitadas do carrapato *Rhipicephalus microplus*. A – Preparação do material para o preenchimento dos tubos capilares com sangue citratado bovino; B – Posicionamento dos tubos capilares sobre o aparelho bucal dos carrapatos; C e D – Espécimes durante o processo de alimentação artificial por meio de tubos capilares.

O quinto experimento foi realizado com o objetivo de avaliar o comportamento de fêmeas de *R. microplus* alimentadas artificialmente, por meio de tubos capilares e ponteiros plásticos (com capacidade de 1000 μ L, utilizadas para micropipetas automáticas). Dois grupos de 11 carrapatos com peso de 40 a 69mg foram selecionados e fixados em bandejas de poliestireno expandido, como descrito para os experimentos anteriores. Os tubos capilares, repletos de sangue citratado bovino, foram depositados sobre os palpos e quelíceras dos

carrapatos, sendo substituídos a cada intervalo de 60 minutos, por um período de 12 horas. As ponteiros plásticas foram posicionadas a extremidade de menor diâmetro sobre os palpos e quelíceras dos carrapatos e mantidas com uma angulação aproximada de 45°, apoiadas sobre um bloco de massa de modelar depositado na bandeja (Figura 4). Em seguida, as ponteiros foram preenchidas com meio mililitro de sangue citratado bovino. As fêmeas foram submetidas à alimentação artificial por um período de sete horas. Durante os períodos de alimentação, os carrapatos permaneceram em estufa do tipo BOD, à temperatura de $37 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa de $80 \pm 5\%$. O grupo controle foi composto a partir de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* composto a partir de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* alimentadas naturalmente sobre o bovino e coletadas após queda natural.

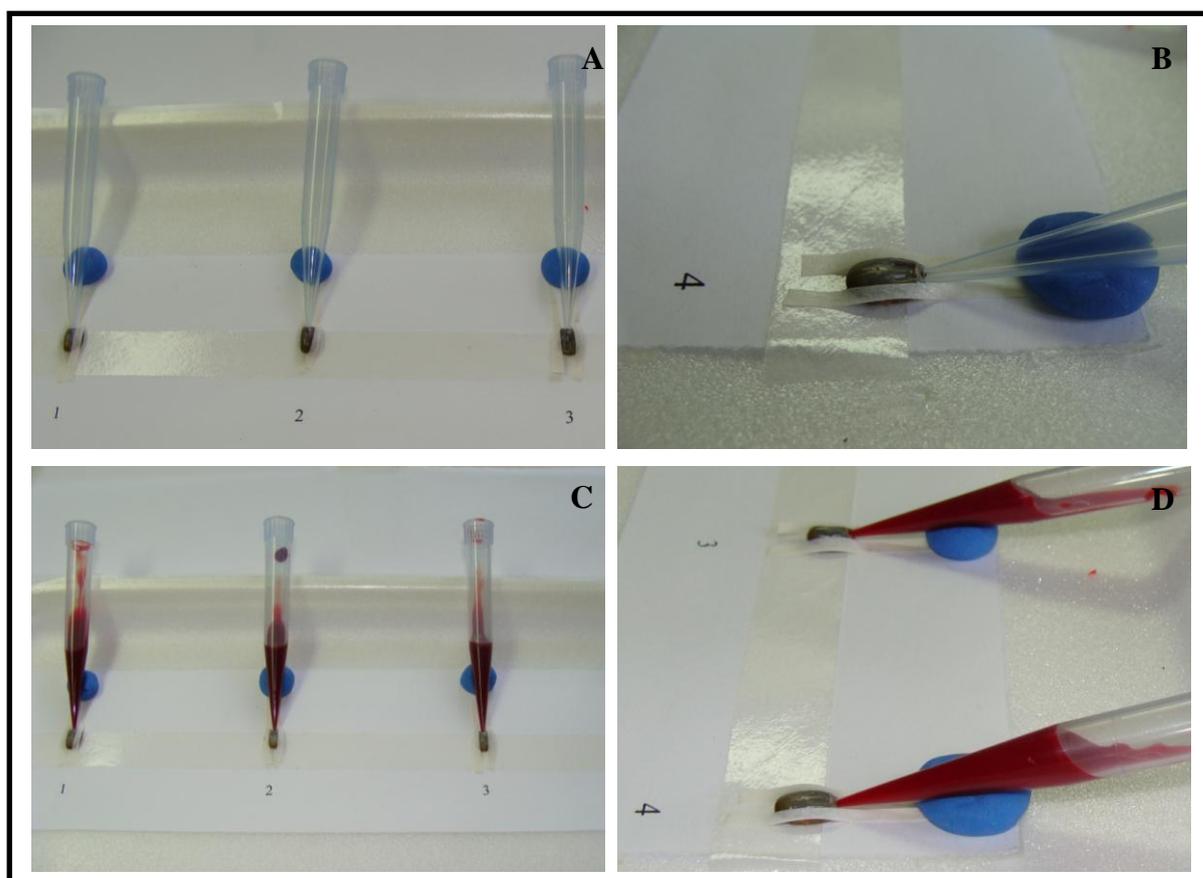


Figura 4. Alimentação artificial de fêmeas parcialmente ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* por meio de ponteiros plásticos. A e B – Fêmeas *R. microplus* fixadas em bandejas de poliestireno expandido com ponteiros plásticos apoiadas sobre blocos de massa de modelar e posicionadas sobre o hipostômio dos carrapatos; C e D – Ponteiros plásticos preenchidas com 0,5mL de sangue citratado bovino posicionadas sobre os palpos e as quelíceras dos carrapatos.

Em todos os experimentos, ao término dos períodos de alimentação *in vitro*, os carrapatos foram lavados em água destilada para remoção do sangue ressecado e restos de fita adesiva e pesados individualmente em balança analítica para avaliação do ganho de peso.

3.7 Aspectos Biológicos Analisados

Para avaliação dos aspectos biológicos, as fêmeas foram acondicionadas em placas de Petri, por fixação em posição dorsal com auxílio de fita adesiva e mantidas em estufa do tipo BOD, sob temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e $80 \pm 5\%$ de umidade relativa do ar.

Observações diárias foram realizadas para o correto registro dos aspectos biológicos da fase não-parasitária de fêmeas parcialmente ingurgitadas de *R. microplus* alimentadas artificialmente e dos grupos controle.

A partir da metodologia empregada foi possível a determinação, para cada grupo experimental, dos seguintes parâmetros: peso das fêmeas ingurgitadas (média dos pesos das fêmeas de cada grupo), período de pré-postura (período em dias entre o término da alimentação das fêmeas e o primeiro dia da postura.), peso da postura (somatório dos pesos das posturas diárias de cada fêmea), índices de produção de ovos e eficiência reprodutiva (calculados segundo BENNETT, 1974 e MELÉNDEZ et al., 1998, respectivamente) e percentual de eclosão (estimativa visual da quantidade de larvas eclodidas em relação à massa total de ovos de cada fêmea).

3.8 Análise Estatística

Em todos os experimentos, para a comparação dos valores relativos ao peso das fêmeas antes e após a alimentação artificial, em um mesmo grupo experimental, foi utilizado o teste t de Student, a nível de 5% de significância.

Na análise dos experimentos relacionados à alimentação artificial de fêmeas parcialmente ingurgitada de *R. microplus*, foram utilizados os testes de Duncan, quando o número de tratamentos foi superior a quatro (efeito do peso inicial, do intervalo entre a coleta e o início da alimentação *in vitro* e de diferentes dietas) e o t de Student, quando avaliados até quatro tratamentos (efeito da temperatura e dos dispositivos de alimentação). As médias foram consideradas significativamente distintas quando $p < 0,05$.

No primeiro experimento, verificou-se a tendência e a força da associação da variável independente (faixa de peso) com as variáveis dependentes (peso adquirido, perda de peso e percentual de peso atribuído a ingestão de sangue) através da regressão linear.

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, mesmo após transformação logarítmica, a estratégia de análise foi não paramétrica, a partir do teste de Kruskal-Wallis a nível de significância de 5%.

Para análise dos resultados utilizou-se o programa ASSISTAT Versão 7.6 beta (2011) e a escolha dos testes estatísticos foi realizada conforme Sampaio (2002).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Técnicas de Alimentação *in vitro* de Fêmeas Parcialmente Ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*

As técnicas de alimentação artificial desenvolvidas neste estudo, quando aplicadas para fêmeas parcialmente ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*, demonstraram ser de fácil aplicação e, além disso, os materiais necessários para sua execução apresentaram baixo custo.

As modificações propostas à técnica de alimentação artificial de fêmeas parcialmente ingurgitadas de *R. microplus* descrita por Rangel (2008), como a imobilização das pernas dos carrapatos com fita adesiva de papel crepado foi necessária, uma vez que em ensaios prévios, observou-se que as fêmeas, continuamente, removiam os dispositivos de seu gnatossoma, principalmente nas primeiras três horas de alimentação *in vitro*. Após este período inicial, houve uma diminuição da remoção dos dispositivos e, à medida que os carrapatos aumentavam seu grau de ingurgitamento, a fita se desprende da bandeja, não prejudicando a continuidade do processo de ingestão de sangue pelos carrapatos. A imobilização dos pares de pernas dos carrapatos foi registrada nos estudos realizados por Chabaud (1950) e Burgdorfer (1957) a partir da utilização de parafina e massa de modelar, respectivamente.

Da mesma forma, a utilização de fita dupla face na borda da bandeja garantiu uma eficiente imobilização dos dispositivos utilizados na alimentação artificial, o que facilitou o manuseio da bandeja nos experimentos em que foi necessária a substituição dos mesmos. Esta fita adesiva foi utilizada com a mesma finalidade por Kocan et al. (2005), no estudo da interação entre o carrapato *D. variabilis* e a riquetsia *A. marginale*.

No presente estudo, a pesagem dos carrapatos antes e após a alimentação artificial foi uma maneira simples e eficiente para a determinação do ganho de peso dos grupos alimentados artificialmente, assim como realizado por De La Vega et al. (2000), Abel (2004) e Rangel (2008). Outros métodos utilizados na determinação do ganho de peso de carrapatos alimentados artificialmente foram a marcação radioativa (BURGDORFER, 1957; JOYNER et al., 1972; PURNELL et al., 1972; MACALUSO et al., 2001; BROADWATER et al., 2002), microesferas fluorescentes (KOCAN et al., 2005), marcação do nível de preenchimento dos capilares (ALMAZÁN et al., 2005), eletrogramas (McLEAN; KINGSLEY, 1964) e técnicas moleculares (REHAV et al., 1999; JASINSKAS et al., 2000; KOCAN et al., 2005; SOARES et al., 2005). Estes métodos, apesar de eficientes, contribuem para o aumento dos custos financeiros e para diminuir a praticidade da técnica de alimentação artificial.

Além da ingestão satisfatória de sangue, o sucesso da alimentação artificial também pôde ser observado, em todos os experimentos, com a constatação a vista desarmada do arredondamento dos idiossomas, a redução constante do conteúdo dos dispositivos e a excreção de guanina pela abertura anal (Figura 5). Além disso, as fêmeas após a alimentação artificial não apresentaram alteração em sua morfologia quando comparadas com os grupos controle. Resultados semelhantes aos observados por Rangel (2008), ao alimentar esta mesma espécie de carrapato.

Informações disponíveis para o processo de nutrição do carrapato *R. microplus* (RIEK, 1965; TACHEL et al., 1972; LONDT; ARTHUR, 1975; DE LA VEGA et al., 2003) sugerem que a taxa de ingurgitamento das fêmeas aumenta consideravelmente durante a fase final do ciclo parasitário. Estes relatos foram comprovados em condições artificiais no presente estudo, a partir das técnicas de alimentação artificial por meio de tubos capilares e ponteiras plásticas.

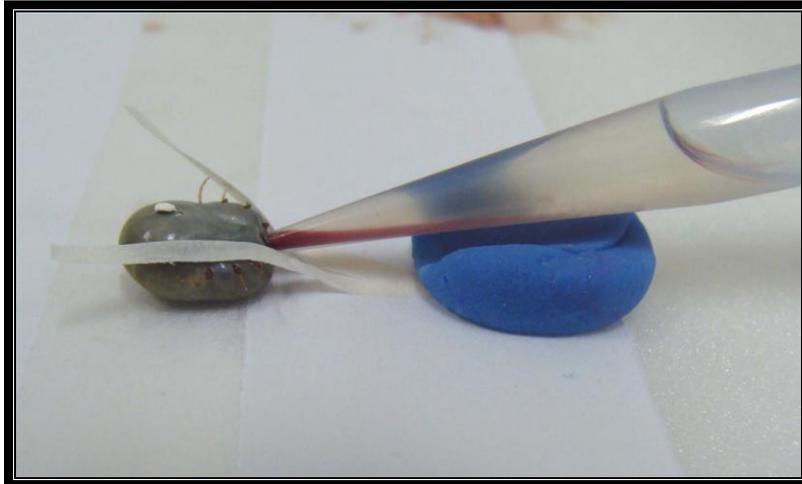


Figura 5. Excreção de guanina em fêmea de *Rhipicephalus microplus* alimentada por meio de ponteira plástica, com capacidade de 1000 μ L, utilizadas para micropipetas automáticas.

4.1.1 Tubos capilares

Na aplicação técnica de alimentação artificial por meio de tubos capilares, foi observado o ressecamento do sangue na extremidade do capilar em contato com o aparelho bucal dos carrapatos. Este evento atrapalhou o fluxo de sangue no tubo, o que justificou a necessidade das trocas dos mesmos a cada 60 minutos para que o processo de alimentação não fosse prejudicado. A troca constante dos capilares apesar de ter permitido que os carrapatos recebessem sangue fresco regularmente, tornou a técnica mais laboriosa. No presente estudo foi demonstrado a possibilidade de aumento do intervalo de tempo entre as trocas dos tubos capilares, proposto inicialmente para cada 30 minutos, conforme Rangel (2008).

