

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Parasitologia
Programa de Pós-graduação em Parasitologia

**DESCRIÇÃO DO CICLO BIOLÓGICO E ANÁLISE DO COMPORTAMENTO
ALIMENTAR DE *Ornithodoros rostratus* ARAGÃO, 1911 (ACARI:
ARGASIDAE) EM CAMUNDONGOS**

Gabriel Cerqueira Alves Costa

Belo Horizonte
2015

Gabriel Cerqueira Alves Costa

DESCRIÇÃO DO CICLO BIOLÓGICO E ANÁLISE DO COMPORTAMENTO
ALIMENTAR DE *Ornithodoros rostratus* ARAGÃO, 1911 (ACARI: ARGASIDAE)
EM CAMUNDONGOS

Dissertação de Mestrado apresentada ao
programa de Pós-graduação em
Parasitologia do Instituto de Ciências
Biológicas da Universidade Federal de
Minas Gerais como requisito à obtenção
do título de Mestre em Parasitologia.

Orientador: Dr. Ricardo Nascimento
Araújo

Co-orientador: Dr. Marcos Horácio
Pereira

Belo Horizonte

2015

**À minha família
pelo exemplo, incentivo
e amor imensurável.**

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus por sempre iluminar meu caminho e permitir a realização dos meus sonhos.

Ao meu orientador Professor Ricardo Nascimento Araújo por ter me dado a oportunidade de aprender a cada dia mais no laboratório e também pela grande paciência e dedicação nesses anos de orientação.

Ao meu co-orientador, Professor Marcos Horácio, pela disponibilidade, atenção e boas ideias que ajudaram a construir esse trabalho.

À Dra. Adriana Coelho Soares pela grande colaboração na realização do eletromiograma.

Aos professores Maurício, Nelder e Leonardo, do Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos pela disponibilidade e apoio no laboratório.

A todos amigos feitos ao longo dos últimos anos no laboratório pelo incentivo, ajuda, companheirismo e por fazer do ambiente de trabalho o lugar mais leve e tranquilo possível.

Aos amigos da turma do mestrado que, com muita união, fizeram com que essa jornada fosse extremamente mais suave e divertida.

Ao programa de Pós-graduação em Parasitologia e, em especial, à Sumara e Sibebe por toda a ajuda, disponibilidade e carinho.

Aos meus grandes amigos que sempre estiveram do meu lado e, como parte importante da minha vida, são diretamente responsáveis pelas minhas conquistas.

À Marina, que com todo o afeto, amor e dedicação me ajuda a ser uma pessoa melhor e faz tudo valer a pena.

Aos meus pais Roberto e Margarete e ao meu Irmão Miguel, que são o começo de tudo, meu ponto de referência. São eles que me dão motivação para atingir meus objetivos e correr atrás dos meus sonhos.

Este Trabalho foi realizado no Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos (LFIH), do Departamento de Parasitologia - ICB - UFMG, e contou com o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) e Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular (INCT-EM).

RESUMO

O *Ornithodoros rostratus* ARAGÃO, 1911 é um argasídeo encontrado na Bolívia, Paraguai, Argentina e Brasil. Além da ação espoliante exercida sobre seus hospedeiros, pode ser transmissor de doenças aos vertebrados. Até o momento, existem poucos trabalhos a respeito da biologia de *O. rostratus* e os poucos existentes na literatura apresentam várias divergências. A fim de gerar uma maior compreensão a respeito desses artrópodes, este trabalho teve como objetivo descrever aspectos importantes sobre o ciclo biológico da espécie e o comportamento alimentar em condições de laboratório. Trezentas larvas de *O. rostratus* foram alimentadas em camundongos *Swiss* e seu desenvolvimento até o estágio adulto foi acompanhado. Ninfas de quarto estágio tiveram o processo alimentar avaliado pelo eletromiograma e pela microscopia intravital. Os resultados mostraram que, para completar o ciclo em camundongos, *O. rostratus* passa por um estágio larval, até 6 estádios de ninfa e adultos machos e fêmeas. Adultos podem ser originados de ninfas 3 a 6. Larvas necessitaram de, em média, 2,7 dias para completar o repasto sanguíneo, enquanto os outros estádios levaram de 17,3 a 78,3 minutos. O período de pré-ecdise variou de 5 a 12,5 dias e após um repasto, fêmeas se mantiveram por, em média, $15,2 \pm 5,8$ dias em oviposição e liberaram $276,8 \pm 137,2$ ovos. A análise detalhada do comportamento alimentar identificou quatro eventos durante a hematofagia: sucção, salivação, movimentação das quelíceras e inatividade das peças bucais. A partir da frequência de ocorrência destes eventos, foi possível dividir o processo alimentar em duas fases: 1- formação do poço alimentar e 2 – ingurgitamento. A fase 1 foi subdividida em três momentos que foram desde o contato inicial com o hospedeiro até primeiros sinais de sucção intercalados por eventos de salivação e movimentação das quelíceras. Na fase de ingurgitamento, a movimentação das quelíceras cessa e a ingestão de sangue acontece em complexos alimentares que são compostos por salivação seguida de sucção. A fase 2 apresentou quatro momentos caracterizados por: Fase 2a: sinais elétricos de sucção com formato irregular e frequência crescente ao longo do tempo; Fase 2b: sinais elétricos de sucção com formato regular e em alta frequência (>4 Hz); Fase 2c; sinais elétricos de sucção voltam a ficar com formato irregular e com frequência decrescente; Fase 2d: sinais elétricos de sucção sem padrão definido. Os resultados obtidos adicionam novas informações sobre a biologia de *O. rostratus*, bem como sobre aspectos do comportamento alimentar de argasídeos em hospedeiros vertebrados.

ABSTRACT

Ornithodoros rostratus ARAGÃO, 1911 is an argasid tick found in Bolivia, Paraguay, Argentina and Brazil. Despite the problems generated by the hematophagy on their hosts, they can be vectors of diseases to vertebrates. However, to date, there are few studies about its biology and the existing literature have several divergences. In order to generate a better understanding of these arthropods, this work aimed at describing important aspects of the life cycle of *O. rostratus* and its feeding behavior under laboratory conditions. For such, 300 larvae of *O. rostratus* were fed in Swiss mice and their development until the adult stage was followed. Fourth instar nymphs had their feeding process evaluated by the electromyogram and the intravital microscopy. The results showed that to complete the cycle in mice, *O. rostratus* passes through a larval stage, up to 6 nymphal and adult males and females. Adults may be originated from nymphs 3 to 6. Larvae needed, in average, 2.7 days to complete the blood meal while the other stages spend 17.3 to 78.3 minutes. The pre-ecdysis period ranged from 5 to 12.5 days and after a meal females remained 15.2 ± 5.8 days laying 276.8 ± 137.2 eggs. A detailed analysis of the feeding behavior identified four events during blood feeding: sucking, salivation, chelicerae movements and inactivity of the mouthparts. Due to the frequency of occurrence of the events, the process was divided into two phases: 1 - formation of the feeding pool and 2 - engorgement. Phase 1 was divided in three stages ranging from the initial contact with the host to the 1st suction signs interspersed with salivation events and chelicerae movements. During the engorgement phase, the chelicerae movements ceases and blood intake occurred in feeding complexes that comprise salivation followed by suction. Phase 2 had four stages characterized by: Phase 2a: suction electrical signals with irregularly shape and suction frequency increasing over time; Phase 2b: suction electrical signals with regular shaped and high-frequency (> 4 Hz); Phase 2c: suction electrical signals again with irregular shape but with frequency decreasing over time; Phase 2d: suction electrical signals with no pattern. These data add new information about the *O. rostratus* biology and aspects of feeding behavior of ticks on vertebrate hosts.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Vista dorsal (A) e ventral (B) de Fêmea de *Ornithodoros rostratus*. Pag. 11

Figura 2 – Peso Final de ninfas de quarto estágio (N4) de acordo com o estágio evolutivo subsequente. Pag. 28

Figura 3 – Sobreposição do tamanho da área relativa do poço alimentar e dos sinais elétricos gerados durante o processo alimentar realizados em Padrão de Alta Qualidade (A e C), Padrão de Média Qualidade (E e G) e Sem Padrão Definido (I e K). As imagens B, D, F, H, J e L representam ampliações das partes selecionadas das figuras anteriores. Pag. 33

Figura 4 – Sinais elétricos gerados pela movimentação de quelíceras (A,B,C e D) e períodos de inatividade (A, B, E e F). Pag. 34

Figura 5 – Frequências de sucção e salivação medidas através do eletromiograma durante a Fase 1 (formação do poço alimentar) e em diferentes momentos da Fase 2 (ingurgitamento) ao longo do processo alimentar de ninfas de quarto estágio de *O. rostratus* alimentadas em camundongos. Pag. 38

Figura 6 – Sítio da picada e pool alimentar em diferentes tempos após o início da alimentação. Quadro 1 - fase 1; Quadros 2 a 7 – fase 2 mostrando 14,29, 28,57, 42,86, 57,15, 71,44, e 85,73% do período alimentar; quadro 8 – final do período alimentar. Pag. 39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Parâmetros relativos às mudas durante o ciclo biológico de *Ornithodoros rostratus*. Pag. 27

Tabela 2 – Parâmetros alimentares de *Ornithodoros rostratus* em camundongos. Pag. 29

Tabela 3 – Parâmetros reprodutivos de fêmeas de *Ornithodoros rostratus* em camundongos. Pag. 30

LISTA DE ABREVIATURAS

Fig – Figura

S – Segundo

Min – Minuto

mL – Mililitro

mm – Milímetro

cm – Centímetro

mg – Miligrama

Kg – Kilograma

TTC – Tempo total de contato

PI – Peso Inicial

PF – Peso Final

GP – Ganho de Peso

TI – Taxa de Ingestão

N1 – Ninfa de primeiro estágio

N2 – Ninfa de segundo estágio

N3 – Ninfa de terceiro estágio

N4 – Ninfa de quarto estágio

N5 – Ninfa de quinto estágio

N6 – Ninfa de sexto estágio

Hz – Hertz

mV – Milivolt

DP – Desvio Padrão

Sumário

1. INTRODUÇÃO	11
1.1 Família Argasidae e <i>Ornithodoros rostratus</i>	11
1.2 Ciclo Biológico em Argasidae	13
1.3 Hematofagia	15
1.4 O processo alimentar	16
2. JUSTIFICATIVA	20
3. OBJETIVOS	22
4. METODOLOGIA	23
4.1 Carrapatos e manutenção da colônia	23
4.2 Descrição do ciclo biológico	23
4.3 Avaliação de aspectos reprodutivos	24
4.4 Comportamento alimentar	24
4.5 Microscopia intravital e eletromiograma simultaneamente	25
4.6 Eletromiograma	26
4.7 Análise Estatística	26
4.8 Comitê de ética	26
5. RESULTADOS	27
5.1 Estágios evolutivos e parâmetros relativos a muda de <i>Ornithodoros rostratus</i> ...	27
5.2 Parâmetros alimentares de <i>Ornithodoros rostratus</i>	28
5.3 Parâmetros reprodutivos de <i>Ornithodoros rostratus</i>	30
5.4 Eventos observados através da microscopia intravital durante a alimentação de <i>Ornithodoros rostratus</i> e sua correspondência com os sinais elétricos capturados ...	30
5.5 Caracterização geral do processo alimentar de <i>Ornithodoros rostratus</i> através da análise do eletromiograma	35
5.6 Fases do processo alimentar de <i>Ornithodoros rostratus</i>	35

6. DISCUSSÃO.....	40
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	50
8. REFERÊNCIAS	51
9. ANEXOS.....	57

1. INTRODUÇÃO

1.1 Família Argasidae e *Ornithodoros rostratus*

Ornithodoros rostratus ARAGÃO, 1911 (Fig. 1) é um carrapato pertencente à família Argasidae, conhecida por incluir os carrapatos de corpo mole e que conta com aproximadamente 190 espécies (Estrada-Pena et al. 2010). As espécies pertencentes a essa família apresentam várias peculiaridades e diferenças em relação aos carrapatos da família Ixodidae, como a ausência de um escudo dorsal, o capítulo ancorado na região ventral do corpo, preferência por habitar ninhos e esconderijos, alimentação realizada em períodos curtos, sobretudo para ninfas e adultos, vários repastos sanguíneos e oviposições realizadas pelas fêmeas, presença de vários estádios de ninfa, excreção do excesso de água e íons através das glândulas coxais e acasalamento fora do hospedeiro (Hoogstraal 1985).

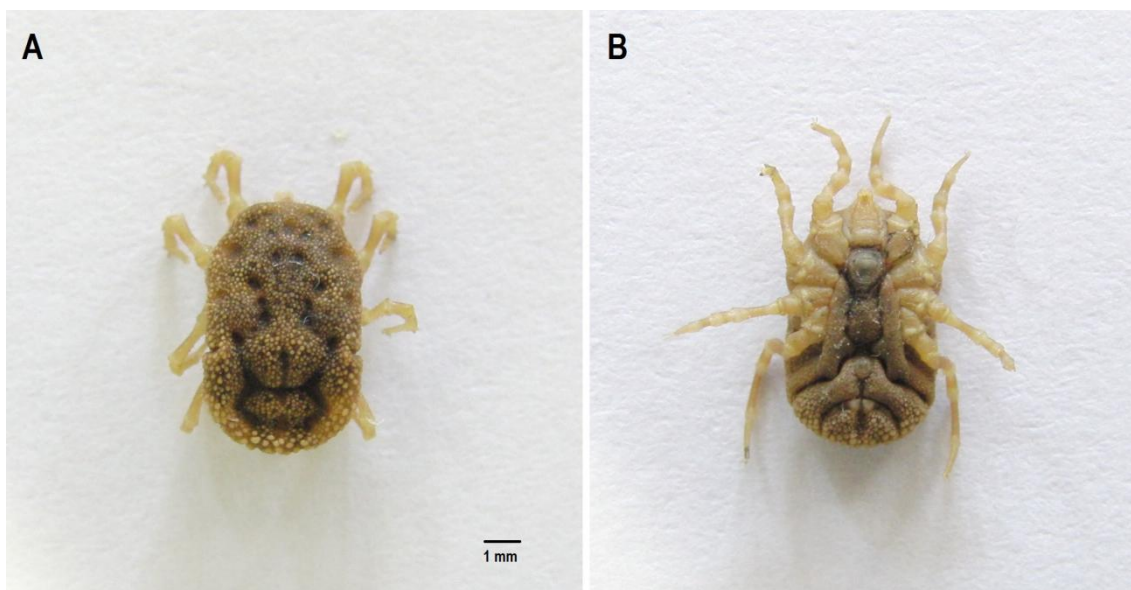


Figura 1 – Vista dorsal (A) e ventral (B) de Fêmea de *Ornithodoros rostratus*. (Fotos: Gabriel C. A. Costa)

O gênero *Ornithodoros* é o mais representativo dentro da família Argasidae, contando com 113 espécies (Dantas-Torres et al. 2012). Isso ocorre também no Brasil, visto que das 21 espécies pertencentes à família Argasidae descritas no país (Martins et al. 2014), a maioria pertence a esse gênero, sendo elas: *Ornithodoros brasiliensis*,

ARAGÃO; *Ornithodoros capensis* NEUMANN; *Ornithodoros fonsecai*; *Ornithodoros hasei* SCHULZE; *Ornithodoros jul* SCHULZE; *Ornithodoros marinkellei* KOHLS, CLIFFORD E JONES; *Ornithodoros mimon* KOHLS; *Ornithodoros nattereri* WARBURTON; *Ornithodoros rondonensis*; *Ornithodoros rostratus* ARAGÃO; *Ornithodoros rudis* KARSH; *Ornithodoros setosus* KOHLS, CLIFFORD E JONES; *Ornithodoros stageri* COOLEY E KOHLS e *Ornithodoros talaje* GUÉRIN-MÉNEVILLE.

