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

Parâmetros biológicos de *Amblyomma sculptum* alimentados em diferentes linhagens de camundongos e desenvolvimento de resposta imune antissaliva

Izabela Cosso Tavares Ribeiro

Belo Horizonte
Abril de 2021

Izabela Cosso Tavares Ribeiro

Parâmetros biológicos de *Amblyomma sculptum* alimentados em diferentes linhagens de camundongos e desenvolvimento de resposta imune antissaliva

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para obtenção do grau de Mestre em Parasitologia.
Área de concentração: Entomologia

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Nascimento Araújo

Belo Horizonte
Abril de 2021

Dedico a minha família e a todos que me ajudaram a chegar até aqui. Eu amo vocês!!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por sempre me guiar, me proteger e iluminar os meus caminhos para a realização dos meus sonhos.

Ao meu orientador, professor Ricardo Nascimento Araújo, por acreditar no meu potencial, por todos os ensinamentos, pela paciência e por toda dedicação durante esses anos de orientação. Muito obrigada.

Aos meus pais, Angela e Marcelo, por absolutamente tudo. Não existem palavras para descrever o quanto eu sou grata a vocês. Se eu estou aqui hoje, sendo a primeira da família a fazer uma pós-graduação em uma universidade de prestígio, é graças a vocês. Vocês são meu maior exemplo e meu maior orgulho!

À minha irmã Manuela, por todo amor e compreensão. E ao meu cachorro Sadam, que por várias vezes me obrigou a dar uma pausa nos dias estressantes para brincar de bolinha, dar biscoitinho e ganhar muitos lambeijos.

Aos meus avós Alcindo e Dalva por sempre vibrarem com minhas conquistas, e à minha vovó Leni (in memorian) que eu tenho certeza que também vibra muito lá de cima.

Ao meu namorado Gustavo, por sempre torcer por mim e acreditar que eu sou capaz. Obrigada pela paciência e todo apoio que você me deu meu amor.

Aos meus padrinhos Adriana e Paulo, e a todos os meus tios, primos e amigos que sempre acompanharam a minha trajetória acadêmica e sempre torceram muito por mim.

Aos professores Nelder, Marcos Horácio, Maurício, Leonardo e Graziele, do Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos, por todos ensinamentos e contribuições dadas ao longo da minha iniciação científica e do meu mestrado.

Aos meus amigos e principais envolvidos nesse trabalho, Jéssica, Rodolfo, Paula e Gabriel. Sem vocês o meu mestrado frente a essa pandemia teria sido bem mais difícil.

Obrigada pela colaboração, pela disponibilidade, por toda ajuda e, principalmente, pela amizade. Vocês estão no meu coração.

À Márcia e ao Cézar, por todo apoio que vocês sempre me ofereceram. Não somente o apoio técnico, mas por terem feito meus dias de trabalho mais leves sendo com uma risada ou uma história contada.

A todos os amigos do LFIH, principalmente à Isabella, Adalberto, Denise, Natália, Luccas, Luiza, Luisa, Arthur, Lidiane, Daniel, Maykelin, Ulisses e Angelita. Obrigada pela parceria, pela ajuda e por fazerem do nosso ambiente de trabalho um espaço amigável que tem muita troca de conhecimento e bom-humor.

Ao Programa de Pós Graduação em Parasitologia e a todos os professores por todo ensinamento. Agradeço especialmente à Sumara e à Sibele, pela disponibilidade, ajuda e carinho que sempre tiveram com todos nós.

A todos que de alguma forma contribuíram para que esse trabalho fosse feito.

E por último, agradeço pela pessoa que me tornei durante o mestrado em meio a pandemia. Uma mulher forte que aprendeu a ser resiliente e a respeitar o tempo das coisas. E que acima de tudo, não desiste dos seus sonhos!

"Eu estou entre aqueles que pensam que a ciência tem uma grande beleza. Um cientista em seu laboratório não é apenas um técnico: ele também é uma criança colocada à frente de fenômenos naturais que o impressionam como um conto de fadas." - Marie Curie

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BOD – demanda bioquímica do oxigênio

BSA – *Bovine serum albumin* (albumina do soro bovino)

cm – centímetro

DAB – dietil-amino-etil-benzidina

DP – desvio-padrão

EGS – extrato de glândula salivar

g – grama

h – hora

IFN-g – interferon-gama

IgE – imunoglobulina E

IgG – imunoglobulina G

IgG2 – imunoglobulina G, subtipo 2

IL-1 – interleucina 1

IL-33 – interleucina 33

IL-4 – interleucina 4

kDa – kilodaltons

kg – quilogramas

kST2 – camundongo BALB/c knockout para o receptor ST2

M – molar

mA – miliampère

mg – miligramas

mL – mililitros

mM – milimolar

n – número amostral

nm – nanômetro

PBS – *phosphate buffered saline* (tampão fosfato)

PBS-T – *phosphate buffered saline* (tampão fosfato) + tween 20

SDS-PAGE – *Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio)

sST2 – forma solúvel do receptor ST2

ST2L – forma ligada a membrana do receptor ST2

Th1 – T helper 1

Th2 – T helper 2

V – volts

α-Gal – galactose-alfa-1,3-galactose

µg – micrograma

µL – microlitro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estágios de desenvolvimento de *Amblyomma sculptum*: Ovos (A); Larva (B); Ninfa (C) e Adultos: Macho (D) e Fêmea (E) (Neves et al., 2016).....19

Figura 2: Ciclo biológico do *Amblyomma sculptum* (Abreu, 2018).....20

Figura 3: Mapa do Brasil com os estados da federação, demonstrando a distribuição geográfica do complexo *Amblyomma cajennense* sensu lato no país (Martins, 2014).....22

Figura 4: Colagem da câmara de alimentação em camundongo Swiss.....36

Figura 5: Extração da saliva de *Amblyomma sculptum*. (A) Aplicação de pilocarpina 2% na hemocele dos carrapatos. (B) Coleta da saliva com o auxílio de micropipeta.....37

Figura 6: Obtenção do Extrato de Glândula Salivar (EGS) de *Amblyomma sculptum*. (A) Fêmea com tegumento rebatido para visualização dos órgãos internos. (B) Glândulas salivares isoladas.....38

Figura 7: Níveis de IgG anti-EGS de *Amblyomma sculptum* presentes no soro de camundongos infestados. Os dados representam a média ± DP de sete camundongos. As placas foram sensibilizadas com extrato de glândula salivar (EGS) de *A. sculptum*. Amostras: Controle negativo (C-), 7 dias após primeira infestação (Ap 1ª), 7 dias após segunda infestação (Ap 2ª) e 7 dias após terceira infestação (Ap 3ª).....53

Figura 8: Níveis de IgG anti-saliva de *Amblyomma sculptum* presentes no soro de camundongos infestados. Os dados representam a média ± DP de sete camundongos. As placas foram sensibilizadas com saliva de *A. sculptum*. Amostras: Controle negativo (C-), 7 dias após primeira infestação (Ap 1ª), 7 dias após segunda infestação (Ap 2ª) e 7 dias após terceira infestação (Ap 3ª).....54

Figura 9: SDS-PAGE a 12,5% e Western Blot de extrato de glândula salivar (EGS) de *Amblyomma sculptum* com pool de soro dos camundongos Swiss alimentados na 1ª, 2ª e 3ª infestações.....55

Figura 10: SDS-PAGE a 12,5% e Western Blot de saliva de *Amblyomma sculptum* com pool de soro dos camundongos Swiss alimentados na 1ª, 2ª e 3ª infestações.....56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Grupos experimentais para avaliação dos parâmetros biológicos de *Amblyomma sculptum* alimentados em camundongos.....34

Tabela 2: Parâmetros biológicos de larvas de *Amblyomma sculptum* alimentadas em camundongos das linhagens BALB/c, C57BL/6 e Swiss.....43

Tabela 3: Parâmetros biológicos de ninfas de *Amblyomma sculptum* alimentadas em camundongos das linhagens BALB/c, C57BL/6 e Swiss.....44

Tabela 4: Parâmetros biológicos de ninfas de *Amblyomma sculptum* alimentadas em camundongos das linhagens BALB/c e BALB/c knockout para o receptor ST2 (kST2).....45

Tabela 5: Parâmetros biológicos de fêmeas de *Amblyomma sculptum* alimentadas em camundongos Swiss.....46

Tabela 6: Parâmetros biológicos de ninfas de *Amblyomma sculptum* alimentadas em camundongos BALB/c com diferentes densidades parasitárias.....47

Tabela 7: Parâmetros biológicos de ninfas de *Amblyomma sculptum* alimentadas em camundongos BALB/c knockout para o receptor ST2 (kST2) com diferentes densidades parasitárias.....48

Tabela 8: Parâmetros biológicos de ninfas de *Amblyomma sculptum* alimentadas sucessivamente em camundongos da linhagem BALB/c.....49

Tabela 9: Parâmetros biológicos de ninfas de *Amblyomma sculptum* alimentadas sucessivamente em camundongos da linhagem BALB/c knockout para o receptor ST2 (kST2).....50

Tabela 10: Parâmetros biológicos de ninfas de *Amblyomma sculptum* alimentadas sucessivamente em camundongos da linhagem Swiss.....51

Tabela 11: Tabela 11: Razão machos/fêmeas de *Amblyomma sculptum* obtida em cada infestação em camundongos Swiss.....52

Tabela 12: Peso após a alimentação de ninfas de *Amblyomma sculptum* que viraram machos e fêmeas em cada infestação de camundongos Swiss (mg).....52

RESUMO

Amblyomma sculptum, carrapato da família Ixodidae, possui como principais hospedeiros os equinos, as capivaras e as antas. Estes hospedeiros não desenvolvem uma imunidade efetiva contra o carrapato e podem apresentar altas cargas parasitárias. Tendo em vista a necessidade de desenvolvimento de novas formas de combate aos carrapatos, a manutenção de colônias de *A. sculptum* em laboratório com uma quantidade suficiente de espécimes para a realização de experimentos é essencial. Entretanto, o uso de camundongos para a manutenção de colônias de *A. sculptum* ainda é pouco descrito na literatura. No presente estudo, o objetivo principal foi descrever os parâmetros biológicos do carrapato *A. sculptum* alimentado em diferentes linhagens de camundongos e avaliar o desenvolvimento de resposta imune pelos hospedeiros. Para isso, a alimentação de *A. sculptum* foi feita em camundongos C57BL/6, Swiss, BALB/c e BALB/c knockout para o receptor ST2 (kST2). Ninfas do carrapato-estrela também foram alimentadas em diferentes densidades parasitárias e em sucessivas infestações. O sangue de camundongos infestados foi coletado para avaliação de anticorpos. Os resultados mostraram que camundongos das linhagens BALB/c, C57BL/6 e Swiss podem ser utilizados para manter uma colônia de larvas e ninfas de *A. sculptum* em laboratório. Entretanto, as ninfas alimentadas em camundongos Swiss apresentaram peso após alimentação menor, 13,1 ± 4,3 mg, e tempo médio de muda maior, 17,1 ± 1,4 dias. As ninfas alimentadas em camundongos BALB/c knockout para o receptor ST2 (kST2) realizaram o repasto sanguíneo com eficiência semelhante às ninfas alimentadas em camundongos BALB/c. Porém, demoraram mais tempo para se alimentarem, 5,3 ± 1,4 dias. Ninfas de *A. sculptum* foram mais eficientes quando alimentadas em densidades parasitárias de 10 ninfas/camundongo. Quando cinco ninfas foram alimentadas no mesmo local no camundongo, o peso após a alimentação foi significativamente menor, 12,9 ± 5,3 mg em camundongos BALB/c e 12,9 ± 3,9 mg em camundongos kST2. As ninfas realizaram com sucesso a hematofagia nas três infestações sucessivas em camundongos BALB/c, kST2 e Swiss demonstrando que esses camundongos não desenvolveram uma resistência adquirida. O tempo de alimentação foi maior quando ninfas alimentaram em camundongos das linhagens BALB/c e kST2 previamente

infestados por carrapatos, 7,5 ± 1,0 e 6,5 ± 1,3 dias, respectivamente. Já na linhagem Swiss, o tempo de alimentação e o tempo de muda foram menores, 4,7 ± 1,2 e 14,3 ± 0,4 dias, respectivamente. O soro dos camundongos Swiss parasitados apresentou anticorpos antissaliva crescentes após uma terceira infestação. Os anticorpos presentes no soro dos camundongos Swiss reconheceram, através de Western Blot, moléculas do extrato de glândula e da saliva do carrapato, essa última representada por duas bandas, o que indica que a saliva tem poucas proteínas imunogênicas. Nosso trabalho mostrou que camundongos são bons hospedeiros para o carrapato *A. sculptum*, podendo ser usados por até três infestações sem desenvolverem imunidade efetiva contra o parasitismo.

Palavras-chave: carrapato-estrela; hematofagia; infestações; camundongos; imunidade.

ABSTRACT

Amblyomma sculptum, a tick of the family Ixodidae, has as main hosts equines, capybaras, and tapirs. These hosts do not develop effective immunity against the tick and may have high parasitic loads. Because of the need to develop new ways of combating ticks, the maintenance of *A. sculptum* colony in the laboratory with a sufficient number of specimens to carry out experiments is essential. However, the use of mice for the maintenance of *A. sculptum* colonies is still poorly described in the literature. In the present study, the main objective was to describe the biological parameters of the tick *A. sculptum* fed on different strains of mice and to evaluate the development of immune response by the hosts. For this, *A. sculptum* was fed on C57BL/6, Swiss, BALB/c, and BALB/c knockout mice for the ST2 (kST2) receptor. Star tick nymphs were also fed at different parasitic densities and successive infestations. Blood from infested mice was collected for antibody assessment. The results showed that BALB/c, C57BL/6, and Swiss mice can be used to maintain a colony of *A. sculptum* larvae and nymphs in the laboratory. However, nymphs fed on Swiss mice had lower weight after feeding, 13.1 ± 4.3 mg, and longer mean molting time, 17.1 ± 1.4 days. Nymphs fed on BALB/c knockout mice to the ST2 receptor (kST2) performed blood meal with efficiency similar to nymphs fed on BALB/c mice. However, they took longer to feed, 5.3 ± 1.4 days. *A. sculptum* nymphs were more efficient when fed at parasitic densities of 10 nymphs/mice. When five nymphs were fed at the same location in the mouse, the weight after feeding was significantly lower, 12.9 ± 5.3 mg in BALB/c mice and 12.9 ± 3.9 mg in kST2 mice. The nymphs successfully performed hematophagy on the three successive infestations in BALB/c, kST2, and Swiss mice demonstrating that these mice did not develop acquired resistance. Feeding time was longer when nymphs fed on mice of the BALB/c and kST2 strains previously infested with ticks, 7.5 ± 1.0 and 6.5 ± 1.3 days, respectively. In the Swiss line, the feeding time and the seedling time were shorter, 4.7 ± 1.2 and 14.3 ± 0.4 days, respectively. The serum of the parasitized Swiss mice showed increasing antisaliva antibodies after a third infestation. The antibodies present in the serum of Swiss mice recognized, through Western Blot, molecules of the gland extract and the saliva of the tick, the latter represented by two bands, which indicates that the saliva has few immunogenic

proteins. Our work showed that mice are good hosts for the *A. sculptum* tick, which can be used for up to three infestations without developing effective immunity against the parasitism.

Keywords: *Amblyomma sculptum*; hematophagy; infestations; mice; immunity.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 18

1.1. *AMBLYOMMA SCULPTUM* 18

1.1.1. Taxonomia e classificação 18

1.1.2. Ciclo biológico 18

1.1.3. Distribuição e epidemiologia 21

1.2. IMPORTÂNCIA MÉDICA E VETERINÁRIA 23

1.3. CONTROLE DE CARRAPATOS 23

1.4. ESTUDOS ENVOLVENDO *AMBLYOMMA SCULPTUM* 25

1.5. MANUTENÇÃO DO *AMBLYOMMA SCULPTUM* EM LABORATÓRIO 26

1.6. RESPOSTA IMUNE DO HOSPEDEIRO 28

2. JUSTIFICATIVA 31

3. OBJETIVOS 32

3.1. OBJETIVO GERAL 32

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 32

4. METODOLOGIA 33

4.1. ASPECTOS ÉTICOS 33

4.2. COLETA DE CARRAPATOS 33

4.3. MANUTENÇÃO DA COLÔNIA EM LABORATÓRIO 33

4.4. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS BIOLÓGICOS DE *AMBLYOMMA SCULPTUM* 34

4.5. OBTENÇÃO DA SALIVA E DO EXTRATO DE GLÂNDULA SALIVAR (EGS) DE *AMBLYOMMA SCULPTUM* 37

4.6. EXTRAÇÃO DE SORO DOS CAMUNDONGOS 38

4.7. QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS 39

4.8. SDS-PAGE E WESTERN BLOT 39

4.9. ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA) 40

4.10. ANÁLISES ESTATÍSTICAS 40

5. RESULTADOS 42

5.1. PARÂMETROS BIOLÓGICOS DE *AMBLYOMMA SCULPTUM* ALIMENTADOS EM CAMUNDONGOS DE DIFERENTES LINHAGENS 42

5.2. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS BIOLÓGICOS, EM DIFERENTES DENSIDADES PARASITÁRIAS, DE NINFAS DE *AMBLYOMMA SCULPTUM* ALIMENTADAS EM CAMUNDONGOS BALB/C E CAMUNDONGOS KST2 46

5.3. PARÂMETROS BIOLÓGICOS DAS NINFAS DE *AMBLYOMMA SCULPTUM* ALIMENTADAS SUCESSIVAMENTE EM CAMUNDONGOS 48

5.4. NÍVEIS DE ANTICORPOS CONTRA ANTÍGENOS DA SALIVA DE *AMBLYOMMA SCULPTUM* PRODUZIDOS PELOS CAMUNDONGOS SWISS IMUNIZADOS 53

5.5. RECONHECIMENTO DE ANTÍGENOS SALIVARES DE *AMBLYOMMA SCULPTUM* PELO SORO DE CAMUNDONGOS SWISS USADOS COMO FONTE ALIMENTAR POR NINFAS 54

6. DISCUSSÃO 57
7. CONCLUSÕES 66
8. REFERÊNCIAS 68

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Amblyomma sculptum*

1.1.1. Taxonomia e classificação

Carrapatos são atrópodes da classe Arachnida pertencentes à ordem Ixodida, que contém três famílias: Argasidae, conhecidos como carrapatos de corpo mole; Ixodidae, conhecidos como carrapatos de corpo duro; e Nattalliellidae. Esses artrópodes são considerados cosmopolitas e formam um grupo bem sucedido de artrópodes hematófagos obrigatórios (Keirans; Durden, 2005).

A espécie *Amblyomma sculptum,* pertencente à família Ixodidae, foi denominada *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) durante muitos anos. Em 2014, estudos baseados em análises morfológicas e ferramentas moleculares mostraram que *A. cajennense* é um complexo de pelo menos seis espécies distintas, sendo elas: *Amblyomma cajennense* sensu strictu, *Amblyomma mixtum*, *Amblyomma sculptum*, *Amblyomma interandinum*, *Amblyomma pattinoi* e *Amblyomma tonelliae*. Esse complexo é denominado *Amblyomma cajennense* sensu lato, sendo que cada espécie está relacionada a uma área biogeográfica (Beati et al. 2013, Nava et al. 2014; Estrada-Peña et al. 2014).

