

**UFRRJ**

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

**TESE**

**Estudos biológicos e moleculares de  
*Amblyomma parvum* Aragão, 1908 (Acari:  
Ixodidae) da Argentina e Brasil**

**Michele da Costa Pinheiro**

**2015**



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

**ESTUDOS BIOLÓGICOS E MOLECULARES  
DE *Amblyomma parvum* ARAGÃO, 1908 (ACARI:  
IXODIDAE) DA ARGENTINA E BRASIL**

**MICHELE DA COSTA PINHEIRO**

*Sob a Orientação da Professora*

**Kátia Maria Famadas**

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

Seropédica, RJ

Fevereiro de 2015

595.429

P654e

T

Pinheiro, Michele da Costa, 1980-  
Estudos biológicos e moleculares  
de *Amblyomma parvum* Aragão, 1908  
(Acari: Ixodidae) da Argentina e  
Brasil / Michele da Costa Pinheiro.  
- 2015.

107 f.: il.

Orientador: Kátia Maria Famadas.  
Tese (doutorado) - Universidade  
Federal Rural do Rio de Janeiro,  
Curso de Pós-Graduação em Ciências  
Veterinárias, 2015.

Inclui bibliografia.

1. *Amblyomma* - Teses. 2.  
Carrapato - Brasil - Teses. 3.  
Carrapato - Argentina - Teses. 4.  
Parasitologia veterinária - Teses.  
I. Famadas, Kátia Maria, 1961- 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~~

~~MICHELE DA COSTA PINHEIRO~~

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

~~TESE APROVADA EM 23/02/2015~~

---

---

~~Dra. Kátia Maria Famadas – UFRRJ  
(Orientadora)~~

---

---

~~Dr. Huarrisson Azevedo Santos – UFRRJ~~

---

---

~~Dra. Eliane Mattos Piranda – UFMS~~

---

---

~~Dr. Fabio Barbieri – Embrapa Rondônia~~

---

---

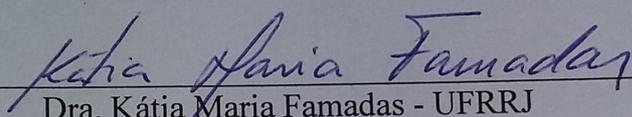
~~Dra. Márcia Cristina de Azevedo Prata – Embrapa Gado de Leite~~

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

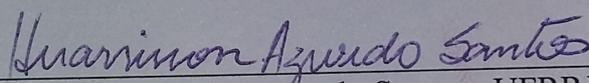
MICHELE DA COSTA PINHEIRO

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

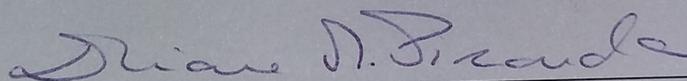
TESE APROVADA EM 23/02/2015



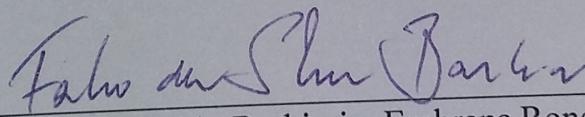
Dra. Kátia Maria Famadas - UFRRJ  
(Orientadora)



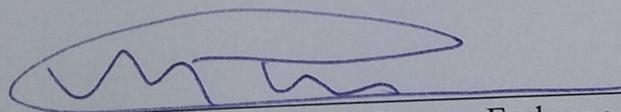
Dr. Huarrisson Azevedo Santos - UFRRJ



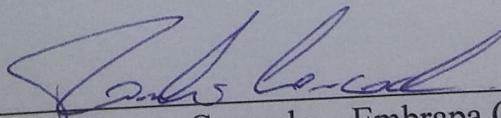
Dra. Eliane Mattos Piranda - UFMS



Dr. Fabio Barbieri – Embrapa Rondônia



Dra. Márcia Cristina de Azevedo Prata – Embrapa Gado de Leite



Dr. Paulo Henrique Duarte Cançado – Embrapa Gado de Corte

Dedico esse trabalho à minha família e amigos. Obrigada por acreditarem em mim e me apoiarem principalmente nos momentos de cansaço e desânimo.

“Senhor dá-me sabedoria e não conhecimentos. Ou dá-me conhecimentos que me levem à sabedoria.” Etty Hillesum

## AGRADECIMENTOS

*“A vida está cheia de surpresas e de momentos inesquecíveis, por isso quando conseguir alcançar seus sonhos, não se esqueça de olhar ao seu redor para dizer obrigado a todos aqueles que de alguma maneira te deram a mão para que pudesse chegar onde você está.”*

Maite Perroni

À Deus, por me guiar em todas as escolhas de minha vida e ajudando a superar todas as pedras em meu caminho.

À minha família, que me ajudou a superar momentos difíceis apoiando e incentivando minhas decisões, especialmente minha mãe, pelo carinho, respeito e confiança em mim depositados. Amo vocês!!!

À minha orientadora, Doutora Kátia Maria Famadas, pela orientação e pela amizade. Pela sua compreensão, paciência e dedicação a mim e a todos da equipe.

Ao professor e Doutor Douglas McIntosh pela ajuda nas técnicas de biologia molecular nos estudos da presente tese.

À todos os estagiários do Laboratório de Ixodologia e Morfofisiologia de Ácaros, Leonardo Coutinho, Laura Ribeiro, Amanda Rodrigues, Liliam Nascimento, Ana Paula Prevides, Fernanda Mendes, pelo apoio e colaboração não importando se tinha que trabalhar nos fins de semana ou feriados.

Às doutorandas Elizabete Captivo Lourenço, Iwine Joyce Sá-Hungaro, Isis Daniele Alves Costa-Santolin, que sempre estiveram dispostas a me ajudar em qualquer hora, qualquer dia e em qualquer momento.

Aos “morcegóides” Renan Dias, Priscilla Patrício, Luis Gomes, Kelly Freitas, Luiza Prado pelos momentos de trabalho na coleta de campo e os bons momentos de descontração na madrugada.

À amiga e doutora Vanessa Raia, que mesmo de longe continua sendo sempre minha eterna “co-orientadora”.

À grande amiga Carla Carolina Ribeiro pelos momentos que dividimos, pela confiança que construímos, e por todo carinho à nossa amizade.

À Tassia Furtado e Isabela Leite por terem tido paciência para me explicar toda a rotina do laboratório de Biologia Molecular.

Aos amigos e doutores Paulo Cançado e Eliane Piranda pela estadia em sua casa e por vários ensinamentos. Sempre foram um dos meus exemplos a seguir.

Ao Dr. Matias Pablo Juan Szabó e Maria Marlene Olegário pelos carrapatos cedidos para o estudo.

Ao Dr. Raimundo Wilson de Carvalho, Adilson Benedito de Almeida e Michel Santos pela ajuda no projeto inicial de minha tese.

Aos professores José Luis Luque Alejos e Maria de Lurdes Azevedo Rodrigues pelos conselhos e sempre dispostos a colaborar.

Aos funcionários da Embrapa Pantanal e Embrapa Gado de Corte por proporcionarem minha ida a Nhecolândia para coleta de carrapatos.

Ao Dr. Santiago Nava e Alberto Guglielmone do Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuária, Argentina pelas discussões científicas, ensinamentos e pelo exemplo de profissionalismo e dedicação à pesquisa.

À Profa. Maria P.A.L. de Crespi e o Sr. Pedro Timóteo, do Departamento de Produção Animal, Instituto de Zootecnia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro pela cessão dos coelhos utilizados nos experimentos.

À Evelina Tarragona pela hospedagem e amizade que adquirimos durante os quatro meses que vivi em Rafaela para realização do doutorado-sanduíche. ¡Gracias cariño!

Aos grandes amigos do Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UFRRJ, pelos momentos de estudos compartilhados e nos momentos de descontração.

Aos meus amigos de comunidade pastoral, que sempre entenderam e aceitaram minhas ausências e que sempre estiveram orando por mim.

Aos meus amigos da “Família STS”, Elaine Gurgel, Ciro Gaspar, Juliana Zanotteli, Evanil Junior, Cezar Quitiba, Igor Correia, Thales Laiza pelos momentos de descontração quando eu mais precisava.

Aos funcionários da Estação de Parasitologia Veterinária W.O. Neitz e do Departamento de Parasitologia Animal da UFRRJ, pelo auxílio na manutenção dos animais e colaboração sempre que necessária.

Aos animais, que mesmo sem escolha, foram essenciais para a realização deste estudo.

A CAPES e FAPERJ pelo apoio financeiro ao projeto e pela concessão de bolsa durante o curso de Doutorado e a todos os cidadãos que pagam seus impostos em dias.

A todos que, mesmos não citados aqui, sabem que, de alguma forma, colaboraram para o sucesso desta empreitada.

## **BIOGRAFIA**

Michele da Costa Pinheiro, filha de Wilson Soares Pinheiro e Ana Maria de Jesus da Costa Pinheiro, nasceu no dia 8 de outubro de 1980, na cidade do Rio de Janeiro. Concluiu o ensino fundamental em 1995 na Escola Municipal Cecília Meireles. Em 1998 concluiu o ensino médio no Colégio Estadual Olavo Bilac.

Em 2003, ingressou na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro no curso de Zootecnia onde obteve o título de Bacharel em Zootecnia em 2008. Durante o período acadêmico realizou estágios em diversos setores no Instituto de Zootecnia e no Laboratório de Morfofisiologia de Ácaros e Ixodologia pertencentes ao Departamento de Parasitologia Animal do Instituto de Veterinária.

Em 2009, ingressou no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias na mesma universidade, e obteve o título de Mestre em Ciências em fevereiro de 2011.

Em março de 2011, ingressou no doutorado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, onde foi bolsista da CAPES até o presente momento.

Em agosto de 2014, com auxílio do Programa Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE/CAPES) a aluna foi analisar seus resultados moleculares no Instituto Nacional de Tecnología Agropecuária (EEA-Rafaela), Argentina sob a orientação do Doutor Santiago Nava.

Durante os anos de doutorado, a autora se dedicou integralmente as atividades relacionadas ao desenvolvimento de sua tese, participando de diversas linhas de pesquisas do Laboratório de Artrópodes Parasitos e participou de congressos nacionais e internacionais e de publicações em periódicos com fator de impacto.

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

**Tabela 1** – Parâmetros biológicos da fase parasitária e não parasitária de fêmeas ingurgitadas de três populações de *Amblyomma parvum*, mantidas em câmaras climatizadas reguladas a temperatura de 27°C, 80±10% UR e escotofase. Na sequência: média e desvio padrão; amplitude de variação. **30**

**Tabela 2** – Parâmetros biológicos da fase parasitária e não parasitária de larvas ingurgitadas de três populações de *Amblyomma parvum*, mantidas em câmaras climatizadas reguladas a temperatura de 27°C, 80±10% UR e escotofase. Na sequência: média e desvio padrão; amplitude de variação. **31**

**Tabela 3** – Parâmetros biológicos da fase parasitária e não parasitária de ninfas ingurgitadas de três populações de *Amblyomma parvum*, mantidas em câmaras climatizadas reguladas a temperatura de 27°C, 80±10% UR e escotofase. Na sequência: média e desvio padrão; amplitude de variação. **32**

**Tabela 4** – Parâmetros biológicos de ovos de três populações de *Amblyomma parvum*, mantidas em câmaras climatizadas reguladas a temperatura de 27°C, 80±10% UR e escotofase. Na sequência: média e desvio padrão; amplitude de variação. **33**

### CAPÍTULO II

**Tabela 1** – Parâmetros biológicos da ecdise de ninfas de três populações de *Amblyomma parvum* imersas em água destilada por diferentes períodos. Dados expressos em média; desvio padrão e amplitude de variação. **56**

**Tabela 2** - Número de fêmeas de *Amblyomma parvum* recuperadas após alimentação em coelhos domésticos e fêmeas que realizaram postura. **59**

**Tabela 3** - Parâmetros biológicos de adultos de três populações de *Amblyomma parvum* provenientes de ninfas imersas em água destilada por diferentes períodos. Dados expressos em média; desvio padrão e amplitude de variação. **60**

**Tabela 4** – Parâmetros biológicos da ecdise de larvas de três populações de *Amblyomma parvum* após imersão das ninfas em água destilada por diferentes períodos. Dados expressos em média; desvio padrão e amplitude. **61**

### **CAPÍTULO III**

**Tabela 1** – Dados dos espécimes de *Amblyomma parvum* utilizados no presente estudo. **85**

**Tabela 2** - Iniciadores, mistura para PCR e condições do ciclo da PCR utilizado para amplificação do 12S rDNA mitocondrial **86**

**Tabela 3** - Iniciadores, mistura para PCR e condições do ciclo da PCR utilizado para amplificação do Cytochrome oxidase I mitocondrial (COI) **87**

**Tabela 4** - Iniciadores, mistura para PCR e condições do ciclo da PCR utilizado para amplificação do nuclear ribosomal internal transcribed spacer 2 (ITS2) **88**

## LISTA DE FIGURAS

### CAPITULO I

**Figura 1**– *Amblyomma parvum* ninfas (A) e adults (B) alimentados em *Oryctolagus cuniculus*; fêmeas fixadas em placa de Petri para realização de postura (C) e detalhe das fêmeas em postura (D).

26

### CAPÍTULO II

**Figura 1** – Ninfas ingurgitadas de *Amblyomma parvum*: A, sendo acondicionadas em frascos com água destilada. B, grupo de exemplares do tratamento de 96 horas em Beker de vidro repleto com água destilada para evitar evaporação ou formação de bolhas. C, ninfas sobre papel filtro para secagem. D, ninfas em tubos de ensaio para observação da emergência dos adultos. Fotos: Pinheiro, 2013

53

**Figura 2** – Fluxograma experimental com resumos das etapas do estudo

54

**Figura 3** – Dados referentes ao estágio ninfal, Período de pré-ecdise (A); período de ecdise (B); porcentagem de ecdise (C). Dados expressos em média e desvio padrão.

57

**Figura 4** – Ninfas ingurgitadas de *Amblyomma parvum* imersas apresentando no conteúdo do tubo a presença de traços de um líquido avermelhado semelhante a sangue, após cerca de uma semana de imersão. Fotos: Pinheiro, 2013.

58

## LISTA DE QUADRO

### CAPITULO I

**Quadro 1**– Períodos médios dos parâmetros biológicos de *Amblyomma parvum* resultantes de infestações em coelhos, mantidos em estufa tipo BOD a 27°C e 85%UR encontrados na literatura.

38

## LISTA DE ABREVIações E SÍMBOLOS

<b>%</b>	Por cento
<b>°C</b>	Graus Celsius
<b>µL</b>	Microlitros
<b>BOD</b>	“Biochemical Oxygen Demand” – Demanda bioquímica de oxigênio
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>et al</b>	“et alli” – e colaboradores
<b>g</b>	gramas
<b>IEN</b>	Índice de Eficiência Nutricional
<b>IER</b>	Índice de Eficiência Reprodutiva
<b>Lat</b>	Latitude
<b>INTA</b>	Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuária
<b>mg</b>	Miligramas
<b>mL</b>	Microlitros
<b>mm</b>	Milímetros
<b>mM</b>	Milimolar
<b>ng</b>	Nanograma
<b>pb</b>	pares de bases
<b>PCR</b>	“Polymerase Chain Reaction” – Reação em Cadeia da Polimerase
<b>pmoles</b>	picomoles
<b>S</b>	“South” – Sul
<b>UFRRJ</b>	Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
<b>UR</b>	Umidade Relativa
<b>W</b>	“West” – Oeste

## RESUMO GERAL

PINHEIRO, Michele da Costa. **Estudos biológicos e moleculares de *Amblyomma parvum* Aragão, 1908 (Acari: Ixodidae) da Argentina e Brasil.** 2015. 107p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2015.

É de suma importância o conhecimento sobre características ecológicas em diferentes biomas e como cada população se comporta frente a adversidades do meio em que vive. Tem-se observado que algumas espécies de carrapatos amplamente distribuídos podem apresentar diferenças genética e/ou biológicas entre as populações. O carrapato *Amblyomma parvum* possui uma ampla distribuição Neotropical com uma lista extensa de hospedeiros. Para tentar elucidar essas lacunas sobre o assunto, estudos foram desenvolvidos nos Laboratórios de Ixodologia e Biologia Molecular do Departamento de Parasitologia Animal da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Ao comparar o ciclo biológico deste parasito proveniente de três colônias de distintas localidades (Pantanal Sul-matogrossense, Cerrado goiano e Chaco argentino) observou-se que o ciclo completo de *A. parvum* foi completado em um período médio de 104,2; 99,6 e 100,7 dias para os biomas Pantanal, Chaco e Cerrado respectivamente. Conclui-se que os parâmetros biológicos das três populações são bastante semelhantes. Também não é totalmente compreendido como artrópodes terrestres sobrevivem às inundações temporárias que seguem fortes chuvas então o objetivo do segundo capítulo foi comparar o efeito da imersão sob o ciclo de vida a fim de responder como o estresse hídrico pode afetar e/ou alterar a eficiência reprodutiva. Pode-se observar que a população Pantanal demonstrou ser mais sensível em relação à imersão mesmo tendo a observação de ecdise no grupo 96 horas. Apesar disso no grupo 48 horas da população Pantanal não houve continuação do ciclo enquanto que as populações Chaco e Cerrado continuaram seu ciclo mesmo depois que as ninfas permanecerem 48 horas submersas. Pode-se observar que a partir de 72 horas a imersão causa um efeito deletério para essa espécie. Os resultados aqui relatados sugerem que a capacidade de sobreviver submersos por um período é um aspecto adicional da biologia dessa espécie de carrapato. No que diz respeito à análises moleculares na literatura foi demonstrado divergência genética (3,0 a 3,7%) entre *A. parvum* argentinos e brasileiros. No entanto, a análise de apenas um gene não é suficiente para fazer inferências robustas sobre a significância das diferenças genéticas entre diferentes populações, então novas sequências de marcadores moleculares obtidas a partir de *A. parvum* pertencentes a diferentes localidades da Argentina e Brasil, foram analisadas. Para o gene 12S e COI houve uma diferença significativa a ponto de considerá-las como espécies distintas na América do Sul, 3,8% e 7,1% respectivamente. Mas ao observarmos os resultados para o gene ITS2 não houve diferença suficiente para caracterizar espécies diferentes. Diante desses resultados biológicos e moleculares são recomendáveis novas análises com novas amostras de novas localidades, a fim de elucidar essa dúvida sobre a possibilidade desse gênero da América do Sul ser espécies diferentes.

**Palavras - chave:** biologia, imersão, carrapato

## GENERAL ABSTRACT

PINHEIRO, Michele da Costa. **Biological and molecular studies of *Amblyomma parvum* Aragão, 1908 (Acari: Ixodidae) in Argentina and Brazil** [Estudos biológicos e moleculares de *Amblyomma parvum* Aragão, 1908 (Acari: Ixodidae) da Argentina e Brasil]. 2015. 107p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2015.

It is extremely important the knowledge about ecological characteristics in different biomes and how each population behaves to adversities of the environment they live in. It has been observed that some tick species widely distributed may have genetic and / or biological differences between populations. The tick *Amblyomma parvum* has a wide distribution Neotropical with an extensive list of hosts. To try to elucidate these gaps on the subject, studies were developed in Laboratório de Ixodologia and Biologia Molecular in Departamento de Parasitologia Animal in Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. When comparing the life cycle of this parasite from three colonies of different locations (Pantanal Sul-matogrossense, Cerrado, Goiás and Chaco, Argentina) it was observed that the complete cycle of *A. parvum* was completed in an average period of 104.2; 99.6 and 100.7 days for the Pantanal, Chaco and Cerrado respectively. We conclude that the biological parameters of the three populations are quite similar. It is also not fully understood as terrestrial arthropods survive the temporary flooding following heavy rains then the purpose of the second chapter was to compare the effect of immersion in the life cycle in order to respond to water stress can affect and/or changes in the reproductive efficiency. It can be observed that the Pantanal population was more sensitive to immersion even though the observation ecdysis in group 96 hours. Despite this in group 48 of the Pantanal population there was no continuation of the cycle while the Chaco and Cerrado populations continued its cycle even after the nymphs remain submerged 48 hours. It can be observed that from 72 hours immersion causes a deleterious effect on this species. The results reported here suggest that the ability to survive underwater for a period is a additional aspect of the biology of this species of tick. With respect to the molecular analysis was demonstrated in literature genetic divergence (3.0 to 3.7%) of *A. parvum* Argentinean and Brazilian. However, analysis of a single gene is not robust enough to make inferences about the significance of the genetic differences between different populations, so new sequences of molecular markers obtained from *A. parvum* belonging to different locations in Argentina and Brazil have been evaluated. Results for the genes 12S and COI there was a significant difference point of to consider them as distinct species in South America, 3.8% and 7.1% respectively. But when we observe the results for the ITS2 gene there was not enough difference to characterize different species. View of these biological and molecular results are recommended further analysis with new samples of new locations in order to elucidate this question about the possibility of this kind in South America be different species.

**Key words:** biology, immersion, tick

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO GERAL</b>	<b>1</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>3</b>
2.1. Importância de estudar carrapatos	3
2.2. Taxonomia	3
2.3. Gênero <i>Amblyomma</i>	4
2.4. <i>Amblyomma parvum</i> Aragão, 1908: distribuição geográfica e hospedeiros	4
2.5. Doenças transmitidas por <i>Amblyomma parvum</i>	6
<b>3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>7</b>

### CAPÍTULO I

<b>Parâmetros biológicos de três populações de <i>Amblyomma parvum</i> Aragão, 1908 (Acari: Ixodidae) em condições de laboratório.</b>	<b>15</b>
--	-----------

<b>RESUMO</b>	<b>17</b>
---------------	-----------

<b>ABSTRACT</b>	<b>19</b>
-----------------	-----------

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>21</b>
---------------------	-----------

<b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>23</b>
-----------------------------	-----------

2.1. Local de Execução	23
------------------------	----

2.2. Hospedeiros	23
------------------	----

2.3. Características do bioma de origem das colônias dos carrapatos	23
---	----

2.4. <i>Amblyomma parvum</i>	24
------------------------------	----

2.5. Procedimento Experimental	24
--------------------------------	----

2.5.1. Fase de larvas e ninfas	25
--------------------------------	----

2.5.2. Fase adulta	25
--------------------	----

2.6. Avaliação do potencial biótico em condições experimentais	27
--	----

2.6.1. Fêmeas ingurgitadas	27
----------------------------	----

2.6.2. Ovo	27
------------	----

2.6.3. Larvas e Ninfas	27
------------------------	----

2.7. Análise Estatística	28
--------------------------	----

2.8. Aprovação do Comitê de Bioética e Biossegurança	28
--	----

<b>3 RESULTADOS</b>	<b>29</b>
---------------------	-----------

<b>4 DISCUSSÃO</b>	<b>35</b>
--------------------	-----------

<b>5 CONCLUSÃO</b>	<b>37</b>
--------------------	-----------

<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>39</b>
-------------------------------------	-----------

### CAPÍTULO II

<b>Viabilidade de ninfas ingurgitadas de <i>Amblyomma parvum</i> Aragão, 1908 (Acari: Ixodidae) imersas em água destilada.</b>	<b>43</b>
--	-----------

<b>RESUMO</b>	<b>45</b>
---------------	-----------

<b>ABSTRACT</b>	<b>47</b>
-----------------	-----------

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>49</b>
---------------------	-----------

<b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>51</b>
-----------------------------	-----------

2.1. Origem dos hospedeiros	51
-----------------------------	----

2.2. Colônias de estudo	51
-------------------------	----

2.3. Protocolo experimental	51
-----------------------------	----

2.4. Análise estatística	52
--------------------------	----

2.5. Aprovação do Comitê de Bioética e Biossegurança	52
--	----

<b>3 RESULTADOS</b>	<b>55</b>
<b>4 DISCUSSÃO</b>	<b>63</b>
<b>5 CONCLUSÃO</b>	<b>67</b>
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>69</b>
<b>CAPÍTULO III</b>	
<b>Caracterização molecular de <i>Amblyomma parvum</i> Aragão, 1908 (Acari: Ixodidae) da Argentina e Brasil usando marcadores nucleares e mitocondriais.</b>	<b>75</b>
<b>RESUMO</b>	<b>77</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>79</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>81</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>83</b>
2.1. Amostragem	<b>83</b>
2.2. Extração de DNA e PCR	<b>83</b>
2.3. Sequenciamento	<b>84</b>
<b>3 RESULTADOS</b>	<b>89</b>
<b>4 DISCUSSÃO</b>	<b>91</b>
<b>5 CONCLUSÃO</b>	<b>93</b>
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>95</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>99</b>
<b>ANEXOS</b>	
<b>Anexo A – Pasta Una - Protocolo</b>	<b>101</b>
<b>Anexo B - Parecer da Comissão de Ética na Pesquisa da UFRRJ/COMEP para realização de estudos utilizando coelhos domésticos para o capítulo I</b>	<b>103</b>
<b>Anexo C - Parecer da Comissão de Ética na Pesquisa da UFRRJ/COMEP para realização de estudos utilizando coelhos domésticos para o capítulo II</b>	<b>105</b>
<b>Anexo D – Publicação referente à tese</b>	<b>107</b>



## 1 INTRODUÇÃO GERAL

De ampla distribuição Neotropical, o carrapato *Amblyomma parvum* Aragão 1908 é capaz de se alimentar em várias espécies animais, inclusive o homem, além de ser potencial reservatório e/ou vetor de patógenos. Populações de *A. parvum* da Argentina e Brasil apresentam divergência genética significante e relatos de espécies hospedeiras contrastantes.

Os carrapatos parecem ter a capacidade de se adaptarem às adversidades dependendo do bioma em que habitam, as quais podem ser referentes aos hospedeiros, períodos de parasitismo, preferências por ambiente para postura e muda.

Como espécie que possui distribuição geográfica ampla, *A. parvum* é passível de apresentar variabilidades anatômicas, fisiológicas e de comportamento. Em espécies de importância econômica e/ou saúde coletiva, o conhecimento aprofundado das características inerentes às populações que a compõem é de fundamental importância no que tange a determinados aspectos epidemiológicos, visto que podem ter comportamento diferenciado em relação à especificidade parasitária, capacidade vetorial e plasticidade na ocupação de ecossistemas. Apesar da ampla distribuição observada em *A. parvum*, pouco se conhece sobre suas características ecológicas nos diferentes biomas que habita e como cada população se comporta frente às adversidades do meio em que vive como, por exemplo, períodos de alagamento no ambiente durante a fase não parasitária. Mas as preferências ecológicas deste carrapato só se tornarão claras, quando estudos adicionais e com uma resolução biogeográfica melhor forem realizados.

No Brasil não há relatos do envolvimento de *A. parvum* com algum agente causador de doença para animais e humanos, mas devido à alta densidade desse carrapato na vegetação, em animais tanto doméstico como silvestre e até mesmo em humanos, suscita que poderá se tornar uma espécie importante como parasita ou agente transmissor de agentes como já pode ser observado na Argentina.

