

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

ASPECTOS DA ECOLOGIA QUÍMICA DE *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (ACARI: IXODIDAE) EM DUAS RAÇAS DE CÃES

Doutorando(a): Carla Cristina Braz Louly
Orientador(a): Profa. Dra. Lígia Miranda Ferreira Borges

Goiânia
2008

CARLA CRISTINA BRAZ LOULY

ASPECTOS DA ECOLOGIA QUÍMICA DE *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (ACARI: IXODIDAE) EM DUAS RAÇAS DE CÃES

Tese apresentada para a obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal junto à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás.

Área de Concentração:

Sanidade Animal

Orientador:

Profa. Dra. Lígia Miranda Ferreira
Borges – IPTSP/UFG

Comitê de Orientação:

Prof. Dr. Guido Fontgalland
Coelho Linhares - EV/UFG
Profa. Dra. Andréa Caetano da
Silva– IPTSP/UFG

**GOIÂNIA
2008**

AGRADECIMENTOS

À Deus acima de tudo pelo amparo e conforto nos momentos mais difíceis.

Ao meu esposo Solowich, pelo amor, apoio, compreensão e companheirismo ao longo de mais esta jornada, me ajudando em cada momento da realização deste trabalho.

À minha mãe Lia, e ao meu irmão Carlos Alberto por todas às vezes que me acompanharam na realização do experimento e pelo carinho em todas as horas. Ao meu pai Carlos Alberto, pelo apoio, carinho e incentivo em todas as horas.

À Professora Lígia Miranda Ferreira Borges por sua compreensão, dando-me apoio nos momentos mais difíceis e pela amizade, fundamentais para a conclusão deste trabalho.

Aos queridos amigos do Centro de Parasitologia, pela valiosa ajuda para a realização deste estudo, e também pelos momentos de alegria e descontração que tornaram esta jornada mais fácil.

Aos meu co-orientadores os professores Andrea Caetano da Silva e Guido Fontgalland Coelho Linhares pela orientação e apoio durante o trabalho.

Ao Professor Pedro Henrique Ferri por sua valorosa colaboração, sua paciência e orientação importantes para a elaboração deste estudo.

A todos os professores e funcionários da Escola de Veterinária da UFG, por me acolher e apoiar nestes quatro anos.

Ao Hospital Veterinário da EV/UFG, e a todos os funcionários pela cessão dos canis para a realização do experimento.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro fundamental para concretização deste trabalho.

Aos animais, coelhos e cães, fundamentais para a concretização deste estudo, meu respeito e carinho.

“Ser feliz é reconhecer que vale a pena viver, apesar de todos os desafios, incompreensões e períodos de crise. Ser feliz é deixar de ser vítima dos problemas e se tornar um autor da própria história. É atravessar desertos fora de si, mas ser capaz de encontrar um oásis no recôndito da sua alma. É agradecer a Deus a cada manhã pelo milagre da vida. Ser feliz é não ter medo dos próprios sentimentos. É saber falar de si mesmo. É ter coragem para ouvir um não. É ter segurança para receber uma crítica, mesmo que injusta. Pedras no caminho? Guardo todas, um dia vou construir um castelo...”.

Fernando Pessoa

ÍNDICE

CAPÍTULO 1: Considerações Gerais	1
Referências	5
CAPÍTULO 2: More about the role of 2,6-dichlorophenol in tick courtship: identification and olfactometer bioassay in <i>Amblyomma cajennense</i> and <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	9
Resumo	9
Abstract	9
Introduction.....	10
Materials and Methods	12
Results.....	15
Discussion	15
References	18
CAPÍTULO 3: Comparison of the susceptibility to <i>Rhipicephalus sanguineus</i> (Acari: Ixodidae) of two breeds of dogs, The English Cocker Spaniel and Beagle.....	25
Resumo	25
Abstract	26
Introduction.....	27
Materials and Methods	29
Results.....	31
Discussion	33
Acknowledgment.....	36
References	36
CAPÍTULO 4: <i>Rhipicephalus sanguineus</i> distingue cães sensíveis dos resistentes.....	43
Resumo	43
Abstract	44
Introdução:.....	45
Material e Métodos	47
Resultados	50
Discussão.....	52
Agradecimentos	55

Referências:	55
CAPÍTULO 5: Considerações Finais	62

CAPÍTULO 1: Considerações Gerais

Rhipicephalus sanguineus é provavelmente a espécie de ixodídeo mais amplamente distribuída em todo o mundo, sendo adaptado nas Américas do Norte, Central e do Sul, nas regiões Leste e Oeste da Índia, China, Austrália, Micronésia, Sudeste da Europa, Madagascar e África (Soulsby, 1966). Originária do continente africano, onde existem aproximadamente 20 espécies do gênero *Rhipicephalus*, a espécie *R. sanguineus* está distribuída em todo território nacional e acredita-se que tenha sido introduzida no Brasil por volta do século XVI, com a entrada dos colonizadores europeus e seus animais (Labruna, Pereira, 2001).

O grupo *R. sanguineus* engloba várias espécies que se apresentam morfológicamente semelhantes e cuja posição taxonômica ainda é incerta, sendo elas *Rhipicephalus turanicus* e *Rhipicephalus camicasi* além do próprio *R. sanguineus*. Existem relatos destas espécies parasitando diversos mamíferos e até aves rasteiras, mas como a sua diferenciação muitas vezes não é possível, não existe um consenso entre os pesquisadores sobre a especificidade parasitária das mesmas (Soulsby, 1966; Uspensky et al., 1997; Guglielmone et al., 2006). Sabe-se que existem diferenças morfológicas, biológicas e genéticas entre cepas provenientes do Brasil e da Argentina (Oliveira et al., 2005, Szabó et al., 2005), porém estudos filogenéticos mais aprofundados são necessários e a única espécie reconhecida na América do Sul ainda é o *R. sanguineus* (Guglielmone et al., 2006).

