

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA

***Amblyomma sculptum* (Acari: Ixodidae): avaliação
da capacidade de locomoção e desenvolvimento de
formulações vacinais para seu controle**

Ulisses Antônio Natividade

Belo Horizonte

2020

Ulisses Antônio Natividade

***Amblyomma sculptum* (Acari: Ixodidae): avaliação da capacidade de locomoção e desenvolvimento de formulações vacinais para seu controle**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Entomologia

Belo Horizonte

2020

043

Natividade, Ulisses Antônio.

Amblyomma sculptum (Acari: Ixodidae): avaliação da capacidade de locomoção e desenvolvimento de formulações vacinais para seu controle [manuscrito] / Ulisses Antônio Natividade. – 2020.

71 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Ricardo Nascimento Araujo.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Parasitologia.

1. Parasitologia. 2. Ixodidae. 3. Locomoção. 4. Sobrevivência. 5. Comportamento. 6. Vacinas. I. Araujo, Ricardo Nascimento. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 576.88/.89

“Ciência deve respeitar a demanda humana por qualidade de vida”.

Prof. Luiz Felipe Silva (UNIFEI)

À minha mãe e a minha esposa
ALPINA VALÉRIA NATIVIDADE e
ANGELITA DE PAULA PIMENTA

AGRADECIMENTOS

À minha mãe que lutou sozinha por minha educação e me preparou para os desafios da vida.

Ao professor Dr. Ricardo Nascimento Araújo pelo comprometimento, pela disciplina e organização na orientação deste trabalho, além da paciência e todos os conhecimentos dispensados.

Ao professor Dr. Marcos Horácio pela atenção, parceria e acolhimento no laboratório e em Belo Horizonte.

Ao professor Dr. Nelder Gontijo por permitir a participação na confraria secreta além de estar sempre por perto para prevenir minhas “alunisses”, contribuindo sempre para o meu crescimento acadêmico.

Ao professor Dr. Mauricio Sant’Anna pelos momentos agradáveis de convívio e pelas contribuições.

Aos técnicos do LFIH, Márcia Campos e César Nonato, que fazem tudo fluir de forma discreta tornando possível conviver e trabalhar no dia-a-dia.

À Professora Héliida Monteiro, técnicos e alunos de seu laboratório.

Aos professores Ricardo Fujiwara, Daniella Bartolhomeu e Lilian Lacerda Bueno, técnicos e alunos de seu laboratório.

Aos coordenadores do programa de pós-graduação.

À fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e INCT-Entomologia Molecular que viabilizaram a execução desta pesquisa através do suporte financeiro.

A todos os funcionários e professores do ICB/UFMG que de maneira direta ou indireta contribuíram para a minha realização acadêmica.

À minha sogra, Dona Expedita, pelo zelo, apoio e orações.

A todos os amigos do LFHI, que tornaram a realização desse trabalho mais agradável: Naylene, Paulinha e Jessica; Gabriel; Luciana Ramos; Rafaela Paim; Rodolfo; Adalberto, Denise, Natália, Mércia, Monique, Lucas, Luiza Guerra, Luiza Lara, Daniel, Giovanna e Rafael.

Às amigas especiais Sumara e Sibeles que nos orientam, apoiam, cobram e sempre estão dispostas a ajudar.

À Angelita, pela dedicação e apoio incondicionais, fundamentais em tudo que realizo.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA	- bovine serum albumin (albumina do soro bovino)
BOD	- biochemistry oxigene demand (Demanda bioquímica de oxigênio)
BT	- Basic Tail
CEBio	- centro de bioterismo
cm	- centímetro
cm/min	- centímetros por minutos
CRT	- coeficiente de redução de fêmeas ingurgitadas
CRO	- coeficiente de redução de oviposição
CRF	- coeficiente de redução de fertilidade dos ovos
d	- dias
DAB	- dietil-amino-etil-benzidina
DE	- dia experimental
DP	- desvio padrão
DTT	- ditionitrosol
ELISA	- Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EP	- erro padrão
FMB	- febre maculosa brasileira
g	- aceleração da gravidade
hr	- hora
ICB	- Instituto de Ciências Biológicas
IgG	- imunoglobulina G
IPTG	- isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
kDa	- kilodaltons
Kn	- Kunitz
M	- molar
m	- metro(s)
m/DE	- metros por dia de experimento
mg	- miligramas
MIF	- mediana da intensidade de fluorescência
min	- minutos
mL	- mililitro

mM	- milimolar
MW	- molar weight
n	- número amostral
nm	- nanômetro
nM	- nanomolar
°C	- graus Celsius
OD	- optical density (densidade óptica)
OPD	- orto-fenilenodiamina ou 1,2-diaminobenzeno
PBS	- “phosphate buffered saline” (tampão fosfato)
PCR	- Polymerase Chain Reaction (reação em cadeia da polimerase)
pH	- potencial hidrogeniônico
Qui	- Quimera
SDS-PAGE	- “sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis” (dodecilsulfato de sódio – gel de poliacrilamida para eletroforese)
seg	- segundos
T1	- teste 1
T2	- teste 2
T3	- teste 3
T4	- teste 4
T5	- teste 5
V	- volts
V/h	- Volts/hora
Vmax	- Velocidade máxima
vWF	- von Willebrand
µg	- micrograma
µL	- microlitro
µM	- micromolar

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Formas evolutivas de <i>Amblyomma sculptum</i>	16
Figura 2:	Ciclo biológico de <i>A. sculptum</i>	17
Figura 3:	Distribuição geográfica conhecida das espécies pertencentes ao complexo <i>A. cajennense</i> sensu lato nas Américas.....	18
Figura 4:	Distribuição geográfica das espécies de carrapatos pertencentes ao complexo <i>A. cajennense</i> sensu lato no Brasil.....	19
Figura 5:	Desenho esquemático do aparato experimental.....	29
Figura 6:	Histogramas da distância percorrida e mudança de sentido de ninfas de <i>A. sculptum</i> , por dia experimental, em condições de laboratório.....	32
Figura 7:	Influência da idade sobre os parâmetros de locomoção das ninfas de <i>A. sculptum</i> em condições de laboratório.....	33
Figura 8:	Efeito da locomoção na sobrevivência de ninfas de <i>A. sculptum</i>	34
Figura 9:	Influência do período experimental nos parâmetros de locomoção de ninfas de <i>A. sculptum</i> em diferentes estações do ano.....	35
Figura 10:	Influência da estação do ano nos parâmetros de locomoção de ninfas de <i>A. sculptum</i> em condições de laboratório.....	36
Figura 11:	Sobrevivência de ninfas de <i>A. sculptum</i> mantidas em diferentes condições de locomoção durante diferentes estações do ano.....	36
Figura 12:	Delineamento do ensaio vacinal realizado em camundongos utilizando antígenos contra o carrapato <i>A. sculptum</i>	47
Figura 13:	Produção e purificação das proteínas recombinantes utilizadas nas formulações vacinais contra o carrapato <i>A. sculptum</i>	49
Figura 14:	Resposta antígeno-específica produzida a partir da vacinação de camundongos com antígenos salivares recombinantes.....	50
Figura 15:	Resposta antígeno-específica produzida a partir da vacinação de camundongos com antígenos salivares recombinantes em testes específicos.....	51
Figura 16:	Parâmetros alimentares de fêmeas de <i>A. sculptum</i> alimentadas em camundongos imunizados com as diferentes formulações vacinais.....	53
Figura 17:	Parâmetros reprodutivos de fêmeas de <i>A. sculptum</i> alimentadas em camundongos imunizados com as diferentes formulações vacinais.....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Capacidade de locomoção e características da caminhada de ninfas de <i>A. sculptum</i> em condições e laboratório.....	31
Tabela 2:	Distância de locomoção e mudança de sentido por dia experimental (DE) de ninfas de <i>A. sculptum</i> em condições de laboratório.....	31
Tabela 3:	Distância de locomoção em um único sentido de ninfas de <i>A. sculptum</i> em condições de laboratório.....	31
Tabela 4:	Grupos experimentais e formulações utilizadas nos ensaios vacinais.....	44
Tabela 5:	Mortalidade de fêmeas de <i>A. sculptum</i> alimentadas em camundongos imunizados com as diferentes formulações vacinais.....	52
Tabela 6:	Fertilidade de fêmeas de <i>A. sculptum</i> após alimentação em camundongos imunizados com diferentes formulações vacinais.....	54
Tabela 7:	Coeficientes de redução de fêmeas ingurgitadas (CRT), oviposição (CRO) e fertilidade dos ovos (CRF) relativos à vacinação com os antígenos salivares recombinantes e suas taxas de eficácia no controle da infestação por fêmeas de <i>A. sculptum</i>	55

Resumo

Amblyomma sculptum (Acari: Ixodidae) é considerado o principal carrapato em importância médica no Brasil, além de causar enormes prejuízos nas criações de animais. No presente estudo, foram investigados dois importantes fatores relacionados ao *A. sculptum* que são sua capacidade de locomoção de forma ativa de ninfas e o efeito de diferentes formulações vacinais no desenvolvimento de fêmeas. Para isso, o estudo foi dividido em duas partes. Na primeira parte, os objetivos foram de descrever a capacidade assim como as características da locomoção de ninfas de *A. sculptum* em condições de laboratório e avaliar seu efeito na sobrevivência. Para tanto, um aparato de locomoção foi construído e diferentes parâmetros de locomoção, além da sobrevivência das ninfas, foram mensurados. Observou-se que as ninfas de *A. sculptum* foram capazes de caminhar, ao longo de sua vida, por distâncias superiores a 100 metros. Porém, as distâncias diárias percorridas foram de aproximadamente 1,8 metros e houveram mudanças constantes de sentido. Constatou-se também que a sobrevivência de ninfas que permaneceram em repouso fora de mais de seis meses e três vezes maior que de ninfas submetidas à locomoção diária. A segunda parte do estudo avaliou a resposta imune e eficácia de diferentes formulações vacinais contendo antígenos salivares e intestinais contra *A. sculptum* utilizando camundongos como hospedeiros. Para isto, foram realizados ensaios vacinais com cinco formulações que possuíam combinações de antígenos recombinantes (T1-KnQui; T2-BTQui; T3-8,9Qui; T4-Kn8,9Qui e T5-Kn8,9BTQui) seguido pelo desafio com casais de *A. sculptum*. Foi observada uma taxa de mortalidade de até 33% nas fêmeas de carrapatos testadas assim como redução de até 50% na fertilidade destas fêmeas. Os ensaios realizados revelaram eficácias que variaram de 69,1 a 81,8% denotando perspectivas promissoras. As formulações com os melhores resultados foram aquelas que continham os antígenos rAsKunitz, rAs8,9KDa e rAsQuimera. Os resultados adicionam à literatura informações importantes que visam o controle de carrapatos *A. sculptum* e a prevenção das doenças por ele transmitidas.

Palavras-chave: complexo *Amblyomma cajennense*; busca ativa; sobrevivência; antígenos vacinais; vacina; comportamento.

Abstract

Amblyomma sculptum (Acari: Ixodidae) is considered the main tick of medical importance in Brazil, in addition to causing enormous losses in animal husbandry. In the present study, two important factors related to *A. sculptum* were investigated, which are nymphs ability to move around actively and the effect of different vaccine formulations on the female development. For this, the study was divided into two parts. At the first part, the ability and characteristics about nymphs locomotion of *A. sculptum* under laboratory conditions and to evaluate its effect on survival were described. For that, a locomotion apparatus was built and different locomotion parameters, in addition to the survival of nymphs, were measured. It was observed that the nymphs of *A. sculptum* were able to walk, over their lifetime, for distances greater than 100 meters. However, the daily distances covered approximately 1.8 meters and constant changes in direction were observed. It was also found that the survival of nymphs that remained at cloister was more than six months and three times greater than nymphs submitted to daily locomotion. The second part of the study aimed to evaluate the immune response and effectiveness of five different vaccine formulations containing salivary and intestinal antigens against *A. sculptum* using mice as hosts. For this, vaccine trials were carried out with combined formulations of recombinant antigens (T1-KnQui; T2-BTQui; T3-8,9Qui; T4-Kn8,9Qui and T5-Kn8,9BTQui) and challenge against *A. sculptum* couples. A mortality rate of up to 33% was observed in the tick females tested as well as a reduction of up to 50% in the fertility of these females. The tests carried out revealed efficacy between 69,1 and 81,8%, showing promising perspectives. The formulations with the best results were those that contained the rAsKunitz, rAs8.9KDa and rAsQuimera antigens. The results add to the literature important information about tick *A. sculptum* control and preventing diseases transmitted by it.

Keywords: *Amblyomma cajennense* complex; active search; survival; vaccine antigens; vaccine; behavior.

SUMÁRIO

	pag.
1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1. Taxonomia dos carrapatos e de <i>Amblyomma sculptum</i>	14
1.2. Importância do carrapato <i>A. sculptum</i>	14
1.2.1. Importância médica.....	14
1.2.2. Importância veterinária.....	15
1.3. Biologia do carrapato <i>A. sculptum</i>	15
1.3.1. Principais hospedeiros e ciclo biológico.....	15
1.3.2. Distribuição e epidemiologia.....	17
1.3.3. Dispersão, locomoção e sobrevivência de carrapatos.....	20
1.4. Controle de carrapatos.....	22
2. JUSTIFICATIVA.....	25
3. CAPÍTULO 1 - Capacidade e características da locomoção de ninfas de <i>A. sculptum</i> em condições de laboratório.....	26
3.1. Objetivos.....	26
3.1.1. Objetivo geral.....	26
3.1.2. Objetivos específicos.....	26
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
4.1. Manutenção da colônia de <i>A. sculptum</i> em laboratório.....	27
4.2. Grupos experimentais.....	27
4.3. Ensaio de locomoção	28
4.4. Construção das figuras e análise estatística dos dados.....	29
5. RESULTADOS.....	30
5.1. Parâmetros de locomoção de ninfas de <i>A. sculptum</i> em condições de laboratório.....	30
5.2. Parâmetros de locomoção de ninfas de <i>A. sculptum</i> em condições de laboratório ao longo do período experimental.....	32
5.3. Influência da locomoção na sobrevivência das ninfas.....	33
5.4. Avaliação dos parâmetros de locomoção de ninfas de <i>A. sculptum</i> de experimentos realizados em diferentes estações do ano.....	34
6. DISCUSSÃO.....	37
7. CONCLUSÕES.....	42

8.	CAPÍTULO 2 - Avaliação da resposta imune humoral e eficácia de diferentes formulações vacinais contra <i>A. sculptum</i> utilizando camundongos Swiss como hospedeiros.....	43
8.1.	Objetivos.....	43
8.1.1.	Objetivo geral.....	43
8.1.2.	Objetivos específicos.....	43
9.	MATERIAL E MÉTODOS.....	44
9.1.	Manutenção da colônia de <i>A. sculptum</i> em laboratório.....	44
9.2.	Produção das formulações vacinais.....	44
9.3.	Imunização dos grupos experimentais de camundongos.....	46
9.4.	Infestação dos hospedeiros e avaliação da eficácia vacinal.....	47
9.5.	Avaliação da resposta humoral nos animais imunizados.....	48
9.6.	Construção das figuras e análise estatística dos dados.....	48
10.	RESULTADOS.....	49
10.1.	Preparação das formulações vacinais.....	49
10.2.	Ensaio vacinal em camundongos.....	50
10.2.1.	Avaliação da produção de anticorpos séricos antígeno-específicos.....	50
10.2.2.	Mortalidade e parâmetros alimentares e reprodutivos de fêmeas alimentadas em camundongos vacinados com diferentes formulações vacinais contra <i>A. sculptum</i>.....	52
11.	DISCUSSÃO.....	56
12.	CONCLUSÕES.....	59
13.	BIBLIOGRAFIA.....	60
	<i>Anexo.....</i>	<i>72</i>

1. INTRODUÇÃO

1.1. Taxonomia dos carrapatos e de *Amblyomma sculptum*

Os carrapatos pertencem à classe Arachnida e estão compreendidos em duas principais famílias: Ixodidae, representada por aproximadamente 703 espécies e Argasidae, que é composta por aproximadamente 194 espécies (Dantas-Torres *et al.* 2012; Guglielmone *et al.* 2010). Existe ainda uma terceira família: Nuttalliellidae, representada por uma única espécie: *Nuttalliella namaqua* (Keirans 2009).

A família Ixodidae agrupa os “carrapatos de corpo duro” que possuem um escudo rígido quitinoso na região dorsal e é dividida em dois grupos: Prostriata e Metastriata. No grupo Prostriata, que apresenta dobra anal anterior ao ânus e cuja cópula ocorre antes ou durante a alimentação, estão inseridos os carrapatos do gênero *Ixodes*. Enquanto no grupo Metastriata, com dobra anal posterior, maturação sexual tardia e cópula ocorrendo somente depois que os adultos se alimentam, estão incluídos os demais gêneros (Nava, Guglielmone e Mangold 2009). No grupo Metastriata encontra-se o gênero *Amblyomma* e a espécie *A. sculptum*.

A. sculptum era conhecido anteriormente como *A. cajennense* até a realização de uma mudança taxonômica, verificada por meio de análises moleculares, morfológicas e reprodutivas, além de distribuição biogeográfica. Essa espécie agora faz parte do chamado complexo *A. cajennense* sensu lato, que agrupa outras cinco espécies distintas (*A. cajennense* sensu stricto, *A. interandinum*, *A. mixtum*, *A. patinoi* e *A. tonelliae*), distribuídas do sul dos Estados Unidos da América até o norte da Argentina e todo Uruguai (Beati *et al.* 2013; Estrada-Peña *et al.* 2014; Nava *et al.* 2014). No Brasil, são encontradas apenas as espécies *A. cajennense* sensu stricto e *A. sculptum*, sendo esta última a única descrita na região Sudeste (Estrada-Peña *et al.* 2014).

1.2. Importância do carrapato *A. sculptum*

1.2.1. Importância médica

A. sculptum é considerado o principal carrapato em importância médica no Brasil. Ele é o principal vetor da bactéria *Rickettsia rickettsii* e a espécie de carrapato mais associada às infestações em humanos, estando presente em áreas verdes de regiões urbanizadas e populosas

(Guglielmone *et al.* 2006; Labruna 2009; Queirogas *et al.* 2012). A Febre Maculosa Brasileira (FMB) causada por *R. rickettsii* é a riquetsiose de maior ocorrência e maior gravidade no país (Nava *et al.* 2014; Oliveira *et al.* 2016), com 2075 casos e 534 óbitos registrados no Brasil entre 2007 e 2017, sendo 528 óbitos na região Sudeste onde se destacam o estado de Minas Gerais com 71 e São Paulo com 393 óbitos. Além de cinco óbitos na região Sul, todos no Paraná e uma morte no Nordeste, no estado de Pernambuco (SINAN 2020). *A. sculptum* também pode estar envolvido na transmissão de outras bactérias do gênero *Rickettsia* possivelmente patológicas, tais como *R. parkeri*, *R. bellii*, *R. felis* e *R. amblyommatis* (Bitencourth *et al.* 2017; Sebastian *et al.* 2017).

1.2.2. Importância veterinária

O carrapato *A. sculptum* também é de grande interesse na medicina veterinária uma vez que gera prejuízos econômicos na cadeia pecuária parasitando rebanhos de animais no Brasil. Durante o repasto sanguíneo, as fêmeas retiram grandes volumes de sangue, podendo causar comprometimento da capacidade produtiva dos hospedeiros e predispor a infecções secundárias, instalação de miíases, desvalorização do couro dos hospedeiros, gastos na tentativa de controle de carrapatos, entre outros (Borges *et al.* 2002; De Castro 1997; Ghosh, Azhahianambi e Yadav 2007). Adicionalmente, carrapatos da espécie *A. sculptum* são incriminados como vetores para os animais de patógenos como bactérias do gênero *Rickettsia*, diferentes arbovírus e algumas espécies de borrelíias (Jongejan e Uilenberg 2004).

1.3. Biologia do carrapato *A. sculptum*

1.3.1. Principais hospedeiros e ciclo biológico

A. sculptum apresenta quatro estágios de desenvolvimento em seu ciclo, sendo eles os ovos, larvas, ninfas e adultos macho e fêmea (Figura 1). As larvas são hexápodes e vulgarmente conhecidas por “micuins” enquanto as ninfas são octópodes e chamadas de “vermelhinho”. Na fase adulta, ele é popularmente conhecido como “carrapato estrela”, “carrapato do cavalo” e “rodoleiro ou radoleiro”, sendo o último termo mais comumente usado para fêmeas ingurgitadas e amplamente difundido pelo homem do campo.

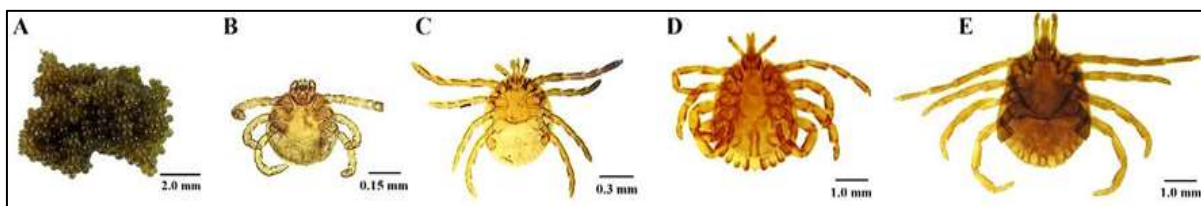


Figura 1: Formas evolutivas de *Amblyomma sculptum* : Ovos (a); Larva (b); Ninf (c) e Adultos: Macho (d) e Fêmea (e) (Neves *et al.* 2016).

As formas adultas de *A. sculptum* apresentam alta especificidade parasitária para hospedeiros como equinos, capivaras e antas (Labruna *et al.* 2001; Lopes *et al.* 1998; Szabó, Pinter e Labruna 2013). Larvas e ninfas realizam o repasto sanguíneo em uma série de diferentes hospedeiros vertebrados, tais como o homem, bovinos, suínos, cães e aves além de vários animais silvestres (Lopes *et al.* 1998; Rojas, Marini e Coutinho 1999; Szabó *et al.* 2018). A espécie é considerada de fácil manutenção em laboratório e colônias de *A. sculptum* podem ser mantidas se alimentando em animais como camundongos e coelhos (Franco *et al.* 2016; Lopes *et al.* 2008).

O ciclo biológico de *A. sculptum* é do tipo trioxeno e apresenta sazonalidade ao longo do ano com picos populacionais bem definidos (Labruna *et al.* 2002; Lopes *et al.* 1998; Oliveira *et al.* 2000). Haja vista que maiores taxas populacionais de larvas podem ser observadas durante os meses de abril a julho, de ninfas entre julho e outubro, enquanto os adultos são mais frequentes durante os meses que vão de outubro a março (Oliveira *et al.* 2003; Szabó *et al.* 2018). Labruna (2003) e seus colaboradores perceberam que larvas em jejum de *A. sculptum* passaram um período de confinamento sob o solo abaixo de vegetação. Estas larvas não estavam totalmente imóveis, mas não apresentavam, aparentemente, interesse por busca ativa de hospedeiros, o que foi caracterizado como comportamento de diapausa larval. O fotoperíodo parece ter maior influência sobre a regulação da diapausa em carrapatos. Assim, aquelas larvas que eclodiram mais cedo, tornar-se-ão ativas somente em abril junto da maior parte. De modo que foram observadas maior quantidade de larvas em arbustos e estas encontraram seus hospedeiros, se alimentando e sofrendo ecdise para ninfas até o mês de julho e assim por diante.

Após o desprendimento da fêmea ingurgitada, que cai do seu hospedeiro no solo. A oviposição se inicia após, aproximadamente, 20 dias em condições ideais de temperatura e umidade, cerca de 28°C e 80% respectivamente, e pode variar de cinco a vinte mil ovos. A incubação dos ovos dura aproximadamente 30 dias, quando as larvas eclodem e se dirigem às extremidades de arbustos a fim de esperar a passagem de um hospedeiro susceptível (Costa e Botelhos 2011). Ao encontrar um hospedeiro, elas se fixam e iniciam o ingurgitamento durante um período de 3 a 6 dias e, quando ingurgitadas, desprendem-se e caem ao solo realizando a

ecdise para o estágio de ninfa após um período de 18 a 26 dias. As ninfas apresentam o mesmo comportamento das larvas e, após um período de 5 a 7 dias em contato com o hospedeiro, completam seu repasto e se desprendem para realizar uma nova ecdise no solo, agora para adulto macho ou fêmea. Esse período leva entre 23 e 25 dias. No hospedeiro, o macho e a fêmea realizam a cópula e após o repasto sanguíneo, as fêmeas ingurgitadas se desprendem e cerca de 7 a 10 dias depois, ovipõem e iniciam um novo ciclo (Pereira e Labruna 1998) (Figura 2).

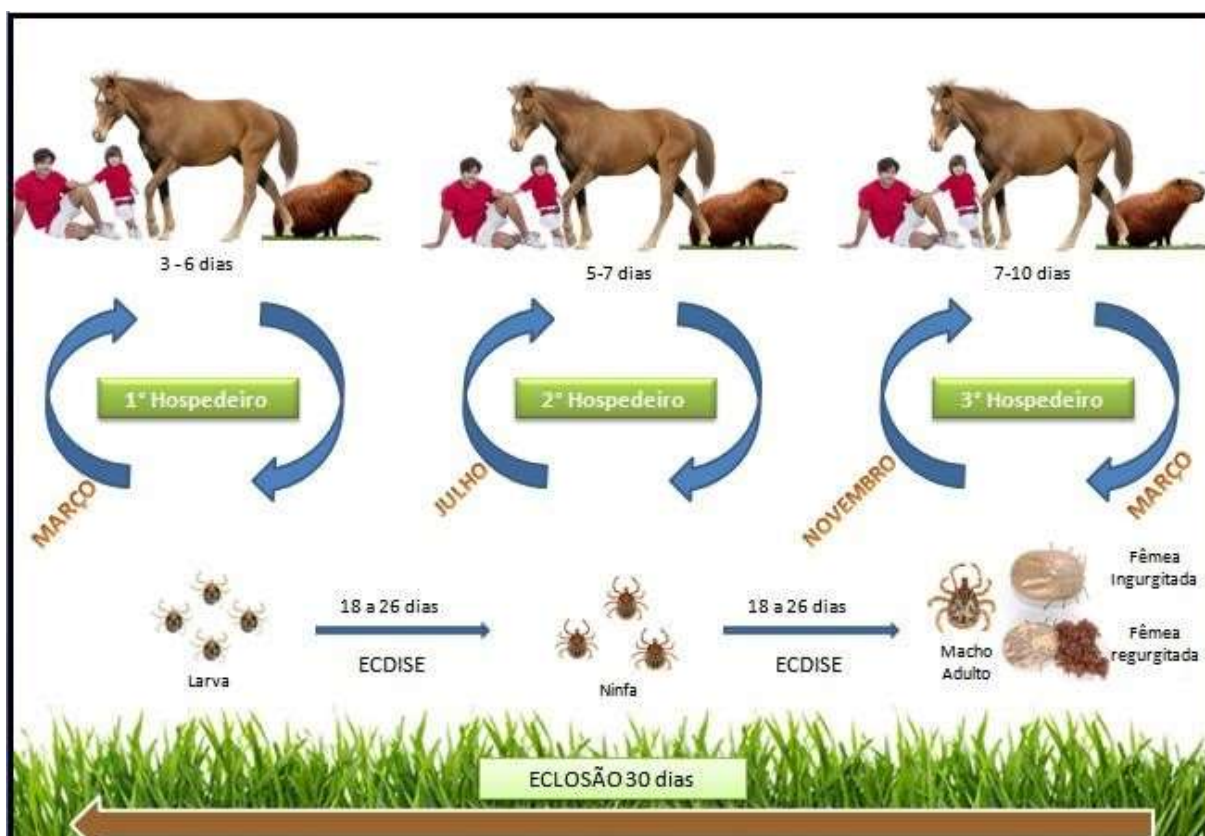


Figura 2: Ciclo biológico de *A. sculptum* (Abreu, 2018).