Pesquisas sobre bioecologia de carrapatos de animais domésticos e silvestres vêm sendo desenvolvidas nos Laboratórios de Ixodologia e Morfofisiologia de Ácaros do Departamento de Parasitologia Animal da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), há vários anos. Recentemente em colaboração com os laboratórios de Biologia Molecular da UFRRJ e com o Instituto Nacional de Tecnología Agropecuária (INTA- Argentina) essa tese foi desenvolvida como objetivo geral de aprofundar o conhecimento relacionado às populações de *A. parvum* que ocorrem em três biomas distintos, Chaco argentino, Pantanal e Cerrado no Brasil. Para maior compreensão e análises a tese foi elaborada em três capítulos a seguir.

No CAPÍTULO I, cujo objetivo geral foi comparar o ciclo biológico de três populações de *A. parvum* mantidas em laboratório.

No CAPÍTULO II, o efeito da imersão sob o ciclo de vida foi realizado a fim de responder como o estresse hídrico pode afetar e/ou alterar a eficiência reprodutiva de três populações de *A. parvum*.

No CAPÍTULO III, foram realizadas análises filogeográficas de *A. parvum* de diversas localidades do Brasil e Argentina.



## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Importância de estudar carrapatos

Carrapatos possuem a capacidade de transmitir uma grande variedade de agentes infecciosos, tais como vírus, bactérias, protozoários e helmintos (SONENSHINE et al., 2002), e só perdem para os mosquitos como os principais transmissores de agentes patogênicos para os homens (HOSKINS; CUPP, 1988; KOCAN et al. 2011). Representam importância extrema relacionada com o parasitismo nas regiões tropicais e subtropicais, por possuírem uma ampla distribuição e grande relevância econômica e sanitária na produção animal e saúde pública atraindo uma grande atenção científica. De fato, as doenças transmitidas por carrapatos estão entre as doenças infecciosas e parasitárias mais importantes de animais domésticos e seres humanos em todo o mundo e um número de novos agentes patogênicos foram descobertos nos últimos anos (NICHOLSON et al. 2010). Transmitem inúmeras arboviroses (por exemplo, o vírus da encefalite transmitida por carrapatos e outros como os da família Flaviviridae, Reoviridae, Bunyaviridae e Iridoviridae), bactérias (*Rickettsia*, *Ehrlichia*, *Borrelia*) e protozoários (*Babesia* e *Theileria*) (FRASER; MAYS, 1986; SONENSHINE, 1993; LEMOS et al., 1996). A manutenção de patógenos nestes ácaros pode ser transestadial e/ou transovariana (AESCHLIMANN, 1991), o que lhes permite permanecerem infectados durante toda sua vida e também por muitas gerações após uma infecção primária.

Podemos acrescentar ainda que carrapatos podem causar perdas econômicas significativas para a indústria pecuária em todo o mundo. Essas perdas, que foram estimadas em cerca de US\$ 3,24 bilhões por ano só no Brasil (GRISI et al., 2014) são principalmente o resultado do esgotamento do sangue, transmissão de patógenos, e os custos dos programas de controle, fora as lesões macroscópicas que consistem em erosões focais, eritema, úlceras crostosas com alopecia e nódulos (JONSSON, 2006).

### 2.2. Taxonomia

Carrapatos são pertencentes ao Filo Arthropoda (Latreille, 1829), Sub-filo Chelicerata, Classe Arachnida (Latreille, 1829), Sub-classe Acari (Leach, 1817), Ordem Ixodida (Leach, 1815). De acordo com Nava et al. (2013), o número de espécies de carrapatos válidos em todo o mundo é de 901 carrapatos, divididos em três famílias: Nuttalliellidae (P.Schulze, 1935), Argasidae (Canestrini 1899) e Ixodidae (Murray, 1877).

A família Nuttalliellidae é monoespecífica e representada pela espécie *Nuttalliella namaqua* (Bedford 1931), considerado carrapato é um “fóssil vivo” (HORAK et al., 2002; BARROS-BATESTTI et al., 2006; MANS et al., 2011) e é encontrado apenas no continente africano. Adultos e ninfas possuem um pseudo-escudo semelhante ao escudo de ixodídeos, mas uma cobertura de tegumento semelhante ao dos argasídeos, e realizam uma rápida alimentação (MANS et al. 2011). Como hospedeiros preferenciais estão os lagartos do gênero *Cordylus* e *Agama* e roedores murídeos como o *Micaelamys namaquensis*, *Aethomys chrysophilus* e *Acomys spinosissimus* (HORAK et al. 2012; MANS et al., 2014).

A família Argasidae é composta por 198 espécies de cinco gêneros (*Antricola*, *Argas*, *Ornithodoros*, *Nothoaspis*, *Otobius*) com registro de 87 espécies reconhecidas para região Neotropical (GUGLIELMONE et al., 2003; LABRUNA; VENZAL, 2009; NAVA et al., 2010; GUGLIELMONE et al., 2010; DANTAS-TORRES et al., 2012; VENZAL et al., 2013). São conhecidos como “carrapatos moles” pela característica

marcante da ausência escudo dorsal e capítulo sob o idiossoma na maioria das espécies. São carrapatos de habitats áridos ou semiáridos sendo encontrados nos nichos de seus hospedeiros como em ninhos, tocas e poleiros. Eles possuem o hábito de forragear principalmente durante a noite quando seus hospedeiros estão dormindo. Várias espécies de argasídeos se alimentam de aves ou mamíferos como morcegos e podem provocar picadas dolorosas para os seres humanos (VENZAL et al., 2006).

Composta pelo maior número de componentes sendo na Região Neotropical estabelecidas 126 espécies (GUGLIELMONE; NAVA, 2014), a família Ixodidae é representada pelos “carrapatos duros”, assim chamados por possuírem escudo dorsal presente, onde no macho se apresenta em todo o dorso e nas fêmeas, ninfas e larvas é restrito a porção anterior do idiossoma e capítulo com aparelho bucal visivelmente projetando para frente (BARROS-BATESTTI et al., 2006). Ixodidae sedestaca por ser a família mais importante quando se considera ameaça à saúde humana (JONGEJAN; UILENBERG, 2004). São organizados em dois grupos: Prostriata composto somente pelo gênero *Ixodes* e grupo Metastriata com os principais gêneros de importância médico veterinária, *Amblyomma*, *Dermacentor*, *Rhipicephalus* e *Haemaphysalis* (HOOGSTRAAL; AESCHLIMANN, 1982; GUGLIELMONE et al., 2010).

Esses carrapatos podem ser encontrados principalmente onde a vegetação fornece abrigo contra dessecação, como por exemplo, sob madeiras ou grama longa. Os adultos são facilmente distinguíveis com a fêmea sendo maior, muitas vezes de cores vivas, e os menores do sexo masculino na maioria das espécies (BARROS-BATESTTI et al., 2006).

No Brasil, a fauna de carrapatos é atualmente composta por 61 espécies (DANTAS-TORRES et al. 2009), sendo o gênero *Amblyomma* o de maior importância médico-veterinária.

### **2.3. Gênero *Amblyomma***

Depois da espécie *Rhipicephalus microplus*, as espécies de carrapatos que mais tem despertado interesse científico são as do gênero *Amblyomma*. Com uma extensa distribuição, esse gênero compreende todos os continentes com exceção da Antártida (ONOFRIO et al., 2006), especificamente na região neotropical atualmente estão relatadas 35 espécies (DANTAS-TORRES et al., 2009; NAVA et al. 2014) e algumas são incriminadas na transmissão de rickettsioses para os humanos (LABRUNA et al., 2004; LABRUNA et al., 2009) nas quais já foram encontrados isolados de agentes zoonóticos em animais domésticos e humanos (FIGUEIREDO et al., 1999; ABEL et al., 2006; SERRA-FREIRE et al., 2011; MAZIOLI et al., 2012).

Em relação aos hospedeiros desse gênero podemos observar parasitismo em diversas das ordens de mamíferos (GUGLIELMONE et al., 2014). Aves são infestadas com fases imaturas de algumas espécies de carrapatos (LABRUNA et al., 2007). Anfíbios e répteis também estão entre os hospedeiros deste gênero (ONOFRIO et al., 2006).

### **2.4. *Amblyomma parvum* Aragão, 1908: distribuição geográfica e hospedeiros**

*Amblyomma parvum* Aragão, 1908 é uma espécie de carrapato de ampla distribuição geográfica tendo sido assinalada desde o sul do México até a Argentina (GUGLIELMONE et al., 2003). Um relato de Corn et al. (2012) indicou a presença desta espécie no estado da Flórida, Estados Unidos. Contudo, esta espécie é considerada exótica para esta região.

A lista de hospedeiros conhecidos na região Neotropical é extensa (46 espécies), com carrapatos adultos coletados em membros de pelo menos nove ordens de mamíferos de médio e grande porte (Nava et al., 2008).

Na Argentina o primeiro relato foi de Aragão (1938) em tatus (*Dasybus novemcinctus*). Os adultos de *A. parvum* se encontram frequentemente em animais domésticos (GUGLIELMONE; NAVA, 2006). Mas também já foi descrito para diversos gêneros de mamíferos (IVANCOVICH; LUCIANI, 1992; GUGLIELMONE; VIÑABAL, 1994). Nava et al. (2006) e Guglielmone e Nava (2010) determinaram os roedores Caviidae como hospedeiros dos estágios imaturos de *A. parvum*. Animais domésticos, especialmente bovinos (*Bos taurus* L.) e caprinos (*Capra hircus* L.) são os hospedeiros mais comumente relatados nesse país (NAVA et al., 2008).

Para o México há os registros para onça-pintada (*Panthera onca*), cavalos (*Equus caballus*), tatus e gambás (*Didelphis* sp.) (GUZMÁN-CORNEJO et al., 2011).

Na Costa Rica há relato da presença em cavalos e veado-de-cauda-branca (*Odocoileus virginianus*) (CALDERÓN et al., 2005).

No Paraguai foi relatada a presença de carrapatos adultos em pumas (*Puma concolor*), onça-pintada (*Panthera onca*) (DURDEN et al., 2006), quatis (*Nasua nasua*) e cachorro do mato (*Cerdocyon thous*) (WHITAKER; ABRELL 1987; NAVA et al., 2007).

Na Bolívia houve registro dessa espécie de carrapato em cachorro do mato (*Cerdocyon thous*), veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*), mataco (*Tolypeutes mataco*) ou “tatu-bola” (*Tolypeutes matacus*), jaguatirica (*Leopardus pardalis*), graxaim (*Pseudalopex gymnocercus*) (DEEM et al., 2004; 2009; FIORELLO et al., 2006; MASTROPAOLO et al., 2014).

Floch e Fauran (1959) listaram capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*), cão doméstico (*Canis familiaris*), veado vermelho (*Mazama americana*) como hospedeiros do carrapato em questão nas Antilhas Francesas.

Em uma revisão de carrapatos em carnívoros no Brasil, Labruna et al. (2005) relatam adultos de *A. parvum* em pumas, onça-pintada, jaguatirica, cachorro do mato e lobo guará (*Chrysocyon brachyurus*).

O trabalho de Mullins et al. (2004) registra a ocorrência em um novo hospedeiro, tatu de nariz grande (*Dasybus kappleri*), e em um novo registro geográfico, o estado do Amazonas.

Em Pernambuco, Dantas-Torres et al. (2010) encontrou um macho de *A. parvum* em tamanduá-mirim (*Tamandua tetradactyla*) em Serra Talhada e Horta et al. (2011) reportaram parasitando preá (*Galea spixii*) e rato-boiadeiro (*Thrichomys apereoides*) sendo novos hospedeiros para a espécie.

No município de Mossoró, Rio Grande do Norte foi observado na parte facial de um ovino (*Ovis aries*) e cinco caprinos sendo descrito pela primeira vez nesses hospedeiros na região Nordeste (BEZERRA, 2007). No mesmo estado, na zona rural de Pau dos Ferros, Ferreira et al. (2008) observaram o parasitismo de *A. parvum* na perna de um homem após atividades de campo com manejo de bovinos.

No Bioma Pantanal foram encontrados indivíduos adultos em tamanduá mirim, tatupeba (*Euphractus sexcinctus*), veado catingueiro, porco monteiro (*Sus scrofa*), quati (*Nasua nasua*) (PEREIRA et al., 2000; MARTINS et al. 2004; MEDRI et al., 2010; CANÇADO et al., 2013; RAMOS et al., 2014). Cançado et al. (2008) avaliando os carrapatos associados com a vida selvagem na região do Pantanal coletaram na vegetação 46 carrapatos adultos machos e 35 fêmeas através de armadilhas de CO<sub>2</sub>.

Szabó et al., (2007) encontraram adultos em cavalos e cachorros domésticos e adultos e ninfas no ambiente através de armadilhas e arrasto de flanela em diversas

fitofisionomias no Cerrado em Goiás. No mesmo estado, Martins et al. (2011) encontraram ninfas em *C. thous* no Parque Nacional das Emas.

Em uma revisão sobre hospedeiros e distribuição geográfica de carrapatos no Rio Grande do Sul, Evans et al. (2000) relacionaram *A. parvum* a tatus nos municípios de Rosário do Sul e São Francisco de Assis.

Pinheiro et al., (2014) registraram a primeira ocorrência deste carrapato na vegetação em um fragmento de floresta de Mata Atlântica no Rio de Janeiro.

Estudos da suscetibilidade de diferentes espécies hospedeiras ao parasitismo por *A. parvum* realizados no Brasil, demonstraram que este carrapato pode ser considerado generalista (OLEGÁRIO et al., 2011), assim como *Amblyomma cajennense*. Estes autores demonstraram que apesar da preferência variável dos diversos estágios do parasito por diferentes espécies de animais, tais como, cães, equinos, bovinos, caprinos, coelhos e cobaias, sua distribuição pode ser mais favorecida por condições ambientais e não apenas pela própria diversidade de hospedeiros.

## **2.5. Microorganismos transmitidos por *Amblyomma parvum***

A relação parasito/hospedeiro, o menor grau de especificidade dos carrapatos e os longos períodos de jejum são fatores que favorecem a transmissão de agentes patogênicos. No processo de alimentação, os carrapatos, de forma geral, podem determinar: ação traumática e espoliativa, pela dilaceração de células e tecidos, bem como ação tóxica, pela inoculação de substâncias através da saliva e transmissão de doenças, causando prejuízos econômicos à pecuária brasileira e à saúde pública (MASSARD; FONSECA, 2004).

Segundo Cançado (2008), diferente do que acontece com *Amblyomma cajennense*, a picada dos adultos de *A. parvum* é praticamente indolor, desta forma, o carrapato pode não ser percebido e permanecer fixado por um período longo, aumentando assim o risco de transmissão de *Rickettsia* spp., *Borrelia* spp. e outros patógenos.

Pacheco et al. (2007) detectaram rickettsia em *A. parvum* coletados na vegetação e em *G. musteloides* e a designaram como *Rickettsia* sp. cepa Argentina de patogenicidade desconhecida. Anos mais tarde, Tomassone et al. (2010) detectaram a mesma rickettsia em outra região argentina. Também na Argentina, já foram detectados em *A. parvum*, bactérias como *Ehrlichia chaffensis*, agente etiológico da Erliquiose Monocítica Humana (TOMASSONE et al., 2008).

Dzul-Rosado et al. (2013) relacionam *A. parvum* como potencial vetor de *Rickettsia rickettsii* no sudeste do México e desempenha um papel fundamental na natureza como um hospedeiro, juntamente com outros vetores que são responsáveis pela transmissão da doença a seres humanos.

Pacheco et al. (2013), na província de Córdoba, Argentina coletaram *A. parvum* em preás e encontraram dois (15,4%) dos 13 adultos coletados infectados com *Coxiella burnetii*.

Nieri-Bastos et al. (2014) analisando DNA de *A. parvum* coletados na vegetação no Pantanal Sul Mato-grossense e em cavalos no Cerrado no estado do Piauí, detectaram positividade para *Candidatus Rickettsia andeanae* em 63,5% (40/63) e 66,7% (2/3) respectivamente. Este estudo relata a identificação do agente pela primeira vez no Brasil. Sua ação como agente patogênico em humanos ainda é desconhecida, necessitando de mais estudos para avaliar a capacidade de infectar seres humanos ou outros hospedeiros vertebrados.

#### 4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEL, I.; PEDROZO, M.G.C.; BUENO, C. *Amblyomma tigrinum* koch, 1844 (Acari: Ixodidae) em cães domésticos procedentes da Reserva Florestal do Boqueirão, Município de Ingaí, Sul de Minas Gerais. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.73, n.1, p.111-112, 2006.

AESCHLIMANN, A. Ticks and disease: susceptible hosts, reservoir hosts and vectors. Chapter 8. In: TOFT, C.A.; AESCHLIMANN, A. BOLIS, L. **Parasite-host Associations Coexistence or conflict?** Oxford University Press, Editors: p.148-156, 1991.

ARAGÃO, H.B. Nota sobre os Ixodideos da Republica Argentina. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.33, n.2, p.319-327, 1938.

BARROS-BATTESTI, D.M.; ARZUA, M.; BECHARA, G.H. **Carrapatos de importância médico-veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies**. 1ª ed. Vox/ICTTD-3/Butantan, São Paulo. 223pp., 2006.

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

BEZERRA, A.C.D.S. Prevalência de ectoparasitos em caprinos e ovinos do município de Mossoró, Rio Grande Do Norte. **Acta Veterinaria Brasília**, v.1, n.2, p.68, 2007.

BURLINI, L.; TEIXEIRA, K.R.; SZABÓ, M.P.; FAMADAS, K.M. Molecular dissimilarities of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in Brazil and its relation with samples throughout the world: is there a geographical pattern? **Experimental and Applied Acarology**, v.50, p.361–374, 2010.

CALDERÓN, V.A.; FONSECA, V.H.; GAMBOA, J.H. Catálogo de garrapatas suaves (Acari: Argasidae) y duras (Acari: Ixodidae) de Costa Rica. **Brenesia** v.63-64, p.81-88, 2005.

CANÇADO, P.H.D. **Carrapatos de Animais Silvestres e Domésticos no Pantanal Sul Mato-grossense (Sub-região da Nhecolândia): Espécies, Hospedeiros e Infestações em Áreas com Manejos Diferentes**. 65f. Tese de Doutorado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2008.

CANÇADO, P.H.D.; FACCINI, J.L.H.; HERRERA, H.M.; TAVARES, L.E.R.; MOURÃO, G.M.; PIRANDA, E.M.; PAES, R.C.S.; RIBEIRO, C.C.D.U.; BORGHESAN, T.C.; PIACENTI, A.K.; KINAS, M.A.; SANTOS, C.C.; ONO, T.M.; PAIVA, F. Host-Parasite Relationship of Ticks (Acari: Ixodidae and Argasidae) and Feral Pigs (*Sus scrofa*) in the Nhecolândia Region of the Pantanal Wetlands in Mato Grosso do Sul. **ISRN Parasitology**, v.2013. Article ID 610262, 6 pages <http://dx.doi.org/10.5402/2013/610262>. 2013

CORN, J.L.; HANSON, B.; OKRASKA, C.R.; MUIZNIEKS, B.; MORGAN, V.; MERTINS, J.W. First at-large record of *Amblyomma parvum* (Acari: Ixodidae) in the United States. **Systematic & Applied Acarology**. v.17, n.1, p.3–6, 2012.

DANTAS-TORRES, F.; ONOFRIO, V. C.; BARROS-BATTESTI, D.M. The ticks (Acari: Ixodida: Argasidae, Ixodidae) of Brazil. **Systematic and Applied Acarology**, v. 14, p. 30-46, 2009.

DANTAS-TORRES, F.; SIQUEIRA, D.B.; RAMEH-DE-ALBUQUERQUE, L.C.; DA SILVA E SOUZA, D.; ZANOTTI, A.P.; FERREIRA, D.R.; MARTINS, T.F.; DE SENNA M.B.; WAGNER, P.G.; DA SILVA, M.A.; MARVULO, M.F.; LABRUNA, M.B. Ticks infesting wildlife species in northeastern Brazil with new host and locality records. **Journal of Medical Entomology**, v.47, n.6, p.1243-1246, 2010.

DANTAS-TORRES, F.; VENZAL, J.M.; BERNARDI, L.F.O.; FERREIRA, R.L.; ONOFRIO, V.C.; MARCILI, A.; Bermúdez, S.E.; Ribeiro, A.F.; Barros-Battesti, D.M.; Labruna, M.B. Description of a new species of bat-associated argasid tick (Acari: Argasidae) from Brazil. **Journal of Parasitology**. v.98, n.1, p.36-45, 2012.

DEEM, S.L.; NOSS, A.J.; VILLARROEL, R.; UHART, M.M., KARESH, W.B. Disease survey of free-ranging grey brocket deer (*Mazama gouazoubira*) in the Gran Chaco, Bolivia. **Journal of Wildlife Diseases**. v.40, p.92–98, 2004.

DEEM, S.L.; NOSS, A.J.; FIORELLO, C.V.; MANHARTH, A.L.; ROBBINS, R.G.; KARESH, W.B. Health assessment of free-ranging three-banded (*Tolypeutes matacus*) and ninebanded (*Dasybus novemcinctus*) Armadillos in the Gran Chaco, Bolivia. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v.40, p.245–256, 2009.

DURDEN, L.A.; CUNNINGHAM, M.W.; MCBRIDE, R.; FERREE, B. Ectoparasites of free-ranging pumas and jaguars in the Paraguayan Chaco. **Veterinary Parasitology**, v.137, p.189-193, 2006.

DZUL-ROSADO, K.; PENICHE-LARA, G.; TELLO-MARTÍN, R.; ZAVALA-VELÁZQUEZ, J.; PACHECO, R.C.; LABRUNA, M.B.; SÁNCHEZ, E.C.; ZAVALA-CASTRO, J. *Rickettsia rickettsii* isolation from naturally infected *Amblyomma parvum* ticks by centrifugation in a 24-well culture plate technique. **Open Veterinary Journal**, v. 3, n.2, p.101-105, 2013.

EVANS, D.E.; MARTINS, J.R.; GUGLIELMONE, A.A. A review of the ticks (Acari, Ixodida) of Brazil, their hosts and geographic distribution - 1. The state of Rio Grande do Sul, southern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.95, n.4, p.453-470, 2000.

FAMADAS, K.M.; FACCINI, J.L.H. Variação morfológica de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) no Brasil. **Arquivos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, v.12, n.1-2, p.73-81, 1989.

FERREIRA, C.G.T.; REGO, I.G.; AHID, S.M.M. Parasitismo em humano por *Amblyomma parvum* Aragão, 1908 (Acari: Ixodidae) em Pau dos Ferros, Rio Grande do Norte, Brasil. **PUBVET**, v. 3, n. 1, p.3-9, 2008.

FIGUEIREDO, L.T.M.; BADRA, S.J.; PEREIRA, L.E.; SZABO, M.P.J. Report on ticks collected in the Southeast and Mid-West regions of Brazil: analyzing the potential transmission of tick-borne pathogens to man. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.32, n.6, p. 613-619, 1999.

FIGURELLO, C.V.; ROBBINS, R.G.; MAFFEI, L.; WADE, S.E. Parasites of free-ranging small canids and felids in the Bolivian Chaco. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v.37, p.130–134, 2006.

FLOCH, H.; FAURAN, P. Les Ixodidae du genre *Amblyomma* en Guyane et aux Antilles Française. **Acarologia** v.1, p.216-227, 1959.

FRASER, C.M., MAYS, A. (Ed) **The Merck veterinary manual**. 6 ed. New Jersey: Merck, p.815-819, 1986.

GRISI, L.; LEITE, R.C.; MARTINS, J.R.S.; BARROS, A.T.M.; ANDREOTTI, R.; CANÇADO, P.H.D.; LEÓN, A.A.P.; PEREIRA, J.B.; VILLELA, H.S. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, n. 2, p. 150-156, 2014.

GUGLIELMONE, A.A.; VIÑABAL, A.E. Claves morfológicas dicotómicas y información ecológica para la indentificación de las garrapatas del genero *Amblyomma* Koch, 1844 de la Argentina. **Revista Investigativa Agropecuaria**, v.25, p.39-67, 1994.

GUGLIELMONE, A. A.; ESTRADA-PEÑA, A.; KEIRANS, J.E.; ROBBINS, R.G. **Ticks (Acari: Ixodidae) of the Neotropical Zoogeographic Region**. Editora Atalanta Houten - ICTTD, The Netherlands. 173pp., 2003.

GUGLIELMONE, A. A.; NAVA, S. Las garrapatas argentinas del género *Amblyomma* (Acari: Ixodidae): distribución y hospedadores. **RIA**, v.35, n.3, p.133-153, 2006.

GUGLIELMONE, A.A.; NAVA, S. Rodents of the subfamily Caviinae (Hystricognathi, Caviidae) as hosts for hard ticks (Acari: Ixodidae) **Mastozoología Neotropical**, v.17, n.2, p.279-286, 2010.

GUGLIELMONE, A.A.; ROBBINS, R.G.; APANASKEVICH, D.A.; PETNEY, T.N.; ESTRADA-PEÑA, A.; HORAK, I.G.; SHAO, R.; BARKER, S.C. The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world: a list of valid species names. **Zootaxa**; v.2528, n.6, p.1-28, 2010.

GUGLIELMONE, AA; NAVA, S. Names for Ixodidae (Acari: Ixodoidea): valid, synonyms, incertae sedis, nomina dubia, nomina nuda, lapsus, incorrect and suppressed names-with notes on confusions and misidentifications. **Zootaxa**; v.24, p1-p256, 2014.

GUZMÁN-CORNEJO, C.; ROBBINS, R.G.; GUGLIELMONE, A.A.; MONTIEL-PARRA, G.; PÉREZ, T.M. The *Amblyomma* (Acari: Ixodida: Ixodidae) of Mexico: Identification Keys, Distribution and Hosts. **Zootaxa**, v.2998, p.16-38, 2011.

HOOGSTRAAL, H.; AESCHLIMANN, A. Tick-host specificity. **Bulletin de la Société Entomologique Suisse**, v.55, p.5-32, 1982.

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

HORAK, I.G.; LUTERMANN, H.; MEDGER, K.; APANASKEVICH, D.A.; MATTHEE, C.A. Natural hosts of the larvae of *Nuttalliella* sp. (*N. namaqua*?) (Acari: Nuttalliellidae). **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v.79, n.1, Art. #405, 2 pages, 2012. <http://dx.doi.org/10.4102/ojvr.v79i1.405>.

HORTA, M.C.; NASCIMENTO, G.F.N.; MARTINS, T.F.; LABRUNA, M.B.; MACHADO, L.C.P.; NICOLA, P.A. Ticks (Acari: Ixodida) parasitizing free-living wild animals in the Caatinga biome in the State of Pernambuco, northeastern Brazil. **Systematic & Applied Acarology**, v.16, p.207–211, 2011.

HOSKINS, D.J.; CUPP, E.W. Ticks of Veterinary Importance. Part.I The Ixodidae family: Identification, behavior and associated diseases. **Small Animal Competition**. v.10, p.564-581, 1988.

IVANCOVICH, J.C.; LUCIANI, C.A. Las garrapatas de Argentina. **Monografía de la Asociación Argentina de Parasitología Veterinaria**, Buenos Aires, 95pp., 1992.

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

JONSSON, N.N. The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattle and their crosses. **Veterinary Parasitology**, v.137, p.1–10, 2006.

KAUFMAN, W.R. Ticks: Physiological aspects with implications for pathogen transmission. **Ticks Tick Borne Disease**, v.1, n.1, p.11-22, 2010.

