

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

Ana Carolina Marinho dos Santos

AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO ALIMENTAR DE *Amblyomma sculptum*
BERLESE, 1888 (ACARI: IXODIDAE) EM CAMUNDONGOS

Belo Horizonte

2018

Ana Carolina Marinho dos Santos

AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO ALIMENTAR DE *Amblyomma sculptum*
BERLESE, 1888 (ACARI: IXODIDAE) 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. Área de concentração: Entomologia.

Orientador: Dr. Maurício Roberto Viana Sant'Anna

Co-orientador: Dr. Marcos Horácio Pereira

Belo Horizonte

2018

- 043 Santos, Ana Carolina Marinho dos.
Avaliação do comportamento alimentar de *Amblyomma sculptum* Berlese, 1888 (Acari: Ixodidae) em camundongos [manuscrito] / Ana Carolina Marinho dos Santos. - 2018.
65 f. : il. ; 29,5 cm.
- Orientador: Dr. Maurício Roberto Viana Sant'Anna. Co-orientador: Dr. Marcos Horácio Pereira.
- Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós- Graduação em Parasitologia.
1. Parasitologia. 2. Carrapatos. 3. Comportamento Alimentar. 4. Eletromiografia. I. Sant'Anna, Maurício Roberto Viana. II. Pereira, Marcos Horácio. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 576.88/.89



Universidade Federal de Minas Gerais



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Parasitologia

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Ana Carolina Marinho dos Santos

386/2018/12
entrada
1º/2016
2016660265

Às quatorze horas do dia 30 de agosto do ano de 2018, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: **“Avaliação do comportamento alimentar de *Amblyomma sculptum* BERLESE, 1888 (ACARI: IXODIDAE) em camundongos”** área de concentração: **Entomologia**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, **Dr. Mauricio Roberto Viana Sant'Anna**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao (a) candidato (a), para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do (a) candidato (a). Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do (a) candidato (a) e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dr. Mauricio Roberto Viana Sant'Anna	UFMG	APROVADA
Dra. Adriana Coelho Soares	UNI-BH	APROVADA
Dr. Gustavo Fontes Paz	CPqRR/FIOCRUZ	APROVADO
Dr. Marcos Horácio Pereira	UFMG	APROVADO

Expedição do resultado final.

CONSIDERAÇÕES GERAIS – SOBRE TESE APRESENTADA PELO (A) O (A) CANDIDATO (A):

Exigências	
Recomendações	
Sugestões	As sugestões foram passadas diretamente à estudante.

Pelas indicações, o (a) candidato(a) foi considerado(a): APROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente ao(a) candidato(a) pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 30 de agosto de 2018.

Dr. Mauricio Roberto Viana Sant'Anna

(Orientador)

Dra. Adriana Coelho Soares

Dr. Gustavo Fontes Paz

Dr. Marcos Horácio Pereira

(Co-orientador)

Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador

Prof. Ricardo Augusto Fujimori
Prof. Ricardo Augusto Fujimori
Coordenador do Programa
Pós-Graduação em Parasitologia
UFMG

*Aos meus pais, por todo amor, apoio e carinho,
sempre.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, por todas as bênçãos concedidas em minha vida e, pela saúde, força, oportunidade e determinação para que esse estudo fosse realizado.

Ao meu orientador, Professor Maurício Roberto Viana Sant'Anna, não só pelos anos de orientação, como também pela oportunidade de aprendizado, paciência e incentivo.

Ao meu co-orientador, Professor Marcos Horácio Pereira, pelos ensinamentos, atenção e ideias que ajudaram a construir esse trabalho.

Aos demais professores do Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos - LFIH, Nelder, Ricardo, Grasi e Léo, pelo apoio no laboratório.

Aos técnicos do LFIH, Márcia e César. A ajuda de vocês foi essencial para a realização deste trabalho

Aos alunos que fazem parte do LFIH, pelos anos de convivência e companheirismo.

Aos amigos e companheiros da “Turma do Peru” que contribuíram para essa jornada. Em especial ao “Clã da Parasito”, pela amizade, carinho, apoio, idas ao BK, melhores coreografias de “*funk*” e melhores rolês. Dani, Willi, Gui e Diogo, vocês fizeram esses anos serem ainda mais especiais, amo vocês!

Aos Professores da Parasitologia e ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do ICB/UFMG, em especial à Sumara e Sibebe, pela disponibilidade, ajuda e carinho.

Aos meus amigos e familiares que estão em Maceió e, ainda assim ao meu lado, por cada palavra de incentivo, por todo o apoio e pelas boas vibrações.

Aos amigos que tive a oportunidade de conhecer aqui em BH, que vieram da UFMG, sejam de outras turmas do PPG em Parasitologia ou até mesmo de outros cursos, assim como os que vieram por fora.

À Thais e Kátia pelas boas gargalhadas, pelas comidas e palavras de apoio. Vocês são as melhores “Maridas” do mundo.

Ao Dani, que com seu carinho, amor e uma pequena dose de loucura soube bem quando me dar apoio, comida e momentos de distrações. Amo-te eu!

E por fim, aos meus pais, pelo apoio à minha decisão de dar continuidade aos meus estudos, mesmo tendo que estar longe de casa, pela paciência durante meus momentos de “*stress*” e por todo amor e carinho, sempre. Pois, minhas conquistas/felicitações não são somente minhas, são nossas!

*“Mesmo quando tudo parece desabar, cabe a mim
decidir entre rir ou chorar, ir ou ficar, desistir ou
lutar; porque descobri, no caminho incerto da vida,
que o mais importante é o decidir.”*

Cora Coralina

RESUMO

O *Amblyomma sculptum* é um ácaro ixodídeo que possui distribuição desde as áreas úmidas do Norte da Argentina, Bolívia, Paraguai até áreas periamazônicas no Brasil. O *A. sculptum* é uma das seis espécies pertencentes ao complexo *Amblyomma cajennense*, sendo esta espécie a de maior distribuição entre os estados brasileiros, apresentando grande importância por se tratar do principal vetor da *Rickettsia rickettsii*, bactéria responsável por causar a Febre Maculosa Brasileira (FMB) a qual acomete os seres humanos. Apesar de existirem trabalhos relativos ao comportamento alimentar de carrapatos pertencentes à família Ixodidae, e utilizando a técnica de eletropenetrograma, o número de estudos acerca do assunto ainda é reduzido e, em se tratando do *A. sculptum*, até então, na literatura, não existe nenhum tipo de informação a respeito de seu comportamento alimentar por meio desta técnica. Desse modo, o presente trabalho tem por objetivo estudar detalhadamente o processo alimentar de ninfas e fêmeas de *A. sculptum*, em condições de laboratório, quando alimentadas em camundongos nas diferentes fases que ocorrem ao longo de todo o processo alimentar do artrópode. Para tal avaliação, foi utilizada a técnica de eletromiograma para captura de sinais elétricos que são emitidos pelo carrapato durante o processo alimentar. A análise do perfil da atividade elétrica da bomba faríngea permitiu identificar três eventos durante a hematofagia: sucção, salivação e inatividade. Esses eventos foram agrupados de acordo com o que foi visto na análise, minuto a minuto, permitindo, assim, caracterizar quatro grupos de eventos para fêmeas: Sucção-Salivação-Inatividade, Salivação-Inatividade, Sucção-Salivação e Sucção; e três para as ninfas: Sucção-Salivação, Salivação-Inatividade e Inatividade. Além disso, foram determinados os eventos predominantes, por dia de alimentação, e a frequência de sucção predominante. Os resultados obtidos trazem, assim, novas informações sobre os aspectos alimentares de *A. sculptum* em um hospedeiro vertebrado em condições de laboratório.

Palavras-chave: *Amblyomma sculptum*. Comportamento alimentar. Eletromiograma.

ABSTRACT

Amblyomma sculptum is an ixodid tick with wide distribution in the Americas, found from humid areas of northern Argentina, Bolivia, Paraguay to periamazonic areas in Brazil. *A. sculptum* is one of the six species belonging to the *Amblyomma cajennense* complex, with the broadest distribution among Brazilian states within the complex, being also important because it is the main vector of Brazilian Spotted Fever (BSF), which affects humans. Although there are studies related to the feeding behavior of ticks belonging to the Ixodidae family, and using the technique of electropenetrography, the number of studies about the subject is still reduced and, in the case of *A. sculptum*, until now, in the literature, there is no information about the feeding behavior using a similar technique. Thus, the present work aims to study in detail the feeding process of *A. sculptum* nymphs and females under laboratory conditions, when fed to mice at the different stages that occur throughout the entire food process of the arthropod. To this end, the electromyogram technique was used to capture the electrical signals produced by the tick during the feeding process. The analysis of the electrical activity profile of the pharyngeal pump allowed us to identify three events during haematophagy: suction, salivation and inactivity. These events were grouped during the analysis and four groups of events were characterized for females: Suction-Salivation-Inactivity, Salivation-Inactivity, Suction-Salivation and Suction, whereas three were observed for nymphs: Suction-Salivation, Salivation-Inactivity, and Inactivity. In addition, we determined the predominant event per day of feeding and the suction frequency. These results provided new information about the *A. sculptum* feeding in a vertebrate host under laboratory conditions.

Key words: *Amblyomma sculptum*. Feeding behaviour. Electromyogram.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Distribuição das seis espécies do complexo *Amblyomma cajennense* de acordo com os espécimes examinados a partir de três coleções de carrapatos (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Estación Experimental Agropecuaria Rafaela, Argentina; Coleção Nacional de Carrapatos da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Brasil; U.S. National Tick Collection, U.S.A)..... 16
- Figura 2** - Ciclo biológico trioxeno de *Amblyomma sculptum*..... 19
- Figura 3** - Câmara de alimentação (seta) fixadas no dorso (A) do camundongo *Swiss* e acondicionamento dos carrapatos para a técnica de eletromiograma (B) 27
- Figura 4** - Esquema da montagem experimental para realização da técnica de eletromiograma, onde os sinais elétricos gerados, durante o tempo de fixação do carrapato em busca do repasto sanguíneo no hospedeiro, foram captados e armazenados. Seta: eletrodos; AMP: amplificador; F: filtro; PAQ: placa de aquisição..... 28
- Figura 5** - Gráficos gerados no *software* MATLAB 6que indicam a existência de duas frequências prevalentes de aproximadamente 5 e 7 Hz (setas), sendo uma relativa à sucção de alta frequência (A e C), e outra relativa à sucção de baixa frequência (A e E). Nos respectivos espectrogramas (B, D e F),é possível observar a faixa que indica a frequência fundamental ao longo do tempo (setas). Também podem ser observadas as frequências harmônicas (E) e suas faixas no espectrograma (F)..... 32
- Figura 6** - Sinais elétricos, gerados durante o processo alimentar, a partir dos quais foi possível caracterizar as duas frequências de sucção, sendo elas: Sucção de Alta Frequência (A) e Sucção de Baixa Frequência (A, B, C e D), que apresentam picos regulares (B e D) ou irregulares (A e C). Sinais de Salivação clássicos (A, C, D e E) e Salivação X (D); e Inatividade (E) 34
- Figura 7** - Grupos de eventos observados ao longo do processo alimentar de fêmeas de *A. sculptum* nos dias de alimentação: 1: Sucção-Salivação-Inatividade (A),

Inatividade-Salivação (B) e Sucção-Salivação (C); 3:Sucção-Salivação (D) e Sucção(E); 6: Sucção-Salivação (F) e Sucção (G); e 9: Sucção-Salivação (H).... 39

- Figura 8 -** Percentual de eventos presentes, por minuto, durante o processo alimentar de fêmeas de *A. sculptum*, nos dias 1, 3, 6 e 9 após fixação ao hospedeiro.
*Diferença estatística entre os grupos ($p<0,05$; Qui quadrado)..... 41
- Figura 9 -** Percentual de eventos predominantes, por minuto, durante o processo alimentar de fêmeas de *A. sculptum*, nos dias 1, 3, 6 e 9 após fixação ao hospedeiro.
*Diferença estatística entre os grupos ($p<0,05$; Qui quadrado)..... 42
- Figura 10 -** Percentual das frequências de sucção, por minuto, durante o processo alimentar de fêmeas de *A. sculptum*, nos dias 1, 3, 6 e 9 após fixação ao hospedeiro.
*Diferença estatística entre os grupos ($p<0,05$; Qui quadrado)..... 43
- Figura 11 -** Grupos de eventos observados ao longo do processo alimentar de ninfas de *A. sculptum* nos dias de alimentação: 1: Sucção-Salivação (A); 2: Sucção-Salivação (B), Inatividade-Salivação (C) e Inatividade (D); 3:Sucção-Salivação (E); 4: Sucção-Salivação (F)..... 47
- Figura 12 -** Percentual de eventos presentes, por minuto, durante o processo alimentar de ninfas de *A. sculptum*, nos dias 1, 2, 3 e 4 após fixação ao hospedeiro.
*Diferença estatística entre os grupos ($p<0,05$; Qui quadrado)..... 49
- Figura 13 -** Percentual de eventos predominantes, por minuto, durante o processo alimentar de ninfas de *A. sculptum*, nos dias 1, 2, 3 e 4 após fixação ao hospedeiro.
*Diferença estatística entre os grupos ($p<0,05$; Qui quadrado)..... 50
- Figura 14 -** Percentual das frequências de sucção , por minuto, durante o processo alimentar de ninfas de *A. sculptum*, nos dias 1, 2, 3 e 4 após fixação ao hospedeiro.
*Diferença estatística entre os grupos ($p<0,05$; Qui quadrado)..... 51
- Figura 15 -** Peso final das ninfas de acordo com o sexo do estágio adulto a que deram origem. A barra horizontal significa diferença estatística entre os grupos ($p<0,05$; Teste de Mann-Whitney)..... 53

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Dados referentes aos quatro grupos experimentais, compostos por fêmeas adultas de *A. sculptum*, cujo processo alimentar foi monitorado por eletromiograma 30
- Tabela 2** - Dados referentes aos quatro grupos experimentais, compostos por ninfas de *A. sculptum*, cujo processo alimentar foi monitorado por eletromiograma..... 31
- Tabela 3** - Eventos observados, minuto a minuto, ao longo do processo alimentar de fêmeas de *Amblyomma sculptum* 36
- Tabela 4** - Eventos predominantes, observados minuto a minuto, ao longo do processo alimentar de fêmeas de *Amblyomma sculptum* 36
- Tabela 5** - Frequências de sucção predominantes, observadas minuto a minuto, ao longo do processo alimentar de fêmeas de *Amblyomma sculptum* 37
- Tabela 6** - Eventos observados, minuto a minuto, ao longo do processo alimentar de ninfas de *Amblyomma sculptum*..... 44
- Tabela 7** - Eventos predominantes, observados minuto a minuto, ao longo do processo alimentar de ninfas de *Amblyomma sculptum*..... 44
- Tabela 8** - Frequências de sucção predominantes, observadas minuto a minuto, ao longo do processo alimentar de ninfas de *Amblyomma sculptum*..... 45
- Tabela 9** - Parâmetros alimentares de ninfas de *Amblyomma sculptum* alimentadas em camundongos e submetidas ao eletromiograma 52
- Tabela 10** - Parâmetros relativos às mudas das ninfas de *Amblyomma sculptum*..... 52

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	Difosfato de Adenosina
AMP	Monofosfato de Adenosina
cm	Centímetro
DP	Desvio Padrão
Fig	Figura
FMB	Febre Maculosa Brasileira
GP	Ganho de Peso
Hz	Hertz
Inat	Inatividade
kg	Kilograma
µL	Microlitros
mg	Miligrama
min	Minutos
mL	Mililitros
mV	Milivolts
nm	Nanômetros
PBS	Tampão Fosfato Salino
PF	Peso Final
PI	Peso Inicial
s	Segundos
Sal	Salivação
Suc	Sucção
TTC	Tempo Total de Contato

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	15
1.1.	Família Ixodidae, Complexo <i>Amblyomma cajennense</i> e <i>Amblyomma sculptum</i>	15
1.2.	Importância Médico-Veterinária	17
1.3.	Ciclo Biológico de <i>Amblyomma sculptum</i>	18
1.3.	Hematofagia	20
1.4.	Eletropenetrograma e Eletromiograma	22
2.	JUSTIFICATIVA.....	24
3.	OBJETIVOS	25
3.1.	Objetivo Geral	25
3.2.	Objetivos Específicos.....	25
4.	METODOLOGIA	26
4.1.	Manutenção da Colônia de <i>Amblyomma sculptum</i> em Laboratório.....	26
4.2.	Preparo dos Camundongos e Carrapatos Utilizados na Técnica de Eletromiograma	26
4.3.	Eletromiograma.....	27
4.4.	Análise dos Dados Gerados no Eletromiograma	28
4.5.	Análise Estatística	29
4.6.	Comitê de Ética.....	29
4.7.	Delineamento Experimental.....	29
5.	RESULTADOS.....	32
5.1.	Caracterização das Frequências Fundamentais por Meio do MATLAB 6	32

5.2. Descrição e Identificação dos Sinais Elétricos Presentes nos Eletromiogramas Relacionados ao Processo Alimentar de Ninfas e Fêmeas de <i>Amblyomma sculptum</i>	33
5.3. Caracterização do Processo Alimentar de Fêmeas de <i>Amblyomma sculptum</i>	35
5.4. Caracterização do Processo Alimentar de Ninfas de <i>Amblyomma sculptum</i>	44
5.5. Parâmetros Alimentares e Relativos às Mudanças das Ninfas de <i>Amblyomma sculptum</i>	52
6. DISCUSSÃO	54
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
ANEXO	65
ANEXO A	65

1. INTRODUÇÃO

1.1. Família Ixodidae, Complexo *Amblyomma cajennense* e *Amblyomma sculptum*

Os carrapatos pertencem à classe Arachnida e estão divididos em duas principais famílias: Ixodidae, com aproximadamente 700 espécies, e Argasidae, que é composta por aproximadamente 180 espécies (Barros-Battestiet al., 2006). Existe ainda uma terceira família, Nuttalliellidae, que possui apenas uma espécie: *Nuttalliella namaqua* (Keirans, 2009). Os Ixodidae apresentam características, como o dimorfismo sexual, onde os machos, que são menores em tamanho, apresentam um escudo que recobre toda a sua área dorsal, enquanto as fêmeas apresentam um escudo limitado ao terço anterior do dorso; a presença de um hipóstomo apical; uma alimentação que ocorre por um longo período de tempo; a capacidade de ingerir até mais de cem vezes o seu peso e concentrar o sangue ingerido por meio da excreção do excesso de água através de suas glândulas salivares. Por outro lado, os argasídeos apresentam um tegumento coriáceo, sem a presença de escudo; hipóstomo ventral, no terço anterior do corpo; alimentação que ocorre em curtos períodos de tempo e a concentração do sangue ingerido no repasto que se dá pela excreção de água através das glândulas coxais (Szabó et al., 2013).