O *O. rostratus* é uma espécie que apresenta importância Médica e Veterinária. Além da espoliação sanguínea, a sua picada é dolorosa e capaz de causar lesões equimóticas, inflamação e bolhas no local da alimentação (Aragão 1936, Boero 1957, Estrada-Peña & Jongejan 1999). Além disso, eles são vetores da febre maculosa, causada pela bactéria *Rickettsia rickettsii* (Hoogstraal 1985) e foram descritos abrigo bactérias simbiotes do gênero *Coxiella* (Almeida et al. 2012), no qual está inserida a *C. burnetii*, agente causadora da febre Q aguda e endocardite em seres humanos e animais (Angelakis & Raoult 2010, Griffin et al. 2012). Outras espécies de *Ornithodoros* encontradas nas Américas, Caribe e África já foram confirmadas como vetores de doenças, como a Peste Suína africana (Sanchez-Botija 1963) e a Febre Recorrente transmitida na América do Sul (Parola et al. 2011), em países da América do Norte como o México, por *O. talaje* (Davis 1956) e Estados Unidos, por *Ornithodoros hermsi* e *Ornithodoros turicata* (Dworkin et al. 2002) e também em países europeus (Rebaudet & Parola 2006), o que indica que *O. rostratus* também possa ser um vetor em potencial para os agentes causadores dessas doenças.

Até o momento, *O. rostratus* já foi identificado na Bolívia, Paraguai, Argentina e Brasil, associado a diversas espécies de hospedeiros como porcos selvagens, animais de interesse pecuário, cães e o homem (Hoogstraal 1985, Guglielmone et al. 2003, Venzal et al. 2006), sugerindo que essa espécie possa apresentar um hábito generalista. Recentemente, um novo foco de infestação por *O. rostratus* foi identificado em uma fazenda localizada em Nhecolândia, no Pantanal, Mato Grosso do Sul, Brasil, onde pessoas e animais domésticos, como cães e porcos, foram reportados como hospedeiros (Ribeiro et al. 2013).

1.2 Ciclo Biológico em Argasidae

Os Argasídeos são artrópodes hematófagos obrigatórios em uma grande variedade de hospedeiros vertebrados como roedores, morcegos, mamíferos que habitam tocas, aves e répteis (Hoogstraal 1985, Venzal & Estrada-Pena 2006).

O seu ciclo biológico da família Argasidae é definido, em geral, por ovo, um estágio de larva, 2-8 estádios de ninfa e adultos machos e fêmeas, que são capazes de se alimentar e acasalar várias vezes, resultando em pequenas oviposições, nas quais são liberados 5-500 ovos no solo após cada repasto das fêmeas (Hoogstraal 1985, Vial 2009). Os ovos liberados pelas fêmeas no ambiente eclodem, dando origem às larvas. Essas apresentam apenas três pares de pernas e se mantêm posicionadas no ambiente à espera dos hospedeiros. Após o repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado, larvas dão origem as ninfas, que por sua vez, possuem quatro pares de pernas. O número de estádios ninfais é variável em relação às espécies de argasídeos e também pode apresentar diferenças dentro de uma mesma espécie, já que a qualidade e quantidade de sangue ingerido parecem interferir na quantidade de estádios de ninfa necessários para que os carrapatos se tornem adultos (Morel 1969). Os adultos surgidos a partir das ninfas também apresentam quatro pares de pernas e hábito hematofágico, mas nesse estágio é possível visualizar a abertura genital e essa auxilia na diferenciação entre machos e fêmeas. Adultos acasalam no solo após o repasto sanguíneo, culminando na liberação de ovos no ambiente. O tempo de alimentação dos carrapatos dessa família é curto, principalmente em ninfas e adultos em que, geralmente, dura em torno de 15 minutos a 1 hora. Esse aspecto tem impacto na capacidade de dispersão dos carrapatos quando fixados aos hospedeiros, que tende a ser pequena, limitando também a distribuição das espécies e patógenos associados (Gray et al. 2013). As larvas, por sua vez, podem apresentar um repasto sanguíneo curto, como aquele observado em ninfas e adultos ou uma alimentação de longa duração, que pode levar até 10 dias. Larvas de algumas espécies, como o *Ornithodoros savignyi*, podem mudar para ninfas sem se alimentarem (Khan & Srivastava 1988). Hoogstraal (1985) afirma que fatores como a espécie do carrapato e do hospedeiro influenciam no tempo alimentar das larvas.

Os argasídeos, sobretudo aqueles do gênero *Ornithodoros*, apresentam hábito nidícola ou de habitar áreas sombreadas onde os hospedeiros costumam descansar. O

fato de habitarem esses abrigos faz com que as variações de temperatura do meio externo não impactem de maneira severa o desenvolvimento dos carrapatos.

Várias espécies do gênero *Ornithodoros* tiveram o ciclo biológico analisado nos mais diferentes hospedeiros ao longo dos anos. Khalil & Hoogstraal (1981) analisaram o ciclo de *Ornithodoros amblyus* em pombos como hospedeiros e observaram um tempo médio de repasto sanguíneo de 11 dias para as larvas, a existência de 4-7 estádios ninfais e um período médio de 6,9 dias de oviposição no primeiro ciclo gonotrófico das fêmeas, que resultou em um número médio de 345,1 ovos por fêmea.

Em 1986, Beck et al. descreveram o ciclo de *O. turicata* em camundongos, observando um padrão de alimentação rápida para as larvas (em média 19,6 min) e a existência de 3 a 6 estádios ninfais. O período de oviposição durou de 1 a 9 dias e cada fêmea gerou, em média, 102 ovos. Outro estudo feito a partir de aves como hospedeiros foi realizado por Tizu et al. (1995) para elucidar o ciclo biológico de *O. talaje*. Nesse trabalho, as autoras utilizaram filhotes de galinhas para alimentar larvas e galinhas para ninfas e adultos. O tempo médio de repasto das larvas foi 7,6 dias e foi detectada a presença de 2-4 estádios ninfais. O período médio de oviposição das fêmeas foi de 12,3 dias, resultando na oviposição de 31,3 ovos durante o primeiro ciclo gonotrófico.

Landulfo et al. (2012) descreveram o ciclo biológico de *O. mimon* utilizando gerbis e coelhos como hospedeiros e observaram um período médio de 5,4 e 5,2 dias, respectivamente, para que as larvas se alimentassem nos dois hospedeiros, além da existência de 2 ou 3 estádios de ninfa. Nesse mesmo trabalho, também foi feita a análise de parâmetros reprodutivos das fêmeas. O período médio de oviposição foi de 17,2 dias, com a liberação de, em média, 137 ovos por fêmea e eclosão de 77% dos ovos durante o primeiro ciclo gonotrófico.

Até o momento, foram realizados poucos trabalhos que abordaram o ciclo biológico de *Ornithodoros rostratus* em diferentes hospedeiros e tais trabalhos, em sua maioria, se mostraram incompletos ou controversos em diversos aspectos.

Brumpt (1915) analisou de forma pouco profunda o ciclo biológico de *O. rostratus* em cães e galinhas, observando a existência de 4 a 5 estádios ninfais. Em seu estudo, ele constata também que as larvas ingurgitavam rapidamente, mas só se desprendiam do hospedeiro entre o 2º e 8º dia após a picada. Guglielmone & Hadani (1980) observaram a existência de 3 a 5 estádios de ninfa e larvas se alimentando em um período que variou de 1 a 3 dias em cobaias, mas não abordaram os aspectos

reprodutivos das fêmeas naquele hospedeiro. Venzal & Estrada-Pena (2006), por sua vez, realizaram um estudo acerca da eficiência alimentar de *O. rostratus* em diferentes hospedeiros. Os autores utilizaram um réptil (*Tarentola mauritanica*) e coelho como hospedeiros para os carrapatos e observaram períodos de alimentação para as larvas de 4,5 dias em répteis e 2,9 em coelhos. Ribeiro et al. (2013) realizaram um recente estudo utilizando coelhos como hospedeiros e descreveram a existência de 3 a 6 estádios de ninfa e larvas que realizaram um repasto sanguíneo rápido (33,5 min). Ao contrário dos outros estudos, esse último abordou de forma mais completa diversos parâmetros reprodutivos: tempo médio de oviposição (10 dias), número médio de ovos por fêmeas (555,5), tempo médio de incubação dos ovos (12,7 dias) e taxa de eclosão dos ovos (75,9%).

1.3 Hematofagia

Artrópodes hematófagos são aqueles que parasitam vertebrados para a obtenção do sangue, que por sua vez, representa a fonte de nutrientes para seu o desenvolvimento. Basicamente, o sangue é uma suspensão de partículas, constituída em sua maior parte por hemácias diluídas em uma solução proteica, o plasma.

Apesar do repasto sanguíneo representar um curto período de tempo no ciclo de vida dos carrapatos argasídeos, este consiste em um momento de grande importância, já que o sucesso na obtenção de sangue determina a sobrevivência, a continuação do desenvolvimento do carrapato e sua dinâmica populacional. É importante salientar que o repasto sanguíneo consiste num processo composto por diferentes fases: busca e adesão ao hospedeiro, escolha do sítio alimentar, penetração e fixação das peças bucais na pele do hospedeiro, ingurgitamento, retirada das peças bucais e saída do hospedeiro. A execução de todas essas fases representa o período de maior risco para o artrópode, uma vez que ele pode ser percebido e morto pelo hospedeiro (Anderson & Magnarelli 2008). Além disso, é durante o repasto sanguíneo que ocorre a circulação de patógenos entre o vetor e o hospedeiro, interferindo na epidemiologia das doenças que tem os carrapatos como vetores.

Os grupos de artrópodes que têm o sangue como fonte de nutrientes apresentam maneiras diferentes de realizar o repasto sanguíneo no hospedeiro. A forma com que realizam hematofagia está intimamente ligada às características morfológicas das peças bucais, que podem variar em aspectos como comprimento, largura e flexibilidade.

Alguns insetos, como os triatomíneos, conseguem ingerir o sangue diretamente dos vasos sanguíneos (Dickerson & Lavoipierre 1959, Lavoipierre et al. 1959) e são chamados solenofágicos. Para que realizem a solenofagia, suas peças bucais longas e flexíveis realizam uma busca e, posteriormente, a penetração nos vasos sanguíneos (arteríolas e vênulas), de onde ingerem o sangue. Os carrapatos, por sua vez, realizam a telmatofagia, processo que ocorre a partir da penetração e movimentação de suas peças bucais curtas e rígidas de maneira ativa, que dilacera os tecidos e leva ao extravasamento de sangue na região formando um poço alimentar. O poço de sangue e restos celulares é, então, sugado pelo carrapato (Lavoipierre & Riek 1955).

A morfologia das peças bucais dos carrapatos está diretamente relacionada às características de sua picada telmatofágica. Seu aparato bucal bastante curto e rígido está localizado no capítulo, junto aos palpos, que não entram na pele do hospedeiro durante o processo alimentar. Um par de quelíceras se posiciona medialmente aos palpos e apresentam suas bordas laterais cortantes, o que ajuda na penetração e dilaceração dos tecidos do hospedeiro. O hipostômio, por sua vez, se encontra na região central e também apresenta a superfície externa repleta de ganchos, que servem de ancoragem para o carrapato. O conjunto formado por hipostômio e quelíceras forma um tubo por onde o carrapato suga o sangue e injeta saliva no sítio alimentar durante o repasto (Anderson & Magnarelli 2008).

1.4 O processo alimentar

Os efeitos de picadas de artrópodes hematófagos e seu papel na transmissão de patógenos são alvos de estudos há muitas décadas. Desde os estudos realizados por Hoeppli & Feng (1931), surgiram vários outros trabalhos que abordaram as diferentes reações causadas nos tecidos de hospedeiros parasitados por ectoparasitos. Paralelamente, o mecanismo utilizado por esses artrópodes para realizar o espólio sanguíneo causador das lesões também tem sido alvo de estudo em diversos trabalhos.

Devido ao grande interesse em relação ao processo hematofágico, algumas técnicas foram desenvolvidas para estudá-lo em artrópodes, sendo que a microscopia intravital e o eletromiograma são duas das mais utilizadas. A microscopia intravital consiste na obtenção de imagens do sítio de alimentação no hospedeiro através da transiluminação, permitindo uma visão bem detalhada dos processos que ali ocorrem. Desde os estudos

pioneiros de Griffiths & Gordon (1952), que desenvolveram um método para observar em detalhes o processo alimentar de mosquitos em roedores, que possibilitava inclusive a visualização da ejeção de saliva pelo inseto nos tecidos do hospedeiro, a técnica foi apurada através da utilização de equipamentos mais modernos para iluminação, visualização e gravação das imagens, além de softwares de análise de imagens. Essa técnica permite a avaliação dos eventos que ocorrem em cada período do processo alimentar, podendo ser observados no artrópode (ex. movimentação de peças bucais) e/ou hospedeiro (ex. modificações ocorridas na pele, microcirculação e tecidos no sítio alimentar) (Soares et al. 2013). Apesar de ser altamente informativa, a microscopia intravital não é capaz de captar ações que ocorrem dentro do carrapato. Dessa forma, se faz necessário o uso de outra técnica complementar que possa contribuir para a descrição do processo hematofágico. A técnica conhecida como eletromiograma permite a captura dos sinais elétricos gerados pelos artrópodes hematófagos durante o processo alimentar. Esta foi previamente aplicada em diversos grupos como afídeos (McLean & Kinsey 1964), mosquitos (Kashin & Wakely 1965), moscas tsé-tsé (Margalit et al. 1972, Rice et al. 1973), cimicídeos (Araujo et al. 2009a), triatomíneos (Smith & Friend 1970, Guarneri et al. 2000a, Araujo et al. 2009b) e carrapatos ixodídeos (Gregson 1969, Sweatman & Gregson 1970, Tatchell et al. 1972, Waladde et al. 1979). Nos estudos iniciais, a técnica consistia em conduzir uma pequena corrente por um circuito que passava, através de eletrodos, pelo artrópode e hospedeiro. As mudanças na resistência elétrica geradas por contrações musculares do artrópode durante o processo alimentar eram captadas e gravadas (McLean & Kinsey 1964, Kashin & Wakely 1965). A técnica foi aprimorada ao longo dos anos para evitar distúrbios causados nos artrópodes pela corrente elétrica e, atualmente, os equipamentos são capazes de detectar as variações de voltagem promovidas pelas contrações da musculatura responsável pela sucção do sangue ou movimentação de peças bucais no sítio alimentar. A principal de suas vantagens é que, além do monitoramento de todo o processo alimentar, os dados captados são gravados, e ficam disponíveis para posterior análise. A associação entre os diferentes sinais gravados e os eventos observados no sítio alimentar que ocorrem simultaneamente durante o repasto permite a descrição detalhada e quantitativa do processo alimentar. Além disso, essas tecnologias também podem ser utilizadas para comparar o comportamento alimentar entre diferentes grupos, e/ou tratamentos, como: grupos da mesma espécie pertencentes a diferentes estádios evolutivos (Guarneri et al.

2003), diferentes espécies, populações ou tratamentos dado a grupos de artrópodes (Araujo et al. 2009c), efeito da luminosidade e tamanho da fêmea no comportamento alimentar (Tatchell et al. 1972), diferentes hospedeiros ou composição da dieta (Waladde et al. 1979, Guarneri et al. 2011), variação da temperatura corporal de hospedeiros pecilotérmicos (Sweatman & Gregson 1970).