1.3.2. Distribuição e epidemiologia

Espécimes coletados na cidade de Cayena, na Guiana Francesa, foram inicialmente descritas como *Amblyomma cajennense* (Fabricius 1787) e pertencentes à família Ixodidae. Inicialmente, essa espécie foi descrita como distribuída por toda a América desde o sul dos Estados Unidos, passando pela América Central e chegando ao norte da Argentina (Barros-Battesti, Arzua e Bechara 2006; Estrada-Peña, Guglielmone e Mangold 2004) (Figura 3). Recentemente, análises morfológicas e moleculares propuseram o agrupamento de seis espécies distintas, sendo cada espécie relacionada a uma área biogeográfica, no que seria chamado

complexo *A. cajennense*, conhecido por *A. cajennense* sensu lato (Beati *et al.* 2013; Estrada-Peña *et al.* 2014; Nava *et al.* 2014).



Figura 3: Distribuição geográfica conhecida das espécies pertencentes ao complexo *A. cajennense* sensu lato nas Américas. O mapa mostra a localização geográfica conhecida de todas as espécies incluídas até então no complexo *A. cajennense* sensu lato. Os pontos representam os registros de espécimes consideradas no estudo de Estrada-Peña *et al.* (2004).

A ocorrência de pelo menos duas espécies de carrapatos pertencentes ao complexo *A. cajennense* foi mostrada no Brasil por Martins (2016), sendo elas *A. cajennense* sensu stricto e *A. sculptum* (Figura 4). *A. cajennense* s. s. foi encontrada sobretudo nas regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste, enquanto *A. sculptum* foi descrita em todas as regiões do país, além de ser a única espécie do complexo presente no Sudeste. Altamente associada ao clima tropical, *A. sculptum* se dissemina por áreas do Pantanal, Mata Atlântica e, sobretudo, no bioma do Cerrado onde é amplamente distribuída.

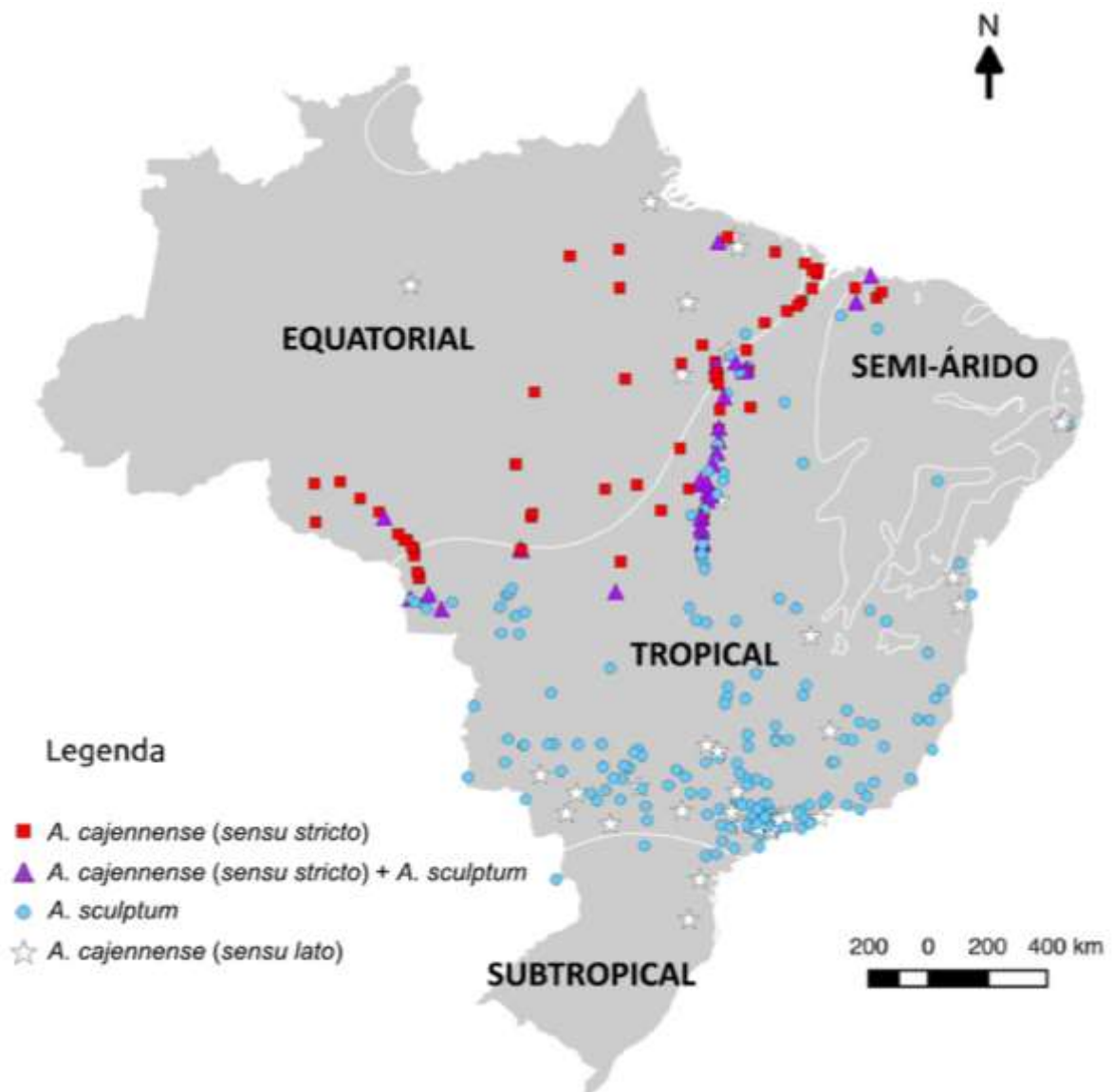


Figura 4: Distribuição geográfica das espécies de carrapatos pertencentes ao complexo *A. cajennense* sensu lato no Brasil. O mapa mostra a localização dos carrapatos *A. cajennense* (sensu stricto) e *A. sculptum* além da localização de *A. cajennense* (sensu lato) identificados nas quatro regiões climáticas brasileiras. Adaptado de Martins *et al.* (2016).

Acredita-se que a dispersão por pequenos hospedeiros está relacionada com a larga distribuição horizontal de *A. sculptum* em áreas de cerrado (Pajuaba Neto *et al.* 2018). Também se observa uma alta prevalência da espécie em regiões urbanas e periurbanas, em áreas verdes e sombreadas, devido principalmente à disponibilidade de hospedeiros, como as capivaras, já que esses hospedeiros preferenciais são eficazes na manutenção do ciclo do carrapato (Queirogas *et al.* 2012).

Os relatos de identificação de *A. sculptum* têm se tornado mais abundante em áreas urbanas e periurbanas apesar de ainda ser mais comum em áreas rurais. Esta expansão para áreas mais próximas do homem é favorecida pela presença de animais hospedeiros em parques muito frequentados e pela proximidade do homem com animais como cães e cavalos que transitam entre as áreas urbanas e silvestres infestadas, o que se agrava pela ocupação desordenada do espaço urbano (Szabó, Pinter e Labruna 2013). O alto índice de parasitismo observado em pessoas também se relaciona ao fato de *A. sculptum*, que mistura busca ativa e acesso ao hospedeiro por “emboscada”, ser mais agressivo e menos exigente nas fases de larva e ninfa que outras espécies de carrapatos. Esse número é consideravelmente maior que para outras espécies da mesma região, como *A. dubitatum*, por exemplo, que é uma espécie de carrapato adaptada a capivaras (Pajuaba Neto *et al.* 2018; Ramos *et al.* 2017). Assim todos estes fatores contribuem para o aumento do risco para Febre Maculosa Brasileira (Araújo, Navarro e Cardoso 2016).

1.3.3. Dispersão, locomoção e sobrevivência de carrapatos

A capacidade de dispersão e tempo de sobrevivência são importantes fatores que moldam comportamento e dinâmica populacional dos carrapatos. Esses fatores sofreram enormes pressões evolutivas, uma vez que constituem elementos importantes para conseguir se alimentar em um hospedeiro e sobreviver em condições naturais (Buczek *et al.* 2017). Carrapatos que se dispersam mais e sobrevivem por mais tempo têm mais chances de encontrar hospedeiros para se alimentar, transmitir agentes patogênicos e, conseqüentemente, de manter o ambiente infestado. Estes fatores também influenciam a dinâmica populacional dos carrapatos, uma vez que eles passam mais de 90% de sua vida no ambiente e a maior mortalidade de espécimes ocorre durante o período não parasitário devido a fatores abióticos (Randolph 2014). Além disso, são eles que vão determinar a extensão da área infestada e,

consequentemente, a área de ocorrência de doenças causadas por patógenos veiculados por carrapatos (Qviller *et al.* 2016).

A dispersão dos carrapatos envolve principalmente a locomoção passiva pelos hospedeiros e a locomoção ativa realizado através de caminhadas (Qviller *et al.* 2016). A locomoção passiva constitui a principal forma de dispersão, uma vez que carrapatos se fixam ao hospedeiros e retornam para o ambiente em qualquer local onde houve circulação do hospedeiro (Qviller *et al.* 2016). A locomoção ativa também pode auxiliar na dispersão de carrapatos, porém sua maior contribuição é de forma indireta. De forma geral, a locomoção ativa dos carrapatos é feita basicamente para buscar um hospedeiro e, em seguida, retornar para um abrigo onde as condições ambientais são mais favoráveis. Desta forma, quanto maior a locomoção ativa de uma espécie de carrapato, maior a chance de encontrar o hospedeiro e ser transportado passivamente (Carroll e Schmidtman 1996).

Para a busca por hospedeiros, os carrapatos possuem dois tipos principais de comportamento: o comportamento de emboscada (do inglês "Ambush behavior") e o comportamento de caça (do inglês: "Hunter behavior") (Sonenshine 1991). O comportamento de emboscada é caracterizado pelo ato de escalar arbustos e permanecer em um ponto vantajoso para o encontro de um hospedeiro. Já o comportamento de caça é caracterizado por incursões periódicas rápidas para fora do local onde estão escondidos em direção ao hospedeiro, mediante algum estímulo (Sonenshine 1991). Independente da estratégia utilizada no encontro dos hospedeiros ou na sobrevivência é notório que a capacidade de locomoção dos carrapatos vai influenciar diretamente seu sucesso e, consequentemente sua dispersão no ambiente e sobrevivência (Loye e Lane 1988). Carrapatos que tem mais capacidade de se locomover, poderão repetir mais vezes os comportamentos de busca pelo hospedeiro, seja ele por emboscada ou caça, e terão mais capacidade de encontrar abrigos com condições favoráveis à sobrevivência (Ramos *et al.* 2017).

Outros fatores ambientais também influenciam a locomoção dos carrapatos. Os mais importantes são aqueles que estão diretamente ligados à procura por condições ambientais mais favoráveis à sobrevivência como abrigo de raios solares, temperaturas mais amenas e umidade mais alta. Trabalhos anteriores com *Rhipicephalus (boophilus) microplus* mostraram que larvas tendem a se deslocar menos para o topo de gramíneas no verão em relação ao inverno (Furlong, Chagas e Nascimento 2002). *Ixodes ricinus* tende a se deslocar para locais com mais umidade relativa no ar e este comportamento é mais intenso em espécimes com maior estresse hídrico (Crooks e Randolph 2006). Outro fator que influencia diretamente a locomoção é a sazonalidade, característica que é marcante em determinadas espécies. A estação do ano é um

dos fatores que mais influenciaram *Dermacentor reticulatus* a se dispersar. As distâncias foram consideravelmente maiores na primavera em relação ao outono (Buczek *et al.* 2017).

Apesar de sua importância, poucos trabalhos se dedicaram a avaliar a capacidade de locomoção de carrapatos. Os trabalhos existentes na literatura tiveram maior enfoque na avaliação da dispersão ou no comportamento de locomoção frente a diferentes estímulos, mas não na capacidade (Alekseev *et al.* 2000; Buczek *et al.* 2017; Gray 1985; Koch e Mcnew 1982; McMahon e Guerin 2002; Oliveira *et al.* 2000). Para algumas espécies, como *I. ricinus*, a locomoção horizontal está limitado a apenas alguns centímetros na maior parte da estação ativa dos espécimes (Crooks e Randolph 2006; Perret *et al.* 2003). *D. reticulatus*, em condições naturais, também foi capaz de dispersar somente curtas distâncias, apenas a média de 60 cm (Buczek *et al.* 2017). Em condições naturais, ninfas de *I. scapularis* se dispersaram por uma distância de apenas 2 a 3 metros em 2 a 3 semanas e adultos por 5 a 6 metros em 3 a 4 semanas (Carroll, Mills e Schmidtman 1996). Entretanto, os autores estimam que a capacidade de locomoção é maior que a área de dispersão, pois não acontece em linha reta (Buczek *et al.* 2017).

A. sculptum é uma espécie conhecida por apresentar um comportamento agressivo, uma vez que usa tanto emboscada quanto caça como estratégias para encontrar um hospedeiro, além de responder a estímulos diversos. Entretanto, sua capacidade de locomoção ainda é desconhecida. Sua determinação poderia auxiliar em um maior entendimento dos fatores envolvidos em sua dispersão e também de risco de infecção por patógenos por ele transmitidos.

1.4. Controle de carrapatos

Os acaricidas químicos são a base do controle das infestações por carrapatos atualmente. Arsênico já era utilizado para combater os parasitos desde o final do século XIX e em meados dos anos 40 os organoclorados foram usados em massa (George 2006). Por serem muito tóxicos para animais, houve uma busca constante por novos produtos para se evitar os efeitos colaterais desses compostos. A partir de então, foram introduzidas novas classes de acaricidas como, por exemplo, amidínicos, piretróides sintéticos, fenilpirazólicos e as lactonas macrocíclicas que são menos tóxicos para mamíferos e possuem melhor eficácia no combate aos carrapatos. Contudo, a cada ano aumenta a preocupação com os níveis de contaminação do ambiente e dos produtos de origem animal, mesmo com os avanços obtidos com os novos compostos, o que se soma à perda de eficácia pela seleção de populações de carrapatos resistentes às bases usadas (Furlong e Martins 2000). Este cenário resultou num desafio para a

pecuária brasileira, uma vez que em muitos lugares a maioria desses produtos já não é mais eficaz no controle dos carrapatos. Esse problema é agravado pela grande dificuldade de desenvolvimento de novas drogas, pois esse processo é longo e dispendioso (De La Fuente *et al.* 2007).

O uso indiscriminado e sem conhecimento técnico prévio de produtos acaricidas para o controle dos carrapatos ainda pode levar à contaminação do solo e fontes de água. Além disso, a necessidade de mão de obra qualificada, também é um fator negativo em relação ao seu uso exclusivo para o controle (Jongejan e Uilenberg 1994). Para sobrepor esses problemas, nos dias atuais, idealiza-se o controle químico integrado com formas de controle alternativas, como manejo das áreas de pastagem com a diminuição da cobertura vegetal utilizando corte e aragem, vacância da pastagem por período superior à sobrevivência dos carrapatos ou introdução de espécies resistentes ao parasito (De Castro 1997).

O controle biológico também se mostra como uma alternativa aos acaricidas tradicionais. O uso de fungos patogênicos como *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* apresenta eficácia na eliminação dos parasitos, chegando a levar à mortalidade 100% de ninfas de *A. sculptum* em condições de laboratório (Lopes *et al.* 2007). Em adição, extratos vegetais menos nocivos aos animais e ao ambiente também vêm sendo testados em alternativa aos acaricidas tradicionais (Benelli *et al.* 2016). Entretanto, ainda faltam estudos para que uma formulação seja disponibilizada e usada em larga escala contra carrapatos.

A imunização dos animais também é uma medida que poderia ser integrada a outros métodos a fim de otimizar os resultados do controle. Há mais de quarenta anos são realizados estudos em busca de antígenos que possam ser utilizados em vacinas contra carrapatos (Roberts, 1968). Proteínas relacionadas à detoxificação de heme, proteínas presentes e/ou transportadas para os ovos, proteínas salivares e intestinais, além de várias outras já foram testadas (Merino *et al.* 2013; Guerrero, Miller e De León 2012; Parizi *et al.* 2009, 2012; Willadsen 2004). Atualmente, encontram-se disponíveis comercialmente apenas três vacinas sob os nomes TickGARD®^{Plus}, Gavac® e Ixovac®, sendo que todas têm como base o antígeno oculto BM86, uma glicoproteína intestinal de *R. microplus* (Canales *et al.* 1997; Willadsen *et al.* 1989). Também foram realizados estudos para a produção de vacinas multiantigênicas (Parizi *et al.* 2012) que buscam maior abrangência e com isto melhores resultados contra *R. microplus*.

A maior parte dos estudos teve como enfoque o desenvolvimento de uma vacina para o carrapato dos bovinos *R. microplus* e pouca atenção foi dada a outras espécies de carrapato. Dentre os poucos trabalhos desenvolvidos, Costa (2019) identificou quatro antígenos que apresentaram resultados promissores contra *A. sculptum*. Três desses antígenos foram

obtidos de moléculas salivares e foram chamados AsKunitz (AsKn), AsBasicTail (AsBT) e As8,9KDa (As8,9), que se referiam às famílias as quais eles pertenciam. O quarto antígeno foi produzido utilizando 22 epítomos provenientes de sete moléculas transmembrana expressas no epitélio intestinal e foi assim chamado de AsQuimera (AsQui). Os antígenos salivares foram caracterizados como inibidores de serino protease e apresentaram atividade sobre a cascata da coagulação, a cascata do sistema complemento e sobre tripsina bovina. Ensaio vacinais, realizados com os antígenos em camundongos, demonstraram resultados promissores contra fêmeas de *A. sculptum* com eficácias de 85,3, 92,9 e 80,8% para AsKn, As8.9 e AsQui, respectivamente. O antígeno AsBT apresentou eficácia de apenas 59,5% contra fêmeas, porém foi capaz de induzir 100% de mortalidade em ninfas de *A. sculptum* durante a alimentação. Os antígenos AsKn e As8.9 também foram efetivos contra ninfas induzindo taxas de mortalidade 70 e 100%, respectivamente. Entretanto, novos estudos devem ser feitos com esses antígenos a fim de confirmar sua eficácia e desenvolver formulações com resultados mais promissores contra o carrapato *A. sculptum*.

2. JUSTIFICATIVA

A. sculptum apresenta grande relevância para a medicina veterinária e saúde pública no Brasil. Na medicina veterinária, o rodoleiro é responsável por consideráveis prejuízos relacionados principalmente à espoliação sanguínea, que leva à queda na produção, predisposição a diversas doenças e gastos com mão de obra e medicamentos. Para a saúde pública, o carrapato estrela é o principal carrapato associado aos humanos e o principal vetor do agente causador da Febre Maculosa Brasileira (FMB). A importância em saúde pública vem se agravando pelo aumento de infestações descritas em áreas urbanas e periurbanas e o crescente número de casos de FMB. Um maior conhecimento sobre sua capacidade de locomoção poderia auxiliar a entender melhor a capacidade de dispersão da espécie e os mecanismos usados para se infestar novas áreas. Apesar de sua importância, poucos estudos têm sido realizados a fim de melhor entender e estimar sua capacidade de dispersão no ambiente e de se desenvolver novas ferramentas para auxiliar no seu controle. O desenvolvimento de novas formulações vacinais contra *A. sculptum* poderiam criar métodos alternativos de controle que possam ser utilizados isoladamente ou em conjunto com os métodos atuais a fim de se obter um controle cada vez mais eficiente em regiões infestadas. Todavia, até o momento, existem apenas três vacinas disponíveis comercialmente contra carrapatos, sendo todas contra a espécie *R. microplus*. Essas vacinas são baseadas no mesmo antígeno, uma glicoproteína intestinal chamada de BM86. O mecanismo de ação dessas vacinas ainda não é totalmente conhecido, mas sabe-se que o sistema complemento tem um papel importante em sua efetividade. Seguindo uma linha de raciocínio baseada no mecanismo efetor da BM86, alguns trabalhos foram desenvolvidos na tentativa de desenvolver uma vacina que possa ser usada contra *A. sculptum*. Motivado por resultados anteriores, no presente trabalho são combinados dois, três ou quatro antígenos no intuito de aumentar a eficácia no controle de *A. sculptum*. Tem-se, também a proposta de um antígeno ativando o sistema complemento e os demais coibindo a ação dos inibidores, fazendo com que o complemento seja ativado em maior nível e aja livremente no intestino. Esse foi o motivo de todas as formulações intestinais conterem o antígeno rAsQuimera, associado aos outros antígenos.

3. CAPÍTULO 1 - Capacidade e características da locomoção de ninfas de *A. sculptum* em condições de laboratório

3.1. Objetivos

3.1.1 Objetivo geral

- Avaliar a capacidade e as características da locomoção de ninfas do carrapato estrela (*Amblyomma sculptum*) em condições de laboratório.

3.1.2. Objetivos específicos

- Descrever a distância total percorrida durante a locomoção de ninfas de *A. sculptum* em condições de laboratório;
- Descrever o tempo total de locomoção durante a locomoção de ninfas de *A. sculptum* em condições de laboratório;
- Descrever as mudanças de sentido ao longo da locomoção de ninfas de *A. sculptum* em condições de laboratório;
- Aferir a velocidade de locomoção de ninfas de *A. sculptum* em condições de laboratório;
- Avaliar o perfil da locomoção de ninfas de *A. sculptum* ao longo do seu período de vida;
- Avaliar a influência da locomoção diária na sobrevivência de ninfas de *A. sculptum*;
- Confirmar a inexistência da sazonalidade nas características da locomoção de ninfas do carrapato *A. sculptum* mantidas e testadas em condições de laboratório.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Manutenção da colônia de *A. sculptum* em laboratório

Para a manutenção da colônia de *A. sculptum*, os carrapatos foram mantidos em incubadora BOD em condições de temperatura e umidade controladas ($28 \pm 2^\circ\text{C}$ e $90 \pm 5\%$ de umidade) sem iluminação. A manutenção do ciclo ocorreu através da alimentação de larvas, ninfas e adultos em camundongos da linhagem Swiss de acordo com a metodologia de (Bouchard e Wikel 2005). Seguindo esta metodologia, os carrapatos de vários estágios de desenvolvimento foram colocados nas câmaras fixadas nos camundongos que foram tampadas em seguida. As câmaras foram confeccionadas a partir de tubos cônicos de polipropileno de 1,5 mL cortados em aproximadamente 1,5 cm abaixo da tampa. As tampas foram separadas dos tubos e perfuradas para permitir a saída do excesso de umidade. As câmaras foram afixadas com adesivo de contato (Brascoplast Standard, Brascola Ltda, Santa Catarina, Brasil) no dorso e após 24 horas da fixação das câmaras, as larvas, ninfas ou os casais de adultos foram colocados dentro delas e tampadas, que eram verificadas diariamente. Após o término da alimentação, os espécimes foram retirados e mantidos em estufa BOD nas condições mencionadas acima.

4.2. Grupos experimentais

Foram separadas larvas de *A. sculptum* recém desprendidas em camundongos. Após aproximadamente 15 dias ocorreram as ecdises e foram coletadas todas aquelas que realizaram ecdises em um mesmo dia. As ninfas não alimentadas experimentais foram mantidas em tubos de microcentrifuga de polipropileno (eppendorf®) de 500 μL , com orifícios na tampa para ventilação e papel filtro internamente. As ninfas foram separadas em dois grupos (teste e controle) e foram mantidas em condições de temperatura ($28 \pm 2^\circ\text{C}$) e umidade controladas ($90 \pm 5\%$ de umidade) em estufa BOD sem iluminação. As ninfas teste foram utilizadas nos experimentos de locomoção e foram retiradas das condições descritas anteriormente somente durante os ensaios. As ninfas controle também eram retiradas da estufa e expostas às mesmas condições de iluminação, temperatura e umidade; contudo não realizavam a caminhada pelo barbante. O experimento foi realizado em duplicata, sendo o primeiro grupo formado por 37 ninfas (10 testes e 27 controles) que sofreram ecdise no dia 26/11/2017 (experimento realizado predominantemente no verão) e o segundo com 41 ninfas (10 testes e 31 controles) que

mudaram no dia 05/06/2018 (experimento realizado predominantemente no inverno). Os ensaios de locomoção tiveram início quando as ninfas tinham 20 dias de ecdise e, concomitantemente, tivera início a observação do grupo controle para avaliação da sobrevivência. Utilizaram-se neste estudo larvas de 20 dias para garantir que as mesmas tivessem interesse em buscar por alimento.

4.3. Ensaios de locomoção

As ninfas foram colocadas individualmente, com auxílio de um pincel, em um barbante inclinado a 70° em relação a uma superfície plana, afixado em um aparato de locomoção (Figura 5). O experimento foi realizado em aparato que pudesse simular um arbusto com altura próxima de 50 cm. A inclinação se relaciona com o próprio peso destes arbustos que normalmente não são retos ou se inclinam com o vento. Além do mais, os carrapatos em local plano apresentam movimento erráticos difíceis de serem medidos sem equipamentos caros. A superfície exposta do barbante era de 42 cm de comprimento podendo ser recolhida ou estendida com auxílio de uma manivela. Cada uma das ninfas poderia caminhar livremente para cima ou para baixo e se caísse seria colocada de volta ao barbante.

O início e o fim de cada locomoção eram marcados com caneta *hidrocor* que não apresentou nenhum efeito aparente como estímulo ou repelente nos carrapatos testados previamente em ensaios piloto ou durante o experimento. Os ensaios foram realizados com as ninfas uma vez por dia com início as sete horas. Cada ensaio individual era encerrado quando a ninfa caía pela terceira vez ou quando permanecia imóvel por 90 segundos. Todos os experimentos foram realizados em ambiente controlado de laboratório, com temperatura de $28 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidade de $60 \pm 5\%$, com iluminação branca artificial de teto. Durante a realização dos ensaios, apenas o avaliador era mantido na sala experimental com propósito de prevenir ao máximo a ocorrência de estímulos que pudessem interferir nos resultados como vibração, barulho, variação de luminosidade ou odores. O barbante só era manipulado com luvas e o trecho em que uma ninfa caminhava não era utilizado novamente, sendo eliminado após a medição.

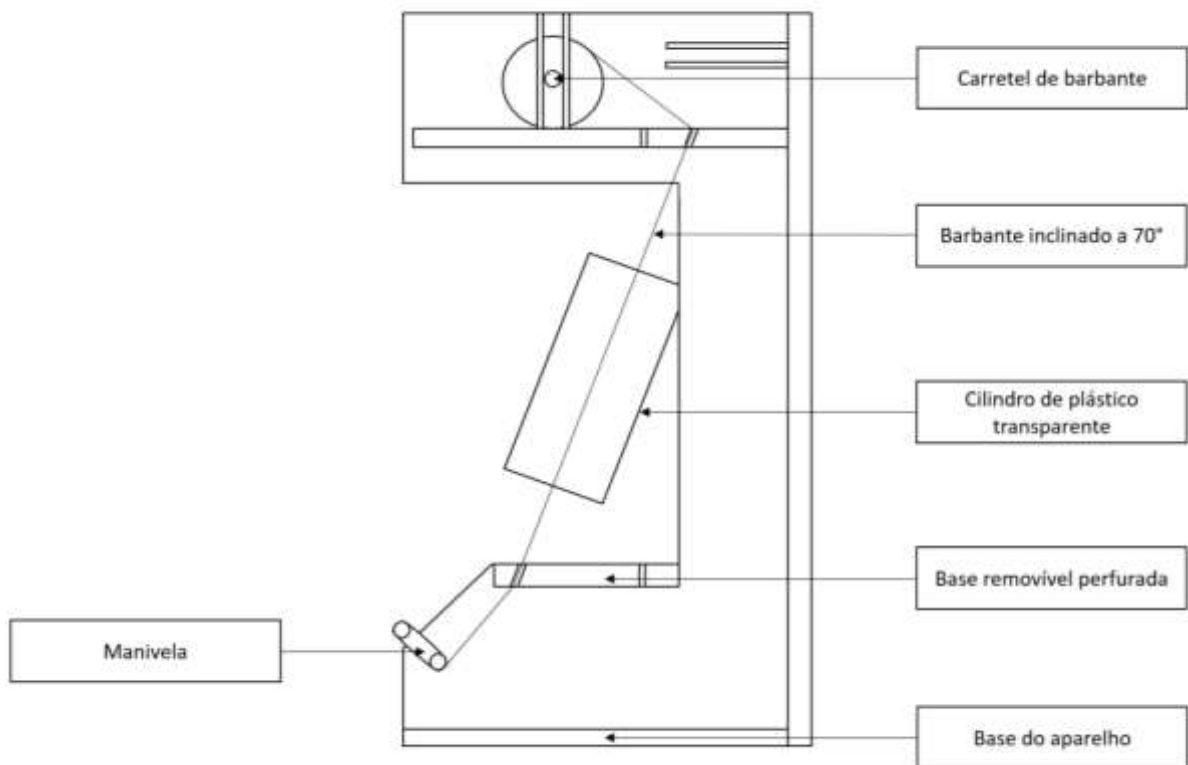


Figura 5: Desenho esquemático do aparato experimental. Planejado e construído pelo autor deste estudo para avaliação diária da locomoção de ninfas de *A. sculptum* em condições de laboratório. O cilindro transparente não toca o barbante e protege o animal da ação do deslocamento de ar.