KOCAN, K.M.; BLOUIN, E.; DE LA FUENTE, J. RNA interference in ticks. **Journal of Visualized Experiments**, v.47, e2474 10.3791/2474, 2011.

LABRUNA, M.B.; MCBRIDE, J.W.; BOUYER, D.H. Molecular evidence for a spotted fever group *Rickettsia* species in the tick *Amblyomma longirostre* in Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v.41, p.533–537, 2004.

LABRUNA, M.B.; JORGE, R.D.S.P.; SANA, D.A.; JÁCAMO, A.T.A.; KASHIVAKURA, C.K.; FURTADO, M.M.; FERR, C.; PEREZ, A.A.; SILVEIRA, L.; SANTOS JUNIOR, T.S.; MARQUES, S.R.; MORATO, R.G.; NAVA, A.; ADANIA, C.H.; TEIXEIRA, R.H.F.; GOMES, A.A.B.; CONFORTI, V.A.; AZEVEDO, F.C.C.; PRADA, A.S.; SILVA, J.C.R.; BATISTA, A.F.; MARVULO, M.F.V.; MORATO, R.L.G.; ALHO, C.J.R.; PINTER, A.; FERREIRA, P.M.; FERREIRA, F.; BARROS-BATTESTI, D.M. Ticks (Acari: Ixodida) on wild carnivores in Brazil. **Experimental and Applied Acarology**, v.36, n.1-2, p.149-163, 2005.

LABRUNA, M. B.; WLIPPO, L.F.S.; DEMETRIO, C.; MENEZES, A.C.; PINTER, A.; GUGLIELMONE, A.A.; SILVEIRA, L.F. Ticks collected on birds in the state of São Paulo, Brazil. **Experimental and Applied Acarology**, v.43, p.147-160, 2007.

LABRUNA, M.B. Ecology of Rickettsia in South America. Rickettsiology and Rickettsial Diseases-Fifth International Conference: **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1166, p.156–166, 2009.

LABRUNA, M.B.; VENZAL, J.M. *Carios fonsecai* sp. nov. (Acari, Argasidae), a bat tick from the central-western region of Brazil. **Acta Parasitologica** v.54, p.355–363, 2009.

LABRUNA, M.B.; NARANJO, V.; MANGOLD, A.J.; THOMPSON, C.; ESTRADA-PENA, A.; GUGLIELMONE, A.A.; JONGEJAN, F.; DE LA FUENTE, J. Allopatric speciation in ticks: genetic and reproductive divergence between geographic strains of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **BMC Evolutionary Biology**, v.9, n.46, p.1-12, 2009.

LABRUNA, M.B.; SOARES, J.F.; MARTINS, T.F.; SOARES, H.S.; CABRERA, R.R. Cross-mating experiments with geographically different populations of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). **Experimental and Applied Acarology**, v.54, p.41–49, 2011.

LEMOS, E.R.S.; MACHADO, D.R.; COURA, J.R.; GUIMARÃES, M.A A.; FREIRE, N.M.S. Infestation by ticks and detection of antibodies to spotted fever group Rickettsiae in wild animals captured in the state of São Paulo, Brazil. A preliminar report. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.91, n.3, p.273-275, 1996.

MANS, B.J.; DE KLERK, D.; PIENAAR, R.; LATIF, A.A. *Nuttalliella namaqua*: A Living Fossil and Closest Relative to the Ancestral Tick Lineage: Implications for the Evolution of Blood-Feeding in Ticks. **PLoS ONE**, v.6, n.8, e23675, 2011.

MANS, B.J.; DE KLERK, D.; PIENAAR, R.; LATIF, A.A. The host preferences of *Nuttalliella namaqua* (Ixodoidea: Nuttalliellidae): a generalist approach to surviving multiple host-switches. **Experimental and Applied Acarology**, v.62, p.233–240, 2014.

MARTINS, J.R.; MEDRI, I.M.; OLIVEIRA, C.M.; GUGLIELMONE, A.A. Ocorrência de carrapatos em tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*) e tamanduá-mirim (*Tamandua tetradactyla*) na região do Pantanal Sul Mato-Grossense, Brasil. **Ciência Rural**, v.34, n.1, p.293-295, 2004.

MARTINS, T.F.; FURTADO, M.M.; JÁCOMO, A.T.A.; SILVEIRA, L.; SOLLMANN, R.; TÔRRES, N.M.; LABRUNA, M.B. Ticks on free-living wild mammals in Emas National Park, Goiás State, central Brazil. **Systematic & Applied Acarology** v.16, p.201–206, 2011.

MASSARD, C.L.; FONSECA A.H. Carrapatos e doenças transmitidas, comuns ao homem e aos animais. **A Hora Veterinária**, v.135, n.1, p.15-23, 2004.

MASTROPAOLO, M.; BELTRÁN-SAAVEDRA, L.F.; GUGLIELMONE A.A. The ticks (Acari: Ixodida: Argasidae, Ixodidae) of Bolivia. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v.5, p.186-194, 2014.

MAZIOLI, R.; SZABÓ, M.; MAFRA, C. *Amblyomma nodosum* (Acari: Ixodidae) parasitizing a domestic dog in Colatina, Espírito Santo, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.21, n.4, p.428-429, 2012.

MEDRI, I.M.; MARTINS, J.R.; DOYLE, R.L.; MOURÃO, G.; MARINHO-FILHO, J. Ticks (Acari: Ixodidae) from Yellow Armadillo, *Euphractus sexcinctus* (Cingulata: Dasypodidae), in Brazil's Pantanal Wetlands. **Neotropical Entomology**, v.39, n.5, p.823-825, 2010.

MULLINS, M.C.; LAZZARINI, S.M.; PICANÇO, M.C.L.; SERRA-FREIRE, N.M. *Amblyomma parvum* a parasite of *Dasypus kappleri* in the state of Amazonas, Brazil. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 42, n. 1, p. 287-291, 2004.

NAVA, S.; MANGOLD, A.J.; GUGLIELMONE A.A. The natural hosts for larvae and nymphs of *Amblyomma neumanni* and *Amblyomma parvum* (Acari: Ixodidae). **Experimental and Applied Acarology**, v.40, n.2, p.123-131, 2006.

NAVA, S.; LARESCHI, M.; REBOLLO, C.; USHER, C.B.; BEATI, L.; ROBBINS, R.G.; DURDEN, L.A.; MANGOLD, A.J.; GUGLIELMONE, A.A. The ticks (Acari: Ixodida: Argasidae, Ixodidae) of Paraguay. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v.101, n. 3, p.255–270, 2007.

NAVA, S.; SZABÓ, M.P.J., MANGOLD, A.J.; GUGLIELMONE A.A. Distribution, hosts, 16s rDNA sequences and phylogenetic position of the Neotropical tick *Amblyomma parvum* (Acari: Ixodidae). **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v.102, n.5, p.409-425, 2008.

NAVA, S.; GUGLIELMONE, A.A.; MANGOLD, A.J. An overview of systematics and evolution of ticks. **Frontiers in Biosciences**, v.14, p.2857-2877, 2009.

NAVA, S.; VENZAL, J. M.; TERASSINI, F. A.; MANGOLD, A. J.; CAMARGO, L. M.; LABRUNA, M. B. Description of a new argasid tick (Acari: Ixodida) from bat caves in Brazilian Amazon. **Journal of Parasitology**, v.96, p.1089–1101, 2010.

NAVA, S.; VENZAL, J.M.; TERASSINI, F.A.; MANGOLD, A.J.; CAMARGO, L.M.A.; CASÁS, G.; LABRUNA, M.B. *Ornithodoros guaporensis* (Acari, Ixodida: Argasidae), a new tick species from the Guaporé River Basin in the Bolivian Amazon. **Zootaxa**, v.3666, n.4, p.579–590, 2013.

NICHOLSON, W.L.; ALLEN, K.E.; MCQUISTON, J.H. BREITSCHWERDT, E.B.; LITTLE, S.E. The increasing recognition of rickettsial pathogens in dogs and people. **Trends in Parasitology**, v.26, n. 4, p.205–212, 2010.

NIERI-BASTOS, F.A.; LOPES, M.G.; CANÇADO, P.H.D.; ROSSA, G.A.R.; FACCINI, J.L.H.; GENNARI, S.M.; LABRUNA, M.B. *Candidatus* Rickettsia andeanae, a spotted fever group agent infecting *Amblyomma parvum* ticks in two

Brazilian biomes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.109, n.2, p.259-261, 2014.

NIJHOF, A.M.; PILLAY,V.; STEYL, J.; PROZESKY, L.; STOLTSZ,W.H.; LAWRENCE, J.A.; PENZHORN, B.L.; JONGEJAN, F. Molecular characterization of *Theileria* species associated with mortality in four species of African antelopes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 5907–5911, 2005.

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

OLEGÁRIO, M.M.M.; GERARDI, M.; TSURUTA, S.A.; SZABÓ, M.P.J. Life cycle of the tick *Amblyomma parvum* Aragão, 1908 (Acari: Ixodidae) and suitability of domestic hosts under laboratory conditions. **Veterinary Parasitology**, v.179, p.203-208, 2011.

ONOFRIO, V.C.; LABRUNA, M.B.; PINTER, A.; GIACOMIN, F.G.; BARROS-BATTESTI, D.M. Comentários e chaves para as espécies de *Amblyomma*. 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, p. 53-71, 2006.

PACHECO, R.C.; MORAES-FILHO, J.; NAVA, S.; BRANDFIO, P.E.; RICHTZENHAIN, L.J.; LABRUNA, M.B. Detection of a novel spotted fever group rickettsia in *Amblyomma parvum* ticks (Acari: Ixodidae) from Argentina. **Experimental and Applied Acarology**, v.43, p.63-71, 2007.

PACHECO, R.C.; ECHAIDE, I.E.; ALVES, R.N.; BELETTI, M.E.; NAVA, S.; LABRUNA, M.B. *Coxiella burnetii* in Ticks, Argentina. **Emerging Infectious Diseases** v.19, n. 2, p.344-346, 2013.

PEREIRA, M.C.; SZABÓ, M.P.J.; BECHARA, G.H.; MATUSHIMA, E.R.; DUARTE, J.M.B.; REHAV, Y.; FIELDEN, L.; KEIRANS, J.E. Ticks (Acari: Ixodidae) associated with wild animals in the Pantanal region of Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v.37, p. 979-983, 2000.

PINHEIRO, M.C.; LOURENÇO, E.C.; PATRÍCIO, P.M.P.; SÁ-HUNGARO, I.J.B.; FAMADAS, K.M. Free-living ixodid ticks in an urban Atlantic Forest fragment, state of Rio de Janeiro, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, n. 2, p. 264-268, 2014.

RAMOS, V.N.; OSAVA, C.F.; PIOVEZAN, U.; SZABÓ, M.P.J. Ticks on humans in the Pantanal wetlands, Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v.5, p.497–499, 2014.

SERRA-FREIRE, N.M.; SENA, L.M.M.; BORSOI, A.B.P. Parasitismo humano por carrapatos na Mata Atlântica, Rio de Janeiro, Brasil. **EntomoBrasilis** v.4, n.2, p.67-72, 2011.

SONESHINE, D.E. **Biology of ticks**. Oxford University Press, New York. v.1, p.447, 1991.

SONENSHINE, D.E.; LANE, R.S.; NICHOLSON, W.L. Ticks (Ixodida). In: MULLEN, G., DURDEN, L.A. **Medical and Veterinary Entomology**. Nova York: Academic Press. p.517-558, 2002.

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

SZABÓ, M.P.J.; OLEGÁRIO, M.M.M.; SANTOS, A.L.Q. Tick fauna from two locations in the Brazilian savannah. **Experimental and Applied Acarology**, v.43, n.1, p.73-84, 2007.

TOMASSONE, L.; NUÑEZ, P.; GÜRTLER, R.E.; CEBALLOS, L.A.; OROZCO, M.M.; KITRON, U.D.; FARBER, M. Molecular Detection of *Ehrlichia chaffeensis* in *Amblyomma parvum* Ticks, Argentina. **Emerging Infectious Diseases**, v.14, n.12, 2008.

TOMASSONE, L.; NUÑEZ, P.; CEBALLOS, L.A.; GÜRTLER, R.E. KITRON, U. FARBER, M. Detection of "*Candidatus* Rickettsia sp. Strain Argentina" and *Rickettsia bellii* in *Amblyomma* ticks (Acari: Ixodidae) from Northern Argentina. **Experimental and Applied Acarology**, v.52, p.93-100, 2010.

VENZAL, J.M.; ONOFRIO, V.C.; BARROS-BATTESTI, D.M.; ARZUA, M. Família Argasidae: características gerais, comentários e chaves para gêneros e espécies, p.13-27. In BARROS-BATTESTI, D.M., ARZUA, M., BECHARA, G.H. (eds) **Carrapatos de importância médico- veterinária da Região Neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécie**. São Paulo, Vox/ICTTD-Butantan, São Paulo, 223pp., 2006.

VENZAL, J.M.; NAVA, S.; GONZÁLEZ-ACUÑA, D.; MANGOLD, A.J.; MUÑOZ-LEAL, S.; LADO, P.; GUGLIELMONE, A.A. A new species of *Ornithodoros* (Acari: Argasidae), parasite of *Microlophus* spp. (Reptilia: Tropiduridae) from northern Chile. **Ticks and Tick Borne Disease**, v.4, n.1-2, p.128-132, 2013.

WHITAKER JR., J.O., ABRELL, D.B. Notes on some ectoparasites from mammals of Paraguay. **Entomology News**, v.98, p.198-204, 1987.

## CAPÍTULO I

### **PARÂMETROS BIOLÓGICOS DE TRÊS POPULAÇÕES DE *Amblyomma parvum* ARAGÃO, 1908 (ACARI: IXODIDAE) EM CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO**



## RESUMO

PINHEIRO, Michele da Costa. **Capítulo I: Parâmetros biológicos de três populações de *Amblyomma parvum* Aragão, 1908 (Acari: Ixodidae) em condições de laboratório.** 2015. 27p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2015.

Cada espécie de carrapato apresenta adaptações muito variáveis dependendo do bioma em que habita. Essas diferenças se referem aos hospedeiros, períodos de parasitismo, preferências por ambiente para postura e muda. *Amblyomma parvum* é uma espécie de carrapato de ampla distribuição geográfica com uma extensa lista de hospedeiros conhecidos na região Neotropical. Ele e a maioria dos carrapatos da família Ixodidae exibem um ciclo de vida com três hospedeiros. Na literatura é sabido que populações de *A. parvum* do Brasil e da Argentina apresentam divergência genética. O presente trabalho comparou a biologia deste parasito proveniente de três colônias de distintas localidades (Pantanal Sul-matogrossense, Cerrado goiano e Chaco argentino) a fim de elucidar a divergência entre as populações do Brasil e Argentina. Para isso, foram utilizadas amostras das duas primeiras gerações de *A. parvum* de três origens distintas que são mantidas em colônias já estabelecidas no Laboratório de Ixodologia da UFRRJ em estufas incubadoras tipo B.O.D reguladas a temperatura de  $27\pm 1^{\circ}\text{C}$ , umidade relativa de (UR)  $80\pm 5\%$  e escotofase. Foram realizadas infestações em coelhos para cada fase parasitária e localização. Os carrapatos ingurgitados que se desprendiam foram coletados diariamente. No laboratório, estes eram limpos, pesados e acondicionados para a observação contínua do ciclo. O ciclo de vida de *A. parvum* foi completado em um período médio de 104,2; 99,6 e 100,7 dias para os biomas Pantanal, Chaco e Cerrado respectivamente. Conclui-se que a biologia das três populações de *A. parvum* é bastante semelhante e que são necessários novos estudos biológicos e moleculares comparativos para diferenciação.

**Palavras-chave:** ciclo de vida, Brasil, Argentina.



## ABSTRACT

PINHEIRO, Michele da Costa. **Chapter I: Biological parameters of three populations of *Amblyomma parvum* Aragão, 1908 (Acari: Ixodidae) in laboratory conditions.** 2015. 27p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2015.

Each tick species presents very variable adaptations depending on the biome in which inhabits. These differences relate to the hosts, parasitism periods, preferences and environment for posture changes. *Amblyomma parvum* is a species of tick widely distributed with an extensive list of known hosts in the Neotropics. This tick and most of the family Ixodidae ticks exhibit a life cycle with three hosts. In the literature it is known that populations of *A. parvum* Brazil and Argentina have genetic divergence. This study compared the biology of this parasite from three colonies of different locations (Pantanal, Mato Grosso do Sul; Cerrado, Goias and Chaco, Argentina) in order to elucidate the divergence between the populations of Brazil and Argentina. For this, samples of the first two generations of *A. parvum* from three different sources that are kept in colonies already established in the Laboratório de Ixodologia, UFRRJ in BOD incubators regulated temperature of  $27 \pm 1^\circ\text{C}$ , relative humidity (RH)  $80 \pm 5\%$ . Infestations were conducted in rabbits for each parasitic phase and location. The engorged ticks that came off were collected daily. In the laboratory, they were clean, weighed and packaged for continuous observation of the cycle. The complete cycle of *A. parvum* was completed in an average of 104.2; 99.6 and 100.7 days for the Pantanal, Chaco and Cerrado respectively. It is concluded that the biology of three populations of *A. parvum* is quite similar and are necessary new biological and molecular studies for comparative differentiation.

Keys words: life cycle, Brazil, Argentina.



## 1 INTRODUÇÃO

Ectoparasitas obrigatórios de vertebrados a maioria dos carrapatos possuem um ciclo de vida complexo, apresentando períodos de parasitismo e outro de vida livre (período de oviposição e entre mudas), com ou não alternância de hospedeiro (ANDERSON; MAGNARELLI, 1993).

O conhecimento do ciclo de vida dos carrapatos é importante não somente para entender os padrões demográficos, mas elucidar a potencial influência destes parasitos na ecologia do hospedeiro e como vetores de agentes patogênicos (RANDOLPH, 2008).

A maioria dos carrapatos ixodídeos exibe um ciclo de vida heteroxeno. Isto significa que o carrapato irá alimentar em mais de um hospedeiro diferente, se alimentando apenas uma vez durante cada estágio de desenvolvimento. A duração de tempo que as larvas, ninfas e adultos passam se alimentando varia entre as espécies e estágios de desenvolvimento, mas normalmente leva vários dias (APANASKEVICK; OLIVER Jr, 2013). Após a alimentação as larvas e ninfas se desprendem de seu hospedeiro e realizam sua ecdise no ambiente e em seguida, procuram um novo hospedeiro. Em condições favoráveis o processo de muda pode ser concluído de uma a três semanas.

Após a obtenção de uma refeição de sangue, fêmeas adultas da família Ixodidae destacam-se e colocam uma postura única de ovos no ambiente. As condições ambientais adversas ou um declínio na duração do dia pode levar os carrapatos a entrarem em diapausa, retardando a busca pelo hospedeiro, desenvolvimento ou oviposição (BELOZEROV, 1982). Dependendo das espécies de carrapato, o número de ovos postos pode variar de algumas centenas a alguns milhares. Na maioria dos casos, quanto maior for o volume de sangue ingerido, mais ovos a fêmea será capaz de produzir (SONENSHINE, 1991).

O processo de postura de ovos pode levar vários dias a partir de duas ou três semanas para terminar. A fêmea morre logo após esse processo. O período de desenvolvimento para cada estágio do carrapato varia, e todo o ciclo de vida pode levar até dois anos ou mais para ser concluído (NEVES, 2005).

*Amblyomma parvum* se classifica como um parasito trioxeno, pois seu ciclo se completa em três hospedeiros. O conhecimento do ciclo biológico de *A. parvum* em detalhes só foi possível quando Guglielmone et al. (1991) conseguiram manter esse carrapato em condições de laboratório. Uma colônia foi mantida a partir de duas fêmeas obtidas de bovinos infestados, localizados na província de Salta, no norte da Argentina e o ciclo foi completado em aproximadamente 100 dias.

Estudos realizados por pesquisadores na Argentina (NAVA et al., 2008) foram conclusivos para a presença de uma geração por ano de *A. parvum* e que os adultos na natureza são abundantes nos meses mais quentes (com pico no meio do verão), enquanto os estágios imaturos prevalecem nos meses mais secos do ano (larvas encontradas principalmente no outono e ninfas mais abundantes no meio do inverno).

Quando uma população de *A. parvum* com origem do Pantanal Sul Matogrossense foi submetida a cinco diferentes temperaturas na fase de vida livre em condições de laboratório, foi verificado que os períodos de pré-eclosão, eclosão, pré-ecdise, ecdise, período total de muda, pré-postura e postura apresentaram relação indireta com a temperatura (Kawamura, 2009).

As preferências por hospedeiros em laboratório também foram avaliadas por Olegário et al. (2011) que verificaram ser os cães excelentes hospedeiros de *A. parvum*

na fase adulta enquanto que para os imaturos foram as cobaias. Ainda ressaltaram que os equinos não devem ser descartados como hospedeiros em condições experimentais.

Em virtude de comportamentos biológicos contrastantes, Gerardi et al. (2013) realizaram estudos comparativos da biologia de *A. parvum* coletados na Argentina e no Brasil. Avaliaram parâmetros biológicos de acordo com a origem destes carrapatos e com a espécie de hospedeiro utilizado na alimentação experimental e consideraram que bovinos são os hospedeiros mais adequados para as larvas originárias da Argentina. Cobaias foram os melhores hospedeiros para as formas imaturas e, cães e bovinos, para as formas adultas de carrapatos de ambas as origens.

Ainda não se tem um posicionamento conclusivo sobre as divergências observadas nas populações de *A. parvum* da Argentina e Brasil, apesar dos estudos realizados. Dessa forma é importante mais estudos sobre o ciclo de vida e das eventuais diferenças que tem sido observadas sobre a biologia de *A. parvum*.

Assim, o objetivo deste estudo foi comparar o ciclo biológico de três populações de *A. parvum* da Argentina e Brasil mantidas em laboratório.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Local de Execução

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Ixodologia da Estação para Pesquisas Parasitológicas Wilhelm Otto Neitz (EPPWON) pertencente ao Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), localizada na Rodovia BR 465, Km 47, Rio de Janeiro – Brasil (22°45'S; 43°41'O; Alt.: 33m).

### 2.2. Hospedeiros

Para o desenvolvimento do ciclo biológico e manutenção da colônia no laboratório, foram utilizados coelhos (*Oryctolagus cuniculus*), mestiços Nova Zelândia x Califórnia, sem distinção de sexo e sem contato prévio com carrapatos e produtos carrapaticidas, provenientes do Setor de Cunicultura do Instituto de Zootecnia da UFRRJ. Os animais foram mantidos em gaiolas individualizadas (60x60x60cm), onde receberam ração comercial para coelhos e água a vontade.

Para realizar as infestações foram usados colares de restrição adaptados para limitar auto-limpeza e assim dificultar a retirada das toucas. Após os procedimentos os animais foram devolvidos ao Setor de Cunicultura- UFRRJ.

### 2.3. Características do bioma de origem das colônias dos carrapatos

As colônias de estudo são provenientes de três biomas com características distintas.

#### *Chaco Argentino*

É composto por uma vasta planície com um declive suave para o leste e se estende sobre a metade ocidental da Formosa e Chaco, leste de Salta, quase todo Santiago del Estero, norte de Santa Fé e Córdoba, e os setores de Catamarca, La Rioja e San Luis. A planície tem interrupções ocasionais das terras altas, localizadas principalmente no sul do país. A faixa de temperatura dessa eco-região é entre 18 e 23°C com precipitação média anual entre 500 a 700 mm (OBIO, 2014).

Sua vegetação é composta por bosque xerófilo com árvores baixas; bosques, savanas e pastagens. A diversidade faunística compreende tatus, tamanduá, onça, puma, javali, cervos, lhama, iguana e algumas espécies de aves (BUKART et al., 1999).

#### *Cerrado*

É um bioma central ou continental ocupando a região central da América do Sul com áreas também na Bolívia e Paraguai. No Brasil, esse bioma se espalha pelos estados do Maranhão, Piauí, Bahia, Minas Gerais, São Paulo, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, São Paulo e Paraná, e é predominante em Goiás e Tocantins ocupando mais de oitenta por cento de seus territórios.

A temperatura anual média varia de 21,3 a 27,2°C (PORTAL BRASIL, 2014), possui climas tropicais de caráter subúmido, com precipitações que variam de 800 a 1800 mm, com 90% da precipitação anual ocorrendo durante a estação chuvosa, entre outubro e abril. A estação seca varia de maio a setembro (BUSTAMANTE et al., 2012).

Segundo Eiten (1994), o Cerrado pode ser dividido em dois grupos de espécies vegetais: a camada de árvores e arbustos de caules grossos e a camada rasteira.

Características definidas do cerrado sentido restrito são árvores baixas e tortuosas, com ramificações irregulares e retorcidas. Os arbustos e subarbustos encontram-se espalhados (RIBEIRO; WALTER, 1998).

### *Pantanal*

O Pantanal é uma extensa área que apresenta uma organização complexa constituída de lagoas (doces e salinas), cordilheiras (cordões arenosos alongados), intercalados por vazantes, corixos (canais que ligam as águas de baías, lagoas, alagados com os rios próximos), que espraíam suas águas na planície durante o período da cheia.

Caracteriza-se por ser de região baixa, localizada no centro da Bacia do Alto Paraguai (BAP), onde os rios inundam a planície e alimentam um intrincado sistema de drenagem que inclui lagos extensos, cursos d'água divergentes e áreas de escoamento e inundação sazonal (REBOUÇAS et al., 2002). Situado no sul de Mato Grosso e no noroeste de Mato Grosso do Sul, ambos Estados do Brasil, além de também englobar o norte do Paraguai e leste da Bolívia (que é chamado de Chaco boliviano) (ALHO 2005).

O clima do Pantanal é tropical, com duas estações bem definidas, verão chuvoso e inverno seco. Apresenta uma pluviosidade média anual em torno de 1300 mm, temperatura média anual entre 24°C e 25°C e evapotranspiração anual superior a 1140 mm (MACHADO et al., 2014).

As cheias do Pantanal estão diretamente associadas às características do relevo e à concentração das chuvas durante o verão na BAP. A parte elevada dessa bacia possui altitudes entre 200 e 700 metros. O volume d'água proveniente deste planalto adentra o Pantanal e, acrescido do volume de chuvas locais, causa as enchentes periódicas anuais. O Pantanal apresenta declividade entre 0,7 a 5 cm/km no sentido norte-sul e entre 7 a 50 cm/km no sentido leste-oeste, sendo praticamente plano. Isso torna o escoamento de suas águas muito lento, favorecendo a inundação de extensas áreas (GALDINO; RESENDE, 2000). Conforme o grau de susceptibilidade ocorre três tipos de pantanais: alto, médio e baixo (ALLEM; VALLS, 1986; POTT et al., 1997). As fazendas localizadas no baixo Pantanal precisam retirar os animais durante o período de cheia.

### **2.4. *Amblyomma parvum***

Foram utilizadas amostras de *A. parvum* de três origens distintas que são mantidas em colônias já estabelecidas no Laboratório de Ixodologia em estufas incubadoras tipo B.O.D reguladas a temperatura de 27±1°C, umidade relativa de (UR) 85±5% e escotofase.