O comportamento alimentar de carrapatos pertencentes à família Ixodidae foi documentado em alguns trabalhos nas últimas décadas. Em 1960, Gregson descreveu o processo alimentar de *Dermacentor andersoni* através da análise de imagens do seu sítio alimentar na orelha de um camundongo anestesiado. Nas imagens geradas foi possível observar a formação do cemento e eventos de salivação e sucção no poço alimentar. Outros estudos em ixodídeos foram feitos a partir da análise dos sinais elétricos gerados pelos carrapatos durante o processo alimentar. Gregson (1969) utilizou o eletrograma durante o repasto sanguíneo de *Dermacentor andersoni*. Sweatman & Gregson (1970) avaliaram o comportamento alimentar do carrapato *Hyalomma aegyptium* em tartaruga, sob diferentes temperaturas ambientais e, comparativamente, em coelho. Nesse estudo, foi realizado o eletrograma da musculatura da bomba de sucção durante o processo alimentar. Os autores conseguiram observar uma série de eventos como, períodos de inatividade, funcionamento da bomba faríngea, ejeção da saliva e a existência de complexos alimentares, caracterizados como ciclos envolvendo uma sequência de eventos de salivação, sucção e inatividade. Em 1972, Tatchell et al. descreveram o processo alimentar do carrapato bovino, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, através de uma metodologia similar a utilizada nos estudos anteriores e também identificaram sinais caracterizados como: inatividade, sucção e salivação, além de terem observado padrões de sinais que não foram caracterizados. Outro estudo também foi realizado posteriormente em *R. microplus* (Waladde et al. 1979) e neste, os carrapatos realizaram o repasto em um alimentador artificial, o que permitiu analisar o perfil dos sinais gerados em função da composição da dieta.

No caso de carrapatos argasídeos do gênero *Ornithodoros*, a descrição do processo alimentar mais detalhada foi realizada apenas por Lavoipierre & Riek (1955) através do uso de diferentes espécies de carrapatos argasídeos que tiveram roedores como hospedeiros e a técnica designada para análise do comportamento alimentar foi baseada na microscopia intravital desenvolvida por Griffiths & Gordon (1952). Dessa forma, os autores conseguiram observar alguns eventos que ocorreram ao longo do processo

alimentar como inserção das peças bucais no hospedeiro, formação do poço alimentar, sucção e salivação, além das modificações nos tecidos do hospedeiro causadas pela picada.

2. JUSTIFICATIVA

O *Ornithodoros rostratus* tem a capacidade de parasitar o homem e várias espécies de animais de interesse econômico no Brasil. Além disso, o fato do *O. rostratus* e várias outras espécies do gênero serem apontadas como vetores de doenças de importância humana e veterinária no mundo endossa a importância da realização de estudos que visam um maior entendimento da espécie em questão. No entanto, até o momento, existem poucos trabalhos a respeito da biologia e do ciclo evolutivo dessa espécie e esses apresentam, em sua maioria, várias divergências. Estimativas superficiais sobre aspectos evolutivos de *O. rostratus* foram feitas com o uso de cães e galinhas (Brumpt 1915), cobaias (Guglielmone & Hadani 1980), coelhos e répteis (Venzal & Estrada-Pena 2006), enquanto uma análise mais detalhada foi feita utilizando coelhos como hospedeiros (Ribeiro et al. 2013). Mesmo com esses trabalhos, alguns aspectos a respeito do ciclo biológico de *O. rostratus* permaneceram inexplorados e outros, como capacidade reprodutiva das fêmeas originadas em diferentes estádios, tempo de alimentação das larvas e número de estádios de ninfas ainda são controversos. Portanto, a realização do presente estudo foi necessária para que se pudesse aumentar o entendimento acerca de aspectos do ciclo biológico dessa espécie tendo o camundongo como hospedeiro, o que facilitaria a manutenção de colônias em laboratório.

A maioria dos estudos de avaliação do comportamento alimentar de artrópodes hematófagos foi realizada em insetos ou carrapatos ixodídeos. Em relação aos carrapatos argasídeos, a literatura apresenta apenas algumas observações aleatórias sobre os fenômenos que ocorrem durante o processo alimentar em diferentes hospedeiros e pouca atenção foi dada ao mecanismo alimentar. A descrição do processo alimentar realizada por Lavoipierre & Riek (1955) através do uso de diferentes espécies de carrapatos argasídeos foi preliminar e os autores apresentaram dificuldades na interpretação de alguns processos que ocorreram durante a alimentação, além de não terem quantificado os diferentes eventos ao longo da hematofagia.

Com o objetivo de estudar o processo hematofágico de *O. rostratus*, um grupo de ninfas foi alimentado em camundongos e o processo foi monitorado através da análise dos sinais elétricos e microscopia intravital, simultaneamente. Essa associação possibilitou a identificação e quantificação dos diferentes sinais elétricos gerados nos diferentes eventos ocorridos durante cada fase do processo alimentar. Possivelmente, é a

primeira vez que essa metodologia foi utilizada em carrapatos argasídeos. Dessa forma, o presente trabalho permitirá a comparação dos padrões alimentares observados entre *O. rostratus* e outros argasídeos ou artrópodes hematófagos, em geral.

3. OBJETIVOS

- 1 - Realizar uma descrição detalhada do ciclo biológico do *Ornithodoros rostratus* em condições laboratoriais:
 - Determinar o número de estágios evolutivos e aspectos relativos à ecdise de *O. rostratus*;
 - Descrever a duração média do repasto e capacidade alimentar de larvas, ninfas e adultos em camundongos;
 - Descrever aspectos relativos à reprodução, como oviposição e viabilidade de ovos de fêmeas surgidas de diferentes estádios de ninfas.

- 2 - Descrever o comportamento alimentar de *Ornithodoros rostratus* em camundongos através da análise simultânea da microscopia intravital e dos sinais elétricos gerados pelo carrapato durante o eletromiograma ao longo do processo alimentar:
 - Descrição e identificação dos eventos observados durante o processo alimentar em função da análise dos sinais elétricos correspondentes as imagens obtidas pela microscopia intravital;
 - Descrição das fases do processo alimentar de acordo com o padrão e frequência de eventos observados no eletromiograma de ninfas de *O. rostratus*.

4. METODOLOGIA

4.1 Carrapatos e manutenção da colônia

Os carrapatos utilizados nos experimentos foram coletados na região de Nhecolândia, Mato Grosso do Sul, Brasil (19° 03' S, 56° 47' W). Os espécimes coletados foram trazidos ao laboratório, identificados de acordo com Venzal et al. (2006) e mantidos em incubadoras com condições semi-controladas de temperatura ($28 \pm 2^\circ\text{C}$) e umidade ($85 \pm 10\%$). Os carrapatos foram alimentados em camundongos da linhagem *Swiss* (*Mus musculus*) em intervalos de 20 dias.

4.2 Descrição do ciclo biológico

As larvas foram alimentadas em camundongos da linhagem *Swiss* a partir da metodologia descrita por Bouchard & Wikel (2005). Câmaras de alimentação foram feitas com tubos de polipropileno para centrifuga com capacidade de 1.5 mL cortados a aproximadamente 1 cm do topo e fixados ao dorso dos camundongos. As tampas foram perfuradas com uma agulha fina para permitir a circulação de ar dentro da câmara. 25 larvas foram colocadas dentro de cada uma das câmaras, que permaneciam fechadas até o fim do processo alimentar. As câmaras eram examinadas diariamente para verificar e documentar as larvas que haviam terminado o processo alimentar e se soltado da pele do hospedeiro. Larvas que não se fixaram em até 24 horas após serem colocadas na câmara de alimentação foram retiradas e descartadas. As larvas foram utilizadas em um período que variou entre 10 e 20 dias após a emergência e o seu peso médio antes do repasto sanguíneo foi obtido através da pesagem de um grupo de 100 espécimes.

Ninfas e adultos foram alimentados em camundongos anestesiados em um ambiente com temperatura controlada ($28 \pm 2^\circ\text{C}$). Os espécimes utilizados nos experimentos tinham entre 25 a 35 dias após a muda. A área para alimentação no camundongo era delimitada por um cilindro plástico com 1.5 cm de altura e 2.0 cm de diâmetro fixado com fitas adesivas ao ventre do hospedeiro. Cada hospedeiro foi utilizado como fonte de alimentação para, no máximo, 10 ninfas antes do terceiro estágio, 5 ninfas após o terceiro estágio ou 5 adultos. Todo o processo de alimentação foi filmado com uma câmera digital (Canon EOS600D) para análises posteriores. Ao mesmo tempo, um

observador registrava o exato momento da picada e da retirada das peças bucais da pele do hospedeiro, para calcular o tempo exato de contato entre cada carrapato e o hospedeiro (Tempo Total de Contato – TTC). Os espécimes foram pesados antes (Peso Inicial – PI) e depois (Peso Final – PF) para determinar o ganho de peso (GP), que é o PF menos o PI. Após o processo de alimentação, as ninfas eram mantidas individualmente em tubos capazes de permitir a entrada de ar e monitoradas diariamente para determinar o tempo gasto para realização da ecdise e também o número de ninfas que realizaram a ecdise ou morreram.

4.3 Avaliação de aspectos reprodutivos

Para a análise de parâmetros reprodutivos, casais foram formados a partir das fêmeas e machos mais pesados originados de cada estágio de ninfa. Após um período de 25 a 35 dias após a muda, casais de adultos foram alimentados em camundongos, sendo submetidos à pesagem anterior e posterior ao repasto sanguíneo. Os casais foram acomodados em tubos, que por sua vez, foram avaliados diariamente para quantificar o número de ovos liberados por fêmea e o período de duração do processo de oviposição após o repasto alimentar (um ciclo gonotrófico). O período de incubação dos ovos e a porcentagem de eclosão também foram quantificados.

4.4 Comportamento alimentar

Os experimentos foram realizados em duas etapas. Primeiramente, a identificação dos eventos que ocorrem no sítio alimentar através da utilização das técnicas de microscopia intravital e eletromiograma, simultaneamente. Na segunda etapa, a análise dos sinais elétricos gerados pelo eletromiograma foi realizada individualmente em um grupo de ninfas para que se pudesse determinar a duração e frequência da ocorrência dos eventos ao longo do processo alimentar.

4.5 Microscopia intravital e eletromiograma simultaneamente

Os camundongos utilizados como hospedeiros foram anestesiados intraperitonealmente com uma solução de Cetamina (Cristalia) e Xilazina (Bayer) a 150 e 10 mg/kg de peso, respectivamente. Cada camundongo era acomodado em uma superfície aquecida (Fine Science Tools Inc., Canada) para manter a temperatura corporal a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, monitorada por um sensor retal (Fine Science Tools).

Os sinais elétricos foram gravados de acordo com Araujo et al. (2011) modificado de Smith & Friend (1970). Para a realização da técnica, um eletrodo foi fixado ao hospedeiro, enquanto o segundo foi fixado sobre a superfície dorsal do carrapato. Os sinais capturados foram amplificados 210 vezes, filtrados e digitalizados por uma placa de aquisição (AC-100) conectada a um microcomputador. Cuidados com luminosidade, calor, odor, barulhos, vibrações e contato com os carrapatos foram levados em consideração a fim de minimizar variações durante os experimentos. Os momentos da picada e o fim do processo alimentar eram monitorados visualmente. O sítio de alimentação foi a superfície convexa da orelha do camundongo, comprimida em uma gota de água sobre uma plataforma de Plexiglas. As imagens do sítio alimentar foram capturadas a 30 *frames* por segundo através de uma câmera digital (Olympus U-PMTVC, Tóquio, Japão) adaptada a um microscópio (Leica DM500) (Soares et al. 2013).

As imagens gravadas durante o processo alimentar foram analisadas através do software ImageJ, de acordo com Soares et al. (2013) e Araujo et al. (2011). Cada *frame* foi convertido em uma “imagem binária” (preto e branco) e a área escura da região selecionada (aquela que contém o sítio alimentar) calculada após ajustes que permitiram a diferenciação de materiais extravasados no sítio alimentar e o plano de fundo (tecidos). Os valores da área contendo material extravasado dentro do sítio alimentar obtidos em cada *frame* ao longo da hematofagia foram transferidos para planilhas no Microsoft Excel e SigmaPlot para Windows (Version 12.3) com valores do plano de fundo iguais a zero.

4.6 Eletromiograma

Camundongos *hairless* da linhagem *Swiss* foram anestesiados e posicionados sobre uma superfície aquecida, como descrito no item 4.5. O eletromiograma foi realizado de maneira semelhante ao realizado anteriormente, exceto pelo fato de que um dos eletrodos foi conectado a uma rede metálica posicionada dentro de um cilindro de polipropileno (0,7 mm de diâmetro e 10 mm de altura) utilizado como apoio para os carrapatos e posicionado sobre a pele do camundongo. O contato entre a rede metálica e o carrapato foi potencializado através do uso de um gel condutor (Regisgraf-Gel®). Os carrapatos foram pesados individualmente antes e após o repasto sanguíneo para que se pudesse determinar o PI e PF, respectivamente, além do GP. Com base nas gravações dos sinais elétricos obtidos, o TTC foi definido como a duração do período em que as peças bucais do carrapato permanecem inseridas na pele do hospedeiro. A taxa de ingestão (TI, mg/min) foi calculada pela divisão do GP pelo TTC. As frequências de salivação no sítio alimentar e contração da bomba faríngea para a sucção de sangue também foram contabilizadas.

4.7 Análise Estatística

Os dados foram analisados através do GraphPad Prism® para Windows. A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste Kolmogorov-Smirnov. Os testes de Kruskal-Wallis seguido por Dunn foram realizados para análises não paramétricas dos diferentes parâmetros comparados entre os estágios de *O. rostratus*. O teste de Mann-Whitney foi utilizado para comparar diferentes parâmetros entre as ninfas de quarto estágio utilizadas nos experimentos de alimentação e aquelas utilizadas nos eletromiogramas. O nível de significância estabelecido foi $P < 0,05$.

4.8 Comitê de ética

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os manuais de experimentação animal e aprovados pelo comitê de ética para utilização de animais (CETEA/ICB-UFMG) sob o protocolo 301/2013 (Anexo).

5. RESULTADOS

5.1 Estágios evolutivos e parâmetros relativos a muda de *Ornithodoros rostratus*

Para completar seu ciclo, *O. rostratus* passou por um estágio larval, três a seis estádios ninfais (N1, N2, N3, N4, N5, N6) além de adultos machos e fêmeas (Tabela 1). Ao alimentar-se em camundongos, 68% das larvas mudaram para ninfas de primeiro estágio (N1) e a porcentagem de ninfas que mudou para o próximo estágio variou de 48 a 99%. A partir do terceiro estágio, as ninfas já puderam dar origem a adultos. Foi constatado que a porcentagem de ninfas que mudou para adultos aumenta progressivamente com o estágio evolutivo (18 e 100% em N3 e N6, respectivamente), em detrimento à porcentagem que mudou para um próximo estágio de ninfa. Dentre as ninfas que mudaram para adultos, os estádios mais precoces (como N3 e N4) tenderam a originar mais machos enquanto os mais avançados (N5 e N6) tenderam a originar número maior de fêmeas (Tabela 1).

O tempo de pré-ecdise aumentou progressivamente do estágio larval até o terceiro estágio ninfal. No entanto, a partir de N3 o tempo de muda não apresentou diferenças significativas em relação aos estádios subsequentes ($p > 0.05$) (tabela 1).