Em geral, um volume de 11,5mL de sangue bovino foi suficiente para alimentar cada grupo de carrapatos e repor o conteúdo dos capilares que por ventura se apresentou ressecado ou mesmo extravasado, durante o período de alimentação artificial.

4.1.2 Ponteiras plásticas

Com o emprego de ponteiras plásticas não foi observado ressecamento do sangue e os carrapatos foram capazes de se alimentar de forma contínua sem a necessidade de substituição do conteúdo destes dispositivos.

O volume de sangue utilizado na alimentação por meio de tubos capilares, em comparação com o utilizado na alimentação por meio de ponteiras plásticas foi reduzido para 5,5mL, uma vez que os 500 μ L depositados inicialmente permitiram o ingurgitamento do carrapato sem a necessidade de reposição sucessiva de sangue.

4.2 Efeito das Faixas de Peso Inicial

Os resultados referentes ao peso médio das fêmeas de *R. microplus* de cada grupo experimental, antes e após a alimentação artificial por meio de tubos capilares, bem como ganho médio de peso, perda de peso das fêmeas e percentual de ingurgitamento, estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Influência do peso inicial na alimentação artificial de fêmeas parcialmente ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*, por meio de tubos capilares.

Faixas de Peso (mg)	Grupos	N/n	Peso das Fêmeas (mg)			Perda de Peso* (mg)	Ingurgitamento** (%)
			Média ± Desvio Padrão (Limite mínimo – Limite máximo)				
			Antes	Depois	Adquirido		
10 - 39	I	10/10	25,11 ± 10,57 ^b (10,7 – 39,6)	99,38 ± 50,23 ^a (30,9 – 173,9)	74,27 ± 44,73 ^{AB} (20,2 – 143,2)	1,76 ± 0,91 ^D (0,5 – 3,7)	38,47
40 - 69	II	10/10	54,75 ± 9,65 ^b (40,2 – 69,8)	152,24 ± 30,62 ^a (118,7 – 217,1)	97,49 ± 31,07 ^A (57,7 – 153,3)	2,71 ± 1,58 ^C (0,9 – 5,8)	58,91
70 - 99	III	10/4	82,96 ± 11,01 ^a (70,0 – 99,1)	133,42 ± 77,60 ^a (68,0 – 287,4)	50,46 ± 74,37 ^{AB} (-4,8 – 188,3)	2,83 ± 0,97 ^{BC} (2,0 – 5,2)	51,62
100 - 129	IV	10/3	112,11 ± 8,83 ^a (100,8 – 123,7)	153,23 ± 73,12 ^a (102,2 – 285,6)	41,12 ± 73,76 ^{BC} (-5,6 – 163,8)	4,16 ± 1,47 ^{AB} (2,7 – 7,0)	59,29
130 - 159	V	10/3	145,99 ± 10,29 ^a (130,6 – 156,0)	159,39 ± 38,51 ^a (127,0 – 235,5)	13,40 ± 35,66 ^C (-4,9 – 91,5)	5,02 ± 1,66 ^A (2,8 – 7,8)	61,62

N, número de fêmeas expostas a tubos capilares; n, número de fêmeas alimentadas. Médias seguidas por letra minúscula igual, nas linhas e maiúscula nas colunas, não diferiram entre si, pelos testes t de Student e Duncan, ambos a nível de 5% de significância. *Registrada para fêmeas de cada faixa de peso inicial, após um jejum de 24 horas. **Percentual estabelecido a partir do peso de fêmeas oriundas de queda natural.

As fêmeas parcialmente ingurgitadas de *R. microplus* das cinco faixas de peso avaliadas foram capazes de ingerir sangue por meio de tubos capilares. Nos grupos, I (10-39mg) e II (40-69mg) todos os carrapatos retomaram o processo de ingurgitamento *in vitro*, sendo observada diferença significativa ($p < 0,05$) entre as médias dos pesos antes e depois de 24 horas de exposição aos capilares. No grupo III (70-99mg), apenas quatro carrapatos se alimentaram artificialmente, enquanto nos grupos IV (100-129mg) e V (130-159mg) este evento foi verificado somente em três carrapatos. Desta forma, ao se comparar o peso dos carrapatos dos grupos III, IV e V antes e depois da alimentação artificial, não foi constatada diferença estatística significativa ($p > 0,05$).

O peso inicial demonstrou relação negativa ($r^2 = 0,83$) com o peso adquirido pelas fêmeas, pois à medida que se aumentou a faixa de peso dos carrapatos, houve um decréscimo da capacidade de ingestão de sangue (Figura 6 e 7). Embora fêmeas do grupo II apresentaram peso médio adquirido de 97,49mg, numericamente superior aos demais grupos, não foi observada diferença estatística significativa entre este valor e os pesos médios de 74,27 e 50,46mg observados nos grupos I e III, respectivamente. Para os carrapatos do grupo IV verificou-se um peso médio adquirido de 41,12mg, considerado estatisticamente igual aos grupos I e III, bem como ao grupo V, onde foi verificado peso médio adquirido de 13,40mg após a ingestão de sangue por meio de tubos capilares. Apesar de não haver diferença estatística significativa entre as diferentes faixas de peso observadas, as fêmeas dos grupos I e II apresentaram maior tendência de ganho de peso. Resultado semelhante ao encontrado por Sakai (2010) na alimentação artificial de fêmeas de *R. sanguineus* parcialmente ingurgitadas em cães. Esta autora verificou que as fêmeas com faixas de peso iniciais de 20 a 35 e 36 a 50mg apresentaram melhor desempenho que os carrapatos com peso inicial acima de 50mg.

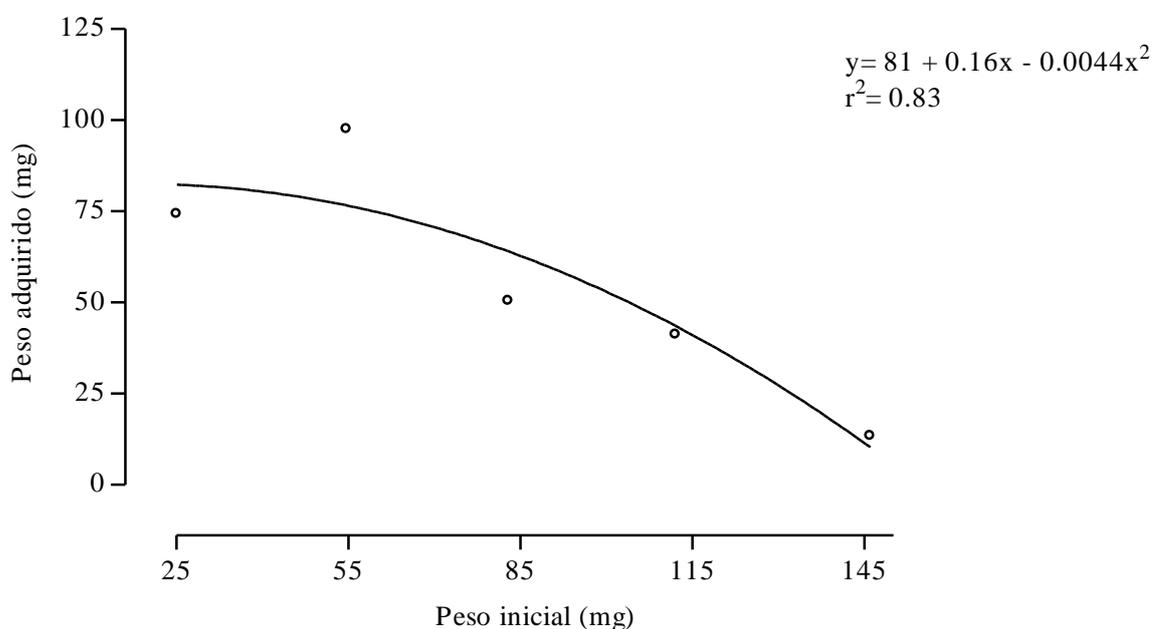


Figura 6. Relação entre a faixa de peso inicial e o ganho médio de peso das fêmeas parcialmente ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* alimentadas por meio de tubos capilares.

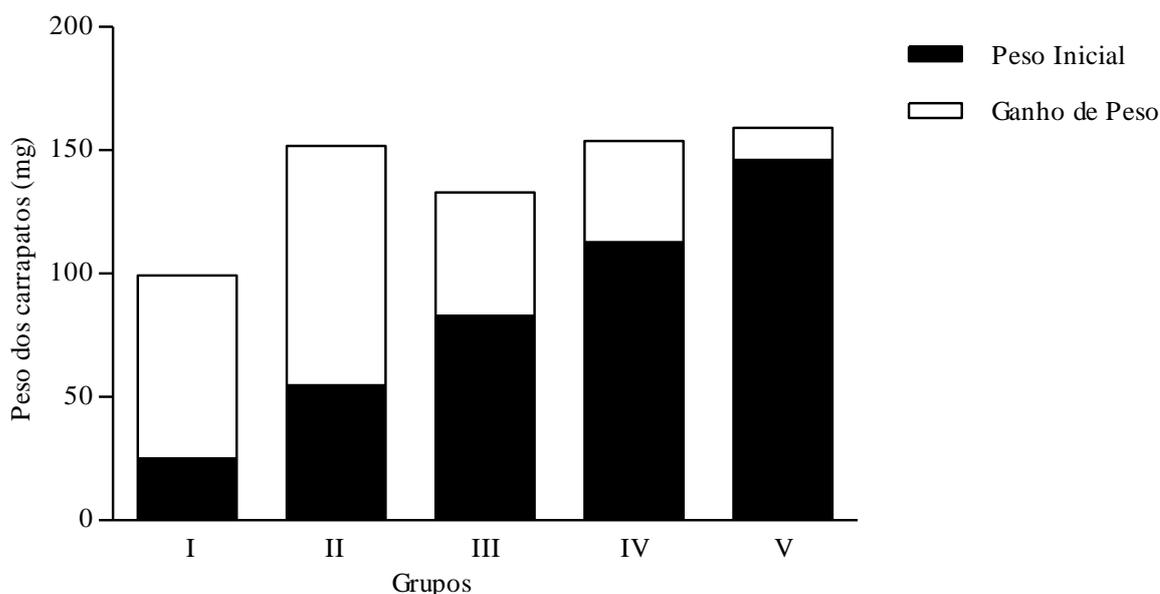


Figura 7. Relação entre a faixa de peso inicial e o ganho médio de peso das fêmeas parcialmente ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* alimentadas por meio de tubos capilares. Os grupos I, II, III, IV e V representam as faixas de peso 10-39, 40-69, 70-99, 100-129 e 130-159mg, respectivamente.

Os carrapatos do grupo II foram capazes de aumentar 2,78 vezes seu peso médio inicial, atingindo, ao término da alimentação artificial, um peso médio de 152,24mg, considerado dentro da faixa de peso aceitável para a espécie. Enquanto o grupo I, mesmo aumentando 3,96 vezes seu peso médio inicial, resultou na obtenção de fêmeas com peso médio final de 99,38mg, considerado abaixo da faixa de peso aceitável para a espécie. Em contra partida os carrapatos dos grupos III, IV e V, com peso inicial mais elevado apresentaram aumento de 1,61; 1,36 e 1,09 vezes no peso médio das fêmeas, respectivamente. Embora os carrapatos da faixa de 10 a 39mg tenham ingerido uma quantidade significativa de sangue *in vitro* é possível que um período maior de exposição aos capilares seja necessário para que as fêmeas consigam completar seu processo de alimentação. Fêmeas parcialmente ingurgitadas na faixa de 40 a 69mg apresentaram peso médio final de 152,24mg após 24 horas de alimentação artificial por meio de tubos capilares, considerado dentro da faixa de peso aceitável para a espécie. Estes resultados sugerem que a retomada do processo de ingurgitamento *in vitro* está relacionada ao efeito da faixa de peso inicial das fêmeas, uma vez que acima de 70mg as fêmeas parcialmente ingurgitadas de *R. microplus* não apresentaram um rendimento satisfatório quando alimentadas artificialmente por meio de tubos capilares.

Os resultados obtidos tornaram possível aumentar o peso e reduzir o tempo necessário para a alimentação artificial de fêmeas de *R. microplus* por meio de tubos capilares. Neste estudo, o peso médio das fêmeas de *R. microplus* foi superior ao observado por Rangel (2008), o qual verificou que fêmeas com peso inicial de 40 a 70mg atingiram peso médio final de 131,64mg, após 36 horas de exposição aos capilares.

A determinação do peso inicial das fêmeas parcialmente ingurgitadas de *R. microplus* submetidas à alimentação artificial por meio de tubos capilares influenciou no peso final dos carrapatos. Embora todos os carrapatos utilizados estivessem dentro da faixa de peso proposta

por Wharton e Utech (1970) houve diferença estatística entre o ganho de peso dos grupos avaliados. A importância do estabelecimento da faixa de peso para fêmeas parcialmente ingurgitadas alimentadas *in vitro* foi mencionada inicialmente por Losel et al. (1993) na alimentação artificial de *R. appendiculatus*, onde observaram melhores resultados quando utilizados carrapatos na faixa de 35 a 70mg. Observação semelhante à realizada por Rangel et al. (2008) na alimentação de fêmeas parcialmente ingurgitadas de *D. nitens*, onde verificaram que os grupos de carrapatos com faixa de peso inicial de 61 a 100mg apresentaram maior ganho de peso em relação aos grupos pesando entre 40 e 60mg.

A utilização de fêmeas parcialmente ingurgitadas com faixa de peso muito extensas pode dificultar o êxito da alimentação artificial dos carrapatos por meio de tubos capilares. Cunha et al. (2010) na alimentação *in vitro* de *R. sanguineus* ao utilizarem carrapatos com faixa de peso inicial de 21,9 a 172,3mg observaram um ganho médio de peso de apenas 12mg após 24 horas de exposição aos capilares.

Desta forma, é possível que para cada espécie de carrapato, as fêmeas parcialmente ingurgitadas apresentem uma faixa de peso ideal na qual seja verificado um melhor rendimento na alimentação artificial por meio de tubos capilares.