No Brasil, o seu hospedeiro preferencial é o cão doméstico, sendo que raramente é encontrado parasitando outros hospedeiros, como cavalos, bovinos e o homem, e quando ocorre este parasitismo geralmente está associado com um estreito contato destes hospedeiros com o cão (Labruna, Pereira 2001; Dantas Torres, 2006; Louly et al., 2006). Este ixodídeo apresenta importância médica, por ser ocasionalmente encontrado parasitando o homem, sendo o principal vetor da *Rickettsia conorii* agente da Febre Botonosa (Merle et al., 1998) que ocorre em várias regiões da Europa e da África. Nas Américas já foi relatado como vetor da *Rickettsia rickettsii* ,

no estado de Arizona, Estados Unidos (Demma et al., 2005). No Brasil é indicado como vetor em potencial da borreliose ou “Lyme simile”, causada pela *Borrelia* sp. (Yoshinari et al., 1997).

Esta espécie é conhecida vulgarmente como carrapato vermelho do cão devido à coloração castanho avermelhada de seu escudo (Labruna e Pereira, 2001). Apresenta grande importância veterinária podendo causar anemia devido a uma intensa espoliação sanguínea, além da transmissão de doenças ao cão como a babesiose pela *Babesia canis*, (Woldehiwet, Ristic, 1993), ou pela *Babesia gibsoni* (Trapp et al., 2006), pancitopenia tropical canina, causada pela *Ehrlichia canis*, hepatozoonose causada pelo *Hepatozoon canis*, a trombocitopenia cíclica canina causada pelo *Anaplasma platys* e a hemobartonelose pelo *Mycoplasma haemocanis* (Woldehiwet, Ristic, 1993).

Uma característica desta espécie de ixodídeo é a de causar explosões populacionais quando em condições climáticas favoráveis e na presença constante do cão. Este fato levou vários pesquisadores a questionar se o cão é capaz de desenvolver resistência a este carrapato. Os estudos realizados visando determinar se o cão é ou não capaz de desenvolver uma resposta contra o *R. sanguineus* não foram conclusivos. Ferreira, Bechara (1995), Bechara et al. (1995) e Szabó et al. (1995) afirmam que o cão é incapaz de desenvolver resistência, enquanto Inokuma et al. (1997) e Jitapallapong et al. (2000b) sugerem que a resistência está presente, porém pode variar de acordo com a raça, e que o *R. sanguineus* apresenta uma resposta eficaz para burlar os efeitos desta resistência. Porém, em estudos com infestações artificiais em hospedeiros não preferenciais, como porquinhos-da-índia e hamsters, foi observada uma forte resistência já na segunda infestação (Szabó et al., 1995).

A ausência de resistência por parte do hospedeiro é comum em modelos de interação em que ocorreu uma adaptação co-evolutiva por um longo período, sendo que a resistência do hospedeiro é inversamente proporcional ao nível de adaptação (Penna, 1991; Rechav, 1992). Inokuma et al. (1999) demonstraram que a titulação de anticorpos anti *R. sanguineus* era menor em animais com nível de infestação mais alta sugerindo que

aparentemente o *R. sanguineus* apresenta substâncias capazes de limitar a expressão da resistência por parte do cão.

O *R. sanguineus* é um carrapato de ciclo trioxeno, ou seja, realiza a ecdise no meio ambiente, necessitando de três hospedeiros para completar seu ciclo. É uma espécie de hábito nidícola, sendo extremamente adaptada ao habitat do cão (Sonenshine, 1993; Santos Silva, Filipe, 1998). Como passa grande parte de seu ciclo no meio ambiente, sofre grande influência das condições climáticas, podendo variar o número de gerações por ano de acordo com a variação de temperatura, umidade e fotoperíodo (Guglielmone et al., 2006). No Brasil, não existem relatos deste carrapato realizando diapausa, e o número de gerações por ano varia de 2 a 5 (Guglielmone et al., 2006, Louly et al., 2006, Silveira, 2008).

Esta espécie busca ativamente o hospedeiro, porém em situações especiais pode utilizar a estratégia de emboscada na localização do mesmo. A escolha do tipo de busca é regulada principalmente pelas condições do ambiente, especialmente a umidade relativa do ar (Uspensky, 2002). Os carrapatos, de forma geral, utilizam vários estímulos térmicos, sonoros, visuais, olfativos, gustativos e táteis na fase de busca pelo hospedeiro (Wallade, Rice, 1977), quanto a *R. sanguineus*, sabe-se somente que é largamente atraído por CO₂ (Stella, et al., 1988; Louly, 2003), e pelo latido de cão (Sonenshine, 1993).