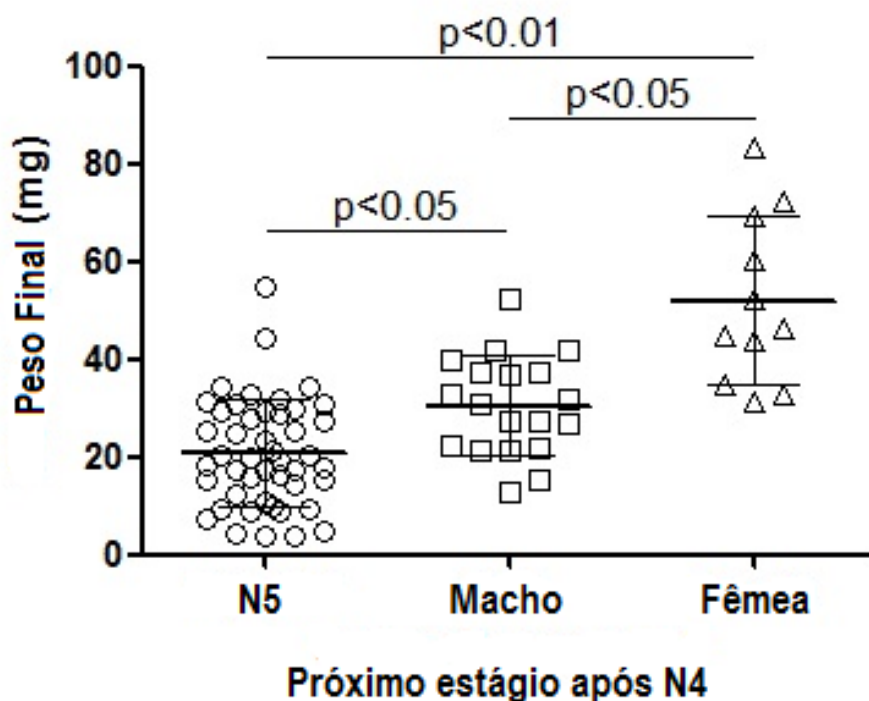
Tabela 1 – Parâmetros relativos a mudas durante o ciclo biológico de *Ornithodoros rostratus*.

Estágio/ estádio	N	Mudaram	Número de mudas para			Razão Fêmea:Macho	Pré-ecdise(dias)
			Ninfa	Fêmea	Macho		
Larva	300	204 (68%)	204 (100%)	0	0	5.0 ± 1.6^a	
Ninfa 1	156	75 (48%)	75 (100%)	0	0	6.8 ± 1.6^{ab}	
Ninfa 2	68	62 (91%)	62 (100%)	0	0	8.2 ± 1.4^{bc}	
Ninfa 3	125**	95 (76%)	78 (82%)	0	17 (18%)	11.3 ± 2.5^{bcd}	
Ninfa 4	78	76 (99%)	46 (61%)	11(14%)	19 (25%)	13.4 ± 2.3^d	
Ninfa 5	46	41 (89%)	12 (29%)	25(61%)	4 (10%)	14.0 ± 2.2^d	
Ninfa 6	12	9 (75%)	0	7 (78%)	2 (22%)	12.5 ± 0.8^d	

*Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0.05$; Kruskal-Wallis/Dunn's).

**Foram adicionadas mais 63 N3 ao experimento.

O peso final (PF) de N4 teve relação com o próximo estágio evolutivo a que deram origem. O PF de N4 que originaram fêmeas foi significativamente maior ($p<0.05$) que o PF das N4 que originaram machos, que por sua vez, também foi maior ($p<0.05$) que o PF das N4 que deram origem ao próximo estágio de ninfa (N5) (Fig. 2).



$p<0.01$; Kruskal-Wallis/ $p<0.05$ Dunn's

Figura 2 – Peso Final de ninfas de quarto estágio (N4) de acordo com o estágio evolutivo subsequente.

5.2 Parâmetros alimentares de *Ornithodoros rostratus*

Todos os dados sobre os parâmetros alimentares estão representados na Tabela 2. O número de espécimes capazes de se alimentar em camundongos foi sempre alto, variando de 83 (N1) a 100% (N6). O peso dos espécimes, entre 25 e 35 dias após a muda, aumentou proporcionalmente ao longo dos estádios até N5, que foi similar ao próximo ($p>0.05$). Adultos originados de estádios ninfais iniciais (N3 e N4)

apresentaram tendência a ser mais leves que os adultos originados de estádios ninfais mais tardios (N5 e N6). As fêmeas tenderam a ser mais pesadas que os machos.

O GP e a capacidade de ingestão de sangue, representada pela taxa GP/PI variaram entre os estádios e o sexo dos adultos. Exceto pelos machos, que ingeriram menor quantidade de sangue, o GP foi proporcional ao PI. A taxa GP/PI variou entre os estágios, sendo maior em larvas e fêmeas (que foram capazes de ingerir 10,7 e 3,7 vezes o seu PI, respectivamente) e menor nos machos (GP/PI=0,6-0,7).

As larvas permaneceram em média por quase três dias afixados no hospedeiro, já os outros estádios se alimentaram por períodos significativamente mais curtos que variaram de 17,3 minutos para o primeiro estágio ninfal até 78,3 minutos nas fêmeas originadas de N5.

Tabela 2 – Parâmetros alimentares de *Ornithodoros rostratus* em camundongos.

Estágio/estádio	N	Número que se alimentou	Peso Inicial (mg)	Ganho de Peso (mg)	Razão GP/PI	TTC (dias ou minutos) ^{***}
Larva	300	264 (88%)	<0,1 ^a	~1,0 ± 0,4 ^{**a}	10,7	2,7 ± 1,3 ^{***}
Ninfa 1	156	129 (83%)	0,6 ± 0,2 ^{ab}	0,8 ± 0,9 ^{ab}	1,4	17,3 ± 13,4 ^a
Ninfa 2	68	66 (97%)	1,1 ± 0,5 ^b	3,1 ± 3,0 ^b	2,8	20,4 ± 10,9 ^a
Ninfa 3	125	125 (100%)	3,4 ± 0,8 ^{bc}	8,4 ± 7,2 ^{bc}	2,5	26,6 ± 6,4 ^{ab}
Ninfa 4	78	76 (97%)	6,4 ± 2,5 ^{cd}	21,4 ± 15,9 ^{cd}	3,4	37,9 ± 4,9 ^{ab}
Ninfa 5	46	43 (93%)	17,0 ± 5,8 ^{de}	40,6 ± 28,4 ^{de}	2,4	42,2 ± 13,2 ^{ab}
Ninfa 6	12	12 (100%)	17,9 ± 8,9 ^{de}	41,5 ± 19,3 ^{de}	2,3	51,7 ± 4,4 ^b
Macho****	42	37 (88%)	21,2 ± 7,9 ^{de}	14,7 ± 9,0	0,7	39,7 ± 16,0
Macho(Ninfa 3)	17	15 (88%)	18,8 ± 5,4	13,7 ± 6,7 ^{de}	0,7	38,3 ± 9,8 ^{ab}
Macho (Ninfa 4)	19	16 (84%)	22 ± 10,3 ^{de}	15,1 ± 11,9 ^{de}	0,7	22,3 ± 12,0 ^{ab}
Macho (Ninfa 5)	4	4 (100%)	24,4 ± 4,6 ^{cde}	15,3 ± 5,9 ^{cde}	0,6	58,3 ± 20,8 ^{ab}
Macho (Ninfa 6)	2	2 (100%)	27,1 ± 2,5 ^{cde}	17,3 ± 4,3 ^{cde}	0,6	35,4 ± 10,0 ^{ab}
Fêmea****	43	40 (93%)	28,1 ± 10,0	104,9 ± 48,9	3,7	53,6 ± 21,4
Fêmea (Ninfa 4)	11	11 (100%)	23,3 ± 7,0 ^{de}	74,4 ± 31,6 ^{de}	3,2	37,6 ± 8,2 ^{ab}
Fêmea (Ninfa 5)	25	22 (88%)	28,7 ± 10,1 ^e	111,4 ± 40,4 ^e	3,9	78,3 ± 29,0 ^b
Fêmea (Ninfa 6)	7	7 (100%)	33,8 ± 12,2 ^e	132,6 ± 73,7 ^e	3,9	51,5 ± 8,1 ^b

* Letras diferentes indicam diferença estatística (p<0,05; Kruskal-Wallis/Dunn's);

**Subtraído de 0,09;

***Período medido em dias e não em minutos, como nos outros estádios;

****Mostra os valores para machos e fêmeas, em geral. Não incluídos nas análises estatísticas.

5.3 Parâmetros reprodutivos de *Ornithodoros rostratus*

Em geral, após um repasto sanguíneo, as fêmeas recém-surgidas permaneceram em oviposição por, em média, $15,2 \pm 5,8$ dias e fizeram a postura de $276,8 \pm 137,4$ ovos, em média. Fêmeas originadas de N4 tiveram tempo de oviposição e de incubação dos ovos similares a fêmeas que se originaram de N5 e N6 ($p > 0,05$), mas apresentaram valores estatisticamente inferiores de PI e GP. Além disso, apresentaram menor número de ovos/fêmea em comparação com fêmeas surgidas de N6 ($p < 0,05$) (Tabela 3). No entanto, a taxa de conversão de sangue ingerido (mg)/número de ovos produzidos foi similar entre as fêmeas surgidas de diferentes estádios ninfais, de forma que 1 mg de sangue tenha gerado aproximadamente 2,6 ovos.

Foi observado que a taxa de eclosão dos ovos liberados por fêmeas surgidas de N6 foi de $94,0 \pm 7,1\%$, um valor consideravelmente maior que aquele atingido por fêmeas surgidas de N4 e N5.

Tabela 3 – Parâmetros reprodutivos de fêmeas de *Ornithodoros rostratus* em camundongos.

Estádio anterior	N	Peso Inicial (mg)	Ganho de Peso (mg)	Tempo de oviposição (dias)	Ovos/Fêmea	Incubação dos ovos (dias)	Eclosão (%)	Taxa de conversão**
Ninfa 4	11	$26,6 \pm 5,3^a$	$72,4 \pm 42,8^a$	$14,6 \pm 4,2^a$	$187,7 \pm 56,9^a$	$16,7 \pm 2,6^a$	$54,3 \pm 40$	2,59
Ninfa 5	4	$42,1 \pm 0,9^{ab}$	$113,8 \pm 12,3^{ab}$	$15,8 \pm 6,9^a$	$306,0 \pm 24,3^{ab}$	$16,8 \pm 2,8^a$	$48,5 \pm 25,4$	2,69
Ninfa 6	2	$46,9 \pm 7,4^b$	$203,2 \pm 46,6^b$	$16,5 \pm 9,2^a$	$530,0 \pm 84,9^b$	$19,5 \pm 3,5^a$	$94,0 \pm 7,1$	2,61
Total	17	$34,5 \pm 10,1$	$105,2 \pm 61,2$	$15,2 \pm 5,8$	$276,8 \pm 137,4$	$17,2 \pm 2,9$	$58,6 \pm 36,3$	2,63

* Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$; Kruskal-Wallis/Dunn's);

** Número de ovos produzidos com 1mg de sangue ingerido.

5.4 Eventos observados através da microscopia intravital durante a alimentação de *Ornithodoros rostratus* e sua correspondência com os sinais elétricos capturados

As imagens gravadas durante a microscopia intravital permitiram identificar quatro tipos de eventos que aconteceram durante a alimentação: sucção, salivação,

movimentação de quelíceras e inatividade – e associar cada um destes eventos com os tipos de sinais elétricos capturados. A análise das imagens utilizando o programa ImageJ ainda permitiu avaliar a dinâmica do poço alimentar, caracterizada pelo aumento ou redução de área formada pelo material extravasado (área avermelhada), nos momentos em que ocorriam sucção ou salivação. As características de cada evento identificado foram:

Sucção: Quando o carrapato realizou a sucção do sangue do local de alimentação para seu tubo digestivo, observamos uma redução rápida da área avermelhada do poço alimentar formado ao redor das peças bucais que corresponde à sucção de sangue do poço para o interior da bomba faríngea. Este evento foi sucedido por um aumento na área avermelhada do poço que foi resultante da interrupção da sucção do poço e, provavelmente, do bombeamento do sangue da bomba faríngea para o intestino, ocorrendo simultaneamente ao extravasamento de sangue dos tecidos para a área do poço. A análise das imagens referentes à variação da área avermelhada do poço alimentar nestes momentos geraram gráficos de ondas sequenciais (Fig. 3). Os sinais elétricos capturados durante a sucção foram caracterizados por variações sequenciais e repetitivas na voltagem, que formaram picos com vértice para baixo (Fig. 3) e refletem as contrações e relaxamento da musculatura da bomba faríngea, uma vez que os picos observados nos eletrogramas e nas análises de imagens coincidiram temporalmente (Fig. 3).

Os sinais elétricos de sucção apresentaram três padrões distintos que foram caracterizados pelo formato dos picos e pela frequência com que aparecem, sendo eles: A) picos com forma simétrica (vértice único e amplitude relativamente semelhante ao longo do tempo) e em alta frequência - >4 Hertz (Hz) - que, em conjunto, formaram um padrão aqui chamado de “Padrão de Alta Qualidade” (Fig 3A a D); B) picos com formas irregulares (vértice duplo e variação na amplitude ao longo do tempo) e frequência relativamente mais baixa (<4 Hz) que, em conjunto, formaram o padrão aqui chamado de “Padrão de Média Qualidade” (Fig. 3E a H); e C) sinais elétricos disformes (variação de voltagem irregular e sem definição nítida de picos), sendo chamado de “Sem Padrão Definido” (Fig. 3I a L). Nesse último caso, não foi possível identificar sinais elétricos que indicassem sucção ou outro evento. No entanto, a análise das imagens indicou que durante estes momentos havia sucção e também salivação.

Salivação: Na microscopia intravital foi possível observar uma ejeção de material das peças bucais para o local da alimentação. Nos períodos iniciais da alimentação, o material ejetado apresentou coloração clara, fazendo com que a análise das imagens pelo ImageJ não fosse informativa. Entretanto, durante a fase de ingurgitamento, o material ejetado apresentou coloração avermelhada, representado por saliva misturada com o material ingerido do poço alimentar, provavelmente sangue, fluidos teciduais e células do local de alimentação. Nestes momentos, a salivação foi caracterizada por um aumento repentino nos valores de área relativa manchada de vermelho, que refletiam o aumento repentino ocupado pelo poço alimentar na área em análise (Fig. 3).

Os sinais elétricos capturados durante a salivação foram caracterizados por um aumento repentino na voltagem emitida (até ~2,8 mV) seguido pelo retorno da voltagem ao valor basal (~1,5 mV) (Fig. 3A a H). O aumento repentino na voltagem referente à salivação foi variável e em várias situações era muito sutil (~0,2 mV) (ex: terceiro evento de salivação da Fig. 3A, Fig. 3C e 3D), mas mesmo nestes casos sempre foi possível observar ejeção de material para o local de alimentação.