A faixa de peso inicial e a perda de peso das fêmeas do grupo controle A demonstraram relação positiva ($r^2 = 0,96$) (Figura 8). Para as fêmeas parcialmente ingurgitadas com peso inicial de 10 a 39mg foi registrada perda média de 1,76mg, considerada estatisticamente a menor perda de peso entre as cinco faixas de peso

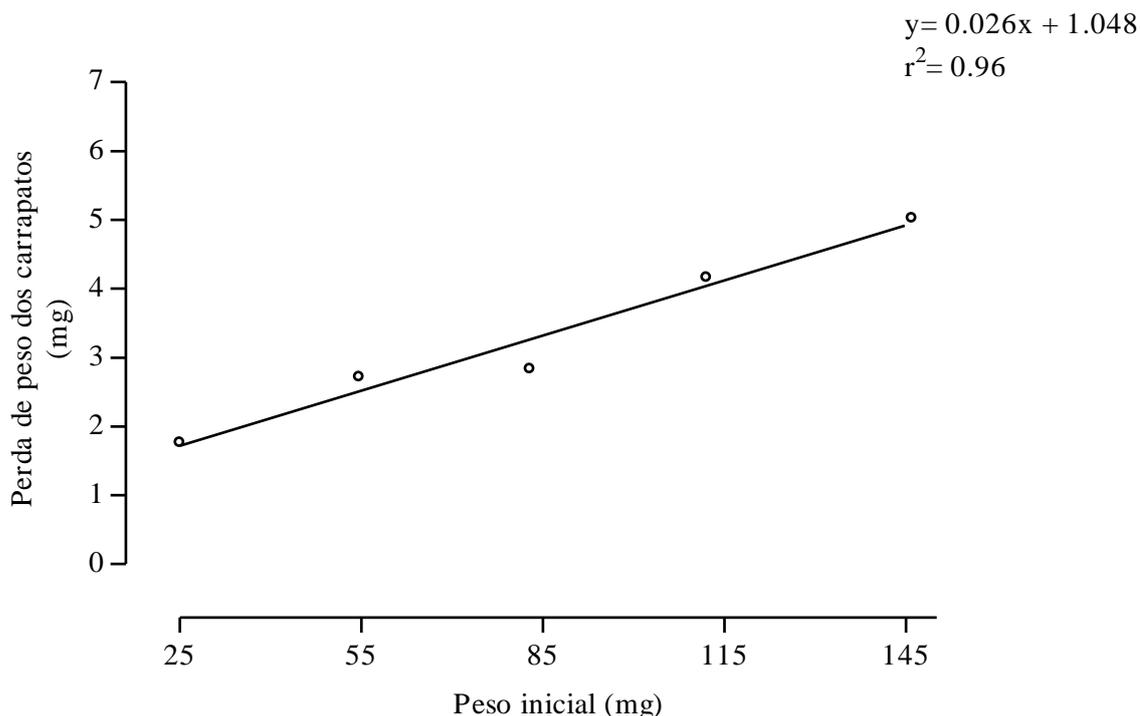


Figura 8. Relação entre a faixa de peso inicial e a perda de peso das fêmeas parcialmente ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* mantidas em jejum por um período de 24 horas (Grupo Controle A).

analisadas. Nas fêmeas com peso inicial de 40 a 69 e 70 a 99mg, as perdas médias de peso dos carrapatos foram de 2,71 e 2,83mg, respectivamente, não havendo diferença estatística significativa ($p>0,05$). As fêmeas com peso inicial de 100 a 129mg apresentaram uma perda média de 4,16mg, considerada estatisticamente igual ($p>0,05$) ao grupo de carrapatos com peso inicial de 70 a 99mg, assim aos carrapatos com peso inicial de 130 a 159mg, onde foi verificada perda média de peso nas fêmeas de 5,02mg. Estes resultados indicam que os carrapatos adultos provenientes de faixas de pesos iniciais acima de 70mg se encontravam em maior estresse metabólico, o que pode ter refletido na menor retomada do processo de ingurgitamento desses carrapatos *in vitro*.

O peso médio das fêmeas depois da alimentação artificial, em todas as faixas de peso, apresentou diferença estatística ($p<0,05$) em relação ao grupo controle B, do qual se obteve fêmeas com peso médio de 258,42mg. A partir deste valor foram calculados os percentuais de ingurgitamento de 38,47; 58,91; 51,62; 59,29 e 61,62% para os grupos I, II, III, IV e V, respectivamente. No entanto, o cálculo do percentual de ingurgitamento não permitiu evidenciar a relação entre a alimentação artificial e o ganho de peso das fêmeas. Esta relação foi determinada através de uma regra de três simples, entre o peso adquirido e o peso das fêmeas depois da alimentação, ao qual foi conferida a equivalência de 100%. Nos grupos I, II, III, IV e V, o peso atribuído a ingestão de sangue *in vitro* foi de 74,73; 64,03; 37,82; 26,83 e 8,41% respectivamente. Verificou-se uma relação negativa ($r^2 = 0,98$) (Figura 9) entre as faixas de peso iniciais e o percentual do peso das fêmeas derivado da alimentação artificial.

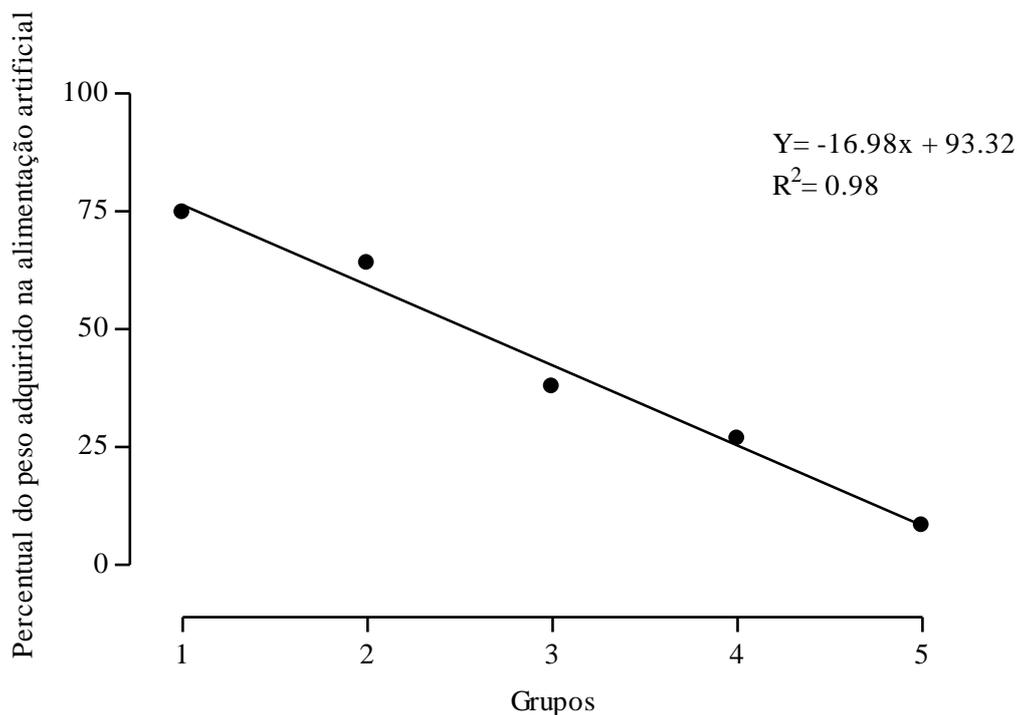


Figura 9. Relação entre a faixa de peso inicial e o percentual do peso das fêmeas adquirido durante a alimentação artificial. Os grupos I, II, III, IV e V representam as faixas de peso 10-39, 40-69, 70-99, 100-129 e 130-159mg, respectivamente.

4.3 Intervalo entre a Coleta e o Início da Alimentação Artificial

Na Tabela 2 estão apresentados os resultados referentes ao peso médio das fêmeas de *R. microplus* de cada grupo experimental, antes e após a alimentação artificial por meio de tubos capilares, assim como o ganho médio de peso, o ingurgitamento proporcional e a análise estatística comparativa de todos os intervalos analisados entre a coleta das fêmeas e o início da alimentação artificial.

Os pesos médios das fêmeas parcialmente ingurgitadas antes do início da alimentação artificial nos grupos I (fêmeas expostas aos capilares uma hora após serem removidas do bovino), II (fêmeas expostas aos capilares três horas após serem removidas do bovino), III (fêmeas expostas aos capilares seis horas após serem removidas do bovino), IV (fêmeas expostas aos capilares nove horas após serem removidas do bovino) e V (fêmeas expostas aos capilares 12 horas após serem removidas do bovino) foram de 52,51; 54,73; 54,07; 54,74 e 54,52mg, respectivamente, não sendo observado diferença estatística significativa ($p>0,05$), o que era esperado, devido à metodologia de distribuição das fêmeas utilizada para a formação dos grupos.

Independente do intervalo entre a coleta e o início da exposição aos tubos capilares, as fêmeas parcialmente ingurgitadas foram capazes de ingerir uma quantidade significativa de sangue bovino, o que foi comprovado pela diferença estatística existente entre o peso médio das fêmeas antes e 24 horas após a alimentação artificial por meio de tubos capilares.

Em estudos prévios, a permanência dos carrapatos fora da estufa BOD por um período igual ou superior a duas horas, reduziu fortemente a capacidade destes em retomar o processo de ingurgitamento por meio da técnica de alimentação artificial que utiliza tubos capilares (comunicação pessoal).

Depois da alimentação artificial por meio de tubos capilares, as fêmeas dos grupos I, II, III, IV e V apresentaram pesos médios de 142,41; 150,17; 145,96; 150,52 e 155,35mg, assim como, pesos médios adquiridos de 89,90; 95,45; 91,89; 95,78 e 100,84mg, respectivamente, ambos considerados estatisticamente iguais entre si ($p>0,05$).

Os resultados obtidos neste experimento contrariam as observações realizadas em estudos anteriores, que preconizaram a imediata alimentação dos carrapatos após sua remoção do hospedeiro vertebrado (ABEL, 2004; RANGEL, 2008; CUNHA, 2010).

Com exceção dos grupos I e III, verificou-se a perda de peso nas fêmeas após a alimentação artificial por meio de tubos capilares. Nos grupos III e V, apenas duas fêmeas não foram capazes de retomar o processo de ingurgitamento e, no grupo IV, a perda de peso foi observada em três fêmeas. Por terem ocorrido em número reduzido, essas perdas de peso provavelmente foram causadas por fatores intrínsecos, inerentes a cada espécime e não pelo efeito dos intervalos entre a coleta e o início da alimentação *in vitro*.

Um percentual de ingurgitamento foi calculado para as fêmeas dos cinco grupos experimentais atribuindo-se ao peso médio das fêmeas do grupo controle a equivalência de 100%. Os percentuais obtidos foram de 58,88; 58,11; 56,48; 58,25 e 60,12% para os grupos submetidos aos capilares nos intervalos de um, três, seis, nove e 12 horas entre a coleta e o início de alimentação *in vitro*, respectivamente. Estes resultados foram semelhantes ao observado por Rangel (2008), que obteve percentual de ingurgitamento de 63,64% para fêmeas de *R. microplus* alimentadas por meio de tubos capilares por 36 horas.

Ainda, estes resultados indicam a possibilidade de reprodução desse experimento, mesmo em instituições onde seja difícil a obtenção de carrapatos em curto espaço de tempo, uma vez que as fêmeas parcialmente ingurgitadas de *R. microplus*, quando mantidas sob condições controladas de temperatura a $27\pm 1^{\circ}\text{C}$ e de umidade relativa do ar a $80\pm 5\%$,

Tabela 2. Efeito do intervalo entre a coleta e início da alimentação artificial de fêmeas parcialmente ingurgitadas do carrapato *Rhipicephalus microplus*, por meio de tubos capilares.

Intervalos (horas)	Grupos	N/n	Peso das Fêmeas (mg)			Ingurgitamento* (%)
			Média ± Desvio Padrão (Limite mínimo – Limite máximo)			
			Antes	Depois	Adquirido	
1	I	11/11	52,51 ± 7,35 ^{Ab} (40,2 – 69,8)	142,41 ± 43,44 ^{Aa} (118,7 – 217,1)	89,90 ± 40,17 ^A (57,7 – 153,3)	58,88
3	II	11/9	54,73 ± 9,23 ^{Ab} (43 – 69,8)	150,17 ± 70,79 ^{Aa} (48,3 – 249,4)	95,45 ± 74,75 ^A (-3,6 – 193,9)	58,11
6	III	11/11	54,07 ± 8,95 ^{Ab} (40,8 – 67,8)	145,96 ± 74,30 ^{Aa} (56,9 – 275,2)	91,89 ± 71,96 ^A (-1,9 – 209,7)	56,48
9	IV	11/8	54,74 ± 9,10 ^{Ab} (40,2 – 68,5)	150,52 ± 70,83 ^{Aa} (45,1 – 237,8)	95,78 ± 70,73 ^A (-3,8 – 172,8)	58,25
12	V	11/9	54,52 ± 8,71 ^{Ab} (42,9 – 69,4)	155,35 ± 81,91 ^{Aa} (43,0 – 260,5)	100,84 ± 78,56 ^A (-3,6 – 197,7)	60,12

N, número de fêmeas expostas a tubos capilares; n, número de fêmeas alimentadas. Médias seguidas por letra minúscula igual, nas linhas e maiúscula nas colunas, não diferiram entre si, pelos testes t de Student e Duncan, respectivamente, ambos ao nível de 5% de significância. *Percentual estabelecido a partir do peso de fêmeas oriundas de queda natural.

permaneceram viáveis para a alimentação artificial por um período de até 12 horas após coleta no hospedeiro vertebrado.

4.4 Efeito de Diferentes Formas de Apresentação do Sangue Bovino

O peso médio das fêmeas antes e depois da alimentação artificial por meio de tubos capilares, assim como o peso médio adquirido e o percentual de ingurgitamento, estão apresentados na Tabela 3.