Os animais utilizam substâncias químicas como uma forma de comunicação intra e interespecífica. Estas substâncias são conhecidas como semioquímicos e podem atuar dentro de indivíduos de uma mesma espécie como os feromônios, ou entre indivíduos de espécies diferentes como os alomônios e cairomônios (Vilella, Della Lúcia, 2001). Os cairomônios podem servir como sinalizadores para o carrapato tanto da presença do hospedeiro, como de um local no meio ambiente no qual seja mais provável o encontro do mesmo (Carroll, 1999). Estas substâncias podem atuar tanto na orientação do carrapato, como ocorre com o CO₂, tendo função de atraente, como podem ser percebidas pelo contato, funcionando como um arrestante. Quando percebe uma substância arrestante o carrapato cessa suas atividades locomotoras, aguardando outro sinal que indique a presença do hospedeiro (Carroll, 1999; Sonenshine,

2006). Outras substâncias, como alguns componentes da urina, moléculas liberadas pela respiração ou substâncias encontradas na pele dos animais foram demonstradas como atrativas para outras espécies de carrapatos (Carroll, 1999; Osterkamp et al., 1999; MacMahon, Guerin, 2002). Porém nenhum estímulo, seja ele químico, físico ou mecânico, é responsável por desencadear uma resposta de forma isolada, sendo que a associação de estímulos pode atuar de forma sinérgica para uma espécie e antagônica para outra (Kennedy, 1978).

A fase de busca pelo hospedeiro é de extrema importância para carrapatos metastriatas, pois além da realização do repasto sanguíneo para assegurar a sobrevivência, necessitam de uma prévia ingestão de sangue para atingirem a maturação sexual e realizarem a cópula, que ocorre no hospedeiro (Uspensky, 2002; Oliver, 1974). De forma geral, o macho e a fêmea iniciam a alimentação, e após um período de aproximadamente quatro dias a fêmea cessa a ingestão de sangue, enquanto o macho se desprende e a localiza para iniciar a cópula (Oliver, 1974).

Segundo Sonenshine (1991) uma hipótese do comportamento de cópula em metastriatas segue uma seqüência geral: a orientação é mediada por um feromônio sexual de atração, que é secretado pela fêmea indicando para o macho que a mesma está apta para a cópula; a percepção do feromônio de monta; o macho monta a fêmea e passa para a posição ventral; a identificação do poro genital e transferência do espermatóforo.

Os estudos preliminares sobre feromônios em carrapatos identificaram um composto como feromônio sexual de atração, o 2,6-diclorofenol, que já foi descrito em mais de 17 espécies de ixodídeos, sendo que das quatro espécies de maior importância econômica que ocorrem no Brasil este composto já foi identificado em três, dentre elas *R. sanguineus* (Chow et al., 1975). Em *Dermacentor nitens* (Neumann) este composto atua como feromônio sexual de atração e de monta e em *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini) atua parcialmente como um atraente sexual, porém o seu papel na regulação do comportamento de cópula de *R. sanguineus* ainda não foi determinado.

A principal forma de controle de ixodídeos é o uso de acaricidas, porém o uso excessivo destas substâncias ocasiona o aparecimento de

cepas resistentes (Miller et al., 2001). Desta forma, o encontro de substâncias químicas como feromônios e cairomônios que participam da ecologia química deste carrapato e que possam ser introduzidas no seu controle parece uma boa alternativa, pois atuam preferencialmente sobre a espécie alvo e diminuem a quantidade de carrapaticida a ser utilizada. O uso do 2,6-diclorofenol no controle de carrapatos tem apresentado bons resultados (Ziv et al., 1981; Silva, 2004). Norval et al. (1996) e Allan et al. (1998) usaram iscas impregnadas com feromônios e acaricidas para controle *A. hebraeum* e *A. variegatum*, respectivamente.

Diante da complexidade do comportamento de *R. sanguineus*, o objetivo deste trabalho foi estudar alguns aspectos da sua ecologia química e da interação parasito-hospedeiro, sendo eles: 1- demonstrar se o 2,6 diclorofenol desempenha algum papel no comportamento de cópula; 2- avaliar se existe diferença de suscetibilidade entre duas raças de cães o Cocker Spaniel Inglês e o Beagle; 3- avaliar se é capaz de diferenciar animais resistentes e sensíveis na fase de busca pelo hospedeiro: 4- avaliar a sua resposta aos extratos de pele de cães das duas raças.

Referências

ALLAN, S. A., BARRÉ, N., SONENSHINE, D. E., BURRIDGE, M. J. Efficacy of tags impregnated with pheromones and acaricide for control of *Amblyomma variegatum*. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 12, p.141-150, 1998.

CARROLL, J. F. Responses of Three Species of Adult Ticks (Acari: Ixodidae) to Chemicals in the Coats of Principal and Minor Hosts. **Journal of Medical Entomology**, v. 36 (3), p. 238-242, 1999.

CHOW, Y. S., WANG, C. B., LIN, L C. Identification of a sex pheromone of the female brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 68, p.485-488, 1975.

DANTAS-TORRES F., FIGUEREDO L.A., BRANDÃO-FILHO S.P. *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae), the brown dog tick, parasitizing humans in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, p. 64-67. 2006.

FERREIRA, B. R., G. H. BECHARA. Imunidade a carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* (acari: Ixodidae) em cachorro – do – mato *Cercopithecus thomasi*

(LINNAEUS) e no cão doméstico. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 32(4), p. 232-237, 1995.

GUGLIELMONE, A. A., SZABÓ, M. P. J., MARTINS, J. R. S., ESTRADA-PEÑA, A. Diversidade e importância de carrapatos na sanidade animal. IN: **Carrapatos de Importância médico-veterinária da região neotropical, um guia ilustrado para identificação das espécies**; por Darci Moraes Barros-Battesti, Márcia Arzua e Gervásio Henrique Bechara. São Paulo, Vox/ICTTD-3/Butantan, p. 115-138, 2006.

INOKUMA, H., TAMURA, K., ONISHI, T. Dogs develop resistance to *Rhipicephalus sanguineus*. **Veterinary Parasitology**, v 68, p 295-297, 1997.