No Brasil, os ixodídeos estão representados pelos gêneros *Dermacentor*, *Rhipicephalus*, *Ixodes*, *Haemaphysalis* e *Amblyomma*. A espécie *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787), pertencente à família Ixodidae (carrapatos de corpo duro), foi descrita pela primeira vez na cidade de Cayena, na Guiana Francesa, e encontra-se distribuída por todo continente americano, desde o Sul dos Estados Unidos, América Central até o Norte da Argentina (Barros-Battesti et al., 2006). Estudos recentes, realizando análises morfológicas e ferramentas moleculares, propuseram que o carrapato, até então denominado *Amblyomma cajennense*, não era uma espécie, e sim, um complexo constituído por seis espécies distintas de carrapatos, sendo elas: *A. cajennense* (senso stricto), *Amblyomma mixtum*, *Amblyomma sculptum*, *Amblyomma tonelliae*, *Amblyomma interandinum* e *Amblyomma patinoi* (Beati et al., 2013; Nava et al., 2014; Estrada-Peña et al., 2014). Cada espécie possui distribuição geográfica distinta, como pode ser observado na Figura 1, onde o *A. cajennense* somente é encontrado na região Amazônica da América do Sul, incluindo Venezuela, Guianas e os

estados do Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins no Brasil. A espécie *A. interandinum* ocorre no Peru; *A. mixtum* é encontrado do Texas (EUA) ao oeste do Equador; *A. patinoi* foi descrita somente na Colômbia; *A. tonelliae* está distribuída nas áreas secas da região do Chaco no centro norte da Argentina, Bolívia e Paraguai e *A. sculptum*, distribuído desde áreas úmidas do Norte da Argentina, Bolívia, Paraguai até áreas periamazônicas no Brasil, englobando os estados do Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Pernambuco, Piauí, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Goiás (Nava et al., 2014).



Figura 1 – Distribuição das seis espécies do complexo *Amblyomma cajennense* de acordo com os espécimes examinados a partir de três coleções de carrapatos (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Estación Experimental Agropecuaria Rafaela, Argentina; Coleção Nacional de Carrapatos da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Brasil; U.S. National Tick Collection, U.S.A). **Amblyomma cajennenses* s.; † *Amblyomma tonelliae* n. sp.; ¥ *Amblyomma interandinum* n. sp.; # *Amblyomma patinoi* n. sp.; ■ *Amblyomma mixtum*; 0 *Amblyomma sculptum*. X, registro de *A. sculptum* no Departamento de Beni, Bolívia, localidade desconhecida. Fonte: Nava et al., 2014.

Como dito anteriormente, apenas duas espécies do complexo *A. cajennense* são relatadas no Brasil, sendo o *A. sculptum* a espécie de maior distribuição entre os estados brasileiros, apresentando grande importância por se tratar do principal vetor da bactéria *Rickettsia rickettsii*, agente etiológico da Febre Maculosa Brasileira (FMB), a qual acomete seres humanos (Bitencourth et al., 2016).

No estágio larval, o *A. sculptum* é denominado de “micuim” ou “carrapato pólvora”, já as ninfas são conhecidas como “carrapatinho”, “carrapato vermelho” ou “vermelhinho” e, na fase adulta, recebem o nome popular de “carrapato-do-cavalo”, “rodoleiro” ou “carrapato-estrela” (Aragão, 1936; Pereira & Labruna, 1998; Rodrigues et al., 2015).

Os principais hospedeiros para todos os estágios parasitários dessa espécie de carrapato são equinos, capivaras e antas, porém, estes, apresentam baixa especificidade parasitária, especialmente nas fases imaturas. Desta forma, outras espécies de animais também podem servir como seus hospedeiros, dentre elas estão o boi, carneiro, cabra, cão, porco, veado, cachorro do mato, coelho, cotia, quati, tatu, tamanduá e até mesmo o homem (Aragão, 1936; Pereira & Labruna, 1998).

1.2. Importância Médico-Veterinária

Em áreas urbanas e rurais, próximas às coleções de água, a presença de capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) e do carrapato *Amblyomma cajennense* tem sido um fator de risco importante para a ocorrência da transmissão ativa da bactéria causadora da FMB (Szabó et al., 2013). A FMB é reconhecida devido a sua alta letalidade nas Américas (Pereira & Labruna, 1998; Rodrigues et al., 2015). De acordo com dados do Ministério da Saúde, entre os anos 2000 e 2016, foram notificados 1673 casos de FMB em todo o território nacional, dos quais 460 evoluíram para óbito, apresentando uma letalidade de 27,5% (Brasil, 2017).

Infestações pelo *A. sculptum* ocasionam importantes perdas econômicas na indústria, quer seja pela depreciação do couro ou pela redução da produtividade animal, além dos gastos com carrapaticidas e assistência médico-veterinária, levando também a perda de animais devido aos hemoparasitas transmitidos (Prata et al., 1996; Guglielmone et al., 2004).

Em humanos, o parasitismo ocorre muitas vezes em massa, e tem como resposta reações de hipersensibilidade a antígenos específicos presentes na saliva do carrapato, causando intenso prurido, que persiste por longos dias no local da picada, e a formação de uma lesão granulomatosa, que leva meses para cicatrizar. Além disso, o ato de coçar as feridas intensamente pode levar a infecções bacterianas secundárias, devido à deposição de bactérias no local da picada (Aragão & Fonseca, 1961; Guimarães et al., 2001).

No Brasil, há evidências que sugerem que a *Theileria equi* também possa ser transmitida pelo *Amblyomma cajennense* (Kerber et al., 2009), entretanto, os estudos experimentais mostram resultados negativos (Ribeiro, Silveira, Bastos, 2011).

1.3. Ciclo Biológico de *Amblyomma sculptum*

A. sculptum é uma espécie de carrapato que necessita de três hospedeiros para completar seu ciclo, possuindo, assim, um ciclo de vida trioxeno (Fig. 2). Com isso, a fêmea ingurgitada (completamente alimentada), denominada teleógina, ao se desprender do hospedeiro, cai no solo, preferencialmente nos horários mais frescos do dia, como no início da manhã ou final da tarde e início da noite. Nesse ambiente a teleógina busca um local protegido para a realização da postura dos ovos. Finalizada a postura, a teleógina morre, e por meio dos seus ovos, inicia-se uma nova infestação naquele ambiente. Dos ovos eclodem as larvas que, ao atingirem a maturação, sobem na vegetação e ali permanecem, em aglomerados, à espreita de algum potencial hospedeiro e, ao entrarem em contato com esse animal, permanecem fixadas a ele por três a seis dias. No hospedeiro, essas larvas realizam o repasto sanguíneo até ficarem completamente ingurgitadas. Depois, as larvas se desprendem e voltam ao solo em busca de um local seguro para realização da ecdise (muda) que ocorre entre 18 a 26 dias. Após a primeira ecdise, surgem as ninfas, que, assim como as larvas, vão subir na vegetação e ficar na espera de algum hospedeiro. Essas ninfas também podem realizar busca ativa por hospedeiros, percorrendo curtas distâncias sobre o solo. Ao entrarem em contato com o hospedeiro, essas ninfas permanecem fixadas por cinco a sete dias, realizando o repasto sanguíneo. Após o ingurgitamento, as ninfas se desprendem do animal e, no solo, realizam a segunda ecdise, que ocorre entre 23 e 25 dias, dando origem às formas adultas sexuadas (Aragão, 1936; Pereira & Labruna, 1998; Rodrigues et al., 2015).

Os adultos, assim como as larvas e ninfas, também possuem o hábito de subir nas folhas, permanecendo ali à espreita de um hospedeiro. Mas, ao detectar a presença de um animal, também podem caminhar sobre o solo e realizar busca ativa por ele. Ao encontrar um hospedeiro, machos e fêmeas se fixam no animal, iniciando o repasto sanguíneo e também a cópula. A fêmea, após o completo ingurgitamento, que ocorre entre sete a dez dias após sua fixação, se desprende do animal, caindo sobre o solo, dando início a um novo ciclo de vida. Enquanto isso, o macho permanece fixado ao hospedeiro, por um período mais longo, à espera de outras fêmeas para fecundá-las (Aragão, 1936; Pereira & Labruna, 1998; Rodrigues et al., 2015).

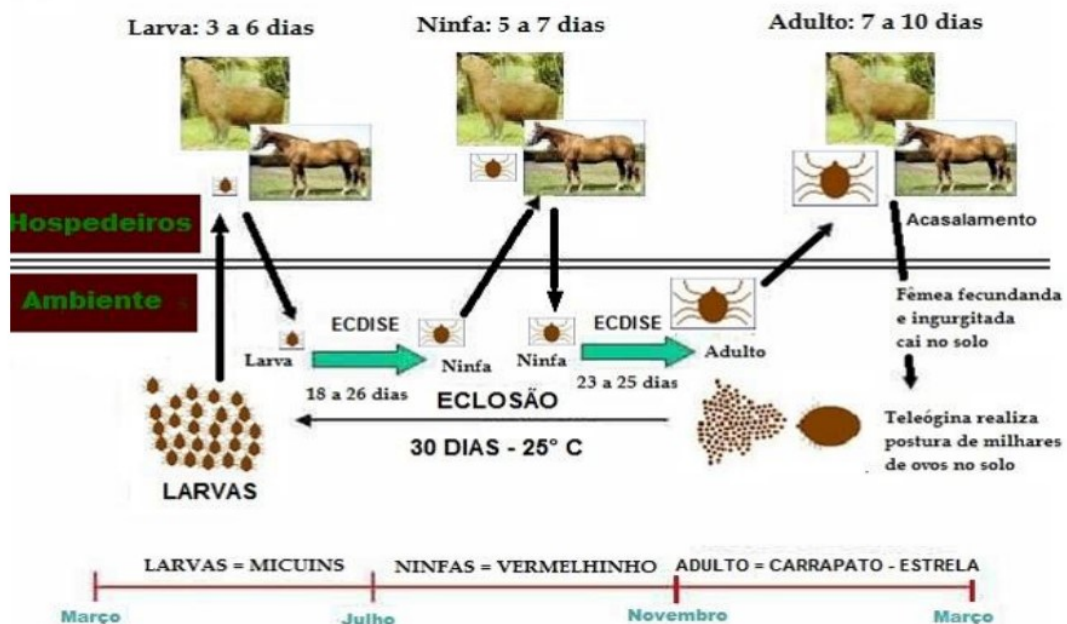


Figura 2 – Ciclo biológico trioxeno de *Amblyomma sculptum*, onde a fêmea ingurgitada cai ao solo e realiza a postura dos ovos. Destes, eclodem as larvas que, ao atingirem a maturação, ficam à espreita de algum hospedeiro ao qual permanecem fixadas, por três a seis dias, se alimentando. Após o ingurgitamento, as larvas caem ao solo para a realização da ecdise, dando origem as ninfas que, assim como as larvas, ficam na espera de algum hospedeiro ao qual permanecem fixadas, por cinco a sete dias, realizando o repasto sanguíneo. Após o ingurgitamento, as ninfas se desprendem do hospedeiro e realizam a segunda ecdise dando origem as formas adultas sexuadas. Estes, também possuem o hábito ficar à espreita de um hospedeiro, mas, ao detectar a presença de um animal, também podem realizar busca ativa por ele, ao qual se fixam iniciando o repasto sanguíneo e também a cópula. Modificado de Pereira e Labruna (1998).

1.4. Hematofagia

Os carrapatos são artrópodes hematófagos obrigatórios e, por isso, são o segundo maior vetor de agentes causadores de doenças em humanos, ficando atrás apenas dos mosquitos. Os mesmos são os artrópodes de maior importância veterinária por transportarem e transmitirem patógenos a animais. Carrapatos pertencentes à família Ixodidae permanecem associados aos seus hospedeiros durante longos períodos até completarem o repasto sanguíneo, o que pode chegar a aproximadamente 30 dias (Chen et al., 2010).

O processo hematofágico consiste em três etapas principais: a penetração das peças bucais na pele do hospedeiro, a localização do vaso sanguíneo e a ingestão de sangue pelo artrópode (Lehane, 2005). A evolução da hematofagia, nos insetos, pode ser observada pelas diferentes peças bucais que são utilizadas durante o processo alimentar. Estas peças bucais podem ser adaptadas tanto para perfurar a pele do hospedeiro, como para formar canais que possibilitem a ingestão do sangue e a secreção da saliva, de modo a otimizar o processo e diminuir o risco do artrópode ser percebido e morto, de modo a utilizar duas estratégias para a realização do repasto sanguíneo. A primeira é a solenofagia, na qual a abertura do canal alimentar é colocada dentro dos vasos sanguíneos, podendo ser comparada à canulação de um vaso por uma agulha de seringa, como ocorre em barbeiros, piolhos, pulgas e mosquitos. A segunda estratégia é a telmofagia, que consiste na dilaceração da epiderme e da derme do hospedeiro, por peças bucais curtas e rígidas, formando uma pequena poça de sangue e células, no sítio alimentar. A ação da penetração e movimentação das peças bucais, que são adaptadas para rasgar, dilacerar ou cortar a pele do hospedeiro, levam ao rompimento dos vasos e ao extravasamento de sangue no local. Estas peças bucais são encontradas em flebotomíneos, tabanídeos, simulídeos, moscas picadoras e carrapatos (Lehane, 2005; Araújo et al., 2012).

Durante a evolução da hematofagia que ocorreu várias vezes nos mais de 400 gêneros de artrópodes hematófagos descritos, fora, selecionadas moléculas salivares que atuam combatendo a hemostasia dos hospedeiros vertebrados (agregação plaquetária, vasoconstrição e coagulação sanguínea), além de compostos anti-inflamatórios e imunomoduladores (Ribeiro, 1995). Exemplos são os vasodilatadores identificados na saliva do carrapato bovino *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Inokuma et al., 1994) e no carrapato *Ixodes scapularis* (Valenzuela, 2005). Para inibir a agregação plaquetária, que é a

primeira linha de defesa contra a perda de sangue, e serve como uma espécie de molde para a cascata de coagulação sanguínea, vários artrópodes hematófagos utilizam enzimas com atividade apirásica, como o argasídeo *Ornithodoros moubata* (Ribeiro et al., 1991). Estas enzimas quebram o Difosfato de Adenosina (ADP), responsável pela ativação das plaquetas, em Monofosfato de Adenosina (AMP), inibindo, assim, sua agregação (Valenzuela, 2005). Já inibidores da cascata de coagulação foram identificados nos carrapatos *Amblyomma cajennense*, como o inibidor do fator Xa (Batista et al., 2010), e em *R. (B.) microplus*, no qual foi identificado um inibidor de trombina (Ciprandi et al., 2006).

A resposta inflamatória representa uma ameaça aos artrópodes hematófagos, uma vez que a ela é uma resposta localizada à injúria, se tornando maléfica para o carrapato, prejudicando o sucesso do repasto. Já foi descrito, na saliva de *I. scapularis*, um antagonista da bradicinina, que é o hormônio responsável pela dor (Ribeiro & Mather, 1998). Inibidores da resposta imune foram descritos nas espécies *Ixodes ricinus* (Hannier et al., 2004) e *Hyalomma asiaticum asiaticum* (Yu et al., 2006). Elas possuem inibidores de células B que atuam nas respostas de anticorpos específicos anticarrapato, responsáveis por causar rejeição pelo hospedeiro. Já a espécie *I. scapularis* possui uma proteína salivar capaz de inibir células T resultantes da redução da produção de interleucina-2 (Anguita et al., 2002). Além disso, inibidores do sistema complemento humano já foram descritos na saliva de *I. scapularis* (Valenzuela et al., 2000), *I. ricinus* (Daix et al., 2007), *A. cajennense* (Franco et al., 2016) e *R. (B.) microplus* (Silva et al., 2016), uma vez que proteínas do complemento, ativas no soro do sangue ingerido, podem danificar as células do intestino destes ácaros.