Os pesos médios das fêmeas parcialmente ingurgitadas antes do início da alimentação artificial nos grupos I (alimentado com sangue total bovino, na concentração final de um mililitro de citrato de sódio para dez mililitros de sangue), II (alimentado com sangue total bovino, na concentração final de um mililitro de citrato de sódio para 20 mililitros de sangue), III (alimentado com sangue total bovino, na concentração final de três unidades internacionais de heparina sódica por mililitro de sangue), IV (alimentado com sangue total bovino, na concentração final de dez unidades internacionais de heparina sódica por mililitro de sangue) e V (alimentado com sangue total bovino desfibrinado) foram de 52,51; 54,43; 54,59; 54,37 e 54,18mg, respectivamente, não sendo observada diferença estatística significativa ($p > 0,05$), o que era esperado, devido à metodologia de distribuição das fêmeas utilizada para a formação dos grupos.

Em todos os grupos experimentais, as fêmeas parcialmente ingurgitadas foram capazes de ingerir uma quantidade significativa de sangue bovino, o que foi comprovado pela diferença estatística ($p < 0,05$) existente entre o peso médio das fêmeas antes e 24 horas após a alimentação artificial por meio de tubos capilares.

Fêmeas alimentadas por meio de tubos capilares alcançaram pesos médios de 142,41; 132,47; 143,81; 143,37 e 133,18mg, nos grupos I, II, III, IV e V, respectivamente, considerados estatisticamente iguais ($p > 0,05$). Da mesma forma, os pesos médios adquiridos encontrados, 89,90; 78,05; 89,22; 89,00 e 79,00mg para os grupos I, II, III, IV e V, respectivamente, também não apresentaram diferença estatística ($p > 0,05$). Resultado semelhante ao verificado por Chabaud (1950), ao utilizar dietas constituídas por água, solução salina, soro e sangue desfibrinado de cobaia e líquido proveniente de ascite em rato. Assim como, De La Vega et al. (2000) na alimentação artificial de fêmeas em jejum de *R. microplus* verificaram que a utilização dos tubos capilares não apresentou efeito deletério sobre os carrapatos, ou no seu posterior desenvolvimento sobre o bovino, independente do tipo de sangue utilizado, heparinizado ou desfibrinado.

No entanto, para algumas espécies de carrapatos foi possível observar o efeito de diferentes dietas oferecidas por meio de tubos capilares. Gregson (1956) concluiu que carrapatos *D. andersoni* consumiram mais ativamente o sangue heparinizado em relação ao plasma de carneiro. Para *R. appendiculatus* foi observado o inverso, uma vez que maiores volumes de plasma e soro foram consumidos em relação ao sangue heparinizado ou desfibrinado de bovino (JOYNER; PURNELL, 1968).

Independente da forma como o sangue total bovino foi testado, foram verificadas perdas de peso em fêmeas de *R. microplus* alimentadas por meio de tubos capilares. No grupo I, a perda de peso foi observada em apenas um carrapato. Nos grupos II, III e IV, foram registradas perdas de peso em três, dois e três carrapatos, respectivamente. Enquanto no grupo V verificou-se perda de peso em quatro carrapatos. Com relação à perda de peso obtida em alguns espécimes é importante ressaltar que, mesmo com os numerosos critérios adotados para garantir amostras homogêneas, não houve intervenção na variabilidade genética dos

Tabela 3. Efeito de diferentes formas de apresentação do sangue bovino sobre a alimentação artificial de fêmeas parcialmente ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*, por meio de tubos capilares.

Sangue Total (concentração)	Grupos	N/n	Peso das Fêmeas (mg)			Ingurgitamento* (%)
			Média ± Desvio Padrão (Limite mínimo – Limite máximo)			
			Antes	Depois	Adquirido	
Citratado (1:10)	I	11/10	52,51 ± 7,35 ^{Ab} (40,2 – 69,8)	142,41 ± 43,44 ^{Aa} (118,7 – 217,1)	89,90 ± 40,17 ^A (57,7 – 153,3)	58,88
Citratado (1:20)	II	11/8	54,43 ± 7,85 ^{Ab} (40,8 – 62,3)	132,47 ± 64,64 ^{Aa} (50,6 – 228,2)	78,05 ± 65,77 ^A (-4,4 – 170,2)	51,26
Heparinizado (3UI)	III	11/9	54,59 ± 10,27 ^{Ab} (41,8 – 69,8)	143,81 ± 79,09 ^{Aa} (43,1 – 281,9)	89,22 ± 80,83 ^A (-7,1 – 229,5)	55,65
Heparinizado (10UI)	IV	11/8	54,37 ± 7,26 ^{Ab} (45,1 – 65,6)	143,37 ± 66,97 ^{Aa} (41,4 – 225,5)	89,00 ± 66,20 ^A (-4,9 – 168,3)	55,48
Desfibrinado	V	11/7	54,18 ± 7,62 ^{Ab} (43,0 – 67,5)	133,18 ± 74,51 ^{Aa} (52,0 – 234,6)	79,00 ± 75,33 ^A (-2,7 – 172,3)	51,54

N, número de fêmeas expostas a tubos capilares; n, número de fêmeas alimentadas. Médias seguidas por pelo menos uma letra minúscula igual, nas linhas e maiúscula nas colunas, não diferiram entre si, pelos testes t de Student e Duncan, respectivamente, ambos ao nível de 5% de significância. *Percentual estabelecido a partir do peso de fêmeas oriundas de queda natural.

carrapatos e a possibilidade de não ingestão de sangue não estava descartada. Nos grupos II e V, os tratamentos aplicados ao sangue bovino apresentaram como inconveniente, a maior densidade da dieta utilizada, o que dificultou seu fluxo no interior do capilar, além de tornar necessária a troca dos capilares em intervalos inferiores ao observado para as outras dietas, em decorrência de um ressecamento mais acelerado do sangue.

Um percentual de ingurgitamento foi calculado para as fêmeas dos cinco grupos experimentais atribuindo-se ao peso médio das fêmeas do grupo controle a equivalência de 100%. Os percentuais obtidos foram de 58,88; 51,26; 55,65; 55,48 e 51,54% para os grupos I, II, III, IV e V, respectivamente.

A avaliação dos aspectos biológicos da fase não-parasitária das fêmeas de *R. microplus*, apresentados na Tabela 4, comprovou não haver diferença quanto à forma como o sangue total bovino foi utilizado, na alimentação artificial dos grupos I, II, III, IV e V. Estes resultados contrariam afirmação realizada por De La Vega et al. (2000), de que a utilização do anticoagulante heparina sódica provocou efeito tóxico sobre o desenvolvimento embrionário dos carrapatos.

A técnica de tubos capilares ofereceu um método alternativo para a alimentação de fêmeas parcialmente ingurgitadas de *R. microplus* dentro do qual a forma de apresentação do sangue pode ser variada de acordo com o propósito experimental.

Tabela 4. Aspectos biológicos da fase não-parasitária de fêmeas *Rhipicephalus microplus* alimentadas, com sangue bovino total, diluído em anticoagulantes e desfibrinado, por meio de tubos capilares.

Aspectos biológicos	Tratamentos aplicados ao sangue bovino total					Controle*
	Citrato de sódio		Heparina sódica		Desfibrinado	
	1:10	1:20	3UI	10UI		
Peso das fêmeas (mg)	142,41 ± 43,44 ^b (118,7 – 217,1)	132,47 ± 64,64 ^b (50,6 – 228,2)	143,81 ± 79,09 ^b (43,1 – 281,9)	143,37 ± 66,97 ^b (41,4 – 225,5)	133,18 ± 74,51 ^b (52,0 – 234,6)	258,42±44,43 ^a (170,00 – 334,70)
Período de Pré-Postura (dias)	3,18±0,40 ^a (3,00 – 4,00)	3,00±0,00 ^a (3,00 – 3,00)	3,45±0,93 ^a (3,00- 6,00)	2,91±0,30 ^a (2,00 – 3,00)	3,09±0,30 ^a (3,00 – 4,00)	3,18±0,40 ^a (3,00 – 4,00)
Peso da postura (mg)	61,00±26,63 ^b (10,4 – 114,2)	61,27±43,44 ^b (3,0 – 121,3)	54,24±43,05 ^b (0,0 – 133,9)	70,93±40,76 ^b (8,9 – 118,2)	64,09±46,13 ^b (10,3 – 130,2)	142,47±28,12 ^a (75,1 – 172,4)
Índice de produção de ovos (%)	40,86±7,75 ^a (24,24 – 52,60)	42,17±21,47 ^a (2,97 – 86,70)	37,73±16,71 ^a (0,00 – 54,68)	44,78±11,97 ^a (21,50 – 54,67)	42,22±12,73 ^a (19,81 – 55,75)	57,37±18,34 ^a (27,47 – 96,30)
Índice de eficiência reprodutiva (%)	35,01±12,08 ^a (17,43 – 52,60)	38,68±23,51 ^a (2,08 – 86,70)	28,56±20,67 ^a (0,00 – 54,68)	40,62±12,34 ^a (19,35 – 54,67)	35,08,62±16,00 ^a (11,19 – 55,75)	51,65±17,61 ^a (27,47 – 86,67)
Eclosão (%)	84,55±19,16 ^a (50,00 – 100,00)	86,36±20,14 ^a (50,00 – 100,00)	68,18±40,70 ^a (0,00 – 100,00)	90,91±13,00 ^a (60,00 – 100,00)	80,91±23,43 ^a (40,00 – 100,00)	90,91±13,75 ^a (60,00 – 100,00)

Médias seguidas de letras minúsculas iguais nas linhas não diferiram entre si, pelos testes Duncan ou Kruskal-Wallis, ambos ao nível de 5% de significância.

* Fêmeas alimentadas em bovinos e recuperadas após queda natural.

4.5 Influência de Diferentes Temperaturas

Na Tabela 5 estão apresentados os resultados referentes ao peso médio de fêmeas de *R. microplus* antes e depois da exposição aos tubos capilares. Assim como, o peso médio adquirido e o percentual de ingurgitamento dos carrapatos, em todas as temperaturas e períodos de alimentação analisados.

Os pesos médios das fêmeas parcialmente ingurgitadas antes do início da alimentação artificial nos grupos I (fêmeas mantidas a 32°C e alimentadas por 12 horas), II (fêmeas mantidas a 32°C e alimentadas por 24 horas), III (fêmeas mantidas a 37°C e alimentadas por 12 horas) e IV (fêmeas mantidas a 37°C e alimentadas por 24 horas) foram de 53,61; 54,25; 54,95 e 54,72mg, respectivamente, não sendo observada diferença estatística significativa ($p>0,05$), o que era esperado, devido à metodologia de distribuição das fêmeas utilizada para a formação dos grupos.

Verificou-se diferença estatística ($p<0,05$) no peso médio de fêmeas de *R. microplus* antes e após a alimentação, em todos os grupos experimentais. No entanto, foi possível observar carrapatos que não foram capazes de ingerir sangue, em ambas as faixas de temperatura. No grupo I, a perda de peso foi observada em quatro carrapatos, enquanto que nos grupos II e IV, a perda de peso foi registrada em apenas um carrapato. No grupo III, nenhum carrapato demonstrou perda de peso quando submetido à alimentação por meio de tubos capilares.

No grupo I (fêmeas alimentadas sob temperatura de 32°C por 12 horas), as fêmeas apresentaram valores médios de 99,25 e 45,65mg, em relação ao peso final e ganho de peso, respectivamente, considerados estatisticamente inferiores ($p<0,05$) aos demais grupos experimentais. Estes resultados foram semelhantes aos observados por Rangel (2008) para fêmeas de *R. microplus* alimentadas em estufa a temperatura de 27°C por 12 horas, as quais obtiveram peso médio de 85,57mg e ganho médio de peso de 41,40mg. Nos grupos II, III e IV, depois da alimentação artificial as fêmeas apresentaram pesos médios de 176,08; 160,10 e 177,00mg e ganhos médios de 121,83; 105,15; e 122,28mg, respectivamente. Os resultados observados nestes grupos foram superiores aos encontrados por Rangel (2008) (Figura 10), para fêmeas parcialmente ingurgitadas de *R. microplus* alimentadas em estufa BOD a temperatura de 27°C. Este autor verificou fêmeas com peso médio final de 119,69 e 131,64mg e ganho médio de peso de 67,53 e 79,47mg, após 24 e 36 horas de exposição aos capilares, respectivamente.

A utilização de temperaturas mais elevadas tornou possível aumentar o ganho médio de peso dos carrapatos. Além disso, as fêmeas alimentadas por 12 horas sob temperatura de 37°C foram capazes de atingir o mesmo grau de ingurgitamento observado em fêmeas alimentadas por 24 horas.

Um percentual de ingurgitamento foi calculado para as fêmeas dos quatro grupos experimentais atribuindo-se ao peso médio das fêmeas do grupo controle equivalência a 100%. Os percentuais obtidos foram de 39,96; 70,89; 64,46 e 71,26% para os grupos I, II, III e IV, respectivamente. Verificou-se um aumento neste percentual, em relação a experimentos anteriores quando se trabalhou à temperatura de 27°C (RANGEL, 2008).

A grande vantagem deste experimento foi manter o sangue aquecido à temperatura próxima a do hospedeiro natural sem, entretanto, aquecer demais o ambiente do carrapato para evitar ressecamento. A utilização de estufas do tipo BOD proporcionou o desenvolvimento do trabalho totalmente a 32 ou 37°C e umidade relativa de $80 \pm 5\%$, visto que todas as atividades inerentes aos processo de alimentação foram realizados dentro da

Tabela 5. Efeito de diferentes temperaturas sobre a alimentação artificial de fêmeas parcialmente ingurgitadas do carrapato *Rhipicephalus microplus*, por meio de tubos capilares.