1.1.2. Ciclo biológico

Amblyomma sculptum apresenta quatro estágios de desenvolvimento em seu ciclo biológico, sendo eles os ovos, larvas, ninfas e adultos macho e fêmea (Figura 1).

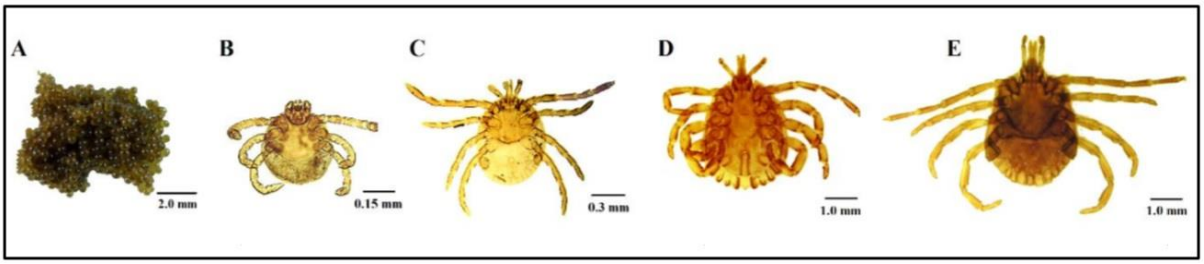


Figura 1: Estágios de desenvolvimento de *Amblyomma sculptum*: Ovos (A); Larva (B); Ninfa (C) e Adultos: Macho (D) e Fêmea (E) (Neves et al., 2016).

Os adultos são vulgarmente chamados de “carrapato estrela” ou “rodoleiro” e suas formas mais jovens, larvas e ninfas, são conhecidas como “vermelhinho” e “micuim”, respectivamente. O ciclo de vida é trioxeno, necessitando de três hospedeiros para desenvolvimento completo (Figura 2). O ciclo biológico tem o seu início quando a fêmea ingurgitada se desprende do animal e cai no solo para realizar a oviposição, que ocorre após um período de aproximadamente 20 dias. Uma fêmea ingurgitada ovipõe cerca de cinco a vinte mil ovos e a incubação dos ovos no solo dura aproximadamente 30 dias. As larvas eclodem e se fixam a um hospedeiro suscetível para iniciarem o ingurgitamento. Esse período dura de 3 a 6 dias e, quando ingurgitadas, caem ao solo e realizam a muda para o estádio de ninfa. As ninfas se fixam a outro hospedeiro para se alimentarem e, após um período de 5 a 7 dias, se desprendem e caem ao solo para realizar uma nova muda, agora para adultos, se diferenciando em macho e fêmea. No hospedeiro, o macho e a fêmea realizam a cópula e, após completarem o repasto sanguíneo, as fêmeas ingurgitadas caem ao solo após 7 a 10 dias, ovipõem e iniciam um novo ciclo. O ciclo apresenta sazonalidade e necessita de um ano para o desenvolvimento de uma geração (Pereira; Labruna 1998).

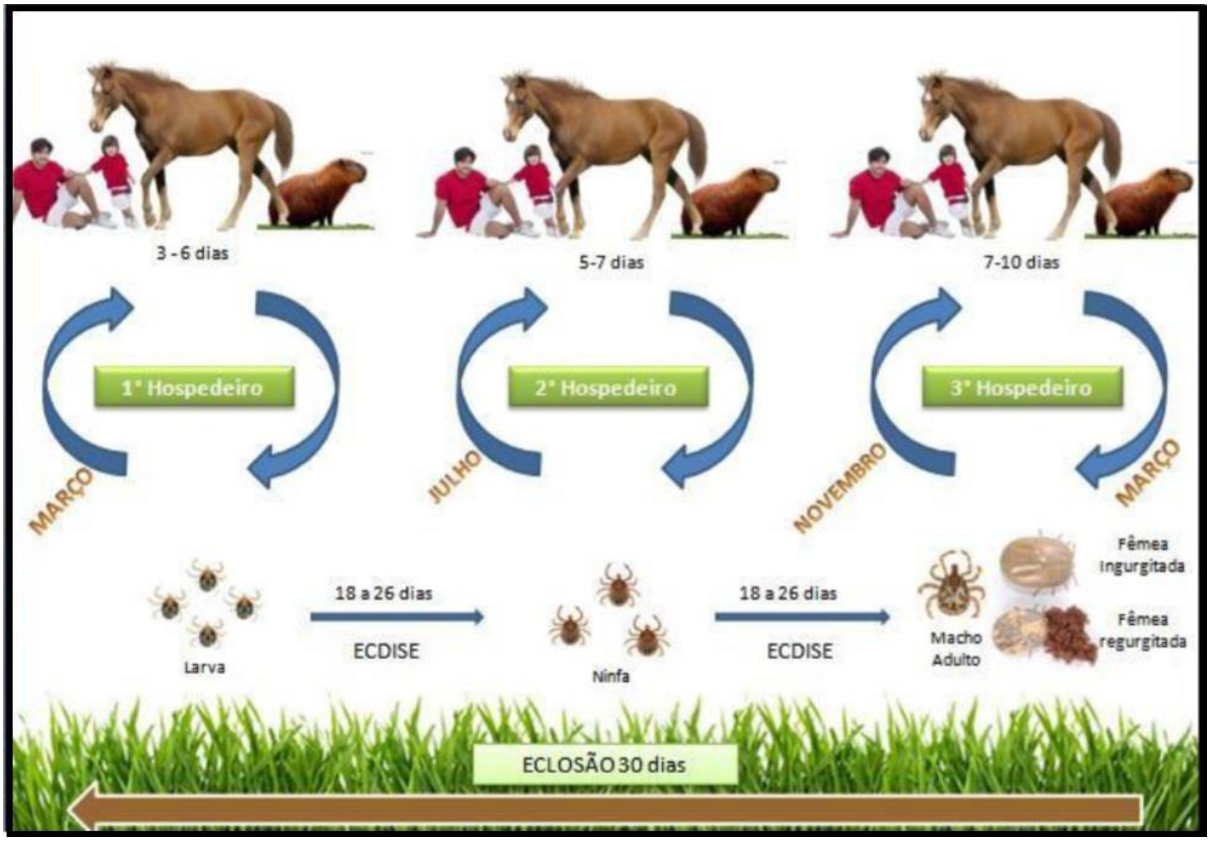


Figura 2: Ciclo biológico do *Amblyomma sculptum* (Abreu, 2018).

Cada fase do ciclo de vida do carrapato-estrela ocorre com mais frequência em uma época específica do ano. Os adultos são mais frequentes nos meses mais quentes e úmidos (outubro a março). Já as larvas ocorrem no período seco do ano (abril a setembro), sendo que o pico principal é de abril a julho. As ninfas são mais frequentes principalmente nos meses de junho a outubro. (Labruna et al., 2002). Além disso, às larvas apresentam um comportamento denominado de diapausa comportamental, que corresponde ao tempo em que essas larvas permanecem no solo em “repouso” sem apresentarem comportamento de busca por hospedeiros aumentando, consequentemente, o período sem alimentação dos carrapatos (Cabrera, 2008; Labruna et al., 2002).

O carrapato-estrela têm os equinos como hospedeiros preferenciais entre os animais domésticos e as antas (*Tapirus terrestris*) como hospedeiros preferenciais silvestres, enquanto as capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) abrangem uma grande importância como hospedeiros preferenciais silvestres em ambientes antrópicos pois, além de contribuir para a presença de populações de carrapatos em ambientes urbanos e periurbanos, é o principal reservatório e fonte de infecção da *Rickettsia*

rickettsi para o *A. sculptum*. (Labruna et al., 2001). Já as formas imaturas, também podem ser encontradas parasitando animais silvestres, aves, cães, bovinos, humanos e outros mamíferos, devido a sua baixa especificidade (Lopes et al., 1998; Rojas; Marini; Coutinho, 1999).

1.1.3. Distribuição e epidemiologia

O complexo *Amblyomma cajennense* é encontrado na região Neotropical, tendo sido primeiramente descrito a partir de espécimes coletados na cidade de Cayena na Guiana Francesa, e pode ser encontrado a partir do sul dos EUA (estados do Texas e Florida) ao norte da Argentina (Battesti; Arzua; Bechara, 2006). No território brasileiro, Martins (2014) demonstrou a existência de duas espécies, sendo elas *A. cajennense* s. s., encontrada nas regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste, e a espécie *A. sculptum*, a única do complexo descrita no sudeste (Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo), sendo encontrada também no centro-oeste (Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul), Nordeste (Pernambuco e Piauí) e sul do estado do Paraná (Nava et al., 2014a) (Figura 3). Associado ao clima tropical e presente em áreas de Pantanal, Mata Atlântica e Cerrado (Martins et al., 2016), *A. sculptum* têm sua dispersão através de pequenos hospedeiros devido a sua larga distribuição horizontal em áreas de Cerrado (Pajuaba Neto et al., 2018).

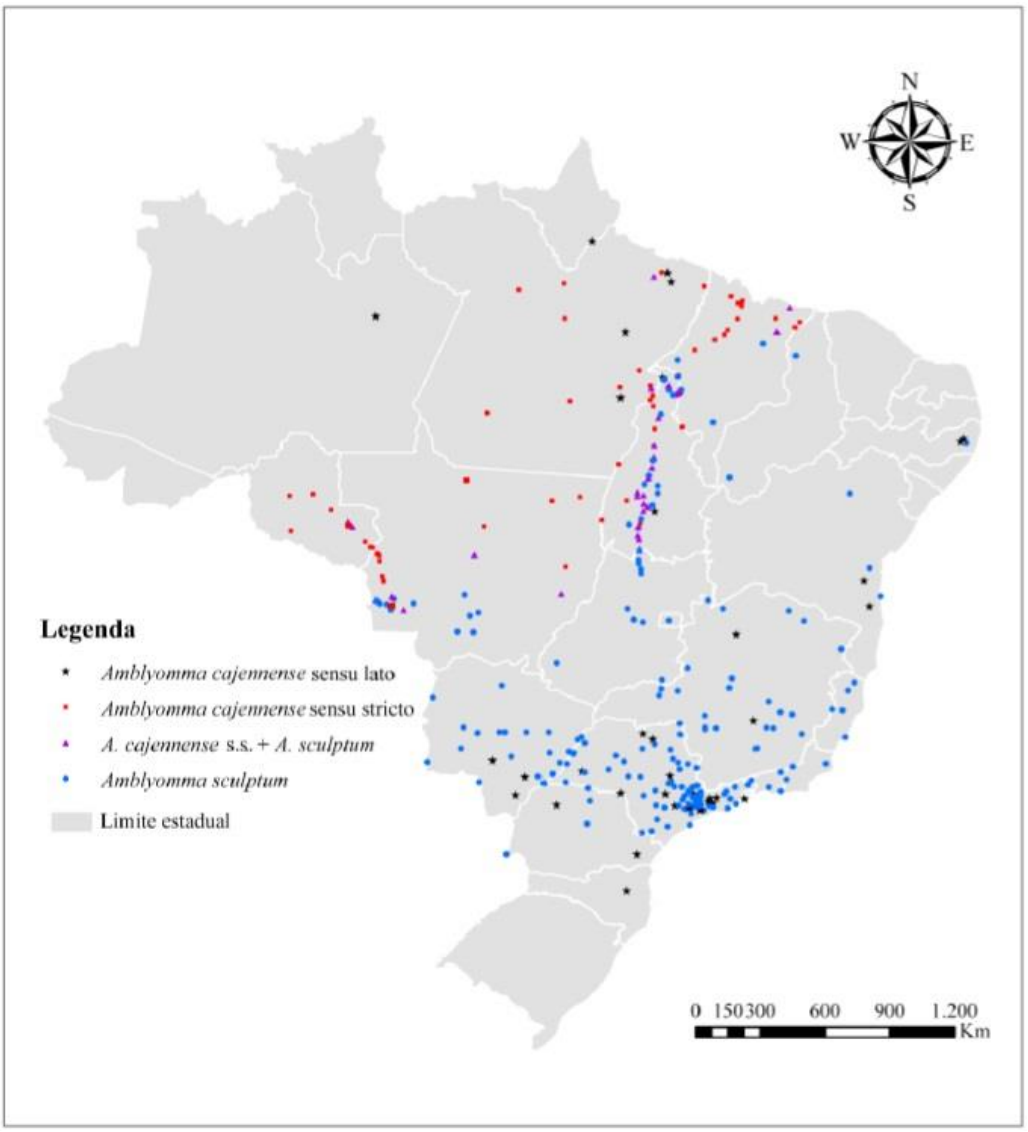


Figura 3: Mapa do Brasil com os estados da federação, demonstrando a distribuição geográfica do complexo *Amblyomma cajennense* sensu lato no país (Martins, 2014).

A alta prevalência de *A. sculptum* em áreas verdes e sombreadas de regiões urbanas e periurbanas faz com que essa espécie tenha uma grande associação com humanos. Essa alta prevalência se deve, 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). O comportamento agressivo por parte desse ixodídeo, que mistura procura ativa e acesso ao hospedeiro por “emboscada”, e a alta capacidade de deslocamento parecem ser as principais características da espécie que contribuem para o alto índice de parasitismo observado em pessoas (Natividade et al., 2021; Ramos et al., 2017). Espécies como o *Amblyomma dubitatum*, por exemplo, que é um carrapato adaptado às capivaras,

possui um valor consideravelmente menor no índice de parasitismo observado em pessoas (Ramos et al., 2017; Pajuaba Neto et al., 2018).

1.2. Importância médica e veterinária

Amblyomma sculptum possui grande importância médica por ser a espécie de carrapato mais associada às infestações em humanos, principalmente ninfas, e por ser o principal vetor da bactéria *R. rickettsii*, causadora da forma mais grave da Febre Maculosa Brasileira (FMB). Essa é a riquetsiose de maior ocorrência e gravidade no país, com mais de 2.090 casos confirmados e 681 mortes entre 2000 e 2018 (Brasil, 2019). Adicionalmente, o carrapato-estrela pode estar envolvido na transmissão de outras bactérias possivelmente patogênicas do gênero *Rickettsia*, tais como *R. amblyommatis, R. felis, R. bellii e R. parkeri*, além de espiroquetas do complexo *Borrelia burgdorferi* sensu lato, causadoras da Doença de Lyme-símile brasileira (Nascimento et al., 2016; Bitencourth et al., 2017; Sebastian et al., 2017).

Esse carrapato também possui importância na medicina veterinária por causar grandes prejuízos econômicos na pecuária devido à espoliação sanguínea que compromete a capacidade produtiva, desvaloriza o couro, predispõe a infecções secundárias e faz com que se tenham gastos com carrapaticidas que podem eventualmente contaminar a carne, o leite e o ambiente (Serra-Freire, 1982a; Serra-Freire, 1982b). Além disso, podem transmitir para os animais patógenos como algumas espécies de borrélias, bactérias do gênero *Rickettsia* e diferentes arbovírus (Jongejan; Uilenberg, 2004).

1.3. Controle de carrapatos

Atualmente, o principal método de controle para as infestações por carrapatos são os acaricidas químicos, como os amidínicos, piretróides sintéticos, fenilpirazólicos e lactonas macrocíclicas. Apesar de usualmente o uso de acaricidas apresentar resultados eficazes no controle de carrapatos, seu uso pode trazer alguns problemas, sobretudo quando ocorre de forma incorreta. Os principais problemas são a seleção de populações de carrapatos resistentes às bases usadas (Furlong; Martins, 2000) e

a contaminação do solo, das fontes de água, da carne, do leite e do ambiente. Diante desse cenário, o uso de acaricidas é indicado sempre em associação a outras formas de controle, como manejo das áreas de pastagem com a diminuição da cobertura vegetal (corte e aragem), vacância da pastagem por período superior à sobrevivência dos carrapatos ou introdução de espécies resistentes ao parasito (de Castro, 1997).

Além dessas medidas já utilizadas no controle em campo, estudos vêm sendo feitos para desenvolver medidas alternativas. O controle biológico é uma alternativa em desenvolvimento. 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, 2007).

Outra medida que poderia ser integrada para aperfeiçoar o controle de carrapatos é a imunização dos animais. Atualmente, encontram-se disponíveis comercialmente apenas duas vacinas sob os nomes Gavac® e Ixovac®, sendo que todas têm como base o antígeno oculto BM86, uma glicoproteína intestinal de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canales et al., 1997; Willadsen et al., 1989). Entretanto, essas vacinas apresentam eficácia apenas para carrapatos do subgênero *Boophilus*. A maior parte dos trabalhos produzidos até o momento sobre o desenvolvimento de vacinas contra carrapatos foi focada no *R. microplus*, carrapato de bovinos, o que é justificado pelo grande prejuízo econômico no setor agropecuário causado por seu parasitismo.

No intuito de desenvolver uma vacina contra *A. sculptum*, Franco et al. (2016) demonstraram a presença de inibidores da via clássica do sistema complemento no extrato de glândula salivar (EGS) de fêmeas em jejum e durante todo seu período alimentar. Recentemente, Costa et al. (2021) identificaram e caracterizaram três proteínas salivares de *A. sculptum* que foram chamadas de AsKunitz, As8.9kDa e AsBasicTail. Tais proteínas são expressas na glândula salivar do carrapato durante as fases de larva, ninfa e adultos, e são capazes de inibir o sistema do complemento e a cascata de coagulação, evidenciando a sua importância para o sucesso no processo alimentar do artrópode. Essas proteínas também foram utilizadas em ensaios vacinais com camundongos onde demonstraram resultados promissores contra ninfas e fêmeas desse ixodódeo com níveis de eficácia variando de 70 a 100%.

1.4. Estudos envolvendo *Amblyomma sculptum*

Nos últimos anos, diversos estudos importantes sobre a fisiologia, controle e a epidemiologia de *A. sculptum* foram conduzidos. Dentre eles, alguns exemplos podem ser citados. Em 2020, Higa et al. relataram pela primeira vez evidências moleculares da presença da cepa de *Rickettsia parkeri* da Mata Atlântica em carrapatos *A. sculptum* na região Centro-Oeste do Brasil e também detectaram pela primeira vez o material genético de *Borrelia* spp. em um carrapato do gênero *Amblyomma*. Esses dados enfatizam a necessidade de mais estudos relacionados à competência do carrapato-estrela como vetor dos dois agentes descritos.

Recentemente, as alergias induzidas por picadas de carrapatos foram consideradas um problema mundial (van Nunen, 2015). A alergia à carne vermelha acontece quando as pessoas se tornam hipersensíveis ao carboidrato α-gal, que é produzido em abundância pela maioria dos mamíferos, com exceção de alguns primatas (inclusive os humanos). Diante disso, Araújo et al. (2016) fizeram um estudo onde demonstraram que a injeção de saliva de *A. sculptum* ou a exposição à alimentação dos carrapatos induz anticorpos IgG e IgE anti-α-Gal em camundongos knockout para α-1,3-galactosiltransferase, indicando assim a presença de epítopos contidos na α-Gal na saliva do carrapato. Esses resultados sugerem, pela primeira vez, que picadas do carrapato *A. sculptum* podem estar associadas com as reações alérgicas à carne vermelha no Brasil.

Devido à necessidade de mais informações sobre o controle de *A. sculptum*, Borges et al. (2020) conduziram um estudo onde mostraram que as larvas desse ixodídeo apresentam maior sensibilidade ao grupo dos piretróides sintéticos, seguido pelos grupos fenilpirazóis, organofosforados e lactonas macrocíclicas. Esses achados poderiam apoiar estudos visando ao controle do carrapato tanto em animais quanto no meio ambiente.