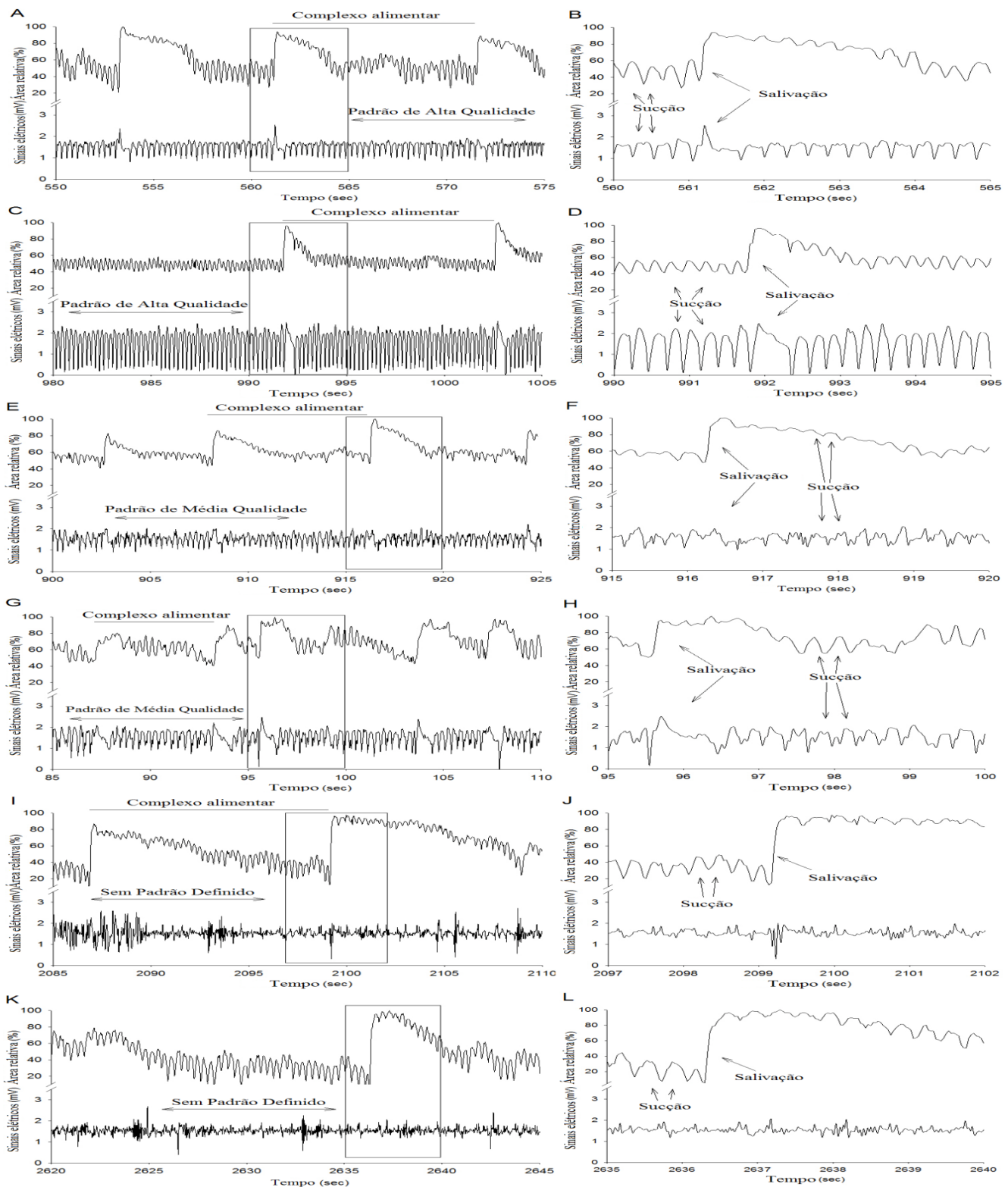


Figura 3 – Sobreposição do tamanho da área relativa do poço alimentar e dos sinais elétricos gerados durante o processo alimentar realizados em Padrão de Alta Qualidade (A e C), Padrão de Média Qualidade (E e G) e Sem Padrão Definido (I e K). As imagens B, D, F, H, J e L representam ampliações das partes selecionadas das figuras anteriores.

Movimentação das quelíceras: Nos momentos iniciais da alimentação, todos os carrapatos realizaram intensa movimentação das quelíceras a fim de abrir os tecidos e inserir as peças bucais no local da picada. Essa movimentação sempre era intercalada por vários eventos de salivação e, em alguns momentos, por sucção. Os sinais elétricos gerados por este evento apresentavam grande variação de voltagem (~3 mV) com um padrão desordenado (Fig. 4A, B, C e D).

Inatividade: caracterizado por um período em que os carrapatos permaneceram com as peças bucais em contato com o hospedeiro, porém sem realizar nenhum dos eventos caracterizados acima. Durante este período, os valores de voltagem capturados apresentaram ligeira variação (~0,8-0,9 mV). Estes eventos foram observados basicamente em duas situações: a) no início da alimentação, quando as peças bucais do carrapato entram em contato com o hospedeiro e permanecem por um período sem se movimentar (Fig. 4A e B) e b) aleatoriamente e em qualquer fase da alimentação, porém por períodos curtos (0,1 a 2 s) entre os outros eventos que compõem a hematofagia (Fig. 4E e F). Períodos de inatividade foram muito raros durante a fase de ingurgitamento.

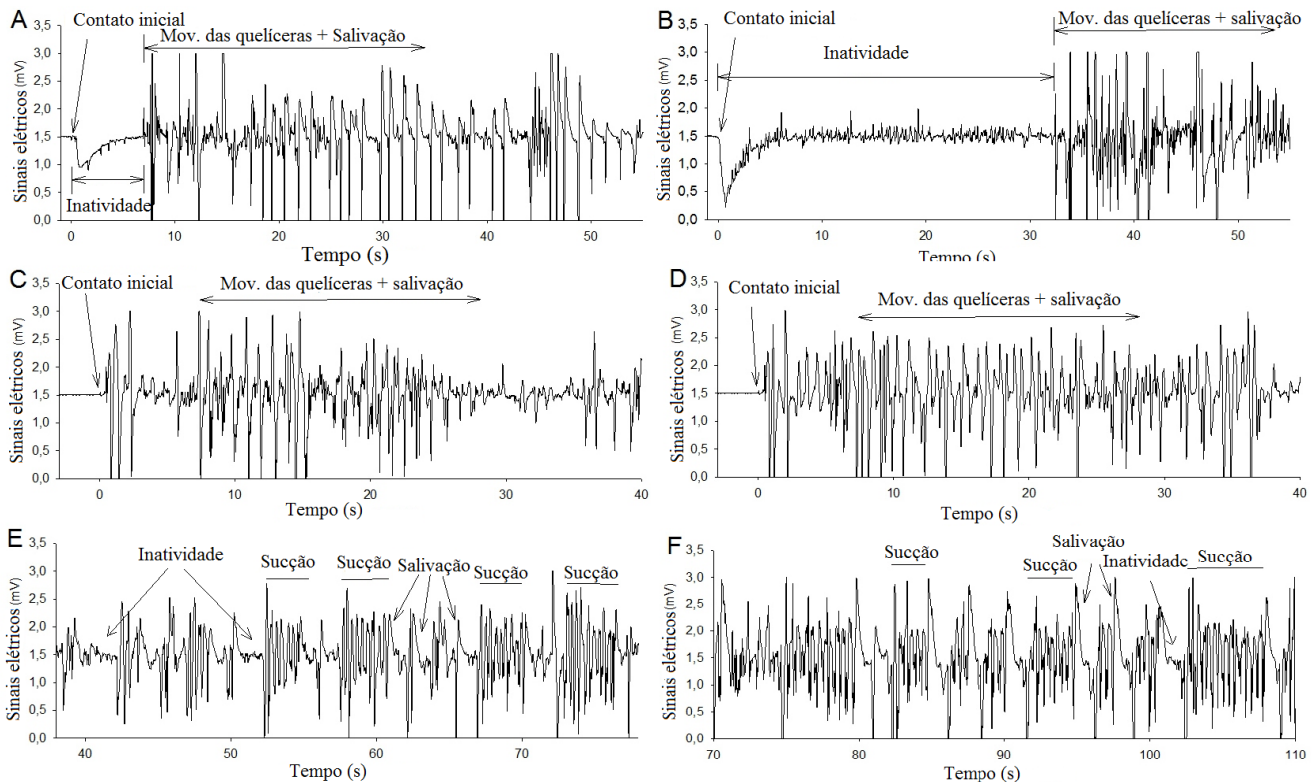


Figura 4 – Sinais elétricos gerados pela movimentação de quelíceras (A,B,C e D) e períodos de inatividade (A, B, E e F).

5.5 Caracterização geral do processo alimentar de *Ornithodoros rostratus* através da análise do eletromiograma

Durante a hematofagia, o grupo de N4 que foi submetido ao eletromiograma separadamente ficou, em média, em torno de 34,4 minutos em contato com o hospedeiro e ingeriu aproximadamente 4,4 vezes seu peso inicial em sangue (Tabela 4). A taxa de ingestão média foi de 0,8 mg/min e quase todos os carrapatos se alimentaram sem mudar de local, apenas um dentre os oito avaliados iniciou a hematofagia em um local e, após algum tempo de alimentação, mudou para uma região próxima à picada inicial, para picar novamente e completar sua alimentação.

Tabela 4 – Parâmetros alimentares de ninfas de quarto estágio de *Ornithodoros rostratus* alimentadas em camundongos e submetidas ao eletromiograma (n=8).

Parâmetros alimentares	Média ± DP	Mínimo - Máximo
Peso Inicial (mg)	6.1 ± 2.5	4.0 - 10.3
Ganho de Peso (mg)	27.0 ± 15.6	12.3 - 48.0
Picadas	1.1 ± 0.4	1 - 2
Tempo total de contato (min)	34.4 ± 12.9	20.8 – 55.6
Taxa de Ingestão (mg/min)	0.8 ± 0.4	0.3 – 1.5

5.6 Fases do processo alimentar de *Ornithodoros rostratus*

Uma vez identificados e caracterizados os eventos, utilizamos os registros elétricos gravados do grupo de N4 citado acima para quantificar sua frequência ao longo da alimentação. Baseado na frequência de ocorrência de cada evento, o processo alimentar foi dividido em duas fases distintas: fase 1 - formação do poço alimentar; e fase 2 - ingurgitamento (Fig. 5). As características de cada fase são:

Fase 1: Esta fase representa o início da alimentação quando acontece o contato inicial do carrapato com o hospedeiro, a inserção das peças bucais e a formação do poço alimentar. A duração média foi de 8% de todo o período alimentar (Fig. 5). São observados os quatro tipos de eventos (inatividade, movimentação das quelíceras, salivação e sucção), porém a sucção acontecia somente por períodos curtos e sem

continuidade, indicando que não há ingestão de sangue ou há muito pouca ingestão. Os eventos durante a fase 1 apareceram em frequência e períodos variados, caracterizando três momentos distintos que ocorreram em sequência, sendo eles:

Fase 1a- Contato inicial com inatividade: este momento ocorreu a partir do contato inicial com o hospedeiro até o início da movimentação das quelíceras (Fig. 4A e B). Durante este período os carrapatos encostaram as peças bucais no hospedeiro, mas permaneceram sem realizar nenhuma atividade uma vez que não foram observados sinais elétricos característicos dos eventos acima. Este período teve duração média de $14 \pm 13,5$ segundos (variação de 5 a 33 segundos), que corresponde a 0,7% do processo alimentar, e foi observado na hematofagia de seis dos oito carrapatos avaliados.

Fase 1b - Penetração das peças bucais e início da formação do poço alimentar: Este período foi caracterizado por intensa movimentação das quelíceras intercalados por vários eventos de salivação (Fig. 4A a D) que indicaram que os carrapatos estavam utilizando as quelíceras e a saliva para penetrar as peças bucais nos tecidos do hospedeiro e formar o poço alimentar. Este momento teve duração média de $34,5 \pm 23,7$ segundos (variando de 14 a 83 segundos), correspondente a 1,7% do período alimentar. Não foram observados eventos de sucção na fase 1b e a saliva ejetada ainda possuía um aspecto claro, indicando que não houve ingestão do conteúdo do poço. Dentre os oito carrapatos avaliados, dois iniciaram o processo alimentar diretamente nesta fase, sem que houvesse o período de inatividade (fase 1a) (Fig. 4C e D).

Fase 1c - Formação do poço alimentar: Este terceiro momento da fase 1 é caracterizado pelo início do aparecimento dos primeiros eventos de sucção, que começaram a acontecer, em média, após $48,5 \pm 32,1$ segundos do início da alimentação. Durante este período, a movimentação das quelíceras e a salivação foram intercalados por eventos de sucção (Fig. 4E e F). Inicialmente, os sinais de sucção apareceram por períodos curtos (2 a 3 segundos) e com o tempo foram se tornando mais prolongados em detrimento aos eventos de movimentação das quelíceras, que se tornaram mais escassos. Desta forma, a média geral da frequência dos eventos de sucção aumentou progressivamente (Fig. 5). Esta fase, chamada de fase 1c, correspondeu a 5,7% do período alimentar e os sinais elétricos de sucção capturados apresentaram picos irregulares (vértice duplo e amplitude variada). Foi possível observar o extravazamento progressivo de sangue dos tecidos (formação do poço alimentar), porém com extensão ainda delimitada a uma pequena região ao redor das peças bucais (Fig. 6).

O término da fase 1 foi delimitado pela ocorrência de pelo menos 20 eventos de sucção seguidos ou intercalados apenas por sinais de salivação, indicando que o carrapato saiu da fase de formação do poço alimentar e passou para a fase de ingurgitamento (fase 2). Durante o ingurgitamento, os carrapatos realizaram basicamente sucção intercalada por salivação. Dessa forma, não houve movimentação das quelíceras e os momentos de inatividade foram extremamente raros. Durante este período, a ingestão de sangue aconteceu em complexos alimentares, de forma que um único complexo alimentar seja caracterizado pelo período que compreende à ejeção de saliva seguida de sucção no poço alimentar até o início de uma nova salivação (Fig. 3). Na análise gráfica das imagens, os complexos alimentares foram caracterizados pelo aumento repentino na área relativa do poço (causado pela ejeção de saliva com material do canal alimentar em adição ao sangue extravasado dos tecidos), seguido da sucção deste conteúdo que causa redução contínua na área relativa até que esta retorne ao seu valor basal, permanecendo assim por algum tempo até que haja uma nova salivação e um novo complexo alimentar (Fig. 3). A duração dos complexos alimentares foi menor na fase 2a ($5,3 \pm 2,2$ segundos, em média) e maior nas fases subsequentes (média de $10,9 \pm 7,4$, $12,5 \pm 6,7$ e $11,7 \pm 4,5$ segundos nas fases 2b, 2c e 2d, respectivamente).

A frequência da sucção e o padrão dos sinais elétricos de sucção variaram ao longo do ingurgitamento e permitiram dividir esta fase em quatro momentos distintos, sendo elas:

Fase 2a: Esta fase, que durou em torno de 4% do período alimentar (Fig. 3), foi caracterizada pela sucção contínua de sangue com sinais elétricos em Padrão de Média Qualidade (Fig. 3E a H) com intensa salivação (Fig. 5). Ela se iniciou com a ocorrência de pelo menos 20 sinais de sucção seguidos e terminou com a ocorrência de pelo menos 20 sinais de sucção em Padrão de Alta Qualidade. Ao longo do tempo da fase 2a, a frequência da sucção aumentou gradativamente, a salivação foi reduzida (Fig. 5) e o formato dos picos foi modificado do Padrão de Média Qualidade para o Padrão de Alta Qualidade.

Fase 2b: Esta foi a segunda fase mais duradoura, que correspondeu em média a 24% do período alimentar, e foi caracterizada por uma redução na frequência de salivação e intensa sucção (Fig. 5). Os sinais elétricos referentes à sucção apresentaram Padrão de Alta Qualidade (Fig. 3A a D) e foi o período no qual a frequência de sucção atingiu e se manteve seus valores mais altos (>4 Hz). Com o passar do tempo,

começaram a aparecer picos de sucção com sinais elétricos irregulares e o término desta fase foi considerado quando ocorreu pelo menos 20 sinais de sucção seguidos com Padrão de Média Qualidade.