Temperaturas (°C)	Períodos de Alimentação (horas)	Grupos	N/n	Peso das Fêmeas (mg)			Ingurgitamento* (%)
				Média ± Desvio Padrão (Limite mínimo – Limite máximo)			
				Antes	Depois	Adquirido	
32	12	I	11/7	53,61 ± 5,81 ^{Ab} (47,0 – 61,7)	99,25 ± 50,46 ^{Ba} (45,6 – 173,8)	45,65 ± 50,53 ^B (-4,3 – 124,1)	39,96
	24	II	11/10	54,25 ± 6,30 ^{Ab} (45,0 – 64,6)	176,08 ± 55,86 ^{Aa} (54,6 – 244,6)	121,83 ± 56,10 ^A (-2,3 – 196,4)	70,89
37	12	III	11/11	54,95 ± 8,23 ^{Ab} (41,2 – 66,2)	160,10 ± 24,45 ^{Aa} (118,9 – 188,3)	105,15 ± 24,34 ^A (77,5 – 145,6)	64,46
	24	IV	11/10	54,72 ± 7,65 ^{Ab} (43,0 – 69,3)	177,00 ± 65,62 ^{Aa} (62,8 – 283,5)	122,28 ± 69,95 ^A (-6,5 – 240,5)	71,26

N, número de fêmeas expostas a tubos capilares; n, número de fêmeas alimentadas. Médias seguidas por pelo menos uma letra minúscula igual, nas linhas e maiúscula nas colunas, não diferiram entre si, pelo teste t de Student, ao nível de 5% de significância. *Percentual estabelecido a partir do peso de fêmeas oriundas de queda natural.

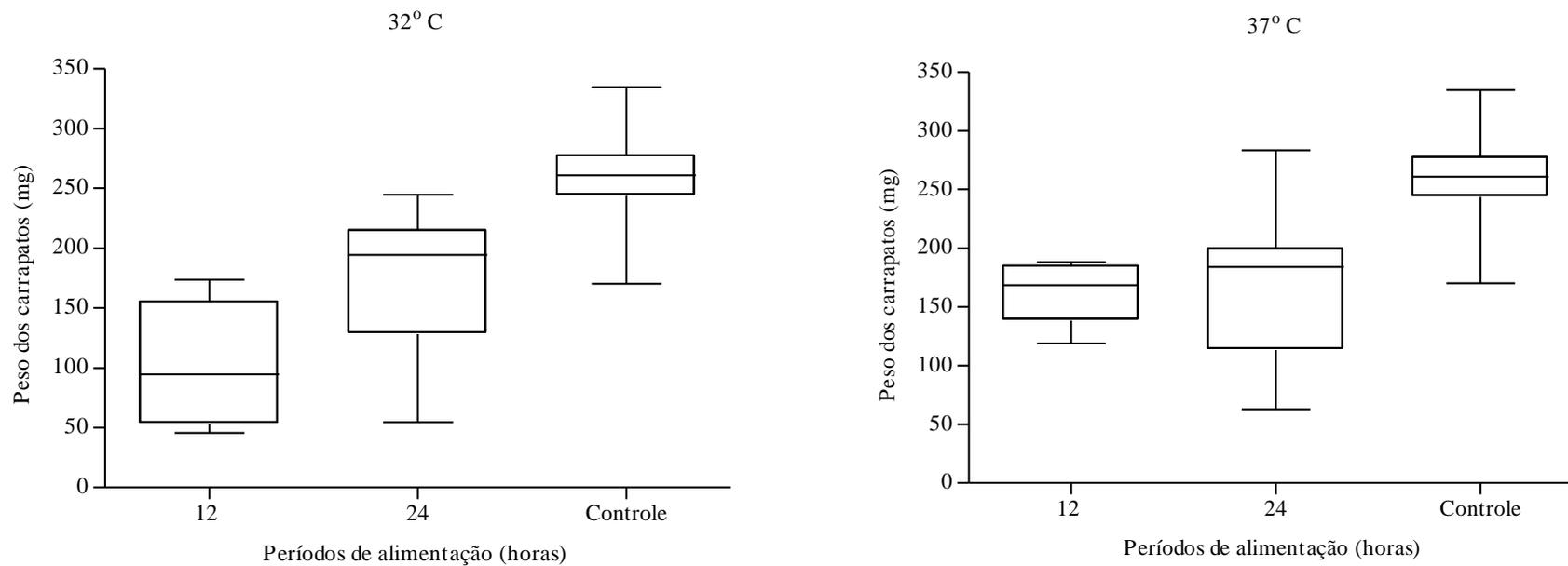


Figura 10. Valores médios das fêmeas de *Rhipicephalus microplus* alimentadas artificialmente sob às temperaturas de 32°C e 37°C, durante os períodos de 12 e 24 horas e grupo controle.

estufa. Esses valores de temperatura foram ideais para a realização do experimento, uma vez que os carrapatos foram capazes de se alimentar e pareciam em condições normais de motilidade após serem retirados das bandejas. Ainda, os carrapatos retomaram o processo de ingurgitamento imediatamente após o posicionamento dos capilares sobre seu hipostômio, sendo, em alguns casos, necessária a substituição dos capilares em intervalos inferiores a 60 minutos. Nos experimentos realizados por Chabaud (1950) e Purnell e Joyner (1967), a temperatura do sistema de alimentação artificial foi mantida com auxílio de uma luminária. Enquanto, Inokuma et al. (1994) utilizaram uma placa aquecedora na tentativa de manter constante a temperatura da dieta oferecida por meio de tubos capilares.

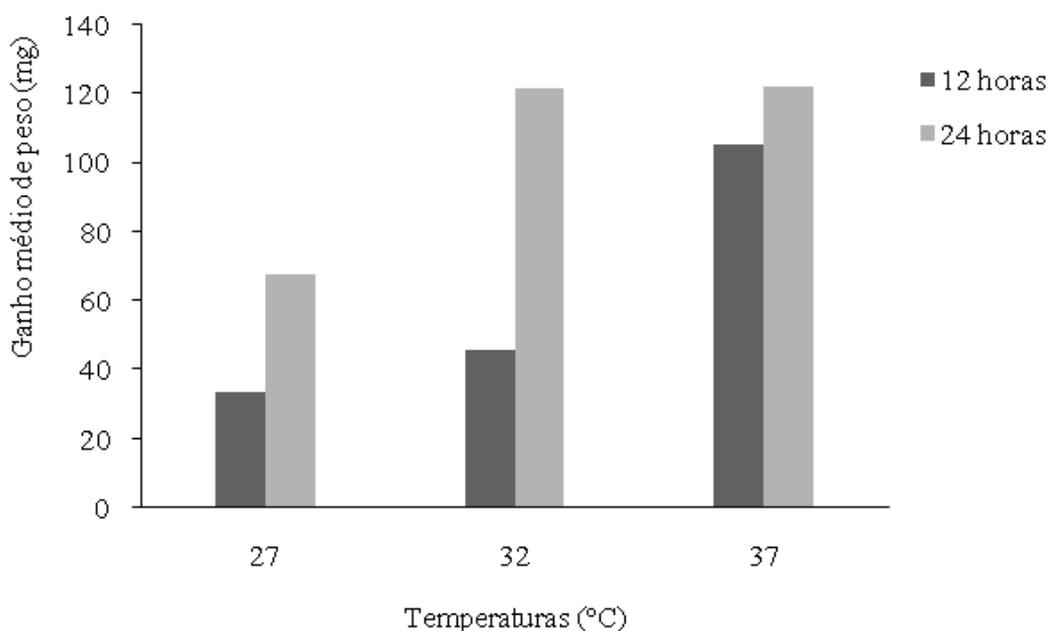


Figura 11. Ganho médio de peso de fêmeas de *Rhipicephalus microplus* alimentadas artificialmente por meio de tubos capilares, nos períodos de 12 e 24 horas, sob condições controladas de temperaturas de 27, 32 e 37°C. Os resultados obtidos à temperatura de 27°C foram compilados de Rangel (2008).

A temperatura estabelecida para a experimentação nos diferentes trabalhos variou muito, de acordo com a espécie de carrapato, desde 27°C a 37°C (ABEL, 2004; WILLADSEN et al., 1984). A alimentação artificial de *D. nitens* e *A. cajennense* em estufa BOD a temperatura de 27°C foi suficiente para garantir que os carrapatos completassem seu ingurgitamento *in vitro* (RANGEL et al., 2008; ABEL et al., em análise). No entanto, quando utilizada a mesma temperatura para alimentar fêmeas parcialmente ingurgitadas de *R. sanguineus*, os carrapatos não ingeriram a quantidade de sangue necessária para completar seu ingurgitamento (CUNHA et al., 2010; SAKAI, 2010). Segundo Chabaud (1950) o sucesso da alimentação artificial depende da padronização de uma temperatura adequada para a ingestão das dietas oferecidas.

4.6 Dispositivos de Alimentação

Os resultados referentes ao peso médio das fêmeas de *R. microplus* antes e depois da alimentação *in vitro*, peso médio adquirido e percentual de ingurgitamento dos carrapatos, estão apresentados na Tabela 6.

Os pesos médios das fêmeas parcialmente ingurgitadas antes do início da alimentação artificial nos grupos alimentados por meio de tubos capilares e ponteiras plásticas foram de 54,95 e 48,97mg, respectivamente, não sendo observada diferença estatística significativa ($p>0,05$), o que era esperado, devido à metodologia de distribuição das fêmeas utilizada para a formação dos grupos.

Independente do dispositivo utilizado observou-se que, com o aumento do grau de ingurgitamento os carrapatos passaram a elevar o histerossoma (Figura 12), de tal forma que na extremidade oposta, o gnatossoma em associação com o dispositivo entrou em contato com a base da bandeja, o que provocou o extravasamento do sangue.

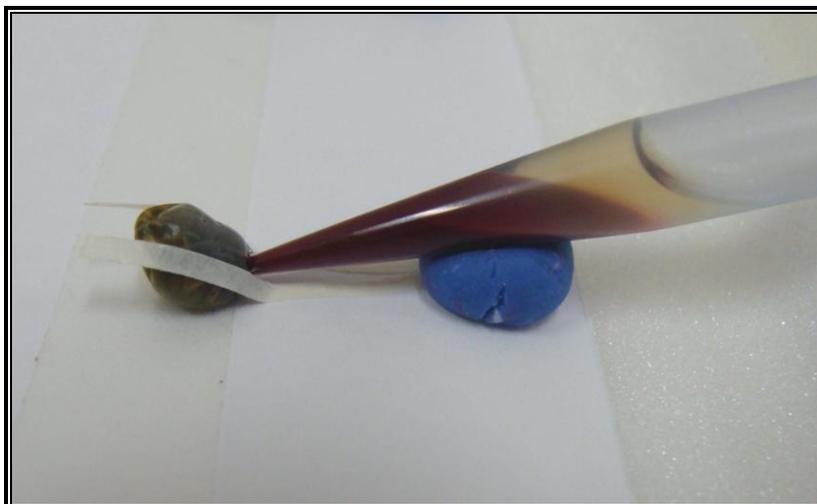


Figura 12. Elevação do histerossoma de fêmea de *Rhipicephalus microplus* alimentada por meio de ponteira plástica e desprendimento da fita de papel crepado da bandeja.

Como o objetivo do uso das ponteiras foi oferecer um maior volume de sangue aos carrapatos, evitando-se trocas sucessivas da dieta, optou-se por encerrar o processo de alimentação artificial após sete horas, quando se detectou o extravasamento do conteúdo nas primeiras ponteiras. Esta decisão não foi atribuída aos grupos alimentados por meio de tubos capilares, uma vez que nos intervalos de tempo estabelecidos para troca dos mesmos, as fêmeas foram reposicionadas de forma a evitar o contato do dispositivo com a bandeja.

Nos grupos experimentais se observou diferença estatística ($p<0,05$) no peso médio de fêmeas *R. microplus* antes e após a alimentação *in vitro*. Todos os carrapatos expostos a tubos capilares e ponteiras por 12 e sete horas, respectivamente, foram capazes de retomar o processo de ingestão de sangue.

Na alimentação artificial de fêmeas parcialmente ingurgitadas de *R. microplus* por meio de ponteiras plásticas, carrapatos com peso médio inicial de 48,97mg, alcançaram peso médio final de 200,17mg, o que representou um ganho médio de 151,20mg (Figura 13). Estes

Tabela 6. Efeito de dispositivos utilizados para a alimentação de fêmeas parcialmente ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*.

Dispositivos de alimentação artificial	Períodos de alimentação (horas)	N/n	Peso das Fêmeas (mg)			Ingurgitamento* (%)
			Média ± Desvio Padrão (Limite mínimo – Limite máximo)			
			Antes	Depois	Adquirido	
Tubo capilar	12	11/11	54,95 ± 8,23 ^{Ab} (41,2 – 66,2)	160,10 ± 24,45 ^{Ba} (118,9 – 188,3)	105,15 ± 24,34 ^B (77,5 – 145,6)	64,46
Ponteira plástica	7	11/11	48,97 ± 9,09 ^{Ab} (40,4 – 66,5)	200,17 ± 19,92 ^{Aa} (178,8 – 236,0)	151,20 ± 24,78 ^A (120,8 – 194,3)	80,59

N, número de fêmeas expostas a tubos capilares; n, número de fêmeas alimentadas. Médias seguidas por pelo menos uma letra minúscula igual, nas linhas e maiúscula nas colunas, não diferiram entre si, pelo teste t de Student, ao nível de 5% de significância. *Percentual estabelecido a partir do peso de fêmeas oriundas de queda natural.

resultados foram considerados estatisticamente superiores ($p < 0,05$) ao peso médio de 160,10mg e ao ganho médio de 105,15mg obtidos para fêmeas de *R. microplus* alimentadas por meio de tubos capilares. Ainda, os resultados obtidos com a utilização de ponteiras plásticas foram superiores aos observados por Willadsen et al. (1984), que verificaram fêmeas de *R. microplus* com peso médio de 189,8mg, após alimentação por meio de pipetas Pasteur.