- Colônia Chaco Argentino: Formada a partir de 10 casais de *A. parvum* cedidos pelo Laboratório de Ixodologia da Faculdade de Medicina Veterinária (FAMEV) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), que tem como origem a Província de Salta, Argentina (25° 09'S; 64° 17'W);
- Colônia Cerrado: Formada a partir de 10 casais de *A. parvum* cedidos pelo Laboratório de Ixodologia da Faculdade de Medicina Veterinária (FAMEV) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) cujos exemplares foram oriundos do Município de Araguapaz, Goiás, Brasil (15°04'18''S; 50°25'03''W);
- Colônia Pantanal: Formada a partir de três fêmeas ingurgitadas coletadas em cão doméstico na Fazenda Nhecolândia, Município de Nhumirim, Mato Grosso do Sul, Brasil 18° 59'S; 56° 39'W) em maio de 2012.

### **2.5. Procedimento Experimental**

Todos os procedimentos foram realizados nas três populações de *A. parvum*.

### **2.5.1. Fase de larvas e ninfas**

Todas as infestações destas fases seguiram a técnica utilizada por Neitz et al. (1971), utilizando toucas confeccionadas com tecido branco na base da orelha fixado com pasta UNA (Anexo A) não tóxica e esparadrapo. Coelhos foram infestados com aproximadamente 2000 larvas e com 300 ninfas com 20 a 25 dias de jejum.

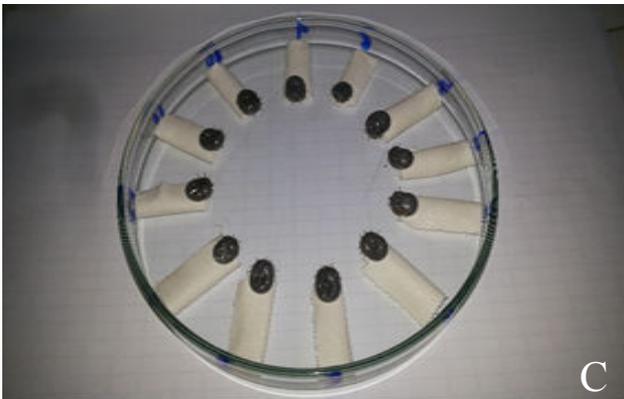
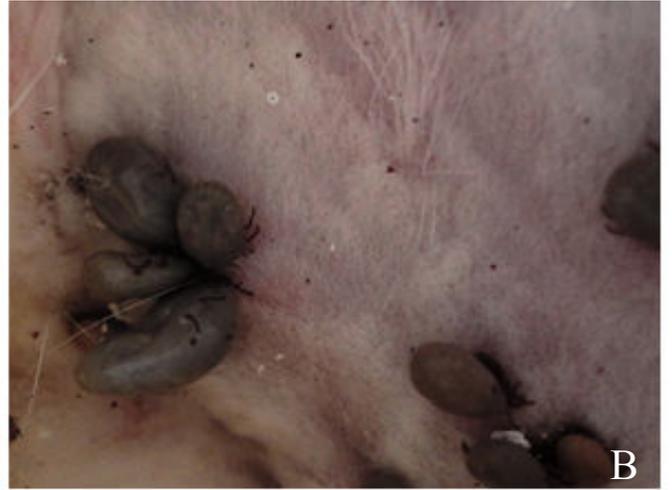
A partir do primeiro dia após a infestação, os sacos foram abertos para coleta dos espécimes ingurgitados tão logo iniciaram o desprendimento (Figura 1A). No laboratório foram lavados, pesados e acondicionados em seringas plásticas de 10 ml cortadas e tampadas com tecido tipo organza para a observação da ecdise ninfal e adulta.

### **2.5.2. Fase adulta**

Nesta fase foram infestados coelhos com 15 casais de *A. parvum* cada com idade entre 20 a 30 dias. A infestação foi realizada através da técnica de Neitz et al., (1971) com modificações no dorso (Figura 1B). Teleóginas desprendidas naturalmente foram lavadas com água corrente, secadas com papel toalha e pesadas em balança analítica, identificadas individualmente e fixadas com auxílio de esparadrapo em placas de Petri para realização da postura (Figura 1C e D).

Após o início da realização da postura a cada três dias eram coletados os ovos de cada fêmea e armazenados em seringas plásticas de 10 ml cortadas e tampadas com buchas de algodão hidrofílico para a observação da eclosão larval.

Durante todo o experimento, a fase não-parasitária foi mantida em estufa incubadora para B.O.D (Biochemical Oxygen Demand) reguladas a temperatura de  $27\pm 1^{\circ}\text{C}$ , umidade relativa de (UR)  $85\pm 5\%$  e escotofase.



**Figura 1.** *Amblyomma parvum* ninfas (A) e adultos (B) alimentados em *Oryctolagus cuniculus*; fêmeas fixadas em placa de Petri para realização da postura (C) e detalhe das fêmeas em postura (D).

## 2.6. Avaliação do potencial biótico em condições experimentais

Foram coligidos dados biológicos em cada etapa do ciclo para cada colônia.

### 2.6.1. Fêmeas ingurgitadas

*Período médio parasitário*: tempo em que os carrapatos se alimentam sobre o hospedeiro.

*Peso médio da fêmea ingurgitada*: peso após total alimentação e desprendimento do hospedeiro.

*Período médio de pré-postura (pré-oviposição)*: tempo decorrido desde a coleta da fêmea ingurgitada até o início da oviposição (BELLATO, 1995).

*Período médio de postura*: intervalo de tempo compreendido entre o início da postura e a postura dos últimos ovos (GLÓRIA et al., 1993).

*Peso médio da postura*: peso, em mg, do total de postura colocado pela fêmea ingurgitada.

*Peso médio da quenógena*: peso obtido no terceiro dia após o término da postura de cada fêmea.

*Índice médio eficiência reprodutiva*: relação da postura total da fêmea com o seu peso inicial, ou seja, o quanto de ingurgitamento (o quanto de sangue ingerido) que a fêmea foi capaz de transformar em ovos. Calculado através da fórmula usada por Bennett (1974).

$$\text{IER} = \frac{\text{Peso da massa de ovos (mg)}}{\text{Peso inicial da fêmea ingurgitada (mg)}} \times 100$$

*Índice médio de eficiência nutricional (IEN)*: relação entre a postura total da fêmea e a perda de peso desta após a postura, calculado segundo Bennett, 1974. O peso residual da fêmea se refere ao peso da quenógena.

$$\text{IEN} = \frac{\text{Peso da massa de ovos (mg)}}{\text{Peso inicial da fêmea ingurgitada} - \text{Peso residual da fêmea (mg)}} \times 100$$

### 2.6.2. Ovo

*Período médio de incubação*: Período transcorrido entre o dia inicial da postura até a emergência da primeira larva (GLÓRIA et al., 1993).

*Período médio de eclosão*: Compreendido entre o aparecimento da primeira e da última larva (BELLATO, 1995).

*Percentual médio de eclosão*: Percentual estimado de larvas que eclodiram em relação ao total de ovos colocados (BELLATO, 1995).

### 2.6.3. Larvas e Ninfas

*Período médio parasitário*: tempo em que os carrapatos se alimentam sobre o hospedeiro.

*Período médio de pré-ecdise*: Intervalo de tempo compreendido desde a recuperação do instar ingurgitado até a realização da primeira ecdise de cada frasco (CHACÓN et al., 2003).

*Período médio de ecdise*: Compreende o período da realização da primeira ecdise até o dia em que o último instar realizou a ecdise (CHACÓN et al., 2003).

*Percentual médio de ecdise*: total de instares que realizaram ecdise em relação ao total existente (CHACÓN et al., 2003).

## **2.7. Análise Estatística**

Os dados foram previamente submetidos à verificação da normalidade. A partir desta análise prévia, os parâmetros biológicos que apresentaram distribuição normal foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA), e as médias foram analisadas através do teste Tukey, ao nível de 5% de confiança. Os dados avaliados como não paramétricos sofreram transformação binomial antes de serem analisados por ANOVA e teste Tukey no programa estatístico GramphPad Instat versão 6.0.

## **2.8. Aprovação do Comitê de Bioética e Biossegurança**

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro/COMEP sob o processo número 160/2011(Anexo B).

### 3 RESULTADOS

Os parâmetros biológicos das fêmeas ingurgitadas de *A. parvum* de diferentes biomas, mantidas em temperaturas reguladas a 27°C e 80±10% UR e escotofase podem ser analisados na Tabela 1.

Em relação ao período médio parasitário, a população Pantanal apresentou um período mais longo diferindo estatisticamente ( $P < 0,05$ ) das demais populações. Os períodos médios de pré-postura e postura foram semelhantes, não diferindo estatisticamente ( $P > 0,05$ ) entre as três populações. Além disso, observou-se diferença estatística entre o peso médio da postura obtido das fêmeas oriundas do Cerrado e as demais populações ( $P < 0,05$ ). Fêmeas do Chaco apresentaram um peso maior em relação às outras duas populações estudadas, diferindo da população Pantanal ( $P < 0,05$ ), resultado semelhante no parâmetro peso da quenógena onde novamente a população do Chaco apresentou um maior peso.

Ao analisar o Índice de Eficiência Nutricional se observa uma diferença significativa entre as três populações estudadas ( $P < 0,05$ ).

Em relação ao período da fase de ovo, o período de incubação diferiu significativamente entre os carrapatos da população Pantanal das demais populações. Embora o período médio de eclosão e o percentual médio de eclosão tenham sido menores na população Pantanal, não foram observadas diferenças significativas ( $P > 0,05$ ) entre estes parâmetros analisados (Tabela 2).

O período médio parasitário larval foi mais longo na população Pantanal, mas não foi observada diferença entre as populações estudadas ( $P > 0,05$ ). Todas as populações obtiveram um percentual de ecdise acima de 80% ( $P > 0,05$ ). A população Pantanal apresentou menor período de ecdise larval entre as demais populações observadas ( $P < 0,05$ ) (Tabela 3).

Como observado na Tabela 4 todos os parâmetros das ninfas ingurgitadas foram estatisticamente semelhantes, exceto no período de ecdise em que observamos uma diferença significativa da população Pantanal em relação às demais.

**Tabela 1.** Parâmetros biológicos da fase parasitária e não parasitária de fêmeas ingurgitadas de três populações de *Amblyomma parvum*, mantidas em câmaras climatizadas reguladas a temperatura de 27°C, 80±10% UR e escotofase. Na sequência: média e desvio padrão; amplitude de variação.

Parâmetros	Biomos		
	Chaco	Cerrado	Pantanal
Período parasitário (dias)	17,25 <sup>b</sup> ± 5,56 (11 – 24)	18,13 <sup>b</sup> ± 5,84 (12 – 28)	22,2 <sup>a</sup> ± 6,61 (8 – 28)
Peso da fêmea (mg)	342,35 <sup>a</sup> ± 67,61 (222,9 – 449,4)	324,2 <sup>a</sup> ± 63,16 (206,2 – 433,7)	260,3 <sup>b</sup> ± 36,19 (216,4 – 370,2)
Período de pré-postura (dias)	4,0 <sup>a</sup> ± 0,93 (3 – 6)	4,0 <sup>a</sup> ± 1,02 (2 – 5)	4,1 <sup>a</sup> ± 1,57 (1 – 8)
Período de postura (dias)	15,33 <sup>a</sup> ± 1,88 (12 – 18)	19,0 <sup>a</sup> ± 2,05 (16 – 23)	16,4 <sup>a</sup> ± 5,47 (6 – 29)
Peso da postura (mg)	198,57 <sup>a</sup> ± 47,83 (109,6 – 273,6)	164,9 <sup>b</sup> ± 59,54 (30,9 – 276,7)	88,3 <sup>c</sup> ± 22,52 (37,1 – 131,0)
Peso Quenógena	103,76 <sup>a</sup> ± 27,43 (32,4 – 140,4)	47,1 <sup>b</sup> ± 19,21 (15,4 – 87,0)	44,4 <sup>b</sup> ± 13,78 (26,8 – 72,3)
Índice de eficiência reprodutiva (%)	38,36 <sup>b</sup> ± 21,77 (4,27 – 66,16)	50,5 <sup>a</sup> ± 14,57 (14,9 – 86,8)	34,4 <sup>b</sup> ± 9,95 (15,1 – 52,7)
Índice de Eficiência Nutricional (%)	53,55 <sup>b</sup> ± 26,68 (8,50 – 103,36)	59,0 <sup>a</sup> ± 15,80 (19,3 – 98,2)	42,3 <sup>c</sup> ± 13,51 (19,5 – 73,4)

Médias seguidas de letras iguais na mesma linha não diferem significativamente entre si, em nível de 5% de significância.

**Tabela 2.** Parâmetros biológicos de ovos de três populações de *Amblyomma parvum*, mantidas em câmaras climatizadas reguladas a temperatura de 27°C, 80±10% UR e escotofase. Na sequência: média e desvio padrão; amplitude de variação.

Parâmetros	Biomás		
	Chaco	Cerrado	Pantanal
Período de incubação (dias)	20,5 <sup>b</sup> ± 1,5 (18 – 22)	21,9 <sup>b</sup> ± 0,5 (19 – 22)	24,7 <sup>a</sup> ± 1,0 (23 - 26)
Período de eclosão (dias)	6,5 <sup>a</sup> ± 1,8 (5 – 8)	6,4 <sup>a</sup> ± 2,5 (4 – 8)	5,8 <sup>a</sup> ± 2,7 (3 - 11)
Percentual de eclosão	96,7 <sup>a</sup> ± 5,1 (85 – 99)	95,9 <sup>a</sup> ± 3,8 (90 – 99)	94,7 <sup>a</sup> ± 5,7 (90 - 99)

Médias seguidas de letras iguais na mesma linha não diferem significativamente entre si, em nível de 5% de significância.

**Tabela 3.** Parâmetros biológicos da fase parasitária e não parasitária de larvas ingurgitadas de três populações de *Amblyomma parvum*, mantidas em câmaras climatizadas reguladas a temperatura de 27°C, 80±10% UR e escotofase. Na sequência: média e desvio padrão; amplitude de variação.

Parâmetros	Biomás		
	Chaco	Cerrado	Pantanal
Período parasitário	4,5 <sup>a</sup> ± 0,8 (4 – 6)	4,3 <sup>a</sup> ± 0,9 (4 – 6)	5,6 <sup>a</sup> ± 0,5 (4 – 8)
Período de pré-ecdise (dias)	13,4 <sup>a</sup> ± 0,5 (10 – 16)	10,5 <sup>b</sup> ± 0,9 (9 – 12)	9,7 <sup>b</sup> ± 0,6 (9 – 11)
Período de ecdise (dias)	9,9 <sup>a</sup> ± 1,0 (7 – 10)	9,4 <sup>a</sup> ± 0,8 (8 – 10)	5,5 <sup>b</sup> ± 0,7 (3 – 6)
Percentual de ecdise	95,7 <sup>a</sup> ± 7,9 (90 – 100)	93 <sup>a</sup> ± 2,4 (90 – 95)	81,3 <sup>a</sup> ± 15,9 (65 – 100)

Médias seguidas de letras iguais na mesma linha não diferem significativamente entre si, em nível de 5% de significância.

**Tabela 4.** Parâmetros biológicos da fase parasitária e não parasitária de ninfas ingurgitadas de três populações de *Amblyomma parvum*, mantidas em câmaras climatizadas reguladas a temperatura de 27°C, 80±10% UR e escotofase. Na sequência: média e desvio padrão; amplitude de variação.

Parâmetros	Biomias		
	Chaco	Cerrado	Pantanal
Período parasitário (dias)	8 <sup>a</sup> ± 0,82 (7 – 9)	7 <sup>a</sup> ± 0,81 (7 – 9)	7 <sup>a</sup> ± 0,81 (6 – 8)
Período de pré-ecdise (dias)	16,78 <sup>a</sup> ± 1,31 (14 – 19)	15,9 <sup>a</sup> ± 1,10 (14 – 19)	14,51 <sup>a</sup> ± 1,74 (9 – 17)
Período de ecdise (dias)	12,78 <sup>b</sup> ± 1,31 (11 – 14)	13,25 <sup>b</sup> ± 1,48 (12 – 16)	16,54 <sup>a</sup> ± 2,75 (14 – 19)
Percentual de ecdise	90,17 <sup>a</sup> ± 13,91 (50 – 100)	86 <sup>a</sup> ± 15,68 (50 – 100)	88,48 <sup>a</sup> ± 17,39 (40 – 100)

Médias seguidas de letras iguais na mesma linha não diferem significativamente entre si, em nível de 5% de significância.



## 4 DISCUSSÃO

Para melhor compreensão dos resultados obtidos foi construído um quadro onde constam todos os dados obtidos e publicados sobre a biologia de *A. parvum* (Quadro 1).

Em relação à população Chaco comparada com o trabalho de Guglielmone et al. (1991), que são da mesma região (Salta, Argentina), nos indica que os dois trabalhos não apresentam resultados similares em relação aos parâmetros biológicos, mas a duração do período médio do ciclo é semelhante, o que sugere particularidades que até o presente momento não sabemos quais são, pois depende de mais estudos ecológicos e biológicos para melhor elucidação.

Quando se faz a mesma comparação com a população Pantanal do presente estudo com os resultados da dissertação de Kawamura (2009), observa-se uma similaridade de resultados. Uma das causas dessa discrepância de resultados do presente estudo com os de Guglielmone et al. (1991) e Kawamura (2009) pode ser o fato que o local de pesquisa (UFRRJ, Seropédica) de Kawamura (2009) foi o mesmo utilizado para esse presente estudo, pois a metodologia e hospedeiros empregados foram semelhantes nos três estudos.

O período parasitário da fase adulta e ninfal de *A. parvum* observado pelas três populações foi bem mais longo em relação aos observados por outros autores (GUGLIELMONE et al., 1991; KAWAMURA, 2009; OLEGÁRIO et al., 2011; GERARDI et al., 2013) (Tabela 5). Isso pode ser resultado devido à temperatura do local onde os hospedeiros estavam alojados. A temperatura do município de Seropédica, RJ, local onde foi realizado o estudo, segundo o Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), tem temperatura média anual de 23,83°C, com as temperaturas médias anuais mínimas e máximas, respectivamente, 20,1°C e 29,8°C, mas em algumas épocas do ano, principalmente nos meses de verão a temperatura pode chegar a 40°C, podendo causar uma diapausa comportamental que nada mais é que a inibição da procura do hospedeiro pelos adultos pós-ecdise ou o retardamento ou mesmo a parada do processo de ingurgitamento que é caracterizada em carrapatos pela perda temporária da agressividade consequentemente causando um prolongamento na alimentação (BELOZEROV, 1982). Na América do Sul, diapausa comportamental foi descrito para larvas de *Amblyomma cajennense* no Brasil (CABRERA; LABRUNA, 2009).

Em relação ao período de incubação dos *A. parvum* da população Cerrado houve uma discrepância em relação aos resultados obtidos com aqueles de Olegário et al., (2011) que são da mesma região (Goiás) (Quadro 1). É provável que tal fato se deva às diferenças entre gerações utilizadas na obtenção desse parâmetro, pois enquanto foram utilizados carrapatos de primeira e segunda geração neste estudo, Olegário et al., (2011) utilizaram carrapatos da quinta a décima segunda geração. É sabido que a alta taxa de homozigose pode levar a redução dos parâmetros biológicos dos carrapatos mantidos em colônia (TROUGHTON; LEVIN, 2007).

Segundo Gerardi (2012), cães e bovinos são os melhores hospedeiros para a fase adulta de *A. parvum* com origem brasileira e argentina, mas que de maneira geral, coelhos também podem ser escolhidos como hospedeiros adequados, pois permitem um desempenho biológico próximo ao observado nos melhores hospedeiros. No presente estudo foram utilizados coelhos domésticos como hospedeiros, pois eles são utilizados como hospedeiro rotineiramente na alimentação dos carrapatos de diversas espécies de ixodídeos (SANAVRIA; PRATA 1996; PRATA et al. 1998; FACCINI et al. 2010; PINHEIRO et al. 2013) e pode-se observar uma elevada porcentagem de eclosão e ecdise.

Ao comparar esses resultados com os de Guglielmone et al., (1991) (99,6 dias) e Olegário et al., (2011) (101,6 dias) podemos observar que os resultados são semelhantes e que podemos obter até três gerações em condições laboratoriais. Esses resultados evidenciam que o ciclo em laboratório de *A. parvum* é curto quando comparado com outras espécies de *Amblyomma* da região neotropical nas mesmas condições de laboratório: *Amblyomma aureolatum* – 116 a 168 dias (RODRIGUES et al., 2002); *Amblyomma auricularium* – 125,5 dias (FACCINI et al., 2010); *Amblyomma dubitatum* – 189,4 dias (LABRUNA et al., 2004); *Amblyomma neumanni* – 205,7 dias (AGUIRRE et al., 1999); *Amblyomma incisum* – 262,3 dias (SZABÓ et al., 2009).

Foram adicionados dados biológicos de uma nova população (Pantanal) àquelas trabalhadas por Gerardi (2012) e Gerardi et al. (2013), onde os autores desses dois estudos afirmam que as populações da Argentina e Brasil pertencem a mesma espécie. Com os resultados obtidos pelo presente estudo pode-se constatar de que se trata da mesma espécie visto que os resultados foram semelhantes biologicamente entre si.

## 5 CONCLUSÃO

As três populações avaliadas de *A. parvum* dos biomas, Chaco, Cerrado e Pantanal apresentam pequenas diferenças em relação aos parâmetros biológicos, mas que não comprometem o “*status*” da espécie em questão. Estudos moleculares juntamente com aqueles reprodutivos, ou seja, cruzamento entre populações de *A. parvum* de diferentes origens geográficas poderão dar um suporte aos achados da biologia.

**Quadro 1.** Períodos médios dos parâmetros biológicos de *Amblyomma parvum* resultantes de infestações em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*), mantidos em estuda tipo BOD a 27°C e 85%UR, encontrados na literatura.

Referências	Período (dias)							
	Parasitário adultos	Pré-oviposição	Oviposição	Incubação	Parasitário larval	Pré-ecdise ninfa	Parasitário ninfal	Pré-ecdise adultos
Guglielmone et al. (1991) – Chaco	8,0	5,7	17,5	31,8	3,2	10,9	4,7	17,8
Kawuamura (2009) – Pantanal	n/d	4,1	19,9	24,1	n/d	9,9	n/a	14,3
Olegário et al. (2011) – Cerrado	10,6	5,1	n/d	47,7	4,3	13,4	4,0	16,5
Gerardi et al. (2013) – Cerrado	10,3	4,1	n/d	29,2	5,7	n/d	4,6	n/d
Gerardi et al. (2013) – Chaco	10,1	4,1	n/d	28,5	5,7	n/d	6,8	n/d
Pinheiro (2015) – Pantanal*	22,2	4,1	16,4	24,7	5,6	9,7	7,0	14,5
Pinheiro (2015) – Cerrado*	18,1	4,0	19,0	21,9	4,3	10,5	7,0	15,9
Pinheiro (2015) – Chaco*	17,2	4,0	15,3	20,5	4,5	13,4	8,0	16,7

n/d: dados não disponíveis

\*presente estudo

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIRRE, D.H.; VIÑABAL, A.E.; GUGLIELMONE, A.A. The life cycle of *Amblyomma neumanni* Ribaga, 1902 (Acari: Ixodidae) in the laboratory. **Experimental Applied Acarology**, v.23, p.159–164, 1999.
- ALHO, C.J.R. The Pantanal. In: Fraser LH, Keddy PA (eds) **The world's largest wetlands—ecology and conservation**. Cambridge University Press, New York, p.203–271, 2005.
- ALLEM, A.C.; VALLS, J.F.M. **Recursos forrageiros nativos do Pantanal Mato-Grossense**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 339pp., 1987.
- ANDERSON, J.F.; MAGNARELLI, L.A. Epizootiology of Lyme disease-causing borreliae. **Clinical Dermatology**, v.11, n.3, p.339–351, 1993.
- APANASKEVICK, D.A.; OLIVER Jr, J.H. **Life cycles and natural history of ticks**, p.59-73. In: SONENSHINE, D.E.; ROE, R.M.(eds). *Biology of ticks*, Oxford University Press, v.1, 560pp., 2013.
- BELLATO, V. **Efeitos de diferentes temperaturas no desenvolvimento de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) em condições de laboratório**. 1995. 58f. Tese de Doutorado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.
- BELOZEROV, V.N. **Diapause and biological rhythms in ticks**. In: OBENCHAIN, F.D., GALUN, R. *Physiology of ticks*. Oxford: Pergamon Press, 509pp., 1982.
- BENNETT, G.F. Oviposition of *Boophilus microplus* (Canestrini) (ACARIDA: IXODIDAE): (Influence of tick size on egg production). **Acarology**, v.16, n.1, p.52-61, 1974.
- BUKART, R.; BÁRBARO, N.O.; SÁNCHEZ, R.O.; GÓMEZ, D.A. **Eco-Regiones de La Argentina**. Programa Desarrollo Institucional Ambiental. 43pp, 1999.
- CABRERA, R.R.; LABRUNA, M.B. Influence of photoperiod and temperature on the larval behavioral diapause of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). **Journal Medical of Entomology**, v.46, p.1303–1309, 2009.
- CHACÓN, S.C.; CORREIA, P.G.; BARBIERI, F.S.; DAEMON, E.; FACCINI, J.L.H. Efeito de três temperaturas constantes sobre a fase não parasitária de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.12, n.1, p.13-20, 2003.
- EITEN, G. Vegetação do Cerrado. In: PINTO, M. N. (Org.). **Cerrado: Caracterização, ocupação e perspectivas**. Brasília: UNB, SEMATEC, 2. Ed. 681pp., 1994.
- FACCINI, J.L.H.; CARDOSO, A.C.B.; ONOFRIO, V.C.; LABRUNA, M.B.; BARROS-BATTESTI, D.M. The life cycle of *Amblyomma auricularum* (Acari:

Ixodidae) using rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) as experimental host. **Experimental and Applied Acarology**, v.50, n.1, p.71-77, 2010.

GALDINO, S.; RESENDE, E. K. Previsão de cheias e secas da Embrapa auxilia pantaneiros. Corumbá: EMBRAPA - CPAP, 2000. 5p. Artigo de Divulgação na Mídia.

GERARDI, M. **Biologia comparada de carrapatos *Amblyomma parvum* (Acari: Ixodidae) do Brasil e da Argentina**. 2012. 93p. Dissertação (Mestrado em Imunologia e Parasitologia Aplicadas). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal Uberlândia, Uberlândia, MG, 2012.

GERARDI, M.; MARTINS, M.M.; NAVA, S.; SZABÓ, M.P.J. Comparing feeding and reproductive parameters of *Amblyomma parvum* tick populations (Acari: Ixodidae) from Brazil and Argentina on various host species. **Veterinary Parasitology**, v.197, p.312-317, 2013.

GLÓRIA, M.A.; DAEMON, E.; FACCINI, J.L.H.; GRISI, L. Influência de diferentes temperaturas sobre a biologia da fase não parasitária de *Boophilus microplus* (Can., 1887) (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.2, n.2, p.85-91, 1993.

GUGLIELMONE, A.A.; MANGOLD, A.J.; GARCIA, M.D. The life cycle of *Amblyomma parvum* Aragão, 1908 (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions. **Experimental and Applied Acarology**, v.13, n.2, p.129-136, 1991.

INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA - INMET. Disponível em: <[http://www.inmet.gov.br/sim/gera\\_graficos.php?chklist=1%2C2%2C&UF=&mostrar=1&imgmap=&Data=07%2F2009&Data2=2013&enviar=Mostrar+Gr%2Fgraficos](http://www.inmet.gov.br/sim/gera_graficos.php?chklist=1%2C2%2C&UF=&mostrar=1&imgmap=&Data=07%2F2009&Data2=2013&enviar=Mostrar+Gr%2Fgraficos)> Acessado em 30 de julho de 2013.

KAWAMURA, T.A. **Influência de Cinco Temperaturas na Fase de Vida Livre de *Amblyomma parvum* (Aragão, 1908) (Acari: Ixodidae)**. 2009. 23p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias, Parasitologia Veterinária). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2009.

LABRUNA, M.B.; PINTER, A.; TEIXEIRA, R.H.F. Life cycle of *Amblyomma cooperi* (Acari: Ixodidae) using capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) as hosts. **Experimental and Applied Acarology**, v.32, p.79-88, 2004.

MACHADO, D.O.; ALVES-SOBRINHO, T.; RIBEIRO, A.S.; IDE, C.N.; OLIVEIRA, P.T.S. **Erosividade da chuva para o bioma Pantanal. Engenharia Sanitária Ambiental**, Rio de Janeiro, v.19, n.2, 2014. Disponível em <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1413-41522014000200195&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-41522014000200195&lng=en&nrm=iso)>. Acessado em 12 de agosto de 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-41522014000200010>.

NAVA, S., MANGOLD, A.J., GUGLIELMONE, A.A. Aspects of the cycle of *Amblyomma parvum* (Acari: Ixodidae) under natural conditions. **Veterinary Parasitology**, v.156, p.270-276, 2008.

NEITZ, W.O.; BOUGHTON, F.; WALTERS, H.S. Laboratory investigations on the karoo paralysis tick (*Ixodes rubicundus* Neumann, 1904). **Onderstepoort Journal Veterinary Research**, v.38, n.3, p.215-224, 1971.

NEVES, D.P. Classe Arachnida. In: COSTA J.O.; BOTELHO, J.R. **Parasitologia Humana**, 1.ed. São Paulo:Editora Atheneu, p.413-421, 2005.

OBIO – Observatorio Nacional de Biodiversidad. **Chaco Seco**. Acesso em: <http://obio.ambiente.gob.ar/ecorregiones/chaco-seco>, 12 de agosto de 2014.

OLEGÁRIO, M.M.M.; GERARDI, M.; TSURUTA, S.A.; SZABÓ, M.P.J. Life cycle of the tick *Amblyomma parvum* Aragão, 1908 (Acari: Ixodidae) and suitability of domestic hosts under laboratory conditions. **Veterinary Parasitology**, v.179, p.203–208, 2011.

PINHEIRO, M.C.; SÁ, I.J.B.; RIBEIRO, C.C.D.U.; MARTINS, C.D.; RAIA, V.A.; FAMADAS, K. Prognosing the sex of adults of *Amblyomma auricularium* through evaluating the biological parameters of engorged nymphs. **Ciência Rural**, v.43, n.4, p.662-667, 2013.

PORTAL BRASIL. **Cerrado: Clima e Relevô**. Disponível em: <[http://www.portalbrasil.net/cerrado\\_climaerelevo.htm](http://www.portalbrasil.net/cerrado_climaerelevo.htm)>. Acessado em: 12 de agosto, de 2014.

POTT, A.; SILVA, J.S.V.; ABDON, M.M.; POTT, V.J.; RODRIGUES, L.M.; SALIS, S.M.; HATSCHBACH, G.G. **Vegetação**. In Brasil. Ministério do Meio Ambiente, dos Recursos Hídricos e da Amazônia Legal. Plano de conservação da Bacia do Alto Paraguai (Pantanal) - PCBAP. Diagnóstico dos meios físico e biótico. MMA/SEMAM/PNMA, Brasília, v.2, p.3-179, 1997.

PRATA, M.C.A.; FACCINI, J.L.H.; DAEMON, E. Relationship between weight and number of engorged *Amblyomma cajennense* larvae and nymphs (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) in experimental infestations on rabbits. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.7, n.2, p.107-111, 1998.

RANDOLPH, S.E. **The impact of tick ecology on pathogen transmission dynamics**. In: BOWMAN, A.S.; NUTTALL, P. (eds) Ticks: biology, diseases and control. Cambridge University Press, Cambridge, p.40–72, 2008.

REBOUÇAS, A.C.; BRAGA, B.; TUNDISI, J.G. **Águas doces no Brasil: capital ecológico, uso e conservação**. 2 ed. São Paulo: Escrituras Editora, 768 pp., 2002.

RIBEIRO, J. F.; WALTER, B. M. T. **Fitofisionomias do Bioma Cerrado**. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P. (Ed.). Cerrado: ambiente e flora. Planaltina: Embrapa CPAC, 556p., 1998.

RODRIGUES, D.S.; CARVALHO, H.A.; FERNANDES, A.A.; FREITAS, C.M.V.; LEITE, R.C.; OLIVEIRA, P.R. Biology of *Amblyomma aureolatum* (Pallas, 1772) (Acari: Ixodidae) on some laboratory hosts in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.97, n.6, p.853–856, 2002.

SANAVRIA, A., PRATA, M.C.A. Metodologia para colonização do *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) em laboratório. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.5, n.2, p.87-90, 1996.

SONENSHINE, DE. **Biology of ticks**. New York (NY): Oxford University Press. 447pp., 1991.

SZABÓ, M.P.J.; PEREIRA, L.F.; CASTRO, M.B.; GARCIA, M.V.; SANCHES, G.S.; LABRUNA, M.B. Biology and life cycle of *Amblyomma incisum* (Acari, Ixodidae). **Experimental Applied Acarology**, v.48, p.263–271, 2009.

TROUGHTON, D.R.; LEVIN, M.L. Life cycles of seven Ixodid tick species (Acari: Ixodidae) under standardized laboratory conditions. *Journal Medical Entomology*, v.44, p.732-740, 2007.

## **CAPÍTULO II**

### **VIABILIDADE DE NINFAS INGURGITADAS DE TRÊS POPULAÇÕES DE *Amblyomma parvum* Aragão, 1908 (Acari: Ixodidae) IMERSAS EM ÁGUA DESTILADA**



## RESUMO

PINHEIRO, Michele da Costa. **Capítulo II: Viabilidade de ninfas ingurgitadas de três populações de *Amblyomma parvum* Aragão, 1908 (Acari: Ixodidae) imersas em água destilada** 2015. 26p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2015.

Uma série de fatores extrínsecos afetam o sucesso no desempenho reprodutivo e sobrevivência de carrapatos após o desprendimento de seus hospedeiros como precipitação, umidade, temperatura, inundações, ventos, e danos físicos. *Amblyomma parvum* é uma espécie de carrapato de ampla distribuição geográfica tendo sido assinalada desde o sul do México até a Argentina, mas com preferência pelo território chaquenho indicando uma tendência dessa espécie a se estabelecer em zonas mais áridas, porém há relatos em outras regiões como Mata Atlântica, Amazônica e Pantanal. Nessa última região em um período do ano há inundação de extensas áreas onde os animais precisam encontrar abrigo. Não é totalmente compreendido como artrópodes terrestres sobrevivem às inundações temporárias que seguem fortes chuvas então o objetivo desse trabalho foi comparar o efeito da imersão sob o ciclo de vida a fim de responder como o estresse hídrico pode afetar e/ou alterar a eficiência reprodutiva de três populações de *A. parvum*. Para isso ninfas de *A. parvum* de três colônias estabelecidas em laboratório da região do Pantanal, Cerrado e Chaco foram imersas por 24, 48, 72 e 96 horas em tubos de ensaio contendo água destilada. Um grupo controle foi mantido seco e um grupo constante imerso foi mantido por algumas semanas. Passados os períodos estipulados, as ninfas foram retiradas da água, secas e acondicionadas em tubos de ensaio. Toda a fase não parasitária foi mantida em estufas biológicas a  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  e  $85 \pm 5\%$  UR e foram utilizados coelhos domésticos como hospedeiros. Após a emergência dos adultos, nova infestação foi realizada para observação da continuação do ciclo após o efeito da imersão. Pode-se observar que a população Pantanal demonstrou ser mais sensível em relação à imersão mesmo tendo a observação de ecdise no grupo 96 horas. Apesar disso no grupo 48 horas não houve continuação do ciclo enquanto que a população Chaco e Cerrado continuaram seu ciclo mesmo depois que as ninfas permanecerem 48 horas submersas. Pode-se observar que a partir de 72 horas a imersão causa um efeito deletério para essa espécie. Os resultados aqui relatados sugerem que a capacidade de sobreviver submersos por um período é um aspecto adicional da biologia dessa espécie de carrapato.

**Palavras-chave:** ciclo de vida, Brasil, Argentina.



## ABSTRACT

PINHEIRO, Michele da Costa. **Chapter II: Viability of engorged nymphs of three *Amblyomma parvum* population Aragão, 1908 (Acari: Ixodidae) immersed in distilled water** 2015. 26p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2015.

A number of extrinsic factors affect the successful reproductive performance and survival of ticks after the detachment of their hosts as precipitation, humidity, temperature, flood, wind, and physical damage. *Amblyomma parvum* is a species of tick widely distributed tick has been marked from southern Mexico to Argentina, but with preference for the Chaco territory indicating a tendency of this species to be established at more arid areas, but there are reports in other regions as Atlantic Forest, Amazonian and Pantanal. In this last region in a year-ago period flood large areas where animals need to find shelter. It is not fully understood as terrestrial arthropods survive the temporary flooding following heavy rains so the aim of this study was to compare the effect of immersion in the life cycle in order to respond to water stress can affect and / or changes to three reproductive efficiency populations of *A. parvum*. For this nymphs of *A. parvum* of three colonies established in the laboratory of the Pantanal, Cerrado, and Chaco were immersed for 24, 48, 72 and 96 hours in the assay tubes containing distilled water. A control group was kept dry and constant group was kept immersed for a few weeks. After the stipulated periods, the nymphs were removed from the water, dried and placed in assay tubes. All non-parasitic phase was maintained in BOD at  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  and  $85 \pm 5\%$  RH and was used domestic rabbits as hosts. After adult emergence, new infestation was performed to observe the continuation of the cycle after the effect of immersion. It can be seen that the Pantanal population was more sensitive to immersion even though the observation ecdysis in Group 96 hours. Despite this in Group 48 there was no continuation of the cycle while the Chaco and Cerrado population continued its cycle even after the nymphs remain submerged 48 hours. It can be seen that from 72 hours immersion causes a deleterious effect on this species. The results reported here suggest that the ability to survive underwater for a period is an additional aspect of the biology of this species of tick.

**Keys words:** life cycle, Brazil, Argentina.



## 1 INTRODUÇÃO

Carrapatos passam mais de 95% do tempo de duração de seu ciclo fora do hospedeiro (NEEDHAN; TEEL, 1991) e estão sujeitos às mais diversas intempéries como alterações extremas de temperatura, umidade relativa do ar (BARCELLOS et al., 2009). Em algumas circunstâncias carrapatos são submetidos a condições de alagamento.

Como a maioria dos artrópodes terrestres, carrapatos, podem sobreviver por alguns períodos submersos na água. Segundo Fielden et al. (2011) o oxigênio dissolvido é obtido a partir da água através da placa espiracular estruturalmente complexa, que funciona semelhante a um plástron. Essa habilidade de permanecer submersos em água por um período pode ser determinante para a sobrevivência daquelas espécies de carrapatos que habitam áreas que sofrem inundações (SANDERSON et al., 2011; SCHIERMEIER, 2011).

O efeito simulado no laboratório da imersão sobre a sobrevivência dos carrapatos já foi objeto de estudo para várias espécies de ixodídeos. O primeiro estudo que impulsionou esse tema foi o de Legg (1930) em que ovos de *Boophilus australis* (= *Rhipicephalus microplus*) foram imersos e pôde ser constatado que a cada intervalo de 24 horas em que os ovos permaneciam sob imersão, sua fertilidade era reduzida progressivamente. Também podem ser destacados os estudos de Sutherst, (1971); Smith, (1973); Bennett, (1974); Campbell; Glines, (1979); Koch, (1986); Gazeta et al. (1995); Paula et al. (2000; 2004; 2005); Louzada; Daemon, (2003); Cançado et al. (2006); Fielden et al. (2011); Giannelli et al. (2012); Sá-Hungaro et al. (2014) onde diversos parâmetros da fase não parasitária foram avaliados a partir de carrapatos em imersão.

A distribuição de *Amblyomma parvum* compreende a região Neotropical (NAVA et al., 2008) sendo os principais registros na província do Chaco argentino, seguido pelo Cerrado brasileiro, explicando a preferência por ambientes mais áridos (NAVA et al., 2008), mas no Brasil também há relatos para região amazônica (MULLINS et al., 2004), Mata Atlântica (PINHEIRO et al., 2014) e região do Pantanal (PEREIRA et al., 2000; MARTINS et al. 2004; CANÇADO et al., 2013; MEDRI et al., 2010; RAMOS et al., 2014), onde em época das cheias, em poucos dias o solo se encharca e não consegue mais absorver a água da chuva que passa a encher os banhados, as lagoas e transbordar dos leitos mais rasos, formando cursos de localização e volume variáveis. Diversos animais precisam procurar abrigo para se proteger da subida das águas.

Com o objetivo de compreender a plasticidade de *A. parvum* frente a situações de alagamento numa primeira etapa foi avaliada a eficiência reprodutiva de três populações de três biomas distintos. Algumas questões foram abordadas como: Qual o limite de tempo para ninfas ingurgitadas permanecerem em imersão de água sem que haja interrupção ou alterações biológicas no decorrer do ciclo de vida de *A. parvum*? Populações de *A. parvum* geograficamente distintas respondem do mesmo modo a situações de alagamento?



## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Origem dos hospedeiros

Os hospedeiros utilizados em todas as etapas do estudo são os mesmos descritos no Capítulo I, item 2.2.

### 2.2. Colônias de estudo

Para o presente estudo foram utilizadas três populações provenientes das mesmas colônias estabelecidas em laboratório descritas no Capítulo I, item 2.4.

### 2.3. Protocolo experimental

Ninfas ingurgitadas de *A. parvum* das três colônias de estudo foram obtidas através de infestações em coelhos domésticos, utilizando a técnica da touca de pano aderido à base das orelhas (NEITZ et al., 1971). Os espécimes desprendidos foram levados ao laboratório, lavados e secados em papel absorvente. Após esta etapa, estes foram distribuídos em tubos de ensaio com 15 ml de capacidade, sendo formados seis grupos com 10 tubos contendo 10 espécimes cada: o grupo controle, os grupos para imersão por 24, 48, 72 e 96 horas, e um grupo para imersão permanente, totalizando 600 espécimes ingurgitados por experimento. Após a distribuição dos exemplares, todos os tubos foram identificados e fechados com tecido de organza e elástico de borracha. O grupo controle permaneceu seco, enquanto que os demais grupos receberam água destilada até a sua borda, com auxílio de uma seringa plástica não agulhada, sendo acondicionados, ainda, em Bekers de vidro repletos com água destilada, para evitar a evaporação da mesma ou a formação de bolhas de ar, segundo técnica de Paula et al. (2000) (Figura 1A e B).

Todos os tubos foram mantidos em condições controladas em estufa tipo BOD, regulada a  $27 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $80 \pm 10\%$  de UR e escotofase. Decorridos os prazos de 24, 48, 72 e 96 horas, os respectivos tubos foram retirados da estufa para que a água em seu interior pudesse ser escoada, sendo então retornados para as condições anteriormente citadas (Figura 1C e D). O grupo imerso permanentemente foi mantido nestas condições controladas por algumas semanas.

Todo material foi observado diariamente para verificação dos parâmetros relativos à fase não parasitária de ninfas ingurgitadas.

Após a emergência dos adultos, nova infestação foi realizada seguindo a mesma técnica de Neitz et al. (1971), sendo desta vez no dorso do hospedeiro. Para cada população foram utilizados como hospedeiros dois coelhos com 10 casais cada. No laboratório as fêmeas ingurgitadas recuperadas de cada colônia após total alimentação foram lavadas com água corrente, secadas em papel absorvente, pesadas em balança analítica, identificadas e acondicionadas em placa de Petri por fixação em posição dorsal com auxílio de esparadrapo para realização da postura.

Os ovos foram coletados de três em três dias e acondicionados em seringas plásticas descartáveis de 10 ml, fechadas com tecido tipo organza e mantidas em câmara climatizada com já descrito anteriormente até a observação total da eclosão.

As larvas com 15 a 20 dias pós-eclosão foram alimentadas em coelhos utilizando a mesma técnica de Neitz et al. (1971). Os hospedeiros foram observados diariamente e após queda natural, as larvas ingurgitadas foram coletadas e pesadas e armazenadas em seringas semelhantes a usadas para a observação dos ovos até o fim do período de ecdise ninfal a fim de completar o ciclo.

Um fluxograma experimental pode ser visto na Figura 2.

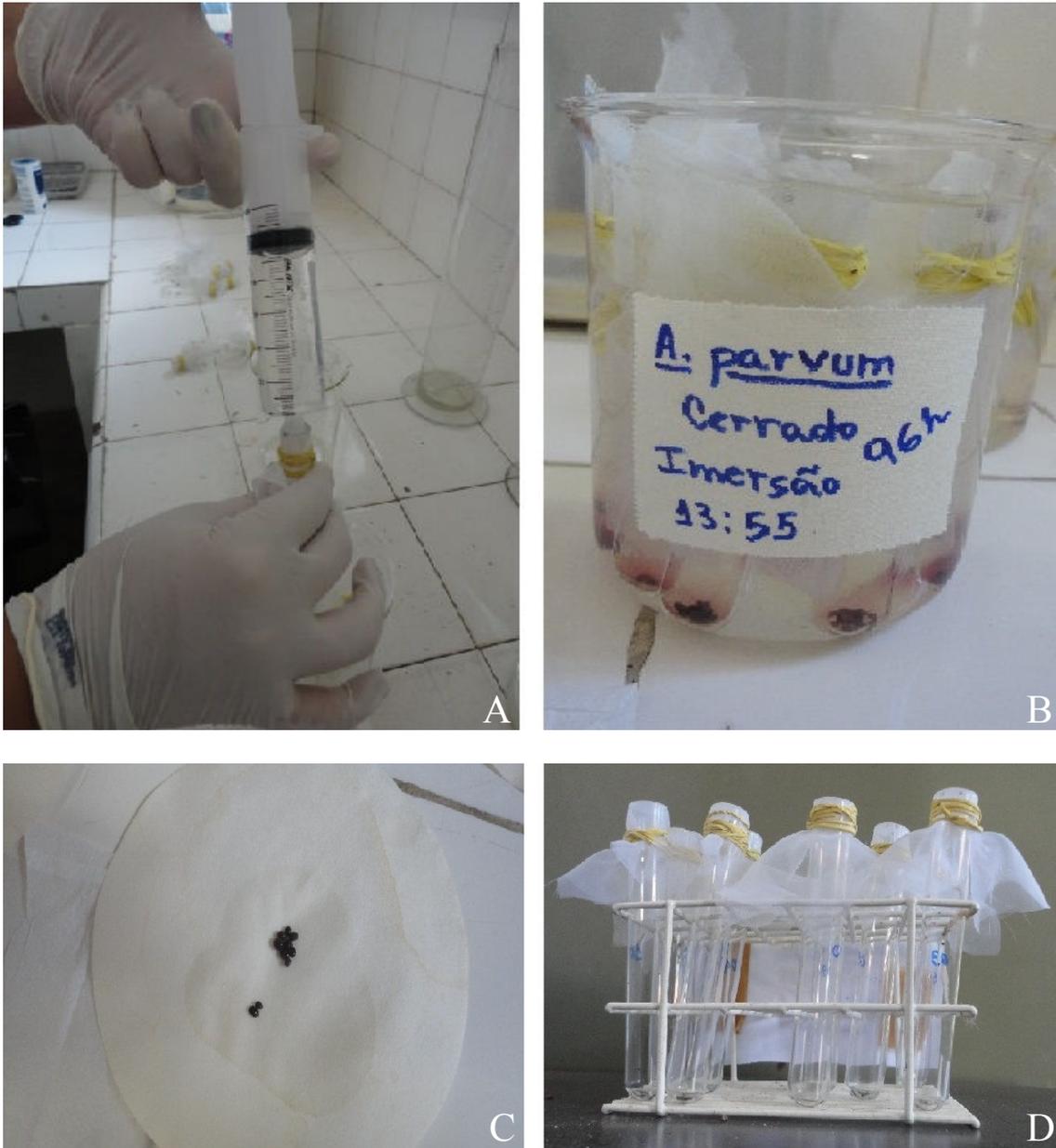
#### **2.4. Análise estatística**

Os parâmetros biológicos analisados na fase larval e ninfal foram: pré-ecdise, ecdise e percentual de ecdise. Já na fase adulta os parâmetros analisados foram: peso da fêmea ingurgitada, período pré-postura, postura, postura total, peso da quenógena. Também foi analisado o Índice de Eficiência Reprodutiva (IER) e Índice de Eficiência Nutricional (IEN) segundo os cálculos de Bennett (1974).

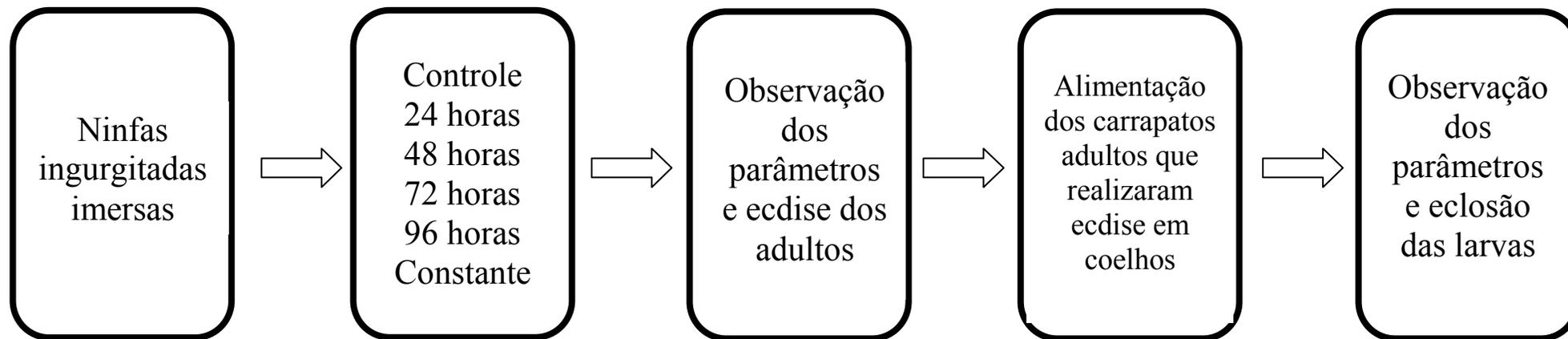
Os resultados foram avaliados pela Análise de Variância (ANOVA) e pelo teste Tukey-Kramer ao nível de significância de 5% após passar pelo teste de normalidade.

#### **2.5. Aprovação do Comitê de Bioética e Biossegurança**

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro/COMEP sob o processo número 179/2011(Anexo C).



**Figura 1.** Ninfas ingurgitadas de *Amblyomma parvum*: A, sendo acondicionadas em frascos com água destilada. B, grupo de exemplares do tratamento de 96 horas em Beker de vidro repleto com água destilada para evitar evaporação ou formação de bolhas. C, ninfas sobre papel filtro para secagem. D, ninfas em tubos de ensaio para observação da emergência dos adultos. Fotos: Pinheiro, 2013.



**Figura 2.** Fluxograma experimental com resumo das etapas do estudo.

### 3 RESULTADOS

Por não apresentarem ecdise de adulto ou ninfas ingurgitadas viáveis os grupos 72 e 96 horas não foram incluídos nas análises estatísticas, sendo essas referentes somente aos grupos controle, 24 e 48 horas. Resultados referentes a ninfas submersas estão demonstrados na Tabela 1 e Figura 3.

A partir de 72 horas de imersão das ninfas ingurgitadas não se observou mais ecdise de adultos nas três populações com exceção de 96 horas da população Pantanal cujos adultos que emergiram morreram antes mesmo de serem levados para futura alimentação.

Nenhuma das ninfas ingurgitadas imersas continuamente por oito semanas sobreviveu, morrendo ainda sob imersão. No conteúdo do tubo após cerca de uma semana de imersão foi observada a presença de traços de um líquido avermelhado semelhante a sangue (Figura 4).

Analisando as populações individualmente pôde ser observado que o percentual de ecdise diminuiu à medida que o tempo de imersão aumentava, embora diferenças estatísticas tenham sido observadas ( $P < 0,05$ ) (Tabela 1).

A porcentagem de ecdise influenciou os períodos de pré-ecdise e ecdise das três populações (Cerrado, Pantanal e Chaco), onde se pode observar que o grupo 48 horas das populações Chaco e Pantanal apresentaram uma baixa porcentagem de ecdise (16,3%) e o período pré-ecdise foi mais curto em relação ao grupo controle como podemos observar na Tabela 1.