INOKUMA, H.; M, MUKAY, Y, YAMAMOTO, K, OHNO.; T, ONISHI., Duration of antibodies against 24kd protein of *Rhipicephalus sanguineus* extract in dogs infested with the adult ticks. **Journal of. Veterinary and . Medical Science**, v. 61(2), p. 179-181. 1999.

JITTAPALAPONG, S.; STICH, R.W.; WITTUM, T. E.; BARRIGA, O. O. Performance of female *Rhipicephalus sanguineus* fed on dogs exposed to a multiple infestation or imunuzation with tick salivary gland or midgut. **Journal of Medical Entomology**, v.. 37, p. 601-611, 2000.

LABRUNA, M.B., M.C. PEREIRA. Carrapatos em cães no Brasil. **Clínica Veterinária**, v. 6, n. 30, p. 24-32, 2001.

LOULY, C. C. B. **Dinâmica sazonal de *Rhipicephalis sanguineus*, no canil da policia militar, em Goiânia-Goiás, Brasil**. 54f. Dissertação (Mestrado em Sanidade Animal)- Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2003.

LOULY, C. C. B., FONSECA, I. N., OLIVEIRA, V. F., BORGES, L. M. F. ocorrência de *Rhipicephalus sanguineus* em trabalhadores de clínicas veterinárias e canis, no município de goiânia, go. **Ciência Animal Brasileira**, v. 7, n. 1, p. 103-106, 2006.

LOULY, C. C. B., FONSECA, I. N., OLIVEIRA, V. F., LINHARES, G. F. C., MENEZES, L. B., BORGES, L. M. F. Seasonal dynamics of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in dogs from a police unit in Goiânia, Goiás, Brazil. **Ciência Rural**, v.37, n.2, p.464-469, 2007.

MCMAHOM, C., GUERIN, P. M. Attraction of the tropical bont tick, *Amblyomma variegatum*, to human breath and to the breath components acetone, NO and CO₂. **Naturwissenschaften**, v. 89, p 311-31, 2002.

MERLE, C., SOTTO, A., BARBUAT, C., JOURDAN, J. Disease course of Medeterranean Spotted Fever: remark on 16 cases. **7e Colloque sur le**

Controle Epidemiológico das Maladies Infectieuses, Paris, France. Institut Pasteur de Paris, v. 28, p 400-401, 1998.

MILLER, R.J.; GEORGE, J.E.; GERREIRO, F.; CARPENTER, L.; WELCH J.B. 2001. Characterization of acaricide resistance in *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille) (Acari: Ixodidae) collected from the Corozal Army Veterinary Quarantine Center, Panama. **Journal of Medical Entomology**, v. 38, p. 293-302, 2001.

NORVAL, R. A.I., SONENSHINE, D. E., ALLAN, S. A., BURRIDGE, M.J. Efficacy of pheromone-acaricide-impregnated tail-tag decoys for controlling the Bont tick, *Amblyomma hebreum* (Acari: Ixodidae) in Zimbabwe. **Experimental and Applied Acarology**, v. 20, p. 31-46, 1996.

OLIVEIRA, P. R., BECHARA, G. H., DENARDI, S. E., SAITO, K. C., NUNES E. T., SZABO, M. P. J., MATHIAS, M. I. C. Comparison of the external morphology of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) ticks from Brazil and Argentina. **Veterinary Parasitology**, v. 129, p. 139-147, 2005.

OSTERKAMP, J., WAHL, U. SCHMALFUSS, G. HAAS, W. Host-odour recognition in two species is cided in a blend of vertebrate volatiles. **Journal of Comparative Physiology**, v. 185, p. 59-67, 1999.

RECHAV, Y. Naturally acquired resistance to ticks- A global view. **Insect Science Applied**, v. 13, n. 4, p. 495-504, 1992.

SANTOS SILVA, M.M., FILIPE, A.R. Ciclos biológicos de ixodídeos em condições de laboratório. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 93, p 143-147, 1998.

SILVA, L.S. **Uso de iscas de 2,6-diclorofenol associado ou não a acaricida para o controle de *Anocentor nitens***. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária - Sanidade Animal) - Universidade Federal de Goiás, 2004. (57).

SILVEIRA, J. A. G. **Dinâmica sazonal de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806), no município de Belo Horizonte, Minas Gerais**. dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008. (64p.)

SONENSHINE, D.E. **Biology of Ticks**.. New York: Oxford University Press. EUA, v. 1, 1991, 447p.

SONENSHINE, D.E. **Biology of Ticks**. New York: Oxford University Press. EUA, v. 2, 1993, 463p.

SOULSBY, E.J.L. **Biology of Parasites. Emphasis on Veterinary Parasitosis**. Academic Press. New York an London, p 72-77, 1966.

STELLA, E., KHOURY, C., D'AMATO, F.R., RIVOSECCHI, L. New data on the biology of *R. sanguineus* in the outskirts of Rome. **Rivista di Parasitologia**, v.49, p. 3-12, 1988.

SZABÓ, M. P. J., MUKAI, L. S., ROSA, P. C. S., BECHARA, G. H. Differences on the acquired resistance in dogs, guinea pigs and hamsters to repeated infestations with *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) adult's. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 32, n. 1, p. 43-50, 1995.

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

TRAPP, S. M., MESSICK, J. B., VIDOTTO, O., JOJIMA, F. S., MORAIS, H. S. A. *Babesia gibsoni* genotype Asia in dogs from Brazil, **Veterinary Parasitology**, v. 141, n. 1-2, p. 177-180. 2006

USPENSKY, I. I., MUMCUOGLU, K. Y., USPENSKY, I. GALUN, R. *Rhipicephalus sanguineus* and *R. turanicus* (Acari: Ixodidae): Closely Related species with Different Biological Characteristics. **Journal of Medical Entomology**, 34(1), p. 74-81, 1997.