Recentemente, nosso grupo de pesquisa realizou um estudo que consistiu na análise do comportamento alimentar de *Ornithodoros rostratus* (Acari: Argasidae) em camundongos. Nele, os autores, através de eletromiograma e microscopia intravital, descreveram detalhadamente as fases de alimentação deste carrapato (Costa et al., 2016). O comportamento alimentar de ixodídeos tem sido pouco abordado, como em trabalhos relevantes publicados ainda nas décadas de 60 e 70. Alguns estudos em ixodídeos foram realizados a partir da análise dos sinais elétricos gerados durante seu processo alimentar. Em 1970, Sweatman & Gregson observaram as diferenças no comportamento alimentar de *Hyalomma aegyptium*, em tartaruga e coelho, sob temperaturas ambientais variadas. Naquele estudo, os pesquisadores realizaram o eletrograma da musculatura da bomba de sucção, durante o repasto sanguíneo do carrapato, e, por meio da emissão dos sinais elétricos, os autores observaram eventos como: período de inativação, atividade da bomba faríngea, ejeção da saliva, ação da saliva durante o

período de sucção e um ciclo de eventos envolvendo variações relativas à injeção de saliva. Em 1972, Tatchell et al. observaram o comportamento alimentar de *R. (B.) microplus* por meio dos sinais elétricos emitidos durante o repasto sanguíneo. Nesse estudo, os autores caracterizaram sinais como: inatividade, sucção, salivação e outros padrões que não foram identificados pelos mesmos. Sweatman et al. (1976) fizeram uso do eletrograma durante o repasto sanguíneo de *Hyalomma dromedarii* em um bovino. Em 1979, Waladde et al. descreveram o processo alimentar de *R. (B.) microplus*, em alimentador artificial, onde foram observadas variações no comportamento alimentar do carrapato por meio dos sinais elétricos em relação à dieta utilizada. Em um estudo mais recente, Bockenstedt et al. (2014) avaliaram o comportamento alimentar de *I. scapularis* por meio da análise de imagens do seu sítio alimentar na orelha de um camundongo infectado com *Borrelia burgdorferi*. Nas imagens geradas pela microscopia intravital, os autores observaram as peças bucais do carrapato sendo introduzidas na derme hospedeiro, o hipóstomo com uma única quelícera estendida, e a formação do “pool” de alimentação. Entretanto, até o momento, nada se tem observado sobre o comportamento alimentar de *A. sculptum* em condições de laboratório, utilizando-se a metodologia de eletromiograma ao longo de todo o processo alimentar do artrópode.

1.5. Eletropenetrograma e Eletromiograma

A captura de sinais elétricos gerados pelos artrópodes hematófagos, durante seu processo alimentar, vem sendo bastante utilizada em estudos sobre o processo hematofágico. De início, a técnica denominada eletropenetrograma consistia em conduzir uma pequena corrente elétrica, que passava pelo artrópode e pelo hospedeiro, com auxílio de eletrodos, assim, toda mudança que ocorria na resistência elétrica promovida pelas contrações musculares do artrópode, durante a hematofagia, eram capturadas e gravadas (McLean & Kinsey, 1964).

Com o decorrer dos anos, a técnica foi aprimorada a fim de evitar as alterações causadas nos artrópodes em decorrência do uso da corrente elétrica. Assim, o eletropenetrograma deu origem ao eletromiograma. Atualmente, os equipamentos mais modernos são capazes de detectar as variações de voltagens provocadas pela penetração e movimentação das peças bucais ou pela movimentação da musculatura de bombas que

estãodiretamente ligadas à sucção de sangue, como a bomba faríngeal ou a bomba cibarial (Smith, 1979). Posteriormente, Guarneri e colaboradores desenvolveram ainda mais esta técnica, usando um sistema de monitoramento eletrônico da atividade da bomba cibarial de triatomíneos para estudos de comportamento alimentar, nos quais o sinal produzido pela bomba é filtrado, ampliado, digitalizado e armazenado em software especialmente desenvolvido para a análise dos sinais (Sant'Anna et al., 2001). A principal vantagem dessa técnica é que, além de possibilitar o monitoramento de todo o processo alimentar, ela permite que os dados capturados sejam gravados e fiquem disponíveis para posterior análise. Esta metodologia já foi utilizada no estudo do comportamento alimentar de triatomíneos (Guarneri et al., 2000; Sant'Anna et al., 2001; Araújo et al., 2007; Soares et al., 2014), percevejo de cama (Araújo et al., 2009) e carrapatos (Costa et al., 2016).

2. JUSTIFICATIVA

Os carrapatos podem transmitir uma grande variedade de patógenos, incluindo bactérias, vírus, protozoários sanguíneos (Chen et al., 2010). No Brasil, o principal patógeno transmitido aos humanos por carrapatos é a *Rickettsia rickettsii*, bactéria causadora da FMB, sendo a maioria dos casos e das mortes confirmados no Sudeste (Bitencourth et al., 2016). Nesta região a principal vetora é o *A. sculptum*. Apesar da sua importância como transmissor de patógenos aos humanos, na literatura não consta nenhum tipo de informação a respeito do comportamento alimentar de *A. sculptum*. Desse modo, o presente trabalho visa, por meio da análise dos sinais elétricos, avaliar o processo alimentar de fêmeas e ninfas de *A. sculptum*, em camundongos, possibilitando, assim, a geração de conhecimentos sobre sua dinâmica de alimentação ao longo dos dias em que permanecem associadas ao hospedeiro, bem como estudar as reações locais observadas na pele e sítio de alimentação do ectoparasito.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Investigar o processo alimentar de *Amblyomma sculptum* em camundongos pelo monitoramento dos sinais elétricos (eletromiograma) gerados pelo carrapato em diferentes tempos de contato com o hospedeiro.

3.2. Objetivos Específicos

- Padronizar a técnica de eletromiograma em ninfas e fêmeas de *A. sculptum* durante o período de fixação ao hospedeiro.
- Fazer o registro do eletromiograma dos carrapatos em diferentes dias após a sua fixação no hospedeiro.
- Identificar e descrever os sinais elétricos presentes nos eletromiogramas relacionados com o processo alimentar de ninfas e fêmeas de *A. sculptum* em camundongos.

4. METODOLOGIA

4.1. Manutenção da Colônia de *Amblyomma sculptum* em Laboratório

Os exemplares de *A. sculptum* utilizados nos experimentos são provenientes de exemplares coletados na Fazenda Experimental da UFMG, em Pedro Leopoldo-MG, Brasil, e foram identificados de acordo com Nava et al., 2014. No Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos do ICB/UFMG, os carrapatos foram mantidos em uma incubadora com condições semi-controladas de temperatura ($28 \pm 2^\circ\text{C}$) e umidade relativa ($85 \pm 10\%$). Esses artrópodes foram alimentados em camundongos machos adultos (7-8 semanas de idade) da linhagem *Swiss* (*Mus musculus*) por cerca de 4 a 10 dias. Para isso, os camundongos da linhagem *Swiss* acomodaram uma câmara de alimentação onde os carrapatos foram mantidos até completarem sua alimentação. As câmaras de alimentação foram fixadas com adesivo de contato (Brascoplast Standard, Brascola) no dorso (região da cernelha) de camundongos previamente anestesiados intraperitonealmente com uma solução de Cetamina (Ventil®, Louveira, SP, Brasil) e Xilazina (Bayer S.A., São Paulo, SP, Brasil) a 150 e 10 mg/kg de peso, respectivamente. As câmaras foram confeccionadas a partir de tubos de polipropileno de 1,5 mL (Eppendorf Tube®), cortados de modo a permanecer com aproximadamente 1,5 cm de altura. As tampas receberam pequenos furos para permitir a troca de umidade e ar (Fig. 3A).

4.2. Preparo dos Camundongos e Carrapatos Utilizados na Técnica de Eletromiograma

Para a realização da técnica de eletromiograma, os camundongos da linhagem *Swiss* foram preparados para acomodar uma câmara de alimentação onde foram mantidos os carrapatos, ao longo dos experimentos, do mesmo modo como citado no item 4.1. Nos experimentos com carrapatos fêmeas, cada camundongo acomodou um casal de adultos em sua câmara de alimentação, enquanto nos experimentos com ninfas, cada camundongo acomodou duas ninfas em sua câmara de alimentação (Fig. 3).

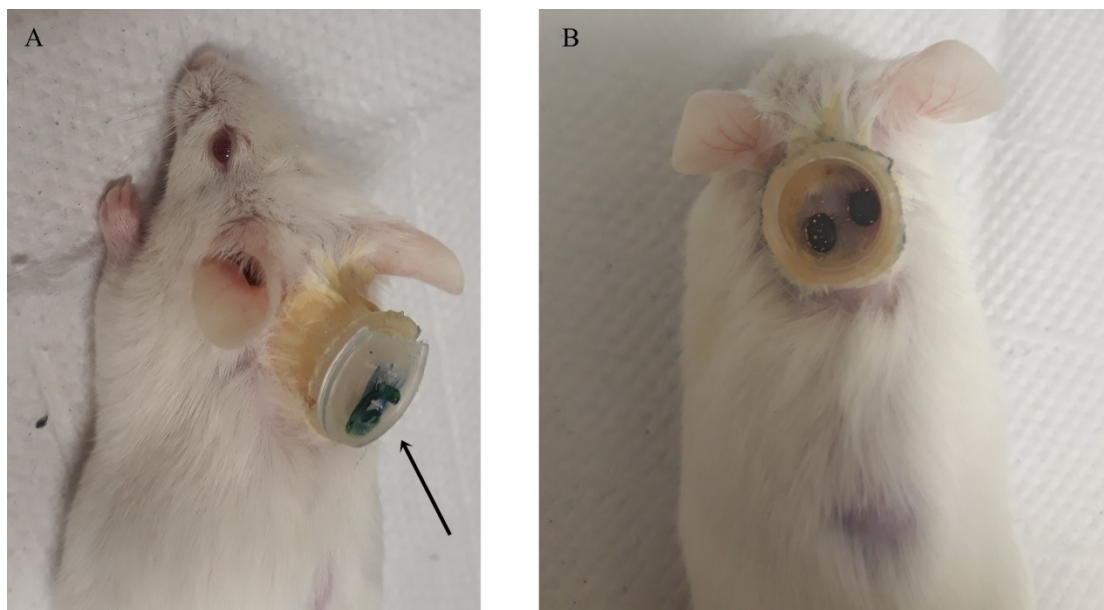


Figura 3 – Câmara de alimentação (seta) fixada no dorso (A) do camundongo *Swiss* e acondicionamento dos carrapatos para a técnica de eletromiograma (B).

4.3. Eletromiograma

Para a realização do eletromiograma (Fig. 4) os camundongos da linhagem *Swiss* foram anestesiados intraperitonealmente com uma solução de Cetamina (Ventil®, Louveira, SP, Brasil) e Xilazina (Bayer S.A., São Paulo, SP, Brasil) a 150 e 10 mg/kg de peso, respectivamente. Em seguida, os camundongos foram acomodados, em decúbito ventral, sobre uma manta aquecida (Fine Science Tools Inc., Baden-Württemberg, Alemanha) que manteve sua temperatura corporal constante a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, mediante monitorização por sensor retal (Fine Science Tools Inc.).

Os sinais elétricos produzidos pelos carrapatos foram captados e gravados de acordo com Costa et al. (2016). Resumidamente, um eletrodo, constituído por um fio de ouro ultrafino com 90 μm de diâmetro, foi fixado ao hospedeiro com fita adesiva, enquanto um segundo eletrodo foi fixado na superfície dorsal do carrapato. O contato entre os eletrodos, no carrapato e no hospedeiro, foi potencializado por meio do uso de um gel condutor (Regisgraf-Gel®, São Paulo, SP, Brasil). Os sinais capturados foram amplificados 210 vezes, filtrados para descartar os sinais com frequência acima de 17 Hz (com uma inclinação de -45 dB/oitava) e digitalizados por uma placa de aquisição de dados (AC-100, Pico Technology

Limited, UK) conectada a um microcomputador. Os dados gerados foram armazenados no programa (Data Acquisition System) escrito pelo Professor Alberto de Figueiredo Gontijo (COLTEC/UFGM). O sítio escolhido para a fixação dos carrapatos foi a pele da região dorsal do tórax do camundongo, a qual era delimitada pela câmara de alimentação (Fig. 3).

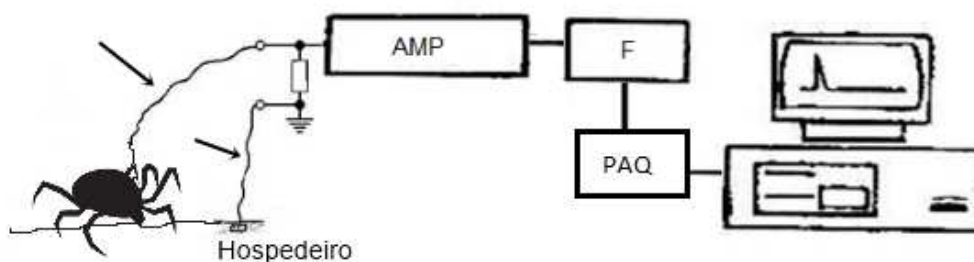


Figura 4 – Esquema da montagem experimental para realização da técnica de eletromiograma, onde os sinais elétricos gerados, durante o tempo de fixação do carrapato em busca do repasto sanguíneo no hospedeiro, foram captados e armazenados. Seta: eletrodos; AMP: amplificador; F: filtro; PAQ: placa de aquisição. Adaptado de Araújo et al. (2011).

4.4. Análise dos Dados Gerados no Eletromiograma

Os arquivos de dados, referentes aos sinais elétricos gerados durante o processo alimentar dos carrapatos, foram analisados dentro do ambiente do *software* MATLAB 6, pelo programa BARBEIRO.m, escrito pelo Professor Alberto de Figueiredo Gontijo (COLTEC/UFGM). Este programa analisa os dados dos sinais elétricos, gerando três representações gráficas: janela 1 - sinal original do carrapato: apresenta os sinais elétricos (mV) fundamentais ao longo do tempo do experimento; janela 2 - espectro de frequência: permite a visualização das frequências fundamentais e suas frequências harmônicas que apareceram no eletromiograma; janela 3 – espectrograma: permite a visualização das frequências fundamentais e suas frequências harmônicas que apareceram ao longo do tempo.

Os registros elétricos, obtidos por meio do eletromiograma, foram transferidos para o Microsoft Excel 365 para a construção dos gráficos de sinais e posterior análise.

4.5. Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas por meio do *software* GraphPad Prism 6. Para testar a normalidade dos dados, foi utilizado o teste Kolmogorov-Smirnov. O teste de Qui quadrado foi utilizado na observação das correlações estatísticas entre os quatro dias de alimentação analisados no eletromiograma. O Teste Exato de Fisher foi utilizado para observar as correlações estatísticas na comparação dos dois dias de alimentação com os parâmetros observados. O teste de Mann-Whitney foi utilizado na comparação de diferentes parâmetros alimentares entre as ninfas utilizadas nos experimentos de eletromiograma. O nível de significância foi determinado como $p < 0,05$.

4.6. Comitê de Ética

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os manuais de experimentação animal e foram aprovados pelo comitê de ética para utilização de animais (CETEA/ICB-UFMG) sob o protocolo 361/2017 (ANEXO A).

4.7. Delineamento Experimental

Para caracterizar o processo alimentar de ninfas e fêmeas de *A. sculptum* em camundongos, foram formados dois grupos experimentais conforme mostrado nas tabelas 1 e 2. Para a descrição do comportamento alimentar, foram utilizadas quatro fêmeas adultas do carrapato que foram avaliadas nos dias 1, 3, 6 e 9 e oito ninfas, avaliadas nos dias 1, 2, 3 e 4 após sua fixação no hospedeiro. A fêmea de número 1 foi removida do experimento no dia 4 por problemas na captura dos sinais, em decorrência de problemas técnicos com o aparelho utilizado.

Os carrapatos adultos fêmeas utilizados nos experimentos tinham entre 30 a 40 dias após a muda e as ninfas, entre 15 e 25 dias. Os espécimes foram pesados antes (Peso Inicial –

PI) e depois (Peso Final – PF) do repasto sanguíneo, para a determinação do ganho de peso (GP), que é o PF menos o PI, sendo que, no caso das ninfas, o PI foi feito por meio de uma média de dois pools contendo 100 ninfas. O tempo total de contato (TTC) dos carrapatos com os hospedeiros também foi determinado desde o dia em que eles fixaram suas peças bucais na pele do camundongo até o dia em que eles as retiraram do mesmo. Finalizado o processo de alimentação, os carrapatos foram removidos e mantidos na incubadora sob condições semi-controladas de temperatura ($28 \pm 2^\circ\text{C}$) e umidade ($85 \pm 10\%$). As ninfas foram mantidas individualmente, em tubos capazes de permitir a troca de ar, e monitoradas diariamente para determinar o tempo gasto para a realização da ecdise e a identificação do sexo do estágio adulto.

Tabela 1 – Dados referentes aos quatro grupos experimentais, compostos por fêmeas adultas de *A. sculptum*, cujo processo alimentar foi monitorado por eletromiograma.

Dia do Monitoramento	Carrapatos Adultos	Duração do Experimento (min)
Dia 1	Fêmeas 1 a 4	46
Dia 3	Fêmeas 1 a 4	46
Dia 6	Fêmeas 1 a 4	46
Dia 9	Fêmea 1	20
	Fêmeas 2 a 4	46

Tabela 2 – Dados referentes aos quatro grupos experimentais, compostos por ninfas de *A. sculptum*, cujo processo alimentar foi monitorado por eletromiograma.

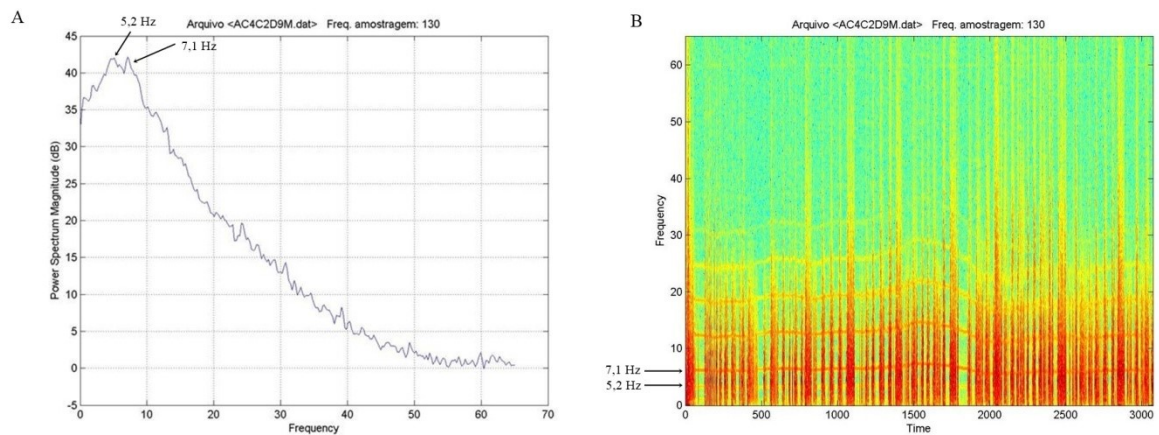
Dia do Monitoramento	Ninfas	Duração do Experimento (min)
	Ninfa 1 a 4	-*
Dia 1	Ninfa 5	16
	Ninfa 6	22
	Ninfa 7	30
	Ninfa 8	3
Dia 2	Ninfa 1	7
	Ninfa 2	7
	Ninfa 3	7
	Ninfa 4	27
	Ninfa 5	25
	Ninfa 6	13
	Ninfa 7	24
	Ninfa 8	13
Dia 3	Ninfa 1	15
	Ninfa 2	20
	Ninfa 3	-**
	Ninfa 4	25
	Ninfa 5	12
	Ninfa 6	19
	Ninfa 7	30
	Ninfa 8	31
Dia 4	Ninfa 1 a 5	-**
	Ninfa 6	18
	Ninfa 7	30
	Ninfa 8	-**

*Sinais elétricos comprometidos na análise. **Ninfa já havia desprendido do camundongo.