4.4. Construção das figuras e análise estatística dos dados

Os dados obtidos foram transferidos para planilhas dos softwares Excell e GraphPad Prism 7.0, depois analisados e representados pela média $\pm$ erro padrão ou média $\pm$ desvio padrão. A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste Kolmogorov-Smirnov. Apesar de quase todas as variáveis terem sido classificadas como paramétricas, a média e os quartis também foram representados para viabilizar a comparação com dados da literatura. A associação entre variáveis foi analisada por Regressão Linear. Diferenças estatísticas entre as curvas de sobrevivência foram avaliadas pelo teste de Log-rank. Os dados dos grupos em diferentes estações foram analisados pelo Teste T e pelo ANOVA com medidas repetidas seguido do teste de Bonferroni. O nível de significância considerado foi $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Parâmetros de locomoção de ninfas de *A. sculptum* em condições de laboratório

O deslocamento de ninfas de *A. sculptum* no aparato construído para os experimentos mostrou um comportamento marcante durante a locomoção. As ninfas começaram a andar assim que colocadas no barbante do aparato. Elas geralmente andavam em linha reta para cima até um momento em que mudavam de sentido e desciam. As ninfas mantinham esse comportamento (caminhando em linha reta seguida de mudança de sentido para cima e para baixo) até quando ficavam aparentemente "cansadas" ou "entediadas", cessando o “questing”, ou quando simplesmente se soltavam do barbante e caíam. Quando elas eram colocadas novamente no barbante, o comportamento fora relativamente semelhante, com a diferença que elas cessavam o “questing” mais rapidamente, andando menos e caindo mais cedo. Após a terceira queda, a maioria das ninfas não andava mais no barbante, se encolhendo, ou andavam apenas por distâncias mais curtas, entrando em repouso (ou quiescência). Esse foi o motivo de termos decidido encerrar o experimento quando as ninfas caíam pela terceira vez.

Para obter uma visão geral das características da locomoção em condições de laboratório, vários parâmetros foram medidos (Tabelas 1 - 3). As ninfas de *A. sculptum* foram capazes de caminhar ao longo de suas vidas por distâncias médias de 110,3 metros. A capacidade de locomoção foi variável entre os espécimes, com algumas ninfas caminhando acima de três vezes mais que outras (Tabela 1). A locomoção não ocorreu em um sentido único e as ninfas mudaram o sentido da rota (para baixo e para cima) em média 142 vezes ao longo do período de caminhada. O sentido do movimento foi o parâmetro com a maior variação observada entre os indivíduos, pois alguns mudaram mais de cinco vezes em relação a outros (Tabela 1). As ninfas percorreram distâncias mais longas (quase três vezes mais) para cima do que para baixo (Tabela 1).

Para o cálculo da velocidade (V) utilizou-se a fórmula:

$$V = \frac{d}{t},$$

onde d é a distância percorrida e t é o tempo gasto. A locomoção ocorreu a uma velocidade média de 9,1 cm / min e as ninfas permaneceram em experimento por 19,1 horas ao longo de sua vida (Tabela 1). A velocidade e o tempo de caminhada também apresentaram grande variação entre as ninfas, de modo que a ordem de magnitude para algumas ninfas foi quase três vezes maior (Tabela 1). Quando as características da locomoção foram analisadas em cada dia

experimental (DE), as ninfas caminharam em média 1,8 m / DE (Tabela 2), sendo a distância entre 0,6 e 2,5 m / DE a mais frequente (em 47,5% dos DE) (Figura 6A). A maioria das ninfas mudou de sentido de 1 a 6 vezes (54,9%) (Figura 6B) e a distância percorrida para cima / DE foi quase três vezes maior que a distância percorrida para baixo / DE (Tabela 2).

Tabela 1: Capacidade de locomoção e características da caminhada de ninfas de *A. sculptum* em condições e laboratório.

Parâmetro	Media $\pm$ DP	Mediana (1°-3° quartil)	Mínimo- Máximo
Distância (m)	110,3 $\pm$ 34,0	118,4 (78,8-132,1)	55,8-169,1
Distância para cima (m)	79,6 $\pm$ 23,5	72,6 (61,0-98,5)	47,3-120,3
Distância para baixo (m)	27,7 $\pm$ 16,3	26,0 (15,8-35,4)	5,9-58,4
Duração (horas)	19,1 $\pm$ 4,4	19,4 (15,2-23,4)	11,8-26,2
Velocidade (cm/min)	9,1 $\pm$ 2,4	9,4 (4,6-10,8)	4,6-12,8
Mudança de sentido	142 $\pm$ 58	142,5 (102,8-174,5)	51-286

Tabela 2: Distância de locomoção e mudança de sentido por dia experimental (DE) de ninfas de *A. sculptum* em condições de laboratório.

Parâmetro	Media $\pm$ DP	Mediana (1°-3° quartil)	Mínimo - Máximo
Distância (m/DE)	1,8 $\pm$ 1,8	1,4 (0,4-2,6)	0,0-15,4
Distância para cima (m/DE)	1,3 $\pm$ 1,2	1,2 (0,2-1,9)	0,0-8,9
Distância para baixo (m/DE)	0,5 $\pm$ 0,7	0,13 (0,0-0,7)	0-6,2
Duração (min)	18,9 $\pm$ 16,4	15 (7-25)	1,5-120
Mudança de sentido/DE	2,6 $\pm$ 3,0	2 (0-4)	0-20

A distância que as ninfas andaram antes da mudança de sentido também foi analisada. Eles caminharam, em média, 52 cm antes de mudar de sentido e essa distância foi quase duas vezes maior para cima (62,7 cm) do que para baixo (35 cm) (Tabela 3). A maioria das caminhadas retas (60,5%) tinha entre 0,1 e 1 m, mas 12,7% foram entre 1,01 e 2 m e apenas 85 caminhadas (2,1%) foram acima de 2 m (Figura 6C).

Tabela 3: Distância de locomoção em um único sentido de ninfas de *A. sculptum* em condições de laboratório.

Parâmetro*	Média $\pm$ DP	Mediana (1°-3° quartil)	Mínimo - Máximo
Distância (cm)	52,0 $\pm$ 54,3	38 (11-75)	0-666
Distância para cima (cm)	62,7 $\pm$ 60,8	49 (15-91)	0-666
Distância para baixo (cm)	35,0 $\pm$ 35,8	24 (8-50)	0-287

*Os valores indicam a distância percorrida até a ninfa mudar de sentido.

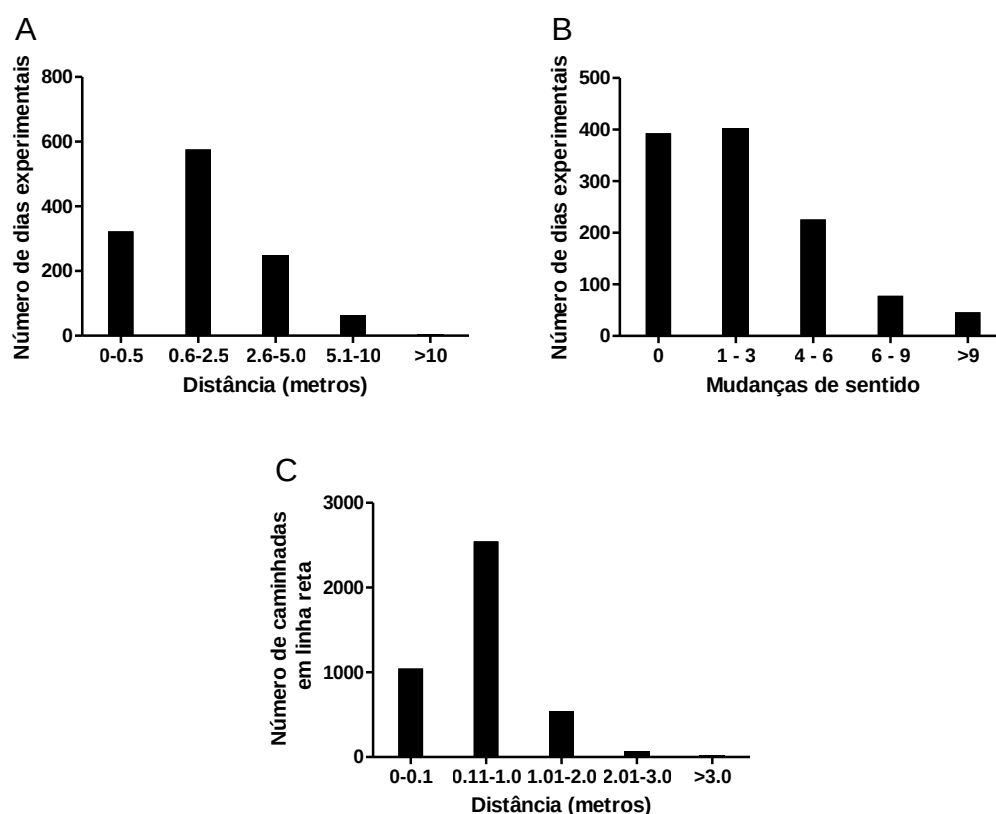


Figura 6: Histogramas da distância percorrida e mudança de sentido de ninfas de *A. sculptum*, por dia experimental, em condições de laboratório. A e B - Distância percorrida e mudança de sentido por dia experimental, C - Distância percorrida em linha reta, sem mudança de sentido.

5.2. Parâmetros de locomoção de ninfas de *A. sculptum* em condições de laboratório ao longo do período experimental

Os parâmetros de locomoção também foram avaliados ao longo do período de sobrevivência das ninfas. Todos os parâmetros (distância, duração, velocidade e mudança de sentido) mostraram uma tendência significativa ($p < 0,01$) de redução com a idade das ninfas (Figura 7). As ninfas andaram $3,4 \pm 1,5$ m / DE a uma velocidade média de $12,2 \pm 4,4$ cm / min no primeiro decil de sua vida útil, enquanto no decil 9 a distância média por DE foi 2,6 vezes menor ($1,3 \pm 0,9$ m) e a velocidade média por DE foi aproximadamente 2,2 vezes mais lenta ($5,6 \pm 2,9$ cm / min) (Figura 7A e C). A diferença para o último decil foi ainda maior (5,7 e 4,5 vezes menor para distância e velocidade, respectivamente) (Figura 7A e C), mas é importante lembrar que, neste momento, várias ninfas estavam próximas da morte e eram inativas.

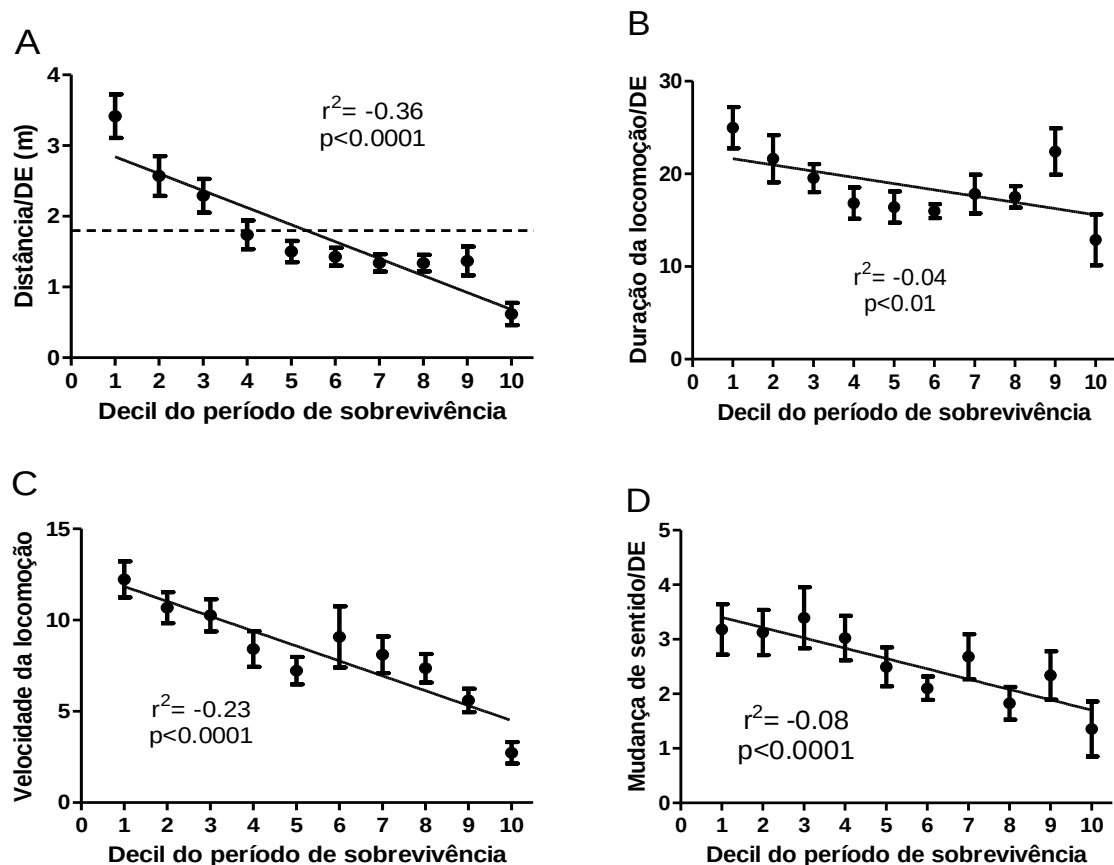


Figura 7: Influência da idade sobre os parâmetros de locomoção das ninfas de *A. sculptum* em condições de laboratório. Os valores em cada decil representam a média $\pm$ EP dos valores medidos nos dias experimentais de cada decil. DE = dia experimental. Análise estatística: regressão linear, A - $F_{1,198} = 109.6$ e $y = 3.08 - 0.24x$, B - $F_{1,198} = 8.9$ e $y = 22.3 - 0.67x$, C - $F_{1,198} = 58.8$ e $y = 12.7 - 0.82x$, e D - $F_{1,198} = 17.1$ e $y = 3.6 - 0.19x$. A linha tracejada em A representa a distância média geral.

5.3. Influência da locomoção na sobrevivência das ninfas

A locomoção afetou significativamente ($p < 0.0001$) a sobrevivência dos carrapatos (Figura 8A). As ninfas submetidas à locomoção diária sobreviveram em média 60,7 dias (mediana = 56,5 dias), enquanto a sobrevida foi três vezes maior para as ninfas mantidas inativas (média = 190,5 dias; mediana = 201 dias).

As ninfas mantidas inativas sobreviveram majoritariamente por 150 a 249 dias (72,4% das ninfas), enquanto as ninfas submetidas à locomoção diária sobreviveram principalmente por um período de 50 a 69 dias (85% das ninfas) (Figura 8B e C). Foi interessante observar a sobrevivência de uma única ninfa, que foi bastante diferente das outras, pois foi capaz de sobreviver 98 dias, 29-30 dias a mais do que as quatro ninfas que sobreviveram por mais tempo (68, 68, 69 e 69 dias). No entanto, a maior sobrevida não resultou em maior distância de locomoção, uma vez que ela percorreu 91,8 m, abaixo da média geral e diferente

da tendência observada nas outras ninfas. Quando a distância percorrida foi analisada em relação à sobrevivência (removendo a ninfa que sobreviveu por 98 dias), houve uma associação positiva significativa ($p < 0,05$) (Figura 8D) que mostrou que as ninfas que sobreviveram por um período maior também andaram por distâncias mais longas.

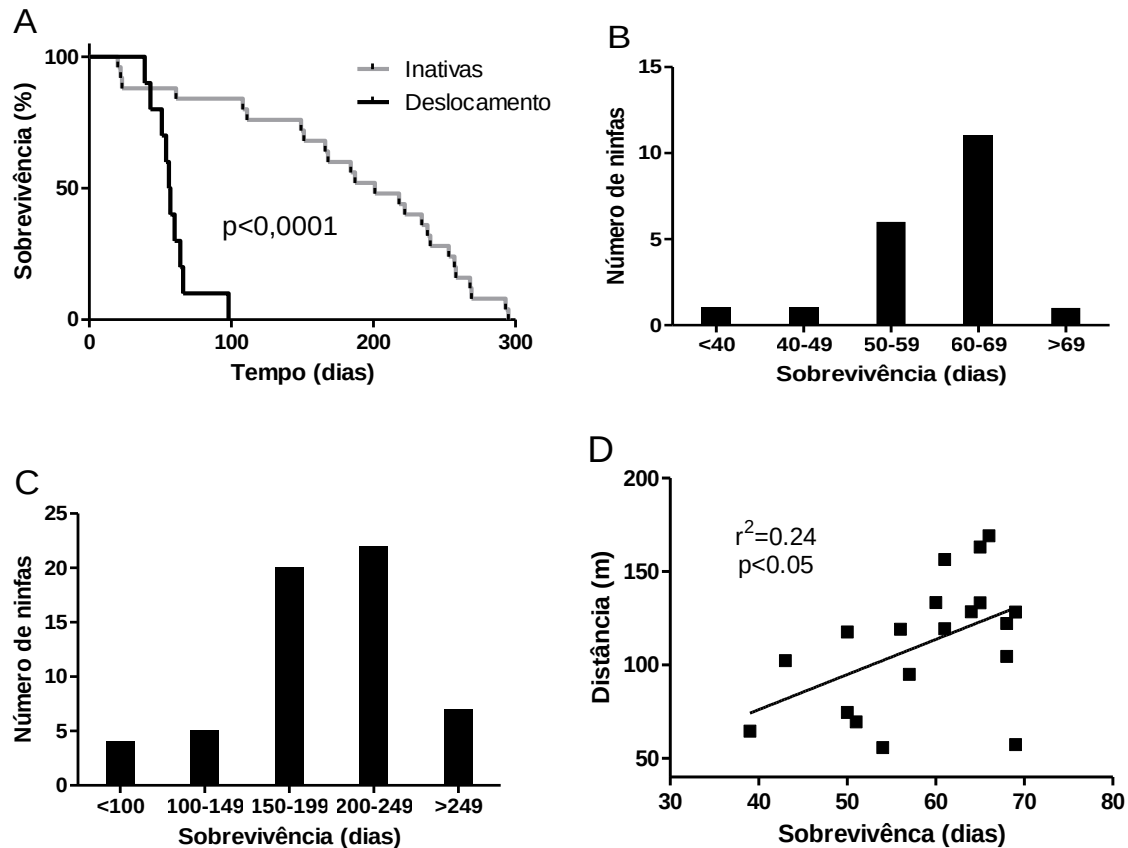


Figura 8: Efeito da locomoção na sobrevivência de ninfas de *A. sculptum*. A- Sobrevivência de ninfas mantidas inativas (mantidas em tubos de 0.5 mL com restrição de circulação) e sob locomoção diária (estimuladas a se deslocar uma vez ao dia no aparato experimental); B - Histograma da sobrevivência de ninfas submetidas à locomoção diária; C - Histograma da sobrevivência de ninfas mantidas inativas; e D - Correlação entre a sobrevivência e a distância de locomoção. Análise estatística: A: Teste de Log-rank e B: Regressão linear ($F_{1,17} = 5.2$; $y = 0.84 + 1.9x$).

5.4. Avaliação dos parâmetros de locomoção de ninfas de *A. sculptum* de experimentos realizados em diferentes estações do ano

Como *A. sculptum* é uma espécie de carrapato com sazonalidade marcante em condições naturais, o comportamento das ninfas pode variar de acordo com a época do ano. Entretanto, as ninfas usadas nos experimentos foram mantidas em incubadoras e os experimentos foram realizados em insetários, ambos com temperatura e umidade controlados de forma que as ninfas normalmente perdem a sazonalidade apresentada em condições naturais. Para confirmar a perda da sazonalidade das ninfas utilizadas, os experimentos foram realizados

em duas épocas distintas do ano, sendo o primeiro majoritariamente no verão (início em 12 de dezembro, final da Primavera, e término em meados de fevereiro, meio do Verão) e o segundo majoritariamente no inverno (início no dia 25 de junho, início do Inverno, e término no final de setembro, início da primavera). Os experimentos foram chamados aqui de acordo com a estação predominante durante sua execução (Verão e Inverno).

De forma geral, não houve diferença estatística ($p > 0,05$) em nenhum parâmetro de locomoção e sobrevivência quando os dados totais dos experimentos foram avaliados (Figuras 9 a 11), demonstrando que as ninfas perderam a sazonalidade ao serem mantidas em estufa e que a estação do ano predominante durante a execução dos experimentos, verão ou inverno, não influenciou os parâmetros de locomoção avaliados.

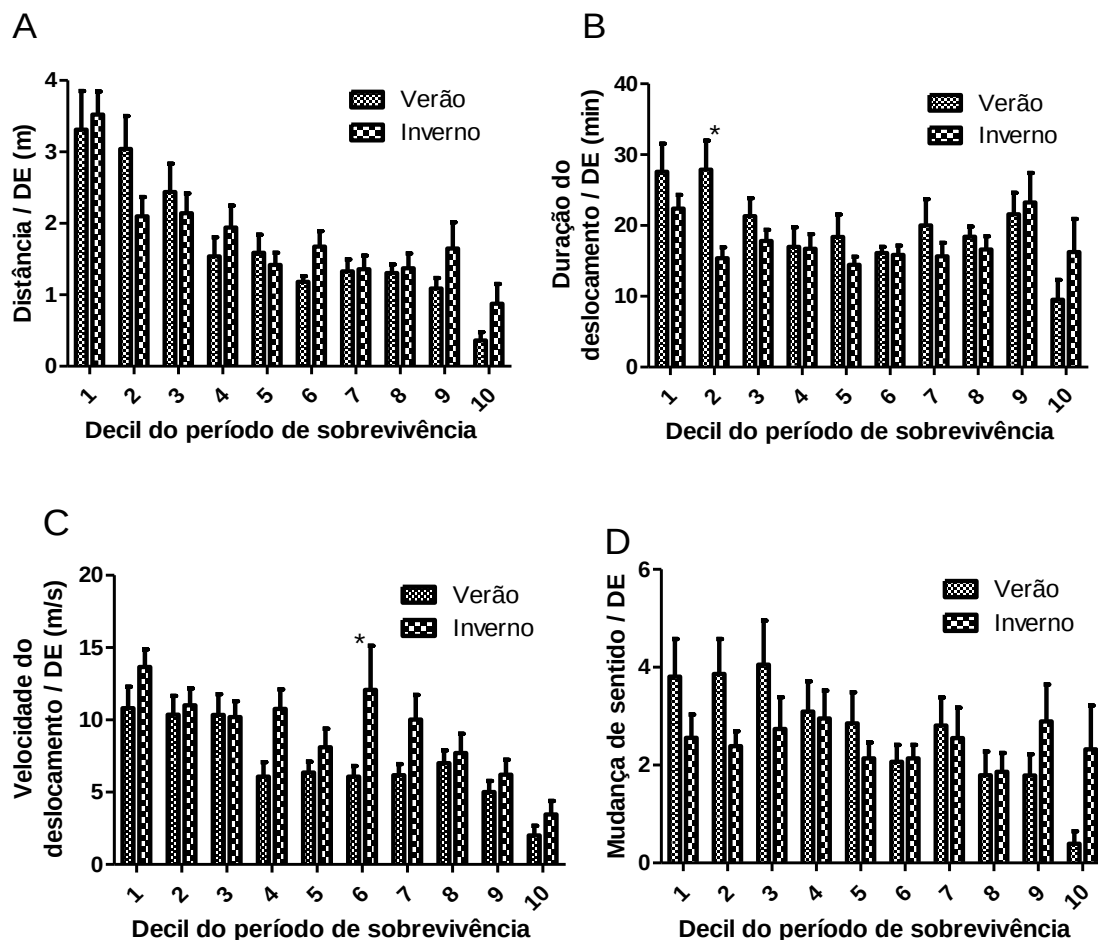


Figura 9: Influência do período experimental nos parâmetros de locomoção de ninfas de *A. sculptum* em diferentes estações do ano. Os valores de cada decil são a média $\pm$ EP dos valores obtidos em cada dia experimental (DE) de cada decil. Análise estatística: Análise de Variância com medidas repetidas (ANOVA) seguido pelo pós-teste de Bonferroni. O asterisco (*) indica diferença estatística ($p < 0.05$) entre o verão e o inverno.

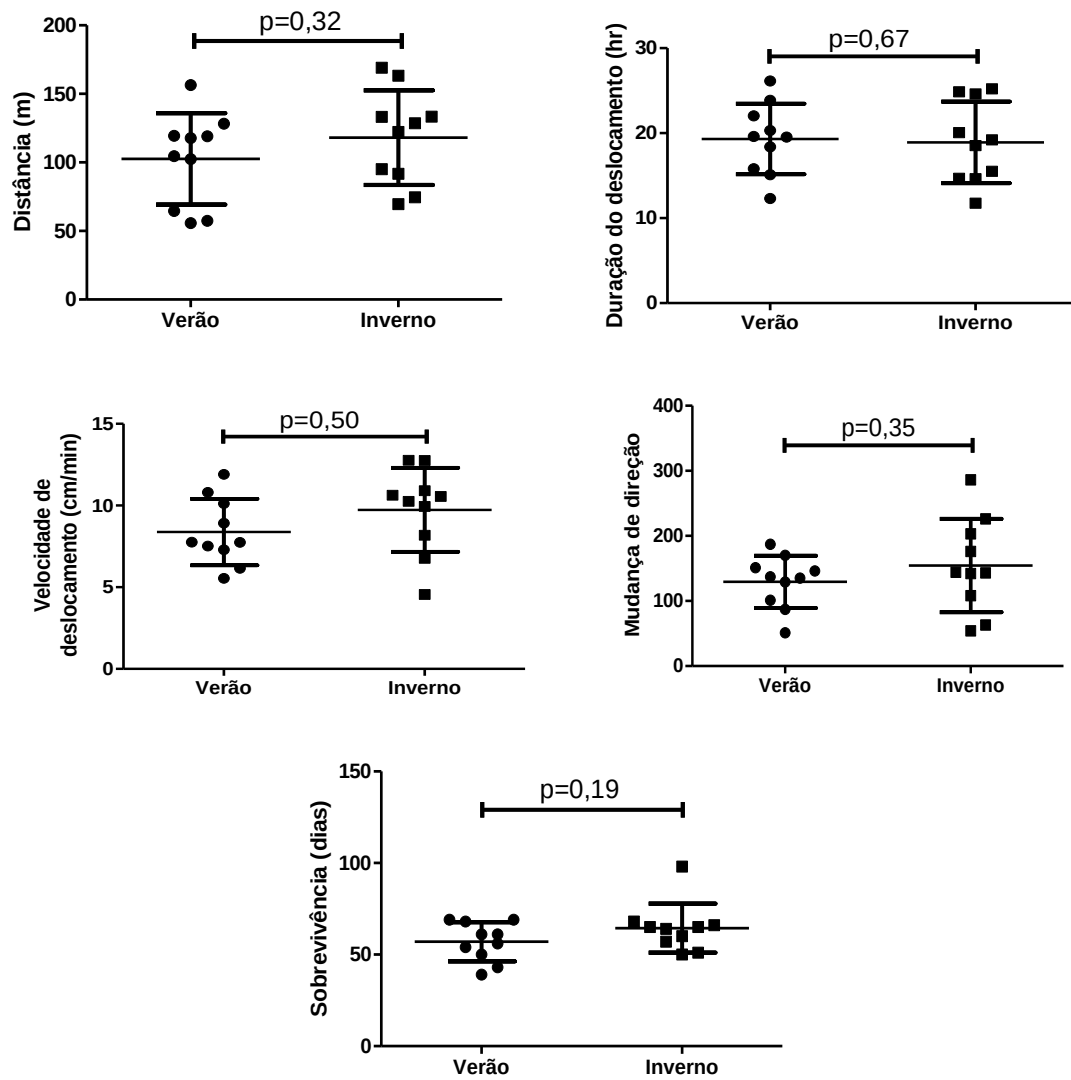


Figura 10: Influência da estação do ano nos parâmetros de locomoção de ninfas de *A. sculptum* em condições de laboratório. Análise estatística = Teste T. As barras representam a média $\pm$ DP.