Em 2021, Natividade et al. elucidaram alguns fatores envolvidos na dispersão de *A. sculptum*, visto que a locomoção ativa dos carrapatos está diretamente associada à epidemiologia dos patógenos transmitidos pelos mesmos. Os resultados mostraram que ninfas de *A. sculptum* são capazes de cobrir distâncias de mais de 100 m ao longo de suas vidas, mas caminham distâncias curtas por vez e mudam

constantemente de direção. Esse comportamento indica que os carrapatos não conseguem se dispersar em longas distâncias por meio da locomoção ativa.

Para o estabelecimento de eficientes estratégias de controle de *A. sculptum,* com o objetivo de diminuir os prejuízos causados pelo parasitismo, estudos acerca da biologia, da fisiologia, dos métodos de controle alternativos e da epidemiologia deste vetor são de extrema importância. Para que a maior parte desses estudos possam ser viabilizados ou apenas alavancados, a manutenção em laboratório se faz necessária tanto para fornecer exemplares com status fisiológico conhecido e padronizado como para realizar experimentos em laboratório onde as condições são mais controladas e permitem chegar a conclusões com mais segurança. Sendo assim, é importante que se estabeleça métodos de criação eficientes do carrapato-estrela em condições laboratoriais.

1.5. Manutenção do *Amblyomma sculptum* em laboratório

Em 1971, Neitz, Boughton e Walters desenvolveram uma metodologia de criação do carrapato *Ixodes rubicundus* que consistia na colocação dos estágios de larva, ninfa e adulto desse ácaro dentro de uma câmara de pano, para acondicionamento dos carrapatos, aderida ao redor das orelhas de coelhos e outros animais domésticos. As câmaras eram abertas diariamente para a coleta dos espécimes que terminavam o repasto sanguíneo e se desprendiam do hospedeiro. Apesar do sucesso da metodologia, a criação de carrapatos não é fácil devido ao seu complexo ciclo biológico. Os problemas encontrados na manutenção de colônias de laboratório refletem diretamente nas lacunas existentes em nosso conhecimento das diferentes espécies desses importantes vetores.

Ao estabelecer uma colônia de carrapatos em laboratório, é necessário considerar cuidadosamente as condições ambientais gerais do seu habitat natural, incluindo temperatura, umidade, ritmo diurno, tempo de atividade, comportamento de busca, métodos e estímulos sensoriais. Dessa forma, as condições laboratoriais precisam ser adaptadas às necessidades específicas de cada espécie de carrapato, buscando aumentar as chances de sucesso da colônia.

Outro fator importante a ser considerado é o fato de que algumas espécies de carrapatos se alimentam apenas de hospedeiros específicos ou de uma faixa estreita de hospedeiros intimamente relacionados, enquanto outras podem ser categorizadas como oportunistas (Sonenshine, 1975). Esse é um dos fatores que dificulta a manutenção de colônias de laboratório, já que alguns hospedeiros naturais são mais difíceis de ser mantidos em condições laboratoriais, como por exemplo, *R. microplus* que vive parte de sua vida sobre os bovinos.

Embora a especificidade de hospedeiro seja um obstáculo, algumas espécies ainda podem ser alimentadas em animais fáceis de se manter em laboratório. O coelho doméstico (*Oryctolagus cuniculus*) tem sido usado como hospedeiro experimental para várias espécies de carrapatos há muito tempo (Kohls, 1937; Faccini; Chacon; Labruna, 2006) por serem facilmente manuseados e por sua manutenção não ser trabalhosa. Vários estudos já mostraram o sucesso na utilização de coelhos para alimentação de carrapatos: estágios imaturos de *Rhipicephalus evertsi* (Londt e Van der Bijl, 1977), todos os estágios de vida de *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato*, Dermacentor occidentalis, Dermacentor variabilis, Ixodes scapularis, Ixodes pacificus, Amblyomma americanum, Haemaphysalis leporispalustris* (Troughton; Levin, 2007), *Amblyomma variegatum* (Voigt et al., 1993), *Dermacentor andersoni* (Howarth; Hokama, 1983) e *Rhipicephalus appendiculatus* (Bailey et al., 1960). Recentemente, Labruna (2018) realizou um estudo onde larvas, ninfas e adultos de *A. sculptum* e *A. cajennense* s.s. foram alimentadas com sucesso em coelhos. Nesses casos, o método típico de alimentação é usar um saco de alimentação ou cápsula preso ao dorso dos coelhos (Rechav; Goldberg; Fielden, 1997). Alguns estudos têm utilizado animais maiores na alimentação de carrapatos, como ovelhas para alimentação de *A. americanum, Amblyomma maculatum, D. andersoni, Dermacentor viriabilis* e *R. sanguineus* s.l. (Nagamori et al., 2019), *Amblyomma hebraeum* (Heyne et al., 1987) e *Ixodes ricinus* (Bonnet et al., 2007), ou bezerros para *D. andersoni* (Kocan et al., 1986) e *R. appendicalutus* (Musyoki et al., 2004).

Em 2005, Bouchard e Wikel descreveram uma metodologia para colonização de carrapatos em laboratório utilizando camundongos (*Mus musculus*) para alimentação de larvas e ninfas. Para as larvas, o método consiste na colocação dos carrapatos para alimentar em camundongos que estão contidos com uma tela de

arame com formato cilíndrico. Os espécimes são colocados no pescoço e na parte superior do camundongo, com o auxílio de um pincel. Após um período de uma a duas horas, para que as larvas se fixem, os animais são transferidos para gaiolas com 1 cm de água e adaptadas com uma grade vazada que permite a passagem de fezes, urina e larvas ingurgitadas. A água da gaiola deve ser trocada e checada diariamente. As larvas ingurgitadas devem ser coletadas com o auxílio de uma pinça. Para a alimentação das ninfas, tubos de polipropileno de 1,5 mL, cortados pela metade, eram fixados no dorso do hospedeiro onde são colocadas aproximadamente 20 ninfas do carrapato. Essa cápsula permite que as ninfas fiquem protegidas, realizando assim a alimentação. Entre o tubo e a tampa é colocado um pedaço de tecido para que ocorra a entrada de ar nos tubos. O pelo da região de aplicação dos tubos é aparado próximo a pele e as cápsulas são fixadas com resina (colophonium) e cera de abelha. Após 3 a 7 dias, as ninfas ingurgitadas são retiradas com o auxílio de uma pinça ou são transferidas para pedaços de gaze.

A utilização de camundongos para manutenção de colônias de carrapato traz diversas vantagens já que eles começaram a ser usados como animais de laboratório principalmente pelo fato de serem pequenos, muito prolíferos, terem período de gestação curto, serem de fácil domesticação e manutenção. Logo, eles se tornaram o mamífero mais usado na experimentação animal (Santos, 2002b). Além disso, como esses animais são utilizados em laboratório há muito tempo, existe uma grande quantidade de informações básicas disponíveis sobre eles. Por outro lado, camundongos não são hospedeiros naturais de várias espécies de carrapato, sendo necessário a realização de experimentos para verificar se os mesmos serão bons hospedeiros para a espécie de carrapato de interesse do estudo. Camundongos já foram utilizados com sucesso em estudos com *Ornithodoros rostratus* (Costa et al., 2016), *I. scapularis* (Anderson et al., 2017; Kurokawa et al., 2020), *I. ricinus* (Dusbabek et al., 1995; Mbow et al., 1994), *R. sanguineus* s.l. (Ferreira; Silva, 1999) e *A. sculptum* (Araujo et al., 2016; Esteves et al., 2019; Costa et al., 2021).

1.6. Resposta imune do hospedeiro

O sucesso da alimentação dos carrapatos está diretamente relacionado com a interação com seus hospedeiros que envolve, principalmente, a resposta imune desenvolvida por estes (Bouchard; Wikel, 2005). O sistema imune possui a resposta imune inata ou natural, que é a primeira linha de defesa do organismo com a qual o indivíduo já nasce, e a resposta imune adquirida ou adaptativa, que é ativada pelo contato com agentes infecciosos. Dentro da resposta imune adquirida, temos a imunidade humoral, mediada por anticorpos produzidos pelos linfócitos B, e a imunidade celular que gera resposta mediada pelos linfócitos T. Essas interações imunológicas são importantes na biologia do carrapato, na transmissão de patógenos e no controle de carrapatos, visto que ambas as defesas imunológicas estão envolvidas nas respostas dos hospedeiros vertebrados à infestação (Brossard; Wikel, 2004).

A alimentação do carrapato induz uma matriz complexa de respostas imunes do hospedeiro envolvendo células apresentadoras de antígeno, células T, células B, anticorpos, citocinas, complemento, basófilos, mastócitos, eosinófilos e uma série de moléculas bioativas (Brossard; Wikel, 1997). Essas interações podem ser vistas como um equilíbrio entre a defesa do hospedeiro contra o carrapato e as estratégias de fuga do carrapato contra as defesas do hospedeiro.

Uma das estratégias de fuga do carrapato envolve o sistema complemento do hospedeiro. O sistema complemento é um dos principais mediadores humorais do processo inflamatório junto aos anticorpos. Esse importante mecanismo da resposta imune, que é ativado no momento da espoliação sanguínea, é contraposto por moléculas ativas produzidas pelos carrapatos principalmente na saliva.

Inibidores do sistema complemento foram descritos em artrópodes hematófagos filogeneticamente distintos, reforçando a importância da inibição do complemento para esses organismos (Schroeder et al, 2009). Os inibidores do complemento são produzidos principalmente pela glândula salivar e intestino e tem como principal função inibir o ataque ao epitélio intestinal pelo sistema complemento presente no sangue ingerido do hospedeiro. Além disso, durante a hematofagia, a inibição do sistema complemento pela saliva reduz consideravelmente a quantidade de antígenos salivares opsonizados com C3b, provocando uma diminuição parcial da resposta inflamatória no local da picada, minimizando assim a percepção do

hospedeiro. Essas ações são exemplos para que ocorra o sucesso da hematofagia (Schroeder et al, 2009; Barros et al., 2009).

Por outro lado, alguns animais podem adquirir resistência à alimentação dos carrapatos após uma infestação ou depois de repetidas infestações, resultando em diminuição do peso ou até mesmo na morte de carrapatos em infestações subsequentes. Allen et al. (1985) relataram que quando camundongos BALB/c foram infestados repetidamente com *D. variabilis*, a quantidade de carrapatos ingurgitados e o peso foram diminuindo a cada infestação, demonstrando assim uma resistência adquirida. Em contrapartida, alguns estudos mostraram que camundongos de laboratório infestados sucessivamente com estágios imaturos de *I. ricinus* (Mbow et al. 1994), *I. scapularis* (Schoeler; Manweiler; Wikel, 1999) ou *R. sanguineus* s.l. (Ferreira; Silva, 1999) não desenvolveram resistência adquirida.

Variações na composição genética do hospedeiro são fatores bem reconhecidos na determinação das respostas imunológicas à infestação (de Castro, 1993). Estudos realizados com linhagens isogênicas de camundongos mostraram que o fundo genético é importante no equilíbrio Th1/Th2. As células T de camundongos C57BL/6 produzem preferencialmente citocinas do tipo Th1 com alta produção de interferon-gama (IFN-g) e baixa de interleucina-4 (IL-4), enquanto que aqueles a partir de camundongos BALB/c favorecem a produção de citocinas do tipo Th2, com baixos níveis de IFN-g e IL-4 elevado (Watanabe et al., 2004). Já os camundongos Swiss, por serem uma linhagem heterogênica, apresentam uma resposta imune modulada. Apesar das diferentes linhagens de camundongos apresentarem perfil comportamental e imune diferentes, ainda não se sabe quais linhagens seriam mais eficientes na criação dos carrapatos. Adicionalmente, seria importante saber a quantidade ideal de carrapatos a ser utilizada em cada alimentação por camundongo para se ter uma taxa de recuperação elevada. Ter o conhecimento sobre sucessivas infestações no mesmo camundongo também é importante para buscar diminuir o número de camundongos utilizados nas alimentações, mantendo o sucesso da colônia.

2. JUSTIFICATIVA

Amblyomma sculptum é motivo de grande preocupação na medicina humana e veterinária, pela ação espoliante, transmissão de patógenos e contaminação dos produtos de origem animal e do ambiente causado pelo uso indiscriminado de produtos carrapaticidas. Um maior conhecimento da fisiologia, genética e comportamento desse ixodídeo é fundamental para auxiliar no estabelecimento de novas estratégias de controle, visando minimizar os prejuízos causados pelo parasitismo e evitar surtos de transmissão de patógenos.

Tendo em vista essa necessidade de desenvolvimento de novas formas de combate aos carrapatos, a manutenção de uma colônia de *A. sculptum* em laboratório com uma quantidade suficiente de espécimes para a realização de experimentos é essencial. O uso de camundongos para a manutenção de colônias do carrapato-estrela em laboratório ainda é pouco descrito na literatura. A utilização desses animais como hospedeiros seria uma excelente opção por serem de fácil manutenção e observação. Além disso, existem grandes quantidades de informações básicas disponíveis sobre eles e baixo custo de manutenção quando comparados com outros animais. Mas para que se torne viável a utilização de camundongos na manutenção da colônia, é de grande importância saber se esses animais são bons hospedeiros para o *A. sculptum*, visto que eles não são hospedeiros naturais desses carrapatos.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Descrever os parâmetros biológicos do carrapato *Amblyomma sculptum* alimentado em diferentes linhagens de camundongos e caracterizar o desenvolvimento de resposta imune pelos hospedeiros.

3.2. Objetivos específicos

- Comparar os parâmetros alimentares e de desenvolvimento de larvas, ninfas *A. sculptum* alimentados em camundongos de diferentes linhagens;
- Descrever os parâmetros alimentares e reprodutivos de fêmeas de *A. sculptum* alimentadas em camundongos Swiss;
- Comparar os parâmetros alimentares e de desenvolvimento, em diferentes densidades parasitárias, de ninfas de *A. sculptum* alimentadas em camundongos BALB/c e BALB/c knockout para o receptor ST2;
- Comparar os parâmetros alimentares e de desenvolvimento, em diferentes infestações sucessivas, de ninfas de *A. sculptum* alimentadas em camundongos;
- Avaliar os níveis de IgG contra antígenos da saliva de *A. sculptum* produzidos pelos camundongos Swiss imunizados;
- Avaliar o reconhecimento de antígenos salivares de *A. sculptum* pelo soro de camundongos Swiss usados como fonte alimentar por ninfas;

4. METODOLOGIA

4.1. Aspectos éticos

Todos os procedimentos envolvendo animais estão de acordo com os princípios para utilização de animais em pesquisa e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG (CEUA/UFMG), sob os protocolos de número 103/2017 e 60/2020 (Anexo I).

4.2. Coleta de carrapatos

Fêmeas ingurgitadas e semi-ingurgitadas de *A. sculptum*, foram coletadas do plantel equino da Fazenda Modelo da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), localizada em Pedro Leopoldo, MG, durante o período de prevalência das formas adultas (Novembro a Março). Os espécimes foram identificados segundo critérios morfológicos com a ajuda de uma chave de classificação (Battesti; Arzua; Bechara, 2006; Nava et al. 2014). As fêmeas também foram obtidas através da colônia de *A. sculptum* mantida no Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos (LFIH) no Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG que é originária de carrapatos coletados neste mesmo local.

4.3. Manutenção da colônia em laboratório

Para a manutenção da colônia de *A. sculptum*, as fases de larva, ninfa e adulto dos carrapatos foram alimentadas em camundongos da linhagem Swiss obtidos do Centro de Bioterismo da UFMG. Os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos (LFIH) ICB – UFMG em gaiolas de plástico com acesso livre à ração (Nuvilab) e água, a uma taxa de lotação de até 10 animais/gaiola. Após o repasto, os espécimes permaneceram em estufa BOD sob condições de temperatura e umidade controladas (27 ± 1°C e 70 ± 5%) até a eclosão das larvas e muda entre os estádios.

4.4. Avaliação dos parâmetros biológicos de *Amblyomma sculptum*

Para a avaliação dos parâmetros biológicos de *A. sculptum*, carrapatos com 30 dias após a muda foram alimentados em camundongos de acordo com os grupos experimentais (Tabela 1).

Tabela 1: Grupos experimentais para avaliação dos parâmetros biológicos de *Amblyomma sculptum* alimentados em camundongos

Experimento 1: Avaliação dos parâmetros biológicos de *Amblyomma sculptum* alimentados em camundongos de diferentes linhagens
Grupo 1 • 3 camundongos BALB/c com 150 larvas em cada • 3 camundongos C57BL/6 com 150 larvas em cada • 3 camundongos Swiss com 150 larvas em cada
Grupo 2 • 3 camundongos BALB/c com 12 ninfas em cada • 3 camundongos C57BL/6 com com 12 ninfas em cada • 3 camundongos Swiss com com 12 ninfas em cada
Grupo 3 • 6 camundongos BALB/c com 10 ninfas em cada • 6 camundongos BALB/c knockout para ST2 com com 10 ninfas em cada
Grupo 4 • 20 camundongos Swiss com 1 macho e 1 fêmea em cada
Experimento 2: Avaliação dos parâmetros biológicos, em diferentes densidades parasitárias, de ninfas de *Amblyomma sculptum* alimentadas em camundongos
Grupo 5 • 6 camundongos BALB/c com 5 ninfas em cada • 6 camundongos BALB/c com 10 ninfas em cada
Grupo 6 • 6 camundongos BALB/c knockout para ST2 com 5 ninfas em cada • 6 camundongos BALB/c knockout para ST2 com 10 ninfas em cada

Experimento 3: Avaliação dos parâmetros biológicos das ninfas de *Amblyomma sculptum* alimentadas sucessivamente em camundongos

Grupo 7

- 6 camundongos BALB/c com 10 ninfas em cada

Grupo 8

- 6 camundongos BALB/c knockout para ST2 com 10 ninfas em cada

Grupo 9

- 15 camundongos Swiss com 12 ninfas em cada

Para a alimentação das larvas, os camundongos foram anestesiados com uma combinação de 150 mg/Kg de peso vivo de Ketamina (Ketamin-S; Cristália) e 10 mg/Kg de peso vivo de xilazina (Rompum; Bayer Healthcare S.A) por via intraperitoneal. Depois de anestesiados, cada camundongo foi infestado com 150 larvas distribuídas por toda a extensão do animal para que se fixassem e realizassem a alimentação. Os camundongos foram mantidos anestesiados por uma hora para que as larvas pudessem se fixar sem que fossem perturbadas pelo camundongo. Após este período, os camundongos foram colocados em gaiolas com maravalha e mantidos em ambiente a 28°C, até retornarem completamente da anestesia. Em seguida, as gaiolas contendo os camundongos foram mantidas em ambiente com condições de temperatura e umidade controladas (25 ± 1°C e 70 ± 5% UR) e variação de claro/escuro a cada 12 horas. No segundo dia após a infestação, os camundongos foram transferidos para gaiolas com o fundo coberto com 2 cm de água e mantidos isolados da água através de uma grade vazada que permitia a passagem de fezes, urina e larvas ingurgitadas. As larvas ingurgitadas foram coletadas a partir do terceiro dia após a infestação com o auxílio de uma pinça.

Para a alimentação das ninfas e adultos, foi utilizada a metodologia de Bouchard & Wikel (2005) com modificações. Essa técnica se baseia na fixação de câmaras de alimentação no dorso (região da cernelha) de camundongos previamente anestesiados. As câmaras foram confeccionadas a partir de tubos de polipropileno de 1,5 mL (Eppendorf Tube®) cortados, permanecendo com aproximadamente 1,5 cm de altura. As tampas receberam pequenos furos para permitir a entrada de umidade.