5. RESULTADOS

5.1. Caracterização das Frequências Fundamentais por Meio do MATLAB 6

Os sinais elétricos, obtidos por meio do eletromiograma e analisados dentro do pacote MATLAB 6, permitiram identificar duas variações de frequências por meio das análises dos gráficos das janelas 2 e 3. Essas, apresentaram uma variação entre 6,5 e 8 Hertz (Hz) e uma outra variação entre 5 e 6,5 Hz (Fig. 5). As frequências, identificadas na janela 2 do MATLAB 6, quando associadas aos sinais vistos no eletromiograma, permitiram correlacioná-las ao sinais referentes ao evento de Sucção. Além das frequências fundamentais, esta análise permitiu a identificação das frequências harmônicas (Fig. 5). Ao observar somente a janela 3 do MATLAB 6, vimos que alguns espectrogramas apresentaram faixas no sentido vertical, e, ao associar essas faixas com os sinais do eletromiograma, foi possível correlacioná-las ao evento de Salivação.



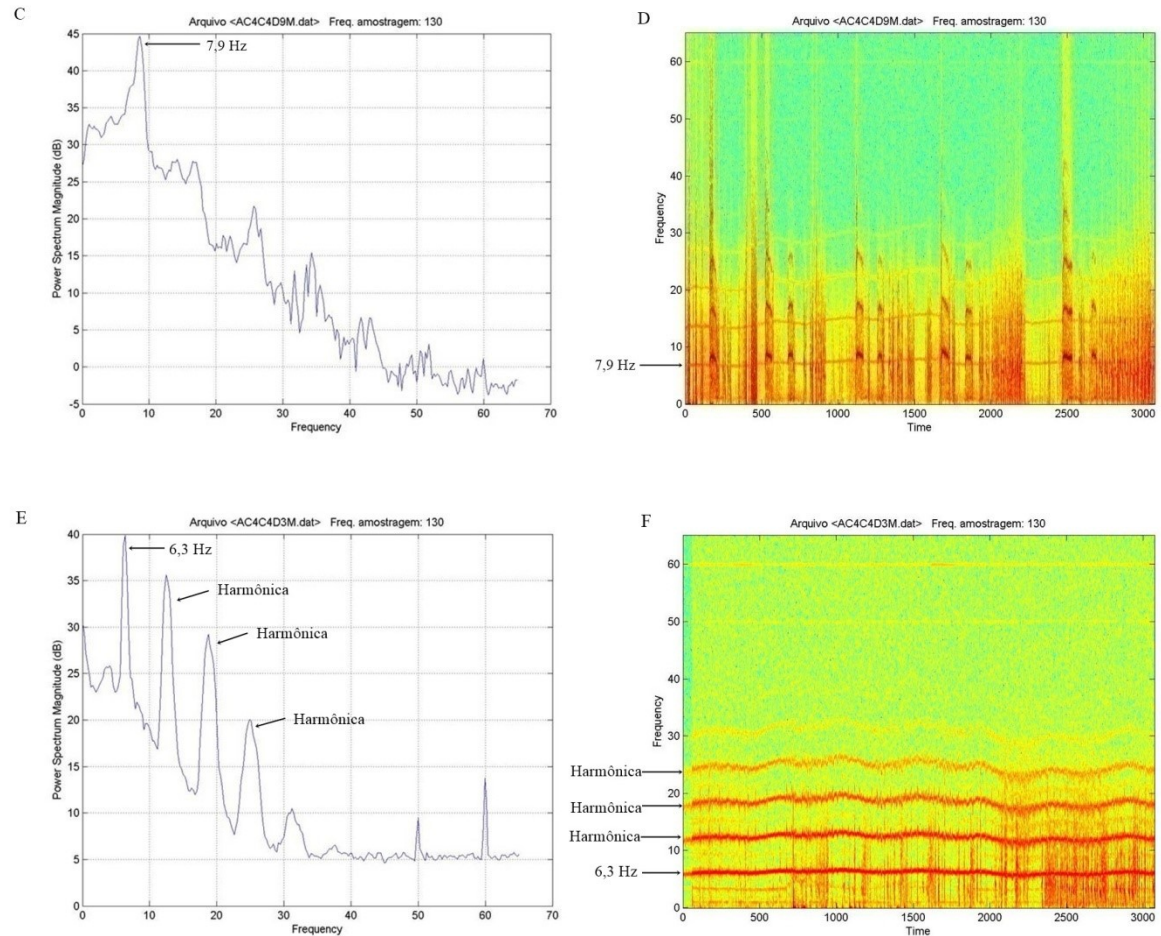


Figura 5– Gráficos gerados no *software* MATLAB 6 que indicam a existência de duas frequências prevalentes de aproximadamente 5 e 7 Hz (setas), sendo uma relativa à sucção de alta frequência (A e C), e outra relativa à sucção de baixa frequência (A e E). Nos respectivos espectrogramas (B, D e F), é possível observar a faixa que indica a frequência fundamental ao longo do tempo (setas). Também podem ser observadas as frequências harmônicas (E) e suas faixas no espectrograma (F).

5.2. Descrição e Identificação dos Sinais Elétricos Presentes nos Eletromiogramas Relacionados ao Processo Alimentar de Ninfas e Fêmeas de *Amblyomma sculptum*

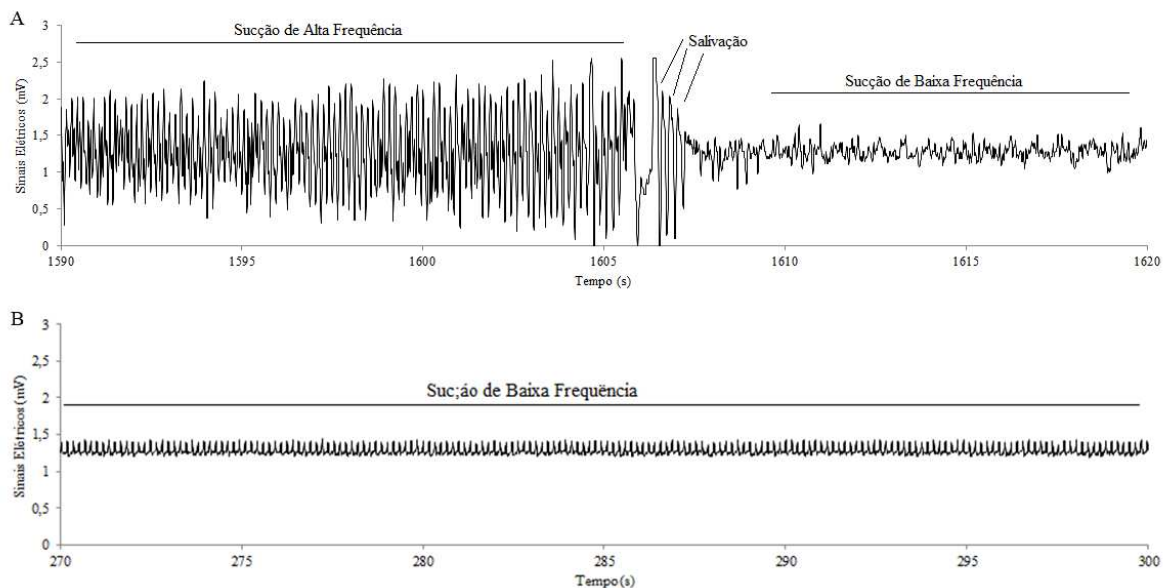
Os sinais elétricos obtidos por meio do eletromiograma e analisados pelos gráficos gerados no Microsoft Excel 365, e dentro do pacote MATLAB 6, permitiram identificar três tipos de eventos ocorridos durante o processo alimentar: sucção, salivação e inatividade (Fig. 6). As características de cada evento identificado são descritas a seguir.

Sucção: caracterizado por período com variações sequenciais e repetitivas na voltagem, que formaram picos com vértice para baixo ou para cima que correspondem à

atividade da bomba faringeal. Os sinais elétricos de sucção apresentaram duas variações de frequências que foram determinadas por meio das análises dos gráficos das janelas 2 e 3 do MATLAB 6, como visto no item 5.2, sendo eles: A) Sucção de Alta Frequência, constituído por picos de vértice único e com alta amplitude, apresentando uma frequência variando entre 6,5 e 8 Hz; B) Sucção de Baixa Frequência, formado por picos ora de vértice único, ora com formas irregulares e vértice duplo ou triplo, com baixa amplitude, e frequência variando entre 5 e 6,5 Hz (Fig.6).

Salivação: caracterizado por um aumento repentino da voltagem emitida, seguido pelo retorno da voltagem ao valor basal, constituindo-se em sinal do tipo “*shoulder peak*”. Entretanto, esse aumento da voltagem foi bem variável, sendo ora bastante característico, ora bem sutil. Além dos picos característicos de Salivação, foi determinado um outro tipo de pico que foram aqui denominamos Salivação X, também caracterizado por um aumento repentino da voltagem e seu retorno ao valor basal, porém, com um tempo de duração mais curto (Fig. 6).

Inatividade: caracterizado por um período no qual o carrapato permaneceu com as peças bucais em contato com o hospedeiro, porém, sem realizar nenhum tipo de evento. Neste período, os valores de voltagem capturados apresentaram ligeira variação (Fig. 6).



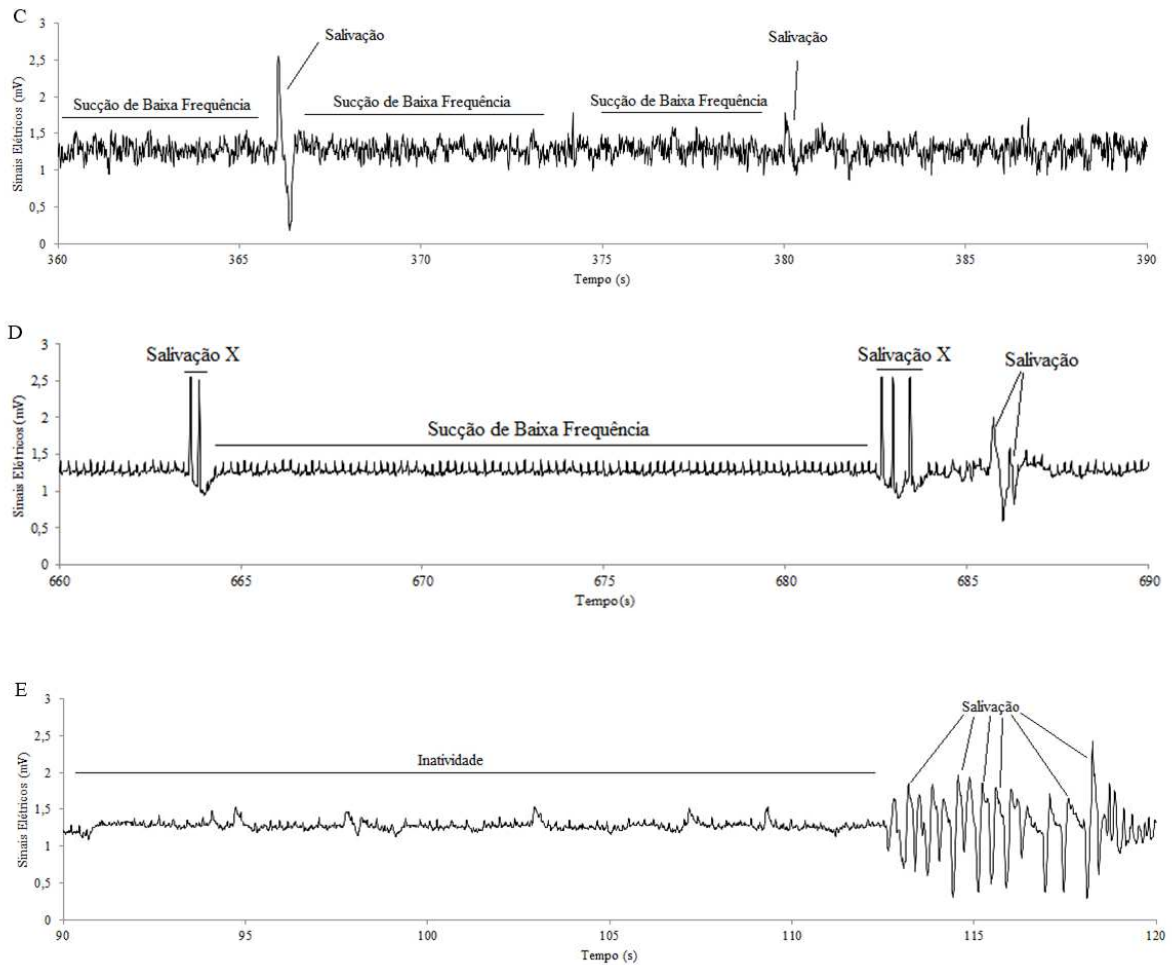


Figura 6 – Sinais elétricos, gerados durante o processo alimentar, a partir dos quais foi possível caracterizar as duas frequências de sucção, sendo elas: Sucção de Alta Frequência (A) e Sucção de Baixa Frequência (A, B, C e D), que apresentam picos regulares (B e D) ou irregulares (A e C). Sinais de Salivação clássicos (A, C, D e E) e Salivação X (D); e Inatividade (E).

5.3. Caracterização do Processo Alimentar de Fêmeas de *Amblyomma sculptum*

As fêmeas de *A. sculptum* foram analisadas em quatro dias distintos de sua alimentação, sendo eles: dia 1, dia 3, dia 6 e dia 9 após a penetração das peças bucais no hospedeiro, por um período de 46 minutos em cada dia, sendo considerado este o tempo total do experimento. As análises dos sinais foram feitas de forma qualitativa, de modo a permitir observar quais dos eventos foram mais presentes, por minuto, em cada dia, assim como qual evento foi predominante por unidade de tempo (min). Em relação aos picos de sucção, observou-se qual a frequência predominante, por minuto, como descrito nas tabelas 3, 4 e 5.

Tabela 3 – Eventos observados, minuto a minuto, ao longo do processo alimentar de fêmeas de *Amblyomma sculptum*.

Dia	Tempo	Duração dos Eventos Observados			
		Suc-Sal-Inat	Sal-Inat	Suc-Sal	Suc
1	Total (min)	76	9	99	0
	%	41,3	4,9	53,8 ^{a,b}	0,0
3	Total (min)	0	0	161	23
	%	0,0	0,0	87,5 ^{a,c}	12,5
6	Total (min)	0	0	175	9
	%	0,0	0,0	95,1 ^b	4,9
9	Total (min)	0	0	138	0
	%	0,0	0,0	100,0 ^{a,c}	0,0

Suc-Sal-Inat: sinais de sucção, salivação e inatividade; Sal-Inat: sinais de salivação e inatividade; Suc-Sal: sinais de sucção e salivação; Suc: sinais de sucção. Foi realizada a análise estatística do valor percentual, de cada evento, em relação ao tempo total nos diferentes dias. Valores que não compartilham uma mesma letra são significativamente diferentes ($p < 0,05$; Teste Exato de Fisher).

Tabela 4 – Eventos predominantes, observados minuto a minuto, ao longo do processo alimentar de fêmeas de *Amblyomma sculptum*.

Dia	Tempo	Duração do Evento Predominante		
		Suc	Sal	Inat
1	Total (min)	70	72	42
	%	38,1 ^{a,b}	39,1 ^{a,b}	22,8
3	Total (min)	164	20	0
	%	89,1 ^a	10,9 ^a	0,0
6	Total (min)	171	13	0
	%	92,9 ^b	7,1 ^b	0,0
9	Total (min)	110	28	0
	%	79,7 ^b	20,3 ^b	0,0

Suc: sucção; Sal: salivação; Inat: inatividade. Foi realizada a análise estatística do valor percentual de cada evento predominante em relação ao tempo total nos diferentes dias. Valores que não compartilham uma mesma letra são significativamente diferentes ($p < 0,05$; Teste Exato de Fisher).

Tabela 5 – Frequências de sucção predominantes, observadas minuto a minuto, ao longo do processo alimentar de fêmeas de *Amblyomma sculptum*.

Dia	Tempo	Duração da Frequência de Sucção Predominante	
		Baixa (>5 e < 6,5 Hz)	Alta (>6,5 e <8 Hz)
1	Total (min)	141	34
	%	80,6 ^a	19,4 ^a
3	Total (min)	173	11
	%	94,0 ^{a,b}	6,0 ^{a,b}
6	Total (min)	159	25
	%	86,4	13,6
9	Total (min)	116	22
	%	84,1 ^b	15,9 ^b

Foi realizada a análise estatística da proporção de frequência baixa e alta nos diferentes dias de observação. Valores que não compartilham uma mesma letra são significativamente diferentes ($p < 0,05$; Teste Exato de Fisher).

A descrição qualitativa dos eventos vistos, dos eventos predominantes e da frequência de sucção predominante, em cada dia de alimentação, está descrita a seguir.