Fase 2c: A penúltima fase da alimentação teve duração de aproximadamente 11% do período alimentar e apresentou perfil de sucção com sinais semelhantes à fase 2a (Fig. 3E a H), diferindo apenas no fato da frequência da sucção ter reduzido gradativamente (Fig. 5). Outra diferença para a fase 2a é que a frequência de salivação permaneceu baixa (Fig. 5). Ao longo do tempo, os sinais de sucção se tornaram cada vez mais irregulares e esta fase terminou com a ocorrência de pelo 10 segundos de sinais elétricos sem padrão definido.

Fase 2d: A última fase do ingurgitamento foi a mais duradoura, correspondendo a 53% do processo alimentar (Fig. 5). Nas análises das imagens foram observados complexos alimentares, porém os sinais elétricos capturados foram extremamente irregulares (Fig. 3I a L). A frequência de salivação permaneceu baixa com complexos alimentares de duração média de $11,7 \pm 4,5$ segundos. Esta fase terminou com a remoção das peças bucais do hospedeiro.

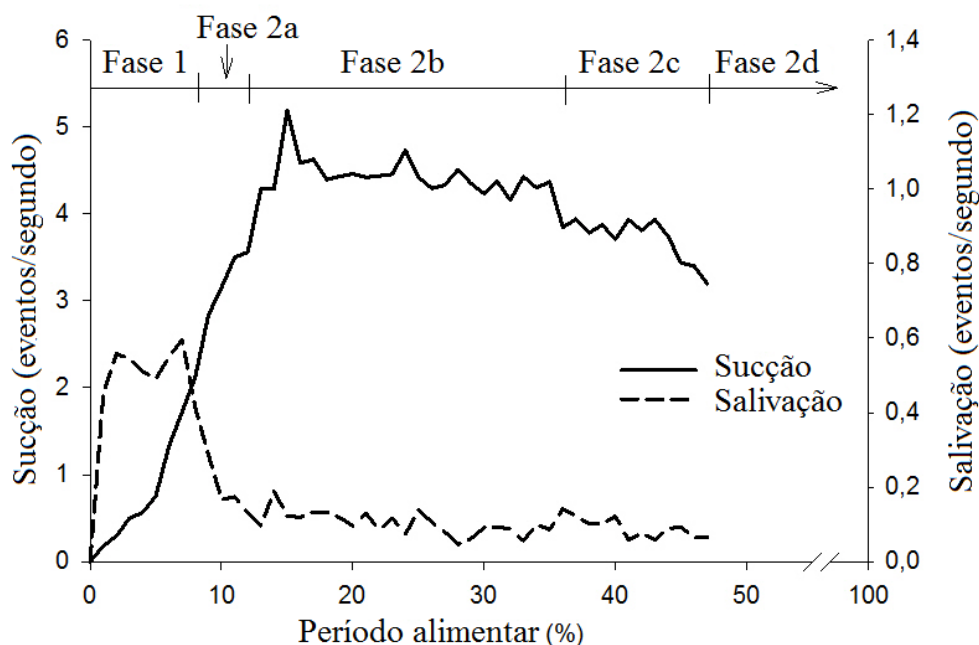


Figura 5 – Frequências de sucção e salivação medidas através do eletromiograma durante a Fase 1 (formação do poço alimentar) e em diferentes momentos da Fase 2 (ingurgitamento) ao longo do processo alimentar de ninfas de quarto estágio de *O. rostratus* alimentadas em camundongos.

O último parâmetro analisado foi a variação do tamanho do poço alimentar ao longo da hematofagia. Foi possível observar que o poço alimentar, inexistente no início da fase 1, já estava formado no final da fase 1 / início da fase 2 e sua área aumentou lenta e gradativamente até, aproximadamente, o último terço da fase 2d. A partir deste momento, foi observado um aumento mais acelerado na área ocupada, devido ao extravasamento de sangue dos tecidos concomitante com a não sucção (Fig. 6). Este aumento acelerado continuou mesmo após a remoção das peças bucais do hospedeiro.

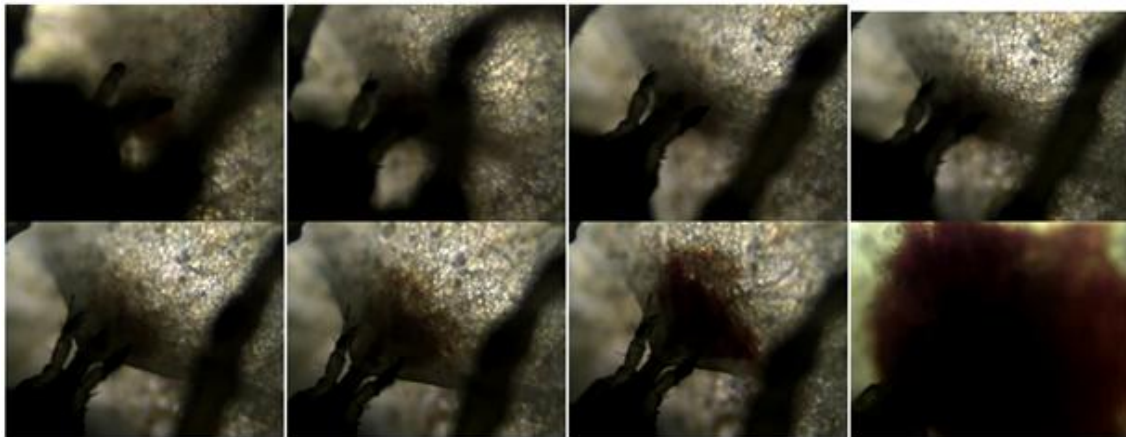


Figura 6 – Sítio da picada e pool alimentar em diferentes tempos após o início da alimentação. Quadro 1 - fase 1; Quadros 2 a 7 – fase 2 mostrando 14,29, 28,57, 42,86, 57,15, 71,44, e 85,73% do período alimentar; quadro 8 – final do período alimentar.

6. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho sobre o ciclo biológico serviram para adicionar novas informações sobre vários parâmetros biológicos de *Onithodoros rostratus* que não haviam sido elucidados ou apresentaram controvérsias nos estudos anteriores. Pela primeira vez, o ciclo biológico dessa espécie de carrapatos tendo camundongos como hospedeiros foi descrito, o que nos permitiu concluir que seria satisfatório manter uma colônia de *O. rostratus* se alimentando em camundongos sob condições controladas, já que foram capazes de completar o ciclo com alta viabilidade. Mesmo que não sejam hospedeiros naturais para *O. rostratus* (Hoogstraal 1985, Cançado et al. 2008, Ribeiro et al. 2013) os camundongos foram utilizados com essa finalidade devido ao fato de serem bons animais para uso experimental. Dentre várias vantagens, o camundongo é uma espécie fácil de manter em laboratório, exige pouco espaço físico para criação e apresenta vários reagentes disponíveis comercialmente, o que facilitaria estudos focados em avaliar aspectos relativos à interação artrópode-hospedeiro.

Foi observada a existência de até seis estádios ninfais durante o ciclo biológico de *O. rostratus*, além de um estágio larval e adultos, como observado anteriormente por Ribeiro et al. (2013). Os adultos foram originados das ninfas 3-6 e, exceto pelas N6 que deram origem a adultos em sua totalidade, as N5 representaram o estágio que gerou a maior porcentagem de indivíduos que mudaram para adultos, corroborando com o que foi observado anteriormente por Guglielmone & Hadani (1980) e Ribeiro et al. (2013). Ribeiro et al. (2013) constatou que, provavelmente, o mais comum seria a presença de cinco estádios de ninfa, o que pode justificar o fato de estudos prévios não terem citado a presença de um sexto estágio ninfal (Brumpt 1915, Guglielmone & Hadani 1980). Foi constatado que as fêmeas também podem surgir a partir de N4, como foi observado também por Guglielmone & Hadani (1980), o que diverge do que foi descrito por Ribeiro et al. (2013), quando se observou fêmeas surgindo apenas a partir de N5 e N6.

A relação Fêmea:Macho variou de 0:1 (adultos surgidos de N3) a 6.2:1.0 (adultos surgidos de N5), mas a taxa final ficou em torno de 1:1, o que corrobora com o que foi visto por Ribeiro et al. (2013). A tendência, aqui observada, dos machos surgirem de estádios ninfais mais precoces e as fêmeas surgirem de estádios ninfais

tardios parece ser comum e corrobora com o que já foi observado em outros carrapatos argasídeos (Pound et al. 1986, Oliver 1989, Tizu et al. 1995).

Foi realizada uma análise da relação entre o PF das N4 após o repasto e o seu estágio evolutivo subsequente. Assim, foi possível observar que, quanto maior o PF de uma N4 após o repasto, maior era a probabilidade deste espécime mudar para adulto, sendo que a tendência era que as N4 de maior PF dessem origem a fêmeas. A relação entre PF e o estágio subsequente das ninfas foi bem clara para *O. rostratus* e parece ser comum, como um todo, para outras espécies de argasídeos (Oliver 1989).

As ninfas e adultos apresentaram um repasto sanguíneo de curta duração, que variou de 17 a 78 minutos. Essa característica comum a carrapatos de hábito nidícola pode lhes conferir grande vantagem evolutiva, pois um contato breve com o hospedeiro resulta em menor tempo de exposição durante o período alimentar e um retorno rápido ao abrigo, onde a digestão do sangue pode ser feita em segurança (Gray et al. 2013).

As larvas levaram de 1-5 dias (média de 2.7 dias) para completar o repasto sanguíneo. O tempo de repasto das larvas foi maior que o observado por Ribeiro et al. (2013), que calculou um tempo médio de 33.5 minutos. Entretanto, corrobora com os valores calculados por Venzal & Estrada-Pena (2006), que observaram um tempo médio de repasto de 2.9 dias em coelhos. Além desse trabalho, outros afirmaram que o processo alimentar das larvas pode ter longa duração, se estendendo por até 8 dias (Brumpt 1915, Guglielmone & Hadani 1980) e incluindo *O. rostratus* no grupo de argasídeos cujas larvas se alimentam lentamente por muitos dias (Hoogstraal 1985). As diferenças relativas ao tempo de repasto não eram esperadas, visto que os espécimes utilizados neste trabalho foram coletados no mesmo local que os carrapatos utilizados por Ribeiro et al. (2013) e provavelmente pertenciam à mesma população. Portanto, possivelmente ocorreram, em primeiro lugar, devido à utilização de hospedeiros diferentes nos dois trabalhos. Paralelamente, outros fatores como diferentes condições experimentais (ex.: temperatura ambiente durante o repasto) ou períodos de jejum das larvas podem, também, ter interferido no tempo necessário para o repasto sanguíneo. Enquanto no presente estudo e naquele desenvolvido por Venzal & Estrada-Pena (2006), as larvas eram utilizadas em um período de 10-20 e ~15 dias, respectivamente, após a eclosão dos ovos, Ribeiro et al. (2013) utilizou larvas em um jejum de 35-45 dias.

Também foi interessante observar que os estágios mais avançados (principalmente N5 e fêmeas) tiveram menor PI e GP em comparação com os mesmos estágios em Ribeiro et al. 2013), sendo um indício da influência do hospedeiro sobre esses parâmetros e talvez sugerindo que os carrapatos possam se alimentar com mais eficiência em coelhos que em camundongos.

As taxa GP/PI observadas (um parâmetro inexplorado em trabalhos anteriores) demonstraram que larvas e fêmeas foram capazes de ingerir mais sangue em relação ao seu peso inicial que ninfas, que por sua vez ficaram à frente dos machos. Esses dados corroboram com aspectos relativos à fisiologia dos carrapatos, em que fêmeas necessitam do repasto sanguíneo significativo para a maturação dos ovários, possibilitando a produção de uma grande quantidade de ovos (Ogihara & Taylor 2013). Larvas e ninfas necessitam de um repasto satisfatório para o desenvolvimento e realização da muda. Os machos, por sua vez, têm como principal função do repasto sanguíneo a realização da espermatogênese. No entanto, os machos argasídeos podem ser capazes de fertilizar fêmeas sem a realização de repasto prévio nas primeiras cópulas (Balashov 1972), o que justificaria sua baixa ingestão de sangue.

Os aspectos reprodutivos de fêmeas originadas de N4, N5 e N6 também foram explorados no presente trabalho. Foi observado que fêmeas originadas de N6 foram significativamente mais pesadas ($p < 0.05$), sendo capazes de ingerir mais sangue do hospedeiro e produzir mais ovos. No entanto, a conversão de sangue ingerido/ovos foi similar nas fêmeas originadas de diferentes estádios de ninfa (1 mg dieta = 2.6 ovos), indicando que a performance reprodutiva permanece inalterada independentemente do estágio de ninfa do qual a fêmea surgiu.

A performance reprodutiva das fêmeas surgidas dos três estádios de ninfa foi semelhante, porém, foi possível observar que a taxa de eclosão dos ovos, o que indica sua viabilidade, foi de 94% para aqueles referentes à fêmeas surgidas de N6, bem acima da média (58.6%), indicando que a fêmea que ingeriu mais sangue, também foi responsável pela liberação de ovos mais viáveis.

O monitoramento de sinais elétricos gerados durante a alimentação e a microscopia intravital são técnicas já empregadas anteriormente no estudo de insetos hematófagos e carrapatos ixodídeos. Entretanto, até onde se sabe, este é primeiro trabalho que avalia de forma quantitativa os fenômenos que acontecem na alimentação de uma espécie da família Argasidae, tornando impossível comparar os resultados encontrados no presente

trabalho com estudos anteriores. Lavoipierre & Riek (1955) realizaram um estudo pioneiro sobre o comportamento alimentar de carrapatos argasídeos, mas usaram apenas a técnica de microscopia intravital para desenvolver uma análise qualitativa.

As duas técnicas utilizadas neste trabalho são complementares e, quando utilizadas em conjunto, promovem um ganho imenso nas análises. A microscopia intravital permite a visualização dos eventos que estão acontecendo no sítio alimentar, com isso ela gera informações não vistas no eletromiograma e é extremamente útil para relacionar os sinais aos eventos da alimentação. A maior desvantagem, é que uma vez que as análises são feitas de forma manual, através de visualização, a quantificação de alguns eventos fica prejudicada. Uma opção para contornar este problema é a utilização de softwares de análise de imagens (como o ImageJ) que auxiliam na análise e quantificação de parâmetros dos eventos. Mas mesmo utilizando estes softwares, a ocorrência de erros ainda é significativa, porque qualquer variação nas imagens causada por fatores externos prejudicam a construção de gráficos. Exemplos de fatores prejudiciais que acontecem comumente são movimentação do hospedeiro ou do artrópode durante a alimentação, ausência de contraste no poço alimentar e na salivação, como visto no início da alimentação, excesso de sangue no poço, como observado principalmente no final da alimentação além de possíveis distúrbios com equipamentos como alteração de intensidade na luz e necessidade de ajuste do foco da imagem no início ou ao longo do experimento. Outro fator limitante da microscopia intravital é que o sítio de alimentação precisa ser translúcido para permitir a visualização de processos. No presente trabalho, foi usada a orelha dos camundongos. Devido ao fato da orelha não ser um sítio usual de alimentação de *O. rostratus* (observações pessoais), as alterações feitas no sítio alimentar podem causar vieses na frequência e duração dos parâmetros que ocorrem na alimentação.