Para a fixação das câmaras com adesivo de contato (Brascoplast Standard, Brascola), os animais foram anestesiados com 150 mg/Kg de peso vivo de Ketamina (Ketamina-S; Cristália) e 10 mg/Kg de peso vivo de Xilazina (Rompum; Bayer Healthcare S.A) por via intraperitoneal (Figura 4). Após 24h da fixação das câmaras, os carrapatos foram colocados dentro de cada câmara.



Figura 4: Colagem da câmara de alimentação em camundongo Swiss.

Durante os experimentos, os camundongos permaneceram em gaiolas de plástico de 50 cm de comprimento, 36 cm de largura e 15 cm de profundidade, com acesso livre a ração (Nuvilab) e água, a uma taxa de lotação de até 10 animais/gaiola, com maravalha. As gaiolas contendo os camundongos foram mantidas em ambiente com condições de temperatura e umidade controladas (25 ± 1°C e 70 ± 5% UR) e variação de claro/escuro a cada 12 horas. As câmaras foram verificadas diariamente para a retirada dos carrapatos. Para os experimentos com sucessivas infestações das ninfas, foram utilizados os mesmos camundongos com intervalos de 20 dias entre as exposições, seguindo a metodologia de Bouchard & Wikel 2005 para cada infestação realizada.

Todos as larvas, ninfas e adultos que completaram a alimentação e se soltaram espontaneamente foram retirados, pesados e mantidos separadamente em um tubo de polipropileno de 1,5 mL (Eppendorf Tube®) com a tampa contendo pequenos furos para permitir a entrada de umidade. Os carrapatos foram mantidos em estufa BOD

em condições de temperatura e umidade controladas (28 ± 2°C e 90 ± 5% de umidade).

4.5. Obtenção da saliva e do extrato de glândula salivar (EGS) de *Amblyomma sculptum*

A saliva foi obtida a partir de fêmeas ingurgitadas de *A. sculptum* coletadas no campo. Após a coleta, elas foram levadas ao laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos do ICB-UFMG, lavadas com água destilada e os pesos anotados para a estimulação da salivação, as fêmeas foram afixadas pelo dorso em um suporte, com o auxílio de fita dupla-face (3M) e injetados 3 a 5 µL de pilocarpina (SIGMA) a 2% em PBS (pH 7,4) diretamente na hemocele com auxílio de uma seringa (Hamilton) acoplada a um disparador (Hamilton) (Figura 5a).

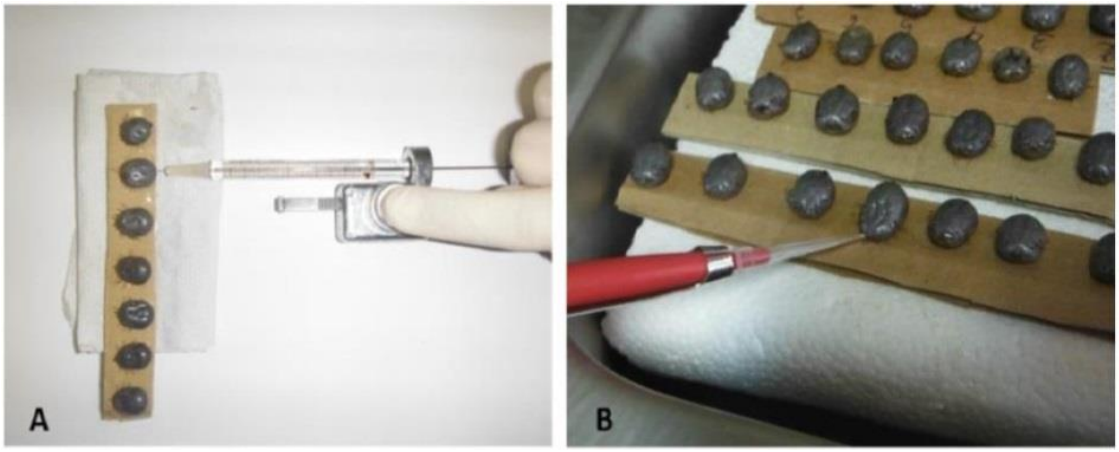


Figura 5: Extração da saliva de *Amblyomma sculptum*. (A) Aplicação de pilocarpina 2% na hemocele dos carrapatos. (B) Coleta da saliva com o auxílio de micropipeta.

Os carrapatos foram mantidos em câmara úmida a 37°C durante 2 horas ou até o fim da salivação (Figura 5b). A saliva foi coletada com o auxílio de uma micropipeta e transferida para tubos de 1,5 mL mantidos em gelo para em seguida serem estocadas a -80°C até o uso. Todos os procedimentos foram realizados no máximo duas horas após a coleta do carrapato.

Para a obtenção do EGS, fêmeas em jejum de *A. sculptum* coletadas no campo e obtidas através da alimentação em camundongos em laboratório foram lavadas com

água destilada, pesadas e mantidas em gelo até o momento da dissecação, que foi realizada no mesmo dia da coleta. Os carrapatos foram dissecados com o auxílio de uma lupa (Leica EZ4) (Figura 6a) e cada par de glândulas salivar foi retirado em solução salina (NaCl 0,9%) (Figura 6b) e transferido para tubos de microcentrífuga (Eppendorf Tube®) de 1,5 mL contendo 10 µL de salina.

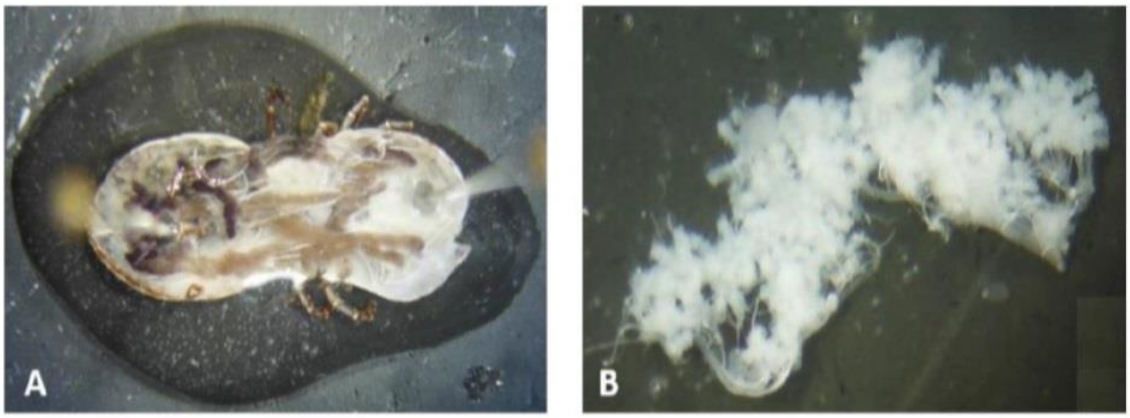


Figura 6: Obtenção do Extrato de Glândula Salivar (EGS) de *Amblyomma sculptum*. (A) Fêmea com tegumento rebatido para visualização dos órgãos internos. (B) Glândulas salivares isoladas.

As amostras foram tratadas por ultrassom em banho-maria (Branson 1510) por 40 segundos e centrifugadas a 4°C por 10 minutos a 14.000 g. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo que permaneceu a -80°C até o momento dos ensaios.

4.6. Extração de soro dos camundongos

O sangue dos camundongos Swiss do grupo 9 foi coletado sete dias após cada exposição. Os animais eram previamente anestesiados por via intraperitoneal com Ketamina 150 mg/kg (Cristália) e Xilazina 10 mg/kg (Bayer). As coletas de sangue foram realizadas no plexo ocular retirando um volume de sangue de aproximadamente 50 µL por animal. O sangue foi imediatamente transferido para tubos de 1,5 mL e mantido à temperatura ambiente por uma hora. Após centrifugação a 5.000 g por 30 minutos, o soro foi transferido com o auxílio de uma micropipeta para microtubos de

1,5 ml e armazenado a -20ºC até o uso. Uma semana após a terceira infestação, o sangue de cada camundongo foi obtido através da decapitação dos animais previamente anestesiados. O soro obteve o mesmo tratamento para ser armazenado a -20ºC até o uso.

4.7. Quantificação de proteínas

Após a coleta da saliva e preparação do EGS, a quantidade de proteínas totais nas amostras foi mensurada através do método de Bradford (1976), que foi determinada seguindo uma curva padrão de concentração de albumina bovina. Foram utilizados 20µL da amostra diluídos a 1:30 em salina 0,9% e distribuídas em triplicatas, em placas de 96 poços, e então medidas em leitor de ELISA (Molecular Devices) com comprimento de onda de 595 nm. Com o resultado, a quantidade de proteínas a ser utilizada em cada ensaio foi ajustada.

4.8. SDS-PAGE e Western Blot

As eletroforeses em géis de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) foram realizadas de acordo com a metodologia de Laemmli (1970). Para a realização do western blot, foi realizado um SDS-PAGE a 12,5% onde foram aplicadas as amostras de EGS e saliva de *A. sculptum*. Após a corrida, as moléculas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (HybondTMP, AmershamBiosciences) durante duas horas a 90 V (~200 mA) em banho de gelo. Os sítios de ligação livres da nitrocelulose foram bloqueados com PBS-T (PBS + 0.05% Tween 20) contendo 10% de leite em pó desnatado por 2 horas sob agitação. Em seguida, a membrana foi lavada 3 vezes, durante 10 minutos com PBS-T, sob agitação. A membrana foi incubada por 1 hora com os soros dos camundongos após a 3ª infestação diluídos em PBS-T na concentração de 1:100, à temperatura ambiente, sob agitação. Após 3 lavagens de 7 minutos com PBST, sob agitação, foi feita a incubação da membrana por 1 hora com anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (Sigma-Aldrich) diluído em PBS (pH 7,4) na concentração de 1:1000. Após esse período, a membrana foi novamente lavada, 2 vezes, por 7 minutos, com PBS-

T e 1 vez com PBS e, então, revelada com os reagentes do kit DAB Substrate Kit for Peroxidase (Vector Laboratories Inc.).

4.9. Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

A técnica de ELISA realizada foi adaptada de Rohousova et al. (2005). Uma microplaca de ELISA Maxisorp (Nunc®) foi sensibilizada durante 12 horas, à temperatura de 4ºC, dentro de uma câmara úmida com 0,5 µg de saliva diluída em tampão carbonato (NaHCO3 35 mM; Na2CO3, 15 mM; pH 9.6). Os poços sensibilizados foram bloqueados com 200 µl de solução bloqueadora (NaCl 8 g; KCl 0,2 g; Na2HPO4 1,44; KH2PO4 0,24 g; H20 1000 mL + 0,05% Tween-20 + 5% de leite em pó desnatado) durante 2 horas a 37ºC. Após o bloqueio, cada poço foi lavado três vezes utilizando-se PBS-T (NaCl 8 g; KCl 0,2 g; Na2HPO4 1,44 g; KH2PO4 0,24 g; H20 1000 mL + 0,05% Tween-20). Foram adicionados 50 µL de soro dos camundongos Swiss controle e imunizados após as 1ª, 2ª e 3ª infestações na diluição de 1:160 em solução PBS-T (PBS-T + 0,1% BSA) e incubados a 37ºC por uma hora sob agitação. Cada um dos tratamentos foi realizado em triplicata. A detecção dos anticorpos anti-saliva de *A. sculptum* foi realizada com adição de anticorpo anti-mouse IgG conjugado com peroxidase (Sigma-Aldrich). Foram transferidos para cada poço, 50 µL do anticorpo anti-mouse IgG peroxidase diluído a 1:50.000 em PBS-T + 0,1% BSA e incubados por uma hora a 37ºC. Os anticorpos não aderidos foram lavados como descrito acima. Após nova lavagem, os poços foram rapidamente preenchidos com 100 µL de substrato OPD-H2O2 (1 mg/mL de O- PhenyleneDiamine [Sigma: P-9029]) dissolvido em tampão citrato de sódio (ácido cítrico 50 mM; Na2HPO4 50 mM; pH 5,0) e incubados por 15 minutos à temperatura ambiente no escuro. A reação foi parada com adição de 100 µL de ácido sulfúrico 1 M por poço. As leituras foram executadas a 450 nm em leitor de microplacas (Versa Max, Molecular Devices®) e os dados gerados foram utilizados para os cálculos estatísticos.

4.10. Análises estatísticas

Os dados obtidos foram analisados através do software GraphPadPrism 5.0 e representados pela média ± desvio padrão. A comparação entre dois grupos foi feita pelo Teste T. No caso de comparação entre mais de dois grupos, foi feito o ANOVA e pós teste de Bonferroni. O teste de Qui-Quadrado foi utilizado para analisar dados de frequência. O nível de significância considerado foi $p< 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Parâmetros biológicos de *Amblyomma sculptum* alimentados em camundongos de diferentes linhagens

Larvas e ninfas de *A. sculptum* foram alimentadas em diferentes linhagens de camundongos para avaliar se existe diferença no desempenho alimentar dos carrapatos de acordo com a linhagem do camundongo. Os dados obtidos sobre os parâmetros biológicos das larvas ao alimentar nas linhagens BALB/c, C57BL/6 e Swiss estão representados na Tabela 2. A porcentagem de recuperação de larvas nos camundongos C57BL/6 foi 14,3% maior que em camundongos BALB/c e 41,8% maior que em camundongos Swiss. O tempo médio de alimentação na linhagem BALB/c foi de 4,1 dias, ligeiramente maior do que o tempo de alimentação das larvas em camundongos C57BL/6 e Swiss, cujo período médio foi de 3,3 e 3,5 dias, respectivamente. Entretanto, essa diferença não foi estatisticamente significativa ($p>0,05$). O peso das larvas após a alimentação não apresentou diferença estatística significativa ($p>0,05$) entre os três grupos avaliados. A média de peso após a alimentação foi de 0,8 mg em camundongos BALB/c e Swiss, e 0,9 mg em camundongos C57BL/6. A porcentagem de muda das larvas variou de 57,7 a 78,4% nos três grupos estudados. O período compreendido entre o desprendimento das larvas ao término da ecdise larva/ninfa, nos três grupos, variou entre 10 a 11 dias. Entretanto, não houve diferença estatística entre os grupos ($p>0,05$).

Tabela 2: Parâmetros biológicos de larvas de *Amblyomma sculptum* alimentadas em camundongos das linhagens BALB/c, C57BL/6 e Swiss.

Parâmetros	BALB/c	C57BL/6	Swiss
n (n/camundongo)	450 (150)	450 (150)	450 (150)
Recuperação (%)	8,4	9,8	5,7
Tempo de alimentação (dias)*	4,1 ± 0,3[a]	3,3 ± 0,5[a]	3,5 ± 0,5[a]
Peso após a alimentação (mg)*	0,8 ± 0,2[a]	0,9 ± 0,2[a]	0,8 ± 0,2[a]
Muda (%)	71,8	78,4	57,7
Tempo de muda (dias)*	10,7 ± 0,9[a]	11,0 ± 1,1[a]	11,6 ± 1,2[a]

*Média ± DP, valores em uma linha seguidas por letras diferentes apresentam diferenças significativas pelo teste ANOVA/Bonferroni ($p<0,05$).

A Tabela 3 apresenta os dados obtidos na avaliação dos parâmetros biológicos das ninfas ao alimentar nas linhagens BALB/c, C57BL/6 e Swiss. A porcentagem de recuperação foi de 91,6% em camundongos BALB/c, 88,8% em camundongos C57BL/6 e de 75% em camundongos Swiss. O tempo de alimentação não apresentou diferença estatística nas três linhagens testadas ($p>0,05$). Esse período para os camundongos das linhagens BALB/c, C57BL/6 e Swiss teve média de 5,4, 5,2 e 4,9 dias, respectivamente. Em relação ao peso médio das ninfas após a alimentação, houve diferença estatística significativa apenas entre as linhagens BALB/c e Swiss ($p<0,05$). As ninfas alimentadas em camundongos BALB/c obtiveram um peso médio 24,3% maior que as ninfas alimentadas em camundongos Swiss e 16,4% maior que as ninfas em camundongos C57BL/6. A porcentagem de muda das ninfas alimentadas nas três linhagens variou entre 83,3% e 92,3% nas linhagens BALB/c e Swiss, respectivamente. O tempo médio de muda obteve diferença estatisticamente significativa ($p<0,05$) quando comparado entre as três linhagens. Ninfas alimentadas em camundongos BALB/c e C57BL/6 apresentaram tempo médio de muda de 14,8 e 15,1 dias, respectivamente. Esses valores são significativamente menores ($p<0,05$) em relação às ninfas alimentadas em camundongos Swiss, que tiveram o tempo médio de 17,1 dias.

Tabela 3: Parâmetros biológicos de ninfas de *Amblyomma sculptum* alimentadas em camundongos das linhagens BALB/c, C57BL/6 e Swiss.

Parâmetros	BALB/c	C57BL/6	Swiss
n (n/camundongo)	36 (12)	36 (12)	36 (12)
Recuperação (%)	91,6	88,8	75,0
Tempo de alimentação (dias)*	5,4 ± 1,1[a]	5,2 ± 0,6[a]	4,9 ± 1,4[a]
Peso após a alimentação (mg)*	17,1 ± 4,9[a]	14,3 ± 5,4[ab]	13,1 ± 4,3[b]
Muda/camundongo (%)	88,8	83,3	92,3
Tempo de muda (dias)*	14,8 ± 0,8[a]	15,1 ± 0,8[a]	17,1 ± 1,4[b]

*Média ± DP, valores em uma linha seguidas por letras diferentes apresentam diferenças significativas pelo teste ANOVA/Bonferroni ($p<0,05$).

Ninfas de *A. sculptum* foram alimentadas em camundongos BALB/c e BALB/c knockout para o receptor ST2 (kST2). Os parâmetros biológicos dos dois grupos foram comparados a fim de verificar se as ninfas conseguiriam se alimentar em camundongos kST2 (Tabela 4). De forma geral, as ninfas de *A. sculptum* alimentadas em camundongos kST2 tiveram parâmetros biológicos bem semelhantes às ninfas que alimentaram em camundongos BALB/c. Apenas o tempo médio de alimentação apresentou diferenças significativas ($p<0,05$). Ninfas alimentadas em camundongos BALB/c apresentaram o tempo médio de alimentação de 4,6 dias, significantemente menor ($p<0,05$) do que o tempo médio de 5,3 dias das ninfas alimentadas em camundongos kST2.

Tabela 4: Parâmetros biológicos de ninfas de *Amblyomma sculptum* alimentadas em camundongos das linhagens BALB/c e BALB/c knockout para o receptor ST2 (kST2).

Parâmetros	BALB/c	kST2
n (n/camundongo)	60 (10)	60 (10)
Recuperação/camundongo (%)	96,7 ± 5,2[a]	80,0 ± 16,7[a]
Tempo de alimentação (dias)*	4,6 ± 0,8[a]	5,3 ± 1,4[b]
Peso após a alimentação (mg)*	17,4 ± 4,9[a]	16,4 ± 4,5[a]
Muda/camundongo (%)	80,2 ± 29,4[a]	91,4 ± 7,0[a]
Tempo de muda (dias)*	15,8 ± 3,7[a]	15,9 ± 3,1[a]

*Média ± DP, valores em uma linha seguidas por letras diferentes apresentam diferenças significativas pelo teste t ($p<0,05$).