USPENSKY, I. Preliminary observation on specific adaptations of exophilic ixodid ticks to forests or open country habitats. **Experimental and Applied Acarology**, v. 28, p. 147-154, 2002.

WALADDE, S. M., RICE, M. J.. The sensory nervous system of the adult cattle tick *Boophilus microplus* (Canestrini) Ixodidae. Part III. Ultra-structure and electrophysiology of cheliceral receptors. **Journal of the Australian Entomological Society**, v.16, p. 441-453, 1977.

WOLDEHIWET, Z., RISTIC, M. **Rickettsial and Chlamydial, Diseases of Domestic Animals**. New York. USA, 1993. 427p.

YOSHINARI, N.H., BARROS, P.J.L., BONOLDI, V.L.N., ISHIKAWA, M., BATTESTI, D.M.B., PIRANA, S., FONSECA, A.H., SCHUMAKER, T.T. Perfil da Borreliose de Lyme no Brasil. São Paulo. **Revista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina**, v. 52, p. 111-117, 1997.

ZIV, M. SONENSHINE, D.E. SILVERSTEIN, R. M., WEST, J.R., GINGHER, K. H. Use of sex pheromone, 2,6 diclorophenol, to disrupt mating by American dog tick, *Dermacentor variabilis* (Say). **Journal of Chemical Ecology**, v.7, p. 829-840, 1981.

CAPÍTULO 2: More about the role of 2,6-dichlorophenol in tick courtship: identification and olfactometer bioassay in *Amblyomma cajennense* and *Rhipicephalus sanguineus*

Carla Cristina Braz Louly*, Diana da Nóbrega Silveira*, Sara Fernandes Soares*,
Pedro Henrique Ferri¹, Arianne Carla Campos de Melo¹, Lígia Miranda Ferreira
Borges²

Resumo

Este estudo teve por objetivo identificar o 2,6-dichlorophenol (2,6-DCP) em *Amblyomma cajennense* e avaliar seu papel na cópula de *A. cajennense* e de *Rhipicephalus sanguineus*. O extrato hexânico de fêmeas atrativas purificado pela extração da fase contínua e o fenol foi identificado pelo método da monitoração do íon usando o GC/MS. Em um olfatômetro, foram estudadas as respostas de machos de *A. cajennense* e de *R. sanguineus* às fêmeas, a septos de borracha ou a septos de borracha impregnados com o 2,6-DCP a 50ng, 500ng, e 5000ng. No extrato de fêmeas de *A. cajennense* 2,6-DCP foi identificado, os machos orientaram-se para a concentração de 500ng, e estes septos e as fêmeas foram reconhecidos como parceiros para a cópula. Os septos tratados com o 2,6-DCP não atraíram e nem foram reconhecidos pelos machos de *R. sanguineus*. Devido à presença de 2,6-DCP na espécie *A. cajennense* e aos resultados dos ensaios biológicos, concluiu-se que este composto atua como um feromônio sexual de atração e de monta nesta espécie, mas não desempenha nenhum papel na cópula do *R. sanguineus*.

Palavras chave: 2,6-diclorofenol, feromônio sexual, Ixodidae, olfatometria, identificação

Abstract

This study aimed to identify 2,6-dichlorophenol (2,6-DCP) in *Amblyomma cajennense* and to evaluate its role in *A. cajennense* and *Rhipicephalus*

* Escola de Veterinária/ UFG

¹ Instituto de Química/ UFG

² Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Caixa Postal 131, 74001-970 Goiânia, GO, Brasil

sanguineus courtship. Hexanic extract from attractive females was purified by solid phase extraction and the phenol was identified by the single ion monitoring method using GC/MS. In an olfactometer, the responses of *A. cajennense* and *R. sanguineus* males to females, control rubber septa or rubber septa impregnated with 2,6-DCP at 50, 500, and 5000 ng, respectively, were studied. 2,6-DCP was identified in *A. cajennense* extract and the males oriented themselves toward the concentration of 500 ng. These septa and the females were recognized as copula partners. The septa treated with 2,6-DCP did not attract and were not even recognized by the *R. sanguineus* males, whereas the females were recognized. Due to the presence of 2,6-DCP in *A. cajennense* and the results of biological bioassays, it was concluded that this compound acts as an attractant and mounting sex pheromone in this tick, but it does not play any role in *R. sanguineus* courtship.

Key words: 2,6-dichlorophenol - sex pheromone - Ixodidae - olfactometer bioassay - identification

Introduction

Mate-finding and courtship behavior in ticks are largely regulated by pheromones. According to Sonenshine (1991), the hypothetical behavioral stages that occur during *Dermacentor variabilis* (Say) courtship can be described as follows. The feeding female secretes a volatile attractant sex pheromone, exciting the male to detach himself. The sexually excited male commences searching behavior, orients to the emitting source, and approaches the pheromone-secreting female. Male contacts the female, detects the mounting sex pheromone, mounts, turns and crawls over the female's opisthosoma to the ventral surface. The male locates the female's gonopore and following probing and successful identification of the genital sex pheromone, the spermatophore is formed and copulation ensues.