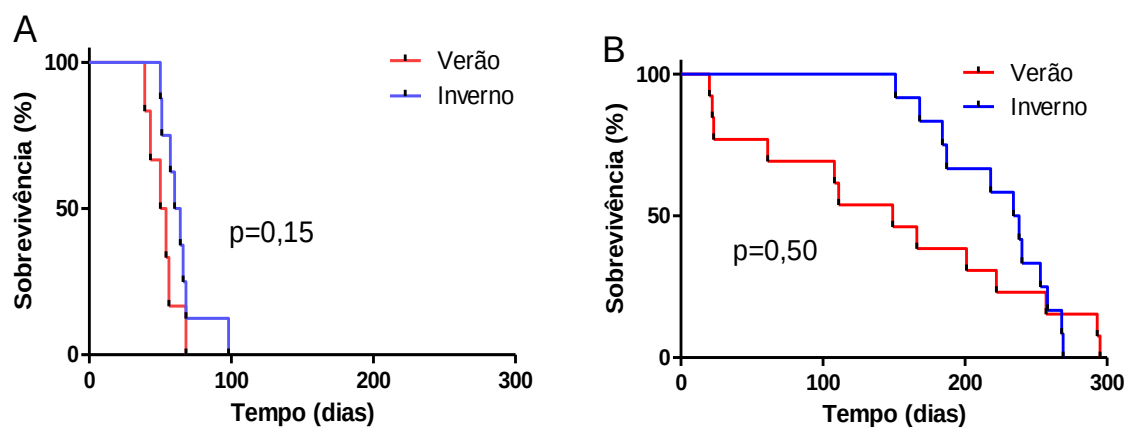


Figura 11: Sobrevivência de ninfas de *A. sculptum* mantidas em diferentes condições de locomoção durante diferentes estações do ano. A- Locomoção diária; e B - Inatividade. Análise estatística: Teste de Log-rank.

6. DISCUSSÃO

No presente trabalho estimou-se a capacidade de locomoção das ninfas de *A. sculptum*, bem como suas características em condições de laboratório. As ninfas de *A. sculptum* foram capazes de percorrer longas distâncias e caminhar por muitas horas. Distâncias superiores a 100 metros ao longo de aproximadamente 19,1 horas. No entanto, a caminhada não se deu em um único sentido, os carrapatos tendem a mudar de sentido constantemente. E esta caminhada foi realizada em distâncias médias de 1,8 m por vez. Esse comportamento mostra que sua locomoção ativa não está relacionada à dispersão no ambiente e seu perfil de locomoção sugere que, provavelmente, a principal intenção é a busca por um hospedeiro. Portanto, seria improvável encontrar *A. sculptum* se movendo ativamente entre dois pontos distantes sem a ajuda de um hospedeiro para dispersão. As afirmações de que *A. sculptum* invade residências distantes de regiões infestadas ou que é capaz de atravessar ruas, como é comum ouvir em convenções de febre maculosa brasileira, não são corroborados pelos achados do presente trabalho. A locomoção ativa pode ajudar na dispersão de *A. sculptum*, mas apenas por pequenas distâncias. Características semelhantes foram observadas para outras espécies de carrapatos que foram encontrados a certa distância do ponto de soltura, mas somente após dias ou semanas e confirmam que a dispersão por caminhadas ocorre lentamente e por curtas distâncias de cada vez. Essas afirmativas são corroboradas por dados do presente trabalho e por trabalhos da literatura (Buczek *et al.* 2017; Carroll e Schmidtman 1996).

Ao longo de um dia experimental em ambiente controlado (temperatura de 28 ± 2 °C e umidade de $60 \pm 5\%$), as ninfas andaram em média 1,8 metros durante 18,9 minutos. Essa distância e esse tempo podem indicar a capacidade de locomoção de uma ninfa até que a quiescência seja necessária. Algumas ninfas se deslocaram por mais de seis metros em um dia de experimento (DE). No entanto, esse foi um comportamento raro e a maioria das distâncias por DE foi entre 0,6 e 2,5 metros (Figura 6A).

Os resultados deste estudo ajudam a caracterizar o comportamento da locomoção de diferentes espécies. Em geral, *Ixodes* e *Dermacentor* são considerados gêneros de carrapatos que andam por curtas distâncias. Perret *et al.* (2003), em condições relativamente similares (25°C e 60% de umidade) às do presente estudo, verificaram que as ninfas de *I. ricinus* andavam por apenas 0,38 e 0,43 m (mediana) antes e após o comportamento de "questing", respectivamente. As ninfas de *I. ricinus* andaram ainda menos nos experimentos realizados por Crooks e Randolph (2006), com locomoção inferior a 14 cm. Sob condições naturais, a dispersão de *D. reticulatus* por locomoção ativa ocorreu apenas por curtas distâncias. Após 2-

3 semanas, os carrapatos foram encontrados apenas a 60 cm da área de soltura (Buczek *et al.* 2017). Além disso, as ninfas de *I. scapularis* dispersaram-se apenas por 2-3 m durante várias semanas (Carroll e Schmidtman 1996). Os autores não mediram a distância total percorrida, uma vez que é provável que a locomoção não tenha sido realizada em linha reta. Outros estudos com carrapatos do gênero *Ixodes* também encontraram caminhadas apenas por curtas distâncias (Goddard 1993; Gray 1985; Loye e Lane 1988).

Por outro lado, sabe-se que as espécies do gênero *Amblyomma* andam por distâncias consideravelmente maiores. Koch e McNew (1982) demonstraram que, usando armadilhas de CO₂, a maior parte das ninfas de *A. americanum* liberadas em uma área pode ser recuperada a uma distância de 3,1 m após algumas horas, mas apenas algumas percorrem distâncias maiores que 6 m. Wilson *et al.* (1972), em um experimento realizado por 3 dias, forma capazes de coletar *A. americanum* adultos distantes 21,3 m da área de soltura. Os achados apresentados demonstram que o *A. sculptum* tem comportamento mais semelhante aos carrapatos da espécie *A. americanum*, que são considerados carrapatos caçadores que possuem capacidade de deslocar por distâncias maiores. É também de se notar a velocidade consideravelmente mais alta do *A. sculptum* (mediana de 9,4 cm/min no presente trabalho) em comparação com *I. ricinus* (0,31 a 0,97 em diferentes condições) (Perret *et al.* 2003).

A distância percorrida em linha reta, sem mudar de sentido, também foi avaliada. Essa distância pode indicar diferentes condições: a distância do solo durante o posicionamento em um comportamento de emboscada, o que é mais provável; ou a distância percorrida em uma incursão na busca por um hospedeiro, o que é menos provável, pois não foram utilizados estímulos no presente trabalho. Na metodologia utilizada, a distância percorrida em linha reta foi de 52 cm em média. Entretanto, o principal comportamento foi de ninfas percorrendo distâncias de 62,7 cm para cima, seguidos de uma mudança de sentido e o deslocamento para baixo por 35 cm, quando elas mudavam de sentido novamente e voltavam a subir. Extrapolando essas descobertas para um possível comportamento da natureza, os dados sugerem que os carrapatos escalam arbustos e permanecem em alturas entre 62,7 e 27,7 cm, à espera de um hospedeiro. De fato, esses dados se alinham com os achados da altura que em ninfas de *Amblyomma* são encontradas em ambientes naturais. Trabalhos anteriores descreveram ninfas de *A. sculptum* encontradas a alturas entre 12 e 52 cm (Ramos *et al.* 2017) e ninfas de *Amblyomma* spp. em alturas de 30 e 40 cm acima do nível do solo (Szabó *et al.* 2009).

Com base na capacidade total de locomoção (110,3 m) e se considerando a distância diária percorrida (1,8 m) como a distância percorrida durante uma incursão em busca de um hospedeiro, pode-se inferir que uma ninfa de *A. sculptum* é capaz de fazer 61,2 incursões em

busca de um hospedeiro ao longo de sua vida. Considerando-se a altura média que as ninfas escalam nos arbustos (62,7 cm) e o comportamento de subir seguido pelo retorno para o abrigo, essa atividade pode ser repetida aproximadamente 88 vezes. Isso demonstra uma grande capacidade de busca por hospedeiros, o que aumenta muito suas chances de sobrevivência e pode justificar o sucesso desse carrapato no ambiente. Essa capacidade de busca pode ser uma das razões pelas quais sua população aumenta consideravelmente e rapidamente, em comparação com *A. dubitatum*, quando um maior número de capivaras se torna disponível (Nunes *et al.* 2019).

A locomoção é energeticamente dispendiosa para os carrapatos e seu custo reflete diretamente na sobrevivência. Sob condições de laboratório, com temperaturas constantes, alta umidade e mantidas dentro de tubos com pouca área para locomoção, as ninfas conseguiram sobreviver por mais de seis meses, enquanto a locomoção diária reduziu esse período de sobrevivência para aproximadamente 2 meses. Curiosamente, os carrapatos que percorreram longas distâncias também viveram mais, o que pode ser explicado pela reserva de energia. As ninfas que têm reservas energéticas maiores são capazes de andar mais e também sobreviver mais (Crooks e Randolph 2006).

Os carrapatos não têm outra fonte de nutrientes além do sangue e a reserva de energia nas ninfas é obtida apenas no estágio da larva. Portanto, elas precisam decidir muito bem quando andar uma vez que buscas malsucedidas reduzirão sua vida útil. Os resultados do presente trabalho sugerem que os carrapatos modulam sua locomoção de acordo com suas reservas. Os carrapatos mais velhos têm reservas energéticas mais baixas e tendem a caminhar por distâncias mais curtas por DE, em velocidade mais lenta, numa possível tentativa de economizar energia. A reserva de energia também é uma explicação para a ninfa que sobreviveu por 98 dias, que andou por uma distância mais curta, provavelmente na tentativa de economizar energia para sobreviver por mais tempo.

A hidratação corporal também pode ter influenciado a sobrevivência dos carrapatos. De fato, a hidratação corporal é uma das principais características que coordenam a caminhada e a busca realizada pelos carrapatos (Knülle e Rudolph 1982). Os carrapatos perdem água durante suas incursões e, quando as condições de hidratação são desfavoráveis, eles param a busca e permanecem nas camadas mais baixas da vegetação (Lees 1946). *I. ricinus* tende a se deslocar para locais com mais umidade relativa do ar e esse comportamento é mais intenso em espécimes com mais estresse hídrico (Crooks e Randolph 2006). No entanto, as ninfas descansavam em um ambiente de alta umidade (90%), uma condição que lhes permite

recuperar a água perdida no período de caminhada (Lees 1946). Portanto, é mais provável pensar que a energia foi o parâmetro que mais influenciou a sobrevivência.

Os objetivos principais dos experimentos foram de relacionar os valores encontrados em condições de laboratório e tentar correlacionar com possíveis comportamentos de *A. sculptum* no ambiente natural. Os resultados obtidos em condições controladas de laboratório permitem uma avaliação de cada variável separadamente sem sofrer viés de outras variáveis impossíveis de controlar em condições de campo, como, por exemplo, umidade relativa do ar, temperatura e luminosidade. Para isso, mediu-se a distância da locomoção em diferentes circunstâncias e relacionaram-se suas características ao possível comportamento que o carrapato pode ter no ambiente em condições naturais. É notório que, caso esse experimento tivesse sido realizado em condições de campo, haveria uma grande variação nesses fatores que indiscutivelmente iriam influenciar nos resultados obtidos.

O experimento foi realizado em aparato que pudesse simular um arbusto com altura próxima de 50 cm. O barbante, por exemplo, possui fios soltos que se assemelham aos tricomas de alguns caules ou folhas. A inclinação se relaciona com o próprio peso destes arbustos que normalmente não são retos ou se inclinam com o vento. Além do mais, os carrapatos em local plano apresentam movimento erráticos difíceis de serem medidos sem equipamentos caros. Contudo, quando testados em pilotos, os carrapatos não se interessaram por percorrer longas distâncias em barbante suspenso paralelo ao chão, saltando após poucos centímetros de caminhada. Este fenômeno de escolha pela subida está muito relacionado a literatura que afirma a necessidade de buscar por um local em que os carrapatos possam buscar pelo seu hospedeiro (Loye e Lane 1988).

É importante notar que vários outros fatores bióticos e abióticos podem influenciar a locomoção e sobrevivência dos carrapatos e, na natureza, esses fatores são extremamente diferentes das condições do laboratório. Entre esses, dois muito importantes são a sazonalidade de algumas espécies de carrapatos e a presença de estímulos tanto para a busca do hospedeiro quanto para a sobrevivência. E o *A. sculptum* é um carrapato sazonal, cujas ninfas são encontradas principalmente durante o outono e o inverno. Contudo, a sazonalidade em condições naturais é controlada pela diapausa comportamental das larvas (Labruna *et al.* 2003) e a manutenção em uma incubadora com temperatura controlada é capaz de romper a sazonalidade (Cabrera e Labruna 2009). Assim, nos experimentos do presente estudo, realizados em diferentes épocas do ano, não se apresentaram resultados diferentes. E estes resultados puderam ser analisados em conjunto.

A presença de estímulos também tem grande influência na locomoção, seja relacionada à busca por um hospedeiro (Carroll, Mills e Schmidtman 1996) ou à procura por condições ambientais mais favoráveis à sobrevivência (Knülle e Rudolph 1982). Os carrapatos tendem a evitar raios solares diretos e a se deslocar para microambientes com temperaturas mais amenas e maior umidade (Knülle e Rudolph 1982). No presente trabalho, nenhum estímulo hospedeiro foi utilizado e a intenção era acessar a distância que o carrapato tem a capacidade percorrer, em vez de verificar os estímulos que despertam a locomoção. No entanto, espera-se que a presença de estímulos possa alterar alguns dos parâmetros medidos, principalmente a distância percorrida nas incursões (Carroll, Mills e Schmidtman 1996). A presença de um observador pode ter sido um dos vieses que influenciaram a caminhada, mesmo tentando-se ao máximo evitar a aproximação ou outros estímulos. Contudo, não se encontraram evidências de que toda a distância tenha sido afetada.

7. CONCLUSÕES

- As ninfas de *A. sculptum* é capaz de caminhar, ao longo de sua vida, por distâncias superiores a 100 metros em períodos de aproximadamente 19 horas em condições de laboratório.
- As distâncias percorridas em um único sentido são de cerca de 50 cm e as ninfas percorrem aproximadamente 1,8 metros antes de uma necessidade de entrar em quiescência.
- A velocidade média de deslocamento das ninfas de *A. sculptum* em condições de laboratório é de aproximadamente 9,1 cm/min ou 0,00546 km/h.
- As ninfas mudam de sentido, em média, 142 vezes aproximadamente ao longo de sua vida e cerca de 2,6 vezes em um dia de caminhada.
- A locomoção diária é capaz de reduzir o tempo médio de sobrevivência de ninfas de *A. sculptum* em aproximadamente três vezes, de mais de seis meses para aproximadamente 2 meses.

8. CAPÍTULO 2 - Avaliação da resposta imune humoral e eficácia de diferentes formulações vacinais contra *A. sculptum* utilizando camundongos Swiss como hospedeiros

8.1. Objetivos

8.1.1 Objetivo geral

- Avaliar a resposta imune humoral e eficácia de diferentes formulações vacinais contendo antígenos salivares e intestinais contra *A. sculptum* utilizando camundongos *Mus musculus* da linhagem Swiss como hospedeiros.

8.1.2. Objetivos específicos

- Avaliar a resposta imune humoral de camundongos imunizados com diferentes formulações vacinais contra o carrapato *A. sculptum*;
- Avaliar o efeito de diferentes formulações vacinais em parâmetros alimentares e reprodutivos de fêmeas de *A. sculptum* alimentadas em camundongos imunizados;
- Avaliar a eficácia de diferentes formulações vacinais sobre fêmeas de *A. sculptum* alimentadas em camundongos imunizados;
- Avaliar a taxa de mortalidade e fertilidade em fêmeas de *A. sculptum* alimentadas em camundongos imunizados com diferentes formulações vacinais.

9. MATERIAL E MÉTODOS

9.1. Manutenção da colônia de *A. sculptum* em laboratório

A colônia de *A. sculptum* foi mantida conforme descrito no item 4.1.

9.2. Produção das formulações vacinais

Foram produzidas cinco formulações vacinais utilizando os quatro antígenos mais promissores identificados por Costa (2019), sendo eles: rAsKunitz – uma proteína de 10,9 kDa que apresenta um domínio do tipo Kunitz_BPTI; rAsBasicTail – uma proteína de 18,9 kDa que apresenta vários resíduos de lisina da região carboxi-terminal; rAs8,9kDa – uma proteína de 13 kDa que apresenta um domínio do tipo fator de von Willebrand (vWF) tipo C; e rAsQuimera – uma proteína de 48,5 kDa que contém 22 epítomos semelhantes aos encontrados em sete proteínas transmembrana intestinais de *A. sculptum*.

As formulações aplicadas em camundongos eram compostas por 5 µg de cada antígeno e 0,1 mg de hidróxido de alumínio dissolvidos em um volume final de 100 µL de PBS estéril (concentração de 1 mg/mL). Todos os antígenos de cada formulação foram aplicados no mesmo local, o dorso do animal, por via subcutânea. A composição das formulações vacinais e os grupos experimentais estão representados na tabela 4.

Tabela 4: Grupos experimentais e formulações utilizadas nos ensaios vacinais.

Grupo	Nome	Nº de Espécimes	Composição
C1	Controle	12 Camundongos	Al(OH) ₃ + PBS*
C2	T1-KnQui	13 Camundongos	Al(OH) ₃ + PBS + rAsKunitz + rAsQuimera
C3	T2-BTQui	13 Camundongos	Al(OH) ₃ + PBS + rAsBasicTail + rAsQuimera
C4	T3-8,9Qui	13 Camundongos	Al(OH) ₃ + PBS + rAs8,9kDa + rAsQuimera
C5	T4-Kn8,9Qui	13 Camundongos	Al(OH) ₃ + PBS + rAsKunitz + rAs8,9kDa + rAsQuimera
C6	T5-KnBT8,9Qui	13 Camundongos	Al(OH) ₃ + PBS + rAsKunitz + rAsBasicTail + rAs8,9kDa + rAsQuimera

* Al(OH)₃ = Hidróxido de Alumínio e PBS= Salina tamponada com fosfato.

Na preparação das formulações vacinais foi utilizado como adjuvante o Hidróxido de Alumínio. Esse adjuvante vem sendo utilizado em vacinas há mais de um século e foi

escolhido devido a suas inúmeras vantagens (Principi e Esposito 2018), sendo as principais: eficiência na amplificação da resposta imune sobretudo do tipo TH2, que vem ao encontro do mecanismo investigado no trabalho; baixo custo que facilitaria o desenvolvimento de um produto acessível; segurança imunológica e baixa toxicidade que faz com que o produto seja aprovado para utilização em humanos e animais; fácil obtenção uma vez que pode ser adquirido em diferentes fornecedores de insumos; e fácil manipulação e utilização na preparação das formulações.

As proteínas recombinantes foram produzidas em bactérias *Escherichia coli* BL-21. A sequência dos genes foi clonada em Vetor pET28a-TEV e transformada nas bactérias por choque térmico. Às bactérias transformadas foram adicionadas em 25 mL meio de cultura LB (Luria Bertani) com 12,5 µL de Kanamicina (concentração de 100 mg/mL) para constituição de pré-inóculo, que foi incubado overnight a 37°C. Após o crescimento das bactérias, constatado pela densidade óptica (OD) do meio que deve estar entre 0,4 e 0,6 após adição do pré-inóculo, a expressão foi induzida pela adição de 1 µL de IPTG a 1 M por mL de meio. A incubação foi realizada durante a noite (“overnight”) a 37°C em agitação de 160 rpm. Após a indução, todo material foi centrifugado em rotação de 10.000 g por 5 minutos a temperatura de 4°C, descartando-se o sobrenadante e reservando o sedimento em -80°C com em Costa (2019).

O sedimento bacteriano contendo a proteína recombinante foi lisado por ultrassom em tampão de lise (20 mM de fosfato de sódio, 30 mM Imidazol e 8 M de ureia) contendo lisozima (5 mg/mL), após congelamento e descongelamento por três vezes. Em seguida foi feita a centrifugação a 12.000 g a 4°C por 20 minutos e o sobrenadante foi filtrado em filtro de 0,22 µm (Millipore) e utilizado para a purificação da proteína de interesse.

A purificação das proteínas recombinantes fusionadas a cauda de poli-histidina, foi realizada utilizando uma coluna de afinidade His Trap® Hp (GE Healthcare) 5 mL previamente carregada com níquel, de acordo com o protocolo do fabricante. A técnica de cromatografia por afinidade foi realizada no sistema de cromatografia em fase líquida preparativa AKTA-prime plus® (GE Healthcare Life Sciences) e “software” PrimeView. A eluição ocorreu na presença de imidazol, sendo coletadas amostras de 1,3 mL em microtubos cônicos de polipropileno de 1,5 mL e guardadas em freezer a -20 °C.

As amostras coletadas em cada passo do processo de purificação foram avaliadas quando uma porção (cerca de 10 µL) foi diluída em tampão de amostra para eletroforese (Tris-HCl 0,5M pH 6,8; β-2-mercaptoetanol 0,1%; SDS 2%; azul de bromofenol 0,1% e glicerol 10%). As amostras e um padrão de massa molecular foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE; Laemmli, 1970). A eletroforese foi conduzida

utilizando-se o sistema Mini-Protean II Dual Slab Cell (Bio-Rad) com gel de empacotamento 4%, gel de separação 12,5%, e voltagem constante de 120 V por aproximadamente 1,5 horas. O gel foi corado por nitrato de prata. Após o SDS-PAGE, as amostras de maior concentração proveniente da purificação foram coletadas e passaram por diálise em PBS. E depois foi realizada a quantificação de proteínas pelo método de Bradford (1976).

O western blotting foi realizado para confirmar a expressão dos recombinantes. O anticorpo primário utilizado foi o anti-cauda de histidina (his TAG) produzido em camundongo (*Sigma-aldrich*®) na diluição de 1:1.500 e o secundário (anti-IgG de camundongo) na concentração 1:1.000. As proteínas separadas por SDS-PAGE foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose por 2 horas em 100 V. Em seguida à transferência, a membrana foi bloqueada com solução bloqueadora (PBS/Tween 0,1% + leite em pó desnatado 10%) sob agitação. Então a membrana foi lavada por três vezes por cinco min com PBS/Tween 0,1% e, em seguida, incubada sob agitação com o anticorpo primário por 1 hora e 30 min. Foram realizadas mais três lavagens e, em seguida, a membrana foi incubada com anticorpo secundário por mais 1 hora e 30 min. Por fim, as membranas foram lavadas novamente por três vezes e a revelação da membrana foi feita utilizando o kit Peroxidase Substrate DAB (Vector Laboratories®).

9.3. Imunização dos grupos experimentais de camundongos

Foram utilizados camundongos da linhagem Swiss, de quatro a seis semanas de idade, adquiridos no Centro de Bioterismo (CEBio) do ICB e mantidos no biotério do Departamento de Parasitologia com ciclo claro-escuro de 12:12 horas, alimentados com ração Nuvilab e água *ad libitum*. Em cada animal, foram aplicadas três doses em intervalos de 14 dias. Amostras individuais de sangue foram colhidas por punção da veia lateral caudal dos camundongos dois dias antes de cada dose para obtenção de soro. O intervalo de dois dias se deve à necessidade de oferecer as melhores condições de manejo possíveis para a saúde do animal. Após 15 dias da última vacinação foi realizado um desafio com coletas de sangue executadas dois dias antes e sete dias depois do ingurgitamento. Também foram feitas coletas de sangue de dois em dois meses depois desta última, completando oito coletas (Figura 12).

O sangue adquirido em cada coleta foi dessorado por cerca de 30 minutos e centrifugado por cinco minutos resultando no soro que foi estocado em freezer a -80°C. Os animais foram acompanhados e observados diariamente quanto as alterações de comportamento e reações nos locais da injeção.

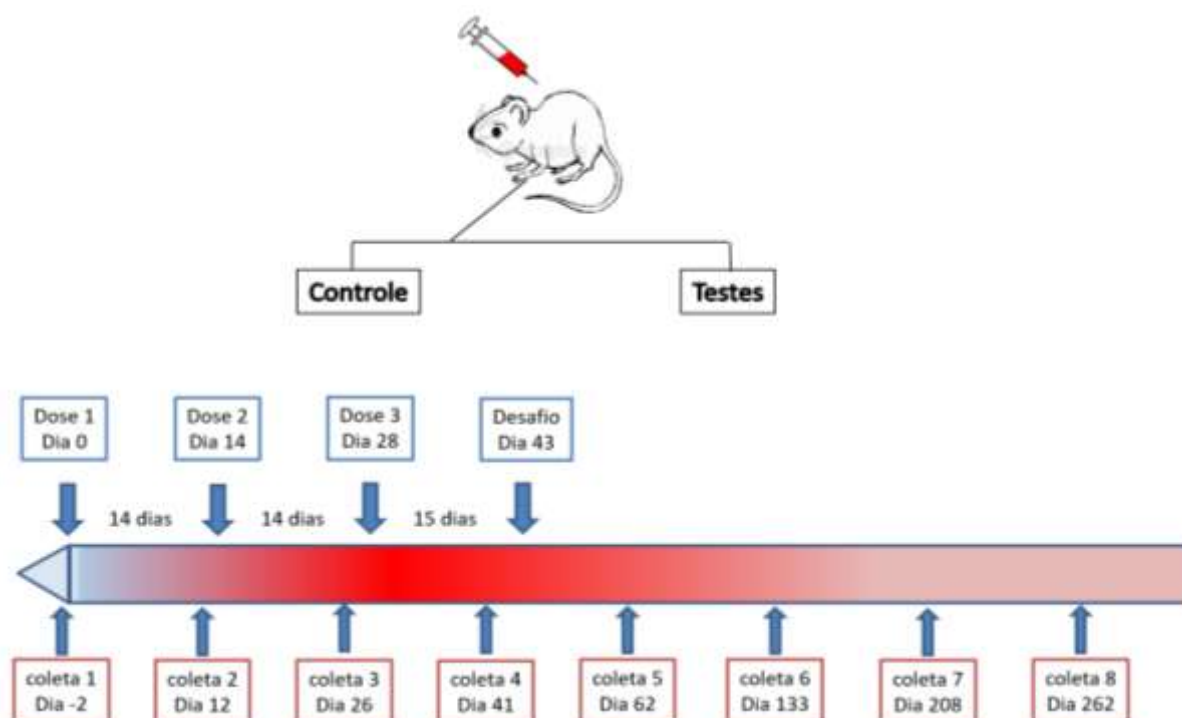


Figura 12: Delineamento do ensaio vacinal realizado em camundongos utilizando antígenos contra o carrapato *A. sculptum*. Controle - animais imunizados com $Al(OH)_3$; Testes - foram utilizados cinco grupos experimentais imunizados com diferentes combinações dos antígenos rAsKunitz, rAs8,9KDa, rAsBasicTail e rAsQuimera. "Coleta" indica os dias onde houve coleta de sangue dos animais.

9.4. Infestação dos hospedeiros e avaliação da eficácia vacinal

O desafio com carrapatos foi realizado 15 dias após a última injeção. Cada camundongo foi infestado com um casal de carrapatos *A. sculptum* adultos não alimentados conforme metodologia descrita no item 4.1. Os camundongos e os carrapatos foram acompanhados diariamente após as infestações. Os seguintes parâmetros relacionados à alimentação de carrapatos foram analisados: tempo de alimentação, peso final após alimentação e mortalidade. Também foram avaliados parâmetros reprodutivos das fêmeas como: massa total de ovos produzida por fêmea e taxa de eclosão dos ovos, que foi calculada pela razão do número de larvas contadas após a eclosão e o número de ovos produzidos por cada fêmea. A eficácia vacinal em cada um dos grupos foi avaliada pela seguinte fórmula: $Eficácia (\%E) = 100 [1 - (CRT \times CRO \times CRF)]$, em que CRT, CRO e CRF significam coeficiente de redução de fêmeas ingurgitadas, coeficiente de redução de oviposição e coeficiente de redução de fertilidade dos ovos, respectivamente (Canales *et al.* 1997).