Adultos de *A. sculptum* foram colocados para alimentar em camundongos Swiss a fim de verificar se as fêmeas teriam um bom desempenho na alimentação e na oviposição (Tabela 5). A porcentagem de recuperação foi de 85%, ou seja, 17 entre as 20 fêmeas colocadas para alimentar junto com os machos foram recuperadas. O tempo médio de alimentação foi de 12,0 dias, e a média de peso após a alimentação foi de 629,2 mg. Das fêmeas recuperadas, 82,4% realizaram a oviposição. A média de peso da massa de ovos postos foi de 358,9 mg, e a porcentagem de eclosão desses ovos foi de 40,9%. Outro parâmetro avaliado foi a capacidade de oviposição, que indica quanto do peso final das fêmeas é usado na produção de ovos. A média da capacidade de oviposição das fêmeas foi de 49,6%.

Tabela 5: Parâmetros biológicos de fêmeas de *Amblyomma sculptum* alimentadas em camundongos Swiss.

Parâmetros	Média ± DP
n (n/camundongo)	20 (1)
Recuperação (%)	85,0
Tempo de alimentação (dias)	12,0 ± 3,9
Peso após a alimentação (mg)	629,2 ± 281,4
Fêmeas férteis (%)	82,4
Massa de ovos (mg)	358,9 ± 168,7
Eclosão (%)	40,9 ± 27,8
Capacidade de oviposição (%)*	49,6 ± 15,0

*Capacidade de oviposição = (peso da massa do ovo/ peso inicial da fêmea) × 100

5.2. Avaliação dos parâmetros biológicos, em diferentes densidades parasitárias, de ninfas de *Amblyomma sculptum* alimentadas em camundongos BALB/c e camundongos kST2

Para avaliar se os parâmetros alimentares dos carrapatos são alterados pela densidade parasitária, foi feita a comparação colocando 5 e 10 ninfas de *A. sculptum* para se alimentar em camundongos BALB/c e camundongos kST2.

Os carrapatos alimentados em camundongos BALB/c não apresentaram diferenças estatísticas ($p>0,05$) entre os grupos com 5 e 10 ninfas na porcentagem de recuperação (Tabela 6). Apesar disso, é possível observar que a porcentagem de recuperação do grupo 10 ninfas é maior que a do grupo 5 ninfas. O tempo médio de alimentação quando 5 ninfas se alimentam juntas foi de 5,2 dias, significantemente maior ($p<0,01$) que o tempo médio de alimentação de 4,6 dias das ninfas quando 10 ninfas se alimentam juntas. O peso médio das ninfas quando 5 ninfas se alimentam juntas foi de 12,9 mg, significantemente menor ($p<0,01$) que o peso médio de 17,5 mg das ninfas quando 10 ninfas se alimentam juntas. A porcentagem de muda e o tempo médio de muda não apresentaram diferenças estatísticas ($p>0,05$) entre os grupos.

Ao analisar os resultados de todos os parâmetros descritos, podemos inferir que as ninfas alimentadas em uma densidade parasitária maior tiveram um desempenho melhor do que as ninfas alimentadas em uma densidade parasitária menor.

Tabela 6: Parâmetros biológicos de ninfas de *Amblyomma sculptum* alimentadas em camundongos BALB/c com diferentes densidades parasitárias.

Parâmetros	5 ninfas	10 ninfas
n (n/camundongo)	30 (5)	60 (10)
Recuperação/camundongo (%)*	60,0 ± 42,0[a]	96,7 ± 5,2[a]
Tempo de alimentação (dias)*	5,2 ± 0,6[a]	4,6 ± 0,8[b]
Peso após a alimentação (mg)*	12,9 ± 5,3[a]	17,4 ± 4,9[b]
Muda/camundongo (%)	67,0 ± 38,7[a]	80,2 ± 29,4[a]
Tempo de muda (dias)*	16,2 ± 3,3[a]	15,8 ± 3,7[a]

*Média ± DP, valores em uma linha seguidas por letras diferentes apresentam diferenças significativas pelo teste t ($p<0,05$).

Os carrapatos alimentados em camundongos kST2 não apresentaram diferenças estatísticas ($p>0,05$) entre os grupos com 5 e 10 ninfas na porcentagem de recuperação, no tempo médio de alimentação, na porcentagem de muda e no tempo médio de muda (Tabela 7). Assim como observado com a linhagem selvagem, o peso médio das ninfas quando 5 ninfas se alimentam juntas foi de 12,9 mg, significantemente menor ($p<0,01$) que o peso médio de 16,4 mg das ninfas quando 10 ninfas se alimentam juntas.

Tabela 7: Parâmetros biológicos de ninfas de *Amblyomma sculptum* alimentadas em camundongos BALB/c knockout para o receptor ST2 (kST2) com diferentes densidades parasitárias.

Parâmetros	5 ninfas	10 ninfas
n (n/camundongo)	30 (5)	60 (10)
Recuperação/camundongo (%)*	83,3 ± 8,2[a]	80,0 ± 16,7[a]
Tempo de alimentação (dias)*	5,5 ± 1,3[a]	5,3 ± 1,4[a]
Peso após a alimentação (mg)*	12,9 ± 3,9[a]	16,4 ± 4,5[b]
Muda/camundongo (%)	70,8 ± 31,1[a]	91,4 ± 7,0[a]
Tempo de muda (dias)*	17,1 ± 3,2[a]	15,9 ± 3,1[a]

*Média ± DP, valores em uma linha seguidas por letras diferentes apresentam diferenças significativas pelo teste t ($p<0,05$).

Assim como o observado nas ninfas alimentadas em diferentes densidades em camundongos BALB/c, apesar da porcentagem de recuperação nos dois grupos ser semelhante, as ninfas alimentadas em uma densidade parasitária maior nos camundongos kST2 tiveram um desempenho melhor do que as ninfas alimentadas em uma densidade parasitária menor nos camundongos kST2.

5.3. Parâmetros biológicos das ninfas de *Amblyomma sculptum* alimentadas sucessivamente em camundongos

Diferentes parâmetros biológicos das ninfas de *A. sculptum* alimentadas sucessivamente em camundongos foram mensurados.

Ninfas alimentadas sucessivamente em camundongos BALB/c tiveram uma diminuição na recuperação da primeira para a segunda infestação, seguido de um aumento da segunda para a terceira infestação (Tabela 8). A porcentagem de recuperação da primeira infestação foi 52,7% maior que a porcentagem de recuperação da segunda infestação. Houve um aumento na porcentagem de recuperação da segunda para a terceira infestação de 2,7%. Apesar da grande diferença na porcentagem de recuperação, esse dado não apresentou diferença

estatística (p>0,05). A média de tempo de alimentação das ninfas na primeira infestação foi de 4,6 dias, significantemente menor (p<0,001) que a média da segunda infestação que foi de 5,7 dias e significantemente menor (p<0,001) que a média da terceira infestação, de 7,5 dias. Podemos observar também que o tempo médio de alimentação apresentou um aumento crescente da primeira para a terceira infestação. O peso médio das ninfas na primeira infestação foi de 17,4 mg, significativamente maior (p<0,01) que o peso médio de 14,0 mg das ninfas da segunda infestação. O peso médio das ninfas na terceira infestação foi de 17,6 mg, significativamente maior (p<0,05) que o peso médio da segunda infestação. A porcentagem de muda e o tempo médio de muda não apresentaram diferenças significativas (p>0,05) da primeira para a terceira infestação. A porcentagem de muda foi de 80,2% na primeira infestação, 48,1% na segunda infestação e 81,7% na terceira infestação. O tempo médio de muda de 15,8 dias da primeira infestação foi significativamente menor (p<0,05) que o tempo médio de muda de 16,3 dias da terceira infestação.

Tabela 8: Parâmetros biológicos de ninfas de *Amblyomma sculptum* alimentadas sucessivamente em camundongos da linhagem BALB/c.

Parâmetros	1ª infestação	2ª infestação	3ª infestação
n (n/camundongo)	60 (10)	60 (10)	60 (10)
Recuperação/camundongo (%)*	96,7 ± 5,2^{a}	63,3 ± 30,1^{a}	65,0 ± 32,7^{a}
Tempo de alimentação (dias)*	4,6 ± 0,8^{a}	5,7 ± 1,1^{b}	7,5 ± 1,0^{c}
Peso após a alimentação (mg)*	17,4 ± 4,9^{a}	14,0 ± 5,4^{b}	17,6 ± 4,7^{a}
Muda/camundongo (%)	80,2 ± 29,4^{a}	48,1 ± 41,5^{a}	81,7 ± 40,2^{a}
Tempo de muda (dias)*	15,8 ± 3,7^{a}	16,4 ± 2,8^{ab}	16,3 ± 1,5^{b}

*Média ± DP, valores em uma linha seguidas por letras diferentes apresentam diferenças significativas pelo teste ANOVA/Bonferroni (p<0,05).

Foram analisados parâmetros biológicos de ninfas que se alimentaram sucessivamente em camundongos BALB/c knockout para o receptor ST2 (Tabela 9). Não houve diferenças significativas (p>0,05) na porcentagem de recuperação e no tempo médio de muda. O tempo médio de alimentação na primeira infestação foi de

5,3 dias, significativamente menor (p<0,001) que na terceira infestação onde a média foi de 6,5 dias. O tempo médio de alimentação na terceira infestação também foi significativamente maior (p<0,001) que o tempo médio de 5,1 dias da segunda infestação. O peso médio das ninfas na primeira infestação foi de 16,4 mg, significativamente maior (p<0,001) que o peso médio de 11,9 mg da segunda infestação. O peso médio das ninfas na terceira infestação foi de 19,1 mg, significativamente maior (p<0,001) que o peso médio da segunda infestação. A porcentagem de muda da primeira infestação foi de 91,4%, significantemente maior (p<0,5) que a porcentagem de muda de 62,9% da segunda infestação.

Tabela 9: Parâmetros biológicos de ninfas de *Amblyomma sculptum* alimentadas sucessivamente em camundongos da linhagem BALB/c knockout para o receptor ST2 (kST2).

Parâmetros	1ª Infestação	2ª infestação	3ª Infestação
n (n/camundongo)	60 (10)	60 (10)	60 (10)
Recuperação/camundongo (%)*	80,0 ± 16,7[a]	78,3 ± 16,0[a]	68,3 ± 31,9[a]
Tempo de alimentação (dias)*	5,3 ± 1,4[a]	5,1 ± 1,0[a]	6,5 ± 1,3[b]
Peso após a alimentação (mg)*	16,4 ± 4,5[a]	11,9 ± 4,0[b]	19,1 ± 6,1[a]
Muda/camundongo (%)	91,4 ± 7,0[a]	62,9 ± 29,2[b]	78,2 ± 11,8[ab]
Tempo de muda (dias)*	15,9 ± 3,1[a]	16,4 ± 3,0[a]	16,8 ± 2,4[a]

*Média ± DP, valores em uma linha seguidas por letras diferentes apresentam diferenças significativas pelo teste ANOVA/Bonferroni (p<0,05).

Os parâmetros biológicos das ninfas alimentadas sucessivamente em camundongos Swiss estão representados na Tabela 10. Não houve diferenças estatísticas (p>0,05) na porcentagem de recuperação. O tempo médio de alimentação das ninfas decaiu da primeira para a terceira infestação. Na primeira infestação o tempo médio de alimentação foi de 5,6 dias, significativamente maior (p<0,001) que o tempo de 4,7 dias da terceira infestação. Na segunda infestação o tempo médio de alimentação foi de 5,4 dias, tempo também significativamente maior (p<0,01) que o tempo de alimentação da terceira infestação. O peso médio das

ninfas na primeira infestação de 14,7 mg foi significativamente maior (p<0,001) que o peso médio das ninfas de 11,8 mg na segunda infestação. O peso médio das ninfas de 14,4 mg na terceira infestação também é significativamente maior (p<0,001) que o da segunda infestação. Outro parâmetro em que podemos observar aumento crescente da primeira para a terceira infestação é a porcentagem de muda das ninfas. Na primeira infestação, a porcentagem de muda foi de 62,5%, menor que a porcentagem de 67,8% da segunda infestação, e significativamente menor (p<0,5) que a porcentagem de 93,3% da terceira infestação. O tempo médio de muda teve uma diminuição gradativa da primeira para a terceira infestação. Na primeira infestação, o tempo médio foi de 17,9 dias, significativamente maior (p<0,001) que o tempo médio de 15,2 dias da segunda infestação e significativamente maior (p<0,001) que o tempo médio de 14,3 dias da terceira infestação. O tempo médio de muda da segunda infestação também foi significativamente maior (p<0,01) que o tempo médio de muda da terceira infestação.

Tabela 10: Parâmetros biológicos de ninfas de *Amblyomma sculptum* alimentadas sucessivamente em camundongos da linhagem Swiss.

Parâmetros	1ª infestação	2ª infestação	3ª Infestação
n (n/camundongo)	180 (12)	180 (12)	180 (12)
Recuperação/camundongo (%)	43,3 ± 20,9^{a}	45,5 ± 31,3^{a}	52,8 ± 39,4^{a}
Tempo de alimentação (dias)*	5,6 ± 1,9^{a}	5,4 ± 1,5^{a}	4,7 ± 1,2^{b}
Peso após a alimentação (mg)*	14,7 ± 4,5^{a}	11,8 ± 4,0^{b}	14,4 ± 5,1^{a}
Muda/camundongo (%)*	62,5 ± 29,0^{a}	67,8 ± 28,2^{ab}	93,3 ± 13,4^{b}
Tempo de muda (dias)*	17,9 ± 2,1^{a}	15,2 ± 1,7^{b}	14,3 ± 0,4^{c}

*Média ± DP, valores em uma linha seguidas por letras diferentes apresentam diferenças significativas pelo teste ANOVA/Bonferroni (p<0,05).

Outro parâmetro importante que foi analisado é a razão machos/fêmeas obtidas pelas ninfas recuperadas em cada infestação em camundongos Swiss

(Tabela 11). Apenas algumas ninfas recuperadas do Grupo 9 foram avaliadas quanto a razão machos/fêmeas e seus respectivos pesos (ver Tabela 1). A razão macho/fêmea da segunda infestação de 1,3 foi maior que as razões macho/fêmea da 1ª e 3ª infestações, de 0,5 e 0,9, respectivamente.

Tabela 11: Razão machos/fêmeas de *Amblyomma sculptum* obtida em cada infestação em camundongos Swiss.

Infestação	1ª	2ª	3ª	Total
N	47	40	73	160
Não realizaram a muda	23	10	7	40
Número de machos	8[a]	17[a]	32[a]	57
Número de fêmeas	16[a]	13[a]	34[a]	63
Razão macho/fêmea	0,5	1,3	0,9	0,9

Valores em uma linha seguidas por letras diferentes apresentam diferenças significativas pelo teste Qui-Quadrado ($p<0,05$).

As médias de peso das ninfas que mudaram para machos e para fêmeas foram analisadas separadamente para avaliar qual a relação deste parâmetro com as diferenças das razões encontradas (Tabela 12). Podemos observar que a média de peso das que originaram machos foi significativamente ($p<0,05$) menor que a média de peso das que geraram fêmeas em cada infestação.

Tabela 12: Peso após a alimentação de ninfas de *Amblyomma sculptum* que viraram machos e fêmeas em cada infestação de camundongos Swiss (mg).

Infestação	1ª	2ª	3ª
Ninfas que mudaram para macho*	11,6 ± 3,0[a]	8,5 ± 2,1[a]	11,9 ± 3,5[a]
Ninfas que mudaram para fêmea*	16,7 ± 3,9[b]	14,1 ± 4,8[b]	18,8 ± 3,7[b]

*Média ± DP, valores em uma coluna seguidas por letras diferentes apresentam diferenças significativas pelo teste t ($p<0,05$).

5.4. Níveis de anticorpos contra antígenos da saliva de *Amblyomma sculptum* produzidos pelos camundongos Swiss imunizados

Foi feito um ELISA com os soros dos camundongos Swiss (n = 15) coletados após cada infestação utilizando anti-IgG como anticorpo secundário. O gráfico mostra o resultado obtido quando utilizamos o EGS de *A. sculptum* como antígeno no ensaio (Figura 7). Podemos observar um aumento significativo ($p<0,05$) no nível de anticorpos contra antígenos do EGS após a 3ª infestação.

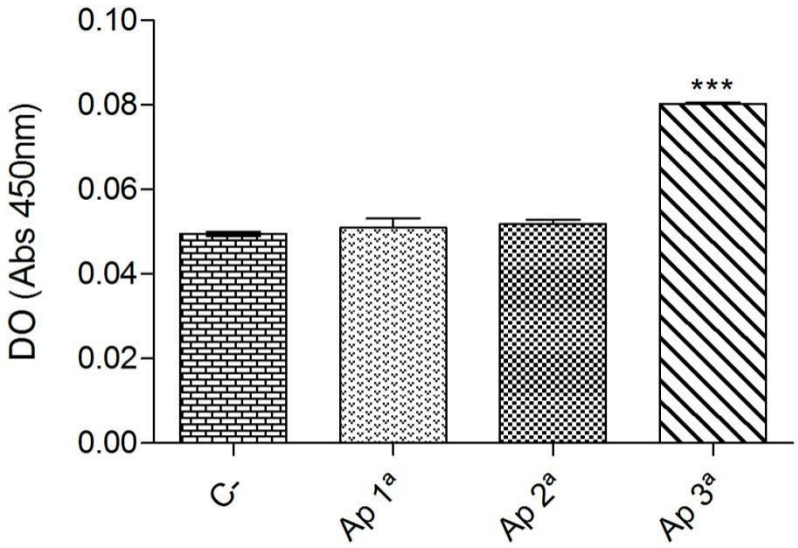


Figura 7: Níveis de IgG anti-EGS de *Amblyomma sculptum* presentes no soro de camundongos infestados. Os dados representam a média ± DP de sete camundongos. As placas foram sensibilizadas com extrato de glândula salivar (EGS) de *A. sculptum*. Amostras: Controle negativo (C-), 7 dias após primeira infestação (Ap 1ª), 7 dias após segunda infestação (Ap 2ª) e 7 dias após terceira infestação (Ap 3ª). Análise estatística: ANOVA/Bonferroni: *** $p<0,001$. Asteriscos indicam diferença estatística para o controle negativo.

O ELISA também foi feito utilizando a saliva de *A. sculptum* no ensaio (Figura 8). Assim como no gráfico de ELISA utilizando EGS, observou-se um aumento crescente significativo no nível de anticorpos contra antígenos da saliva após a 3ª infestação. Porém esse aumento foi menor do que o encontrado no ensaio com o EGS.

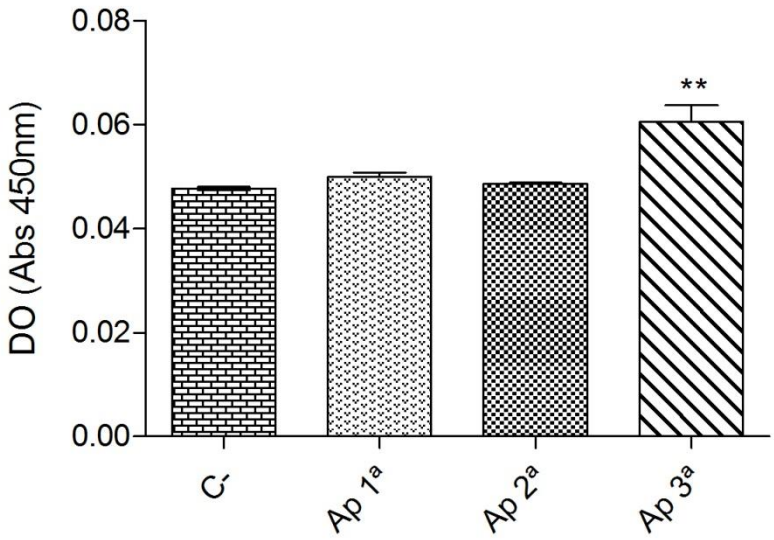


Figura 8: Níveis de IgG anti-saliva de *Amblyomma sculptum* presentes no soro de camundongos infestados. Os dados representam a média ± DP de sete camundongos. As placas foram sensibilizadas com saliva de *A. sculptum*. Amostras: Controle negativo (C-), 7 dias após primeira infestação (Ap 1ª), 7 dias após segunda infestação (Ap 2ª) e 7 dias após terceira infestação (Ap 3ª). Análise estatística: ANOVA/Bonferroni: ** $p<0,01$. Asteriscos indicam diferença estatística para o controle negativo.