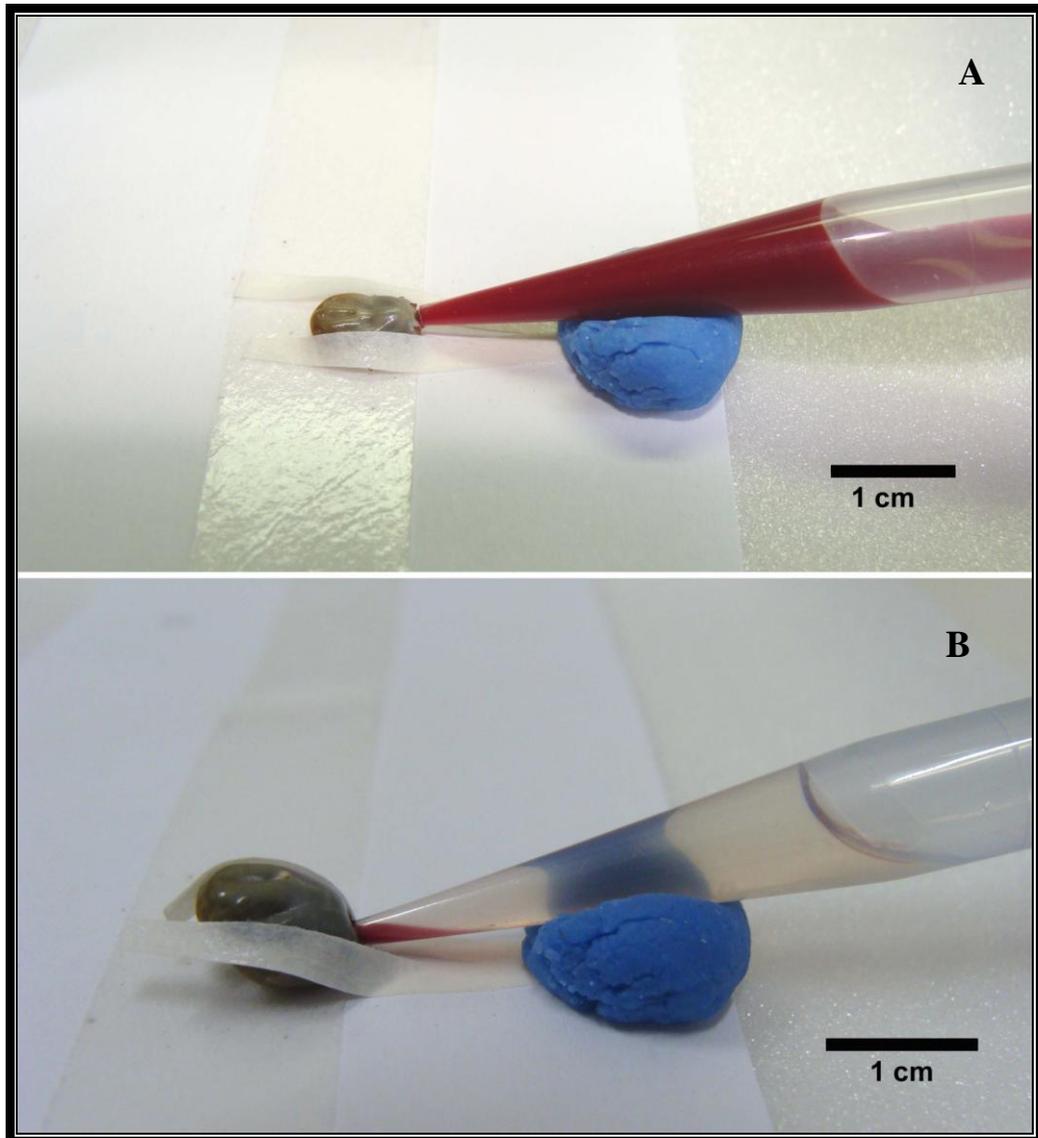


Figura 13. Fêmea de *Rhipicephalus microplus* antes (A) e após (B) alimentação artificial por meio de ponteiras plásticas.

4.7 Aspectos Biológicos da Fase não-Parasitária de Fêmeas de *Rhipicephalus microplus*

Os aspectos biológicos relativos à fase não-parasitária de fêmeas *Rhipicephalus microplus*, mantidas em estufa do tipo BOD à temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa do ar de $80 \pm 5\%$, são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7. Aspectos biológicos da fase não-parasitária de fêmeas de *Rhipicephalus microplus* alimentadas artificialmente e oriundas de queda natural.

Aspectos biológicos	Dispositivos, temperaturas e períodos de alimentação artificial de fêmeas parcialmente ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i>					Controle
	Tubo capilar 32°C		Tubo capilar 37°C		Ponteira plástica 37°C	
	12 horas	24 horas	12 horas	24 horas	7 horas	
Peso das fêmeas (mg)	99,25±50,46 ^c (45,6 – 173,8)	176,08±55,86 ^b (54,6 – 244,6)	160,10±24,45 ^b (118,9 – 188,3)	177,00±65,62 ^b (62,8 – 283,5)	200,17±19,92 ^b (178,8 – 236,0)	248,37±43,48 ^a (200,8 – 333,9)
Período de Pré-Postura (dias)	3,09±0,83 ^a (2,00 – 5,00)	2,91±0,30 ^{ab} (2,00 – 3,00)	3,36±0,67 ^a (2,00 – 3,00)	2,55±0,52 ^b (2,00 – 3,00)	2,91±0,54 ^{ab} (2,00 – 4,00)	3,45±0,52 ^a (3,00 – 4,00)
Peso da postura (mg)	36,65±23,93 ^d (10,06 – 72,50)	64,90±22,39 ^c (14,90 – 85,70)	68,20±19,14 ^c (49,80 – 93,80)	75,12±28,83 ^c (21,2 – 116,30)	100,94±17,64 ^b (69,5 – 128,0)	131,27±43,21 ^a (61,4 – 235,3)
Índice de produção de ovos (%)	34,08±7,67 ^d (23,25 – 45,41)	36,36±5,19 ^{cd} (27,29 – 42,25)	47,01±7,46 ^{ab} (29,17 – 56,87)	41,87±4,23 ^{bc} (33,76 – 47,15)	50,40±6,97 ^a (37,03 – 57,47)	52,58±12,12 ^a (26,78 – 70,47)
Índice de eficiência reprodutiva (%)	29,98±11,59 ^b (3,48 – 45,41)	30,25±7,81 ^b (17,54 – 41,80)	31,15±13,71 ^b (11,67 – 52,76)	34,15±9,13 ^b (16,33 – 47,15)	40,09±15,08 ^{ab} (10,36 – 57,47)	48,53±13,05 ^a (24,10 – 70,47)
Eclosão (%)	88,18±26,39 ^a (10,00 – 100,00)	83,64±19,12 ^a (50,00 – 100,00)	64,55±22,96 ^a (40,00 – 100,00)	80,91±17,58 ^a (40,00 – 100,00)	80,00±27,93 ^a (20,00 – 100,00)	91,82±8,74 ^a (80,00 – 100,00)

Médias seguidas de letras minúsculas iguais nas linhas não diferiram entre si, pelos testes Duncan e Kruskal-Wallis, ambos ao nível de 5% de significância.

Segundo Chabaud (1950), o acompanhamento dos aspectos biológicos dos carrapatos constitui a forma mais adequada para avaliar a eficiência das técnicas de alimentação *in vitro*. O peso médio das fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* do grupo controle foi de 248,37 mg, resultado este próximo ao descrito por Benavides (1984), Bittencourt (1990), Barreira (2001) e De La Vega et al. (2007) trabalhando em condições semelhantes, onde os valores foram de 245,5; 258,2; 256,4 e 258,7 mg, respectivamente. No entanto, este resultado mostrou-se superior quando confrontado com os valores médios de 228,0 e 233,9mg obtidos por De La Vega et al. (2003) e De La Vega et al. (2007). Apesar do peso médio das fêmeas do grupo controle encontrado neste estudo apresentar semelhanças e diferenças quando confrontado com os dados encontrados na literatura, podemos considerá-lo normal. A partir destas observações, podemos sugerir que, as variações encontradas estão relacionadas às diferentes cepas de *R. microplus*, variações climáticas das diferentes regiões, fatores genéticos e imunológicos dos hospedeiros.

Os valores obtidos neste trabalho para os diferentes grupos de fêmeas alimentadas artificialmente apresentaram diferença estatística em relação ao grupo controle. Os pesos médios das fêmeas após a alimentação artificial por meio de capilares foram de 99,25 e 176,08mg para os grupos alimentados sob temperatura de 32°C por 12 e 24 horas, respectivamente, havendo diferença estatística significativa entre os grupos ($p < 0,05$). Em ambiente controlado de temperatura à 37°C, as fêmeas apresentaram peso médio de 160,10, 177,00 e 200,17mg, nos grupos expostos a capilares por 12 e 24 horas e no grupo alimentado por meio de ponteiras plásticas por sete horas, respectivamente, não sendo observada diferença significativas entre os grupos ($p > 0,05$). Com exceção do grupo alimentado sob temperatura de 32°C por 12 horas, os resultados foram superiores aos observados por Rangel (2008) ao avaliar os aspectos biológicos da fase não parasitária de fêmeas de *R. microplus* alimentadas por meio de tubos capilares, quando obteve fêmeas com peso médio final de 131,64mg, após 36 horas de exposição aos capilares. Da mesma forma, estes resultados foram semelhantes ao observado por Willadsen et al. (1984), que verificou fêmeas com peso médio final de 189,8mg ao utilizar pipetas Pasteur na alimentação artificial de fêmeas de *R. microplus*.

Todas as fêmeas de *R. microplus* alimentadas artificialmente foram capazes de realizar posturas viáveis. O período médio de pré-postura das fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* que constituíram o grupo controle neste experimento foi de 3,45 dias, valor este semelhante aos observados por Alvarado e Gonzales (1979), Davey et al. (1980), Bittencourt (1990), Furlong (1990) e Glória et al. (1993), que encontraram resultados de 3,00; 3,00; 2,80; 3,27 e 2,91 dias, respectivamente. Para fêmeas alimentadas artificialmente, os períodos médios de pré-postura foram de 3,09 e 2,91 dias em fêmeas submetidas a tubos capilares por 12 e 24 horas, respectivamente; 3,36 e 2,55 dias em fêmeas alimentadas por meio de tubos capilares em estufa a 37°C por 12 e 24 horas, respectivamente; e 2,91 dias em fêmeas alimentadas por meio de ponteiras plásticas a 37°C por sete horas. Os valores relativos ao período de pré-postura para as fêmeas que constituíram o grupo controle e os grupos alimentados artificialmente, não apresentaram diferenças significativas entre si, com exceção do grupo alimentado à temperatura de 37°C por 24 horas. Com base nestas observações pode-se sugerir que a alimentação das fêmeas em ambiente controlado sob temperaturas de 37°C por um período de 24 horas pode ter aumentado a taxa metabólica dos carrapatos e favorecido o encurtamento do período de pré-postura. Ao contrário das observações realizadas por Rangel (2008), o tempo despendido com a pré-postura não apresentou relação com o peso das fêmeas ingurgitadas.

O peso médio da postura das fêmeas de *R. microplus* dos grupos experimentais apresentou diferença estatística significativa em relação ao grupo controle, onde foi observado o valor médio de 131,27mg. Resultado semelhante ao observado por Glória et al. (1993) de 140,08mg para fêmeas resistentes à carrapaticidas. Entretanto, este valor foi inferior aos encontrados por Glória et al. (1993) e Bittencourt (1990) de 155,6mg para fêmeas sensíveis à carrapaticida e 151mg para fêmeas de *R. microplus* de origem bovina, respectivamente. O menor peso da postura obtido nos carrapatos alimentados artificialmente se justifica em função deste depender do grau de ingurgitamento das fêmeas (RANGEL, 2008) (Figura 14). Na comparação entre os grupos experimentais, o menor peso da postura foi observado em fêmeas alimentadas sob temperatura de 32°C por 12 horas, que apresentaram média de 36,65mg. No grupo exposto a tubos capilares em ambiente controlado à temperatura de 32°C por 24 horas, o peso médio foi de 64,90mg, considerado estatisticamente igual ($p>0,05$) aos pesos médios de 68,20mg e 75,12mg obtidos para a postura nos grupos de carrapatos alimentados por meio de tubos capilares em ambiente de 37°C por 12 e 24 horas, respectivamente. Peso médio da postura superior, 100,94mg, foi observado no grupo de carrapatos alimentados por meio de ponteiras plásticas em estufa a 37°C por sete horas, que diferiu estatisticamente dos demais grupos alimentados *in vitro*. Este resultado apresentou semelhança aos pesos médios de postura de 111,52 e 91,31mg obtidos por Furlong (1990) e Barreira (2001).