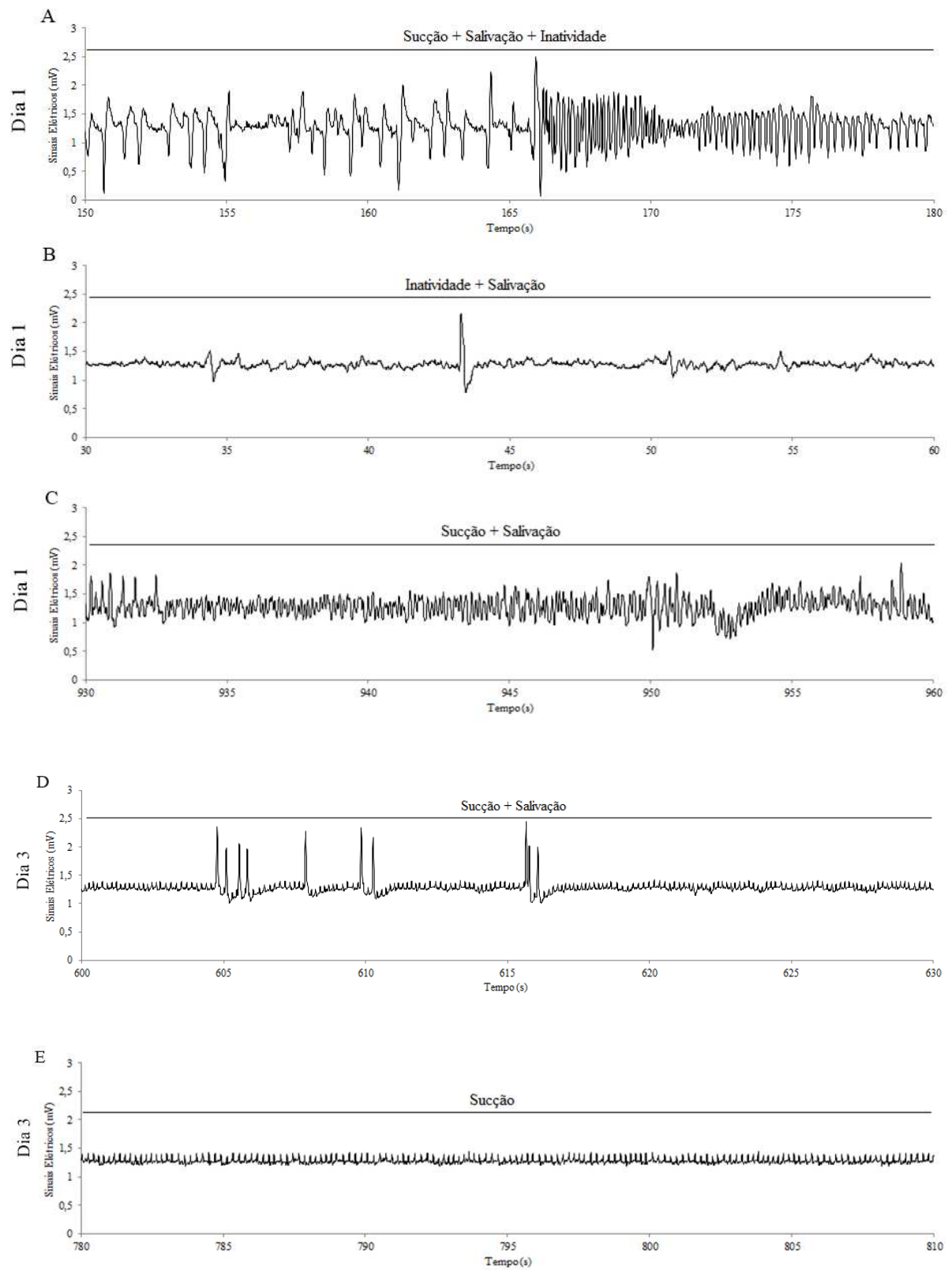
Dia 1: caracterizado pelo início da alimentação do carrapato, considerando os dias avaliados, 24 horas após o mesmo entrar em contato com o hospedeiro e inserir suas peças bucais a fim de realizar a hematofagia. Nesse dia, foram observados três grupos de eventos distintos que foram identificados na análise minuto a minuto: Sucção-Salivação-Inatividade (Fig. 7A), Salivação-Inatividade (Fig. 7B) e Sucção-Salivação (Fig. 7C). Destes grupos de eventos identificados observamos que os mais prevalentes foram Sucção-Salivação e Sucção-Salivação-Inatividade, correspondendo a 53,8% e 41,3% do tempo total de análise nesse dia, respectivamente. Ao observarmos o evento predominante neste dia de alimentação, vimos que a Salivação representa 39,1% do tempo total de análise seguida pela Sucção que corresponde a 38,0%. Somente nesse dia de análise foi possível observar a presença da Inatividade, correspondendo a 2,9% do tempo total de observação. Quanto à frequência dos picos de Sucção observados nesse dia, vimos que houve uma predominância nos picos de Sucção de Baixa Frequência (80,6%) em relação aos picos de Sucção de Alta Frequência (19,4%).

Dia 3: nesse dia de alimentação, 72 horas após o carrapato entrar em contato com o hospedeiro e inserir suas peças bucais a fim de realizar a hematofagia, foram observados dois grupos de eventos distintos identificados nas análises por minuto, sendo eles: Sucção-Salivação (Fig. 7D) e Sucção (Fig. 7E). Observamos aqui um aumento percentual do evento

de Sucção-Salivação em relação ao primeiro dia de análise, onde, nesse dia, o mesmo corresponde a 87,5% do tempo total de análise. Já os eventos onde o carrapato apresenta apenas Sucção correspondem a 12,5% do tempo total de observação desse dia. Ao analisarmos o evento predominante, observamos um aumento significativo da Sucção que nesse dia correspondeu a 89,1% do período analisado e, em contrapartida, uma redução do tempo em que a Salivação foi predominante, correspondendo a 10,9% do tempo total de análise nesse dia. Períodos de Inatividade não foram identificados nesse dia de alimentação. Com relação à frequência dos picos de Sucção observamos um aumento percentual da Sucção de Baixa Frequência (94,0%) e uma diminuição percentual dos picos de Sucção de Alta Frequência (6,0%) em relação ao dia anterior.

Dia 6: nesse dia de alimentação, assim como no anterior, foram observados os mesmos dois grupos de eventos identificados nas análises por minuto: Sucção-Salivação (Fig. 7F) e Sucção (Fig. 7G). Vimos que nesse dia houve um ligeiro aumento percentual do evento de Sucção-Salivação em relação ao dia anterior, correspondendo a 95,1% do tempo total de análise, enquanto os eventos de Sucção que aparecem sozinhos apresentaram uma baixa percentual correspondendo a 4,9% do tempo total de observação. Em relação ao evento predominante, observamos um aumento percentual da Sucção em relação ao dia de análise anterior, correspondendo a 92,9% do tempo total e, por outro lado, uma redução percentual da Salivação, que nesse dia correspondeu a 7,1% do tempo total de observação. Períodos de Inatividade também não foram identificados nesse dia de alimentação. Ao analisarmos a frequência dos picos de Sucção vimos uma redução percentual da Sucção de Baixa Frequência (86,4%) e um aumento percentual dos picos de Sucção de Alta Frequência (13,6%) em relação ao dia anterior de análise.

Dia 9: no último dia analisado do repasto sanguíneo, registrado quando observamos a fase de ingurgitamento, foi observado somente um grupo de eventos identificados nas análises de minuto a minuto: Sucção-Salivação (Fig. 7H). Sendo assim, esse evento correspondeu a 100,0% do tempo total de análise nesse dia, demonstrando um aumento percentual em relação ao dia anterior de análise. Ao analisarmos o evento predominante, observamos uma redução na percentagem da Sucção em relação ao dia anterior, correspondendo a 79,7% do tempo total de observação, e um aumento percentual da Salivação, que nesse dia correspondeu a 20,3% do tempo total de análise. Aqui também não houve identificação de períodos de Inatividade. Com relação à frequência dos picos de Sucção observamos novamente uma redução percentual da Sucção de Baixa Frequência (84,1%) e um aumento percentual dos picos de Sucção de Alta Frequência (15,9%) em relação ao dia anterior de análise.



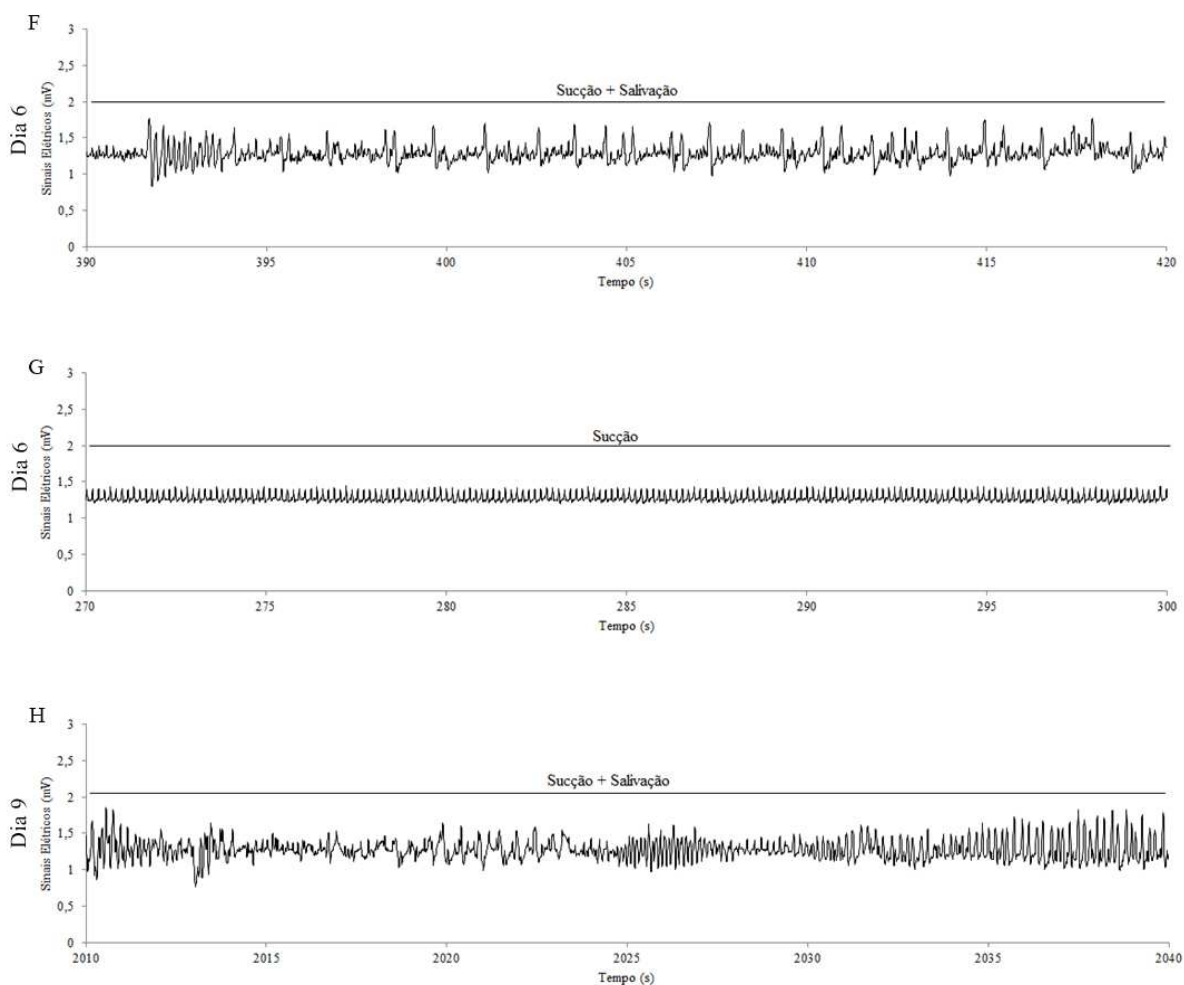


Figura 7 – Grupos de eventos observados ao longo do processo alimentar de fêmeas de *A. sculptum* nos dias de alimentação: 1: Sucção-Salivação-Inatividade (A), Inatividade-Salivação (B) e Sucção-Salivação (C); 3: Sucção-Salivação (D) e Sucção(E); 6: Sucção-Salivação (F) e Sucção (G); e 9: Sucção-Salivação (H).

A comparação dos quatro dias de observação mostrou que o único evento que apareceu em todos eles foi o de Sucção-Salivação que, em termos percentuais em relação ao tempo total, variou de 53,8% (dia 1) a 100,0% (dia 9). Nessa análise minuto a minuto, os eventos Sucção-Salivação-Inatividade e Salivação-Inatividade apareceram apenas no primeiro dia de observação, correspondendo em termos percentuais a 41,3% e 4,9%, respectivamente. Já em relação ao evento Sucção, ele apareceu nos dias 3 (12,5%) e 6 (4,9%), sem apresentar diferença significativa entre eles (Fig. 8).

Em relação aos eventos predominantes, aqueles relativos à Sucção e à Salivação ocorreram nos quatro dias de observação e, em termos percentuais em relação ao tempo total, eles variaram de 38,1% (dia 1) a 92,9% (dia 6) e 7,1% (dia 6) a 39,1% (dia 1),

respectivamente. Nessa análise minuto a minuto, o evento de Inatividade somente foi visto no primeiro dia de análise, correspondendo em termos percentuais a 22,8% (Fig. 9).

A análise da proporção das frequências de sucção, nos quatro dias de observação, mostrou que a Sucção de Baixa Frequência predominou sobre a Sucção de Alta Frequência e, em termos percentuais, elas variaram de 80,6% (dia 1) a 94,0% (dia 3) e 6,0% (dia 3) a 19,4% (dia 1), respectivamente (Fig. 10).

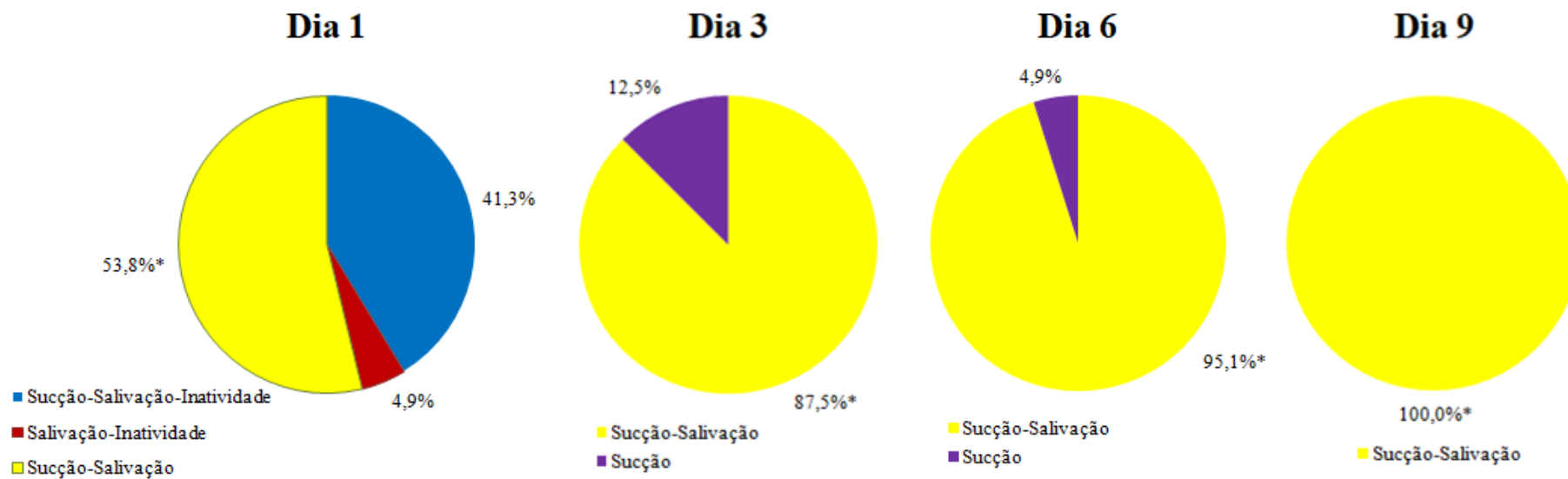


Figura 8 – Percentual de eventos presentes, por minuto, durante o processo alimentar de fêmeas de *A. sculptum*, nos dias 1, 3, 6 e 9 após fixação ao hospedeiro. *Diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$; Qui quadrado).

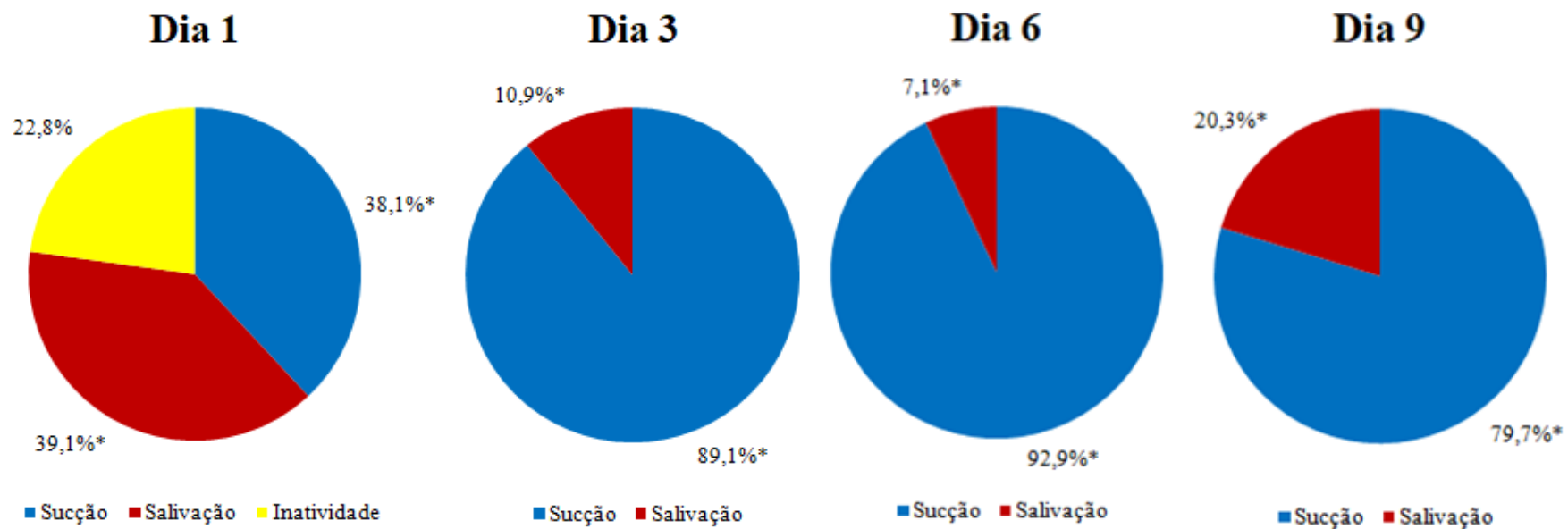


Figura 9 – Percentual de eventos predominantes, por minuto, durante o processo alimentar de fêmeas de *A. sculptum*, nos dias 1, 3, 6 e 9 após fixação ao hospedeiro.

*Diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$; Qui quadrado).

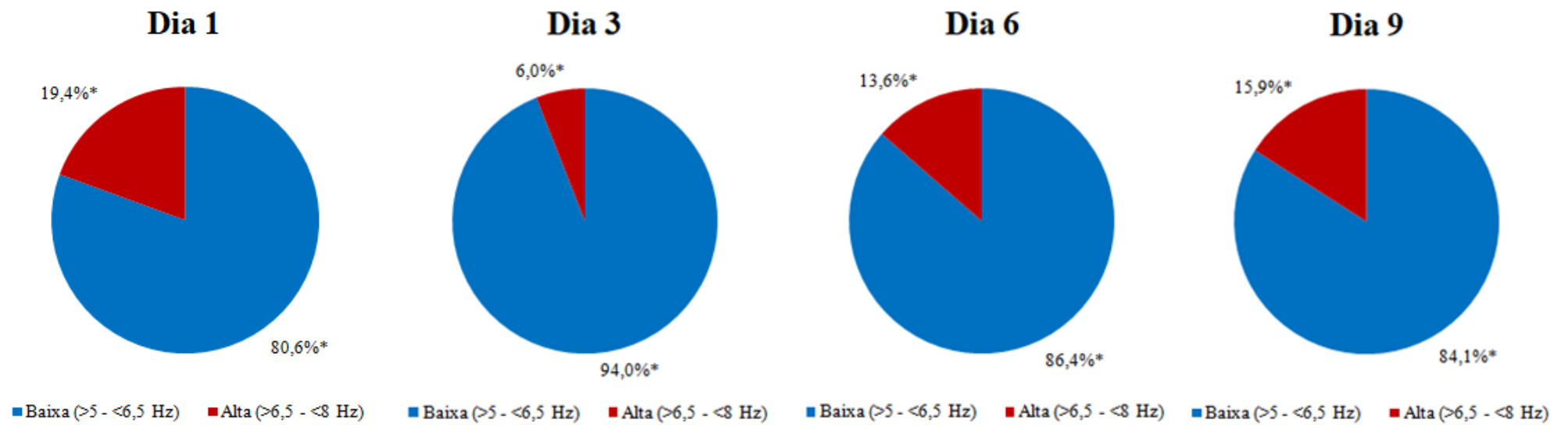


Figura 10 – Percentual das frequências de sucção, por minuto, durante o processo alimentar de fêmeas de *A. sculptum*, nos dias 1, 3, 6 e 9 após fixação ao hospedeiro.

*Diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$; Qui quadrado).

5.4. Caracterização do Processo Alimentar de Ninfas de *Amblyomma sculptum*

As ninfas de *A. sculptum* foram analisadas em quatro dias consecutivos de sua alimentação, sendo eles: dia 1, dia 2, dia 3 e dia 4 após a penetração das peças bucais no hospedeiro. As análises dos sinais foram feitas de modo qualitativo, da mesma forma descrita no item 5.3. Os detalhes observados nas análises são descritos nas tabelas 6, 7 e 8.

Tabela 6 – Eventos observados, minuto a minuto, ao longo do processo alimentar de ninfas de *Amblyomma sculptum*

Dia	Tempo	Duração dos Eventos Observados		
		Suc-Sal	Sal-Inat	Inat
1	Total (min)	71	0	0
	%	100,0 ^a	0,0	0,0
2	Total (min)	89	27	7
	%	72,4 ^{a,b,c}	21,9	5,7
3	Total (min)	152	0	0
	%	100,0 ^b	0,0	0,0
4	Total (min)	48	0	0
	%	100,0 ^c	0,0	0,0

Suc-Sal: sinais de sucção e salivação; Sal-Inat: sinais de salivação e inatividade; Inat: sinais de inatividade. Foi realizada a análise estatística do valor percentual de cada evento em relação ao tempo total nos diferentes dias. Valores que não compartilham uma mesma letra são significativamente diferentes ($p < 0,05$; Teste Exato de Fisher).

Tabela 7 – Eventos predominantes, observados minuto a minuto, ao longo do processo alimentar de ninfas de *Amblyomma sculptum*.

Dia	Tempo	Duração do Evento Predominante		
		Suc	Sal	Inat
1	Total (min)	56	15	0
	%	78,9 ^{a,b}	21,1 ^a	0,0
2	Total (min)	86	3	34
	%	69,9 ^a	2,4 ^{a,b}	27,7
3	Total (min)	106	46	0
	%	69,7 ^b	30,3 ^b	0,0
4	Total (min)	30	18	0
	%	62,5	37,5 ^a	0,0

Suc: sucção; Sal: salivação; Inat: inatividade. Foi realizada a análise estatística do valor percentual de cada evento predominante em relação ao tempo total nos diferentes dias. Valores que não compartilham uma mesma letra são significativamente diferentes ($p < 0,05$; Teste Exato de Fisher).

Tabela 8 – Frequências de sucção predominantes, observadas minuto a minuto, ao longo do processo alimentar de ninfas de *Amblyomma sculptum*.

Dia	Tempo	Duração da Frequência de Sucção Predominante	
		Baixa (>5 e $< 6,5$ Hz)	Alta ($>6,5$ e < 8 Hz)
1	Total (min)	61	10
	%	85,9 ^a	14,1 ^a
2	Total (min)	89	0
	%	100,0 ^{a,b}	0,0 ^{a,b}
3	Total (min)	111	41
	%	73,0 ^a	27,0 ^a
4	Total (min)	39	9
	%	81,2 ^b	18,8 ^b

Foi realizada a análise estatística da proporção das frequências (baixa e alta) nos diferentes dias de observação. Valores que não compartilham uma letra são significativamente diferentes ($p < 0,05$; Teste Exato de Fisher).

A descrição qualitativa dos eventos vistos, dos eventos predominantes e da frequência de sucção predominante de cada dia de alimentação é dada a seguir.

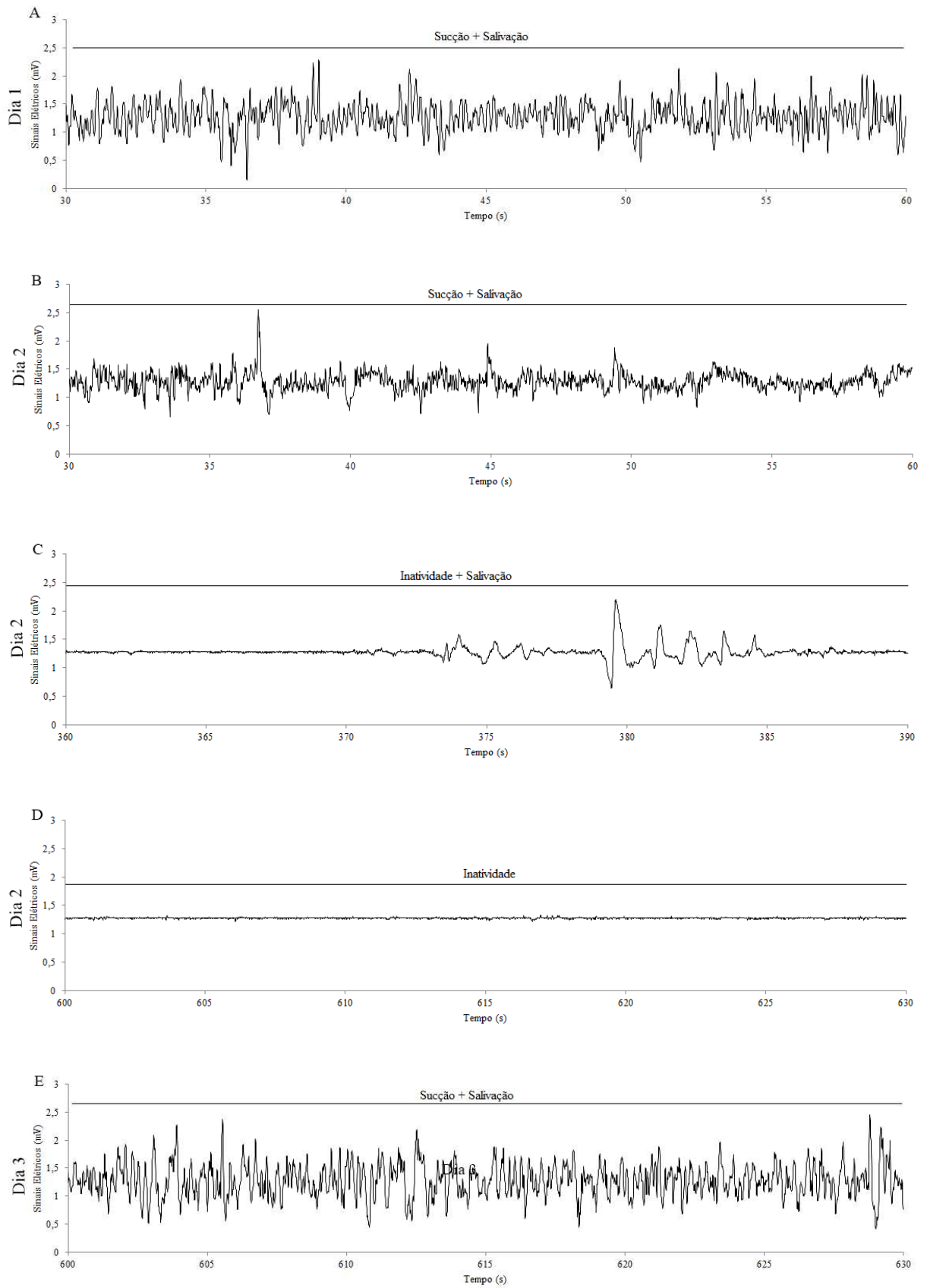
Dia 1: nesse dia, foi observado apenas um grupo de evento, sendo ele Sucção-Salivação (Fig. 11A), que correspondeu, portanto, a 100,0% do tempo total da análise. Observamos que o evento predominante foi a Sucção, ao qual correspondeu a 78,9% do tempo total do processo, seguida pela Salivação que correspondeu a 21,1%. Quanto à frequência dos picos de Sucção, houve uma predominância dos picos de Baixa Frequência (85,9%) em relação aos picos de Alta Frequência (14,1%).

Dia 2: nesse dia de alimentação, foram observados três grupos de eventos distintos, identificados nas análises por minuto, sendo eles: Sucção-Salivação (Fig. 11B), Salivação-Inatividade (Fig. 11C) e Inatividade (Fig. 11D). Foi observada aqui uma redução percentual do evento de Sucção-Salivação, em relação ao dia anterior de análise, quando o mesmo correspondeu a 72,4% do tempo total de análise. Já os eventos de Salivação-Inatividade e Inatividade que apareceram sozinhos corresponderam a 21,9% e 5,7% do tempo total de

observação, respectivamente. Na análise do evento predominante, foi verificada uma redução percentual da Sucção e da Salivação que neste dia correspondeu a 69,9% e 2,4% do tempo total de análise, respectivamente. Quanto à Inatividade, que só foi vista nesse dia, a mesma correspondeu a 27,7% do tempo total da observação. Com relação à frequência dos picos de Sucção, observamos que somente a Sucção de Baixa Frequência foi registrada no dia (100,0%).

Dia 3: nesse dia, assim como no primeiro dia, apenas um grupo de evento foi visto, a Sucção-Salivação (Fig. 11E), correspondendo, assim, a 100,0% do tempo total de análise. Em relação ao evento predominante, observamos uma leve diminuição percentual da Sucção em relação ao dia anterior, correspondendo a 69,7% do tempo total de observação, e por outro lado um aumento percentual da Salivação, que neste dia correspondeu a 30,3% do tempo total de análise. Períodos de Inatividade não foram identificados nesse dia de alimentação. Ao analisarmos a frequência dos picos de Sucção vimos uma redução percentual da Sucção de Baixa Frequência (73,0%) e um aumento percentual dos picos de Sucção de Alta Frequência (27,0%) em relação ao dia anterior.

Dia 4: no último dia do repasto sanguíneo analisado, quando ocorre a fase de ingurgitamento, observamos somente um grupo de evento identificado nas análises de minuto a minuto: Sucção-Salivação (Fig. 11F). Sendo assim, esse evento correspondeu a 100,0% do tempo total de análise. Ao analisarmos o evento predominante, observamos uma redução percentual da Sucção em relação ao dia anterior, correspondendo a 62,5% do tempo total de observação, e um aumento percentual da Salivação, que nesse dia correspondeu a 37,5% do tempo total de análise. Aqui também não houve identificação de períodos de Inatividade. Com relação à frequência dos picos de Sucção observamos um aumento percentual da Sucção de Baixa Frequência (81,2%) e uma redução percentual dos picos de Sucção de Alta Frequência (18,8%) em relação ao dia anterior.



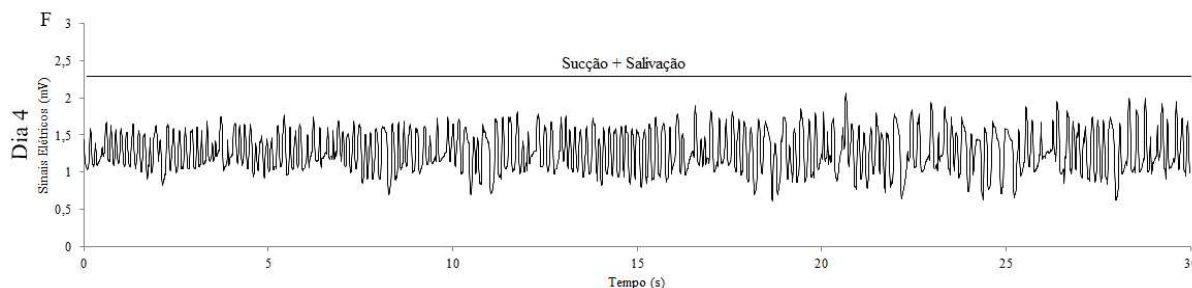


Figura 11 – Grupos de eventos observados ao longo do processo alimentar de ninfas de *A. sculptum* nos dias de alimentação: 1: Sucção-Salivação (A); 2: Sucção-Salivação (B), Inatividade-Salivação (C) e Inatividade (D); 3: Sucção-Salivação (E); 4: Sucção-Salivação (F).

A comparação dos quatro dias de observação mostrou que o único evento que apareceu em todos eles foi o de Sucção-Salivação, assim como visto nos indivíduos adultos fêmeas, o que, em termos percentuais em relação ao tempo total, variou de 72,4% (dia 2) a 100,0% (dias 1, 3 e 4). Nessa análise minuto a minuto, os eventos de Salivação-Inatividade e Inatividade apareceram apenas no segundo dia de observação, correspondendo em termos percentuais a 21,9% e 5,7%, respectivamente (Fig. 12).

Em relação aos eventos predominantes vimos que os eventos de Sucção e de Salivação ocorreram nos quatro dias de observação e, em termos percentuais em relação ao tempo total, eles variaram de 62,5% (dia 4) a 78,9% (dia 1) e 2,4% (dia 2) a 37,5% (dia 4), respectivamente. Nessa análise minuto a minuto, o evento de Inatividade somente foi visto no segundo dia de análise, correspondendo em termos percentuais a 27,7% (Fig. 13).

A análise da proporção das frequências de sucção nos quatro dias de observação mostrou que a Sucção de Baixa Frequência predominou sobre a Sucção de Alta Frequência, e em termos percentuais as mesmas variaram de 73,0% (dia 3) a 100,0% (dia 2) e 0,0% (dia 2) a 27,0% (dia 3), respectivamente (Fig. 14).