9.5. Avaliação da resposta humoral nos animais imunizados

Para avaliação da produção de anticorpos antígeno-específicos, o soro coletado dos animais experimentais foi submetido a ELISA (“Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”). Para isso, utilizou-se 0,5 µg de cada antígeno recombinante purificado em 50 µL de tampão carbonato/poço em placas de ELISA de 96 poços “high binding” (COSTAR® 3590). Após incubação a 4°C em câmara úmida overnight, as placas foram lavadas, bloqueadas por 2 horas a 37°C sob agitação com solução de bloqueio. Após 3 lavagens, foram incubadas por 1 hora em agitação a 37°C com os soros dos camundongos na diluição 1:320 e, após novas lavagens, incubadas com anticorpos anti-IgG de camundongos conjugados com peroxidase (Sigma-aldrich®) na diluição 1:10.000. A revelação foi feita com a adição do tampão fosfato-citrato 100 mM pH 5.0 contendo H₂O₂ e OPD (O-Fenilenodiamina). A reação foi parada com a adição de H₂SO₄ 12,5% e a absorbância medida a 492 nm em leitor de ELISA modelo VERSAmax® com software SoftMax® (Molecular Devices).

9.6. Construção das figuras e análise estatística dos dados

Os dados obtidos foram transferidos para planilhas do excell e software GraphPad Prism 7.0, depois analisados e representados pela média ± erro padrão ou média ± desvio padrão. A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste Kolmogorov-Smirnov. Para dados com distribuição normal, foi feito o teste de Análise de Variância (ANOVA) seguido pelo pós-teste de Dunnett. Para dados que não apresentaram distribuição normal, foi utilizado o teste Kruskal-Wallis e o pós-teste de Dunn's. O nível de significância considerado foi $p < 0,05$.

10. RESULTADOS

10.1. Preparação das formulações vacinais

Os resultados da produção e purificação das proteínas recombinantes usadas nas formulações vacinais estão representados na figura 13. É possível notar que todas as quatro proteínas recombinantes (rAsKunitz; rAs8,9kDa; rAsbasicTail e rAsQuimera,) foram produzidas e purificadas de forma satisfatória, uma vez que, em análises por PAGE, foi observado apenas traços de outras proteínas em conjunto com as recombinantes que estão em grande quantidade após a purificação (Figura 13A). Análises por Western blotting confirmaram a identidade das proteínas recombinantes, uma vez que foram reconhecidas por anticorpos anti-cauda de histidina (Figura 13B).

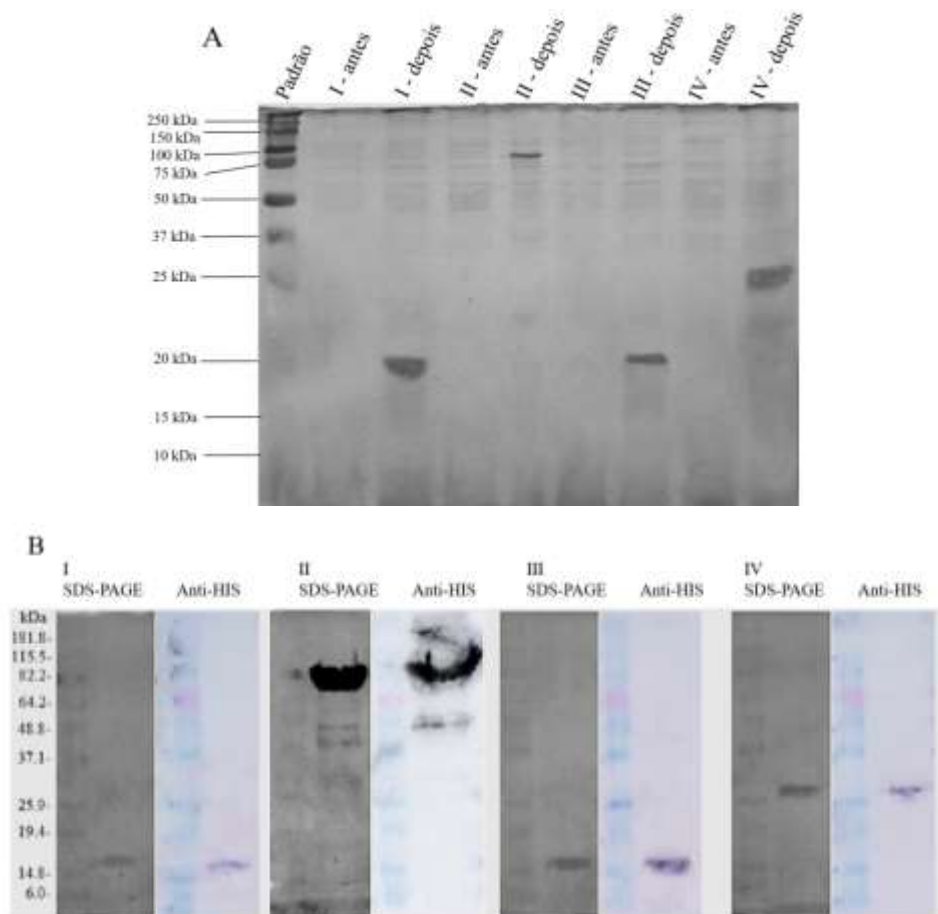


Figura 13: Produção e purificação das proteínas recombinantes utilizadas nas formulações vacinais contra o carrapato *A. sculptum*. A - Visualização das proteínas recombinantes antes e após a indução por IPTG em SDS-PAGE na seguinte ordem: I-rAsKunitz; II-rAs8,9kDa; III-rAsBasicTail e IV-rAsQuimera. B – SDS-PAGE e Western blotting das proteínas recombinantes após purificação em colunas de níquel utilizando anticorpos anti-cauda de histidina na seguinte na mesma ordem.

10.2. Ensaios vacinais em camundongos

10.2.1. Avaliação da produção de anticorpos séricos antígeno-específicos

As análises sorológicas mostraram que todas as formulações estimularam o desenvolvimento de anticorpos antígeno específicos com os antígenos contidos nas formulações (Figura 14). Todas as formulações apresentaram perfis de anticorpos antígeno-específico semelhantes com aumento gradual até a última injeção da formulação seguida por uma queda gradual.

Para as formulações T3-8.9Qui e T4-Kn8,9Qui foi possível observar a permanência de anticorpos no D262, porém sempre em níveis mais baixos em relação aos níveis logo após a última dose da vacina (Figura 14). Entretanto, para as outras formulações, os níveis de anticorpos foram baixos no dia 262, isto é, próximos dos níveis antes da vacinação.

Curiosamente, a formulação que apresentou os menores títulos entre D-2 e D41 foi aquela que continha todos os quatro antígenos em conjunto (formulação 5).

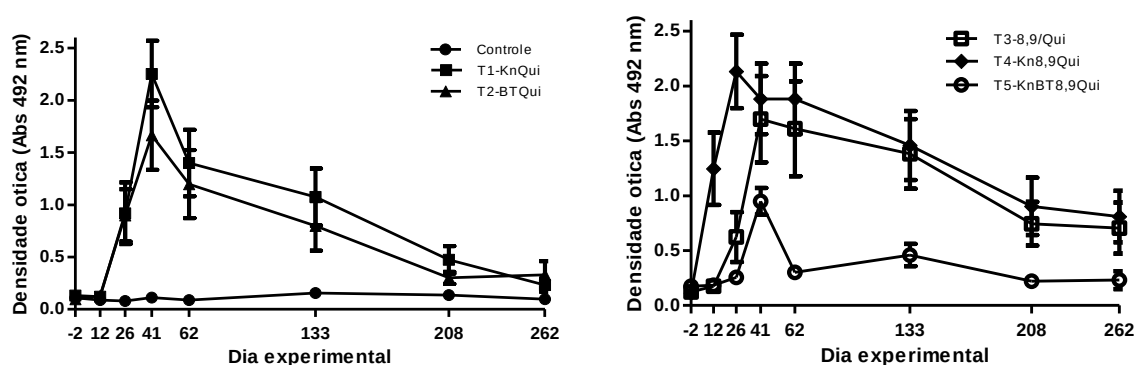


Figura 14: Resposta antígeno-específica produzida a partir da vacinação de camundongos com antígenos salivares recombinantes. Os níveis de IgG totais no soro dos animais foram avaliados a partir da técnica de ELISA indireto utilizando os quatro antígenos nas placas. Os dados estão representados com a média $\pm$ EP dos níveis de IgG dos animais de cada grupo. O dia 1 indica o dia da aplicação da primeira dose da vacina.

Nos primeiros ensaios realizados, as placas de ELISA foram sensibilizadas com todos os quatro antígenos, mesmo nos grupos vacinados com formulações contendo apenas dois antígenos. Este ensaio fornece um resultado rápido mas impede a avaliação de quais antígenos foram mais imunogênicos. Pelos resultados obtidos, a formulação mais antigênica parece ser a que combina o T3-8,9Qui (figura 14). O que pode nos levar a crer que a molécula mais antigênica seja a rAs8.9kDa. Para sanar esta dúvida, novos ensaios foram realizados utilizando os mesmos soros em placas sensibilizadas com os antígenos individualmente (figura 15).

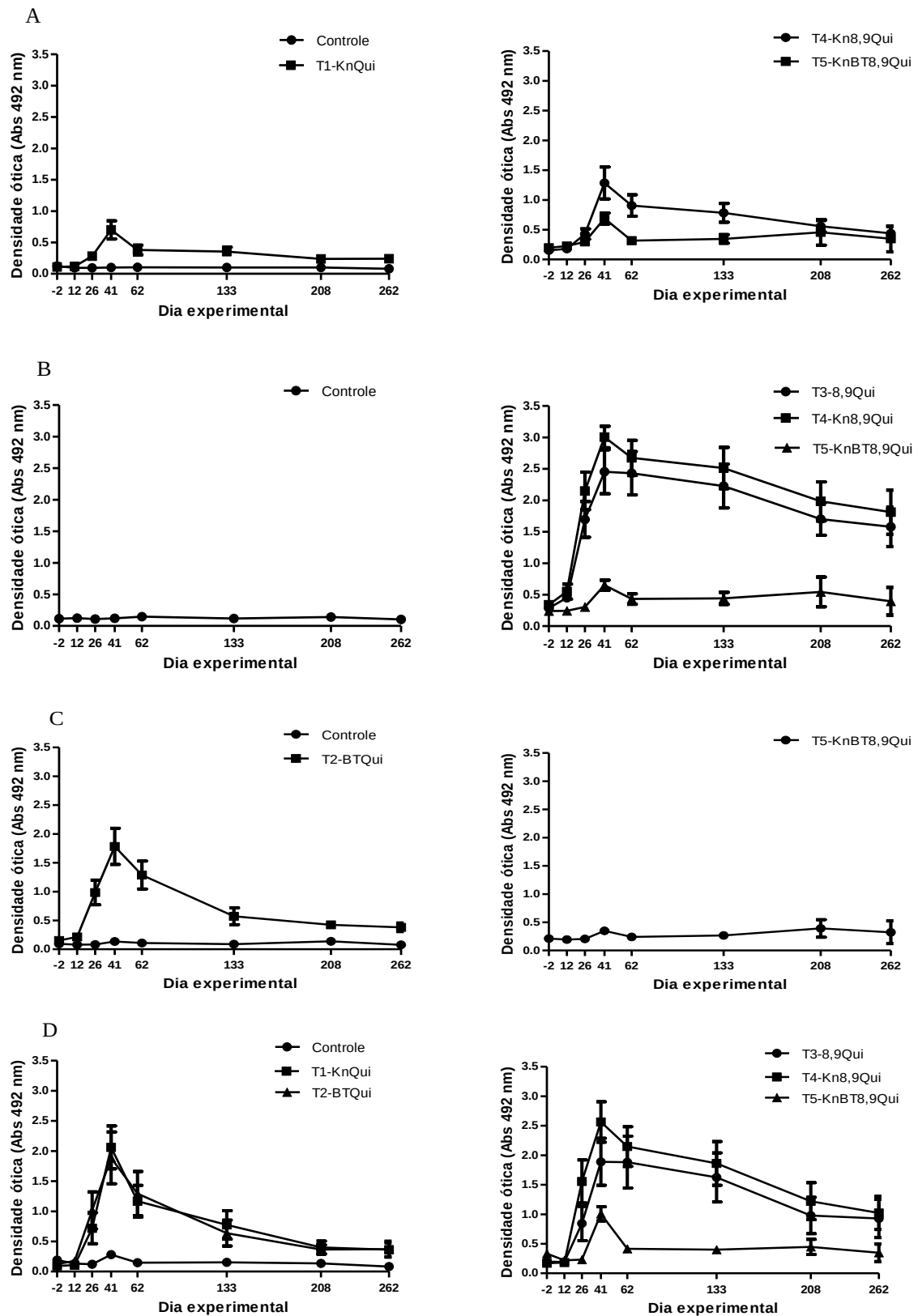


Figura 15: Resposta antígeno-específica produzida a partir da vacinação de camundongos com antígenos salivares recombinantes em testes específicos. Os níveis de IgG totais no soro dos animais foram avaliados a partir da técnica de ELISA indireto utilizando um único antígeno nas placas de cada teste específico. Os dados estão representados com a média $\pm$ EP dos níveis de IgG dos animais de cada grupo. O dia 1 indica o dia da aplicação da primeira dose da vacina. As placas foram sensibilizadas com os seguintes antígenos: A – rAsKunitz; B – rAs8,9KDa; C – rAsBasicTail; D – rAsQuimera.

Os resultados confirmaram que houve produção de anticorpos contra todos os quatro antígenos utilizados nas formulações, O antígeno mais imunogênico foi o rAs8,9KDa, seguido pelo rAsQuimera e o rAsBasicTail. O antígeno rAsKunitz foi o que apresentou os menores títulos de IgG antígeno-específicos (Figura 15). Todos os antígenos tiveram queda nos níveis de IgG após a última imunização, sendo o rAs8,9KDa e o rAsQuimera os que apresentaram maiores níveis no último dia de coleta.

10.2.2. Mortalidade e parâmetros alimentares e reprodutivos de fêmeas alimentadas em camundongos vacinados com diferentes formulações vacinais contra *A. sculptum*

Nos testes vacinais, o primeiro efeito avaliado foi a taxa de mortalidade de fêmeas alimentadas nos camundongos imunizados. Para tanto, foram consideradas todas as mortes ocorridas entre a colocação das fêmeas nas câmaras de alimentação no dorso do camundongo até o final do repasto sanguíneo. Durante o experimento, duas situações aconteceram com alguns grupos, sendo elas a morte de alguns camundongos hospedeiros e o descolamento da câmara de alimentação com perda dos carrapatos. Essas fêmeas experimentais foram excluídas do estudo e esses fatos justificam as diferenças entre o número de amostras de cada grupo experimental.

A taxa de mortalidade variou de 10 a 33,3% nos grupos vacinados, enquanto no grupo controle não houve mortes (Tabela 5). As maiores taxas de mortalidade foram observadas nas formulações contendo T3-8.9Qui e T4-Kn8.9Qui, na qual quase um terço das fêmeas morreu antes de completar o repasto sanguíneo

Tabela 5: Mortalidade de fêmeas de *A. sculptum* alimentadas em camundongos imunizados com as diferentes formulações vacinais.

	Controle	T1- KnQui	T2- BTQui	T3- 8.9Qui	T4- Kn8.9Qui	T5- Kn8.9BTQui
n experimental	12	10	9	9	13	10
Fêmeas vivas	12	8	8	6	9	9
*Mortalidade (%)	0	20	12,5	33,3	31,8	10

* A mortalidade foi avaliada da colocação da fêmea na câmara de alimentação até o final do repasto sanguíneo.

O tempo de alimentação das fêmeas não foi afetado pela imunização dos camundongos utilizados como fonte alimentar, isto é, não houve diferença estatística ($p>0,05$) no tempo de alimentação das fêmeas dos grupos vacinados e controle. O tempo de alimentação variou de 9 a 24 dias, com todos os grupos apresentando tempo médio entre 12,5 a 14,5 dias e mediana entre 10 e 13 dias (Figura 16A).

O volume de sangue ingerido pelas fêmeas também não foi afetado, uma vez que a massa final das fêmeas alimentadas nos camundongos imunizados não foi estatisticamente diferente do grupo controle (Figura 16B). A massa média do grupo controle foi de 524,9 mg enquanto para os grupos vacinados variou de 412,1 a 493,4 mg. A fêmea de maior massa ocorreu no grupo controle com 828,1 mg e a de menor massa ocorreu no grupo T3-8.9Qui com 110,8 mg (Figura 16B).

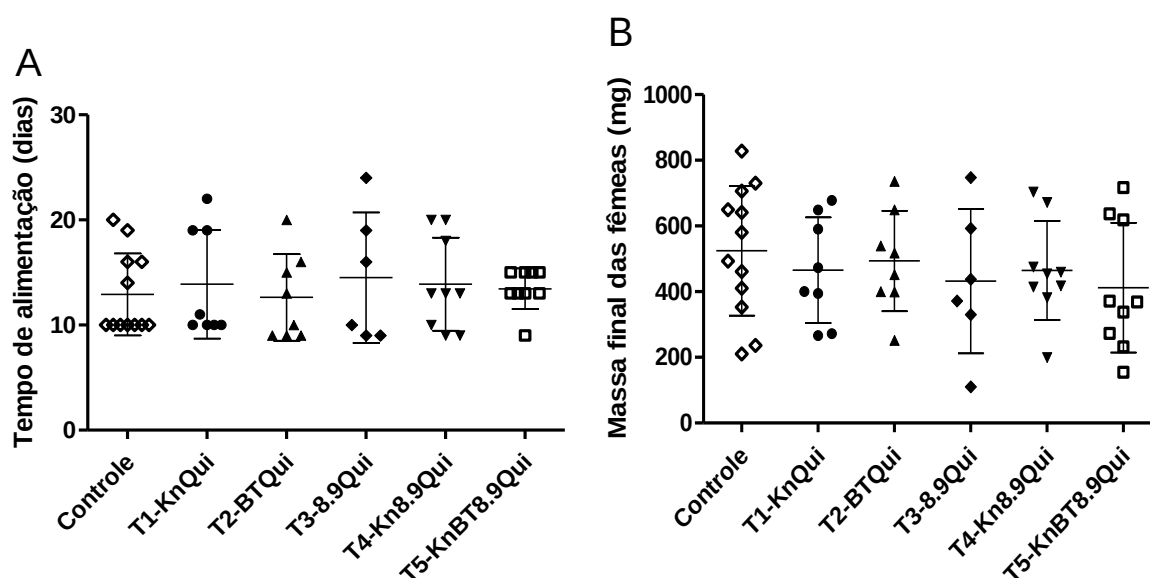


Figura 16: Parâmetros alimentares de fêmeas de *A. sculptum* alimentadas em camundongos imunizados com as diferentes formulações vacinais. A barras indicam a média $\pm$ DP. Análise estatística: One-way ANOVA seguido do pós-teste de Dunns; não houve diferença estatística entre os grupos ($p>0,05$).

A postura de ovos foi o parâmetro mais afetado pela vacinação com as maiores diferenças entre o grupo controle e os grupos vacinados. Todas as fêmeas do grupo controle realizaram a postura, enquanto a taxa de fertilidade nos grupos vacinados variou de 50,0 a 87,5% (Tabela 6). Os grupos mais afetados foram aqueles cuja vacinação foi realizada com as formulações T3-8.9Qui e T5-Kn8.9BTQui.

Tabela 6: Fertilidade de fêmeas de *A. sculptum* após alimentação em camundongos imunizados com diferentes formulações vacinais.

	Controle	T1- KnQui	T2- BTQui	T3- 8.9Qui	T4- Kn8.9Qui	T5- Kn8.9BTQui
Teleóginas alimentadas	12	8	8	6	9	9
Teleóginas férteis*	12	7	7	3	8	5
Taxa de fertilidade (%)	100	87,5	87,5	50,0	88,9	55,6

*Fêmeas que alimentaram e realizaram postura.

A massa de ovos média dos grupos vacinados apresentou as maiores diferenças para o grupo controle, porém sem diferença estatística ($P>0,05$) (Figura 17A). Para alguns grupos, como T1-KnQui, T3-8.9Qui e aquele com os quatro antígenos, a média da massa de ovos foi quase a metade daquela observada para o grupo controle. Essa diferença se justifica principalmente porque esses grupos apresentaram algumas fêmeas inférteis ou que realizaram posturas com muito poucos ovos. Quando foi levado em consideração apenas as fêmeas férteis, a diferenças entre os grupos foram mais sutis e as massas de ovos médias variaram de 151,8 a 248,0 mg (Figura 17B). Estes dados demonstram que as fêmeas que sobrevivem e permanecem férteis são capazes de fazer posturas semelhantes às fêmeas do grupo controle.

A taxa de eclosão dos ovos também apresentou resultados diversos entre os grupos que variaram entre 8,5 e 24,8 nos grupos vacinados e 32,7% no grupo controle (Figura 17C). Entretanto, não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre nenhum dos grupos de fêmeas alimentadas em animais vacinados e aquelas alimentadas em camundongos controle. Em todos os grupos, incluindo o grupo controle, houve fêmeas com posturas nas quais não houve eclosão de larvas ou que originaram menos de 3,5 mg de larvas o que se equivale a aproximadamente 100 larvas (Figura 17).

Para o cálculo da eficácia vacinal, foram utilizados os índices de ingurgitamento das fêmeas, de oviposição e de eclosão dos ovos. Os resultados mostraram que a eficácia das formulações variou de 69,1 a 81,8% (Tabela 7). As formulações com os melhores resultados foram aquelas com os antígenos Kn, 8.9 e Qui que apresentaram eficácia sempre próxima a 80%, enquanto aquelas formulações contendo o antígeno BT apresentaram eficácias entre 69 e 75%.

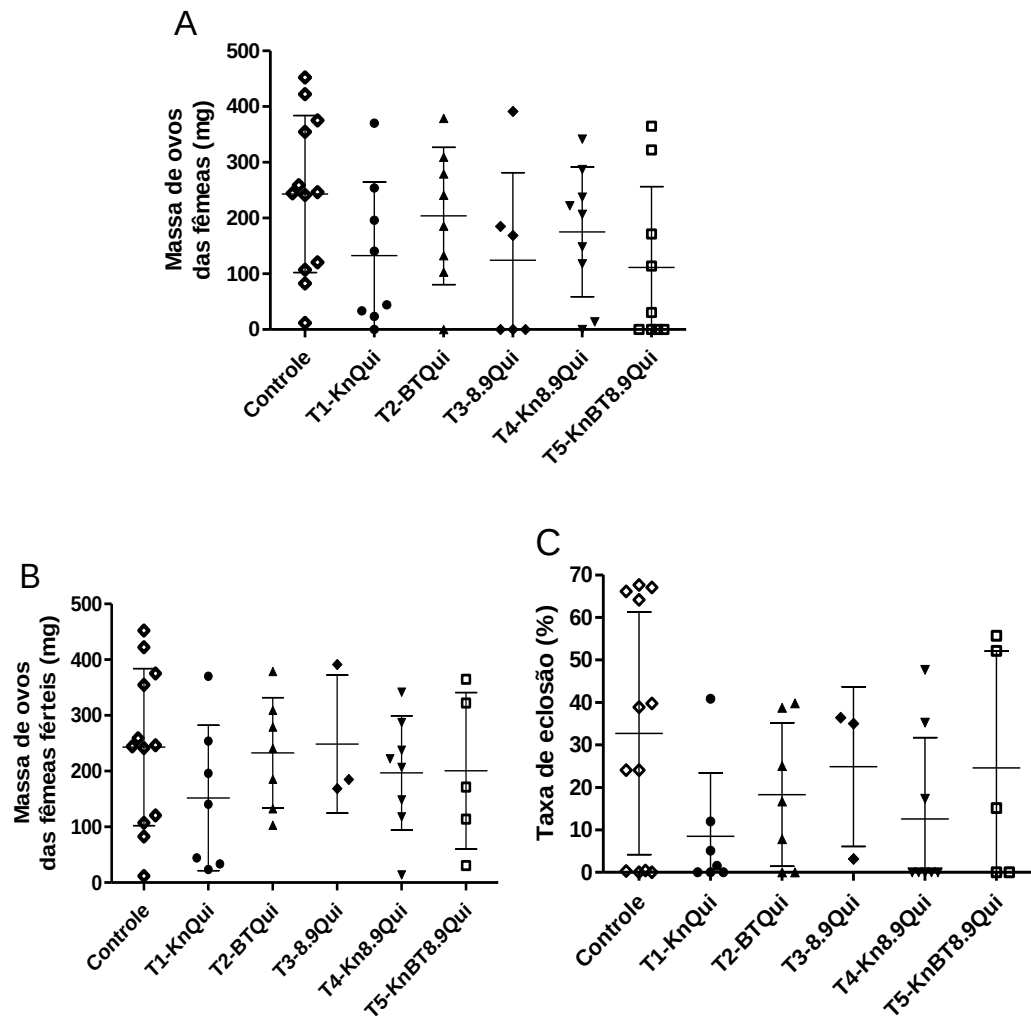


Figura 17: Parâmetros reprodutivos de fêmeas de *A. sculptum* alimentadas em camundongos imunizados com as diferentes formulações vacinais. A barras indicam a média $\pm$ DP. Análise estatística: One-way ANOVA seguido do pós-teste de Dunns. O asterisco (*) indica diferença estatística para o controle ($p < 0,05$).

Tabela 7: Coeficientes de redução de fêmeas ingurgitadas (CRT), oviposição (CRO) e fertilidade dos ovos (CRF) relativos à vacinação com os antígenos salivares recombinantes e suas taxas de eficácia no controle da infestação por fêmeas de *A. sculptum*.

	T1-KnQui	T2-BTQui	T3-8.9Qui	T4-Kn8.9Qui	T5-KnBT8.9Qui
CRT	0,800	0,875	0,666	0,682	0,900
CRO	0,546	0,838	0,511	0,720	0,458
CRF	0,416	0,349	0,627	0,423	0,748
Eficácia (%)	81,8	74,4	78,6	79,2	69,1

11. DISCUSSÃO

Motivados pelos resultados de Costa (2019); no presente trabalho resolvemos elaborar combinados de dois, três ou quatro antígenos no intuito de aumentar a eficácia no controle de *A. sculptum*, sempre em mente com a proposta de um antígeno ativando o sistema complemento e os demais inibindo a ação dos inibidores, fazendo com que o complemento seja ativado em maior nível e aja livremente no intestino. Esse foi o motivo de todas as formulações intestinais conterem o antígeno rAsQuimera, associado aos outros antígenos.

Nos experimentos vacinais realizados neste estudo, o primeiro parâmetro avaliado foi a produção de anticorpos antígeno específicos nos animais vacinados. Como ponto positivo, observamos que todos os antígenos induziram aumento níveis de IgG após as imunizações. Entretanto, alguns pontos negativos foram detectados. O primeiro deles foi que alguns antígenos induziram produção de IgG em níveis mais baixos como o rAsBasicTail e o rAsKunitz. A segunda observação foi a queda acentuada dos níveis de anticorpos após a última imunização. Estes dados sugerem que alguma modificação terá que ser feita a fim de estimular maiores níveis de anticorpos e a sua permanência no sangue dos animais vacinados por mais tempos. Opções que podem ser testadas são o aumento do número de doses, utilização de outros adjuvantes ou modificações estruturais nos recombinantes, como a inclusão de carboidratos nas proteínas.