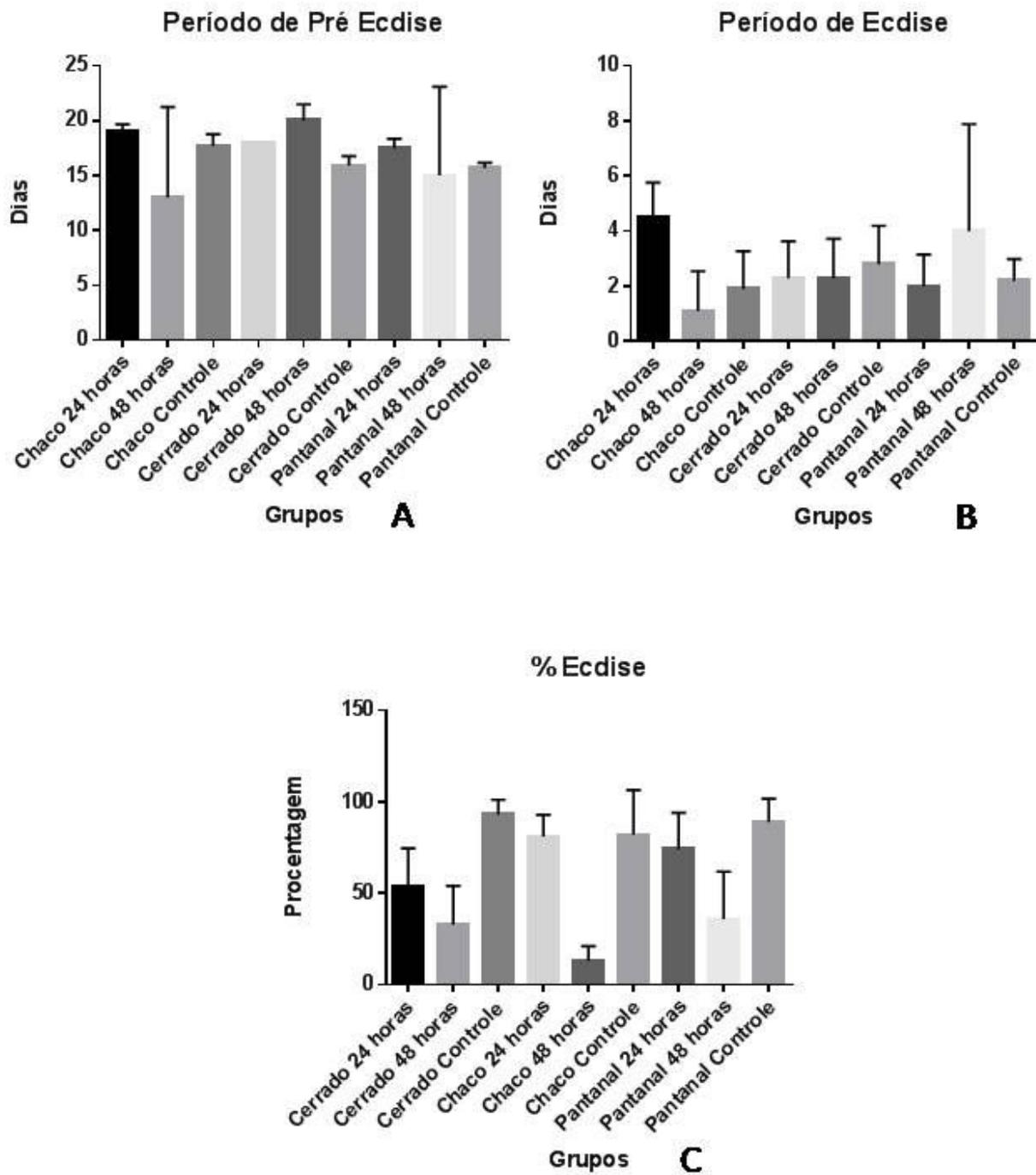
Após a emergência dos adultos, casais de *A. parvum* de cada população foram alimentados em coelhos. A porcentagem de recuperação de fêmeas ingurgitadas com queda natural e que realizaram postura em cada população está na Tabela 2, onde os maiores valores observados são referentes ao grupo 48 horas da população Cerrado. Em contraposição, entre os tratamentos da população Cerrado o grupo 48 horas foi o que apresentou menor valor de peso entre as fêmeas e conseqüentemente menor peso de postura (Tabela 3).

Na população Pantanal apesar de ter ocorrido ecdise no grupo 48 horas, ou os adultos morreram ou não conseguiram se fixar no hospedeiro. No grupo controle e 24 horas do Pantanal, todas as fêmeas ingurgitadas realizaram postura (Tabela 2).

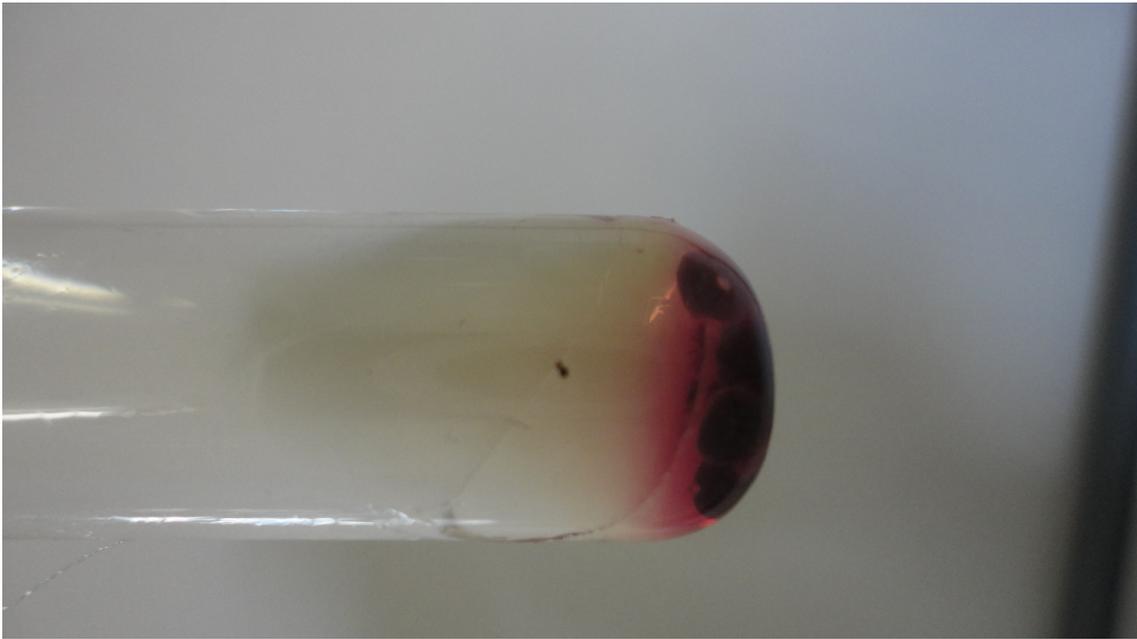
**Tabela 1.** Parâmetros biológicos de ninfas de três populações de *Amblyomma parvum* imersas em água destilada por diferentes períodos. Dados expressos em média; desvio padrão e amplitude de variação.

Parâmetros	População	Controle	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
Período pré-ecdise	Pantanal	15,7 <sup>Aa</sup> ±0,48 15-16	17,5 <sup>Aa</sup> ±0,85 16-18	15 <sup>Aa</sup> ±8,09 0-22	0	2±4,21 0-10
	Cerrado	15,9 <sup>Aa</sup> ±0,87 15-18	18 <sup>Aa</sup> ±0,00 18-18	20 <sup>Aa</sup> ±1,49 19-23	0	0
	Chaco	17,7 <sup>Aa</sup> ±1,05 18-20	19,1 <sup>Aa</sup> ±0,56 18-20	13 <sup>Ab</sup> ±10,16 0-22	0	0
	Pantanal	2,2 <sup>Aa</sup> ±0,78 1-4	2,0 <sup>Aa</sup> ±1,15 1-4	4,0 <sup>Ab</sup> ±3,88 0-12	0	0
	Cerrado	2,8 <sup>Aa</sup> ±1,39 1-5	2,3 <sup>Aa</sup> ±1,33 1-5	2,3 <sup>Ba</sup> ±1,41 1-5	0	0
	Chaco	1,9 <sup>Ab</sup> ±1,30 0-5	4,5 <sup>Ba</sup> ±1,27 3-6	1,1 <sup>Bb</sup> ±1,45 0-5	0	0
Porcentagem ecdise	Pantanal	88 <sup>Aa</sup> ±12,86 60-100	74 <sup>Aa</sup> ±20,11 40-100	36 <sup>Ab</sup> ±25,90 0-70	0	0
	Cerrado	93 <sup>Aa</sup> ±8,23 80-100	54 <sup>Bb</sup> ±20,65 20-80	33 <sup>Ab</sup> ±21,10 10-60	0	0
	Chaco	82 <sup>Aa</sup> ±3,31 90-100	81 <sup>Aa</sup> ±12,80 60-100	16,3 <sup>Bb</sup> ±5,17 10-20	0	0

A, B,...: Letras maiúsculas diferentes nas colunas indicam diferença estatística pelo teste de Tukey (P<0,05); a, b: Letras minúsculas diferentes nas linhas indicam diferença estatística pelo teste Tukey (P<0,05); Letras iguais não diferem entre si significativamente.



**Figura 3.** Dados referentes ao estágio ninfal de *Amblyomma parvum*, Período de pré-ecdise (A); período de ecdise (B); porcentagem de ecdise (C). Dados expressos em média e desvio padrão.



**Figura 4.** Ninfas ingurgitadas de *Amblyomma parvum* imersas apresentando no conteúdo do tubo a presença de traços de um líquido avermelhado semelhante a sangue, após cerca de uma semana de imersão. Fotos: Pinheiro, 2013.

**Tabela 2.** Número e porcentagem de fêmeas de *Amblyomma parvum* recuperadas após alimentação em coelhos domésticos e que realizaram postura.

Origem	Tratamentos	Fêmeas		
		Infestadas	Recuperadas	Com postura
<b>Pantanal</b>	Controle	20	13 (65%)	13 (100%)
	24 horas	20	08 (40%)	08 (100%)
	48 horas	20	0	0
<b>Chaco</b>	Controle	20	18 (90%)	15 (83,4%)
	24 horas	20	12 (60%)	08 (66,7%)
	48 horas	20	04 (20%)	02 (50%)
<b>Cerrado</b>	Controle	20	14 (70%)	14 (100%)
	24 horas	20	09 (45%)	06 (66,7%)
	48 horas	20	20 (100%)	16 (80%)

Os pesos das fêmeas ingurgitadas e o período médio foram inversamente proporcionais ao tempo em que as ninfas que deram origem ficaram imersas. Exceto para peso na população Cerrado, no grupo 24 horas, cujo grupo de fêmeas foi mais pesado que os demais. (Tabela 3).

Em relação à fase larval pode-se observar que os resultados para período de pré-eclosão e eclosão das três populações foram mais longos quando o tempo de imersão foi mais extenso. O percentual de eclosão diminuiu em forma relação inversa ao tempo de imersão das ninfas (Tabela 4).

Na massa de ovos postos pelas fêmeas de *A. parvum* das populações Chaco e Cerrado do grupo 48 horas houve baixo percentual médio de eclosão e foi possível observar ovos encarquilhados.

**Tabela 3.** Parâmetros biológicos de adultos de três populações de *Amblyomma parvum* provenientes de ninfas imersas em água destilada por diferentes períodos. Dados expressos em média; desvio padrão e amplitude de variação.

	Origem	Controle	24 horas	48 horas
<b>Peso das teleógenas</b>	Pantanal	227,2 <sup>Ba</sup> ±62,71 (135,8-343,8)	190,4 <sup>Aa</sup> ±61,36 (105,1-264,9)	0
	Cerrado	386,8 <sup>Aa</sup> ±63,39 (263,4-480,9)	280,2 <sup>Ab</sup> ±78,66 (213,7-417,6)	229,1 <sup>Ab</sup> ±79,16 (84,0-311,0)
	Chaco	340,0 <sup>Aa</sup> ±68,44 (218,9-444,4)	245,9 <sup>Ab</sup> ±64,31 (118,7-336,6)	129,4 <sup>Bb</sup> ±39,95 (101,2-157,7)
<b>Período pré-Postura</b>	Pantanal	2,9 <sup>Ba</sup> ±1,49 (1-5)	2,7 <sup>Ba</sup> ±1,58 (1-5)	0
	Cerrado	3,2 <sup>Ba</sup> ±1,13 (1-5)	4,1 <sup>Aa</sup> ±1,16 (1-5)	3,2 <sup>Ba</sup> ±1,79 (1-6)
	Chaco	4 <sup>Ab</sup> ±0,92 (3-6)	3,3 <sup>Bb</sup> ±1,31 (1-5)	5,5 <sup>Aa</sup> ±0,70 (5-6)
<b>Período postura</b>	Pantanal	12,1 <sup>Aa</sup> ±3,75 (7-16)	11,8 <sup>Aa</sup> ±3,56 (7-16)	0
	Cerrado	15,2 <sup>Aa</sup> ±2,36 (12-18)	12,0 <sup>Aa</sup> ± 5,0 (16-18)	9,8 <sup>Ab</sup> ±4,74 (3-15)
	Chaco	15,3 <sup>Aa</sup> ±1,87 (12-18)	13,9 <sup>Aa</sup> ±3,86 (3-18)	6,0 <sup>Ab</sup> ±4,24 (3-9)
<b>Postura total</b>	Pantanal	102,1 <sup>Ba</sup> ±51,42 (17,8-172,7)	99,1 <sup>Aa</sup> ±53,28 (29,2-173,0)	0
	Cerrado	215,5 <sup>Aa</sup> ±42,84 (157,2-273,9)	108,1 <sup>Ab</sup> ±78,34 (17,2-216,2)	102,1 <sup>Ab</sup> ±58,15 (37,5-177,5)
	Chaco	198,4 <sup>Aa</sup> ±47,87 (109,6-273,6)	128,9 <sup>Ab</sup> ±48,58 (57,9-210,7)	21,8 <sup>Bc</sup> ±28,14 (1,9-41,7)
<b>Peso Quenógena</b>	Pantanal	89,5 <sup>Aa</sup> ±27,65 (40-130,6)	63,3 <sup>Bb</sup> ±11,8 (48,8-77,6)	0
	Cerrado	118,9 <sup>Aa</sup> ±20,8 (84-171,2)	126,1 <sup>Aa</sup> ±30,09 (84,6-173,8)	104,1 <sup>Aa</sup> ±36,28 (58,3-145,8)
	Chaco	103,7 <sup>Aa</sup> ±27,4 (332,4-140,4)	85,6 <sup>Ba</sup> ±28,06 (20,6-131,9)	85,9 <sup>Aa</sup> ±4,24 (82,9-88,9)
<b>Índice de Eficiência Reprodutiva</b>	Pantanal	42,3 <sup>Ba</sup> ±15,19 (13,10-60,41)	48,3 <sup>Aa</sup> ±14,82 (26,8-65,3)	0
	Cerrado	55,6 <sup>Aa</sup> ±4,74 (46,55-62,51)	36,8 <sup>Ab</sup> ±20,19 (13,4-66,1)	45,3 <sup>Aa</sup> ±21,61 (15,54-78,07)
	Chaco	58,1 <sup>Aa</sup> ±5,09 (50,07-64,65)	51,2 <sup>Aa</sup> ±8,85 (30,7-62,59)	14,1 <sup>Ab</sup> ±17,37 (1,87-26,44)
<b>Índice Eficiência Nutricional</b>	Pantanal	70,9 <sup>Aa</sup> ±16,78 (38,3-87,2)	76,7 <sup>Aa</sup> ±6,86 (3,1-84,7)	0
	Cerrado	80,9 <sup>Aa</sup> ±8,75 (63,22-98,01)	76,3 <sup>Aa</sup> ±25,9 (139,35-115,46)	107,4 <sup>Aa</sup> ±78,68 (20,58-218,78)
	Chaco	83,3 <sup>Aa</sup> ±6,06 (73,02-90,29)	80,1 <sup>Aa</sup> ±10,73 (52,78-96,99)	35,59 <sup>Bb</sup> ±28,49 (15,44-55,75)

A, B,....: Letras maiúsculas diferentes nas colunas indicam diferença estatística pelo teste de Tukey (P<0,05); a, b: Letras minúsculas diferentes nas linhas indicam diferença estatística pelo teste Tukey (P<0,05); Letras iguais não diferem entre si significativamente.

**Tabela 4.** Parâmetros biológicos da ecdise de larvas de três populações de *Amblyomma parvum* após imersão das ninfas em água destilada por diferentes períodos. Dados expressos em média; desvio padrão e amplitude.

<b>Parâmetros</b>	<b>População</b>	<b>Controle</b>	<b>24 horas</b>	<b>48 horas</b>	
<b>Período pré-eclosão</b>	Pantanal	9,4 <sup>Aa</sup> ±1,90 6-12	10,7 <sup>Aa</sup> ±0,95 10-12	0	
	Cerrado	9,3 <sup>Ab</sup> ±3,35 1-13	12,0 <sup>Aa</sup> ±1,67 10-14	14,6 <sup>Aa</sup> ±0,57 14-15	
	Chaco	9,4 <sup>Aa</sup> ±0,89 8-10	10,2 <sup>Aa</sup> ±0,83 9-11	12,8 <sup>Aa</sup> ±1,92 10-15	
	<b>Período eclosão</b>	Pantanal	3 <sup>Aa</sup> ±0,57 2-4	3,5 <sup>Aa</sup> ±1 3-5	0
		Cerrado	2,9 <sup>Aa</sup> ±0,56 2-4	3,5 <sup>Aa</sup> ±1,04 2-5	4,33 <sup>Aa</sup> ±0,57 4-5
		Chaco	2,6 <sup>Aa</sup> ±0,54 2-3	3,8 <sup>Aa</sup> ±0,83 3-5	4,2 <sup>Aa</sup> ±2,38 0-6
<b>Porcentagem eclosão</b>	Pantanal	93,2 <sup>Aa</sup> ±4,30 90-99	67,5 <sup>Ab</sup> ±13,23 50-80	0	
	Cerrado	96,4 <sup>Aa</sup> ±3,74 90-99	70 <sup>Ab</sup> ±10,95 50-80	35 <sup>c</sup> ±13,23 25-50	
	Chaco	93 <sup>Aa</sup> ±2,73 90-95	78 <sup>Aa</sup> ±11,51 60-90	27 <sup>b</sup> ±19,23 0-50	

A, B,...: Letras maiúsculas diferentes nas colunas indicam diferença estatística pelo teste de Tukey (P<0,05); a, b: Letras minúsculas diferentes nas linhas indicam diferença estatística pelo teste Tukey (P<0,05); Letras iguais não diferem entre si significativamente.



## 4 DISCUSSÃO

A capacidade de suportar a imersão fora do hospedeiro é importante para a sobrevivência dos carrapatos após eventos de chuva intensa ou inundação temporária. É preciso considerar que a imersão foi simulada em condições laboratoriais, uma vez que, provavelmente, em condições naturais de alagamento, os carrapatos se comportem de maneira diferente, devido à presença de vegetação na pastagem fornecer substrato adequado para que os mesmos se abriguem, evitando a imersão. Pode se esperar efeito semelhante aos obtidos neste trabalho em caso de chuvas fortes e prolongadas e no período de cheias dos rios.

A relação inversa entre o tempo de imersão das ninfas ingurgitadas e o baixo percentual de ecdise dos adultos de *A. parvum* foi observada nas três populações estudadas. Tal resultado já havia sido observado para *Amblyomma cajennense* (PAULA et al. 2005) e *Amblyomma dubitatum* (CANÇADO et al. 2006). Isto indica um possível efeito deletério gerado pela imersão, visto que ninfas ingurgitadas cujo período de pré-ecdise se torna mais longo, ficam mais tempo expostas a variações do ambiente, principalmente temperatura e umidade relativa e mesmo a inimigos naturais (CANÇADO et al. 2006).

Estudos demonstram que agregação acelera a ecdise de ninfas de *Rhipicephalus sanguineus* (CANÇADO et al. 2007a) e *Haemaphysalis leporispalustris* (CANÇADO et al., 2007b). Como observado no presente estudo quanto maior a porcentagem de ecdise, consequentemente maior agregação, e isso influenciarão no processo de ecdise, entretanto na população Pantanal e Chaco as ninfas ingurgitadas do grupo 48 horas tiveram um menor período de pré-ecdise e as do grupo 48 horas da população Cerrado obtiveram um menor período de ecdise. Essa observação corrobora com Olivieri e Serra-Freire (1984) que consideraram que o período de ecdise é mais influenciado pelo tamanho da amostra do que por outros fatores para *A. cajennense*. Essa agregação poderia contrabalancear os efeitos deletérios pela maior sobrevivência do grupo, através do aumento da capacidade defensiva ou modificações do micro-clima e micro-habitat (ZUBEN, 2000) e que se acredita que esse tipo de agrupamento com os indivíduos tendem a se acumular em locais apropriados para evitar condições ambientais estressantes, e onde eles são mais propensos a encontrar seus hospedeiros (SONENSHINE, 2004).

A morte e eliminação de líquido avermelhado pelas ninfas que permaneceram imersas por tempo indeterminado (grupo constante) não é um fato novo para outras espécies de carrapatos como *Rhipicephalus appendiculatus* Neumann, 1901 e *Amblyomma variegatum* (Fabricius, 1794) (SMITH, 1973; DIPEOLU et al., 1991); *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (PENNA, 1999); *Boophilus decoloratus* (Koch 1844) (DIPEOLU, 1984); *Anocentor nitens* (Neumann, 1897) e *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (PAULA et al., 2000) e *Amblyomma auricularium* (Conil, 1878) (SÁ-HUNGARO et al., 2014). Essa observação permite afirmar que a imersão em água destilada por um período de 48 horas começa a ser prejudicial para *A. parvum*. Entretanto não se pode afirmar se este período de imersão seja deletério para esta espécie, tendo em vista que houve eclosão larval, mesmo que em baixas proporções permitindo a continuação do ciclo.

A interação parasito-hospedeiro-ambiente é controlada por fatores espaciais e temporários: hospedeiros usam recursos ambientais para alimentação e abrigo; os parasitas dependem dos hospedeiros para alimentação e dispersão, e alguns parasitas utilizam a vegetação para a oviposição e como substrato para a ocorrência da muda

(TEEL et al., 1996). Assim, para o caso particular dos carrapatos, os principais fatores que afetam sua distribuição espacial são a presença-ausência, abundância e densidade dos hospedeiros, vegetação e clima. Como os carrapatos não possuem uma capacidade e deslocamento ativo muito grande, mudanças rápidas nas condições do microambiente seja devido a chuvas intensas e/ou inundações são provavelmente perigosas. Por isso os carrapatos precisam se adaptar ao meio e precisam de uma estratégia para manter sua sobrevivência e descendência.

A resposta dos carrapatos a estas adaptações determinam a sua preponderância e abundância no ambiente. Entretanto, de acordo com Sutherst (1971), chuvas causam apenas uma redução temporária no número de carrapatos e os efeitos em longo prazo das chuvas são a criação de condições ambientais que são altamente favoráveis para a reprodução carrapato e que áreas costeiras e inundadas são conhecidas pelos seus altos níveis de prevalência de carrapato (SONENSHINE, 1991). Pode-se observar isso no presente estudo, mesmo mantendo imersos por períodos prolongados, houve ecdise dos adultos.

Segundo Madder et al., (2002) as principais condições que afetam a diapausa, que se caracteriza pela interrupção do desenvolvimento quando as condições ambientais são desfavoráveis, são a temperatura, fotoperíodo, umidade e chuvas. Podemos supor que a população Pantanal tenha usado esse artifício de diapausa, pois seu período de pré-ecdise, fase do ciclo em que está no ambiente, foi mais curto que as demais populações. Esse resultado vai de contra ao encontrado por Nava et al. (2008) em que observaram que o ciclo biológico na natureza não é aparentemente regulado por nenhum tipo de diapausa. Vale destacar que os espécimes de *A. parvum* utilizado no trabalho de Nava et al. (2008) tinham origem no Chaco argentino, localidade com clima mais seco que a região pantaneira, onde durante alguns meses fica alagada devido as cheias favorecendo a inundações de extensas áreas (GALDINO; RESENDE, 2000) onde os animais (hospedeiros) precisam encontrar refúgio. Outro fator que devemos considerar é o comportamento de indivíduos no meio natural e condições de laboratório. Enquanto que Nava et al., (2008) não observaram diapausa no ambiente, Guglielmone et al. (1991) observaram que *A. parvum* ingurgitados apresentaram diapausa morfogénica em condições de laboratório.

Não é totalmente compreendido como artrópodes terrestres sobrevivem às inundações temporárias que seguem fortes chuvas. Fielden et al., (2011) desenvolveram um estudo com *Dermacentor variabilis* (Say, 1821) e observaram que esse ixodídeo foi capaz de utilizar o oxigênio dissolvido na água através de um plástron formado por um complexo de placas espiraculares e confirmaram pela primeira vez a respiração via plástron em ixodídeos. Os autores também sugeriram que depressão metabólica ou algumas vias anaeróbias poderiam estar envolvidas nesse processo. Hinton (1967) descreveu o tamanho e forma dos espiráculos. Este autor afirma que sua principal função é bloquear a entrada de água. Uma vez que a duração da ação destes espiráculos difere de uma espécie de carrapato para outra. Assim, a estrutura dos espiráculos pode ser uma adaptação que lhes permite sobreviver às inundações temporárias durante a estação chuvosa. Ainda não se sabe como cada espécie de carrapato utiliza essa habilidade para esse tipo de condição.

Não foram observadas diferenças entre as populações de *A. parvum* na capacidade das ninfas suportarem inundações que justificasse a suspeita de taxa distintos. Estudos com abordagens biológicas e moleculares realizados com diferentes populações de *A. parvum* do Brasil e da Argentina indicaram que divergências existentes e que ambas as populações tinham fortes indicativos de serem espécies distintas (NAVA et al., 2008). Já a visão de Gerardi et al. (2013) ao comparar a biologia de duas

populações do Brasil e da Argentina em diferentes hospedeiros observaram que são semelhantes e portanto pertencentes a mesma espécie.



## 5 CONCLUSÃO

Pôde-se observar que a população Pantanal demonstrou ser mais sensível em relação à imersão. Apesar disso no grupo 48 horas não houve continuação do ciclo, pois os adultos emergentes não tiveram a capacidade de se fixar ao hospedeiro ou morreram antes da alimentação, enquanto que a população Chaco e Cerrado continuaram seu ciclo mesmo depois que as ninfas permanecerem 48 horas submersas. Pode-se observar que a partir de 72 horas a imersão causa um efeito deletério para essa espécie.

Populações geograficamente distintas respondem de formas diferentes frente ao estresse de imersão podendo realizar o que podemos explicar como diapausa como foi o observado na população Pantanal, mas estudos sobre esse fenômeno precisam ser mais bem elucidados com novos bioensaios.

Os resultados aqui relatados sugerem que a partir de 72 horas de imersão pode se tornar deletério para *A. parvum* e que a capacidade de sobreviver submersos por um período é um aspecto adicional da biologia de *A. parvum*. A atuação dos impactos de inundações de água na capacidade dos carrapatos transmitirem patógenos em áreas endêmicas merece uma investigação mais aprofundada.



## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARCELLOS, C.; MONTEIRO, A.M.V.; CORVALÁN, C.; GURGEL, H.C.; CARVALHO, M.S.; ARTAXO, P.; HACON, S.; RAGONI, V. Mudanças climáticas e ambientais e as doenças infecciosas: cenários e incertezas para o Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v.18, n.3, p. 285-304, 2009.

BENETT, G. H. Oviposition of *Boophilus microplus* (Casterini) (Acarina: Ixodidae). II Influence of temperature, humidity and light. **Acarologia**, v.16, n.2, p. 250-257, 1974.

BELOZEROV, V.N. Diapause and quiescence as two main kinds of dormancy and their significance in life cycles of mites and ticks (Chelicerata: Arachnida: Acari). Part 2. Parasitiformes. **Acarina**, v.17, n.1, p.3-32, 2009.

CAMPBELL, A.; GLINES, M.V. Development, survival and ovoposition of the rabbit tick. *Haemaphysalis leporispalustris* (Packard) (Acari: Ixodidae) at constant temperatures. **Journal of Parasitology**, v.65, n.5, p.777-782, 1979.

CANÇADO, P.H.D.; CHACÓN, S.C.; PIRANDA, E.M.; PAULA, A.R.; FACCINI, J.L.H. Efeito da imersão de larvas e ninfas ingurgitadas de *Amblyomma dubitatum* Neumann, 1899 (Acari: Ixodidae) em água destilada. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.15, n.1, p.17-22, 2006.

CANÇADO, P.H.D.; PIRANDA, E.M.; FACCINI, J.L.H. Influência do comportamento gregário nos processos de muda de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae), em condições laboratoriais. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 16, n. 4, p. 205-210, 2007a.

CANÇADO, P.H.D.; PIRANDA, E.M.; FACCINI, J.L.H.; DAEMON, E. Influência do comportamento gregário nos processos de muda de *Haemaphysalis leporispalustris* (Acari: Ixodidae), em condições laboratoriais. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.16, n.1, p.47-53, 2007b.