As maiores vantagens do eletromiograma são o fato de poder ser realizado em locais do hospedeiro onde os artrópodes normalmente realizam o repasto e o fato de ser consideravelmente melhor para a quantificação de eventos, pois os dados gerados de toda a alimentação sofrem menos interferências externas e podem ser quantificados manualmente ou por softwares a fim de realçar diferenças sutis que não podem ser vistas nas imagens, como, por exemplo, os perfis dos sinais aqui chamados de Padrão de Alta e Média Qualidade e os sinais Sem Padrão Definido. Porém, a identificação do perfil gerado por cada evento deve ser realizada anteriormente à quantificação de todo o

processo alimentar, caso contrário as interpretações podem ser feitas de maneira errônea ou vários sinais não poderão ser interpretados, como já aconteceu anteriormente (Lavoipierre & Riek 1955, Sweatman & Gregson 1970, Tatchell et al. 1972). Desta forma, no presente trabalho a microscopia intravital foi utilizada na identificação do significado dos sinais elétricos enquanto o eletromiograma foi utilizado na quantificação desses sinais.

Quatro eventos foram observados durante o processo alimentar, sendo eles Sucção, Salivação, Movimentação de quelíceras e Inatividade. O evento de sucção foi o mais comum durante o processo alimentar. Seu sinal elétrico típico mostra uma variação da voltagem, gerando no eletromiograma um pico com vértice pontiagudo voltado para baixo (forma regular), que indica contração simultânea da musculatura responsável pela abertura da câmara da bomba faríngea. Além do sinal típico, a sucção também gerou sinais elétricos com diferentes formatos, vistos aqui como picos com vértices duplos e variação de voltagem sem padrão definido.

Em triatomíneos, foi mostrado que quando a bomba de sucção está em amplo funcionamento e sem dificuldades no bombeamento, os sinais elétricos apresentam picos com forma regulares (vértice único) e quando há algum problema no bombeamento deste sangue, os sinais começam a apresentar formas com vértices duplos ou triplos (picos irregulares) (Araujo et al., 2009c; Soares et al., 2013). Estes trabalhos demonstraram que o intervalo entre os picos também pode ser afetado, os picos com forma regular normalmente apresentam intervalos iguais enquanto os intervalos entre picos irregulares variam e possuem implicações no enchimento da câmara da bomba de sucção. Acredita-se que este formato irregular dos sinais possa indicar uma falta de sincronia entre os feixes musculares responsáveis pelo funcionamento da bomba de sucção formando picos duplos devido à contração em momentos diferentes de cada feixe muscular.

Em *R. microplus*, Tatchell et al. (1972) descreve um pequeno pico, ou pico subsidiário, conectado ao pico principal que representa a abertura da válvula faríngea. Estes sinais não foram observados aqui e podem ter sido descartados juntamente com outros sinais considerados como ruído e que são excluídos pelo filtro usado no sistema.

O sinal de salivação foi caracterizado por um aumento repentino na voltagem seguido pelo retorno da voltagem ao valor basal. Este aumento apresentou amplitudes variadas, porém a comparação das imagens mostrou que os eventos eram sempre os

mesmos, i.e., ejeção de saliva no sítio alimentar. Estas observações diferem das encontradas por Sweatman & Gregson (1970) em estudos com o ixodídeo *Hyaloma aegyptium* onde os autores caracterizaram diferentes ações do aparato salivar durante a hematofagia, dentre eles a ejeção de saliva, período de inatividade com salivário aberto, abertura do salivário e atividade do salivário durante o período de sucção, de forma que cada uma destas ações apresentava um sinal elétrico característico. Estes resultados podem indicar um mecanismo de salivação diferente entre ixodídeos e argasídeos, que é coerente uma vez que argasídeos precisam de uma frequência de salivação muito maior devido ao curto período de tempo que permanecem com seus hospedeiros.

É interessante ressaltar as diferenças entre a salivação de insetos hematófagos e carrapatos. Os insetos possuem dois canais (um alimentar e um salivar) (Lavoipierre et al., 1959) e apresentam um funcionamento contínuo da bomba de sucção mesmo durante a salivação (Smith and Friend, 1970). Carrapatos possuem apenas um canal que serve para salivação e ingestão de sangue e para que a salivação aconteça, a ingestão de sangue (sucção) deve ser interrompida (Kemp et al. 1982, Sonenshine 1991). Este perfil faz com que durante a fase de ingurgitamento, a salivação seja facilmente identificada nos eletrogramas de carrapatos.

A movimentação das quelíceras apresentou sinais com variação de voltagem em um padrão desordenado. Este é o primeiro trabalho que descreve sinais elétricos de movimentação de quelíceras, uma vez que todos os trabalhos anteriores avaliaram os sinais em carrapatos ixodídeos já fixados ao hospedeiro, quando praticamente não há mais movimentação das quelíceras. Este evento foi observado apenas no início da alimentação, sempre com o intuito de auxiliar a penetração das peças bucais e formar o poço alimentar. Após algum período do início da alimentação, estes movimentos cessaram e só aconteceram novamente em situações em que o carrapato interrompeu a alimentação e iniciou novamente a hematofagia em outro local.

A análise ao longo da alimentação mostrou que os períodos de inatividade foram raros, curtos e apareceram basicamente no início da alimentação (fase 1a). Este perfil é mais parecido com o observado em insetos hematófagos (Sant'Anna et al. 2001, Araujo et al. 2009a) e diferente de carrapatos ixodídeos, que apresentam vários períodos de inatividade e podem chegar a vários minutos em determinadas situações (Gregson 1969, Sweatman & Gregson 1970, Tatchell et al. 1972). Lavoipierre & Riek (1955) também descreveram longos períodos de inatividade após alguns minutos do início da

hematofagia de espécies de argasídeos (*Ornithodoros moubata* e *O. tholozani* var. *typicus*), principalmente após a salivação. Este perfil não foi observado aqui, já que vimos nitidamente uma sucção contínua do conteúdo do poço a partir do início do ingurgitamento até o final da alimentação, com raríssimos períodos de inatividade.

Ao avaliar as fases do processo alimentar, foi importante constatar que os parâmetros alimentares das N4 usadas nos experimentos foram muito parecidos com o observado nas N4 envolvidas na descrição do ciclo alimentar, indicando que os procedimentos utilizados no eletromiograma não interferiram no processo alimentar das ninfas. Ao analisar o conjunto de sinais ao longo do período alimentar foi possível caracterizar de forma detalhada a alimentação do *O. rostratus* em camundongos. O processo alimentar se inicia com o contato das peças bucais do carrapato com o hospedeiro. Após o contato inicial, alguns espécimes (75% neste trabalho) permanecem por alguns segundos (~14 segundos) sem atividade para em seguida iniciar a movimentação das quelíceras, enquanto 25% dos carrapatos iniciam a movimentação das quelíceras imediatamente após o contato com o hospedeiro. Juntamente com a movimentação das quelíceras, há intensa salivação, que teria como objetivo liberar proteases no sítio de alimentação para digerir os tecidos e formar o poço alimentar e também inibir as reações reparatórias desencadeadas no hospedeiro, como hemostasia, inflamação e resposta imune (Ribeiro 1987).

Após algum tempo (~48,5 segundos), são observados os primeiros eventos de sucção que aparecem inicialmente por poucos segundos intercalados com salivação e movimentação das quelíceras. Neste momento parece não haver ingestão de sangue. Essa conclusão é obtida principalmente porque a saliva ejetada nestes momentos ainda está límpida, indicando que não há ou há pouco sangue no canal alimentar. Provavelmente estes eventos iniciais de sucção servem para avaliar a qualidade do poço alimentar e indicar se o carrapato ainda deve continuar trabalhando para melhorar o poço ou se já pode passar para a fase de ingurgitamento. Eventos similares foram observados no processo alimentar de *Rhodnius prolixus*, que testa a qualidade da dieta antes de iniciar a fase de ingurgitamento (Friend & Smith 1971).

Com o tempo, os eventos de movimentação das quelíceras vão se tornando mais raros até cessarem, enquanto os eventos de sucção se tornam mais frequentes até se tornarem contínuos e intercalados apenas por salivação. Nesta parte, inicia-se a fase de ingurgitamento, na qual não observamos aqui, nenhuma movimentação das quelíceras.

Lavoipierre and Riek (1955) também relataram que as quelíceras em argasídeos são ativas durante a penetração das peças bucais e movem apenas ocasionalmente após o início da sucção de sangue.

Na fase de ingurgitamento há intenso funcionamento da bomba de sucção para transferir o sangue do hospedeiro para seu intestino, o que somente se encerra com o término da alimentação. Durante este período, a ingestão de sangue é feita por repetidos complexos alimentares compostos por salivacão seguida de sucção constante. A alimentação em complexos alimentares é relatada por vários autores (Gregson 1969, Sweatman & Gregson 1970, Tatchell et al. 1972, Waladde et al. 1979) que estudaram a alimentação de carrapatos, porém todos eles estudaram ixodídeos e noticiaram a presença de um período de inatividade no complexo alimentar, fato não observado aqui. Em argasídeos, Lavoipierre & Riek (1955) comentaram sobre períodos curtos de inatividade no início da alimentação progressivamente mais demorados ao longo do repasto. No entanto, a duração desses períodos não foi calculada pelos autores. A diferença pode ser explicada pelo fato dos carrapatos utilizados naquele estudo serem pertencentes a outras espécies do gênero *Ornithodoros*, além das diferentes condições experimentais empregadas nos dois estudos.

Carrapatos ixodídeos também seguem este padrão de alimentação em complexos alimentares, porém sua duração é consideravelmente mais longa (de 22 segundos a mais de um minuto) (Sweatman & Gregson 1970) e os momentos de inatividades podem representar até 96% de todo o complexo (Tatchell et al. 1972). A duração dos complexos alimentares foi calculada nos repastos de *R. microplus*, *Dermacentor andersoni* and *Hyalomma aegypticum* e mostrou ser influenciada por fatores como luminosidade, tamanho da fêmea, temperatura do hospedeiro/dieta e composição da dieta (Gregson 1969, Sweatman & Gregson 1970, Tatchell et al. 1972, Waladde et al. 1979).

Durante o ingurgitamento, aqui representado pela fase 2 (Fig. 5), foram observados sinais de sucção em Padrão de alta qualidade, média qualidade e sem padrão definido, que permitiram dividir o ingurgitamento em 4 momentos. Como dito acima, estes sinais podem refletir o esforço despendido para ingerir sangue em cada fase da hematofagia.

A fase 2a apresentou sinais em Padrão de Média Qualidade com intensa salivacão, que é sugestivo de dificuldade em ingerir sangue. Neste momento, é provável que esta dificuldade em ingerir sangue seja devido à qualidade do poço alimentar que ainda não

está em condições totalmente favoráveis para ingestão de sangue, talvez porque o conteúdo ainda apresente alta viscosidade e justifique a intensa salivação que visa inibir os fenômenos hemostáticos do hospedeiro e aumentar a fluidez da dieta. Em insetos hematófagos, dietas mais viscosas aumentam significativamente a dificuldade alimentar, reduzindo a frequência de funcionamento da bomba faríngea e o volume médio de bombeamento (Smith 1979, Soares et al. 2013). Dessa forma, a salivação em maior frequência nesta fase deve acontecer com esse propósito. Trabalhos anteriores mostraram que é importante manter o sangue fluido no intestino para que a ingestão seja aumentada. Através da inibição da coagulação (Araujo et al. 2007) e indução da hemaglutinação (Araujo et al. 2009b), é possível realizar o remanejamento do sangue e a separação da parte fluida da parte sólida da dieta, o que poderia facilitar a diurese e, em carrapatos argasídeos, poderiam favorecer a secreção do excesso de fluido pelas glândulas coxais.

A fase 2b seria aquela em que ocorre maior ingestão de sangue. Provavelmente, o poço alimentar está em sua melhor situação, com um volume relativamente maior de sangue sendo extravasado dos tecidos e com conteúdo fluido permitindo que a sucção ocorra em alta frequência sem maiores dificuldades na passagem de sangue pelo canal alimentar e tubo digestivo, o que pode ser constatado pela geração de sinais elétricos em Padrão de Alta Qualidade.

Com o passar do tempo de ingurgitamento, os sinais elétricos capturados voltam a ficar em Padrão de Média Qualidade (Fase 2c), o que indica que podem estar aparecendo novos problemas no bombeamento da dieta. O mais provável neste momento é que os problemas não sejam no sítio alimentar, mas por dificuldades para bombear o sangue para o intestino. O principal problema poderia ser o excesso de sangue no intestino e a distensão do tegumento do idiossoma que está causando uma pressão reversa no canal alimentar, dificultando a entrada de sangue, tal qual foi observado em triatomíneos por Guarneri et al. (2000b).

A partir de aproximadamente metade da fase de ingurgitamento (fase 2d), quando observamos sinais elétricos sem padrão definido, seria um agravamento dos problemas da fase anterior onde o carrapato tem uma dificuldade enorme em bombear o sangue para o intestino. Nesta fase, o carrapato provavelmente já ingeriu todo o sangue necessário e qualquer distúrbio faria com que este interrompesse a alimentação. Este fato também foi comentado por Lavoipierre and Riek (1955) que descrevem que

argasídeos repletos de sangue são facilmente incomodados se tocados. Como nos experimentos eles estão se alimentando em hospedeiros anestesiados e não há distúrbios que possam estimular o fim da alimentação, eles continuam tentando ingerir sangue até um momento crítico para a sucção. Na natureza, onde a alimentação é feita em hospedeiros não anestesiados, essa fase provavelmente não duraria tanto quando nas condições de laboratório e o fim da alimentação poderiam ocorrer até mesmo na fase 2c.

Ao longo da alimentação, a área do poço alimentar aumenta gradativamente e no final observamos um borrão de sangue no local da picada (Fig. 6) que é explicado pela falta de sucção do sangue do pool somada ao contínuo extravazamento de sangue dos tecidos, provavelmente exacerbado pela atividade anti-hemostática desempenhada pelas moléculas salivares no sítio alimentar. Um fato observado e comentado por Lavoipierre & Riek (1955) diz respeito à possível presença de um fator de dispersão na saliva que favoreça o aumento da área ocupada pelo poço alimentar. O aumento da área do poço alimentar também poderia estar ligado à forma com que a saliva é ejetada nos tecidos. As ejeções são muito fortes, aparentemente com o intuito de forçar a difusão da saliva e aumentar a área do poço, fazendo com que o fluxo de sangue para o redor das peças bucais seja mantido.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Uma colônia de *O. rostratus* pode ser mantida em laboratório através do uso de camundongos como hospedeiros. Nesse caso, os camundongos seriam um bom modelo experimental e possibilitariam o estudo de características da biologia dos carrapatos, como a identificação de moléculas salivares com uso potencial na indústria farmacêutica. Além disso, diferentes aspectos da interação parasito-hospedeiro e a importância do carrapato como vetor de doenças para vertebrados também poderiam ser abordados, como sua capacidade vetorial de *Rickettsia*.

Os dados apresentados neste trabalho ajudaram a elucidar diferentes aspectos relativos ao ciclo biológico de *O. rostratus* em laboratório, fornecendo várias informações úteis a pesquisadores que trabalhem no campo da biologia de carrapatos argasídeos.

Os resultados encontrados nos estudos do comportamento alimentar através da microscopia intravital e do eletromiograma geraram uma série de informações novas a respeito do processo alimentar de carrapatos argasídeos. A metodologia utilizada permitiu descrever e quantificar os eventos que ocorreram no sítio alimentar e discutir suas funções para a realização da hematofagia. De forma complementar, foi feita a caracterização das fases do processo alimentar, o que gerou descobertas inéditas acerca dos parâmetros alimentares de carrapatos argasídeos.