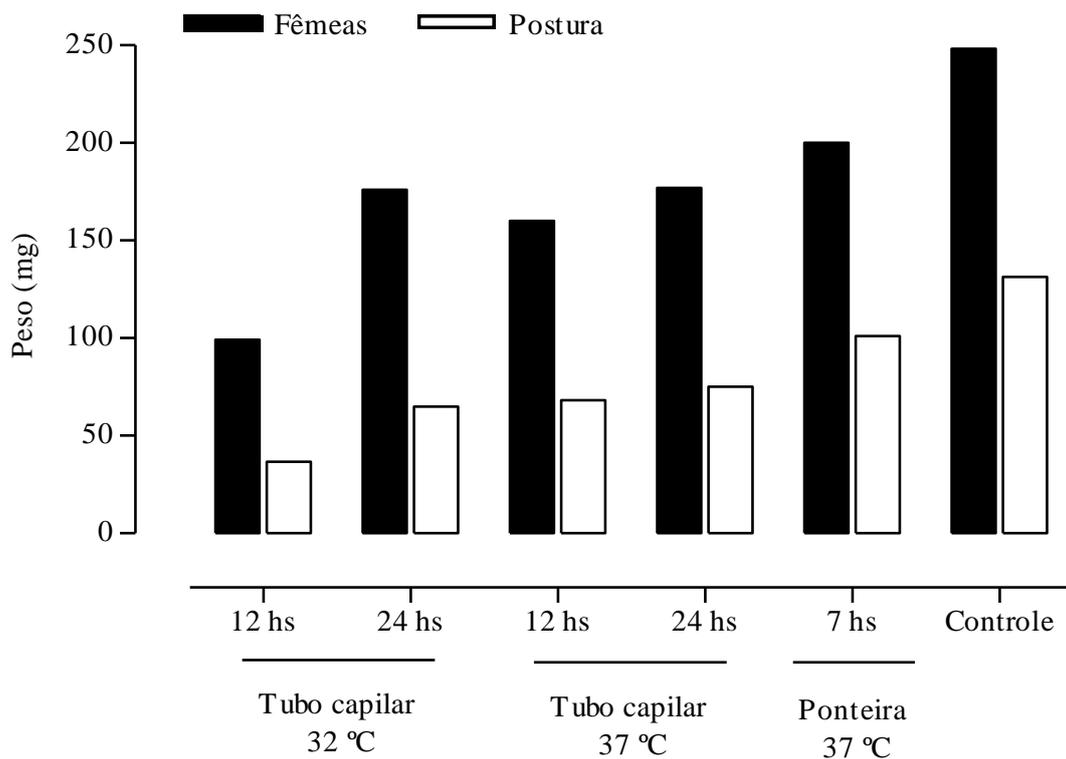


Figura 14. Peso médio das fêmeas alimentadas artificialmente por meio de diferentes dispositivos e temperaturas e o peso médio de suas respectivas massas de ovos.

O índice médio de produção de ovos dos grupos alimentados a 32°C por 12 e 24 horas foi de 34,08% e 36,36%, considerados iguais estatisticamente ($p>0,05$). Estes resultados foram inferiores aos encontrados por Davey et al. (1980), Costa (1982), Benavides (1984), Glória et al. (1993) e Barreira (2001). Os carrapatos do grupo exposto a tubos capilares em ambiente controlado a temperatura de 37°C por 24 horas apresentaram índice médio de 41,87%, não havendo diferença estatística ($p>0,05$) entre este valor e os índices de 36,36% e 47,01% obtidos nos grupos expostos a tubos capilares em estufa à temperatura de 32°C por 24 horas e 37°C por 12 horas, respectivamente. Estes resultados estão de acordo com os reportados por Rangel (2008), em condições semelhantes, que obteve índices médios de produção de ovos de 37,70 e 46,33% nos grupos submetidos à alimentação artificial por meio de tubos capilares por 12 e 24 horas, respectivamente. Nos carrapatos do grupo exposto a ponteiras plásticas por sete horas, o índice médio de produção de ovos encontrado, 50,40%, foi considerado estatisticamente semelhante ($p>0,05$) ao do grupo alimentado por meio de tubos capilares em estufa à temperatura de 37°C por 12 horas e ao índice do grupo controle, que apresentou percentual médio de 52,58%. Os resultados descritos para estes grupos foram semelhantes ao encontrado por Benavides (1984), que verificou percentual médio de produção de ovos de 48,5%. No entanto, este resultado mostrou-se inferior quando confrontado com os valores médios obtidos por Davey et al. (1980) e Bittencourt (1990), os quais encontraram percentuais de 57,95 e 58,50, respectivamente. Assim como os percentuais obtidos por Glória et al. (1993) de 78,70 e 78,60% para carrapatos sensíveis e resistentes a carrapaticidas, respectivamente. As diferenças e semelhanças observadas entre os resultados obtidos neste estudo e na literatura estão diretamente relacionadas às variações encontradas para o peso inicial das fêmeas ingurgitadas e peso da postura dos respectivos experimentos.

O valor médio encontrado para o índice de eficiência reprodutiva foi de 48,53% para o grupo controle, considerado satisfatório quando comparado com outros registros da literatura (DAVEY et al., 1980; BARREIRA, 2001; GLÓRIA et al., 1993) Para as fêmeas dos grupos alimentados por meio de tubos capilares sob temperatura de 32°C e 37°C nos períodos de 12 e 24 horas os índices médios encontrados foram de 29,98; 30,25; 31,15 e 34,15%, respectivamente, considerados estatisticamente inferiores ($p<0,05$) ao índice do grupo controle, evidenciando o efeito, da utilização de tubos capilares sobre a eficiência das fêmeas em converter o sangue ingerido em ovos. Segundo Bennet (1974), a baixa conversão de sangue em ovos não está relacionada ao peso dos carrapatos ingurgitados, mas sim a uma possível falha no mecanismo de concentração do sangue. Assim, os carrapatos alimentados por meio de tubos capilares apresentaram uma maior proporção de plasma e, portanto, um aporte nutricional inferior para produção de ovos do que o restante da população. Nas fêmeas alimentadas por meio de ponteiras plásticas o índice médio de eficiência reprodutiva foi de 40,09%, considerado semelhante ao grupo controle ($p>0,05$). Independente da temperatura, do período e dispositivo de alimentação utilizado, não foi observada diferença estatística ($p>0,05$) entre os grupos experimentais.

O percentual médio de eclosão das larvas originadas das amostras de ovos relacionado ao grupo controle foi de 91,82%. Para as fêmeas alimentadas artificialmente, os percentuais médios observados foram de 88,18; 83,64; 64,55; 80,91 e 80,00%, para os grupos expostos aos tubos capilares em estufa sob temperatura de 32°C e 37°C nos períodos de 12 e 24 horas e para os grupos alimentados por meio de ponteira por sete horas, respectivamente. Na comparação entre os percentuais médios de eclosão larval dos grupos experimentais e o grupo controle não foi encontrada diferenças estatísticas significativas. Apesar das variações observadas nos valores apresentados neste estudo, resultados semelhantes foram propostos

por Costa (1982) e Barreira (1990), que observaram percentuais médios de eclosão de 80 e 89%, respectivamente. Resultados superiores foram encontrados por Glória et al. (1993), que obtiveram percentuais de 100 e 98,33% para fêmeas de *R. microplus* sensíveis e resistentes a carrapaticidas, respectivamente. A semelhança nos resultados dos grupos experimentais e controle indicam que a ingestão de sangue *in vitro* não causou efeito deletério em fêmeas de *R. microplus*.

6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados observados na alimentação artificial de fêmeas parcialmente ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*, pode-se concluir que:

Fêmeas parcialmente ingurgitadas com peso inicial de 40-69mg apresentaram melhor tendência de ganho de peso quando submetidas à alimentação artificial por meio de tubos capilares.

A manutenção das fêmeas parcialmente ingurgitadas em temperatura de $27\pm 1^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa do ar de $80\pm 5\%$ após coleta no hospedeiro vertebrado garantiu a retomada do processo de alimentação *in vitro* por um intervalo de até 12 horas.

Independente se desfibrinado ou diluído em diferentes concentrações dos anticoagulantes citrato de sódio e heparina sódica, o sangue bovino garantiu equivalente grau de ingurgitamento e aspectos biológicos entre as fêmeas.

A alimentação das fêmeas parcialmente ingurgitadas em estufa à temperatura de 37°C e umidade relativa do ar de $80\pm 5\%$ permitiu reduzir o tempo de exposição aos tubos capilares de 24 para 12 horas.

A alimentação das fêmeas parcialmente ingurgitadas, por meio de ponteiras plásticas, com capacidade de $1000\mu\text{L}$, em estufa à temperatura de 37°C e umidade relativa do ar de $80\pm 5\%$ garantiu o ingurgitamento dos espécimes em sete horas.

A alimentação artificial não apresentou efeito deletério sobre os aspectos biológicos da fase não-parasitária desta espécie.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEL, I.; CORRÊA, F. N.; CASTRO, A. A.; CUNHA, N. C.; MADUREIRA, R. C.; FONSECA, A. H. Artificial feeding of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) fasting females through capillary tube technique. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, n. 3, p. 128-132, 2008.

ABEL, I. **Alimentação artificial de fêmeas de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) através de tubos capilares**. 2004. 56f. Tese de Doutorado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro.

ABEL, I.; CORRÊA, F. N.; CASTRO, A. A.; CUNHA, N. C.; RANGEL, C. P.; FONSECA, A. H. Alimentação artificial de fêmeas *Amblyomma cajennense* parcialmente ingurgitadas por meio de tubos capilares. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, (em análise).

ALEKSEEV, A. N. Artificial dosaged feeding of *Ixodes persulcatus* Sch. ticks the main vectors of tickborne encephalitis. **Parazitologiya**, v. 5, n. 5, p. 392-400, 1971.

ALMAZÁN, C.; BLAS-MACHADO, U.; KOCAN, K. M.; YOSHIOKA, J. H.; BLOUIN, E. F.; MANGOLD, A. J.; DE LA FUENTE, J. Characterization of three *Ixodes scapularis* cDNAs protective against tick infestations. **Vaccine**, v. 23, n. 35, p. 4403-4416, 2005.

ALVARADO, R. U.; GONZALES, J. C. A postura e a viabilidade do *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acarina, Ixodidae) em condições de laboratório. **Revista Latino-Americana de Microbiologia**, v.21, n. 1, p.31-36, 1979.

ÁLVAREZ, V.; HERNÁNDEZ, V.; ROMERO, J. J. Fase no parasítica de *Boophilus microplus* (ACARI: IXODIDAE) em condiciones ambientales y de laboratorio en Costa Rica. **Agronomía Costarricense**, v. 31, n. 2, p. 49-56, 2007.

ANDERSON, J. R. Symposium on reproduction of arthropods of medical and veterinary importance. II. Meeting of the sexes. **Journal of Medical Entomology**, v. 11, n. 1, p. 7-19, 1974.

BALASHOV, Y. S. Bloodsucking ticks (Ixodoidea) – vectores of diseases of man and animals. **Miscellaneous publications of the Entomological Society of America**, v. 8, n. 5, p. 162-376, 1972.

BARREIRA, J. D. **Efeito da infecção de *Babesia bovis* (Babes, 1988) e *Babesia bigemina* (Smith; Kilborne, 1893) (Protozoa: Babesiidae) sobre os parâmetros biológicos do carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1893)**. 2001. 138f. Tese de Doutorado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro.

BENAVIDES, O. E. Biologia oviposicional de 1ª garrapata *Boophilus microplus* em condiciones de los Llanos Orientales de Colômbia. **Revista do Instituto Colombiano Agropecuário**, v. 9, n. 1, p. 25-32, 1984.

BENAVIDES, E.; WALKER, A. R. Secreción natural de saliva in la garrapata *Rhipicephalus appendiculatus* (Neumann), alimentada artificialmente en tubos capilares. **Revista Colombiana de Entomología**, v. 1, n. 1, p. 1-7, 1992.

BENNETT, G. F. Oviposition of *Boophilus microplus* (Canestrini) (ACARIDIDA: IXODIDAE): (I. Influence of tick size on egg production). **Acarology**, v. 16, n. 1, p. 52-61, 1974.

BITTENCOURT, A. J. ***Boophilus microplus* (Canestrini, 1887): infestações artificiais, biologia da fase não parasitária e prevalência em caprinos e eqüinos**. 1990. 87f. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro.

BORGES, L. M. F.; CARNEIRO, J. R. C.; GOMES, A. G.; MOREIRA, P. C. **Ciência Animal Brasileira**, v. 2, n. 2, p. 127-131, 2001.

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. **Journal of Infectious Diseases**, v. 100, n. 3, p. 212-214, 1957.

CAMPOS, E.; MORAES, J.; FAÇANHA, A. R.; MOREIRA, E.; VALLE, D.; ABREU, L.; MANSO, P. P. A.; NASCIMENTO, A.; PELAJO-MACHADO, M.; LENZI, H.; MASUDA, A.; VAZ Jr., I. S.; LOGULLO, C. Kinetics of energy source utilization in *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) embryonic development. **Veterinary Parasitology**, v. 138, n. 3-4, p. 349-357, 2006.

CHABAUD, A. G. Sur la nutrition artificielle des tiques. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparee**, v. 25, n. 1-2, p. 42-47, 1950.

COSTA, A. L. **Bioecologia de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acarina: Ixodidae) no Estado do Rio de Janeiro: (Oviposição e sazonalidade, considerações preliminares)**. 1982. 37f. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro.

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

DAVEY, R. B.; GARZA JR., J.; THOMPSON, G. D.; DRUMOND, R. O. Ovipositional biology of the Southern cattle tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) in the laboratory. **Journal of Medical Entomology**, v. 17, n. 2, p. 117-121, 1980.

DAVEY, R. B.; OSBURN, R. L.; MILLER, J. A. Ovipositional and morphological comparisons of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) collected from different geographical areas. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 77, n. 1, p. 1-5, 1984.

DE LA VEGA, R.; DIAZ, G.; FINLAY, L. Artificial Feeding in *Boophilus microplus* (Acari:Ixodidae) through micropipettes. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 916, n. 1, p. 315-319, 2000.

DE LA VEGA, R.; CAMEJO, A.; DÍAZ, G. Dynamics of *Boophilus microplus* (Acari:Ixodidae) female feeding on bovine. **Revista de Salud Animal**, v. 25, n. 3, p. 192-195, 2003.

DE LA VEGA, R.; DÍAZ, G.; CAMEJO, A.; FONSECA, A. H.; RANGEL, C. P. Weight differences between *Boophilus microplus* (Ixodoidea:Ixodidae) from Brazil and from Cuba. **Revista de Salud Animal**, v. 29, n. 1, p. 36-38, 2007.

DIEHL, P. A.; AESCHLIMANN, A.; OBENCHAIN, F. D. Tick reproduction: oogenesis and oviposition. In: OBENCHAIN, F. D.; GALUN, R. **Physiology of Ticks**. Publisher Oxford: Pergamon Press, 1982, p. 277-350.

DOUBE, B. M.; KEMP, D. H. The influence of temperature, relative humidity and host factors on the attachment and survival of *Boophilus microplus* (Canestrini) larvae to skin slices. **International Journal for Parasitology**, v. 9, n. 5, p. 449-454, 1979.