CANÇADO, P.H.D.; FACCINI, J.L.H.; HERRERA, H.M.; TAVARES, L.E.R.; MOURÃO, G.M.; PIRANDA, E.M.; PAES, R.C.S.; RIBEIRO, C.C.D.U.; BORGHEAN, T.C.; PIACENTI, A.K.; KINAS, M.A.; SANTOS, C.C.; ONO, T.M.; PAIVA, F. Host-Parasite Relationship of Ticks (Acari: Ixodidae and Argasidae) and Feral Pigs (*Sus scrofa*) in the Nhecolândia Region of the Pantanal Wetlands in Mato Grosso do Sul. **ISRN Parasitology**, v.2013. Article ID 610262, 6 pages <http://dx.doi.org/10.5402/2013/610262>. 2013.

DIPEOLU, O.O. Studies on ticks of veterinary importance in Nigeria. XVI. The oviposition pattern of engorged *Boophilus* and *Hyalomma* species when subjected in the laboratory to artificially created factors. **Acarologia**, v.25, n.3, p.231-240, 1984.

DIPEOLU, O.O.; AMOO, A.O.; AKINBOADE, O.A. Studies on ticks of veterinary importance in Nigeria: intrinsic factors influencing oviposition and egg-hatch of *Amblyomma variegatum* under natural conditions. **Folia Parasitologica**, v.38, n.1, p.63-74, 1991.

FIELDEN, L.J.; KNOLHOFF, L.M.; VILLARREAL, S.M.; RYAN, P. Underwater survival in the dog tick *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae). **Journal of Insect Physiology**, v.57, p.21-26, 2011.

GALDINO, S.; RESENDE, E.K. **Previsão de cheias e secas da Embrapa auxilia pantaneiros**. Corumbá: EMBRAPA – CPAP, 5p. Artigo de Divulgação na Mídia, 2000.

GAZETA, G.S.; ROCHA, G.C.; CAVALCANTI, P.L.; CAIAFFA, R.T.M.; SERRA-FREIRE, N. M. Comportamento de teleóginas e ovos de *Amblyomma cajennense*, *Anocentor nitens* e *Boophilus microplus* em imersão. **Entomologia y Vectores**, v.2, n.6, p.145-150, 1995.

GIANNELLI, A.; DANTAS-TORRES, F.; OTRANTO, D. Underwater survival of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). **Experimental and Applied Acarology**, v.57, p.171–178, 2012.

GUGLIELMONE, A.A.; MANGOLD, A.J.; GARCIA, M.D. The life cycle of *Amblyomma parvum* Aragão. 1908 (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions. **Experimental and Applied Acarology**, v. 13, p.129–136, 1991.

GUGLIELMONE, A.A.; ESTRADA-PEÑA, A.; KEIRANS, J.E.; ROBBINS, R.G. **Ticks (Acari: Ixodidae) of the Neotropical Zoogeographic Region**. Editora Atalanta Houten - ICTTD. The Netherlands, p.173, 2003.

GUGLIELMONE, A.A.; NAVA, S. Rodents of the subfamily Caviinae (Hystricognathi. Caviidae) as hosts for hard ticks (Acari: Ixodidae). **Mastozoología Neotropical**, v.17, n.2, p.279-286, 2010.

HINTON, H.E. The structure of the spiracles of the cattle ticks: *Boophilus microplus*. **Australia Journal Zoology**, vol.15, p. 941–945, 1967.

KNULLE, W.; RUDOLPH, D. Humidity Relationship and water balance of ticks. In. OBENCHAIN, F.D.; GALUN, R. **Physiology of ticks**, 1ed. Pergamon Press, p.43-67, 1982.

KOCH, H.G. Survival of the Lone Star Tick (Acari: Ixodidae) Under Flooding Conditions: A Laboratory Evaluation. **Journal of Economic Entomology**, v.79, p.1555-1557, 1986.

LEGG, J. Some observations on the life history of the cattle tick *Boophilus microplus*. **Proceedings of the Royal Society of Queensland**, v.41, n.8, p.121-123, 1930.

LOUZADA, G.L.; DAEMON, E. Efeito da imersão de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* (Canestrini. 1887) (Acari: Ixodidae) em água destilada sobre os parâmetros ligados a ovoposição. **Revista Brasileira de Parasitologia**, v.12, n.3, p.115-120, 2003.

MADDER, M.; SPEYBROECK, N.; BRANDT, J.; TIRRY, L.; HODEK, I.; BERKVENS, D. Geographic variation in diapause response of adult *Rhipicephalus appendiculatus* ticks. *Experimental Applied Acarology*, v.27, n.3, p.209-221, 2002.

MARTINS, T.F.; FURTADO, M.M.; JÁCOMO, A.T.A.; SILVEIRA, L.; SOLLMANN, R.; TÔRRES, N.M.; LABRUNA, M.B. Ticks on free-living wild mammals in Emas National Park. Goiás State, central Brazil. **Systematic & Applied Acarology**, v.16, p.201-206, 2011.

MEDRI, I.M.; MARTINS, J.R.; DOYLE, R.L.; MOURÃO, G.; MARINHO-FILHO, J. Ticks (Acari: Ixodidae) from Yellow Armadillo. *Euphractus sexcinctus* (Cingulata: Dasypodidae), in Brazil's Pantanal Wetlands. **Neotropical Entomology**, v.39, n.5, p.823-825, 2010.

MULLINS, M.C.; LAZZARINI, S.M.; PIKANÇO, M.C.L.; SERRA-FREIRE, N.M. *Amblyomma parvum* a parasite of *Dasypus kappleri* in the state of Amazonas. Brazil. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 42, n.1, p. 287-291, 2004.

NAVA, S.; MANGOLD, A.J.; GUGLIELMONE, A.A. The natural hosts for larvae and nymphs of *Amblyomma neumanni* and *Amblyomma parvum* (Acari: Ixodidae). **Experimental and Applied Acarology**, v.40, n.2, p.123-131, 2006.

NAVA, S.; SZABÓ, M.P.J.; MANGOLD, A.J.; GUGLIELMONE, A.A. Distribution. hosts. 16s rDNA sequences and phylogenetic position of the Neotropical tick *Amblyomma parvum* (Acari: Ixodidae). **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v.102, n.5, p.409-425, 2008.

NEEDHAM, G.R.; TEEL, P.D. Off-host physiological ecology of ixodid ticks. **Annals of Review of Entomology**, v.36, p.659-681, 1991.

NEITZ, W.O.; BOUGHTON, F.; WALTERS, H.S. Laboratory investigations on the karoo paralysis tick (*Ixodes rubicundus* Neumann, 1904). **Onderstepoort Journal Veterinary Research**, v.38, n.3, p.215-224, 1971.

OLIVIERI, J.A.; SERRA-FREIRE, N.M. Estádio larval do ciclo biológico de *Amblyomma cajennense*. **Arquivos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, v.7, n.2, p. 39-147, 1984.

PAULA, A.R.; DAEMON, E.; CUNHA, D.W.; FACCINI, J.L.H. Efeito da imersão de fêmeas ingurgitadas e ovos de *Anocentor nitens* (Neumann, 1897) e de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) em água destilada. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 22, n. 1, p. 30-36, 2000.

PAULA, A.R.; PIRANDA, E.M.; FACCINI, J.L.H.; DAEMON, E. Efeito da imersão de larvas não alimentadas de *Anocentor nitens* (Neumann, 1897) e de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) em água destilada. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, n.1, p. 13-17, 2004.

PAULA, A.R.; PIRANDA, E.M.; FACCINI, J.L.H.; DAEMON, E. Efeito da imersão de larvas e ninfas ingurgitadas de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari:

Ixodidae) em água destilada. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 14, n. 2, p. 65-69, 2005.

PENNA, A.P. Efeito da imersão em água destilada sobre as fases de vida livre do ciclo evolutivo de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). 1999. 38 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica. 1999.

RAMOS, V.N.; PIOVEZAN, U.; FRANCO, A.H.A.; OSAVA, C.F.; HERRERA, H.M.; SZABÓ, M.P.J. Feral pigs as hosts for *Amblyomma sculptum* (Acari: Ixodidae) populations in the Pantanal. Mato Grosso do Sul. Brazil. **Experimental Applied Acarology**, v.64, p.393-406, 2014.

RANDOLPH, S.E. Tick ecology: processes and patterns behind the epidemiological risk posed by ixodid ticks as vectors. **Parasitology**, v.129, p.37-65, 2004.

PEREIRA, M.C.; SZABÓ, M.P.J.; BECHARA, G.H.; MATUSHIMA, E.R.; DUARTE, J.M.B.; RECHAV, Y.; FIELDEN, L.; KEIRANS, J.E. Ticks (Acari: Ixodidae) associated with wild animals in the Pantanal region of Brazil. **Journal Medical Entomology**, v.37, p. 979-983, 2000.

PINHEIRO, M.C.; LOURENÇO, E.C.; PATRÍCIO, P.M.P.; SÁ-HUNGARO, I.J.B.; FAMADAS, K.M. Free-living ixodid ticks in an urban Atlantic Forest fragment, state of Rio de Janeiro. Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.23, n.2, p.264-268, 2014.

SÁ-HUNGARO, I.J.B.; RAIÁ, V.A.; PINHEIRO, M.C.; Ribeiro, C.C.D.U.; FAMADAS, K.M. *Amblyomma auricularium* (Acari: Ixodidae): underwater survival of the non-parasitic phase of feeding females. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, n. 2, p. 387-392, 2014.

SANDERSON, M.G.; HEMMING, D.L.; BETTS, R.A. Regional temperature and precipitation changes under highend (<4°C) global warming. **Philosophical Transaction of Royal Society A**, v.369, p.85-98, 2011.

SCHIERMEIER, Q. Increased flood risk linked to global warming. **Nature**, v.470, p.316, 2011.

SMITH, M. W. The effect of immersion in water on the stages of the Ixodid ticks *Rhipicephalus appendiculatus* Neumann, 1901 and *Amblyomma variegatum* Fabricius, 1794. **Annals of the Tropical Medical Parasitology**, v.67, n.4, p.483-492, 1973.

SUTHERST, R.W. An experimental investigation into the effects of flooding on the ixodid tick *Boophilus microplus* (Canestrini). **Oecologia**, v.6, n.3, p. 208–222, 1971.

SONENSHINE, DE. **Biology of ticks**. New York (NY): Oxford University Press. 447pp., 1991.

SONENSHINE, D.E. Pheromones and other semiochemicals of tick and their use in tick control. **Parasitology**, v.129, p.405-425, 2004.

TEEL, D.; MARIN, S.L.; GRANT, W.E. Simulation of host-parasite-landscape interactions: influence of season and habitat on cattle fever tick (*Boophilus* sp.) population dynamics. **Ecological Modelling**, v.84, p.19-30, 1996.

ZUBEN, C.J.V. Implicações do fenômeno de agregação espacial para a dinâmica de populações de insetos. I-Competição por recursos alimentares e espaço. **Revista Brasileira de Zootecias**, v.2, n.1, p.117-133, 2000.



### **CAPÍTULO III**

#### **CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Amblyomma parvum* ARAGÃO, 1908 (ACARI: IXODIDAE) DA ARGENTINA E BRASIL USANDO MARCADORES NUCLEARES E MITOCONDRIAIS**



## RESUMO

PINHEIRO, Michele da Costa. **Capítulo III: Caracterização molecular de *Amblyomma parvum* Aragão, 1908 (Acari: Ixodidae) da Argentina e Brasil usando marcadores nucleares e mitocondriais.** 2015. 20p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2015.

*Amblyomma parvum* é uma espécie de carrapato amplamente distribuída, tendo sido sinalizado desde o sul do México até a Argentina. A lista de hospedeiros conhecidos na região Neotropical é extensa, com carrapatos coletados de membros de pelo menos, nove ordens de mamíferos de médio porte grande. Em função de algumas hipóteses anteriormente questionadas sobre *Amblyomma parvum* na América do Sul, como ocorrência de diversidade de populações e possível presença de outra espécie no continente, o objetivo deste trabalho foi comparar populações de diferentes localidades geográficas através de padrões moleculares semelhantes. Para ajudar a preencher esse lacuna realizou-se o estudo de caracterização molecular de carrapatos provenientes da Argentina e Brasil e de colônias mantidas em condições laboratoriais, através da comparação de fragmentos dos genes 12S rDNA, COI, ITS2. Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular pertencente ao Departamento de Parasitologia Animal da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Após extração, purificação, amplificação e sequenciamento das amostras foram observados que para o gene 12S e COI houve uma diferença significativa a ponto de considerá-las como espécies distintas na América do Sul, 3,8% e 7,1% respectivamente. Mas ao observarmos os resultados para o gene ITS2 não houve diferença suficiente para caracterizar espécies diferentes. São recomendáveis então novas análises com novas amostras de novas localidades, a fim de elucidar essa dúvida sobre a possibilidade de essas amostras da América do Sul ser espécies diferentes.

**Palavras-chave:** carrapatos, marcadores moleculares, variabilidade genotípica.



## ABSTRACT

PINHEIRO, Michele da Costa. **Chapter III: Molecular characterization of *Amblyomma parvum* Aragão, 1908 (Acari: Ixodidae) from Argentina and Brazil using nuclear and mitochondrial markers.** 2015. 20p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2015.

*Amblyomma parvum* is a tick species widely distributed having been signaled from southern Mexico to Argentina. The list of known hosts in the Neotropics is extensive, with adult ticks collected from members of at least nine orders of mammals majority large and medium-sized. According to some hypotheses previously questioned about *A. parvum* in South America, as occurrence of diversity of populations and possible presence of other species on the continent, it is interesting to compare populations of different geographic locations. This study may determine if these populations have similar molecular patterns. To help fill this gap was held the study of molecular characterization of ticks from Argentina and Brazil and colonies maintained in laboratory conditions, through comparison gene fragments of 12S rDNA, COI and ITS2. This work was conducted at the Molecular Biology Laboratory of the Department of Parasitology Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. After extraction, purification, amplification and sequencing of the samples were observed that for the 12S and COI gene was significant difference to the point that consider them as distinct species in South America, 3.8% and 7.1% respectively. But when we observe the results for the ITS2 gene there was not enough difference to characterize different species. It is recommended then further analysis with new samples of new locations in order to elucidate this question about the possibility of these samples in South America is different species.

**Key words:** ticks, molecular markers, genotypic variability.



## 1 INTRODUÇÃO

O entendimento da atual distribuição dos organismos na biosfera exige conhecimento e avaliação dos fatos ocorridos há milhares de anos no Planeta. A biodiversidade, principalmente nos trópicos, é o resultado de processos evolutivos e sucessivos que vêm ocorrendo, em parte, em resposta a inúmeras alterações sofridas pelos diferentes ambientes. Os efeitos das mudanças climáticas em grande escala que ocorreram no passado podem ser inferidos a partir da diversidade genética contemporânea dentro de uma espécie (AVISE, 2000; HEWITT, 2004). Eventos glaciais são conhecidos por terem influenciado tanto a distribuição e diversidade de muitas espécies contemporâneas (BENNETT, 1997).

O termo filogeografia entrou em uso após revisão de Avise et al. (1987) que a denominaram como análise filogenética de dados dos organismos no contexto da distribuição geográfica. É um vínculo entre os processos macro e microevolutivos, baseando em análises moleculares e permite traçar genealogia ao longo dos limites genéticos entre populações, espécies e níveis taxonômicos superiores. A análise de dados filogeográficos permite obter informação sobre os processos de diferenciação das populações e sobre a história evolutiva e demográfica das mesmas. As suas aplicações vão hoje desde a genética de conservação até ao estudo da evolução das espécies e populações animais.

Embora relativamente, filogeografia, tem feito contribuições significativas para a teoria da evolução fornecendo quadros históricos para a compreensão da seleção natural e deriva gênica na especiação ou na força das associações co-evolutivas entre as espécies em relação a interação ecológica (DECHAINED; MARTIN, 2006). Embora a grande maioria dos estudos filogeográficos ainda explorem padrões dentro de uma única espécie, um maior acesso a grande quantidade de dados moleculares está fazendo da filogeografia comparativa, que compara as genealogias de duas ou mais espécies com sobreposição de áreas geográficas, cada vez mais popular e importante (AVISE, 1994; RIDDLE et al., 2000).

Um dos padrões empíricos mais comuns e marcantes em filogeografia é a ocorrência de quebras acentuadas na genealogia do DNA mitocondrial (mtDNA) que muitas vezes distingue conjuntos regionais das populações através de uma série de espécies (AVISE, 2000). DNA mitocondrial é particularmente usado como um marcador genético para este tipo de estudo porque os genes mitocondriais evoluem mais rapidamente do que os genes nucleares, em virtude do padrão de herança uniparental, ausência de recombinação, alta taxa de substituição e considerável poliformismo (AVISE et al., 1987; IRWIN, 2002).

As propriedades do mtDNA em animais produz observações ao redor da estruturação geográfica de linhagens genéticas. Esta correspondência entre genealogia e origem geográfica, por sua vez, permite inferências relacionadas com a história da população e demografia (GARRICK et al., 2010).

Nas últimas décadas as avaliações filogeográficas vêm sendo realizado em diversas espécies de animais como répteis, mamíferos, anfíbios e até em invertebrados (AVISE, 2009). Alguns estudos sobre a distribuição de carrapatos em diferentes regiões biogeográficas têm sido publicados na última década, mas ainda há a necessidade de informações mais detalhadas para algumas espécies principalmente as de importância médico veterinária.

A capacidade de deixar grande número de descendentes faz com que os carrapatos tenham grandes chances de existir por muito mais tempo e de se distribuírem por amplas áreas. Determinadas espécies completam seu ciclo na natureza em até um

período menor que um ano, com grande número de descendentes por geração (PEREIRA; LABRUNA, 1998). Estas características reprodutivas favorecem para que tais grupos de organismos tornem-se cosmopolitas, ou seja, com ampla distribuição ao longo do Planeta.

São escassas informações sobre algumas espécies de carrapatos, no que diz respeito à ecologia, biologia, taxonomia e distribuição geográfica. Aspecto relacionado a esses artrópodes que também tem merecido estudos e que nas últimas décadas sofreu evoluções é a sistemática.

Em algumas espécies de carrapatos amplamente distribuídos tem apresentado diferenças genéticas e/ou biológicas ao longo de sua linha de distribuição (NORRIS et al., 1996; SZABÓ et al., 2005; MIXSON et al., 2006;. LABRUNA et al., 2009; 2011; BURLINI et al., 2010; MORAES-FILHO et al., 2011; MASTROPAOLO et al., 2011; NOUREDDINE et al., 2011; BEATI et al., 2012; 2013).

No caso particular de *Amblyomma parvum*, análises de sequências de 16S rDNA das populações da Argentina e do Brasil evidenciam divergência genética (3,0 a 3,7%) Dois grupos genéticos foram caracterizados, um associado ao sul da sub-região amazônica, representados pelas coleções nas províncias biogeográficas de Caatinga, Cerrado, Chaco, Monte e Floresta do Paraná e outro para o norte desta sub-região representada pelas coleções da Costa e Llanos da Venezuela, Chiapas (México), leste da América Central e do Istmo Ocidental do Panamá (NAVA et al., 2008).

No entanto, a análise de apenas um gene não é suficiente para fazer inferências robustas sobre a significância das diferenças genéticas entre diferentes populações. Além de sequências 16S rDNA, sequências 12S rDNA e ITS2 já foram utilizadas em análises genéticas para o gênero *Amblyomma* (BEATI et al. 2012; 2013). Portanto, novas sequências de marcadores moleculares obtidos a partir de *A. parvum* pertencentes a diferentes localidades da Argentina e Brasil, foram analisadas a fim de testar a hipótese de Nava et al. (2008) sobre o fluxo gênico limitado entre as populações argentinas e brasileiras desta espécie de carrapato.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Amostragem

As amostras incluem carrapatos coletados a partir de coletas de campo e de diferentes hospedeiros em várias regiões da Argentina cedidas pelo Dr. Santiago Nava do Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuária (INTA), Rafaela, Argentina e carrapatos oriundos de colônias mantidas em laboratório. As duas colônias brasileiras são originadas do Mato Grosso do Sul (Fazenda Nhecolândia, Município de Nhumirim, (18° 59'S; 56° 39'W)) e Goiás (Município de Araguapaz, (15°04'18''S; 50°25'03''W)); e a colônia argentina é oriunda da Província de Salta (25° 09'S; 64° 17'W) (Tabela 1). As colônias são mantidas em condições controladas de laboratório no Laboratório de Ixodologia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ).

### 2.2. Extração de DNA e PCR

Foram utilizadas larvas de cada colônia provenientes do Laboratório de Ixodologia da UFRRJ e adultos das amostras cedidas pelo INTA.

Os carrapatos foram processados no Laboratório de Biologia Molecular da UFRRJ. Para a extração de DNA os carrapatos foram submetidos à lavagem em Solução tamponada de Fosfato (PBS), pH 7,2, seguindo-se o seguinte protocolo descrito por Costa-Santolin (2014).

Acrescentou-se 1000µL de PBS estéril nos tubos de tampa com rosca contendo um carrapato cada, submetendo-os em seguida, a uma centrifugação por cinco minutos com rotação de 16000 x g. Este procedimento foi repetido três vezes em cada tubo de amostra.

Após a lavagem dos carrapatos, foram acrescentados 200 µL de PBS (pH 7,2) estéril, 21 µL de cloreto de cálcio (50 mM) e aproximadamente 50mg de pérolas de vidro - “glass beads” (425-600 µm; Sigma-Aldrich; product # G8772) em tubos com tampa de rosca de 0,5mL. As amostras foram agitadas por 60 segundos no minibeadbeater- 16 (Biospec; Bartlesville, OK, USA), foram acrescentados 200µL do tampão de lise (20mM Tris-HCl pH 8.0, 20mM EDTA pH 8.0, 400mM NaCl, 1% Dodecil Sulfato de Sódio) e 20µL proteinase K (20µg mL<sup>-1</sup>; Sigma-Aldrich). Em seguida, as amostras foram incubadas por três horas a 56°C. Passado o tempo de incubação, as amostras foram centrifugadas durante 1 minuto (16000 x g) e depois foram retirados 350 µL de cada lisado e colocados em novos tubos com tampa de rosca de 1,5mL, contendo 250 µL de PBS (pH 7,2).

Foram colocados 600 µL de fenol tamponado (pH 7.4-7.8 BioAgency produto # 11593) e depois misturadas manualmente (invertidos três vezes) para formar uma emulsão. As amostras foram centrifugadas por dez minutos em 16000 x g. Após esse período, foram retirados 550 µL do sobrenadante (fase superior aquosa) sendo o mesmo transferido para um novo tubo com tampa de rosca de 1,5mL. Foram acrescentados 550 µL de Fenol-Clorofórmio (Bioagency product #3879) misturados manualmente (invertidos três vezes) até que a solução formasse uma emulsão e centrifugados por dez minutos em 16000 x g. Após este tempo, foram retirados 500 µL do sobrenadante (fase superior aquosa) e transferidos para novo tubo com tampa de rosca de 1,5 mL. Foram adicionados 500 µL de isopropanol (MERCK<sup>®</sup>) e os tubos foram incubados durante 30 minutos em temperatura ambiente (aproximadamente 24°C).

Passado esse período, as amostras foram centrifugadas por dez minutos em 16000 x g e depois os tubos foram invertidos para descartar o líquido deixando o “pellet” no fundo do tubo. As amostras foram então lavadas com 1000 µL de etanol 70%, (para remoção do sal), e centrifugadas por 1 minuto a 16000 x g. O sobrenadante

foi removido invertendo o tubo. O passo da lavagem foi repetido por mais uma vez. Para remover o restante do álcool, os tubos foram colocados abertos e invertidos em cima de papel absorvente durante 1 minuto e em seguida incubados sem tampa a 56°C durante cinco minutos para evaporar a pequena quantidade de etanol que restava. Após seco, o DNA foi ressuspensionado em 200 µL de “buffer” AE (kit Qiagen®), através de incubação a 4°C durante a noite e no dia seguinte aquecido à 56°C por dez minutos. Aliquotas de 10µL foram separadas para análise molecular e armazenadas à - 20°C.

Os fragmentos dos genes 12S rDNA, Cytochrome C oxidase subunidade I (COI) e nuclear ribosomal internal transcribed spacer 2 (ITS2) foram amplificados pela técnica PCR usando os primers e as condições de ciclagem fornecidas nas tabelas 2, 3 e 4 respectivamente.

### **2.3. Sequenciamento**

Os produtos das PCR foram purificados com Exo-SAP-IT (GE Healthcare Life Sciences) e submetidos ao sequenciamento através do “BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit” Applied Biosystems. Os “amplicons” foram sequenciados em ambas as direções utilizando os mesmos iniciadores utilizados na PCR, e a reação de “cycle sequencing” foi realizada no termociclador modelo 9700 (Applied Biosystems), utilizando as seguintes condições: desnaturação inicial a 96°C durante 60 segundos, seguidos de 30 ciclos de 10 segundos a 96°C, cinco segundos à 50°C para o anelamento e quatro minutos à 60°C para a extensão. Após a reação, a remoção dos nucleotídeos não incorporados foi feita através de precipitação com EDTA/etanol seguido por ressuspensão em 10 µL de formamida (Applied Biosystems). Todo o sequenciamento foi realizado utilizando o sequenciador de DNA automático (modelo 3500 Applied Biosystems). Alinhamento das sequências foi realizado utilizando o programa Sequencher® (Versão 5.2.2; Genecodes Corporation), e a identidade das sequências obtidas foram verificadas utilizando o programa BlastN, junto ao banco de dados GenBank.

**Tabela 1.** Dados da origem e hospedeiro dos espécimes de *Amblyomma parvum* utilizados no presente estudo.

País	Código	Província/Estado	Localidade	Região Fitogeográfica	Coordenadas	Hospedeiro
Argentina	ap021	Catamarca	Est. “El Simão”, 11 km ao norte de San Antonio	Monte	28°50’ S 65°05’ W	<i>Capra hircus</i>
Argentina	ap022 ap023	Santiago del Estero	Est. “El divisadero” 10 km a leste de Choya, rota 89	Chaco	28°41’S 64°47’W	<i>Capra hircus</i>
Argentina	ap026	La Rioja	INTA Chamental, 15 km a leste Chamental	Chaco	30°26’ S 66°12’ W	<i>Capra hircus</i>
Argentina	ap027	Córdoba	Passaje “El Mojon”, 20km nordeste de Sebastián Elcano	Espinal	30° 09’S 63°35’W	<i>Capra hircus</i>
Argentina	ap031	Salta	7 km a leste of Joaquin Victor Gonzales	Chaco	25° 09’S 64° 17’W	<i>Bos taurus</i>
Argentina	ap034	San Luis	18 km a nordeste de El Cadillo	Pampa	31°55’S 65° 48’W	<i>Capra hircus</i>
Argentina	Q166 Q296	Córdoba	Quilino	Espinal	30°13’S 64° 31’W	Vegetação
Argentina	Chaco1 Chaco2 Chaco3	Salta	El Tunal	Chaco	25°14’S 64°25’W	Colônia
Brasil	Cerrado1 Cerrado2 Cerrado3 ap033	Goiás	Araguapaz	Cerrado	15°04’S 50°25’W	Colônia
Brasil	Pantanal1 Pantanal2 Pantanal3	Mato Grosso do Sul	Fazenda Nhumirim, Nhecolândia	Pantanal	18° 59’S 56° 39’W	Colônia

**Tabela 2.** Iniciadores, mistura para PCR e condições do ciclo da PCR utilizado para amplificação do 12S DNAr mitocondrial.