Since the pioneer studies identifying 2,6-dichlorophenol (2,6-DCP) as an attractant sex pheromone in *Amblyomma americanum* (Linnaeus) (Berger

et al. 1971, Berger 1972) this same compound has been identified in 17 species of Ixodidae (Mayer, Mclanglin 1991, Bruyne, Guerin 1994, Liu et al. 1998, Borges et al. 2002). Although identified in several species, confirmatory studies showing its role as an attractant sex pheromone were conclusive in seven species: *D. variabilis*, *Dermacentor andersoni* Stiles (Sonenshine et al. 1976), *A. americanum*, *Amblyomma maculatum* Koch (Kellum, Berger 1977), *Hyalomma dromedarii* Koch, *Hyalomma anatolicum excavatum* Koch (Silverstein et al. 1983) and *Dermacentor nitens* Neumann (Borges et al. 2002). In *D. variabilis*, *D. andersoni* (Hamilton, Sonenshine 1988) and *H. dromedarii* (Sobhy et al. 1994), males attracted to 2,6-DCP placed on inanimate objects failed to recognize these objects as potential mates and left quickly even if they made physical contact with them. In these cases cholesteryl esters were necessary for the males to recognize the objects as sexual partners. Although this model is traditionally accepted, Borges et al. (2002) observed that *D. nitens* males are attracted, mount and proceed to ventral positioning on dummies impregnated with 2,6-DCP. They concluded that in this species, 2,6-DCP acts as an attractant and mounting sex pheromone.

Rhipicephalus sanguineus (Latreille) and *Amblyomma cajennense* (Fabricius) are three-host species ticks widespread in Brazil. The main host of *R. sanguineus* is the dog which can suffer from babesiosis, erlichiosis, hepatozoonosis and mycoplasmosis, all transmitted by the tick (Woldehiwet, Ristic 1993). This tick can also parasitize human beings (Dantas-Torres et al. 2006, Louly et al. 2006) and it is the vector of *Rickettsia conorii* in Europe and *Rickettsia rickettsii* in Arizona, USA (Woldehiwet, Ristic 1993, Demma et al. 2005). *A. cajennense* especially parasitizes equids, but it may infest other mammals such as bovids, cervids, wild and domestic canids, birds and even man. In Brazil, *A. cajennense* is considered the main vector of *R. rickettsii*, the agent of Rocky Mountain spotted fever (Dias, Martins 1939, Lemos et al. 1997, Horta et al. 2004, Guedes et al. 2005).

Chow et al. (1975) identified 2,6-DCP in *R. sanguineus* female extract and observed that males responded to this compound by waving their legs, and detaching from the host, but attraction to this compound was not

confirmed. Sobbhay et al. (1994) identified cholesteryl esters in *R. sanguineus* female extracts, but no bioassay was taken to confirm if these substances acted as mounting sex pheromone in this tick. Rechav et al. (1997) affirm that *A. cajennense* females do not emit sex pheromones and the production shifts to males, although no studies have been conducted for identification or attraction to 2,6-DCP. It is known that in this species the males produce a pheromone that induces males and females to attach. However, the aggregation of an individual on the host which occurs in other species of *Amblyomma* does not occur in *A. cajennense*. Thus, it is not known how the sexes would meet. This study was aimed to identify the presence of 2,6-DCP in *A. cajennense* females and to evaluate its role in *A. cajennense* and *R. sanguineus* courtship.

Materials and Methods

Ticks - *A. cajennense* and *R. sanguineus* engorged nymphs were collected from infested horses and dogs, respectively, and incubated in constant conditions (27°C, RH > 80%, 24h dark) until ecdysis. Then adults were fed on rabbits for six days to guarantee sexually mature males and females. The rabbits were infested with a maximum of 20 adults of *A. cajennense* and 30 of *R. sanguineus*. After one infestation with the first species and two or three with the second one, the rabbits were donated. During the infestations, the rabbits were clinically examined every day and showed no symptoms due to the tick parasitism.

Chemicals - Hexane, dichloromethane, ethyl acetate and methanol were Ultra-Resi Analysed grade (Mallinckrodt Baker, NJ, USA). Deionised water was purified through a MilliQ BioCell system from Millipore (Bedford, MA, USA). 2,6-DCP was the standard product (Sigma, St. Louis, USA). Membrane PVDF (0.45 µm) Millex syringe filter units (Millipore) and an AccuBond ODS-C18 solid-phase extraction (SPE) column (100mg/ml) (J&W Scientific, Folsom, CA, USA) were mounted on a vacuum-filtration adapter (Aldrich).

Pheromone extraction - The pheromone was extracted by immersing 50 six-days fed *A. cajennense* females in 3 ml of hexane and exposing them to ultrasound for 15 min. The suspension was filtered by a syringe filter and the solvent was evaporated under a nitrogen gas stream. One aliquot was dissolved in 1 ml of methanol, poured into the AccuBond C18 SPE column and forced to pass through it at 1 ml/min by applying reduced pressure. The column had previously been activated and conditioned with 2 ml of ethyl acetate, 2 ml of methanol, and 2 ml of deionized water to avoid drying out. After application of the sample, the column was dried by a stream of air for 10 min. The analytes were then eluted with 4 ml of ethyl acetate and the eluate was evaporated to dryness under a stream of nitrogen. The dry extract was reconstituted with hexane and 0.5 µl of the extract was injected into the gas chromatograph.

Pheromone identification - The sample analyses were performed on a GC-MS Shimadzu QP5050A instrument under the following conditions: a CBP-5 (Shimadzu) fused silica capillary column (30 m long x 0.25 mm i.d. x 0.25 µm film thickness composed of 5% phenylmethylpolysiloxane) was connected to a quadrupole detector operating in full scan and in selective ion monitoring mode with electron impact ionization at 70 eV; the carrier gas was He (1 ml/min; 56.7 kPa) in constant flow mode. Injector and interface temperatures were 250°C and 270°C, respectively. Injections were in split mode with a split ratio of 1:5. The oven temperature was programmed as follows: the initial temperature was held for 1 min at 60°C and was then raised to 270°C at 40°C/min, and maintained for 3.75 min (total time of 10 min). The ion-fragments m/z 126 [M^+-Cl_2], 162 [M^+], 164 [M^{++2}] and 166 [M^{++4}] were recorded for 2,6-DCP (retention time at 5.03 min). Phenol identification was based on matching between the mass spectrum of the peak at retention time of 2,6-DCP in hexane extract and that of the authentic sample.