5.5. Reconhecimento de antígenos salivares de *Amblyomma sculptum* pelo soro de camundongos Swiss usados como fonte alimentar por ninfas

Ao avaliar o perfil de proteínas do EGS de *A. sculptum* em SDS-PAGE, observa-se várias proteínas entre os pesos moleculares de, aproximadamente, 14,4 a 116,0 kDa. Os anticorpos presentes no soro dos camundongos Swiss reconheceram, através de Western Blot, moléculas do EGS dos carrapatos,

entretanto, apenas algumas proteínas foram reconhecidas. Visualmente, percebe-se que a proteínas majoritárias marcadas pelos anticorpos apresentaram peso molecular estimado de, aproximadamente, 150, 100, 40, 37 e 25 KDa (Figura 9). Moléculas de outros pesos moleculares também foram marcadas pelos anticorpos, entretanto com nível de marcação mais leve.

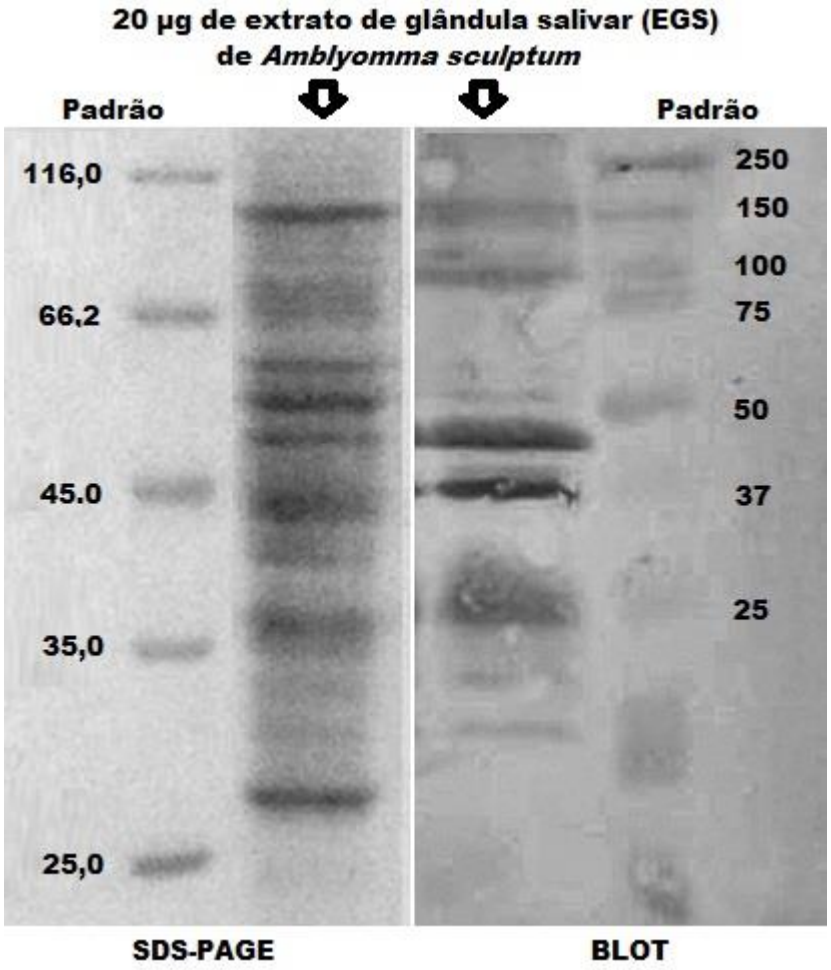


Figura 9: SDS-PAGE a 12,5% e Western Blot de extrato de glândula salivar (EGS) de *Amblyomma sculptum* com pool de soro dos camundongos Swiss alimentados na 1ª, 2ª e 3ª infestações.

Também foi feito SDS-PAGE e Western Blot utilizando 20 µg de proteína salivar de *A. sculptum*, isto é, de saliva secretada através de estímulo com pilocarpina. Foi utilizado anti-IgG conjugado com peroxidase como anticorpo secundário (Figura 10). Ao avaliar a saliva de *A. sculptum* em SDS-PAGE, também se observa grande quantidade de bandas entre, aproximadamente, 14,4 a 116,0 kDa. Entretanto, ao

comparar o SDS-PAGE do EGS e da saliva, observa-se que a saliva apresenta um perfil de distribuição de proteínas diferente do EGS. Os anticorpos presentes no soro dos camundongos reconheceram, através de Western Blot, apenas duas moléculas salivares de aproximadamente 100 e 50 kDa mostrando que a saliva possui menos proteínas imunogênicas.

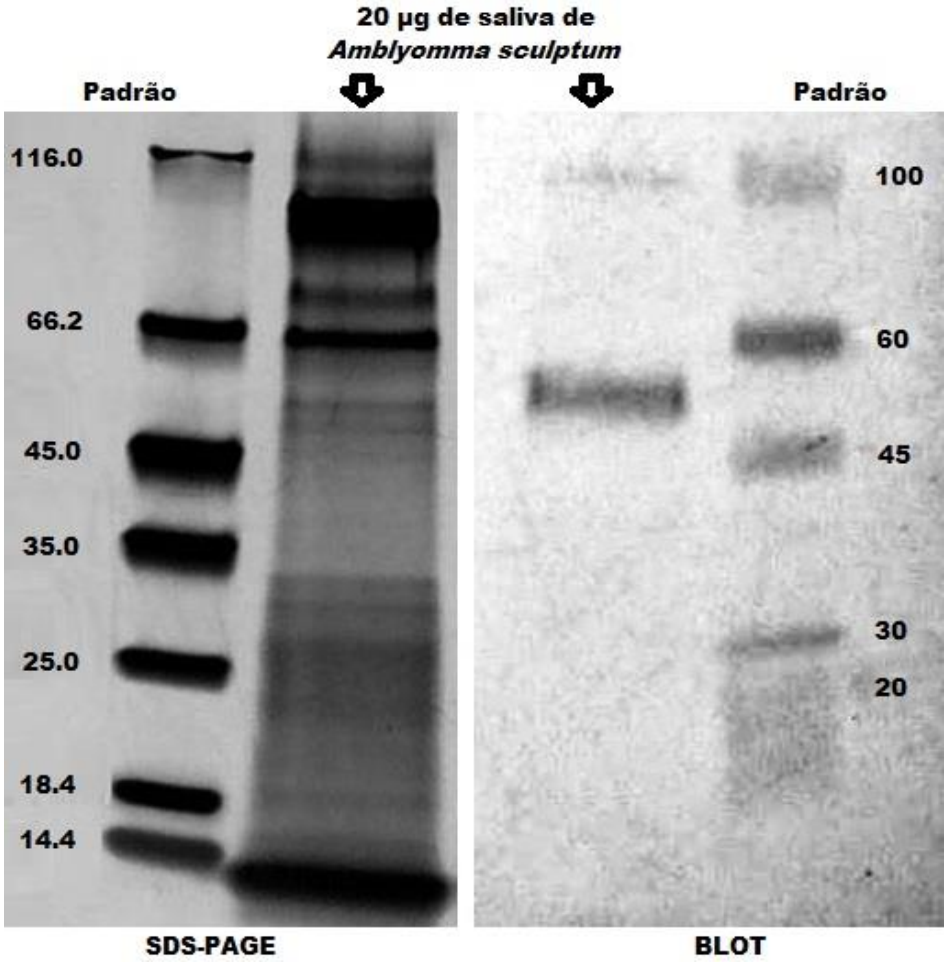


Figura 10: SDS-PAGE a 12,5% e Western Blot de saliva de *Amblyomma sculptum* com pool de soro dos camundongos Swiss alimentados na 1ª, 2ª e 3ª infestações.

6. DISCUSSÃO

O presente trabalho teve como principal objetivo descrever os parâmetros biológicos do carrapato *Amblyomma sculptum* alimentado em diferentes linhagens de camundongos e avaliar o desenvolvimento de resposta imune humoral pelos hospedeiros. Até o momento, este foi o primeiro trabalho que apresentou os principais parâmetros biológicos de todos os estágios de vida do *A. sculptum* quando alimentado em camundongos. Realizamos ensaios utilizando diferentes linhagens de camundongos, diferentes densidades parasitárias e sucessivas infestações a fim de obter maiores detalhes sobre a relação carrapato - camundongos.

Alguns dos dados obtidos apresentaram distribuição não normal. Entretanto, como a maioria dos trabalhos revisados realizaram uma análise paramétrica de seus dados e apresentaram, dessa forma, as médias dos dados, optamos por também utilizar uma análise paramétrica de forma que os nossos dados pudessem ser comparados com os dados dos artigos revisados.

Os parâmetros biológicos de larvas alimentadas em camundongos BALB/c, C57BL/6 e Swiss foram semelhantes. A porcentagem de recuperação, que variou de 5,7 a 9,8%, foi baixa. Não se sabe ao certo o motivo da porcentagem baixa nas três linhagens analisadas, mas a causa pode estar relacionada à metodologia, pois os carrapatos ficaram expostos em todo corpo do animal sem nenhuma proteção contra a tentativa dos camundongos de se livrarem das larvas. Castagnolli et al. (2003) mostraram que em cavalos, em condições de campo, a porcentagem de recuperação de larvas de *A. sculptum* foi de 19,9%. Por outro lado, Prata, Faccini e Daemon (1998) obtiveram uma porcentagem de recuperação de larvas ingurgitadas de *A. sculptum* de 57,9% em coelhos. Essas diferenças nas porcentagens de recuperação podem ter relação com a resposta imune dos hospedeiros ou com as diferenças entre os métodos de alimentação utilizados nos trabalhos, em que as larvas foram colocadas no corpo dos camundongos sem nenhuma proteção contra a ação dos mesmos, enquanto as ninfas foram colocadas em uma câmara de alimentação afixada no dorso dos camundongos.

O tempo de alimentação das larvas variou de 3 a 5 dias, resultado semelhante ao encontrado por Prata, Alonso e Sanavria (1997) onde o tempo de alimentação de larvas de *A. sculptum* em coelhos variou de 4 a 6 dias. Olivieri e Serra-Freire (1984a)

também realizaram infestações experimentais em coelhos e verificaram um período de 3 a 8 dias para o tempo de alimentação larval de *A. sculptum*. O peso após a alimentação teve uma média de 0,83 mg, valor maior do que o encontrado por Castagnolli et al. (2003) nas larvas alimentadas em cavalos que apresentaram uma média de 0,69 mg. Foi possível observar que a porcentagem de muda das larvas alimentadas nas linhagens BALB/c e C57BL/6 foram aproximadamente 23% maior que a porcentagem de muda das larvas de camundongos Swiss. Entretanto, em cavalos, Castagnolli et al. (2003) mostraram que a porcentagem de muda foi de 57,2%, valor semelhante ao das larvas alimentadas em camundongos Swiss (57,7%). Sanavria e Prata (1996) relataram que o tempo de muda das larvas de *A. sculptum* alimentadas em coelhos foi de 11,3 dias. No nosso trabalho, o tempo médio de muda das larvas foi de 11,1 dias.

Quando avaliamos os parâmetros de ninfas alimentadas em diferentes linhagens podemos observar que a porcentagem de recuperação das ninfas foi alta nas três linhagens. Entretanto, ninfas alimentadas em camundongos BALB/c tiveram uma recuperação aproximadamente 22,1% maior que as ninfas alimentadas em camundongos Swiss, enquanto em camundongos C57BL/6 esse aumento foi de 18,4% em relação aos camundongos Swiss. Além disso, ninfas alimentadas em camundongos Swiss tiveram a menor média de peso e o maior tempo de muda. Em conjunto, esses dados mostram que ninfas de *A. sculptum* apresentam mais dificuldade de se alimentarem em camundongos Swiss. Apesar de terem o pior desempenho alimentar entre as três linhagens, as ninfas alimentadas em camundongos Swiss apresentam parâmetros semelhantes ao das ninfas alimentadas em cavalos. Castagnolli et al. (2003) mostraram que ninfas de *A. sculptum* alimentadas em cavalos de campo tem uma porcentagem de recuperação de 72,4%, valor semelhante ao encontrado no nosso trabalho onde ninfas alimentadas em camundongos Swiss apresentam uma porcentagem de recuperação de 75%.

Prata, Alonso e Sanavria (1996) relataram que o tempo de alimentação das ninfas de *A. sculptum* em coelhos variou de 3 a 5 dias. Em cavalos de campo, o tempo médio de alimentação das ninfas de *A. sculptum* é de 7,3 dias (Castagnolli et al. 2003). Nosso trabalho encontrou tempos de alimentação com uma média variando de 4,9 a 5,4 dias. Ao comparar a alimentação de ninfas em coelhos e camundongos com a alimentação de ninfas em cavalos, observa-se que os tempos de alimentação em

condições ambientais são bastante semelhantes aos obtidos quando a alimentação de ninfas ocorre em condições laboratoriais. O peso após a alimentação das ninfas alimentadas em camundongos BALB/c foi 19,5% superior ao peso das ninfas de C57BL/6 e 30,5% superior ao peso das ninfas de Swiss. Prata, Faccini e Daemon (1998) ao realizarem infestações experimentais em coelhos, obtiveram uma média geral para grupos de 50 ninfas de 667,2 ± 54,9 mg (ou 13,5 mg/ninfa). O peso médio de ninfas alimentadas em cavalos de campo é de 12,1 mg (Castagnolli et al. 2003). Mesmo o Swiss, sendo a pior linhagem nesse parâmetro com um peso médio de 13,1 mg, possui o peso médio semelhante aos obtidos em coelhos e superior ao obtido em hospedeiros naturais. Sendo assim, o peso após a alimentação de ninfas alimentadas em camundongos é igual ou até mesmo superior ao peso de ninfas alimentadas em coelhos e cavalos.

Castagnolli et al. (2003) mostraram que a porcentagem de muda das ninfas alimentadas em cavalos de campo é de 90,3%, valor que também é semelhante à porcentagem de muda de 92,3% das ninfas alimentadas em camundongos Swiss. A média do tempo de muda variou de 14,8 a 17,1 dias. Prata, Alonso e Sanavria (1996) observaram que o período compreendido entre o desprendimento da ninfa alimentadas em coelhos até o término da ecdise ninfa/adulto oscilou entre 13 e 14 dias, com média de 13,4 ± 0,5 dias. Na natureza, ninfas alimentadas em cavalos demoraram em média 12,8 dias para realizarem a muda. O período de muda ninfa/adulto é maior em condições naturais quando comparado ao tempo de muda em condições de temperatura e umidade controladas. A partir disso pode-se concluir que o controle das condições de temperatura e umidade, realizadas em laboratório, pode interferir na duração do tempo de muda.

A utilização de animais que reproduzam parâmetros biológicos parecidos com os parâmetros de hospedeiros naturais talvez seja melhor para a realização de experimentos. Além disso, camundongos BALB/c e C57BL/6 são menores que camundongos Swiss, sendo difícil o manuseio dessas linhagens para a alimentação dos carrapatos nas câmaras de alimentação. Entretanto, todas as três linhagens testadas apresentam condições para manter uma colônia de sucesso de *A. sculptum* em laboratório.

Foi realizado um outro experimento a fim de verificar se ninfas de *A. sculptum* conseguiriam realizar o repasto sanguíneo em camundongos BALB/c knockout para

o receptor ST2 (kST2). O receptor ST2 pertence à família de receptores IL-1 e foi originalmente identificado há mais de 20 anos como um “serum inducible secreted protein” em fibroblastos murinos (Klemenz; Hoffmann; Werenskiold, 1989; Tominaga 1989; Tominaga et al. 1991 e 1992; Bergers et al. 1994). O gene ST2 codifica no mínimo três isoformas de proteína, uma forma solúvel (sST2), uma forma ligada a membrana (ST2L) e um ST2 variante (Tago et al., 2001). Em camundongos, a ligação de IL-33 ao receptor ST2 (ST2L) expresso na membrana de mastócitos induz a produção de prostaglandinas e liberação de grânulos citoplasmáticos contendo mediadores pré-formados, como heparina, proteases e histamina, que agem rapidamente aumentando o fluxo sanguíneo local (ocasionando afluxo de leucócitos local) e aumentando a permeabilidade vascular (De Veer; Kemp; Meeusen, 2007; Abraham & John 2010). Nossa hipótese era de que as ninfas alimentadas em camundongos kST2 teriam uma certa dificuldade ao realizarem o repasto sanguíneo já que o fluxo sanguíneo e o aumento da permeabilidade vascular seriam prejudicados pela ausência do receptor ST2. Foi possível observar com os resultados obtidos que as ninfas alimentadas em camundongos kST2 apresentaram um desempenho alimentar semelhante ao das ninfas alimentadas em camundongos BALB/c, mostrando assim que mesmo com a ausência do receptor ST2 os carrapatos são capazes de terem sucesso alimentar.

Os parâmetros alimentares de adultos que realizaram o repasto sanguíneo em camundongos Swiss também foram analisados. O tempo médio de alimentação das fêmeas foi de 12 dias. Castagnolli et al. (2003) mostraram que fêmeas de *A. sculptum* alimentadas em cavalos de campo demoraram em média 13,8 dias para ingurgitarem. A média de peso das fêmeas alimentadas em camundongos Swiss foi de 629,2 mg, média superior à de 348,4 mg das fêmeas alimentadas em coelhos (de Almeida, 2008), e também superior ao maior peso encontrado em fêmeas de *A. sculptum* alimentadas em cavalos (650,8 mg) (Lopes et al., 2000). A capacidade de oviposição foi de 49,6 nas fêmeas alimentadas em camundongos Swiss, resultado semelhante ao encontrado por Borges et al. (2002) onde a capacidade de oviposição variou de 44,0 a 53,9%. Prata e Daemon (1997) definiram que em 1 g de postura de *A. sculptum* contém cerca de 16.400 ovos. Dessa forma, as fêmeas alimentadas em camundongos Swiss produziram cerca de 5.886 ovos, evidenciando a grande capacidade reprodutiva do carrapato *A. sculptum*.