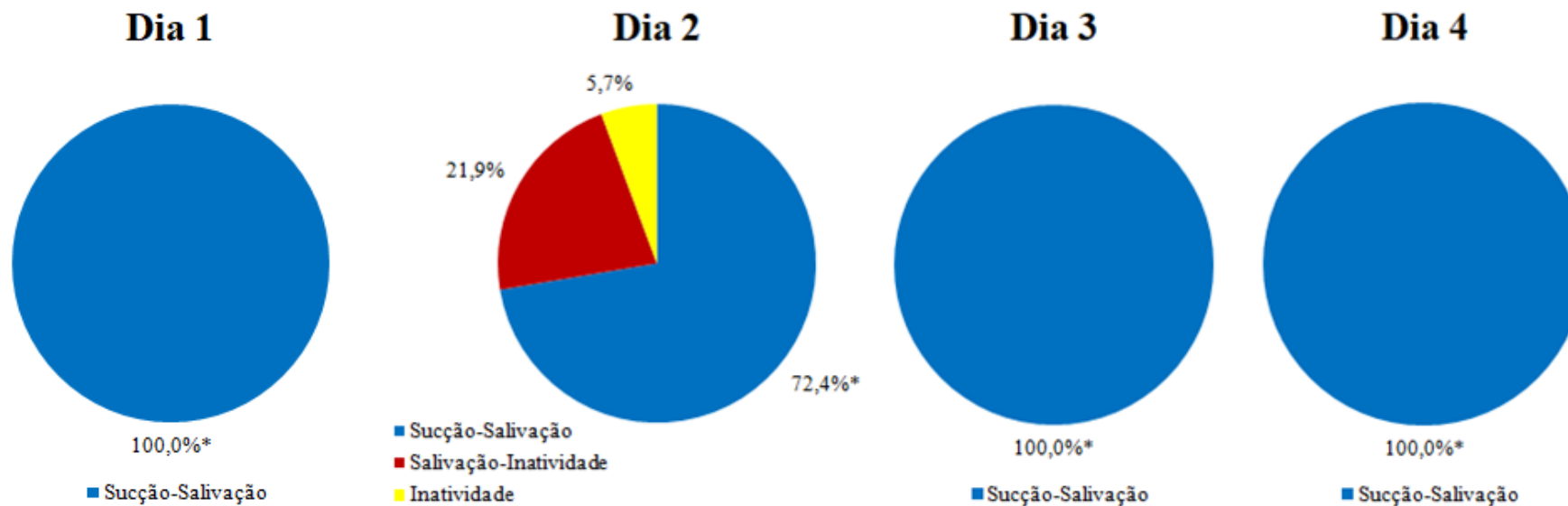


Figura 12 – Percentual de eventos presentes, por minuto, durante o processo alimentar de ninfas de *A. sculptum*, nos dias 1, 2, 3 e 4 após fixação ao hospedeiro. *Diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$; Qui quadrado).

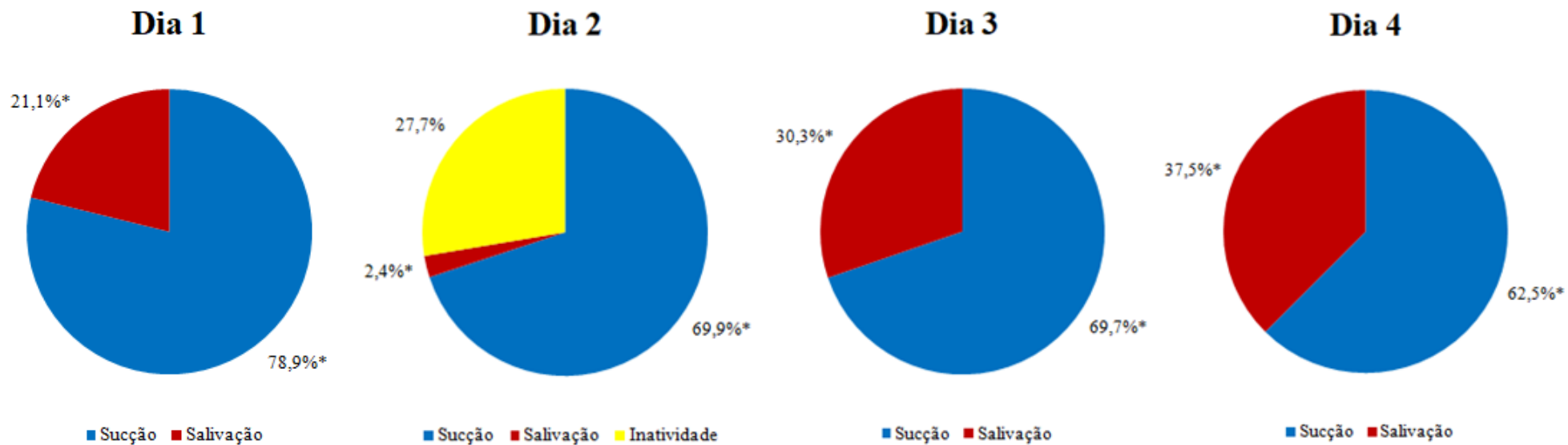


Figura 13 – Percentual de eventos predominantes, por minuto, durante o processo alimentar de ninfas de *A. sculptum*, nos dias 1, 2, 3 e 4 após fixação ao hospedeiro.

*Diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$; Qui quadrado).

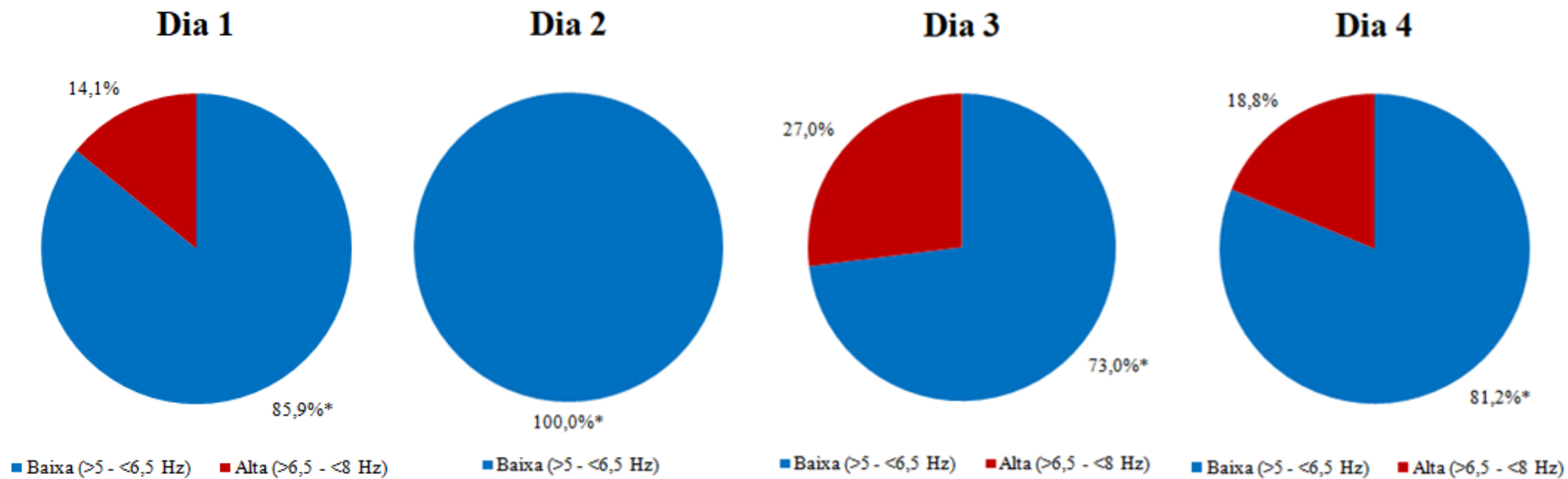


Figura 14 – Percentual das frequências de sucção, por minuto, durante o processo alimentar de ninfas de *A. sculptum*, nos dias 1, 2, 3 e 4 após fixação ao hospedeiro.

*Diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$; Qui quadrado).

5.5. Parâmetros Alimentares e Relativos às Mudanças das Ninfas de *Amblyomma sculptum*

Durante a hematofagia, o grupo de ninfas (N=8) que foi submetido ao eletromiograma ficou, em média, 13,1 dias em contato com o hospedeiro e ingeriu aproximadamente 35,5 vezes o seu peso inicial em sangue. A taxa de ingestão média foi de 4,7 mg/dia (Tabela 9).

Tabela 9 – Parâmetros alimentares de ninfas de *Amblyomma sculptum* alimentadas em camundongos e submetidas ao eletromiograma.

Parâmetros alimentares	Média ± DP	Mínimo – Máximo
Peso Inicial Médio (mg)	0,4 ± 0	0,4 – 0,4
Peso Final (mg)	14,6 ± 5,7	4,4 – 21,0
Ganho de Peso (mg)	14,2 ± 5,7	4,0 – 20,6
Tempo Total de Contato (dias)	3,1 ± 0,6	2,0 – 4,0
Taxa de Ingestão (mg/dia)	4,7 ± 1,7	1,0 – 6,2

Em relação ao intervalo de tempo entre as mudas, as ninfas levaram em média 14,0 dias para atingir o estágio adulto (Tabela 10). Foi observado que a maioria das ninfas (62,5%) deram origem à fêmeas e 37,5% originaram machos. O peso final (PF) das ninfas teve relação com o sexo do estágio adulto a que deram origem (Fig. 15), uma vez que o PF das ninfas que originaram fêmeas foi significativamente maior que o PF das ninfas que originaram machos ($p < 0,05$).

Tabela 10 – Parâmetros relativos às mudas das ninfas de *Amblyomma sculptum*.

N	Mudaram	Número de mudas para		Razão Fêmea:Macho	Pré-ecdise (dias)
		Fêmea	Macho		
8	8 (100%)	5 (62,5%)	3 (37,5%)	1,7:1,0	14,0 ± 0,5

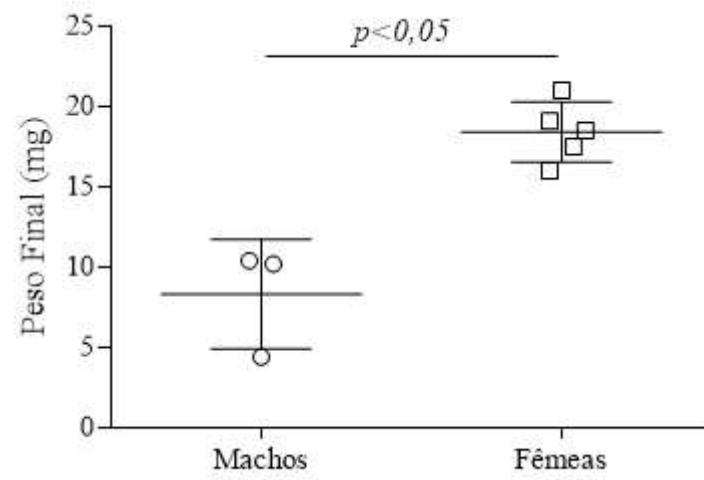


Figura 15 – Peso final das ninfas de acordo com o sexo do estágio adulto a que deram origem. A barra horizontal significa diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$; Teste de Mann-Whitney).

6. DISCUSSÃO

Nesse estudo, foram observados três eventos durante a análise de diferentes dias da alimentação das fêmeas e ninfas de *A. sculptum*, sendo eles: Sucção, Salivação e Inatividade. Em relação à sucção, vimos que a mesma apresentou duas variações de frequências que foram associadas aos picos, por meio das análises dos gráficos gerados no *software* MATLAB 6: uma de alta frequência, variando entre 6,5 e 8 Hz, e outra de baixa frequência, variando entre 5 e 6,5 Hz. Em *R. (B.) microplus*, Tatchell et al. (1972) também descreveram duas variações nas frequências associadas aos picos de sucção, sendo que os autores correlacionaram as variações de frequência com o tipo de alimentação, sendo a de menor frequência associada à alimentação lenta e, a de maior frequência, associada à alimentação rápida. Nesse estudo, a sucção de baixa frequência foi a mais comum durante a hematofagia.

A salivação foi caracterizada pelo aumento repentino da voltagem e, em seguida, seu retorno ao valor basal. Sinais semelhantes, correlacionados à salivação foram observados por Costa e colaboradores (2016), estudando a alimentação de *O. rostratus* em camundongo, sendo caracterizada pelo aumento de voltagem, seguido de retorno lento, formando sinal característico de “*shoulder peak*”. Essa variação na voltagem apresentou amplitudes variadas ao longo da análise da alimentação das fêmeas e das ninfas de *A. sculptum*. Além disso, sua frequência não foi identificada, pois esses sinais apresentavam curtos períodos de tempo que variou de >1 a 4 segundos. Sweatman et al. (1976), ao estudarem *Hyalomma dromedarii*, caracterizaram um sinal semelhante, ao qual denominaram de “expulsão da saliva”. Outras observações referentes à salivação foram vistas por Sweatman & Gregson (1970), ao estudarem o *Hyalomma aegyptium*, quando identificaram eventos como: ejeção da saliva, período do salivário aberto e inativo, flexão do salivário, mudança do salivário predominantemente aberto para o salivário predominantemente fechado e ação salivar durante o período de sucção faríngea, de modo que, para cada um desses eventos, foram vistos sinais distintos. Ainda referente à salivação, vimos um outro tipo de sinal que aqui denominamos como **Salivação X**, também caracterizado por um aumento repentino da voltagem e seu retorno ao valor basal, porém, com um tempo de duração mais curto sem “*shoulder peak*”. Em *R. (B.) microplus*, Waladde et al. (1979) identificaram três sinais distintos para salivação, sendo um semelhante à salivação clássica, com uma alta amplitude, e outro que eles denominaram como salivação separada por períodos de inatividade, cuja duração é semelhante ao que vimos na

salivação X; e um terceiro evento, constituído por um conjunto de picos de salivação ao qual os autores associam a períodos prolongados, com rápidas injeções de saliva, que, em nosso trabalho, não foram identificados. A salivação, em carrapatos, é intercalada com a ingestão de sangue, diferentemente do que acontece com insetos hematófagos como triatomíneos e culicídeos que possuem canal salivar independente do canal alimentar (Lavoipierre et al., 1959). Nos carrapatos o canal salivar e o canal alimentar formam uma única estrutura, constituída pela justaposição do hipóstomo com as quelíceras (Kempet al., 1982). Por esta razão, observamos, nos experimentos de eletromiograma, sinais de salivação independentes e, por vezes, intercalados com sinais de sucção. A saliva dos carrapatos, além de contribuir para a formação da cavidade por onde o sangue é drenado, possui várias proteínas com ação farmacológica anti-hemostática, anti-inflamatória e imunomoduladora que auxiliam no processo de alimentação (Valenzuela, 2004).

Os períodos de inatividade, no presente trabalho, mostraram-se raros, sendo vistos apenas no início da alimentação. Perfil semelhante a este foi visto por Costa et al. (2016), ao estudarem o comportamento alimentar de *O. rostratus*. Entretanto, períodos de inatividade, observados para argasídeos, diferem daqueles vistos em carrapatos ixodídeos de uma maneira geral, os quais mostram longos períodos de inatividade, não somente no início da alimentação, como também nos últimos dias (Sweatman & Gregson, 1970; Tatchell et al., 1972). Ixodídeos, diferentemente de argasídeos, permanecem longos períodos associados aos seus hospedeiros vertebrados.

Eventos como a movimentação das quelíceras não foram vistos nesse estudo, uma vez que os experimentos tiveram início após a fixação do carrapato no hospedeiro. Sinais como estes são vistos justamente durante a implantação das peças bucais, sendo que apenas estudos com carrapatos argasídeos permitem a descrição desse tipo de evento (Zheng et al., 2015; Costa et al., 2016).

As análises qualitativas dos eventos observados durante a alimentação de *A. sculptum* foram feitas, minuto a minuto, considerando o tempo total do experimento. Por meio destas análises, foi visto que os eventos dividiram-se em quatro grupos distintos para as fêmeas de acordo com sua ocorrência, por minuto, sendo eles: Sucção-Salivação-Inatividade, Salivação-Inatividade, Sucção-Salivação e Sucção, e em três grupos distintos para ninfas, sendo eles: Sucção-Salivação, Salivação-Inatividade e Inatividade. O evento Sucção-Salivação foi o mais comum no processo alimentar, tanto para fêmeas quanto para ninfas,

ocorrendo nos quatro dias avaliados. Ainda em relação aos eventos, vimos que a Sucção apresentou o maior percentual do tempo total de análise dos dias de observação das fêmeas e das ninfas em relação à Salivação e Inatividade. A sucção representa o período de ingestão de sangue pelo carrapato.

O uso dos sinais elétricos, nesse estudo, permitiu avaliar, de forma qualitativa, os grupos eventos que ocorreram ao longo da alimentação de fêmeas de *A. sculptum* nos dias 1, 3, 6 e 9, e de ninfas, nos dias 1, 2, 3 e 4 após sua fixação no hospedeiro vertebrado, além dos eventos predominantes e da frequência de sucção mais prevalente ao longo da observação. Análises quantitativas não puderam ser realizadas nesse estudo, pois, os tempos de análises não são representativos para toda a alimentação do *A. sculptum*. Essa dificuldade ocorre pelo tempo em que o carrapato permanece fixado ao seu hospedeiro realizando o repasto sanguíneo. Portanto, nossos experimentos funcionam como “janelas” de observação do comportamento alimentar desses carrapatos. Os carrapatos da família Argasidae têm como característica o fato de realizar seu repasto sanguíneo em um curto período de tempo, o que facilita o acompanhamento e análise de seu comportamento alimentar como um todo, diferentemente do que ocorre com os ixodídeos como o *A. sculptum*, que permanecem fixados em seu hospedeiro por vários dias. Um outro ponto a ser considerado que dificulta o estudo do processo alimentar de ixodídeos é seu tipo de alimentação, onde nos primeiros dias o processo hematofágico é lento (“*slow feeding*”) e nas últimas 24 – 48 horas, durante o período de ingurgitamento, o processo alimentar é rápido (“*fast feeding*”). Costa et al. (2016), realizaram um estudo pioneiro ao quantificar os fenômenos que acontecem na alimentação de *O. rostratus*, uma espécie pertencente à família Argasidae, e neste trabalho os autores quantificaram a frequência de sucção e salivação ao longo do processo alimentar de ninfas de quarto estágio de *O. rostratus*. De forma interessante, Zheng et al. (2015) em seu estudo com *Ornithodoros turicata* observaram por meio de alimentação artificial sinais correspondentes à penetração das peças bucais na membrana do alimentador artificial, salivação, sucção sanguínea e a remoção das peças bucais da membrana de parafina. Costa et al. (2016) também conseguiram acompanhar todo o processo hematofágico ao estudarem o comportamento alimentar de *O. rostratus* identificando sinais correspondentes ao contato inicial, movimentação das quelíceras, sucção, salivação e inatividade. Nesse trabalho não foi possível observar o contato inicial do carrapato com seu hospedeiro nem caracterizar sinais referentes à inserção das peças bucais ou movimentação das quelíceras.