A mortalidade de fêmeas alimentadas em camundongos imunizados pelas diferentes formulações vacinais foi o primeiro fenótipo avaliado (tabela 4). Obtivemos uma taxa pelo menos 10% maior que o controle com 20% em T1-KnQui, 33% para T3-8,9Qui e 31,8% para T4-Kn8,9Qui. Estes resultados são mais altos que aqueles encontrados por Costa (2019) quando testou os antígenos separadamente. Estes resultados também corroboram com a estratégia de utilização de múltiplos antígenos na formulação vacinal (Willadsen 2008), de forma que o bloqueio da atividade das moléculas salivares possa ser mais eficiente ao longo de todo o processo alimentar. Entretanto, esperávamos que o principal efeito do mecanismo de ação das vacinas multiantigênicas fosse a indução de mortalidade, mas não houve aumento na inibição.

Nos parâmetros de alimentação avaliados, não houve diferença significativa entre o tempo médio necessário para a alimentação das fêmeas e a sua massa após o repasto, o que também vai de encontro dos resultados observados por Costa (2019), indicando que as fêmeas de *A. sculptum* se alimentaram satisfatoriamente durante o repasto.

A taxa de fertilidade das fêmeas ingurgitadas caiu pelo menos 10% (T4-Kn8,9Qui), passando por 44,4% em T5-KnBT8,9Qui e chegando a 50% para T3-8,9Qui, sendo o parâmetro de postura de ovos o mais afetado pela vacinação com todos os grupos apresentando a postura de ovos menor que o controle, apesar de não haver diferença estatística significantes diante dos nossos critérios. A média nas taxas de eclosão, massa de ovos e massa de ovos de fêmeas férteis foram sempre menores que o controle apesar de se detectar valores significativamente estatísticos. Mas, na vacinação contra *R. microplus* com um antígeno salivar, também não se observou diminuição significativa na oviposição das fêmeas ingurgitadas (Andreotti *et al.* 2012). Contudo estes valores foram importantes no cálculo da eficácia da imunização conforme (Canales *et al.* 1997).

Apesar dos parâmetros avaliados, isoladamente, não apresentarem diferenças estatísticas para o controle, vários grupos apresentaram valores absolutos inferiores ao controle. Estas pequenas reduções dos vários parâmetros são melhor visualizadas no cálculo da eficácia que leva em considerações todos os parâmetros em conjunto. Com isso, a eficácia da imunização encontrada em nosso trabalho foi bastante promissora para todas as formulações testadas, variando de 69,1 a 81,8 %.

Até o momento não existem trabalhos publicados que testam antígenos vacinais contra *A. sculptum*, porém trabalhos vacinais realizados com outras espécies de carrapatos acharam resultados de eficácia variados. Parizi (2012), e seus colaboradores, utilizando uma vacina multiantigênicas contra *R. microplus* obteve eficácias de 35,3 a 61,6%. Huercha *et al.* (2020) avaliou o eficácia da Glutathione-S-Transferase contra *Dermacentor marginatus* e chegou a valores de 43,69%. Azhahianambi *et al.* (2009) testou eficácia de 61,6% em tHaa86 – uma proteína homóloga à Bm86 – contra *Hyalomma a. anatolicum*. Avaliando uma sequência de 20 aminoácidos de um proteína ribossomal P0 como antígeno vacinal de *R. sanguineus* Rodriguez-Mallon *et al.* (2012) encontraram eficácia de 90%, em coelhos.

Outros estudos já demonstraram a eficácia do extrato intestinal na imunização de hospedeiros contra outras espécies, como *I. ricinus*, *R. microplus*, *R. sanguineus* (Wong; Opdebeeck 1989; Jittapalapong *et al.* 2000; Knorr *et al.* 2018). Assim, esperávamos que a vacinação com antígenos ocultos intestinais combinados com os antígenos salivares pudesse aumentar a eficácia contra fêmeas de *A. sculptum* alimentadas em camundongos. Contudo não houve este aumento. Apesar de ser esperado valores superiores, uma vez que foram somados antígenos salivares a antígenos ocultos, os achados se mostraram promissores pois os valores foram equivalentes aos encontrados por Costa (2019), indicando uma repetibilidade de eficácia dos antígenos vacinais.

Frente aos resultados obtidos por outros autores, considera-se que a utilização das proteínas recombinantes salivares combinadas à intestinal quimérica em ensaios vacinais continua se mostrando promissora na produção de uma futura formulação vacinal a ser utilizada contra *A. sculptum*. Os resultados concordam com os de (Costa 2019) evidenciando o efeito das vacinas sobre diversos parâmetros alimentares e reprodutivos de carrapatos adultos. Os dados obtidos aumentam a esperança de que novos testes sejam realizados com os antígenos, principalmente para avaliação de sua eficácia em diferentes espécies de hospedeiros. Experimentos futuros também devem ser realizados a fim de testar novas formulações que consigam obter melhores resultados com esses antígenos. Também seria interessante verificar uma possível interferência sobre capacidade vetorial dos carrapatos que, caso afetada, levaria a proteção do hospedeiro contra patógenos veiculados pelo carrapato (como, por exemplo, as *Rickettsia* spp.), através da redução da capacidade de transmissão no modelo chamado de Vacinas de Bloqueio de Transmissão ("Transmission Blocking Vaccines") (Nuttall *et al.* 2006; Rego *et al.* 2019).

12. CONCLUSÕES

- Todas as formulações testadas em camundongos elevaram os níveis séricos de IgG que se mantiveram acima dos níveis do controle até o dia 262 do experimento.
- A formulação T1-KnQui promoveu níveis mais altos de IgG em camundongos. Enquanto a formulação T4-Kn8,9Qui apresentou efeito mais duradouro.
- Os combinados de uma, duas ou três proteínas salivares com a quimérica também apresentaram níveis de eficácia promissores entre 69 e 81,8% contra fêmeas de *A. sculptum* alimentados em camundongos.
- A mortalidade de fêmeas é maior no uso das formulações T3-8,9Qui e T4-Kn8,9Qui, acima de 30%. E a taxa de fertilidade é de apenas 50% quando se usa a formulação T3-8,9Qui.
- Apesar de não haver o aumento de eficácia com a combinação de antígenos salivares e intestinais, as formulações se revelaram promissoras para o desenvolvimento de uma vacina a ser utilizada no controle do carrapato.

13. BIBLIOGRAFIA

- ABREU, JÉSSICA. F. **Identificação e caracterização funcional de um inibidor da via clássica do sistema complemento expresso na glândula salivar do carrapato *Amblyomma sculptum***. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) Universidade Federal de Minas Gerais, 2018.
- ALEKSEEV, ANDREY N.; JENSEN, PER M.; DUBININA, HELEN V.; SMIRNOVA, LIOUBOV A.; MAKROUCHINA, NATALIA A.; ZHARKOV, SERGEY D. Peculiarities of behaviour of taiga (*Ixodes persulcatus*) and sheep (*Ixodes ricinus*) ticks (Acarina: Ixodidae) determined by different methods. **Folia Parasitologica**, v. 47, n. 2, p. 147–153, 2000.
- ANDREOTTI, RENATO; CUNHA, RODRIGO CASQUERO; SOARES, MARIANA APARECIDA; GUERRERO, FELIX D.; LEIVAS LEITE, FÁBIO P.; PÉREZ DE LEÓN, ADALBERTO A. Protective immunity against tick infestation in cattle vaccinated with recombinant trypsin inhibitor of *Rhipicephalus microplus*. **Vaccine**, v. 30, n. 47, p. 6678–6685, 2012.
- ARAÚJO, RACHEL PAES DE; NAVARRO, MARLI BRITO MOREIRA DE ALBUQUERQUE; CARDOSO, TELMA ABDALLA DE OLIVEIRA. Febre maculosa no Brasil: estudo da mortalidade para a vigilância epidemiológica. **Cadernos Saúde Coletiva**, v. 24, n. 3, p. 339–346, 2016.
- AZHAHIANAMBI, P.; DE LA FUENTE, J.; SURYANARAYANA, V. V.S.; GHOSH, S. Cloning, expression and immunoprotective efficacy of rHaa86, the homologue of the Bm86 tick vaccine antigen, from *Hyalomma anatolicum anatolicum*. **Parasite Immunology**, v. 31, n. 3, p. 111–122, 2009.
- BARROS-BATTESTI, DARCI M.; ARZUA, MÁRCIA; BECHARA, GERVÁSIO HENRIQUE. **Carrapatos de importância médico veterinária da região Neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies. Vox/ICTTD-3/Butantan**. [s.l.: s.n.].
- BARROS, VERUSKA CAVALCANTI; ASSUMPÇÃO, JÉSSICA GÓES; CADETE, ANDRÉ MIRANDA; SANTOS, VÂNIA CRISTINA; CAVALCANTE, REGINALDO RORIS; ARAÚJO, RICARDO NASCIMENTO; PEREIRA, MARCOS HORÁCIO; GONTIJO, NELDER FIGUEIREDO. The role of salivary and intestinal complement system inhibitors in the midgut protection of Triatomines and mosquitoes. **PLoS ONE**, v. 4, n.

6, p. 1–10, 2009.

- BEATI, LORENZA; NAVA, SANTIAGO; BURKMAN, ERICA J.; BARROS-BATTESTI, DARCI M.; LABRUNA, MARCELO BAHIA; GUGLIELMONE, ALBERTO A.; CÁCERE, ABRAHAM G.; GUZMÁN-CORNEJO, CARMEN M.; LEÓN, RENATO; DURDEN, LANCE A.; FACCINI, JOÃO L. H. *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae), the Cayenne tick: phylogeography and evidence for allopatric speciation Lorenza. **BioMed Central Evolutonary Biology**, v. 13, n. 267, p. 1–20, 2013.
- BENELLI, GIOVANNI; PAVELA, ROMAN; CANALE, ANGELO; MEHLHORN, HEINZ. Tick repellents and acaricides of botanical origin : a green roadmap to control tick-borne diseases ? **Parasitology Research**, v. 115, p. 2545–2560, 2016.
- BITENCOURTH, KARLA; AMORIM, MARINETE; OLIVEIRA, STEFAN VILGES DE; VOLOCH, CAROLINA. *Amblyomma sculptum* : genetic diversity and rickettsias in the Brazilian Cerrado biome. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 31, p. 427–437, 2017.
- BORGES, LÍGIA MIRANDA FERREIRA; OLIVEIRA, PAULO ROBERTO GRIMALDI; LISBOA, C. L. M.; RIBEIRO, MÚCIO FLÁVIO BARBOSA. Horse resistance to natural infestations of *Anocentor nitens* and *Amblyomma cajennense* (Acari : Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 104, n. 3, p. 265–273, 2002.
- BOUCHARD, K. R.; WIKEL, S. K. Care, maintenance, and experimental infestation of ticks in the laboratory setting. **Biology of Disease Vectors**, v. 2, p. 705–712, 2005.
- BUCZEK, ALICJA; ZAJĄC, ZBIGNIEW; WOŹNIAK, ANETA; KULINA, DOROTA; BARTOSIK, KATARZYNA. Locomotor activity of adult *Dermacentor reticulatus* ticks (Ixodida: Ixodidae) in natural conditions. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v. 24, n. 2, p. 271–275, 2017.
- CABRERA, RICARDO R.; LABRUNA, MARCELO B. Influence of Photoperiod and Temperature on the Larval Behavioral Diapause of *Amblyomma cajennense* (Acari : Ixodidae). **Journal of medical entomology**, v. 46, n. 6, p. 1303–1309, 2009.
- CANALES, MARIO; ENRÍQUEZ, ANTONIO; RAMOS, EDUARDO; CABRERA, DEBORAH; DANDIE, HUBERT; SOTO, ALEJANDRO; FALCÓN, VIVIANA; VALLE, MANUEL RODRIGUES. Large-scale production in *Pichia pastoris* of the recombinant vaccine Gavac® against cattle tick. **Vaccine**, v. 15, n. 4, p. 414–422, 1997.

- CARROLL, J. F.; MILLS, G. D.; SCHMIDTMANN, E. T. Field and Laboratory Responses of Adult *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) to Kairomones Produced by White-Tailed Deer. **Journal of Medical Entomology**, v. 33, n. 4, p. 640–644, 1996.
- CARROLL, J. F.; SCHMIDTMANN, E. T. Dispersal of Blacklegged Tick (Acari: Ixodidae) Nymphs and Adults at the Woods-Pasture Interface. **Journal of Medical Entomology**, v. 33, n. 4, p. 554–558, 1996.
- COSTA, GABRIEL CERQUEIRA ALVES. **Identificação e avaliação de eficácia de antígenos vacinais contra o carrapato estrela (*Amblyomma sculptum*)** Tese (Doutorado em Ciências) Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2019.
- COSTA, J.; BOTELHOS, J. **Parasitologia Humana**. In: Neves D, Melo A, Linardi P, Vítor R (Eds.). [s.l.] Atheneu, 2011.
- COSTA, MYLLA SPIRANDELLI. **Efeito imunomodulatório da saliva de *Amblyomma sculptum* durante a infecção por *Toxoplasma gondii***. [s.l.] Universidade Federal de Uberlândia, 2016.
- CROOKS, EMILY; RANDOLPH, SARAH E. Walking by Ixodes ricinus ticks: Intrinsic and extrinsic factors determine the attraction of moisture or host odour. **Journal of Experimental Biology**, v. 209, n. 11, p. 2138–2142, 2006.
- DANTAS-TORRES, FILIPE; VENZAL, JOSÉ M.; BERNARDI, LEOPOLDO F. O.; FERREIRA, RODRIGO L.; ONOFRIO, VALÉRIA C.; MARCILI, ARLEI; BERMÚDEZ, SERGIO E.; RIBEIRO, ALBERTO F.; BARROS-BATTESTI, DARCI M.; LABRUNA, MARCELO 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.
- DE CASTRO, JÚLIO J. Sustainable tick and tickborne disease control in livestock improvement in developing countries. **Veterinary Parasitology**, v. 71, p. 77–97, 1997.
- DE LA FUENTE, JOSÉ; ALMAZÁN, CONSUELO; CANALES, MARIO; DE LA LASTRA, JOSÉ MANUEL PÉREZ; KOCAN, KATHERINE M.; WILLADSEN, PETER. A ten-year review of commercial vaccine performance for control of tick infestations on cattle. **Animal health research reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases**, v. 8, n. 1, p. 23–28, 2007.
- ESTRADA-PEÑA, AGUSTÍN; TARRAGONA, EVELINA L.; VESCO, UMBERTO; MENEGHI, DANIELE DE; MASTROPAOLO, MARIANO; MANGOLD, ATILIO J.;

- GUGLIELMONE, ALBERTO A.; NAVA, SANTIAGO. Divergent environmental preferences and areas of sympatry of tick species in the *Amblyomma cajennense* complex (Ixodidae). **International Journal for Parasitology**, v. 44, n. 14, p. 1081–1089, 2014.
- ESTRADA-PEÑA, AGUSTÍN; GUGLIELMONE, ALBERTO A.; MANGOLD, ATILIO JOSÉ. The distribution and ecological “preferences” of the tick *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae), an ectoparasite of humans and other mammals in the Americas. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 98, n. 3, p. 283–292, 2004.
- FERREIRA, BEATRIZ R.; SILVA, JOÃO S. Saliva of *Rhipicephalus sanguineus* tick impairs T cell proliferation and IFN- γ -induced macrophage microbicidal activity. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 64, n. 3, p. 279–293, 1998.
- FRANCO, PAULA F.; SILVA, NAYLENE C. S.; COSTA, GABRIEL C.; PEREIRA, MARCOS H.; GOMES, A. P. S.; ARAUJO, RICARDO N. **Avaliação de parâmetros biológicos relacionados à alimentação de ninfas de *Amblyomma cajennense* em camundongos**. XVII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária. **Anais...**São luiz, Maranhão: 2012
- FRANCO, PAULA F.; SILVA, NAYLENE C. S.; VALE, VLADIMIR FAZITO DO; ABREU, JESSICA F.; SANTOS, VÂNIA SANTOS; GONTIJO, NELDER F.; VALENZUELA, JESUS G.; PEREIRA, MARCOS H.; SANT'ANNA, MAURICIO R. V.; GOMES, ALESSANDRA P. S.; ARAUJO, RICARDO N. Inhibition of the classical pathway of the complement system by saliva of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). **Experimental Parasitology**, v. 164, p. 91–96, 2016.
- FREITAS, CAROLINA MARIA VIANNA; LEITE, ROMÁRIO CERQUEIRA; OLIVEIRA, PAULO ROBERTO; FERNÁNDEZ, F.C. Biological parameters of larvae, nymphs, and engorged females of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) obtained from artificial and successive infestations on *Oryctolagus cuniculus* (Linnaeus, 1758) (Lagomorpha: Ochotonidae). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 5, p. 1085–1093, 2009.
- FURLONG, JOHN; CHAGAS, ANA CAROLINA DE SOUZA; NASCIMENTO, CRISTIANE BARBUDA. Behavior and ecology of *Boophilus microplus* tick larvae in *Brachiaria decumbens* pastures. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 39, n. 4, p. 213–217, 2002.
- FURLONG, JOHN; MARTINS, JOÃO RICARDO DE S. **Resistência dos carrapatos aos**

- carrapaticidas. Embrapa Gado de Leite-Circular Técnica.** Juiz de Fora, MG: [s.n.].
- GARIN, N. S.; GRABAREV, P. A. Protective reaction of rabbits and guinea pigs upon repeated feeding of ixodid ticks, *Rhipicephalus sanguineus* (Latr., 1806). **Meditinskaiia Parazitologiia I Parazitarnye Bolezni**, v. 41, p. 247–279, 1972.
- GEORGE, JHON. E. Present and Future Technologies for Tick Control. **Annals New York Academy of Sciences**, v. 916, n. 1, p. 583–588, 2006.
- GHOSH, SSRIKANTA; AZHAHANAMBI, PALAVESAM; YADAV, M. P. Upcoming and future strategies of tick control: A review. **Journal of Vector Borne Diseases**, v. 44, n. 2, p. 79–89, 2007.
- GODDARD, JEROME. Ecological Studies of *Ixodes scapularis* (Acari : Ixodidae) in Central Mississippi : Lateral Movement of Adult Ticks. **Jounal of medical entomology**, v. 30, n. 4, p. 824–826, 1993.
- GRAY, J. S. A. Carbon Dioxide Trap For Prolonged Sampling Of *Ixodes Ricinus* L. Populations. **Experimental & Applied Acarology** , v. 1, p. 35–44, 1985.
- GUERRERO, FELIX D.; MILLER, ROBERT J.; DE LÉON, ADALBERTO A. PEREZ. Cattle tick vaccines : Many candidate antigens , but will a commercially viable product emerge ? **International Journal for Parasitology**, v. 42, n. 5, p. 421–427, 2012.
- GUGLIELMONE, ALBERTO A.; BEATI, LORENZA; BARROS-BATTESTI, DARCI M.; LABRUNA, MARCELO BAHIA; SZABÓ, MATIAS PABLO JUAN; MARTINS, JOÃO R.
- GONZÁLEZ-ACUÑA, DANIEL; ESTRADA-PEÑA, AGUSTÍN. Ticks (Ixodidae) on humans in South America. **Experimental and Applied Acarology**, v. 40, n. 2, p. 83–100, 2006.
- GUGLIELMONE, ALBERTO A.; ROBBINS, RICHARD G.; APANASKEVICH, DMITRY A.; PETNEY, TREVOR N.; ESTRADA-PEÑA, AGUSTÍN; HORAK, IVAN G.; SHAO, RENFU; BARKER, STEPHEN C. The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world: a list of valid species names. **Zootaxa**, v. 2528, p. 1–28, 2010.
- HAMILTON, S. E.; KEMP, D. H.; MCKENNA, R. V.; WILLADSEN, PETER. Gut cells of the tick *B. microplus*: the effect of vaccination on digest cells and experiments on blood meal absorption by theses cells. In: Dusbabek, F.; Bujva, V. Eds., editor/s. In: **Modern acarology**. [s.l.] Academia/SPB Academic Publishing, 1991. p. 341–351.

- HUERCHA; SONG, RUIQI; LI, MIN; FAN, XINLI; HU, ZHENGXIANG; WU, LIJIANG; LI, YONGCHANG; ZHANG, WEI; ZHANG, YANG; MA, YUHUI; BAYIN, CHAHAN. Characterization of glutathione S-transferase of *Dermacantor marginatus* and effect of the recombinant antigen as a potential anti-tick vaccine. **Veterinary Parasitology**, v. 279, p. 109043, 2020.
- JITTAPALAPONG, SATHAPORN; STICH, ROGER W.; GORDON, JOHN C.; WITTUM, THOMAS E.; BARRIGA, OMAR O. Performance of Female *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) Fed on Dogs Exposed to Multiple Infestations or Immunization with Tick Salivary Gland or Midgut Tissues. **Journal of Medical Entomology**, v. 37, n. 4, p. 601–611, 2000.
- JONGEJAN, FRANS; UILENBERG, GERRIT. Ticks and control methods. **Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties**, v. 13, n. 4, p. 1201–1226, 1994.
- JONGEJAN, FRANS; UILENBERG, GERRIT. **The global importance of ticks Parasitology** Faculty of Veterinary Medicine of Utricht, , 2004.
- KEIRANS, J. E. Order Ixodidae. In: **In: Krantz G, Walter D (Eds.) A Manual of Acarology**. Lubbock: Texas Tech University Press, Lubbock, 2009. p. 111–123.
- KEMP, DAVID H.; MCKENNA, R. V.; THULLNER, R.; WILLADSEN, PETER. **Proceedings of the IV Seminario Internacional de Parasitologia Animal. In: IV Seminario Internacional de Parasitologia Animal**. IV Seminario Internacional de Parasitologia Animal. **Anais...** Puerto Vallarta, Mexico: 1999
- KNORR, SARAH; ANGUITA, JUAN; CORTAZAR, JULEN T.; HAJDUSEK, ONDREJ; KOPÁČEK, PETR; TRENTIELMAN, JOS J.; KERSHAW, OLIVIA; HOVIUS, JOPPE W.; NIJHOF, ARD M. Preliminary Evaluation of Tick Protein Extracts and Recombinant Ferritin 2 as Anti-tick Vaccines Targeting *Ixodes ricinus* in Cattle. **Frontiers in Physiology**, v. 9, 2018.
- KNÜLLE, WILLI; RUDOLPH, DIETER; **Humidity Relationships and Water Balance of Ticks, In: Obenchain, F.D., Galun, R. (Eds.)**. Oxiford: Pergamon Press Ltd, 1982.
- KOCH, H. G.; MCNEW, R. W. Sampling of Lone Star Ticks (Acari : Ixodidae): Dry Ice Quantity and Capture Sucess. **Annals of Entomology Society of America**, v. 75, p. 579–582, 1982.

- LABRUNA, MARCELO BAHIA; KERBER, CLÁUDIA E.; FERREIRA, FERNANDO; FACCINI, JOÃO LUIZ H.; DE WAAL, DÄNIEL T.; GENNARI, SOLANGE M. Risk factors to tick infestations and their occurrence on horses in the state of São Paulo , Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 97, n. 1, p. 1–14, 2001.
- LABRUNA, MARCELO B.; KASAI, NOBUKO; FERREIRA, FERNANDO; FACCINI, JOÃO L.H.; GENNARI, SOLANGE M. Seasonal dynamics of ticks (Acari: Ixodidae) on horses in the state of São Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 105, n. 1, p. 65–77, 2002.
- LABRUNA, MARCELO BAHIA; AMAKU, MARCOS; METZNER, JOÃO AUGUSTO; PINTER, ADRIANO; FERREIRA, FERNANDO. Larval Behavioral Diapause Regulates Life Cycle of *Amblyomma cajennense* (Acari : Ixodidae) in Southeast Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 40, n. 2, p. 170–178, 2003.
- LABRUNA, MARCELO BAHIA. Ecology of rickettsia in South America. **Annals of New York Academy of Sciences**, v. 1166, p. 156– 166, 2009.
- LEES, ANTONY DAVID. The water balance in *Ixodes ricinus* L. and certain other species of ticks. **Parasitology**, v. 37, n. 1/2, p. 1–20, 1946.
- LOPES, CRISTINA MARQUES LISBÔA; LEITE, ROMÁRIO CERQUEIRA; LABRUNA, MARCELO BAHIA; OLIVEIRA, PAULO ROBERTO DE; BORGES, LÍGIA MIRANDA FERREIRA; RODRIGUES, ZÉNON BATISTA; DE CARVALHO, HENRIQUE ÁVILA; FREITAS, CAROLINA MARIA VIANNA DE; VIEIRA, CARLOS ROBERTO. Host Specificity of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) with Comments on the Drop-off Rhythm. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, n. 3, p. 347–351, 1998.
- LOPES, CRISTINA MARQUES LISBÔA; OLIVEIRA, PAULO R.; HADDAD, JOÃO PAULO; DOMINGUES, LUÍSA N.; PINHEIRO, RIZALDO R.; BORGES, LÍGIA MIRANDA FERREIRA; LABRUNA, MARCELO BAHIA; LEITE, ROMÁRIO CERQUEIRA. Biological Parameters of Ticks (*Amblyomma cajennense* Fabricius, 1787) Under Field and Laboratory Conditions in Pedro Leopoldo, State of Minas Gerais, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, n. 1, p. 14–17, 2008.
- LOPES, ROGERIO B.; ALVES, SÉRGIO B.; PADULLA, LUIZ F. L.; PÉREZ, CARLOS A. Eficiência de Formulações de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* para o Controle de Ninfas de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787). **Revista Brasileira de**

Parasitologia Veterinária, v. 16, n. 1, p. 27–31, 2007.

LOYE, JENELLA E.; LANE, ROBERT S. Questing Behavior of *Ixodes pacificus* (Acari : Ixodidae) in Relation to Meteorological and Seasonal Factors. **Journal of medical entomology**, v. 25, n. 5, p. 391–398, 1988.

MARTINS, THIAGO FERNANDES. **Estudo do complexo *Amblyomma cajennense* no Brasil**. Tese (Doutorado em Ciências) Universidade de São Paulo, 2014.

MARTINS, THIAGO FERNANDES; BARBIERI, AMÁLIA R.M.; COSTA, FRANCISCO B.; TERASSINI, FLÁVIO A.; CAMARGO, LUÍS M.A.; PETERKA, CÁSSIO R.L.; PACHECO, RICHARD DE C.; DIAS, RICARDO A.; NUNES, PABLO H.; MARCILI, ARLEI; SCOFIELD, ALESSANDRA; CAMPOS, ARTUR K.; HORTA, MAURICIO C.; GUILLOUX, ALINE G.A.; BENATTI, HECTOR R.; RAMIREZ, DIEGO G.; BARROS-BATTESTI, DARCI M.; LABRUNA, MARCELO BAHIA. Geographical distribution of *Amblyomma cajennense* (sensu lato) ticks (Parasitiformes: Ixodidae) in Brazil, with description of the nymph of *A. cajennense* (sensu stricto). **Parasites and Vectors**, v. 9, n. 1, p. 1–14, 2016.

MCMAHON, CONOR; GUERIN, PATRICK M. Attraction of the tropical bont tick, *Amblyomma variegatum*, to human breath and to the breath components acetone, NO and CO₂. **Naturwissenschaften**, v. 89, n. 7, p. 311–315, 2002.

MERINO, OCTAVIO; ALBERDI, PILAR; PÉREZ DE LA LAstra, JOSÉ M.; DE LA FUENTE, JOSÉ. Tick vaccines and the control of tick-borne pathogens. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 3, n. July, p. 1–10, 2013.

NAVA, SANTIAGO; BEATI, LORENZA; LABRUNA, MARCELO B.; CÁCERES, ABRAHAM G.; MANGOLD, ATILIO J.; GUGLIELMONE, ALBERTO A. Reassessment of the taxonomic status of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) with the description of three new species, *Amblyomma tonelliae* n. sp., *Amblyomma interandinum* n. sp. and *Amblyomma patinoi* n. sp., and reinstatement of *Amblyomma mixtum* Koch, 1. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 5, n. 3, p. 252–276, 2014.

NAVA, SANTIAGO; GUGLIELMONE, ALBERTO A.; MANGOLD, ATILIO JOSÉ. An overview of systematics and evolution of ticks. **Frontiers en Bioscience**, v. 14, p. 2857–2877, 2009.

NEVES, DAVID PEREIRA; MELO, ALAN LANE DE; LINARDI, PEDRO MARCOS; VITOR, RICARDO W DE ALMEIDA. **Parasitologia Humana**. 13. ed. Rio de Janeiro:

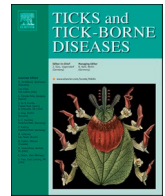
Atheneu., 2016.