A densidade é outra variável importante na interação ectoparasita-hospedeiro. Existem observações divergentes sobre como a densidade do ectoparasita afeta o sucesso da alimentação. Tripet et al. (2009) observaram que flebotomíneos que se alimentam em grupo se beneficiam dos efeitos combinados de anticoagulante, antiplaquetário, vasodilatador e imunomodulador de picadas múltiplas e, portanto, produzem e gastam menos saliva adquirindo sangue. Da mesma forma, Davidar, Wilson e Ribeiro (1989) observaram que larvas e ninfas de *Ixodes dammini* apresentaram maior ingurgitamento em densidades mais altas em camundongos de pata branca (*Peromyscus leucopus*). Van Oosten, Matthysen e Heylen (2016) investigaram os efeitos da densidade de carrapatos adultos no desempenho alimentar de *Ixodes arboricola* infestando filhotes de chapins (*Parus major*) e observaram que as taxas de recuperação dos adultos aumentaram significativamente em maiores densidades. Em contrapartida, os carrapatos podem competir por locais de alimentação no hospedeiro, causando uma redução no sucesso da alimentação em densidades mais altas. Por exemplo, Levin e Fish (1998) observaram um efeito negativo da densidade no sucesso alimentar de larvas de *I. scapularis* em camundongos de patas brancas. Bartosik e Buczek (2012) também relataram um efeito negativo da densidade no sucesso da alimentação de adultos de *I. ricinus* e *Dermacentor reticulatus* em coelhos. Nossos resultados nos permitem inferir que as ninfas alimentadas em uma densidade parasitária maior tiveram um desempenho melhor do que as ninfas alimentadas em uma densidade parasitária menor. Por exemplo, em camundongos BALB/c a porcentagem de recuperação das ninfas de *A. sculptum* aumentou com a densidade. Além disso, o peso médio das ninfas alimentadas em maior densidade foi 34,8% superior ao peso médio das ninfas alimentadas em menor densidade. Já nos camundongos kST2, tanto o peso médio quanto a porcentagem de muda aumentaram com a densidade dos carrapatos. Estes dados corroboram a hipótese de que a saliva liberada por um carrapato no local de alimentação auxilia a hematofagia de carrapatos próximos.

Os parâmetros biológicos das ninfas alimentadas sucessivamente em camundongos BALB/c, kST2 e Swiss nos mostraram que esses camundongos não desenvolveram uma resistência adquirida que levasse a diminuição do desempenho alimentar das ninfas ao longo das infestações. Kurokawa et al. (2020) demonstraram experimentalmente, a partir de três infestações sucessivas, que camundongos BALB/c

não foram capazes de desenvolver resistência efetiva contra ninfas de *I. scapularis*, pois não houve diferença estatística (p>0,05) na porcentagem de recuperação das ninfas da primeira infestação para a segunda e terceira infestações. Dusbabek et al. (1995) relatou que infestações sucessivas de ninfas de *I. ricinus* em camundongos BALB/c resultaram no aumento da porcentagem de recuperação e do peso médio, enquanto o tempo de alimentação foi reduzido significativamente (p<0,05-0,01) ao longo das infestações. Esses resultados indicam que os hospedeiros utilizados nesses experimentos não desenvolveram uma resistência adquirida. Em contrapartida, Kurokawa et al. (2020) mostraram que ninfas de *I. scapularis* alimentadas sucessivamente cobaias apresentaram uma porcentagem de recuperação significativamente menor (p<0,001) em uma segunda e terceira infestação. Allen et al. (1985) também relataram que quando camundongos BALB/c foram infestados repetidamente com *D. variabilis*, a quantidade de carrapatos ingurgitados e o peso desses carrapatos foram diminuindo a cada infestação, demonstrando assim uma resistência adquirida.

É importante ressaltar que essa resistência adquirida a carrapatos pode reduzir o risco de transmissão de patógenos para os hospedeiros (Bell; Stewart; Wikel, 1979). Esta é a base para o desenvolvimento de vacinas direcionadas a antígenos de carrapatos para prevenir infestações e doenças causadas por patógenos transmitidos por carrapatos. Brown e Askenase (1982) mostraram que cobaias que expressam resistência adquirida ao carrapato *A. americanum* desenvolvem respostas inflamatórias cutâneas ricas em basófilos e eosinófilos nos locais de alimentação, e a rejeição do carrapato está associada a extensa degranulação local de basófilos. Brown et al. (1982) relataram que um soro anti-basófilo específico elimina basófilos em locais de alimentação de carrapatos levando a abolição da resistência a *A. americanum*. Esses resultados ilustram o papel crítico dos basófilos na expressão da resistência adquirida a carrapatos.

Pinter, Labruna e Faccini (2002) a fim de avaliar a proporção sexual de carrapatos *A. sculptum* coletados em campo, coletaram ninfas naturalmente ingurgitadas de cavalos e permitiram que mudassem para adultos em laboratório. Das 9044 ninfas ingurgitadas coletadas, 5326 (58,9%) mudaram para adultos no laboratório, totalizando 1883 machos (35,4%) e 3443 fêmeas (64,6%). A proporção sexual foi de 1:1.83 (M:F), ou seja, uma razão macho/fêmea de quase 0,5. Também

foram coletadas larvas de *A. sculptum* não alimentadas da ponta de capins de uma área onde capivaras e cavalos pastavam juntos. Essas larvas foram criadas em laboratório até a fase adulta sendo alimentadas em coelhos, onde geraram 490 machos (52,8%) e 433 fêmeas (47,2%). A proporção sexual após a muda das ninfas alimentadas em coelhos foi de 1,11:1 (M:F), razão macho/fêmea de 1,11. Prata, Faccini e Daemon (1998) também relataram uma proporção sexual de 1:1 de adultos derivados de 10.700 ninfas ingurgitadas de *A. sculptum* obtidas durante infestações de laboratório em coelhos. Nossos resultados mostram que de 160 ninfas ingurgitadas alimentadas em camundongos Swiss, 120 realizaram a muda pra adulto (75%), gerando 57 machos (47,5%) e 63 fêmeas (52,5%). A razão macho/fêmea obtida foi de 0,9. Esses dados são coerentes com a literatura e com o que é esperado, que é uma razão próxima de 1. Entretanto, podem haver variações quando o número de carrapatos é menor, como por exemplo na primeira infestação onde a razão foi de 0,5. Porém quando avaliamos a razão de um grupo onde o n é maior, como na terceira infestação, a razão volta a ser próxima de 1.

Existem várias diferenças biológicas e comportamentais entre os carrapatos ixodídeos fêmeas e machos. Um deles, por exemplo, é a necessidade das fêmeas se alimentam apenas uma vez de grandes quantidades de sangue durante alguns dias de fixação em um hospedeiro, enquanto os machos se alimentam de pequenas quantidades durante a alimentação e podem se alimentar de vários hospedeiros diferentes mais de uma vez (Sauer e Hair 1986). Nossos resultados mostram que ninfas de *A. sculptum* alimentadas em camundongos Swiss nas três infestações sucessivas com médias de peso variando de 8,5 a 11,9 mg produziram machos, enquanto as ninfas com médias de peso variando de 14,1 a 18,8 mg produziram fêmeas.

Estudos anteriores demonstraram diferenças significativas no peso de ninfas ingurgitadas; ninfas de maior peso mudaram para fêmeas e ninfas de menor peso mudaram para machos em *A. triguttatum* (Guglielmone e Moorhouse, 1985), *Amblyomma neumanni* (Aguirre; Viñabal; Guglielmone, 1999), *I. scapularis*, *D. variabilis* (Hu e Rowley 2000), *Hyalomma anatolicum* (Arthur e Snow, 1966), *I. ricinus* (Kahl; Hoff; Knulle, 1990 ; Dusbabek; Kopecky; Uhlir, 1994 ; Dusbebek 1996), *Ixodes rubicundus* (Belozerov; Fourie; Van Der Lingen, 1993), *A. maculatum*, *D. variabilis*, *R. sanguineus* s.l. (Nagamori et al., 2019), *Rhipicephalus bursa*

(Yeruham; Hadani; Galker, 2000) e *O. rostratus* (Costa et al., 2016. Como por exemplo, as ninfas ingurgitadas de *A. americanum* que mudaram para fêmeas pesavam entre 6,0 e 21,0 mg com um peso médio de 13,2 ± 2,2 mg (± DP), enquanto os machos variaram entre 2,0 e 13,0 mg com uma média de 8,4 ± 1,7 mg (Nagamori et al., 2019).

Os anticorpos IgG circulantes para antígenos de saliva, que são induzidos pela alimentação de carrapatos, são detectados em diferentes animais hospedeiros (Brossard, 1976; Brossard; Rutti; Haug, 1991; Wikel, 1996).

ELISA desenvolvido com o soro dos camundongos Swiss infestados detectou anticorpos antissaliva e anti-EGS que foram crescentes somente após uma terceira infestação de *A. sculptum*. O nível de IgG contra antígenos do EGS foi superior ao nível de IgG contra antígenos da saliva. Esse resultado corrobora com as observações de Western-blot realizado com o soro dos camundongos, que reconheceu mais proteínas no EGS do que na saliva. O EGS possui muitas proteínas imunogênicas intracelulares que não entram em contato com os hospedeiros. Essas proteínas são chamadas de antígenos ocultos. Hlatshwayo et al. (2004) mostrou que anticorpos séricos de coelhos expostos a *A. cajennense* e *A. hebraeum* reconhecem inespecificamente antígenos ocultos de vários órgãos do carrapato, incluindo o epitélio do intestino médio e a membrana basal. Ambos western-blot apresentados no trabalho foram feitos com saliva de fêmeas de *A. sculptum* ingurgitadas, e o soro usado foi de camundongos Swiss imunizados por ninfas do carrapato-estrela. É possível que tenha alguma diferença na composição salivar, pois os carrapatos expressam uma variedade da composição salivar em diferentes momentos.

Análises de transcriptoma e proteoma de glândulas salivares de carrapatos demonstraram que carrapatos da mesma espécie expressam diferencialmente proteínas da saliva de carrapatos, dependendo dos animais hospedeiros que alimentam (Narasimhan et al., 2019; Tirloni et al., 2017). Essa diferença na composição das proteínas da saliva pode contribuir, em parte, para diferenças nas respostas imunes do hospedeiro. Pensa-se que algumas propriedades imunomoduladoras da saliva do carrapato podem ter evoluído para polarizar a resposta imune do hospedeiro longe das respostas do tipo Th1, que prejudicam a alimentação do carrapato (Brossard & Wikel, 1997; Wikel, 1999). Ogden et al. (2002) observaram que em taxas naturais de altas infestação de *I. ricinus* em ovelhas, a

resposta imune aos antígenos da saliva se torna polarizada em direção a uma resposta Th2 associada a níveis elevados de IgG circulantes e a uma redução na resistência aos carrapatos. Já em bovinos, as concentrações de IgG podem não refletir com precisão as respostas do tipo Th1 ou Th2 porque os anticorpos circulatórios do isotipo IgG2 podem ser produzidos em respostas do tipo Th1 (Mulcahy et al., 1998). Além disso, variações na qualidade ou grau de respostas às proteínas da saliva do carrapato podem ter influências na transmissão de patógenos transmitidos por carrapatos, como sugerido por Wikel et al. (1997).

Não há dúvidas de que o conhecimento aprofundado da fisiologia, genética e comportamento do carrapato *A. sculptum* contribuirá para o desenvolvimento de métodos de controle, trazendo grandes benefícios à saúde humana e melhorando a produtividade animal. Nosso trabalho mostrou que camundongos são bons hospedeiros para o carrapato *A. sculptum*, podendo ser usados até três infestações sem desenvolverem resistência adquirida à picada dos carrapatos. Esses resultados trazem grandes contribuições pois a utilização de camundongos como hospedeiros em ambiente laboratorial é uma excelente alternativa a alimentação dos carrapatos, já que esses animais são de fácil manutenção e observação, facilitando a realização dos experimentos quando não se tem instalações necessárias para manutenção dos hospedeiros naturais.

7. CONCLUSÕES

- Camundongos das linhagens BALB/c, C57BL/6 e Swiss podem ser utilizados para manter uma colônia de *A. sculptum* em laboratório, porem as ninfas alimentadas em Swiss apresentam peso após alimentação menor e tempo de muda maior.

- Ninfas de *A. sculptum* alimentadas em camundongos kST2 tiveram parâmetros biológicos bem semelhantes às ninfas que alimentaram em camundongos BALB/c

- Fêmeas de *A. sculptum* realizam com sucesso o repasto sanguíneo em camundongos Swiss

- Ninfas alimentadas em camundongos BALB/c knockout para o receptor ST2 realizam o repasto sanguíneo com eficiência semelhante a ninfas alimentadas em camundongos BALB/c, apresentando uma porcentagem de recuperação maior, mas com tempo de alimentação maior.

- Ninfas de *A. sculptum* são mais eficientes quando alimentadas em densidades parasitárias de 10 ninfas/camundongo do que com 5 ninfas/camundongo.

- As ninfas realizaram com sucesso a hematofagia nas 3 infestações em camundongos BALB/c, kST2 e Swiss demonstrando que esses camundongos não desenvolvem uma resistência efetiva para controlar a infestação por carrapatos.

- O tempo de alimentação é maior quando ninfas se alimentam em camundongos das linhagens BALB/c e kST2 previamente infestados por carrapatos. Já na linhagem Swiss, o tempo de alimentação e o tempo de muda são menores.

- A média de peso das ninfas que originaram machos foi menor que a média de peso das ninfas que originaram fêmeas em cada infestação.

- O soro dos camundongos Swiss parasitados apresentou anticorpos antissaliva que foram crescentes somente após uma terceira infestação.

- Os anticorpos presentes no soro dos camundongos Swiss reconheceram, através de Western Blot, moléculas do extrato de glândula salivar e da saliva do carrapato, essa última representada por duas bandas, o que indica que a saliva tem poucas proteínas imunogênicas.

8. REFERÊNCIAS

ABRAHAM, Soman N.; JOHN, Ashley L. St. Mast cell-orchestrated immunity to pathogens**. Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 6, p. 440-452, 2010.

ABREU, Jéssica Figueiredo. Identificação e caracterização funcional de um inibidor da via clássica do sistema complemento expresso na glândula salivar do carrapato *Amblyomma sculptum*. 2018.

AGUIRRE, D. H.; VIÑABAL, A. E.; GUGLIELMONE, A. A. The life cycle of *Amblyomma neumanni* Ribaga, 1902 (Acari: Ixodidae) in the laboratory. **Experimental & applied acarology**, v. 23, n. 2, p. 159-164, 1999.

ALLEN, J. R. et al. *Dermacentor variabilis*: resistance to ticks acquired by mast cell-deficient and other strains of mice. **Experimental parasitology**, v. 59, n. 2, p. 169-179, 1985.

ALLEN, J. R. Immunology of interactions between ticks and laboratory animals. **Experimental & applied acarology**, v. 7, n. 1, p. 5-13, 1989.

ANDERSON, Jennifer M. et al. Ticks, *Ixodes scapularis*, feed repeatedly on white-footed mice despite strong inflammatory response: an expanding paradigm for understanding tick–host interactions. **Frontiers in immunology**, v. 8, p. 1784, 2017.

ARAUJO, Ricardo Nascimento et al. *Amblyomma sculptum* tick saliva: α-Gal identification, antibody response and possible association with red meat allergy in Brazil. **International journal for parasitology**, v. 46, n. 3, p. 213-220, 2016.

ARTHUR, Don R.; SNOW, Keith. The significance of size in the immature stages of the Ixodoidea. **Parasitology**, v. 56, n. 2, p. 391-397, 1966.

BAILEY, K. P. et al. Noteson the rearing of *Rhipicephalus aippendiculatus* and their infection with *Theileria parva* for experimental transmission. **Bulletin of epizootic diseases of Africa**, v. 8, p. 33-43, 1960.

BARROS, Veruska Cavalcanti et al. The role of salivary and intestinal complement system inhibitors in the midgut protection of triatomines and mosquitoes. **PLoSOne**, v. 4, n. 6, p. e6047, 2009.

BARTOSIK, Katarzyna; BUCZEK, Alicja. The impact of intensity of invasion of *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus* on the course of the parasitic phase. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v. 19, n. 4, 2012.

BATTESTI, Darci Moraes Barros; ARZUA, Márcia; BECHARA, Gervásio Henrique. Carrapatos de importância médico-veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies. In: **Carrapatos de importância médico-veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies**. 2006. p. xvi, 223-xvi, 223.

BEATI, Lorenza et al. *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787)(Acari: Ixodidae), the Cayenne tick: phylogeography and evidence for allopatric speciation. **BMC Evolutionary Biology**, v. 13, n. 1, p. 1-20, 2013.

BELL, J. F.; STEWART, S. J.; WIKEL, S. K. Resistance to tick-borne *Francisella tularensis* by tick-sensitized rabbits: allergic klendusity. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 28, n. 5, p. 876-880, 1979.

BELOZEROV, V. N.; FOURIE, L. J.; VAN DER LINGEN, F. J. Sexual dimorphism in nymphal size of the Karoo paralysis tick, *Ixodes rubicundus*. **Experimental & applied acarology**, v. 17, n. 8, p. 627-629, 1993.

BERGERS, Gabriele et al. Alternative promoter usage of the Fos-responsive gene Fit-1 generates mRNA isoforms coding for either secreted or membrane-bound proteins related to the IL-1 receptor. **The EMBO journal**, v. 13, n. 5, p. 1176-1188, 1994.

BITENCOURTH, K. et al. *Amblyomma sculptum*: genetic diversity and rickettsias in the Brazilian Cerrado biome. **Medical and veterinary entomology**, v. 31, n. 4, p. 427-437, 2017.

BONNET, Sarah et al. Transstadial and transovarial persistence of *Babesia divergens* DNA in *Ixodes ricinus* ticks fed on infected blood in a new skin-feeding technique. **Parasitology**, v. 134, n. 2, p. 197, 2007.

BORGES, Debora Azevedo et al. *In vitro* acaricidal activity of different ectoparasiticide classes against *Amblyomma sculptum* larvae. **RevistaBrasileira de ParasitologiaVeterinária**, v. 29, n. 3, 2020.

BORGES, L. M. F. et al. 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.

BRASIL, Ministério da Saúde. Casos confirmados de Febre maculosa. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas, 2000 a 2019*. Disponível em: https://antigo.saude.gov.br/images/pdf/2019/junho/14/Casos-de-Febre-Maculosa.pdf. Acessado em 20 de maio de 2021.

BRASIL, Ministério da Saúde. Óbitos de febre maculosa. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 2000-2019*. Disponível em: https://antigo.saude.gov.br/images/pdf/2019/junho/14/Obitos-por-febre-maculosa.pdf. Acessado em 20 de maio de 2021.

BROSSARD, M. (1976). Relations immunologiques entre Bovins et Tiques, plus particulie`rement entre Bovins *et Boophilus microplus*. **Acta Tropica** 33, 15–36.

BROSSARD, M.; RUTTI, B.; HAUG, T. Immunological relationships between host and ixodid ticks. 1991.

BROSSARD, M.; WIKEL, S. K. Immunology of interactions between ticks and hosts. **Medical and veterinary entomology**, v. 11, n. 3, p. 270-276, 1997.

BROSSARD, M.; WIKEL, S. K. Tick immunobiology. **Parasitology**, v. 129, n. S1, p. S161, 2004.

BROWN, STEPHEN J. et al. Ablation of immunity to *Amblyomma americanum* by anti-basophil serum: cooperation between basophils and eosinophils in expression of immunity to ectoparasites (ticks) in guinea pigs. **The Journal of Immunology**, v. 129, n. 2, p. 790-796, 1982.

BROWN, Stephen J.; ASKENASE, Philip W. Blood eosinophil and basophil responses in guinea pigs parasitized by *Amblyomma americanum* ticks. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 31, n. 3, p. 593-598, 1982.