Olfactometer bioassay - The males were tested against different stimuli: sexually mature females, rubber septa treated with increasing concentrations (50, 500 and 5000 ng) of 2,6-DCP diluted in hexane and septa treated with hexane (control). The septa were the size of a mature virgin female. In a glass arena olfactometer with the bottom covered with a grid paper (1 x 1 cm) (Borges et al. 2002), the *A. cajennense* and *R. sanguineus* males were

released individually at 5 and 2.5 cm respectively from the stimulus source. 15 to 20 males of each species were tested against each odor source. The females were attached to the paper by using a hypodermic needle. The total number of ticks (20 to 30 males) tested in one day were divided between the treatments. The grid paper was always changed along with the odor source. Before the beginning of an experimental day, the arena was cleaned using detergent, rinsed with distilled water, hexane and acetone. To avoid any interference of the observer in the behavior of the ticks, he stayed behind and around 30 cm from the arena, and followed the displacement of the tick on another grid paper (3 x 3 cm). The percentages of males that oriented, showing directional movement toward the stimulus, and their tracks were recorded. The ticks' tracks were divided into sections, each of which was three times the length of the male tick. Two consecutive points were linked by a straight line and the angle was calculated between this line and the direction of the wind (angle 0°). The trajectories displayed by ticks were analyzed by means of circular statistics (Zar 1999). The mean angle displayed by each animal was calculated over the pathways they formed. Subsequently, for every experimental group a mean angle and the length of the resultant mean vector (r) was calculated and the statistical differences between groups were evaluated through the Watson U2 test. The percentage of males that recognized the odor source and proceeded to mounting and ventral positioning was also recorded. The ventral positioning was reached when some mounted males crawled over the septa, located themselves between the septa and the arena, and lifted the septa with the aid of their legs. The percentages of male ticks that oriented and mounted to different odor sources were recorded and compared using the Kruskal–Wallis test (Sampaio 1998). The significance level was $p < 0.05$ in both tests.

Results

Pheromone identification - The retention time ($R_t = 5.03$ min) and elution characteristics on the CBP5 column were determined for the authentic sample of 2,6-DCP (Fig. 1a). Observations of retention time and the characteristic cluster of peaks at 126, 162, 164, and 166 m/z in the SPE-purified hexanic extract of attractive *A. cajennense* females were accepted as evidence that 2,6-DCP was present (Fig. 1b).

Olfactometer bioassay - The *A. cajennense* males oriented toward 2,6-DCF at 500 ng concentration. The septa with this concentration and the females were recognized by the males through mounting in 67% and 73% of cases respectively, and ventral positioning in 42% and 62.5% (Table 1). The displacement angles indicate that 2,6-DCP in all concentrations tested attracted the male ticks: more angles between 0° and 10° were observed in relation to the different odor sources (59% to 80%) than in the control (47%) (Fig. 2). No statistical differences were found among these groups ($0.044 > U_2 > 0.083$) except between control and 500 ng concentration ($U_2 = 0.268$). The percentage of *R. sanguineus* males that reached the different stimulus sources was similar for all odors tested, including the control (Table 1). The displacement angles also indicate that no source was attractive, because similar results were observed with the control (35% of angles between 0° and 10°) and the other stimuli (47 to 56% of angles between 0° and 10°) (Fig. 3) and no statistical differences were found among these groups ($0.031 > U_2 > 0.083$). The septa treated with 2,6-DCP were not recognized by the males as mounting behavior did not occur, but 42% of the males that reached the females mounted and 20% of them proceeded to ventral positioning (Table 1).

Discussion

In the present study we add *A. cajennense* to the extensive list of ticks that produce 2,6-DCP (Mayer, Mclanglin 1991; Bruyne, Guerin 1994; Liu et al., 1998; Borges et al., 2002). Leahy and Booth (1976) presumed that 2,6-

DCP was a sex pheromone of *A. cajennense*, based on the aggregation of male ticks in a Petri dish arena treated with that compound; however, no attempt was made to identify the presence of the phenol in tick extracts.

When developing bioassays to evaluate the activity of pheromones or possible pheromones, the methodology must allow the expression of the characteristic behavior believed to be regulated by the pheromone (Sonenshine, 1991). The present olfactometer bioassay allows the observation of the attraction, orientation and recognition of the odor source. The first two behaviors are regulated by an attractant sex pheromone and the last one by a mounting sex pheromone. When we used that bioassay for the first time (Borges et al., 2002) we did not expect to observe mounting of the rubber septa treated with 2,6-DCP as that behavior is traditionally guided by cholesteryl esters (Hamilton et al. 1989; Sobbhy et al. 1994). However, the observation of this unusual behavior stimulated us to evaluate the same bioassay with other tick species.