Alvo	Iniciadores	Mistura para PCR para volume final de 12,5µL	Tamanho do produto	Condições da PCR	Referências
<b>12S rDNA mitocondrial</b>	T1B (5' AAA CTA GGA TTA GAT ACC CT-3')	1x tampão Platinum Taq DNA polymerase  1,6mM MgCl <sub>2</sub>	350bp	Ativação da <i>Taq</i> Polimerase durante 5 minutos a 95°C. Quarenta ciclos de 15 segundos a 95°C, 20 segundos para o anelamento e 20 segundos para a extensão a 72°C. A extensão final ocorre em 5 minutos a 72°C.	Beati et al. (2012)
	T2A (5'-AAT GAG AGC GAC GGG CGA TGT-3')	0,2mM dNTPs  10pmoles de cada iniciador  0,5 unidades de Platinum Taq DNA polymerase (Life Technologies, Brasil)  1µL do DNA			

**Tabela 3.** Iniciadores, mistura para PCR e condições do ciclo da PCR utilizado para amplificação do Cytochrome oxidase I mitocondrial (COI).

Alvo	Iniciadores	Mistura para PCR para volume final de 12,5µL	Tamanho do produto	Condições da PCR	Referências
<b>COI mitocondrial</b>	Lep F1 (5'ATT CAA CCA ATC ATA AAG ATA TTG G3')	1x tampão Platinum Taq DNA polymerase 2,5mM MgCl <sub>2</sub> 0,2mM dNTPs	658bp	Ativação da <i>Taq</i> Polimerase durante 5 minutos a 94°C. Cinco ciclos de 20 segundos a 94°C, 20 segundos para o anelamento e 30 segundos para a extensão a 72°C. A temperatura de anelamento nos primeiros sete ciclos é aumentada 0,3°C a cada segundo, começando em 47°C indo até 48,8°C. 35 ciclos de 20 segundos a 94°C, 20 segundos a 51°C, 30 segundos para a extensão a 72°C. A extensão final ocorre em 5 minutos a 72°C.	Hebert et al. (2004)
	Lep R1 (5'TAA ACT TCT GGA TGT CCA AAA AAT CA-3')	7,5 pmoles de cada iniciador 0,5 unidades de Platinum Taq DNA polymerase (Life Technologies, Brasil)			
		1µL do DNA			

**Tabela 4.** Iniciadores, mistura para PCR e condições do ciclo da PCR utilizado para amplificação do nuclear ribosomal internal transcribed spacer 2 (ITS2)

Alvo	Iniciadores	Mistura para PCR para volume final de 12,5µL	Tamanho do produto	Condições da PCR	Referências
ITS2 nuclear	ITS2-F (5'ACA TTG CGG CCT TGG GTC TT3')	1x tampão Platinum Taq DNA polymerase 1,76mM MgCl <sub>2</sub> 0,2mM dNTPs 10pmoles de cada iniciador 0,5 unidades de Platinum Taq DNA polymerase (Life Technologies, Brasil) 1µL do DNA	~1200bp	Ativação da <i>Taq</i> Polimerase durante 5 minutos a 94°C. Trinta e três ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos para o anelamento e 95 segundos para a extensão a 72°C. A extensão final ocorre em 5 minutos a 72°C.	Lv et al. (2014)

### 3 RESULTADOS

Todas as amostras de *A. parvum* da Argentina e Brasil amplificaram adequadamente e foi possível a obtenção das sequências para o sequenciamento. Após o sequenciamento dos fragmentos dos genes 12S, ITS2 e COI, foram obtidas sequências “forward” e “reverse” para cada um dos genes, que deram origem a uma sequência consenso. Vale salientar que também foi testado o marcador 16S, mas não houve amplificação considerada satisfatória. Novos primers serão testados e até o presente momento não se obteve resultados satisfatórios.

O comprimento do sequenciamento de 12S rDNA foi aproximadamente 350pb nos espécimes examinados. As amostras das localidades brasileiras Cerrado (colônia) e AP033 e Pantanal (colônia) apresentaram apenas duas diferenças entre si, mas podendo serem consideradas mesma espécie. Essas mesmas diferenças foram encontradas quando comparadas essas localidades com a amostra referência do GenBank (AY 342293.1, 317bp).

Quando comparado as amostras da localidade argentina Chaco (colônia) com a amostra referência foram encontradas 12 diferenças (3,8%) sendo 11 trocas e 1 deleção.

Nas amostras argentinas foi observada a formação de dois grupos. Grupo 1 formado pelas amostras AP021, AP026, AP027, AP031, AP034, Q296 e o Grupo 2 formado pelas amostras AP022, AP023, Q166 (Tabela 1). Quando estes dois grupos, 1 e 2 foram comparados com as amostras da colônia Chaco obteve-se 100% de similaridade.

Quando as amostras foram analisadas em função do gene COI (658bp) encontramos duas diferenças entre as amostras brasileiras. Como observado no marcador 12S, para COI também foi encontrado os mesmos grupos para as amostras argentinas.

Ao se comparar amostras argentinas e brasileiras com COI foram encontrados 7,1% de dissimilaridade (47 diferenças). Mais especificamente entre as amostras do grupo 1 e amostras brasileiras foram encontradas 40 diferenças (6,0%). Não há depósito de sequências de *A. parvum* para marcador COI no GenBank, não permitindo maiores análises e discussões.

As sequências de ITS2 dos espécimes examinados obtiveram um comprimento de aproximadamente 1206pb, resultado compatível com o trabalho de Marrelli et al.,(2007). Foi observada similaridade (100%) quando as amostras brasileiras e de referência no GenBank (AY887118.1) foram comparadas. Embora com valor baixo, apenas cinco diferenças (0,4%), amostras argentinas e brasileiras apresentaram diferenças utilizando o ITS2 e não foram encontradas diferenças que separassem as amostras argentinas em dois grupos (99,9% de similaridade) como foi observado para 12S rDNA e COI.

A única diferença marcante para o marcador ITS2 foi observada quando a amostra AP031 foi comparada com as demais amostras argentinas obtendo 73 diferenças (6,0%). Até que novas análises sejam realizadas para elucidar essa questão não há explicação plausível que justifiquem essa diferença.



## 4 DISCUSSÃO

Este trabalho introduz ferramentas moleculares para fornecer um suporte adicional para a hipótese da existência de duas espécies diferentes de carrapatos atualmente considerados como *A. parvum*.

Na América do Sul, as populações de *A. parvum* estão concentradas em localidades da Argentina, Brasil e Paraguai (NAVA et al., 2008), que estão incluídos dentro do “Diagonal Seca” nos biomas Cerrado, Caatinga e Chaco (Ab’SABER 1977; SILVIA, 1995). A análise molecular fornece evidências de que as populações de carrapatos da Argentina e do Brasil representam diferentes linhagens no caso dos marcadores 12S e COI. Esta associação entre os padrões de distribuição de cada linhagem de *A. parvum* é consistente com os resultados anteriormente obtidos por Nava et al. (2008) com sequências 16S rDNA.

Estes resultados indicam que a análise de ambos os marcadores mitocondriais e nucleares revelaram divergência congruente entre as amostras das diferentes áreas. O DNA mitocondrial (mtDNA) reúne características desejáveis que um marcador evolutivo deve possuir, por essa razão é amplamente utilizado para análises das relações evolutivas entre espécies e a dinâmica das trocas que produzem em níveis micro e macro-evolutivo. O alto número de cópias torna os genes mitocondriais mais fáceis de serem utilizados do que os genes nucleares, além da capacidade de uso para estudos intraespecíficos (HILLS et al., 1996). Segundo Lv et al., (2014), COI deve ser a primeira escolha para identificação das espécies de carrapatos, enquanto que 16S rDNA, ITS2 e 12S rDNA devem ser usados quando COI não produz resultados confiáveis.

Genes mitocondriais e nucleares nem sempre retratam a mesma história evolutiva devido aos seus mecanismos distintos de herança. Os resultados obtidos para os marcadores mitocondriais (12S e COI) foram semelhantes, diferindo dos resultados encontrados pelo marcador nuclear ITS2. Este resultado se assemelha ao encontrado por Navajas et al., (1998) ao estudar o ácaro rajado *Tetranychus urticae* e para o qual encontraram duas linhagens para COI enquanto que em ITS2 não foram encontradas variações intraespecíficas. Os pesquisadores relacionaram esse achado a fatores ecológicos, como especificidade ecológica e na alimentação que condiciona um fator chave para oportunidades de migração e colonização de longas distâncias.

Um trabalho adicional foi desenvolvido para elucidar a questão da divergência entre *A. parvum* da Argentina e do Brasil. Gerardi et al. (2013) compararam os parâmetros biológicos de duas populações de *A. parvum* da Argentina e do Brasil em diferentes hospedeiros e observaram que ambas populações exibem parâmetros biológicos similares quando alimentados na mesma espécie de hospedeiro. Resultados apresentados nos capítulos um e dois dessa tese corroboram com os resultados de Gerardi et al., (2013). Portanto, as diferenças genéticas observadas entre as populações de *A. parvum* da Argentina e Brasil neste trabalho e no trabalho de Nava et al. (2008) não se correlacionam com os parâmetros biológicos mostrados para as duas linhagens genéticas.

Alguns haplótipos podem ser mais suscetíveis à infecção do que outros, como observado em *Ixodes scapularis*, em que linhagens localizadas ao norte são suscetíveis ao transmitir *Borrelia* (QIU et al., 2002) e *Rhipicephalus sanguineus* sl da América tropical cuja competência vetorial para *Ehrlichia canis* difere daqueles do Cone Sul (MORAES-FILHO et al., 2012). Os achados de patógenos relacionados à *A. parvum* estão mais relacionadas à Argentina (PACHECO et al., 2007; 2013; TOMASSONE et al., 2008; 2010), enquanto no Brasil só há um registro recente sobre transmissão de

*Rickettsia andeanae* (NIERI-BASTOS et al., 2014). Melhor compreensão do status taxonômico de *A. parvum* pode proporcionar um melhor discernimento da prevalência de agentes patogênicos transmitidos por este carrapato.

## 5 CONCLUSÃO

As diferenças genéticas aqui observadas para o gene 12S (3,8%) e COI (7,1%) adicionadas aos resultados encontrados por Nava et al. (2008) (3,7%) para gene 16S, indicam que pelo menos duas espécies de carrapatos estão sendo representadas pelo táxon *A. parvum* na América do Sul. Evidências adicionais serão necessárias para complementar os estudos biológicos (alimentação e parâmetros reprodutivos) e genéticos a fim de determinar se as duas linhagens de *A. parvum* na América do Sul representam dois taxa.



## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AB'SABER, A.N. Espaços ocupados pela expansão dos climas secos na América do Sul, por ocasião dos períodos glaciais quaternários. **Paleoclimas**, Instituto de Geografia – Universidade de São Paulo, v.3, p.1-18, 1977.

AVISE, J.C., ARNOLD, J.; BALL, R.M.; BERMINGHAM, E.; LAMB, T.; NEIGL, J.E.; REEB, C.A.; SAUNDERS, N.C. Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between populations genetics and systematics, v.18, p.489-522, 1987.

AVISE, J.C. **Phylogeography: The History and Formation of Species**. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, 447pp., 2000.

AVISE, J.C. Phylogeography: retrospect and prospect. **Journal of Biogeography**, v.36, n.1, p.3-15, 2009.

BEATI L, PATEL J, LUCAS-WILLIAMS H, ADAKAL H, KANDUMA EG, TEMBO-MWASE E, KRECEK R, MERTINS JW, ALFRED JT, KELLY S, KELLY P: Phylogeography and demographic history of *Amblyomma variegatum* (Fabricius) (Acari: Ixodidae), the tropical bont tick. **Vector Borne Zoonotic Disease**, v.12, n.6, p.514–525, 2012.

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

BENNETT, K.D. **Evolution and Ecology: the Pace of Life**. Cambridge University Press, Cambridge, 241pp., 1997.

BURLINI, L.; TEIXEIRA, K.R.; SZABÓ, M.P.; FAMADAS, K.M. Molecular dissimilarities of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in Brazil and its relation with samples throughout the world: is there a geographical pattern? **Experimental Applied Acarology**, v.50, p.361–374, 2010.

GARRICK, R.C.; CACCONE, A.; SUNNUCKS, P. Inference of population history by coupling exploratory and model-driven phylogeographic analyses. **International Journal of Molecular Science**, v.11, p.1190–1227, 2010.

GERARDI, M.; MARTINS, M.M.; NAVA, S.; SZABÓ, M.P.J. Comparing feeding and reproductive parameters of *Amblyomma parvum* tick populations (Acari: Ixodidae) from Brazil and Argentina on various host species. **Veterinary Parasitology**, v.197, p.312-317, 2013.

HEBERT, P.D.; STOECKLE, M.Y.; ZEMLAK, T.S.; FRANCIS, C.M. Identification of Birds through DNA Barcodes. **PLoS Biology**. v.2, n.10, p.312. doi:10.1371/journal.pbio.0020312, 2014.

HEWITT, G.M. Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. **Proceedings of the Royal Society of London**, v.359, p.183-195, 2004.

HILLS, D.M.; MORITZ, C.; MABLE, B.K. **Molecular Systematics**. Sinauer Associates, Massachusetts, USA, 665pp., 1996.

IRWIN, D.E. Phylogeographic breaks without geographic barriers to gene flow. **Evolution**, v.56, n.12, p.2383-2394, 2002.

LABRUNA, M.B.; NARANJO, V.; MANGOLD, A.J.; THOMPSON, C.; ESTRADA-PEÑA, A.; GUGLIELMONE, A.A.; JONGEJAN, F.; DE LA FUENTE, J. Allopatric speciation in ticks: genetic and reproductive divergence between geographic strains of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **BMC Evolutionary Biology**, v.9, p.46. doi: 10.1186/1471-2148-9-46, 2009.

LABRUNA, M.B.; SOARES, J.F.; MARTINS, T.F.; SOARES, H.S.; CABRERA, R.R. Cross-mating experiments with geographically different populations of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). **Experimental Applied Acarology**, v.54, p.41–49, 2011.

LV, J.; WU, S.; ZHANG, Y.; CHEN, Y.; FENG, C.; YUAN, X.; JIA, G.; DENG, J.; WANG, C.; WANG, Q.; MEI, L.; LIN, X. Assessment of four DNA fragments (COI, 16S rDNA, ITS2, 12S rDNA) for species identification of the Ixodida (Acari: Ixodida). **Parasites & Vectors**, v.7, p.93, 2014.

MASTROPAOLO, M.; NAVA, S.; GUGLIELMONE, A.A.; MANGOLD, A.J.; Biological differences between two allopatric populations of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) in Argentina. **Experimental Applied Acarology**, v.53, n.4, p.371-375, 2011.

MIXSON, T.R.; LYDY, S.L.; DASCH, G.A.; REAL, L.A. Inferring the population structure and demographic history of the tick, *Amblyomma americanum* Linnaeus. **Journal Vector Ecology**, v.31, p.181–192, 2006.

MORAES-FILHO J, MARCILI A, NIERI-BASTOS FA, RICHTZENHAIN LJ, LABRUNA MB. Genetic analysis of ticks belonging to the *Rhipicephalus sanguineus* group in Latin America. **Acta Tropica**, v.117, n.1, p.51-55, 2011.

MORAES-FILHO, J., SOARES, J.F., LABRUNA, M.B. Study on the vector competence for *Ehrlichia canis* of four Neotropical populations of *Rhipicephalus sanguineus*. In: FAMERP-UTMB: Emerging infections in the Americas? Common interests and collaboration between Brazil and USA. Sociedade de Medicina e Cirurgia. São José do Rio Preto, Brazil. 2012.

NAVA, S.; SZABÓ, M.P.J., MANGOLD, A.J.; GUGLIELMONE A.A. Distribution, hosts, 16s rDNA sequences and phylogenetic position of the Neotropical tick

*Amblyomma parvum* (Acari: Ixodidae). **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v.102, n.5, p.409-425, 2008.

NAVA, S.; GUGLIELMONE, A.A.; MANGOLD, A.J. An overview of systematics and evolution of ticks. **Frontiers in Bioscience**, v.4, p.2857–2877, 2009.

NAVAJAS, M., LAGNEL, J.; GUTIERREZ, J.; BOURSOT, P. Species-wide homogeneity of nuclear ribosomal ITS2 sequences in the spider mite *Tetranychus urticae* contrasts with extensive mitochondrial COI polymorphism. **Heredity**, v.80, p.742-752, 1998.

NIERI-BASTOS, F.A.; LOPES, M.G.; CANÇADO, P.H.D.; ROSSA, G.A.R.; FACCINI, J.L.H.; GENNARI, S.M.; LABRUNA, M.B. *Candidatus* Rickettsia andeanae, a spotted fever group agent infecting *Amblyomma parvum* ticks in two Brazilian biomes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.109, n.2, p.259-261, 2014.

NORRIS, D.E.; KLOMPEN, J.S.; KEIRANS, J.E.; BLACK, W.C. IV. Population genetics of *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) based on mitochondrial 16S and 12S genes. **Medical Entomology**. v.33, p.78-89, 1996.

NOUREDINE, R.; CHAUVIN, A.; PLANTARD, O. Lack of genetic structure among Eurasian populations of the tick *Ixodes ricinus* contrasts with marked divergence from north-African populations. **International Journal of Parasitology**, v.41, p.183–191, 2011.

PACHECO, R.C.; MORAES-FILHO, J.; NAVA, S.; BRANDFIO, P.E.; RICHTZENHAIN, L.J.; LABRUNA, M.B. Detection of a novel spotted fever group rickettsia in *Amblyomma parvum* ticks (Acari: Ixodidae) from Argentina. **Experimental Applied Acarology**, v.43, p.63-71, 2007.

PACHECO, R.C.; ECHAIDE, I.E.; ALVES, R.N.; BELETTI, M.E.; NAVA, S.; LABRUNA, M.B. *Coxiella burnetii* in Ticks, Argentina. **Emerging Infectious Diseases** v.19, n. 2, p.344-346, 2013.

PEREIRA, M.C.; LABRUNA, M.B. Febre Maculosa: aspectos clínicos epidemiológicos. **Clínica Veterinária**, v.12, p.19-23, 1998.

QIU, W.G.; DYKHUIZEN, D.E.; ACOSTA, M.S.; LUFT, B.J. Geographic uniformity of the Lyme disease spirochete (*Borrelia burgdorferi*) and its shared history with tick vector (*Ixodes scapularis*) in the northeastern United States. **Genetics**, v.160, p.833–849, 2002.

SILVA, J.M.C. Biogeographic analysis of the South American cerrado avifauna. **Steenstrupia**, v.21, p.49–67, 1995.

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

TOMASSONE, L.; NUÑEZ, P.; GÜRTLER, R.E.; CEBALLOS, L.A.; OROZCO, M.M.; KITRON, U.D.; FARBER, M. Molecular Detection of *Ehrlichia chaffeensis* in *Amblyomma parvum* Ticks, Argentina. **Emerging Infectious Diseases**, v.14, n.12, 2008.

TOMASSONE, L.; NUÑEZ, P.; CEBALLOS, L.A.; GÜRTLER, R.E. KITRON, U. FARBER, M. Detection of "*Candidatus* Rickettsia sp. Strain Argentina" and *Rickettsia bellii* in *Amblyomma* ticks (Acari: Ixodidae) from Northern Argentina. **Experimental Applied Acarology**, v.52, p.93-100, 2010.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Todas as observações da presente tese relacionados à *A. parvum* da Argentina e Brasil sugerem que biologicamente apresentam pequenas diferenças em relação aos parâmetros biológicos, mas que não comprometem o “*status*” da espécie em questão. Molecularmente foram observados que para o gene 12S e COI houve uma diferença significativa a ponto de considerá-las como espécies distintas, fato não observado quando analisado pelo gene ITS2. Após esses resultados novos estudos merecem ser aprofundados, de preferência com novas amostras de novas localidades, a fim de elucidar essa dúvida sobre a possível possibilidade de essas amostras da América do Sul ser espécies diferentes.



## **Anexo A - Pasta Una - Protocolo**

100 ml de glicerina  
160 ml de água destilada  
80 gramas de gelatina em pó sem sabor  
60 gramas de óxido de zinco

Colocar a água na panela com antecedência no banho-maria. Misturar a frio, a glicerina e a água destilada. Nesta mistura acrescentar aos poucos a gelatina. Levar ao banho-maria somente quando a mistura endurecer, a ponto de dificultar o processo de homogeneização.

Após terminar a gelatina, repetir o mesmo processo com o óxido de zinco. Findo o óxido de zinco, deixar no banho-maria (mexendo aos poucos) até obter o ponto de cola (quando forma uma linha que não arrebenta, entre os dedos polegar e indicador).

Deixar cinco minutos no banho-maria sem mexer. Após esse passar esse tempo, mexer por dois ou três minutos e desligar do fogo. Utilizar no dia seguinte.



**Anexo B – Parecer da Comissão de Ética na Pesquisa da UFRRJ/COMEP para realização de estudos utilizando coelhos domésticos para o capítulo I**



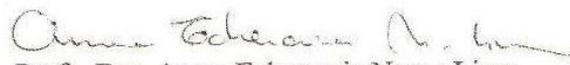
SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
COMISSÃO DE ÉTICA NA PESQUISA DA UFRRJ / COMEP

Protocolo Nº 160/2011

**PARECER**

O Projeto de Pesquisa intitulado “*Maintenance de colônias de carrapatos (Acari: Ixodida) usando coelhos domésticos em condições experimentais*” sob a responsabilidade do Prof. Dr. João Luiz Horácio Faccini do Departamento de Parasitologia Animal do Instituto de Veterinária, processo 23083.010016/2011-14, atende aos princípios básicos para pesquisa envolvendo o uso de animais e está de acordo com os princípios éticos e do bem estar animal estando de acordo com a Resolução 714 de 20/06/2002 do CFMV.

UFRRJ, 24/01/2012.

  
Prof.ª. Dra. Aurea Echevarria Neves Lima  
Pró-reitora de Pesquisa e Pós-graduação



**Anexo C - Parecer da Comissão de Ética na Pesquisa da UFRRJ/COMEP para realização de estudos utilizando coelhos domésticos para o capítulo II**



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
COMISSÃO DE ÉTICA NA PESQUISA DA UFRRJ / COMEP

Protocolo Nº 179/2011

**PARECER**

O Projeto de Pesquisa intitulado "*Efeito da imersão em água destilada na fase imatura de carrapatos ixodídeos e argasídeos em condições controladas em laboratório*" sob a responsabilidade da Profa. Dra. Kátia Maria Famadas do Departamento de Parasitologia Animal do Instituto de Veterinária, processo 23011443/2011-10, atende aos princípios básicos para pesquisa envolvendo o uso de animais e está de acordo com os princípios éticos e do bem estar animal estando de acordo com a Resolução 714 de 20/06/2002 do CFMV.

UFRRJ, 14/03/2012.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Aurea Echevarria Neves Lima'.

Profa. Dra. Aurea Echevarria Neves Lima  
Pró-reitora de Pesquisa e Pós-graduação



## Free-living ixodid ticks in an urban Atlantic Forest fragment, state of Rio de Janeiro, Brazil

Carrapatos ixodídeos de vida livre em um fragmento urbano de Mata Atlântica, Estado do Rio de Janeiro, Brasil

Michele da Costa Pinheiro<sup>1\*</sup>; Elizabete Captivo Lourenço<sup>2</sup>; Priscilla Maria Peixoto Patrício<sup>2</sup>;  
Iwine Joyce Barbosa de Sá-Hungaro<sup>1</sup>; Kátia Maria Famadas<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Ixodologia, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ, Seropédica, RJ, Brasil

<sup>2</sup>Laboratório de Morfofisiologia de Ácaros, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ, Seropédica, RJ, Brasil

Received October 22, 2013

Accepted March 13, 2014

### Abstract

As a consequence of the importance of ticks in forests in protected areas, was conducted survey of species of free-living ticks in the Natural Park Municipal Curió, state of Rio de Janeiro, Brazil. Monthly samples were taken by dragging method, dry ice traps and visual search in two transects. Adults and nymphs of *Amblyomma cajennense* (n= 147), *Amblyomma brasiliense* (n= 4) and *Amblyomma parvum* (n= 1) were collected. This is the first occurrence of *A. parvum* in the state. No correlation was found between the abundance of stages of *A. cajennense* and rainfall, temperature and relative humidity. The highest abundances of adults were in the months of January and May, and nymphs in September and October. The low diversity of parasites on Curió Park can be attributed to the proximity of households with pets, which would also explain the higher abundance of *A. cajennense* that is commonly found in areas impacted by anthropogenic pressure.

**Keywords:** *Amblyomma brasiliense*, *Amblyomma cajennense*, *Amblyomma parvum*.

### Resumo

Como consequência da importância dos carrapatos em áreas florestais como Unidades de Conservação, foi realizado levantamento das espécies de carrapatos de vida livre no Parque Natural Municipal Curió, estado do Rio de Janeiro, Brasil. Foram realizadas coletas mensais através de arrasto, armadilhas de gelo seco e busca visual, em dois transectos. Foram coletados adultos e ninfas de *Amblyomma cajennense* (n= 147), *Amblyomma brasiliense* (n= 4) e *Amblyomma parvum* (n= 1). Esta é a primeira ocorrência de *A. parvum* no Estado. Não foi encontrada correlação entre a abundância de estágios de *A. cajennense* e precipitação, temperatura e umidade relativa do ar. As maiores abundâncias de adultos foram nos meses de janeiro e maio, e ninfas em setembro e outubro. A baixa diversidade de carrapatos no Curió pode ser atribuída à proximidade de residências com animais domésticos, o que também explicaria a maior abundância de *A. cajennense* que é comumente encontrada em áreas impactadas por pressão antrópica.

**Palavras-chave:** *Amblyomma brasiliense*, *Amblyomma cajennense*, *Amblyomma parvum*.

Despite the high socio-environmental interest of more preserved areas such as Full Protection Conservation Units, reports about outbreaks of diseases transmitted by ticks on wild animal and the growing practice of ecotourism, few surveys have focused on free-living ticks. The importance of such studies is indisputable, considering the fact that public parks, which are visited by large

numbers of people, often contain small wild animals and their ticks. The combination of ticks of wild animals, circulating pathogens and humans favors the emergence of zoonosis and hence of public health problems (CISAK et al., 2005; TOLEDO et al., 2008; QUEIROGAS, 2010).

Based on these arguments, the purpose of this study was to conduct a survey of free-living tick species in Curió Municipal Nature Park, examining their life stages and sex ratio throughout the sampling period. Because forest areas may differ from open habitats such as grasslands, in terms not only of vegetation type but also weather patterns (ARZUA, 2007; TACK et al., 2012),

\*Corresponding author: Michele da Costa Pinheiro  
Laboratório de Ixodologia, Departamento de Parasitologia Animal,  
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ,  
BR-465, Km 07, CEP 23890-000, Seropédica, RJ, Brasil  
e-mail: michelezootec@gmail.com