CABRERA, R. R. Influência do fotoperíodo e da temperatura na diapausa comportamental em larvas não alimentadas de *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) provenientes de Pirassununga, São Paulo, Brasil. 2008. 79f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

CANALES, Mario et al. Large-scale production in *Pichiapastoris* of the recombinant vaccine Gavac™ against cattle tick. **Vaccine**, v. 15, n. 4, p. 414-422, 1997.

CASTAGNOLLI, Karina C. et al. Acquired resistance of horses to *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) ticks. **Veterinary parasitology**, v. 117, n. 4, p. 271-283, 2003.

COSTA, Gabriel Cerqueira Alves et al. *Amblyomma sculptum* Salivary Protease Inhibitors as Potential Anti-Tick Vaccines. **Frontiers in immunology**, v. 11, p. 3733, 2021.

COSTA, Gabriel Cerqueira Alves et al. Physiological characterization of the hematophagy of *Ornithodoros rostratus* (Acari: Argasidae) on live hosts. **Journal of Experimental Biology**, v. 219, n. 22, p. 3656-3664, 2016.

DAVIDAR, Priya; WILSON, Mark; RIBEIRO, Jose MC. Differential distribution of immature *Ixodes dammini* (Acari: Ixodidae) on rodent hosts. **The Journal of parasitology**, p. 898-904, 1989.

DE ALMEIDA, Luciana Rodrigues et al. Biological parameters of *Amblyomma cajennense* adult females fed on rabbits treated with ultradiluted biotherapic. 2008.

DE CASTRO, J. J.; NEWSON, R. M. Host resistance in cattle tick control. **Parasitology today**, v. 9, n. 1, p. 13-17, 1993.

DE CASTRO, Julio J. Sustainable tick and tickborne disease control in livestock improvement in developing countries. **Veterinaryparasitology**, v. 71, n. 2-3, p. 77-97, 1997.

DE OLIVEIRA, Stefan Vilges et al. An update on the epidemiological situation of spotted fever in Brazil. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 22, n. 1, p. 1-8, 2016.

DE VEER, Michael John; KEMP, Joanna Magdalena; MEEUSEN, Elza Nicole Theresia. The innate host defence against nematode parasites. **Parasite immunology**, v. 29, n. 1, p. 1-9, 2007.

DUSBABEK, F. et al. Immunosuppression and feeding success of *Ixodes ricinus* nymphs on BALB/c mice. **Medical and veterinary entomology**, v. 9, n. 2, p. 133-140, 1995.

DUSBABEK, F.; KOPECKY, J.; UHLIR, J. Effect of repeated infestations of BALB/c mice with *Ixodes ricinus* nymphs on tick-borne encephalitis virus infection. **Folia parasitologica**, v. 41, n. 4, p. 312-316, 1994.

DUSBÉBEK, Frantiéek. Nymphal sexual ‘dimorphism in-the sheep tick *Ixodes ricinus*. **Folia parasitologica**, v. 43, p. 75-79, 1996.

ESTEVES, Eliane et al. *Amblyomma sculptum* Salivary PGE2 Modulates the Dendritic Cell-Rickettsia rickettsii Interactions in vitro and in vivo. **Frontiers in immunology**, v. 10, p. 118, 2019.

ESTRADA-PEÑA, Agustín et al. 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.

FACCINI, J. L. H.; CHACON, S. C.; LABRUNA, M. B. Rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) as experimental hosts for *Amblyomma dubitatum* Neumann (Acari: Ixodidae). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 6, p. 1236-1239, 2006.

FERREIRA, B. R.; SILVA, J. S. Successive tick infestations selectively promote a T-helper 2 cytokine profile in mice. **Immunology**, v. 96, n. 3, p. 434, 1999.

FRANCO, Paula F. et al. Inhibition of the classical pathway of the complement system by saliva of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). **Experimental parasitology**, v. 164, p. 91-96, 2016.

FURLONG, John; MARTINS, JR de S. Resistencia dos carrapatos aos carrapaticidas. Embrapa Gado de Leite-Circular Técnica (INFOTECA-E), 2000.

GUGLIELMONE, A. A.; MOORHOUSE, D. E. Differences in nymphs of *Amblyomma triguttatum* Koch moulting to males or females. **Acarologia**, v. 26, n. 1, p. 7-11, 1985.

HEYNE, Heloise et al. Rearing and infection techniques for *Amblyomma* species to be used in heartwater transmission experiments. 1987.

HIGA, Leandro de Oliveira Souza et al. Spotted fever group *Rickettsia* and *Borrelia* sp. cooccurrence in *Amblyomma sculptum* in the Midwest region of Brazil. **Experimental and Applied Acarology**, v. 81, n. 3, p. 441-455, 2020.

HLATSHWAYO, M. et al. Cross-reactivity between antigens from *Amblyomma cajennense* and *A. hebraeum* (Acari: Ixodidae**). Journal of the South African Veterinary Association**, v. 75, n. 1, p. 40-42, 2004.

HOWARTH, J. A.; HOKAMA, Y. Artificial feeding of adult and nymphal *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) during studies on bovine anaplasmosis. **Journal of Medical Entomology**, v. 20, n. 3, p. 248-256, 1983.

HU, Renjie; ROWLEY, Wayne A. Relationship between weights of the engorged nymphal stage and resultant sexes in *Ixodes scapularis* and *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae) ticks. **Journal of medical entomology**, v. 37, n. 1, p. 198-200, 2000.

JONGEJAN, Frans; UILENBERG, G. The global importance of ticks. **Parasitology-Cambridge**, v. 129, p. S3, 2004.

KAHL, O.; HOFF, R.; KNÜLLE, W. Gross morphological changes in the salivary glands of *Ixodes ricinus* (Acari, Ixodidae) between bloodmeals in relation to active uptake of atmospheric water vapour**. Experimental & applied acarology**, v. 9, n. 3, p. 239-258, 1990.

KEIRANS, James E.; DURDEN, Lance A. Tick systematics and identification. **Tick-Borne Diseases of Humans**, p. 123-140, 2005.

KLEMENZ, Roman; HOFFMANN, Sylvia; WERENSKIOLD, Anne-Katrin. Serum-and oncoprotein-mediated induction of a gene with sequence similarity to the gene encoding carcinoembryonic antigen. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 86, n. 15, p. 5708-5712, 1989.

KOCAN, K. M. et al. Percutaneous infection of nymphal *Dermacentor andersoni* with *Anaplasma marginale*. **American journal of veterinary research**, v. 47, n. 8, p. 1662-1664, 1986.

KOHLS, Glen M. Tick rearing methods with special reference to the Rocky Mountain wood tick, *Dermacentor andersoni* Stiles. **Culture methods for invertebrate animals**. New York: Dover Publications, 1937.

KUROKAWA, Cheyne et al. Repeat tick exposure elicits distinct immune responses in guinea pigs and mice. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 11, n. 6, p. 101529, 2020.

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

LABRUNA, Marcelo B. Comparative survival of the engorged stages of *Amblyomma cajennense* sensu stricto and *Amblyomma sculptum* under different laboratory conditions. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 9, n. 4, p. 996-1001, 2018.

LABRUNA, Marcelo B. et al. 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.

LEVIN, M. L.; FISH, D. Density-dependent factors regulating feeding success of *Ixodes scapularis* larvae (Acari: Ixodidae). **The Journal of parasitology**, p. 36-43, 1998.

LONDT, J. G. H.; VAN DER BIJL, Eleanore B. The life cycle of the two-host tick *Rhipicephalus evertsievertsi* Neumann, 1897, under laboratory conditions (Acarina: Ixodidae). 1977.

LOPES, C. M. L. et al. Reproductive parameters and conversion efficiency index (CEI) of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787)(Acari: Ixodidae) females under field and laboratory conditions. **Revue de Medecine Veterinaire**, v. 151, n. 10, p. 945-948, 2000.

LOPES, Cristina Marques Lisbôa et al. Host specificity of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787)(Acari: Ixodidae) with comments on the drop-off rhythm. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, n. 3, p. 347-351, 1998.

LOPES, ROGERIO B. et al. 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.

MARTINS, Thiago F. et al. Geographical distribution of *Amblyomma cajennense* (sensulato) ticks (Parasitiformes: Ixodidae) in Brazil, with description of the nymph of *A. cajennense* (sensustricto). **Parasites &Vectors**, v. 9, n. 1, p. 1-14, 2016.

MARTINS, Thiago Fernandes. Estudo do complexo *Amblyomma cajennense* no Brasil. 2014. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

MBOW, M. L. et al. Absence of acquired resistance to nymphal *Ixodes ricinus* ticks in BALB/c mice developing cutaneous reactions. **The Journal of parasitology**, p. 81-87, 1994.

MULCAHY, Grace et al. Correlation of specific antibody titre and avidity with protection in cattle immunized against *Fasciola hepatica*. **Vaccine**, v. 16, n. 9-10, p. 932-939, 1998.

MUSYOKI, Joseph M. et al. Comparative studies on the infectivity of *Theileria parva* in ticks fed in vitro and those fed on cattle. **Experimental & applied acarology**, v. 32, n. 1, p. 51-67, 2004.

NAGAMORI, Yoko et al. Nymphal engorgement weight predicts sex of adult *Amblyomma americanum, Amblyomma maculatum, Dermacentor andersoni, Dermacentor variabilis*, and *Rhipicephalus sanguineus* ticks. **Experimental and Applied Acarology**, v. 77, n. 3, p. 401-410, 2019.

NARASIMHAN, Sukanya et al. Host-specific expression of *Ixodes scapularis* salivary genes. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 10, n. 2, p. 386-397, 2019.

NASCIMENTO, Denise Amaral Gomes et al. Serosurvey of *Borrelia* in dogs, horses, and humans exposed to ticks in a rural settlement of southern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 25, n. 4, p. 418-422, 2016.

NATIVIDADE, Ulisses A. et al. Locomotion activity and its effects on the survival of *Amblyomma sculptum* (Acari: Ixodidae) nymphs under laboratory conditions. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 12, n. 1, p. 101562, 2021.

NAVA, Santiago et al. Reassessment of the taxonomic status of *Amblyomma cajennense* () with the description of three new species, *Amblyomma tonelliae* n. sp., *Amblyomma interandinum* n. sp. and *Amblyomma patinoi* n. sp., and reinstatement of *Amblyomma mixtum*, and *Amblyomma sculptum* (Ixodida: Ixodidae). **Ticks and tick-borne diseases**, v. 5, n. 3, p. 252-276, 2014.

NEITZ, W. O.; BOUGHTON, F.; WALTERS, H. S. Laboratory investigations on the life-cycle of the karoo paralysis tick (*Ixodes rubicundus* Neumann, 1904). 1971.

NEVES, D. P. et al. Parasitologia Humana. 13. ed. Rio de Janeiro: Atheneu., 2016.

OGDEN, N. H. et al. IgG responses to salivary gland extract of *Ixodes ricinus* ticks vary inversely with resistance in naturally exposed sheep. **Medical and veterinary entomology**, v. 16, n. 2, p. 186-192, 2002.

OLIVIERI, J. A.; SERRA-FREIRE, N. M. Estádio larval do ciclo biológico de *Amblyomma cajennense*. Arquivos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, v. 7, n. 2, p. 139 - 147, 1984a.

PAJUABA NETO, Adalberto Albuquerque et al. 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. **TicksTick Borne Dis**, p. 67-71, 2018.

PEREIRA, M. Campos; LABRUNA, M. B. Febre maculosa: aspectos clínico-epidemiológicos. **Clínica Veterinária**, v. 3, n. 12, p. 19-23, 1998.

PINTER, A.; LABRUNA, M. B.; FACCINI, J. L. H. The sex ratio of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) with notes on the male feeding period in the laboratory. **Veterinary Parasitology**, v. 105, n. 1, p. 79-88, 2002.

PRATA, M. C. A.; ALONSO, L. S.; SANAVRIA, A. Parâmetros biológicos do estágio ninfal de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) em coelhos. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 3, n. 2, p. 55 - 57, 1996.

PRATA, M.C.A., FACCINI, J.L.H. & DAEMON, E. Relationship between weight and number of engorged *Amblyomma cajennense* larvae and nymphs (Fabricius, 1787)(Acari:Ixodidae) in experimental infestations on rabbits. **Rev. Bras. Parasitol. Vet**., 7(2):107-111. 1998.

PRATA, Márcia Cristina Azevedo; ALONSO, Luciano Silva; SANAVRIA, Argemiro. Parâmetros biológicos do estágio larval de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787)(Acari: lxodidae) em coelhos. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 4, n. 1, 1997.

PRATA, Márcia Cristina Azevedo; DAEMON, Erik. Determinação do número de ovos por grama de postura de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787)(Acari: lxodidae). **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 4, n. 2, 1997.

QUEIROGAS, V. L. et al. 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.

RAMOS, Vanessa do Nascimento et al. 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.

RECHAV, Yigal; GOLDBERG, Martin; FIELDEN, Laura-Jane. Evidence for attachment pheromones in the Cayenne tick (Acari: Ixodidae). **Journalof medical entomology**, v. 34, n. 2, p. 234-237, 1997.

ROHOUSOVA, I. et al. Detection of species-specific antibody response of humans and mice bitten by sand flies. **Parasitology**, v. 130, n. 5, p. 493, 2005.

ROJAS, Rosario; MARINI, Miguel Ângelo; COUTINHO, Maria Teresa Zanatta. Wild birds as hosts of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 3, p. 315-322, 1999.

SANAVRIA, A. & PRATA, M.C.A. Metodologia para colonização do *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari:Ixodidae) em laboratório. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, 5(2):87-90. 1996.

SANTOS, Belmira Ferreira dos. Criação e manejo de camundongos. Andrade A, Pinto SC, Oliveira RS. Animais de laboratório: criação e experimentação. Rio de Janeiro: Fiocruz, p. 115-8, 2002.

SAUER, J.R.; HAIR J.A. (1986) Morphology, physiology, and behavioral biology of ticks. Halsted Press, NewYork

SCHOELER, George B.; MANWEILER, Stephen A.; WIKEL, Stephen K. *Ixodes scapularis*: effects of repeated infestations with pathogen-free nymphs on macrophage and T lymphocyte cytokine responses of BALB/c and C3H/HeN mice. **Experimental parasitology**, v. 92, n. 4, p. 239-248, 1999.

SCHROEDER, Hélène et al. Subversion of complement by hematophagous parasites. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 33, n. 1, p. 5-13, 2009.

SEBASTIAN, Patrick S. et al. 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.

SERRA-FREIRE, N. M. Epidemiologia de *Amblyomma cajennense*: ocorrência estacional e comportamento dos estádios não parasitários em pastagens do Estado do Rio de Janeiro. **Arq Univ Fed Rural Rio de Janeiro**, v. 5, n. 2, p. 187-193, 1982a.

SERRA-FREIRE, N. M. Ixodídeos parasitas de bovinos leiteiros na zona fisiográfica de Resende, Estado do Rio de Janeiro. **Rev Bras Med Vet**, v. 5, p. 18-20, 1982b.

SONENSHINE, D. E. Influce of host-parasite interations on the population dynamics of ticks. **Miscellaneous publications**, 1975.

TAGO, Kenji et al. Tissue distribution and subcellular localization of a variant form of the human ST2 gene product, ST2V. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 285, n. 5, p. 1377-1383, 2001.

TIRLONI, Lucas et al. Tick-host range adaptation: changes in protein profiles in unfed adult *Ixodes scapularis* and *Amblyomma americanum* saliva stimulated to feed on different hosts. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 7, p. 517, 2017.

TOMINAGA, Shin-ichi et al. Molecular cloning of the murine ST2 gene. Characterization and chromosomal mapping. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression**, v. 1090, n. 1, p. 1-8, 1991.

TOMINAGA, Shin-ichi et al. Nucleotide sequence of a complementary DNA for human ST2. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression**, v. 1171, n. 2, p. 215-218, 1992.

TOMINAGA, Shin-ichi. A putative protein of a growth specific cDNA from BALB/c-3T3 cells is highly similar to the extracellular portion of mouse interleukin 1 receptor. **FEBS letters**, v. 258, n. 2, p. 301-304, 1989.

TRIPET, Frédéric et al. Cooperative blood-feeding and the function and implications of feeding aggregations in the sand fly, *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). **PLoS Negl Trop Dis**, v. 3, n. 8, p. e503, 2009.

TROUGHTON, Danielle R.; LEVIN, Michael L. Life cycles of seven ixodid tick species (Acari: Ixodidae) under standardized laboratory conditions. **Journal of medical entomology**, v. 44, n. 5, p. 732-740, 2007.

VAN NUNEN, Sheryl. Tick-induced allergies: mammalian meat allergy, tick anaphylaxis and their significance. **Asia Pacific Allergy**, v. 5, n. 1, p. 3, 2015.

VAN OOSTEN, A. R.; MATTHYSEN, E.; HEYLEN, D. J. A. The more the merrier–experimental evidence for density-dependent feeding facilitation in the bird-specialised tick *Ixodes arboricola*. **International journal for parasitology**, v. 46, n. 3, p. 187-193, 2016.

VOIGT, W. P. et al. In vitro feeding of instars of the ixodid tick *Amblyomma variegatum* on skin membranes and its application to the transmission of Theileria mutans and Cowdriarum inantium. **Parasitology**, v. 107, n. 3, p. 257-263, 1993.

WATANABE, Hiroyuki et al. Innate immune response in Th1-and Th2-dominant mouse strains. **Shock**, v. 22, n. 5, p. 460-466, 2004.

WIKEL, S. K. (1996). Host immunity to ticks. Annual Review of Entomology 41, 1–22.

WIKEL, Stephen K. et al. Infestation with pathogen-free nymphs of the tick *Ixodes scapularis* induces host resistance to transmission of Borrelia burgdorferi by ticks. **Infection and immunity**, v. 65, n. 1, p. 335-338, 1997.

WIKEL, Stephen K. Tick modulation of host immunity: an important factor in pathogen transmission. **International journal for parasitology**, v. 29, n. 6, p. 851-859, 1999.

WILLADSEN, P. et al. Immunologic control of a parasitic arthropod. Identification of a protective antigen from *Boophilus microplus*. **The Journal of Immunology**, v. 143, n. 4, p. 1346-1351, 1989.

YERUHAM, I.; HADANI, A.; GALKER, F. The life cycle of *Rhipicephalus bursa* Canestrini and Fanzago, 1877 (Acarina: Ixodidae) under laboratory conditions. **Veterinary parasitology**, v. 89, n. 1-2, p. 109-116, 2000.

ANEXO I

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

Protocolo CEUA: 60/2020
Título do projeto: Manutenção de uma colônia de Amblyomma sculptum em laboratório
Finalidade: Pesquisa
Pesquisador responsável: Ricardo Nascimento Araujo
Unidade: Instituto de Ciencias Biologicas
Departamento: Departamento de Parasitologia

Situação atual: Decisão Final - Aprovado

Aprovado na reunião "on line" do dia 11/05/2020. Validade: 11/05/2020 à 10/05/2025.
Belo Horizonte, 11/05/2020.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG
https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br

ANEXO II

UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

Protocolo CEUA: 103/2017
Título do projeto: Identificação de moléculas imunogênicas expressas na glândula salivar e intestino do carrapato Amblyomma sculptum e avaliação de seu potencial como antígenos vacinais
Finalidade: Pesquisa
Pesquisador responsável: Ricardo Nascimento Araujo
Unidade: Instituto de Ciencias Biologicas
Departamento: Departamento de Parasitologia

Situação atual: Decisão Final - Aprovado

Aprovado na reunião do dia 26/06/2017. Validade: 26/06/2017 à 25/06/2022
Belo Horizonte, 27/06/2017.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG
https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br