DRUMMOND, R. O., WHETSTONE, T. M., GLADNEY, W. J. Oviposition of the Lone Star Tick. **Annals of Entomological Society of America**, v.64, n.1, p.191-194, 1971.

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.

FONSECA, A. H.; DUTRA, A. E. A.; PINA, I. G. Uso de sangue de frangos e de bovinos na alimentação de *Argas (Persicargas) miniatus* (Koch, 1848) (Acari: Argasidae), através de membrana de silicone. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 6, n. 3, p. 167-170, 1999.

FRIESEN, K. J.; KAUFMAN, W. R. Salivary gland degeneration and vitellogenesis in the ixodid tick *Amblyomma hebraeum*: Surpassing a critical weight is the prerequisite and detachment from the host is the trigger. **Journal of Insect Physiology**, v.55, n. 10, p. 936-942, 2009.

FURLONG, J. **Comportamento de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887), e *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) em infestações consecutivas ou simultâneas em bovinos: análise preliminar de parâmetros biológicos**. 1990. 92f. Tese de Doutorado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro.

GERN, L.; ZHU, Z.; AESCHLIMANN, A. Development of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* females during blood feeding. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparee**, v. 65, n. 1, p. 89–93, 1990.

GERN, L.; TOUTOUNGI, L. N.; HU, C. M.; AESCHLIMANN, A. *Ixodes (Pholeoixodes) hexagonus*, an efficient vector of *Borrelia burgdorferi* in the laboratory. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 5, n. 4, p. 431–435, 1991.

GREGSON, J. D. Notes on some phenomenal feeding of ticks. **Proceedings of the Entomological Society of British Columbia**, v.34, n. 8, p. 8-11, 1937.

GLÓRIA, M. A.; FACCINI, J. L. H.; DAEMON, E.; GRISI, L. Biologia comparativa da fase não parasitária de estirpes de *B. microplus* (Can., 1887) resistente e sensível a carrapaticida em condições de laboratório. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 2, n. 2, p. 79-84, 1993.

GONZALES, J. C.; SILVA, N. R.; WAGNER, E. M. O ciclo parasitário do *Boophilus microplus* (Can. 1887) em bovinos estabulados. **Arquivos da Faculdade de Veterinária, UFRGS**, v. 2, n. 1, p. 25-34, 1974.

GRISI, L.; MASSARD, C. L.; MOYA BORJA, G. E.; PEREIRA, J. B. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. **A Hora Veterinária**, v. 21, n. 125, p. 8-10, 2002.

GUGLIELMONE, A. A.; SZABÓ, M. P. J.; MARTINS, J. R. S.; ESTRADA-PENÑA, A. Diversidade e importância de carrapatos na sanidade animal. In: BARROS-BATTESTI, D. M.; ARZUA, M.; BECHARA, G. H. **Carrapatos de importância médico veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies**. São Paulo: Vox/ICTTD-3 Butantan, 2006. 223p.

HARRIS, R. A.; KAUFMAN, W. R. Neural involvement in the control of salivary gland degeneration in the ixodid tick, *Amblyomma hebraeum*. **Journal of Experimental Biology**, v. 109, n. 1, p. 281-290, 1984.

HITCHCOCK, L. F. Studies on the parasitic stages of the cattle tick, *Boophilus microplus* (CANESTRINI) (ACARINA: IXODIDAE). **Australian Journal of Zoology**, v. 3, n. 2, p. 145-155, 1955.

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.; SIMON, M.; KRAMER, M. D.; GERN L. Tick factors and in vitro cultivation influence the protein profile, antigenicity and pathogenicity of a cloned *Borrelia garinii* 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. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 64, n. 4, p. 509-512, 1998.

INOKUMA, H.; KEMP, D. H.; WILLADSEN, P. Prostaglandin E2 production by the cattle tick (*Boophilus microplus*) into feeding sites and its effect on the response of bovine mononuclear cells to mitogen. **Veterinary Parasitology**, v. 53, n. 3-4, p. 293-299, 1994.

JASINSKAS, A.; JAWORSKI, D. C.; BARBOUR, A. G. *Amblyomma americanum*: specific uptake of immunoglobulins into tick hemolymph during feeding. **Experimental Parasitology**, v. 96, n. 4, p.213-221, 2000.

JONGEJAN, F.; UILENBERG, G. The global importance of ticks. **Parasitology**, v. 129, n. 1, p. S3-S14, 2004.

JOYNER, L. P.; PURNELL, B. E. The feeding behaviour on rabbits and *in vitro* of the Ixodid tick *Rhipicephalus appendiculatus* Neumann, 1901. **Parasitology**, v. 58, n. 1, p. 715-723, 1968.

JOYNER, L. P.; CUNNINGHAM, M. P.; PUERNELL, R. E.; BROW, C. G. D. The duration of emission of infective particles of *Theileria parva* by infected ticks artificially. **Research Veterinary Science**, v. 13, n. 4. p. 402-403, 1972.

KEMP, D. H.; KOUDSTAAL, D.; ROBERTS, J. A.; KERR, J. D. Feeding of *Boophilus microplus* larvae on a partially defined medium through thin slices of cattle skin. **Parasitology**, v. 70, n. 2, p. 243-254, 1975.

KEMP, D. H.; STONE, B. F.; BINNINGTON, K. C. Tick attachment and feeding: Role of the mouthparts, feeding apparatus, salivary gland secretions, and the host response. In: OBECHAIN, F. D.; GALUN, R. **Physiology of ticks**. Publisher Oxford Pergamon Press, United Kingdom, 1982, v. 1, p. 119-167.

KOCAN, K. M.; YOSHIOKA, J.; SONENSHINE, D. E.; DE LA FUENTE, J.; CERAUL, S. M.; BLOUIN, E. F.; ALMAZÁN, C. Capillary tube feeding system for studying tick-pathogen interactions of *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae) and *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae). **Journal of Medical Entomology**, v. 42, n. 5, p. 864-874, 2005.

KRÖBER, T.; GUERIN, P. M. In vitro feeding assays for hard ticks. **Trends in Parasitology**, v. 23, n. 9, p. 445-449, 2007.

LAHILLE, F. Contribución a l'étude des Ixodidés de la República Argentina. **Annals of Ministerio da Agricultura, Buenos Aires**, v. 2, n. 1, p. 1-166, 1905.

LEGG, J. Some observations on the life history of the cattle tick (*Boophilus australis*). **Proceedings of the Royal Society of Queensland**, v. 41, n. 8, p. 121-132, 1930.

LONDT, J. G. H.; ARTHUR, D. R. The structure and parasitic life cycle of *Boophilus microplus* (Canestrini, 1888) in South Africa (Acarina: Ixodida). **Journal of the Entomological Society of South Africa**, v. 38, n. 1, p. 328-340, 1975.

LOOMIS, E. C. Rearing of *Boophilus microplus* (Acarina: Ixodidae) on the laboratory rabbit. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 64, n. 3, p. 598-603, 1971.

LÖSEL, P. M.; GUERIN, P. M.; DIEHL, P. A. Contrasting effects of sera from rabbits and cattle infested with ticks on the *in vitro* feeding performance of the tick *Rhipicephalus appendiculatus*. **Veterinary Parasitology**, v. 47, n. 1-4, p. 355-60, 1993.

LOUZADA, G. L.; DAEMON, E. Efeito da imersão de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* (CANESTRINI, 1887) (ACARI: IXODIDAE) em água destilada sobre os parâmetros biológicos ligados à oviposição. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 12, n. 3, p. 115-120, 2003.

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.

MAGALHÃES, F. E. P. **Aspectos biológicos, ecológicos e de controle do *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) no município de Pedro Leopoldo-MG-Brasil.** 1989. 117f. Tese de Doutorado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro.

McLEAN, L.; KINGSLEY, M. G. A technique for electrically recording aphid feeding and salivation. **Nature**, v.202, p. 1358-1369, 1964.

MELÉNDEZ, R. D.; CORONADO, A.; MUJICA, F.; CERUTTI, F.; MOSQUERA, O. Levels of natural resistance two *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) in Corora breed bulls. **Revista de Biologia Tropical**, v. 46, n. 3, p. 691-696, 1998.

MOURA, S. T.; FONSECA, A. H.; FERNANDES, C. G. N.; BUTLER, J. F. Artificial feeding of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) through silicone membrane. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 92, n. 4, p. 545-548, 1997.

MURRELL, A.; BARKER, S.C. Synonymy of *Boophilus* Curtice, 1891 with *Rhipicephalus* Kock 1844 (Acari: Ixodidae), **Systematic Parasitology**, v.56, n.1, p. 169-172, 2003.

NAGAR, S. K. On the significance of the duration of preoviposition and oviposition periods in ixodid ticks. **Acarologia**, v. 10, n. 4, p. 621-629, 1968.

OLIVER Jr., J. H. Symposium on reproduction of arthropods of medical and veterinary importance. IV. Reproduction on ticks (Ixodoidea). **Journal of Medical Entomology**, v. 11, n. 1, p. 26-34, 1974.

PEREIRA, M. C.; LABRUNA, M. B.; SZABÓ, M. P. J.; KLAFKER, G. M. ***Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: biologia, controle e resistência.** São Paulo: MedVet, 2008. 169p.

PIERCE, A. E.; PIERCE, M. H. A note on the cultivation of *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Ixodidae: Acarina) on the embryonated hen egg. **The Australian Veterinary Journal**, v. 32, n. 6, p. 144-146, 1956.

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

PURNELL, R. E.; SANSOM, B. F.; SELLWOOD, S. A. Uptake of 3 H-thymidine during artificial feeding of *Rhipicephalus appendiculatus* ticks infected with *Theileria parva*. **Research in Veterinary Science**, v. 13, n. 1, p. 102-103, 1972.

PRUETT, J. H.; OLAFSON, P. U.; DAVEY, R. B. Serologically defined *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* larval antigens in BmLF3, a partially pure Sephacryl S-300 fraction of crude larval proteins. **Veterinary Parasitology**, v. 155, n. 3-4, p. 264-272, 2008.

RANGEL, C. P. **Alimentação artificial de fêmeas parcialmente ingurgitadas de *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) por meio de tubos capilares**. 2008. 34f. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro.

RANGEL, C. P.; CUNHA, N. C.; REZENDE, J.; SILVA, F. J. M.; CORRÊA, F. N.; TEIXEIRA, R. C.; SILVA, J. B.; BAÊTA, B. A. FONSECA, A. H. Alimentação artificial por meio de tubos capilares de fêmeas parcialmente ingurgitadas do carrapato *Dermacentor* (*Anocentor*) *nitens*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, supl. 1, p. 35-39, 2008.

RAU, U.; HANNOUN, C. The use of a capillary-tube technique for artificially feeding *Argas reflexus reflexus* ticks. **Bulletin of World Health Organization**, v. 39, n. 4, p. 414-419, 1968.

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.

RIEK, R. F. Studies on the reaction of animals to infestation with ticks. V. Laboratory animals as hosts for the cattle tick, *Boophilus microplus* (Canestrini). **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 10, n. 4, p. 614-619, 1959.

RIEK, R. F. The cattle tick and tick fever. **Australian Veterinary Journal**, v. 41, n. 7, p. 211-215, 1965.

SAKAI, R. K. **Alimentação artificial de fêmeas de *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) por meio de tubos capilares**. 2010. 36f. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro.

SAMPAIO, I. B. M. Testes estatísticos para comparação de médias. In: SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. 2.ed. Belo Horizonte: Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2002. 256p.

SOARES, C. A. G.; LIMA, C. M. R.; DOLAN, M. C.; PIESMAN, J.; BEARD, C. B.; ZEIDNER, N. S. Capillary feeding of specific dsRNA induces silencing of the *isac* gene in nymphal *Ixodes scapularis* ticks. **Insect Molecular Biology**, v. 14, n. 4, p. 443–452, 2005.

SONENSHINE, D. E. The midgut. In: SONENSHINE, D. E. **Biology of Ticks**. Publisher Oxford University Press, New York, 1991, v. 1, p. 159-185.

STONE, B. F. Parthenogenesis in the cattle tick, *Boophilus microplus*. **Nature**, v. 200, n. 4912, p. 1233, 1963.

SUTHERST, R. W.; WHARTON, R. H.; UTECH, K. B. W. **Guide to studies on tick ecology**. Austrália: CSIRO, 1978, 59p.

TATCHELL, R. J.; CARNELL, R.; KEMP, D. H. Electrical studies on the feeding of the cattle tick, *Boophilus microplus*. **Zeitschrift für Parasitenkunde**, v. 38, n. 1, p. 32-44, 1972.

TOUTOUNGI L. N.; GERN L. Ability of transovarially and subsequent transstadially infected *Ixodes hexagonus* ticks to maintain and transmit *Borrelia burgdorferi* in the laboratory. **Experimental and Applied Acarology**, v. 17, n. 8, p. 581–586, 1993.

WALKER, A. R.; BROWN, C. G. D.; BELL, L. J.; MCKELLAR, S. B. Artificial infection of the tick *Rhipicephalus appendiculatus* with *Theileria parva*. **Research in Veterinary Science**, v. 26, n. 1, p. 264-265, 1979.

WALADDE, S. M.; YOUNG, A. S.; MORZARIA, S. P. Artificial Feeding of Ixodid Ticks. **Parasitology Today**, v. 12, n. 7, p. 272-278, 1996.

WHARTON, R. H.; UTECH, K. B. W. The relation between engorgement and dropping of *Boophilus microplus* (Canestrini) (Ixodidae) to the assessment of tick numbers on cattle. **Journal of Australian Entomology Society**, v. 9, n. 3, p. 171-182, 1970.

WILLADSEN, P.; KEMP, D. H.; MCKENNA, R. V. Bloodmeal ingestion and utilization as a component of host specificity in the tick, *Boophilus microplus*. **Journal Parasitology Research**, v.70, n.3, p. 415–420, 1984.