Em relação às ninfas, realizamos ainda uma análise de relação entre o PF das mesmas após a hematofagia e seu estágio evolutivo subsequente. Assim, foi possível observar que, quanto maior o PF de uma ninfa após o repasto maior era a probabilidade deste espécime originar fêmeas. Essa correlação também foi vista em estudos com *Rhipicephalus sanguineus* (Barbieri et al., 2003) e *Amblyomma auricularium* (Pinheiro et al., 2013).

O presente trabalho foi pioneiro em analisar o comportamento alimentar de adultos fêmeas e ninfas de *A. sculptum* utilizando-se da metodologia de eletromiograma. Este trabalho servirá de ponto de partida para entendermos melhor o processo alimentar da principal espécie de carrapato vetora de *Rickettsia rickettsii* no Brasil. Como perspectivas e aplicabilidade desta metodologia no estudo da biologia de ixodídeos poderemos, por exemplo, estudar o comportamento alimentar de carrapatos em hospedeiros tratados com diferentes tipos de acaricida, observando seu impacto no comportamento alimentar dos carrapatos já fixados antes do tratamento. Outra aplicabilidade seria o estudo do comportamento alimentar de carrapatos infectados com patógenos e o estudo de como a infecção impactaria na alimentação dos mesmos. Além disso, esta metodologia poderia ser aplicada em carrapatos fixados em hospedeiros no campo, uma vez que o programa de aquisição de sinais está sendo adaptado para funcionamento em sistema operacional Windows mais moderno, podendo ser instalado em computadores portáteis de fácil deslocamento para o campo. O novo sistema de filtragem e amplificação de sinais já conta com uma bateria recarregável duradoura que também poderia ser utilizada em campo. Desta forma, isso possibilitaria um maior entendimento da alimentação de carrapatos ixodídeos em contato com seus hospedeiros vertebrados habituais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANGUITA, J.; RAMAMOORTHY, N.; HOVIUS, J. W.; DAS, S.; THOMAS, V.; PERSINSKI, R.; CONZE, D.; ASKENASE, P. W.; RINCÓN, M.; KANTOR, F. S.; FIKRIG, E. Salp15, na *Ixodes scapularis* salivary protein, inhibits CD4+ T cell activation. *Immunity*, v. 16, pp. 849–859, 2002.

ARAGÃO, H. B. Ixodidas brasileiros e de alguns países limítrofes. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 31, pp. 759-843, 1936.

ARAGÃO, H. B.; FONSECA, F. Notas de Ixodologia. V. A propósito da validade de algumas espécies do continente Americano (Acari: Ixodidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 51, pp. 485-492, 1961.

ARAÚJO, R. N.; CAMPOS, I. T.; TANAKA, A. S.; SANTOS, A.; GONTIJO, N. F.; LEHANE, M. J.; PEREIRA, M. H. Brasiliensin: A novel intestinal thrombin inhibitor from *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera: Reduviidae) with an important role in blood intake. *International Journal of Parasitology*, v. 37, pp. 1351-1358, 2007.

ARAÚJO, R. N.; COSTA, F. S.; GONTIJO, N. F.; GONÇALVES, T. C.; PEREIRA, M. H. The feeding process of *Cimex lectularius* (Linnaeus, 1758) and *Cimex hemipterus* (Fabricius, 1803) on different blood meal sources. *Journal of Insect Physiology*, v. 55, pp. 1151-1157, 2009.

ARAÚJO, R. N.; GONTIJO, N. F.; GUARNERI, A. A.; GONTIJO, A. F.; SOARES, A. C.; PEREIRA, M. H. Electromyogram of the cibarial pump and the feeding process in hematophagous Hemiptera. In: Prof. Joseph Mizrahi (Ed.), *Advances in Applied Electromyography*. In Tech, Rijeka, pp. 137-158, 2011.

ARAÚJO, R. N.; GONTIJO, N. F.; LAZZARI, C. R.; PEREIRA, M. H. Interação entre os insetos hematófagos e seus hospedeiros vertebrados. In: *Tópicos avançados em entomologia molecular*. Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular, 2012.

BARBIERI, F. S.; CHACÓN, S. C.; FAMADAS, K. M. Morfometria e biologia das ninfas ingurgitadas de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) como prognóstico do sexo dos adultos. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 12, pp. 159-163, 2003.

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

BATISTA, I. F.; RAMOS, O. H.; VENTURA, J. S.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L.; HO, P. L.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M. A new Factor Xa inhibitor from *Amblyomma cajennense* with a unique domain composition. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 493, pp. 151–156, 2010.

BEATI, L.; NAVA, S.; BURKMAN, E. J.; BARROS-BATTESTI, D. M.; LABRUNA, M. B.; GUGLIELMONE, A. A.; CACERES, A. G.; GUZMAN-CORNEJO, C. M.; LEON, R.; DURDEN, L. A.; FACCINI, J. L. *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae), the Cayenne tick: Phylogeography and evidence for allopatric speciation. *BMC Evolutionary Biology*, v.13, pp. 267-287, 2013.

BITENCOURTH, K.; VOLOCH, C. M.; SERRA-FREIRE, N. M.; MACHADO-FERREIRA, E.; AMORIM, M.; GAZÊTA, G. S. Analysis of *Amblyomma sculptum* haplotypes in an area endemic for Brazilian spotted fever. *Medical and Veterinary Entomology*, v. 30, pp. 342–350, 2016.

BOCKENSTEDT, L. K.; GONZALEZ, D.; MAO, J.; LI, M.; BELPERRON, A. A.; HABERMAN, A. What ticks do under your skin: two-photon intravital imaging of *Ixodes scapularis* feeding in the presence of the Lyme disease spirochete. *Yale Journal of Biology and Medicine*, v. 87, pp. 3-13, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portal da Saúde. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/693-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/febre-maculosa/11269-situacao-epidemiologica-dados>>. Acesso em: 16 jan. 2017.

CHEN, Z.; YANG, X.; BU, F.; YANG, X.; YANG, X.; LIU, J. Ticks (Acari: Ixodoidea: Argasidae, Ixodidae) of China. *Experimental and Applied Acarology*, v. 51, pp. 393-404, 2010.

CIPRANDI, A.; OLIVEIRA, S. K.; MASUDA, A.; HORN, F.; TERMIGNONI, C. *Boophilus microplus*: Its saliva contains microphilin, a small thrombin inhibitor. *Experimental Parasitology*, v. 114, pp. 40–46, 2006.

COSTA, G. C. A.; SOARES, A. C.; PEREIRA, M. H.; GONTIJO, N. F.; SANT'ANNA, M. R. V.; ARAÚJO, R. N. Physiological characterization of the hematophagy of *Ornithodoros rostratus* (Acari: Argasidae) on live hosts. *Journal of Experimental Biology*, v. 219, pp. 3656-3664, 2016.

DAIX, V.; SCHROEDER, H.; PRAET, N.; GEORGIN, J. P.; CHIAPPINO, I.; GILLET, L.; DE FAYS, K.; DECREM, Y.; LEBoulLE, G.; GODFROID, E.; BOLLEN, A.; PASTORET, P. P.; GERN, L.; SHARP, P. M.; VANDERPLASSCHEN, A. Ixodes ticks belonging to the *Ixodes ricinus* complex encode a family of anticomplement proteins. *Insect Molecular Biologie*, v. 16, pp. 155-166, 2007.

ESTRADA-PEÑA, A.; TARRAGONA, E. L.; VESCO, U.; MENEGHI, D.; MASTROPAOLO, M.; MANGOLD, A. J.; GUGLIELMONE, A. A.; NAVA, S. Divergent environmental preferences and areas of sympatry of tick species in the *Amblyomma cajennense* complex (Ixodidae). *International Journal for Parasitology*, v.44, pp. 1081–1089, 2014.

FRANCO, P. F.; SILVA, N. C.; FAZITO DO VALE, V.; ABREU, J. F.; SANTOS, V. C.; GONTIJO, N. F.; VALENZUELA, J. G.; PEREIRA, M. H.; SANT'ANNA, M. R.; GOMES, A. P.; ARAUJO, R. N. Inhibition of the classical pathway of the complement system by saliva of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). *Experimental Parasitology*, v. 164, pp. 91-96, 2016.

GUARNERI, A. A.; DIOTAIUTI, L.; GONTIJO, A. F.; PEREIRA, M. H. Comparison of feeding behaviour of *Triatoma infestans*, *Triatoma brasiliensis* and *Triatoma pseudomaculata* in different hosts by electronic monitoring of the cibarial pump. *Journal of Insect Physiology*, v. 46, pp. 1121-1127, 2000.

GUGLIELMONE, A. A.; BECHARA, G. H.; SZABÓ, M. P. J.; BARROS-BATTESTI, D. M.; FACCINI, J. L. H.; LABRUNA, M. B.; DE LA VEGA, R.; ARZUA, M.; CAMPOS PEREIRA, M.; FURLONG, J.; MANGOLD, A. J.; MARTINS, J. R.; RODRÍGUES, M.; SERRA-FREIRE, N. M.; VENZAL, J. M. Ticks of importance for domestic animals in Latin America and Caribbean countries. Netherlands: International Consortium on Ticks and Tick-Borne Disiases-2 of the European Comission INCO-DEV programme, 2004.

GUIMARÃES, J. H.; TUCCI, E. C.; BARROS-BATTESTI, D. M. Ectoparasitas de importância veterinária. São Paulo: Editora Plêiade/FAPESP, pp. 52-104, 2001.

HANNIER, S.; LIVERSIDGE, J.; STERNBERG, J. M.; BOWMAN, A. S. Characterization of the B-cell inhibitory protein factor in *Ixodes ricinus* tick saliva: a potential role in enhanced *Borrelia burgdoferi* transmission. *Immunology*, v. 113, pp. 401–408, 2004.

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

KEIRANS, J. E. Order Ixodida. In: KRANTZ, G.; WALTER, D. (Eds.), *A Man. Acarol.* Texas Tech University Press, Lubbock, pp. 111–123. 2009.

KEMP, D. H.; STONE, B. F.; BINNINGTION, K.C. Tich attachment and feeding: role of themouthparts, feeding apparatus, salivary gland secretions and the host response. In: OBENCHAIN, F.D.; GALUN, R. (Eds.). *Physiology of ticks*, Pergamon Press, pp. 509, 1982.

KERBER, C. E.; LABRUNA, M. B.; FERREIRA, F.; WAAL, D. T.; KNOWLES, D. P.; GENNARI, S. M. Prevalence of equine Piroplasmosis and its association with tick infestation in the State of São Paulo, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria*, v.18, n. 4. 2009.

LAVOPIERRE, M. M.; DICKERSON, G.; GORDON, R. M. 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. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, v. 53, pp. 235–250, 1959.

LEHANE, M. The biology of blood-sucking in insects. New York: Cambridge University Press, 2005.

MCLEAN, D. L.; KINSEY, M. G. A technique for electrically recording aphid feeding and salivation. *Nature*, v. 202, pp. 1358-1359, 1964.

NAVA, S.; BEATI, L.; LABRUNA, M. B.; CÁCERES, A. G.; MANGOLD, A. J.; GUGLIELMONE, A. A. Reassessment of the taxonomic status of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) with the description of three new species, *Amblyomma tonelliae* n. sp., *Amblyomma interandinum* n. sp. and *Amblyomma patinoi* n. sp., and reinstatement of *Amblyomma mixtum* Koch, 1844 and *Amblyomma sculptum* Berlese, 1888 (Ixodida: Ixodidae). *Ticks and Tick-borne Diseases*, v. 5, pp. 252-276, 2014.

PEREIRA, M.; LABRUNA, M. B. Febre maculosa: Aspectos clínicos e epidemiológicos. *Revista Clínica Veterinária*, v. 12, pp. 19–23, 1998.

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

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

RIBEIRO, J.; ENDRIS, T. M.; ENDRIS, R. Saliva of the soft tick, *Ornithodoros moubata*, contains anti-platelet and apyrase activities. *Comparative Biochemistry and Physiology*. v. 100, pp. 109– 112, 1991.

RIBEIRO, J. M. Blood-feeding arthropods: Live syringes or invertebrate pharmacologists? *Infectious Agents and Disease*, v. 4, pp.143-152, 1995.

RIBEIRO, J. M.; MATHER, T. N. *Ixodes scapularis*: Salivary kininase activity is a metallodipeptidylcarboxypeptidase. *Experimental Parasitology*, v. 89, pp. 213–221, 1998.

RIBEIRO, M. F.; DA SILVEIRA, J. A.; BASTOS, C. V. Failure of the *Amblyomma cajennenses* nymph to become infected by *Theileria equi* after feeding on acute or chronically infected horses. *Experimental Parasitology*, v. 128, pp. 324-327, 2011.

RODRIGUES, V. S.; PINA, F. T. B.; BARROS, J. C.; GARCIA, M. V.; ANDREOTTI, R. Carrapato-estrela (*Amblyomma sculptum*): Ecologia, biologia, controle e importância. Embrapa, 2015.

SANT'ANNA, M. R. V.; DIOTAIUTI, L.; GONTIJO, A. F.; GONTIJO, N. F.; PEREIRA, M. H. Feeding behaviour of morphologically similar *Rhodnius* species: influence of mechanical characteristics and salivary function. *Journal of Insect Physiology*, v. 47, pp. 1459-1465, 2001.

SILVA, N. C.; VALE, V. F.; FRANCO, P. F.; GONTIJO, N. F.; VALENZUELA, J. G.; PEREIRA, M. H.; SANT'ANNA, M. R.; RODRIGUES, D. S.; LIMA, W. S.; FUX, B.; ARAUJO, R. N. Saliva of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) inhibits classical and alternative complement pathways. *Parasitology of Vectors*, v. 9, pp. 445, 2016.

SMITH, J. J. B. Effect of diet viscosity on the operation of the pharyngeal pump in the blood-feeding bug *Rhodnius prolixus*. *Journal of Experimental Biology*, v. 82, pp. 93-104, 1979.

SOARES, A. C.; CARVALHO-TAVARES, J.; GONTIJO, N. F.; DOS SANTOS, V. C.; TEIXEIRA, M. M.; PEREIRA, M. H. Salivation pattern of *Rhodnius prolixus* (Reduviidae: Triatominae) in mouse skin. *Journal of Insect Physiology*, v. 52, pp. 468-472, 2006.

SOARES, A. C.; ARAÚJO, R. N.; CARVALHO-TAVARES, J.; GONTIJO, N. F.; PEREIRA, M. H. Intravital microscopy and image analysis of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) hematophagy: the challenge of blood intake from mouse skin. *Parasitology International*, v. 63, pp. 229-236, 2014.

SWEATMAN, G. K.; GREGSON, J. D. Feeding electrograms of *Hyalomma aegyptium* ticks at different temperatures. *Journal of Medical Entomology*, v. 7, pp. 575-584, 1970.

SWEATMAN, G. K.; TOMEY, G.; KATUL, G. A technique for the continuous recording of tick feeding electrograms and temperature by telemetry from free-ranging cattle. *International Journal for Parasitology*. v. 6. pp. 299-305, 1976.

SZABÓ MP, PINTER A, LABRUNA MB. Ecology, biology and distribution of spotted-fever tick vectors in Brazil. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 3, pp. 27, 2013.

TATCHELL, R. J.; CARNELL, R.; KEMP, D. H. Electrical studies on the feeding of the cattle-tick, *Boophilus microplus*. *Parasitology Research*, v. 38, pp. 32-44, 1972.

VALENZUELA, J. G.; CHARLAB, R.; MATHER, T. N.; RIBEIRO, J. M. Purification, cloning, and expression of a novel salivary anticomplement protein from the tick, *Ixodes scapularis*. *Journal of Biologic Chemistry*.v. 275, pp. 18717-18723, 2000.

VALENZUELA, J. G. Exploring tick saliva: from biochemistry to 'sialomes' and functional genomics. *Parasitology*, v. 129, pp. 83-94, 2004.

VALENZUELA, J. G. Blood-feeding arthropod salivary glands and saliva. In: Marquardt WC (Ed.), *Biology of disease vectors*, Elsevier Academic Press, p. 785, 2005.

WALADDE, S. M.; KEMP, D. H.; RICE, M. J. Feeding electrograms and fluid uptake measurements of cattle tick *Boophilus microplus* attached on artificial membranes. *International Journal for Parasitology*. v. 9, pp. 89-95, 1979.

YU, D.; LIANG, J.; YU, H.; WU, H.; XU, C.; LIU, J.; LAI, R. A tick B-cell inhibitory protein from salivary glands of the hard tick, *Hyalomma asiaticum asiaticum*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 343, pp. 585-590, 2006.

ZHENG, H.; LI, A Y.; TEEL, P. D.; LEÓN, A. A. P.; SESHU, J.; LIU, J. Biological and physiological characterization of *in vitro* blood feeding in nymph and adult stages of *Ornithodoros turicata* (Acari: Argasidae). *Journal of Insect Physiology*, v. 75, pp. 73-79, 2015.

ANEXO

ANEXO A



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação do Comportamento Alimentar de *Amblyomma sculptum* Berlese, 1888 (Acarí: Ixodidae) em Camundongos", protocolo do CEUA: 361/2017 sob a responsabilidade de Maurício Roberto Viana Sant'Anna que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.890 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 27/04/2018.

Vigência da Autorização	23/04/2018 a 22/04/2023
Finalidade	Pesquisa
*Espécie/linhagem	Camundongo heterogêneo / Linhagem Hairless
Nº de animais	4
Peso/idade	30mg / 7(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério CEBIO UFMG

Considerações posteriores:

27/04/2018	Aprovado com recomendação na reunião do dia 23/04/2018. Validade: 23/04/2018 a 22/04/2023 Prezado(a) pesquisador(a) o biotério onde sua pesquisa será realizada não está com cadastro e credenciamento finalizado no novo site do CIUCA/CONCEA. Solicitamos informar ao responsável pelo biotério para concluir o cadastro, porque em breve somente poderemos aprovar os que estiverem devidamente cadastrados e credenciados. Aprovado na reunião do dia 23/04/2018.
------------	--

Belo Horizonte, 29/04/2018.

Atenciosamente,

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

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