- NUTTALL, PAT A.; TRIMNELL, ADAMA R.; KAZIMIROVA, MARIA; LABUDA, MILAN. Exposed and concealed antigens as vaccine targets for controlling ticks and tick-borne diseases. **Parasite Immunology**, v. 28, n. 4, p. 155–163, 2006.
- OLIVEIRA, STEFAN VILGES DE; GUIMARÃES, JESSICA NORONHA; RECKZIEGEL, GUILHERME CARNEIRO; MARIANO, BIDIAH; ARAÚJO-VILGES, KELINE MEDEIROS DE; FONSECA, LIDSY XIMENES; PINNA, FERNANDA VOIETTA; VALÉRIA, SIMONE; PEREIRA, COSTA; CALDAS, EDUARDO PACHECO DE; GAZETA, GILBERTO SALLES; GURGEL-GONÇALVES, RODRIGO An update on the epidemiological situation of spotted fever in Brazil. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 22, n. 22, p. 1–8, 2016.
- OLIVEIRA, PAULO ROBERTO; BORGES, LÍGIA MIRANDA FERREIRA; LOPES, CRISTINA MARQUES LISBÔA; LEITE, ROMÁRIO CERQUEIRA. Population dynamics of the free-living stages of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) on pastures of Pedro Leopoldo, Minas Gerais State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 92, n. 4, p. 295–301, 2000.
- OLIVEIRA, PAULO ROBERTO; BORGES, LÍGIA MIRANDA FERREIRA; LEITE, ROMÁRIO CERQUEIRA; FREITAS, CAROLINA MARIA V. Seasonal dynamics of the Cayenne tick, *Amblyomma cajennense* on horses in Brazil. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 17, n. 4, p. 412–416, 2003.
- PAJUABA NETO, ADALBERTO ALBUQUERQUE; RAMOS, VANESSA DO NASCIMENTO; MERTINS, MARIA MARLENE; OSAVA, CAROLINA FONSECA; PASCOAL, JAMILE DE OLIVEIRA; SUZIN, ADRIANE; YOKOSAWA, JONNY; SZABÓ, MATIAS PABLO JUAN. Influence of microhabitat use and behavior of *Amblyomma sculptum* and *Amblyomma dubitatum* nymphs (Acari : Ixodidae) on human risk for tick exposure , with notes on Rickettsia infection. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 9, n. 1, p. 67–71, 2018.
- PARIZI, LUÍS FERNANDO; POHL, PAULA CRISTIANE; MASUDA, AOI; VAZ JUNIOR, ITABAJARA DA SILVA. New approaches toward anti-*Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tick vaccine. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 1, p. 1–7, 2009.
- PARIZI, LUÍS FERNANDO; RECK, JOSÉ; OLDIGES, DAIANE PAT´RICIA; GUIZZO,

- MELINA GARCIA; SEIXAS, ADRIANA; LOGULLO, CARLOS; DE OLIVEIRA, PEDRO L.; TERMIGNONI, CARLOS; MARTINS, JOÃO RICARDO DE SOUZA; VAZ JÚNIOR, ITABAJARA DA SILVA Multi-antigenic vaccine against the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: A field evaluation. **Vaccine**, v. 30, n. 48, p. 6912–6917, 2012.
- PASSOS NUNES, FERNANDA B; CARVALHO, SILVIO; CIETO, ALEX DEIWS; LABRUNA, MARCELO BAHIA. The Dynamics of Ticks and Capybaras in a Residential Park Area in Southeastern Brazil : Implications for the Risk of *Rickettsia rickettsii* Infection. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. XX, n. XX, p. 3–8, 2019.
- PEREIRA, MARCELO DE CAMPOS; LABRUNA, MARCELO BAHIA. Febre maculosa: aspectos clínicos e epidemiológicos. **Clínica Veterinária**, v. 3, n. 12, p. 19– 23., 1998.
- PERRET, JEAN LUC; GUERIN, PATRICK M.; DIEHL, PETER A.; VLIMANT, MICHÈLE; GERN, LISE. Darkness induces mobility, and saturation deficit limits questing duration, in the tick *Ixodes ricinus*. **Journal of Experimental Biology**, v. 206, n. 11, p. 1809–1815, 2003.
- PRINCIPI, NICOLA; ESPOSITO, SUSANNA. Aluminum in vaccines: Does it create a safety problem? **Vaccine**, v. 36, n. 39, p. 5825–5831, 2018.
- QUEIROGAS, VERA LÚCIA; DEL CLARO, KLEBER; NASCIMENTO, ANDRÉ ROSALVO TERRA; SZABÓ, MATIAS PABLO JUAN. Capybaras and ticks in the urban areas of Uberlândia, Minas Gerais , Brazil : ecological aspects for the epidemiology of tick-borne diseases. **Experimental and Applied Acarology**, v. 57, n. 1, p. 75–82, 2012.
- QVILLER, LARS; VILJUGREIN, HILDEGUNN; LOE, LEIF EGIL; MEISINGSET, ERLING L.; MYSTERUD, ATLE. The influence of red deer space use on the distribution of *Ixodes ricinus* ticks in the landscape. **Parasites and Vectors**, v. 9, n. 1, 2016.
- RAMOS, VANESSA DO NASCIMENTO; OSAVA, CAROLINA FONSECA; PIOVEZAN, UBIRATAN; SZABÓ, MATIAS PABLO JUAN. Ambush behavior of the tick *Amblyomma sculptum* (*Amblyomma cajennense* complex) (Acari: Ixodidae) in the Brazilian Pantanal. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 8, n. 4, p. 506–510, 2017.
- RANDOLPH, SARAH E. Ecology of non-nidicolous ticks. In: SONENSHINE, D. E., ROE, R. M. (Ed.). . **Biology of ticks**. 2nd ed. ed. New York: Oxford University Press, 2014. p. 3–39.

- HAJDUSEK, ONDREJ; TOMÁS-CORTÁZAR, JULEN; AZAGI, TAL; STRNAD, MARTIN KNORR, SARAH; SIMA, RADEK; JALOVECKA, MARIE; FUMAČOVÁ HAVLÍKOVÁ, SABÍNA; LIČKOVÁ, MARTINA; SLÁVIKOVÁ, MONIKA; KOPACEK, PETR; GRUBHOFFER, LIBOR; HOVIUS, JOPPE W. Counterattacking the tick bite: Towards a rational design of anti-tick vaccines targeting pathogen transmission. **Parasites and Vectors**, v. 12, n. 1, p. 1–20, 2019.
- ROBERTS, J. A. Resistance of Cattle to the Tick *Boophilus microplus* (Canestrini) II . Stages of the Life Cycle of Parasite against Which Resistance Is Manifest. **The Journal of Parasitology**, v. 54, n. 4, p. 667–673, 1968.
- RODRÍGUEZ-MALLON, ALINA; FERNÁNDEZ, ERLINDA; ENCINOSA, PEDRO E.; BELLO, YAMIL; MÉNDEZ-PÉREZ, LÍDICE; RUIZ, LÁZARO CEPERO; PÉREZ, DANNY; GONZÁLEZ, MAYTE; GARAY, HILDA; REYES, OSVALDO; MÉNDEZ, LUIS; ESTRADA, MARIO PABLO. A novel tick antigen shows high vaccine efficacy against the dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. **Vaccine**, v. 30, n. 10, p. 1782–1789, 2012.
- ROJAS, ROSARIO; MARINI, MIGUEL ÂNGELO; COUTINHO, MARIA TERESA ZANATTA. Wild Birds as Hosts of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae). **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 3, p. 315–322, 1999.
- SEBASTIAN, PATRICK S.; TARRAGONA, EVELINA L.; BOTTERO, MARÍA N. SARACHO; MANGOLD, ATILIO J.; MACKENSTEDT, UTE; NAVA, SANTIAGO. Bacteria of the genera *Ehrlichia* and *Rickettsia* in ticks of the family Ixodidae with medical importance in Argentina. **Experimental and Applied Acarology**, v. 71, n. 1, p. 87–96, 2017.
- SILVA, NAYLENE C.S.; VALE, VLADIMIR F.; FRANCO, PAULA F.; GONTIJO, NELDER F.; VALENZUELA, JESUS G.; PEREIRA, MARCOS H.; SANT'ANNA, MAURICIO R.V.; RODRIGUES, DANIEL S.; LIMA, WALTER S.; FUX, BLIMA; ARAUJO, RICARDO NASCIMENTO. Saliva of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) inhibits classical and alternative complement pathways. **Parasites and Vectors**, v. 9, n. 1, p. 14–16, 2016.
- SINAN. Sistema de informação de agravos de notificação. Secretaria executiva. Datasus [acesso em fev. 2020] Informações de saúde. Disponível em: <<http://www.datasus.gov.br>>.

- SONENSHINE, DANIEL E. The mouthparts and foregut: Capitulum. Pharynx and Esophagus. In: SONENSHINE, DANIEL E. (Ed.). . **Biology of Ticks**. New York: Oxford University Press, 1991. v. 1p. 119–140.
- SZABÓ, M. P. J. et al. Differences in the acquired resistance of dogs, hamsters, and guinea pigs to repeated infestations with adult ticks *Rhipicephalus sanguineus* (ACARI: IXODAE). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 32, n. 1, p. 43–50, 1995.
- SZABÓ, M. P. J. et al. Ecological aspects of the free-living ticks (Acari : Ixodidae) on animal trails within Atlantic rainforest in south – eastern Brazil. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 103, n. 1, p. 57–72, 2009.
- SZABÓ, MATIAS PABLO JUAN; MUKAI, LUCIANA SILVA; ROSA, PATRICIA CARLA SILVA; BECHARA, GERVÁSIO HENRIQUE. Ticks (Acari : Ixodidae) in the Serra da Canastra National Park in Minas Gerais , Brazil : species , abundance , ecological and seasonal aspects with notes on rickettsial infection. **Experimental and Applied Acarology**, v. 73, n. 3, p. 381–397, 2018.
- SZABÓ, MATIAS PABLO JUAN; PINTER, ADRIANO; LABRUNA, MARCELO BAHIA Ecology , biology and distribution of spotted-fever tick vectors in Brazil. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 3, n. July, p. 1–9, 2013.
- WILLADSEN, PETER; JONGEJAN, FRANS. Immunologic control of a parasitic arthropod. Identification of a protective antigen from *Boophilus microplus*. **Journal of immunology**, v. 143, n. 4, p. 1346–51, 15 ago. 1989.
- WILLADSEN, PETER. Anti-tick vaccines. **Parasitology**, v. 129, p. S397–S387, 2004.
- WILLADSEN, PETER. Antigen cocktails: valid hypothesis or unsubstantiated hope? **Trends in Parasitology**, v. 24, n. 4, p. 164–167, 2008.
- WILSON, JAMES G.; KINZER, DAVID R.; SAUER, JOHN R.; HAIR, JAKIE A. CHEMO-ATTRACTION IN THE LONE STAR TICK (ACARINA: IXODAE): I. Response of different developmental stages to carbon dioxide administered via traps. **Journal of medical entomology**, v. 9, n. 3, p. 245–252, 1972.
- WONG, J. Y. M.; OPDEBEECK, JOAN P. Protective efficacy of antigens solubilized from gut membranes of the cattle tick, *Boophilus microplus*. **Immunology**, v. 66, n. 1, p. 149–55, 1989.



Locomotion activity and its effects on the survival of *Amblyomma sculptum* (Acari: Ixodidae) nymphs under laboratory conditions

Ulisses A. Natividade^a, Angelita P. Pimenta^a, Rodolfo S.M. Cezar^a, Marcos H. Pereira^{a,b},
Nelder F. Gontijo^{a,b}, Mauricio R.V. Sant'Anna^{a,b}, Grasielle D. Pessoa^a, Leonardo B. Koerich^a,
Ricardo N. Araujo^{a,b,*}

^a Physiology of Hematophagous Insects Laboratory, Parasitology Department, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

^b Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Amblyomma sculptum

Nymph

Locomotion

Survival

Dispersion

Walking behavior

ABSTRACT

The active locomotion of ticks is directly associated with the epidemiology of tick-borne diseases, as it has important implications for the interaction of ticks with their hosts and their dispersion in the environment. In an attempt to elucidate the factors involved in the dispersion of *Amblyomma sculptum*, the present work aimed to characterize different aspects of the active locomotion of *A. sculptum* nymphs under laboratory conditions. To this end, nymphs were placed on a string at a 70° inclination and their walking activity was recorded daily along with their survival period. During their lifetime, ticks walked an average of 110 m. Their locomotion was not in a straight line and nymphs changed direction 142 times throughout their lifetimes. The mean distance walked per experimental day was 1.8 m, while the average walking distance before changing direction was 52 cm. The distance walked per experimental day reduced over time. The survival of ticks was affected by walking; resting nymphs survived for over 6 months, while the survival of those that walked daily was reduced to approximately 62 days. The results showed that *A. sculptum* nymphs were able to cover distances of over 100 m throughout their lifetimes, but they walked short distances at a time and constantly changed direction. This behavior indicates that ticks are not able to disperse over long distances by means of active locomotion.

1. Introduction

Amblyomma sculptum is a three-host neotropical tick species, which is widely distributed in the rural and urban areas of southeastern Brazil (Martins et al., 2016; Szabo et al., 2013). The species has a 1-year life cycle with distinct seasonal life stages; larvae, nymphs, and adults predominate at autumn and winter, winter and spring, and spring and summer, respectively (Labruna et al., 2002; Oliveira et al., 2000).

Amblyomma sculptum is the main vector of *Rickettsia rickettsii*, which is the causative agent of the most severe form of the Brazilian spotted fever (BSF) (Labruna, 2009), with fatality rates of over 50 % (Oliveira et al., 2016; Sinan, 2019). In the past decades, the number of BSF cases in Brazil increased; between 2007 and 2015, 17,117 notifications were reported (Oliveira et al., 2016).

Amblyomma sculptum has the highest potential for *R. rickettsii* transmission to humans in its nymphal stage (Katz et al., 2009; Pinter et al.,

2011); this could be attributed to their low host specificity, high aggressiveness towards humans, and the fact that they are usually widely distributed over BSF areas (Pinter et al., 2011; Szabo et al., 2013). Their diminutive size makes it difficult for the host to perceive them and is implicated in infection, as bacterial transmission occurs only after approximately 6 h of being attached to their hosts (Pinter et al., 2011). In addition, *A. sculptum* has a poor capacity for sustaining the bacteria in successive tick generations (Soares et al., 2012), so the main scenario is the infection of the ticks when larvae and transmission while nymphs.

The epidemiology of a tick-borne disease is directly associated with the dispersion of ticks in a certain area that is under risk of contamination (Qviller et al., 2016). However, ticks are small, wingless arthropods unable to actively disperse over long distances. Previous research has shown that active locomotion through walking results only in short-distance dispersion (Buczek et al., 2017; Carroll and

* Corresponding author at: Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Parasitologia, bloco i4 sala 177, Av. Antonio Carlos 6627, Pampulha, Belo Horizonte, Minas Gerais, 31270-901, Brazil.

E-mail address: maraújo@icb.ufmg.br (R.N. Araujo).

<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2020.101562>

Received 28 February 2020; Received in revised form 31 August 2020; Accepted 31 August 2020

Available online 25 September 2020

1877-959X/© 2020 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Schmidtman, 1996; Crooks and Randolph, 2006). Therefore, the main form of tick dispersion in a certain area is by their passive transport through their hosts, as ixodid ticks attach to feed and often detach whilst hosts move in the environment (Carroll and Schmidtman, 1996).

Although active locomotion is related to dispersion over short distances, it is strongly associated with the success of finding a host (Buczek et al., 2017), thus increasing the chances of ticks being carried passively by vertebrates over long distances. In general, ticks have a different behavioral repertoire when seeking a host, which includes the ambush behavior (when ticks climb up vegetation and wait for a passing host from a vantage point) and the hunter behavior (when ticks actively walk to a host in rapid forays stimulated by a clue) (Sonenshine, 1991). A tick's host-seeking activity is usually followed by its return to its shelter where the environmental conditions are more favorable for its survival (Knülle and Rudolph, 1982). Irrespective of the foraging behavior type employed, a tick's active locomotion capacity will influence its ability to find a suitable host, as ticks with a longer walking capacity will be able to repeat this behavioral pattern (ambush/hunt - return to shelter) more times.

Amblyomma sculptum is a species known to exhibit aggressive behavior, as it uses both strategies (ambush and hunt) to find a host (Ramos et al., 2017). Both nymphs and adults are easily captured using CO₂ traps (Ramos et al., 2014; Szabo et al., 2009), suggesting that they may walk long distances. However, no studies have effectively measured the locomotion activity of *A. sculptum*. Therefore, the objectives of the present work were to measure the locomotion activity of *A. sculptum* nymphs and to describe its walking characteristics, as well as its impact on tick survival. The results may shed light on the tick-host interaction and on the dispersion capacity of unfed *A. sculptum* individuals.

2. Material and methods

2.1. Experimental ticks

All ticks used in the experiments came from an *A. sculptum* colony maintained in the Physiology of Hematophagous Insects Laboratory at Universidade Federal de Minas Gerais according to Franco et al. (2016). Briefly, ticks were kept in a BOD incubator (New Lab, Brazil) under controlled temperature ($28 \pm 2^\circ\text{C}$) and relative humidity (RH) ($90 \pm 5\%$) conditions in the dark. Larvae, nymphs, and adults were fed using feeding chambers attached to the backs of Swiss mice (Bouchard and Wikel, 2005). The tick colony maintenance procedures were approved by the Ethics Committee for the Use of Animals (CEUA - UFMG) under protocol number 60/2020.

Two groups, each consisting of nymphs that molted on the same day, were used in the experiments. The first group contained 37 nymphs that molted in November and the second contained 41 nymphs that molted in June; therefore, most of the experiments were carried out in the summer or in the winter (Southern Hemisphere), respectively. Ten nymphs from each group were used in the locomotion experiments and the remaining were kept resting to estimate their survival. Nymphs from all groups were kept in 0.5 mL polypropylene tubes (Alen, China) that contained one small piece of filter paper (Unifil, Brazil) (resting substrate) and had small holes on the cap for ventilation, and were maintained inside incubators in the aforementioned conditions, except when they were used in the locomotion apparatus for the experiment.

2.2. Locomotion experiments

The locomotion experiments began 20 days after the nymphs molted. A locomotion apparatus was built for the experiments (Fig. 1), which consisted of a twine wrapped around two brackets with a 70° inclination and a 28 cm free distance, so that the twine could be coiled to one and uncoiled from the other bracket and vice versa using the handset cranks. The free region of the string was surrounded by a plastic cylinder to protect the experimental area from air currents and odors.

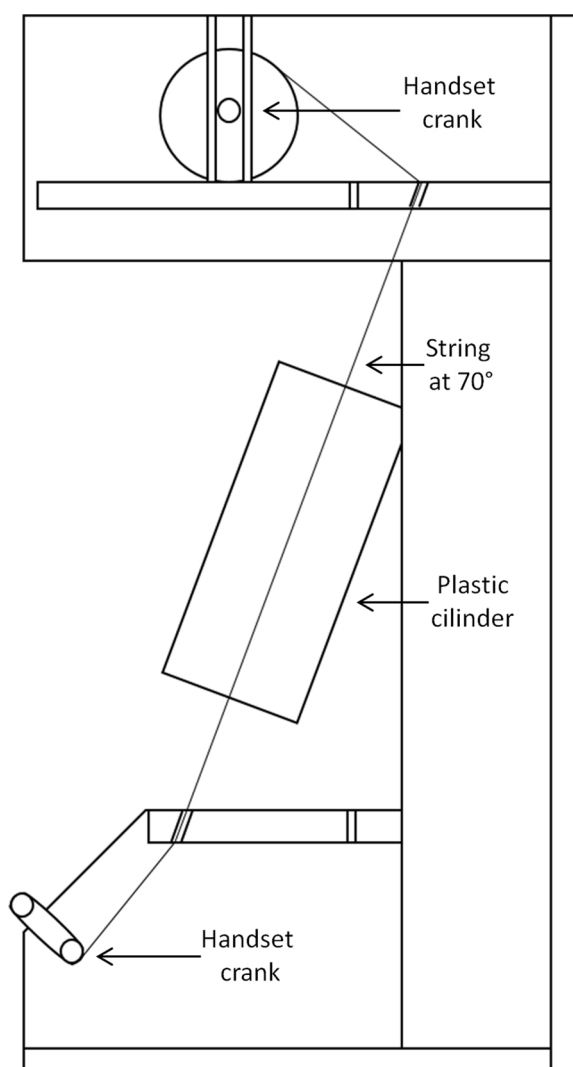


Fig. 1. Sketch of the apparatus built to measure the locomotion of *Amblyomma sculptum* nymphs.

During the standardization of the locomotion experiments, a horizontal twine was also considered. However, ticks did not walk or walked for only a few centimeters. Therefore, the horizontal twine was not used further.

The nymphs were stimulated to walk once a day, between 7 and 11 a. m., starting on the 20th day after they molted until they died. For the daily experiments, they were placed individually on the free region of the string using thin-tipped entomological tweezers to allow for the measurement of any upward or downward movement. As the nymphs started walking, the string was coiled/uncoiled on the brackets so that the nymph remained positioned in the middle of the free area of the string. Each nymph could move freely upward or downward. If the nymph fell, it was repositioned in the same spot on the string. The experiments were considered complete when a nymph fell three times or if it remained motionless for 90 s. To measure the distance walked by each nymph, the evaluator used a marker pen to mark the spot on the string where a nymph started walking, changed direction, and stopped walking. At the end of the experiment, the string piece that was used by the nymph was removed from the apparatus, the distance was calculated based on the marks made on it, and it was then discarded (not used for the other nymphs). All 10 nymphs were tested individually and sequentially every day.

All the experiments were carried out in an insectary with controlled temperature ($28 \pm 2^\circ\text{C}$) and humidity ($60 \pm 5\%$) conditions with

artificial white ceiling lighting. During the tests, only the evaluator (wearing gloves and a lab coat) remained in the experimental room in order to avoid the occurrence of stimuli, such as vibrations, noise, or odors, which could interfere with the results.

To assess the variation in the daily locomotion parameters throughout a nymph's lifespan, the entire experimental period was divided into deciles; each decile accounted for 10 % of each nymph's total experimental days (EDs). The ED average of each parameter was calculated for the deciles and subjected to linear regression analysis.

2.3. Survival measurements

We measured the survival of nymphs from both groups. The nymphs from the rest group were kept in the aforementioned 0.5 mL tubes and were checked daily to estimate their survival. The nymphs from the locomotion experiments remained in the 0.5 mL tubes for most of the time, except when they were on the locomotion apparatus. All the tubes containing the nymphs were kept inside incubators in the dark, at a temperature of $28 \pm 2^\circ\text{C}$ and a humidity of $90 \pm 5\%$. Nymphs that had coiled legs and were immobile, despite stimulation, were considered dead and were discarded.

2.4. Data management and statistical analysis

The data were analyzed using the Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft) and GraphPad Prism 5.0 for Windows (GraphPad Softwares, Inc.) software packages and presented as mean $\pm$ standard deviation (SD) (Tables 1–3) or mean $\pm$ standard error (SEM) (Fig. 3). The normality of data was measured by the Kolmogorov-Smirnov test. All data were classified as parametric, except for the data shown on Table 3; however, non-parametric measurements (median and quartiles) were also generated to enable the comparison with findings of previous studies. The relationship between the variables (Figs. 3 and 4D) was analyzed using linear regression. Significant differences among the survival curves were assessed by the log-rank test (Fig. 4 A and Sup. Fig. 2). Data from the groups that were collected during different seasons were analyzed by a *t*-test (Sup. Fig. 1) or a repeated-measures analysis of variance (ANOVA) followed by a Bonferroni test (Sup. Fig. 3). The significance level was set at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Active locomotion and walking characteristics

Amblyomma sculptum nymphs started walking as soon as they were placed on the apparatus string. They usually started walking straight up until they reached a point when they changed direction and started walking downwards. They kept walking in an up-and-down pattern, until they fell from the string. When they were placed back on the string,

Table 1
Locomotion capacity and walking characteristics of *Amblyomma sculptum* nymphs under laboratory conditions.

Parameter*	Mean $\pm$ SD	Median (1st-3rd quartile)	Minimum-Maximum
Distance (m)	110.3 $\pm$ 34.0	118.4 (78.8–132.1)	55.8–169.1
Distance up (m)	79.6 $\pm$ 23.5	72.6 (61.0–98.5)	47.3–120.3
Distance down (m)	27.7 $\pm$ 16.3	26.0 (15.8–35.4)	5.9–58.4
Duration (hours)	19.1 $\pm$ 4.4	19.4 (15.2–23.4)	11.8–26.2
Velocity (cm/min)	9.1 $\pm$ 2.4	9.4 (4.6–10.8)	4.6–12.8
Change of direction	142 $\pm$ 58	142.5 (102.8–174.5)	51–286

* The values are sums of the measurements obtained throughout a nymph's life.

Table 2

Locomotion distance and change of direction per experimental day in *Amblyomma sculptum* nymphs under laboratory conditions.

Parameter	Mean $\pm$ SD	Median (1st-3rd quartile)	Minimum-Maximum
Distance (m/ED)	1.8 $\pm$ 1.8	1.4 (0.4–2.6)	0.0–15.4
Distance up (m/ED)	1.3 $\pm$ 1.2	1.2 (0.2–1.9)	0.0–8.9
Distance down (m/ED)	0.5 $\pm$ 0.7	0.13 (0.0–0.7)	0–6.2
Duration (min)	18.9 $\pm$ 16.4	15 (7–25)	1.5–120
Change of direction/ED	2.6 $\pm$ 3.0	2 (0–4)	0–20

*ED = Experimental day.

Table 3

Locomotion distance in unique directions traversed by *Amblyomma sculptum* nymphs under laboratory conditions.

Parameter*	Mean $\pm$ SD	Median (1st-3rd quartile)	Minimum-Maximum
Distance (cm)	52.0 $\pm$ 54.3	38 (11–75)	0–666
Distance up (cm)	62.7 $\pm$ 60.8	49 (15–91)	0–666
Distance down (cm)	35.0 $\pm$ 35.8	24 (8–50)	0–287

* Values represent the locomotion distance until nymphs changed direction.

they repeated the up-and-down walking behavior, but this time, they fell from the string sooner. In a preliminary experiment, we observed that after the nymphs had fallen a third time, most would not walk on the string again or they would only walk shorter distances and they would fall from the string quickly.

In order to gain a general view of the locomotion characteristics under laboratory conditions, several parameters were measured (Tables 1–3). The average distance that *A. sculptum* nymphs were able to walk throughout their lives was 110.3 m. The total distance walked varied among specimens, with some nymphs walking more than three times longer than others (Table 1). The nymphs' locomotion did not follow a certain direction, however they alternated between walking upward and downward 142 times on average throughout the period they spent walking. Direction was the parameter that varied the most among individuals, as some ticks changed their direction more than five times than others (Table 1). The nymphs walked longer distances (approximately three times longer) upwards than they did downwards (Table 1).

The average speed of the locomotion was 9.1 cm/min and the nymphs remained in the apparatus for 19.1 h throughout their lives (Table 1). It is important to note that the nymphs were walking most of the time they were in the apparatus, however they also remained still for certain periods of time. The walking time and velocity varied greatly among individuals, so much so that some nymphs walked three times longer or run three times faster than others (Table 1).

The analysis of the locomotion characteristics for each ED showed that nymphs walked 1.8 m/ED on average (Table 2), with the 0.6 and 2.5 m/ED distances being the most frequent (in 47.5 % of the EDs) (Fig. 2A). Most nymphs changed direction 1–6 times (54.9%) (Fig. 2B) and the distance/ED walked upwards was approximately three times longer than the distance/ED walked downwards (Table 2).

The distance nymphs walked before changing direction was also analyzed. They walked, on average, 52 cm before changing direction and this distance was almost twice longer upwards (62.7 cm) than it was downwards (35 cm) (Table 3). Most straight walks (60.5 %) were between 10 and 100 cm, however 12.7 % of the walks ranged between 101 and 200 cm and only 2.1 % of the walks were above 200 cm (Fig. 2C).