8. REFERÊNCIAS

- Almeida AP, Marcili A, Leite RC, Nieri-Bastos FA, Domingues LN, Martins JR, Labruna MB 2012. Coxiella symbiont in the tick *Ornithodoros rostratus* (Acari: Argasidae). *Ticks Tick Borne Dis* 3: 203–206.
- Anderson JF, Magnarelli LA 2008. Biology of ticks. *Infect Dis Clin North Am* 22: 195–215.
- Angelakis E, Raoult D 2010. Q fever. In: *Vet. Microbiol.*, pp. 297–309.
- Aragão H 1936. Ixodidas brasileiros e de alguns países limitrophes. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 31: 759–843.
- Araujo RN, Campos IT, Tanaka AS, Santos A, Gontijo NF, Lehane MJ, Pereira MH 2007. Brasiliensin: A novel intestinal thrombin inhibitor from *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera: Reduviidae) with an important role in blood intake. *Int J Parasitol* 37: 1351–1358.
- Araujo RN, Costa FS, Gontijo NF, Goncalves TC, Pereira MH 2009a. The feeding process of *Cimex lectularius* (Linnaeus 1758) and *Cimex hemipterus* (Fabricius 1803) on different bloodmeal sources. *J Insect Physiol* 55: 1151–1157.
- Araujo RN, Gontijo NF, Guarneri AA, Gontijo AF, Soares AC, Pereira MH 2011. Electromyogram of the cibarial pump and the feeding process in hematophagous Hemiptera. In: J. M (Ed.), *Adv. Appl. Electromyogr.*, InTech, Rijeka, pp. 137–158.
- Araujo RN, Pereira MH, Soares AC, Pereira ID, Diotaiuti L, Gontijo NF, Lehane MJ, Guarneri AA 2009b. Effect of intestinal erythrocyte agglutination on the feeding performance of *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera: Reduviidae). *J Insect Physiol* 55: 862–868.
- Araujo RN, Soares AC, Paim RM, Gontijo NF, Gontijo AF, Lehane MJ, Pereira MH 2009c. The role of salivary nitrophorins in the ingestion of blood by the triatomine bug *Rhodnius prolixus* (Reduviidae: Triatominae). *Insect Biochem Mol Biol* 39: 83–89.
- Balashov YS 1972. Bloodsucking ticks (Ixodoidea) - vectors of diseases of man and animals. *Misc Publ Ent Soc Am* 8: 161–376.
- Beck A, Holscher K, Butler J 1986. Life cycle of *Ornithodoros turicata americanus* (Acari: Argasidae) in the laboratory. *J. Med. Entomol.* 23: 313–319.
- Boero J 1957. Las Garrapatas de la República Argentina (Acarina: Ixodoidea). In: *Dep. Ed. Univ. Buenos Aires*,

- Bouchard KR, Wikel SK 2005. Care, Maintenance, and Experimental Infestation of Ticks in the Laboratory Setting. In: Marquardt WC (Ed.), *Biol. Dis. Vectors*, Elsevier, San Diego, pp. 705–712.
- Brumpt E 1915. Biologia de alguns Ixodideos Brasileiros. *Ann Paul Med Cir* 4: 25–29.
- Cançado PH, Piranda EM, Mourao GM, Faccini JL 2008. Spatial distribution and impact of cattle-raising on ticks in the Pantanal region of Brazil by using the CO(2) tick trap. *Parasitol Res* 103: 371–377.
- Dantas-Torres F, Venzal JM, Bernardi LFO, Ferreira RL, Onofrio VC, Marcili A, Bermúdez SE, Ribeiro AF, Barros-Battesti DM, Labruna MB 2012. Description of a New Species of Bat-Associated Argasid Tick (Acari: Argasidae) from Brazil. *J. Parasitol.* 98: 36–45.
- Davis G 1956. A relapsing fever spirochete, *Borrelia mazzottii* (sp. nov.) from *Ornithodoros talaje* from Mexico. *Am. J. Hyg.* 63: 13–17.
- Dickerson G, Lavoipierre MM 1959. Studies on the methods of feeding of blood-sucking arthropods. II. The method of feeding adopted by the bed-bug (*Cimex lectularius*) when obtaining a blood-meal from the mammalian host. *Ann Trop Med Parasitol* 53: 347–357.
- Dworkin MS, Shoemaker PC, Fritz CL, Dowell ME, Anderson DE 2002. The epidemiology of tick-borne relapsing fever in the United States. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 66: 753–758.
- Estrada-Peña A, Jongejan F 1999. Ticks feeding on humans: A review of records on human-biting Ixodoidea with special reference to pathogen transmission. *Exp. Appl. Acarol.* 23: 685–715.
- Estrada-Pena A, Mangold AJ, Nava S, Venzal JM, Labruna M, Guglielmone AA 2010. A review of the systematics of the tick family argasidae (ixodida). *Acarologia* 50: 317–333.
- Friend WG, Smith JJ 1971. Feeding in *Rhodnius prolixus*: mouthpart activity and salivation, and their correlation with changes of electrical resistance. *J Insect Physiol* 17: 233–243.
- Gray JS, Estrada-Peña A, Vial L 2013. Ecology of nidicolous ticks. In: *Biol. Ticks Vol. II*, pp. 39–60.
- Gregson JD 1960. Morphology and Functioning of the Mouthparts of *Dermacentor andersoni* Stiles. *Acta Trop* 17: 48–79.
- Gregson JD 1969. Electrical observations of tick feeding in relation to disease transmission. In: Kiado A (Ed.), *Proceeding 2nd Int. Congr. Acarol.*, Budapest, pp. 329–339.

- Griffin AT, Espinosa M, Nakamatsu R 2012. Q Fever Endocarditis: An Unusual Presentation. *Am. J. Med. Sci.*
- Griffiths RB, Gordon RM 1952. An apparatus which enables the process of feeding by mosquitoes to be observed in the tissues of a live rodent; together with an account of the ejection of saliva and its significance in Malaria. *Ann Trop Med Parasitol* 46: 311–319.
- Guarneri AA, Araujo RN, Diotaiuti L, Gontijo NF, Pereira MH 2011. Feeding performance of *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera: Reduviidae) on habitual hosts: *Thrichomys laurentius* (Rodentia: Echimyidae) and humans. *Vector Borne Zoonotic Dis* 11: 443–445.
- Guarneri AA, Diotaiuti L, Gontijo NF, Gontijo AF, Pereira MH 2000a. Comparison of feeding behaviour of *Triatoma infestans*, *Triatoma brasiliensis* and *Triatoma pseudomaculata* in different hosts by electronic monitoring of the cibarial pump. *J Insect Physiol* 46: 1121–1127.
- Guarneri AA, Diotaiuti L, Gontijo NF, Gontijo AF, Pereira MH 2003. Blood-feeding performance of nymphs and adults of *Triatoma brasiliensis* on human hosts. *Acta Trop* 87: 361–370.
- Guarneri AA, Pereira MH, Diotaiuti L 2000b. Influence of the blood meal source on the development of *Triatoma infestans*, *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma sordida*, and *Triatoma pseudomaculata* (Heteroptera, Reduviidae). *J Med Entomol* 37: 373–379.
- Guglielmone AA, Estrada-Pena A, Keirans JE, Robbins RG 2003. *Tick (Acari: Ixodida) of the Neotropical Zoogeographic Region.*
- Guglielmone AA, Hadani A 1980. Ciclo biológico de “*Ornithodoros rostratus*”. Aragao, 1911, bajo condiciones de laboratorio. *Rev Med Vet* 61: 254–257.
- Hoeppli R, Feng L 1931. Histological reactions in the skin due to ectoparasites. *Dermacentor sinicus* P. Schulze from hedgehog, *Haemaphysalis campanulata hoeppliana* P. Schulze from dog, *Cimex lectularius* and *Pediculus vestimenti* from man. *Natl. Med. J. China* 17: 541–556.
- Hoogstraal H 1985. Argasid and nuttalliellid ticks as parasites and vectors. *Adv Parasitol* 24: 135–238.
- Kashin P, Wakely HG 1965. An insect “bitometer.” *Nature* 208: 462–464.
- Kemp DH, Stone BF, Binnington KC 1982. Tich attachment and feeding: role of the mouthparts, feeding apparatus, salivary gland secretions and the host response. In: Obenchain FD, Galun R (Eds.), *Physiol. ticks*, Pergamon Press, p. 509.
- Khalil G, Hoogstraal H 1981. The life cycle of *Ornithodoros (alectorobius) ambulus* (acari: ixodoidea: argasidae) in the laboratory. *J. Med. Entomol.* 18: 134–139.

- Khan M, Srivastava S 1988. Life-history of *Ornithodoros savignyi* Audouin. *Indian Vet. J.* 65: 192–195.
- Landulfo GA, Pevidor LV, Santos Sampaio J dos, Luz HR, Onofrio VC, Faccini JLH, Barros-Battesti DM 2012. Life cycle of *Ornithodoros mimon* (Acari: Argasidae) under laboratory conditions. *Exp. Appl. Acarol.* 58: 69–80.
- Lavoipierre MM, Dickerson G, Gordon RM 1959. Studies on the methods of feeding of blood-sucking arthropods. I. The manner in which triatomine bugs obtain their blood-meal, as observed in the tissues of the living rodent, with some remarks on the effects of the bite on human volunteers. *Ann Trop Med Parasitol* 53: 235–250.
- Lavoipierre MM, Riek RF 1955. Observations on the feeding habits of argasid ticks and on the effect of their bites on laboratory animals, together with a note on the production of coxal fluid by several of the species studied. *Ann Trop Med Parasitol* 49: 96–113.
- Margalit J, Galun R, Rice MJ 1972. Mouthpart sensilla of the tsetse fly and their function. I. Feeding patterns. *Ann Trop Med Parasitol* 66: 525–536.
- Martins TF, Venzal JM, Terassini F a., Costa FB, Marcili A, Camargo LM a, Barros-Battesti DM, Labruna MB 2014. New tick records from the state of Rondônia, western Amazon, Brazil. *Exp. Appl. Acarol.* 62: 121–128.
- McLean P, Kinsey MG 1964. A Technique for Electronically Recording Aphid Feeding and Salivation. *Nature* 202: 1358–1359.
- Morel P 1969. Ticks from Africa and the Mediterranean Basin. *CIRAD (2003)*: CD – ROM.
- Ogihara MH, Taylor D 2013. Female Reproductive System. In: *Biol. Ticks*, pp. 449–483.
- Oliver JH 1989. Biology and systematics of ticks (Acari: Ixodida). *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 20: 397–430.
- Parola P, Ryeland P, Mangold AJ, Mediannikov A, Guglielmone AA, Raoult D 2011. Relapsing fever *Borrelia* in *Ornithodoros* ticks from Bolivia. *Ann Trop Med Parasitol* 105: 407–411.
- Pound JM, Campbell J B, Andrews RH, Oliver JH 1986. The Relationship between Weights of Nymphal Stages and Subsequent Development of *Ornithodoros Parkeri* (Acari: Argasidae). *J. Med. Entomol.* 23: 320–325.
- Rebaudet S, Parola P 2006. Epidemiology of relapsing fever borreliosis in Europe. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 48: 11–15.
- Ribeiro JM 1987. Role of saliva in blood-feeding by arthropods. *Annu Rev Entomol* 32: 463–478.

- Ribeiro CC, Faccini JL, Cancado PH, Piranda EM, Barros-Battesti DM, Leite RC 2013. Life cycle of *Ornithodoros rostratus* (Acari: Argasidae) under experimental conditions and comments on the host-parasite relationship in the Pantanal wetland region, Brazil. *Exp Appl Acarol*.
- Rice MJ, Galun R, Margalit J 1973. Mouthpart sensilla of the tsetse fly and their function. II. Labial sensilla. *Ann Trop Med Parasitol* 67: 101–107.
- Sanchez-Botija C 1963. Reservoirs of ASFV: a study of the ASFV in arthropods by means of the haemadsorption test. *Bull. Off. Int. des Epizoot.* 60: 895–899.
- Sant’Anna MR, Diotaiuti L, Figueiredo Gontijo A de, Figueiredo Gontijo N de, Pereira MH 2001. Feeding behaviour of morphologically similar *Rhodnius* species: influence of mechanical characteristics and salivary function. *J Insect Physiol* 47: 1459–1465.
- Smith JJ 1979. Effect of diet viscosity on the operation of the pharyngeal pump in the blood-feeding bug *Rhodnius prolixus*. *J Exp Biol* 82: 93–104.
- Smith JJ, Friend WG 1970. Feeding in *Rhodnius prolixus*: responses to artificial diets as revealed by changes in electrical resistance. *J Insect Physiol* 16: 1709–1720.
- Soares AC, Araujo RN, Carvalho-Tavares J, Gontijo ND, Pereira MH 2013. Intravital microscopy and image analysis of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) hematophagy: The challenge of blood intake from mouse skin. *Parasitol Int*.
- Sonenshine DE 1991. The mouthparts and foregut: Capitulum. Pharynx and Esophagus. In: Sonenshine DE (Ed.), *Biol. Ticks*, Oxford University Press, New York, pp. 119–140.
- Sweatman GK, Gregson JD 1970. Feeding electrograms of *Hyalomma aegyptium* ticks at different temperatures. *J Med Entomol* 7: 575–584.
- Tatchell RJ, Carnell R, Kemp DH 1972. Electrical studies on the feeding of the cattle-tick, *Boophilus microplus*. *Z Parasitenkd* 38: 32–44.
- Tizu T, Schumaker S, Barros DM 1995. Life cycle of *Ornithodoros* (*Alectorobius*) *talaje* (Acari: Argasidae) in laboratory. *J. Med. Entomol.* 32: 249–254.
- Venzal JM, Estrada-Pena A 2006. Larval feeding performance of two Neotropical *Ornithodoros* ticks (Acari: Argasidae) on reptiles. *Exp Appl Acarol* 39: 315–320.
- Venzal JM, Onofrio VC, Barros-Battesti DM, Arzua M 2006. Família Argasidae: características gerais, comentários e chaves para gêneros e espécies. In: Barros-Battesti DM, Arzua M, Bechara GH (Eds.), *Carrapatos Importância Médico-Veterinária da Região Neotrop.*, Vox/ICTTD-3/Butantan, São Paulo, pp. 13–27.
- Vial L 2009. Biological and ecological characteristics of soft ticks (Ixodida: Argasidae) and their impact for predicting tick and associated disease distribution. *Parasite J.* 16: 191–202.

Waladde SM, Kemp DH, Rice MJ 1979. Feeding electrograms and fluid uptake measurements of cattle tick *Boophilus microplus* attached on artificial membranes. *Int J Parasitol* 9: 89–95.

9. ANEXO

Certificado CEUA

From : CEUA <ceua@prpq.ufmg.br>

Tue, Nov 05, 2013 10:09 AM

Subject : Certificado CEUA

To : rmaraujo@icb.ufmg.br



UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 301 / 2013, relativo ao projeto intitulado "Estudo do ciclo biológico e de parâmetros alimentares de *Ornithodoros rostratus* (Acari: Argasidae) em hospedeiros mamíferos", que tem como responsável Ricardo Nascimento Araujo, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 05/11/2013. Este certificado expira-se em 05/11/2018.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº. 301 / 2013, related to the Project entitled "Study of the life cycle and the feeding parameters of *Ornithodoros rostratus* (Acari: Argasidae) on mammal hosts", under the supervision of Ricardo Nascimento Araujo, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 05/11/2013. This certificate expires in 05/11/2018.

FRANCISNETE GRACIANE ARAUJO MARTINS

Coordenador(a) da CEUA/UFMG

Belo Horizonte, 05/11/2013.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/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) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592

www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br