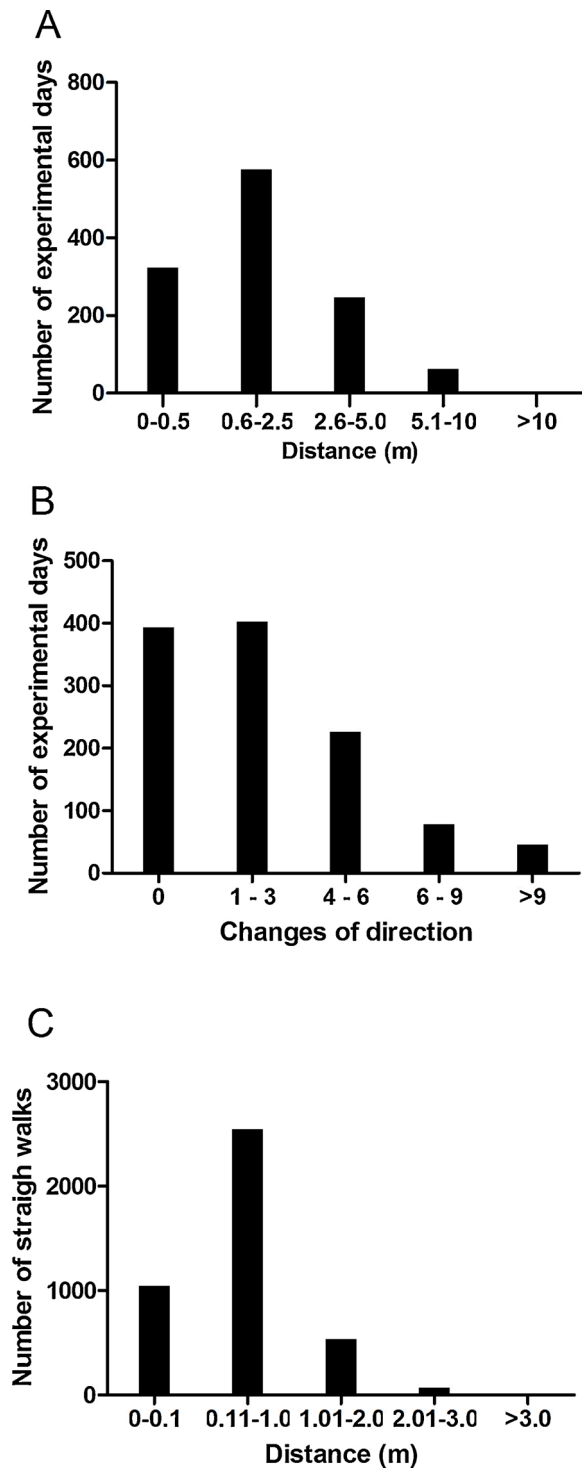


Fig. 2. Histograms of distance walked and change of direction of *Amblyomma sculptum* nymphs. A and B - distance walked and change of direction per experimental day, respectively, C- distance walked on a straight line without change of direction.

3.2. Locomotion characteristics throughout the survival period

The nymphs' locomotion characteristics were also assessed throughout their survival period. All parameters (distance, speed, duration, and change of direction) reduced significantly ($p < 0.01$) with the age of the nymphs (Fig. 3). Nymphs walked 3.4 ± 1.5 m/ED at an average velocity of 12.2 ± 4.4 cm/min in the first decile of their lifespan, whereas in the ninth decile, the average ED distance was 2.6 times

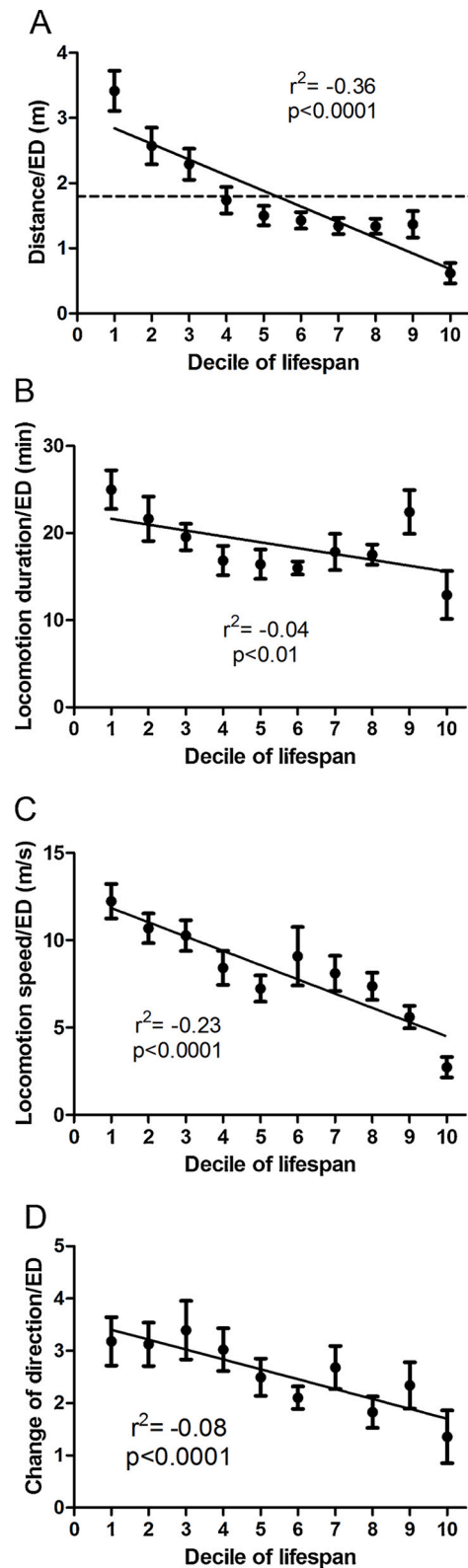


Fig. 3. Influence of the nymph age on the locomotion parameters of *Amblyomma sculptum* nymphs under laboratory conditions. The values in each decile represent the mean $\pm$ SEM of the values measured in the experimental days of each decile. ED = Experimental day. Statistical analysis: Linear regression, A - $F_{1,198} = 109.6$ and $y = 3.08 - 0.24x$, B - $F_{1,198} = 8.9$ and $y = 22.3 - 0.67x$, C - $F_{1,198} = 58.8$ and $y = 12.7 - 0.82x$, and D - $F_{1,198} = 17.1$ and $y = 3.6 - 0.19x$. The dashed line in A represents the overall mean distance.

shorter (1.3 ± 0.9 m/ED) and the average ED velocity was approximately 2.2 times slower (5.6 ± 2.9 cm/min) (Fig. 3A and C). The distance and velocity differences between the first and the last decile were even higher (these were 5.7 and 4.5 times shorter and lower in the last decile, respectively) (Fig. 3A and C); however, it is important to note that in the last decile several nymphs were close to death and were mostly inactive.

3.3. Influence of daily locomotion on the survival of nymphs

Locomotion affected significantly the survival of ticks ($p < 0.0001$, Fig. 4A). Nymphs subjected to daily locomotion survived for 60.7 days (median = 56.5 days) on average, whereas the survival of the inactive nymphs was more than three times higher (mean = 190.5 days; median = 201 days).

The survival of the nymphs that were kept restrained was mainly in the 150–249 day range (this applied to 72.4 % of the nymphs), while the survival of the nymphs subjected to daily locomotion was mainly in the 50–69 day range (this applied to 85 % of the nymphs) (Fig. 4B and C). It is noteworthy that a single nymph survived 98 days, which was at least 29 days longer than the survival period of each of the other nymphs. However, this longer lifespan did not result in a longer locomotion distance, as this nymph walked 91.8 m, which was below the average and different from the tendency observed in other nymphs. When the distance was analyzed in association with survival (excluding the nymph that survived 98 days), there was a significant association ($p < 0.05$) (Fig. 4D), indicating that the nymphs that survived for longer periods were also the ones that walked longer distances.

Finally, it is important to note that *A. sculptum* is a seasonal tick species, therefore we checked for possible differences in the results of the experiments performed in two different seasons (summer and winter). However, there was no statistical difference (Sup. Fig. 1–3), confirming that no bias occurred when the data from both experiments were analyzed together.

4. Discussion

The present work described the active locomotion of *A. sculptum* nymphs as well as their walking characteristics under laboratory conditions. The results showed that *A. sculptum* nymphs were able to walk long distances for many hours (the average distance walked throughout their lifetimes was 110.3 m in approximately 19.1 h). However, the nymphs did not walk in a straight line as they tended to change direction constantly and they traversed shorter distances at a time. Such behavior supports the conclusion that nymphal *A. sculptum* are not able to disperse over long distances without being facilitated by host movement.

In one ED at controlled environmental conditions (temperature at 28 ± 2 °C and humidity at $60 \pm 5\%$), nymphs walked, on average, 1.8 m in 18.9 min. These results could indicate the capacity of locomotion in one walking event. Some nymphs traveled more than 3 m in one ED. However, this was a rare behavior as most of the distances walked per ED were between 0.6 and 2.5 m (Fig. 2A).

The comparison of the results of the present study with those of previous research employing different experimental conditions and using specific stimuli is not trivial. However, the results obtained to date help characterize the locomotion behavior of different species. In general, members of the genera *Ixodes* and *Dermacentor* are believed to walk short distances. In an experiment with relatively similar temperature and relative humidity conditions (25 °C and 60 % RH) as those used in our study (28 °C and 60 % RH), Perret et al. (2003) found that *Ixodes ricinus* nymphs walked 0.38 m (median per walking event). *Ixodes ricinus* nymphs walked even less in the experiments performed by Crooks and Randolph (2006) who used horizontal arenas and variable environmental conditions; 30–50 % of the ticks walked less than 14 cm within 24 h.

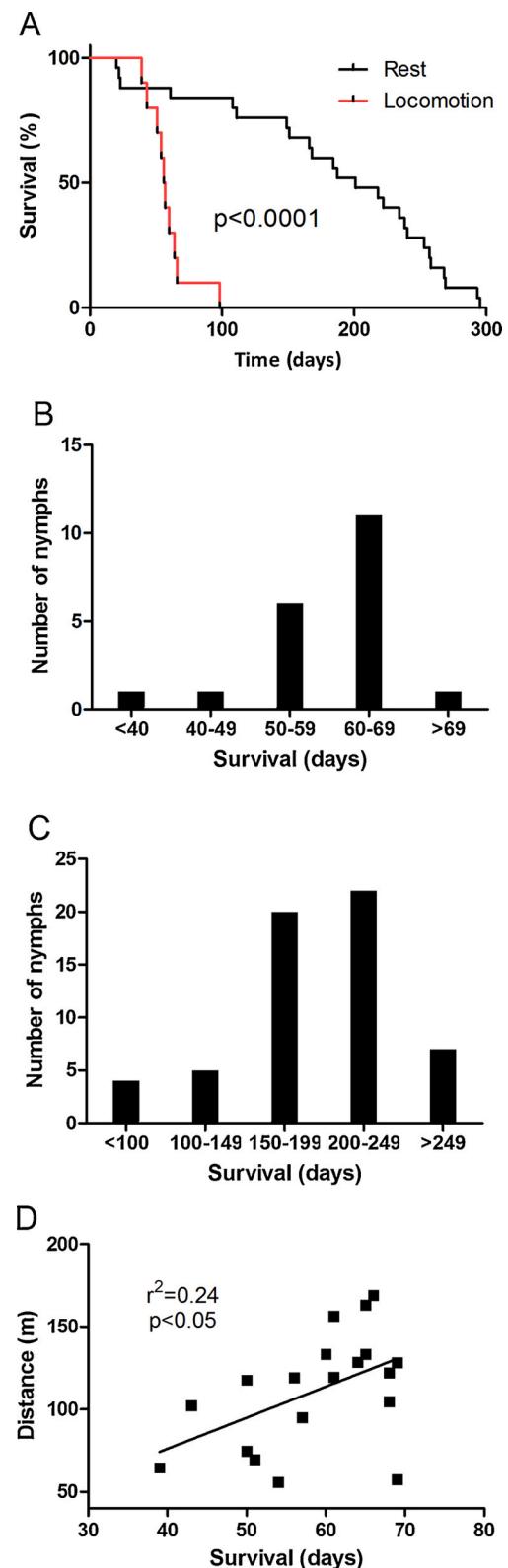


Fig. 4. Effect of daily locomotion on the survival of *Amblyomma sculptum* nymphs. A - Survival of nymphs kept at rest (kept in 0.5 mL tubes with restriction of circulation) and of those subjected to daily locomotion (stimulated to walk once a day); B - Histogram of the survival of nymphs subjected to daily locomotion; C - Histogram of the survival of nymphs restrained with restricted locomotion; D - Association between the nymphs' survival and locomotion distance. Statistical analysis: A: Log-rank test and B: Linear regression ($F_{1,17} = 5.2$; $y = 0.84 + 1.9x$).

Under natural conditions, the active locomotion of adult *Dermacentor reticulatus* results only in short-distance dispersion. After 2–3 weeks, ticks were found only 60 cm away from the release area (Buczek et al., 2017). Additionally, *Ixodes scapularis* nymphs dispersed only for 2–3 m over several weeks (Carroll and Schmidtman, 1996). However, the authors of the aforementioned studies did not measure the total distance walked by the ticks, as it is likely that they did not travel in a straight line. Other studies on *Ixodes* ticks also found that their locomotion was constrained to short distances (Goddard, 1993; Gray, 1985; Loye and Lane, 1988).

On the other hand, *Amblyomma* species are known to walk longer distances. Koch and Mcnew (1982) showed that by using CO₂ traps, most of the *Amblyomma americanum* nymphs released in an area can be recovered at a distance of 3.1 m after a few hours and that a few ticks travel distances longer than 6 m. In an experiment that lasted three days, Wilson et al. (1972) collected adult *A. americanum* as far as 21.3 m away. The findings of the present study demonstrate that *A. sculptum* behaved more like *A. americanum*, which are considered hunter ticks that walk randomly for longer distances even in the absence of stimuli. The considerably higher walking speed of *A. sculptum* (median 9.4 cm/min) recorded in the present study compared with that of *I. ricinus* (0.31 to 0.97 cm/min under different conditions), is also worth noting (Perret et al., 2003).

The distance traveled in a straight line, without changing direction, was also evaluated. This distance could be associated with different features, such as the distance from the floor while positioning during ambush behavior (most likely) or the distance walked on a foray in search of a host; the latter is less likely as we did not use host stimuli in the present work. Our results showed that the average distance traveled in a straight line was 52 cm. However, when nymphs walked distances of 62.7 cm upwards, they tended to change direction, go downwards for 35 cm, and then change direction again. These findings suggest that ticks tend to climb and remain at heights between 62.7 and 27.7 cm. Indeed, these results are in line with questing height findings for *Amblyomma* nymphs in natural environments, wherein *A. sculptum* nymphs quested at heights between 12 and 52 cm (Ramos et al., 2017) and *Amblyomma* spp. nymphs quested at heights between 30 and 40 cm above the ground level (Szabo et al., 2009).

Based on the nymphs' total locomotion capacity (110.3 m throughout their lifetimes) and if we consider the daily distance traveled (1.8 m per ED) as the distance walked before and after questing, it is possible that *A. sculptum* is able to make 61.2 assaults throughout its lifetime. If we consider the ticks' climbing behavior that is followed by returning to their shelter and the average height of shrubs that they climb onto (62.7 cm), this activity pattern could be repeated by *A. sculptum* approximately 88 times. This demonstrates these ticks' great ability to search for hosts, which greatly increases their survival chances and explains their success in the environment. Such host seeking ability may be one of the reasons why this tick's population increases considerably and quickly when its main hosts become abundant, compared with other tick species that share the same hosts (Nunes et al., 2019).

Locomotion is costly for ticks and it influences their survival directly. Under laboratory conditions where nymphs were under constant temperatures, high humidity, and trapped in tubes with a restricted locomotion area, they were able to survive for more than 6 months; in contrast, the survival of nymphs that were subjected to daily locomotion was reduced to approximately 2 months. Interestingly, the ticks that walked longer distances lived longer; this could be attributed to the size of their energy reserves. Ticks with higher energy reserves are able to both walk and survive longer (Crooks and Randolph, 2006).

The sole nutrient source of ticks is blood and the energy reserves of nymphs are established only at the larval stage. An unsuccessful incursion in search for a host will expend the ticks' energy reserves and reduce their lifespans. The findings of the present work suggest that ticks modulate their locomotion according to their energy reserves. Older ticks have lower reserves and, in a possible attempt to conserve their

energy, they tend to walk shorter distances at a time and at a slower velocity.

Body hydration may also influence tick survival. However, ticks rest at high humidity environments (90 % RH), a condition that enables them to regain the water they lost during the walking period (Lees, 1946). Therefore, in the present study, energy was, most likely, the main parameter that influenced tick survival.

Amblyomma sculptum is a seasonal tick, with nymphs occurring mainly during the autumn and winter. However, larval behavioral diapause regulates seasonality under natural conditions (Labruna et al., 2003) and maintenance in a temperature-controlled incubator is sufficient to disrupt seasonality (Cabrera and Labruna, 2009). The findings of the aforementioned studies corroborate our results.

The presence of stimuli also exerts great influence on locomotion, whether it is associated with the search for a host (Carroll et al., 1996) or with the pursuit of more favorable environmental conditions for survival (Knülle and Rudolph, 1982). Ticks tend to avoid direct sunlight and move to microenvironments with cooler temperatures and higher humidity (Knülle and Rudolph, 1982). Indeed, body hydration is one of the main features coordinating the tick walking and questing behaviors (Knülle and Rudolph, 1982). Ticks lose water during questing and when hydration conditions are unfavorable, they stop questing and tend to move to environments with higher humidity, a condition that usually occurs within the vegetation mat (Lees, 1948).

In the present work, no host stimuli were used and the aim was to assess the distances that ticks are able to walk rather than evaluate the stimuli that encourage locomotion. However, it is expected that the presence of stimuli could alter some of the measured parameters, especially the distance walked on a foray (Carroll et al., 1996). The presence of an observer could have exerted bias on the ticks' walking behavior, even though we took the necessary measures to avoid approaching them or to exert any other stimulatory effect. However, we do not believe that the entire distance walked was affected by the observer's presence.

5. Conclusions

The *A. sculptum* individuals examined in this study were able to walk distances longer than 100 m throughout their lifespans in several walking events. However, the distances walked before changing direction were approximately 52 cm and nymphs walked approximately 1.8 m per experimental day. Daily locomotion reduced the survival of nymphs by approximately three times, from more than 6 months to approximately 2 months.

Author contributions

UAN, AP, and RSMC performed the experiments and analyzed and discussed the data; UAN and RNA wrote the paper; MHP, NFG, MRVS, GDP, LBK, and RNA conceived and designed the experiments, provided the resources, analyzed and discussed the data, and reviewed the paper; RNA supervised and coordinated the experiments.

Declaration of Competing Interest

None.

Acknowledgments

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG); Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES); and INCT- Entomologia Molecular. We would like to thank Marcia G. Campos for rearing the ticks. We would like to thank Editage (www.editage.com) for English language editing.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2020.101562>.

References

- Bouchard, K.R., Wikel, S.K., 2005. Care, maintenance, and experimental infestation of ticks in the laboratory setting. In: Marquardt, W.C. (Ed.), *Biology of Disease Vectors*. Elsevier, San Diego, pp. 705–712.
- Buczek, A., Zajac, Z., Wozniak, A., Kulina, D., Bartosik, K., 2017. Locomotor activity of adult *Dermacentor reticulatus* ticks (Ixodida: Ixodidae) in natural conditions. *Ann. Agric. Environ. Med.* 24, 271–275. <https://doi.org/10.5604/12321966.1230736>.
- Cabrera, R.R., Labruna, M.B., 2009. Influence of photoperiod and temperature on the larval behavioral diapause of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). *J. Med. Entomol.* 46, 1303–1309. <https://doi.org/10.1603/033.046.0608>.
- Carroll, J.F., Schmidtman, E.T., 1996. Dispersal of blacklegged tick (Acari: Ixodidae) nymphs and adults at the woods-pasture interface. *J. Med. Entomol.* 33, 554–558. <https://doi.org/10.1093/jmedent/33.4.554>.
- Carroll, J.F., Mills Jr., G.D., Schmidtman, E.T., 1996. Field and laboratory responses of adult *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) to kairomones produced by white-tailed deer. *J. Med. Entomol.* 33, 640–644. <https://doi.org/10.1093/jmedent/33.4.640>.
- Crooks, E., Randolph, S.E., 2006. Walking by *Ixodes ricinus* ticks: intrinsic and extrinsic factors determine the attraction of moisture or host odour. *J. Exp. Biol.* 209, 2138–2142. <https://doi.org/10.1242/jeb.02238>.
- Franco, P.F., Silva, N.C., Fazito do Vale, V., Abreu, J.F., Santos, V.C., Gontijo, N.F., Valenzuela, J.G., Pereira, M.H., Sant'Anna, M.R., Gomes, A.P., Araujo, R.N., 2016. Inhibition of the classical pathway of the complement system by saliva of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). *Exp. Parasitol.* 164, 91–96. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2016.03.002>.
- Goddard, J., 1993. Ecological studies of *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) in central Mississippi: lateral movement of adult ticks. *J. Med. Entomol.* 30, 824–826. <https://doi.org/10.1093/jmedent/30.4.824>.
- Gray, J.S., 1985. A carbon dioxide trap for prolonged sampling of *Ixodes ricinus* L. populations. *Exp. Appl. Acarol.* 1, 35–44. <https://doi.org/10.1007/bf01262198>.
- Katz, G., Neves, V.L.F.C., Angerami, R.N., Nascimento, E.M.M., Colombo, S., 2009. Statistics and epidemiology of Brazilian spotted fever in São Paulo, Brazil. *Bepa* 6, 4–13.
- Knülle, W., Rudolph, D., 1982. Humidity relationships and water balance of ticks. In: Obenchain, F.D., Galun, R. (Eds.), *Physiology of Ticks*. Pergamon Press, Oxford, pp. 43–70.
- Koch, H.G., Mcnew, R.W., 1982. Sampling of lone star ticks (Acari, Ixodidae) - dry ice quantity and capture success. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 75, 579–582. <https://doi.org/10.1093/aesa/75.5.579>.
- Labruna, M.B., 2009. Ecology of *Rickettsia* in South America. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1166, 156–166. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04516.x>.
- Labruna, M.B., Kasai, N., Ferreira, F., Faccini, J.L., Gennari, S.M., 2002. Seasonal dynamics of ticks (Acari: Ixodidae) on horses in the state of São Paulo, Brazil. *Vet. Parasitol.* 105, 65–77. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(01\)00649-5](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(01)00649-5).
- Labruna, M.B., Amaku, M., Metzner, J.A., Pinter, A., Ferreira, F., 2003. Larval behavioral diapause regulates life cycle of *Amblyomma cajennense* (Acari : Ixodidae) in Southeast Brazil. *J. Med. Entomol.* 40, 170–178. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-40.2.170>.
- Lees, A.D., 1946. The water balance in *Ixodes ricinus* L. and certain other species of ticks. *Parasitol.* 37, 1–20. <https://doi.org/10.1017/s0031182000013093>.
- Lees, A.D., 1948. The sensory physiology of the sheep tick, *Ixodes ricinus* L. *J. Exp. Biol.* 25, 145–207.
- Loye, J.E., Lane, R.S., 1988. Questing behavior of *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae) in relation to meteorological and seasonal factors. *J. Med. Entomol.* 25, 391–398. <https://doi.org/10.1093/jmedent/25.5.391>.
- Martins, T.F., Barbieri, A.R., Costa, F.B., Terassini, F.A., Camargo, L.M., Peterka, C.R., de, C.P.R., Dias, R.A., Nunes, P.H., Marcili, A., Scofield, A., Campos, A.K., Horta, M. C., Guilloux, A.G., Benatti, H.R., Ramirez, D.G., Barros-Battesti, D.M., Labruna, M.B., 2016. Geographical distribution of *Amblyomma cajennense* (sensu lato) ticks (Parasitiformes: Ixodidae) in Brazil, with description of the nymph of *A. cajennense* (sensu stricto). *Parasit. Vectors* 9, 186. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1460-2>.
- Nunes, F.B.P., da Silva, S.C., Cieto, A.D., Labruna, M.B., 2019. The dynamics of ticks and capybaras in a residential park area in southeastern Brazil: implications for the risk of *Rickettsia rickettsii* infection. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 19, 711–716. <https://doi.org/10.1089/vbz.2019.2479>.
- Oliveira, P.R., Borges, L.M., Lopes, C.M., Leite, R.C., 2000. Population dynamics of the free-living stages of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) on pastures of Pedro Leopoldo, Minas Gerais State, Brazil. *Vet. Parasitol.* 92, 295–301. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(00\)00322-8](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(00)00322-8).
- Oliveira, S.V., Guimarães, J.N., Reckziegel, G.C., Neves, B.M., Araujo-Vilges, K.M., Fonseca, L.X., Pinna, F.V., Pereira, S.V., de Caldas, E.P., Gazeta, G.S., Gurgel-Gonçalves, R., 2016. An update on the epidemiological situation of spotted fever in Brazil. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* 22, 22. <https://doi.org/10.1186/s40409-016-0077-4>.
- Perret, J.L., Guerin, P.M., Diehl, P.A., Vlimant, M., Gern, L., 2003. Darkness induces mobility, and saturation deficit limits questing duration, in the tick *Ixodes ricinus*. *J. Exp. Biol.* 206, 1809–1815. <https://doi.org/10.1242/jeb.00345>.
- Pinter, A., França, A.C., Souza, C.E., Sabbo, C., Nascimento, E.M.M., Santos, F.C.P., Katz, G., Labruna, M.B., Holman, M.M., Alves, M.J.C., Horta, M.C., Mascheretti, M., Mayo, R.C., Angerami, R.N., Leite, R.M., Souza, S.S., Oliveira, S.C., 2011. Febre maculosa brasileira. *Bepa. Suplemento*, 8, 1–32.
- Qviller, L., Viljugrein, H., Loe, L.E., Meisingset, E.L., Mysterud, A., 2016. The influence of red deer space use on the distribution of *Ixodes ricinus* ticks in the landscape. *Parasit. Vectors* 9, 545. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1825-6>.
- Ramos, V.D., Osava, C.F., Piovezan, U., Szabo, M.P.J., 2014. Complementary data on four methods for sampling free-living ticks in the Brazilian Pantanal. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 23, 516–521. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612014091>.
- Ramos, V.D.N., Osava, C.F., Piovezan, U., Szabo, M.P.J., 2017. Ambush behavior of the tick *Amblyomma sculptum* (*Amblyomma cajennense* complex) (Acari: Ixodidae) in the Brazilian Pantanal. *Ticks Tick-borne Dis.* 8, 506–510. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2017.02.011>.
- Sinan, 2019. Ministério da Saúde do Brasil. Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan. <http://portalsinan.saude.gov.br/febre-maculosa>.
- Soares, J.F., Soares, H.S., Barbieri, A.M., Labruna, M.B., 2012. Experimental infection of the tick *Amblyomma cajennense*, Cayenne tick, with *Rickettsia rickettsii*, the agent of Rocky Mountain spotted fever. *Med. Vet. Entomol.* 26, 139–151. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2011.00982.x>.
- Sonenshine, D.E., 1991. Ecology of non-nidicolous ticks. In: Sonenshine, D.E. (Ed.), *Biology of Ticks*. Oxford University Press, New York, pp. 3–65.
- Szabo, M.P., Labruna, M.B., Garcia, M.V., Pinter, A., Castagnoli, K.C., Pacheco, R.C., Castro, M.B., Verez, V.A., Magalhães, G.M., Vogliotti, A., Duarte, J.M., 2009. Ecological aspects of the free-living ticks (Acari: Ixodidae) on animal trails within Atlantic rainforest in south-eastern Brazil. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 103, 57–72. <https://doi.org/10.1179/136485909X384956>.
- Szabo, M.P., Pinter, A., Labruna, M.B., 2013. Ecology, biology and distribution of spotted-fever tick vectors in Brazil. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 3, 27. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00027>.
- Wilson, J.G., Sauer, J.R., Hair, J.A., Kinzer, D.R., 1972. Chemo-attraction in lone star tick (Acarina: Ixodidae) .1. Response of different developmental stages to carbon-dioxide administered via traps. *J. Med. Entomol.* 9, 245–252. <https://doi.org/10.1093/jmedent/9.3.245>.