In *A. cajennense* the attraction and recognition (mounting and ventral positioning) of the septa impregnated with 2,6-DCP suggest that this compound acts as an attractant and mounting sex pheromone of this tick. Rechav et al. (1997) say that *A. cajennense* females do not produce sexual pheromones. In the genus *Amblyomma* the presence of aggregation-attachment pheromone produced by fed males has been widely reported (Sonenshine, 1991). As demonstrated by Rechav et al. (1997), the males of *A. cajennense* produce a pheromone which promotes the attachment of unfed males and females, but not their aggregation. Given these points, how would the sexes meet in this species? The results obtained here suggest that courtship in *A. cajennense* occurs in the same way as in *D. nitens* (Borges et al., 2002), but is different from what was observed in *D. variabilis*, *D. andersoni* (Hamilton et al., 1989) and *H. dromedarii* (Sobbhy et al., 1994). Males of those last species were attracted to 2,6-DCP which was placed on inanimate objects but failed to recognize them as potential mates and needed cholesteryl esters as a cue for that. It is possible that compounds playing a role as mounting sex pheromones, such as cholesteryl esters strengthen the response of 2,6-DCP in *A. cajennense*, but further studies are needed to address this question.

The septa treated with 2,6-DCP did not attract and was not even recognized by the males of *R. sanguineus*. For this reason, it is probable that 2,6-DCP does not act as an attractant or mounting sex pheromone in this tick. The non attractiveness of this compound is uncommon among metastriate Ixodidae, since several authors have reported its role as an attractant sex pheromone (Sonenshine et al. 1976, Kellum, Berger 1977, Silverstein et al. 1983, Borges et al. 2002). Bruyne and Guerin (1994) did not observe a behavioral response of *Rhipicephalus microplus* (Canestrini) males to 2,6-DCP. However, Cardoso et al. (2000) observed a little attraction to this compound, suggesting that physiological differences among the ticks used in the different assays would be responsible for the different behavioral responses. On the other hand, the non recognition of the septa treated with 2,6-DCP is more common and has already been reported in *D. variabilis*, *D. andersoni* (Hamilton, Sonenshine 1988) and *H. dromedarii* (Sobhhy et al. 1994).

The higher orientation responses of *A. cajennense* to impregnated 2,6-DCP septa at 500 ng concentration in comparison to females probably occurred because the concentrations tested were higher than those released by females. The maximum amount of 2,6-DCP detected in *Amblyomma* females is around 65 ng (Kellum, Berger 1977), therefore justifying the results. The decreasing responses to the highest concentration may have occurred because of the saturation of tick receptors.

Borges et al. (2006) tried to associate the aspect of the female dorsal fovea of four species of Ixodidae with the role of 2,6-DCP in their courtship. Based on fovea aspects the ticks were divided in two groups, with (*D. nitens* and *A. cajennense*) and without (*R. microplus* and *R. sanguineus*) secretions on the fovea. At that time it was known from the literature that 2,6-DCP played a role as a mounting sex pheromone in *D. nitens* (Borges et al., 2002), but not in *R. microplus* (Bruyne, Guerin, 1994, Cardoso et al., 2000). For this reason, they hypothesized that 2,6-DCP would be a mounting sex pheromone in *A. cajennense* but not in *R. sanguineus*. Thus, the results of the bioassays described here corroborate the hypothesis suggested in that study.

2,6-DCP has previously been shown to control metastriate ixodid ticks by confounding males or mimicking females (Ziv et al. 198; Sonenshine et al.,

1985; Abdel-Rahman et al., 1998; Sonenshine, 2006, Borges et al., 2007). Considering the results obtained here, it is reasonable to suggest the use of this compound to intercept *A. cajennense* courtship; however its use in *R. sanguineus* is not recommended because it is not an attractant for this species of tick.

References

ABDEL-RAHMAN M. S., FAHMY M. M., AGGOUR, M. Trials for control of ixodid ticks using pheromone acaricide tick decoys. **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**, v. 28, p. 551-557, 1998.

BERGER, R.S. 2,6-Dichlorophenol, sex pheromone of the lone star tick. **Science**, v. 177, p. 704-705, 1972.

BERGER, R.S., DUKES, J.C., CHOW, Y.S. Demonstration of a sex pheromone in three species of hard ticks. **Journal of Medical Entomology**, v. 8, p. 84-86, 1971.

BORGES, L. M. F., EIRAS, A.E., FERRI, P.H., LOBO, A. C. C. The role of 2,6-dichlorophenol as sex pheromone of the tropical horse tick *Anocentor nitens* (Acari: Ixodidae). **Experimental and Applied Acarology**, v. 27, p. 223-230, 2002.

BORGES, L. M. F., FERREIRA, L. A. M., SCHNEIDER, L. S., OLIVEIRA, R. A., MUSSI, S. V., FARIA, K.A., MELO, L. S., ABUD, L.J., COSTA, G. L., SOARES, S. F.. Efficacy of 2,6-dichlorophenol lure to control *Dermacentor nitens*. **Veterinary Parasitology**, v. 147, p. 155-160, 2007.

BORGES, L. M. F., RIBEIRO, M. F. B., BICALHO, K. A., FERREIRA, F. Estudo das fôveas dorsais de ninfas e adultos de quatro espécies de carrapatos (Acari: Ixodidae) por microscopia eletrônica de varredura. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 15, p. 89-96, 2006.

BRUYNE M, GUERIN PM. Isolation of 2,6-dihlorophenol from the cattle tick *Boophilus microplus*: receptor cell responses but not evidence for a behavioral response. **Journal Insect Physiology**, v. 40, p. 143-154, 1994.

CARDOSO, V.A., BORGES, L. M. F., EIRAS, A. E. . 2,6-dichlorophenol as attractant sex pheromone of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). In: **17th Annual Meeting of the International Society of Chemical Ecology**, Poços de Caldas, p. PO43, 2000.

CHOW, Y. S., WANG, C. B., LIN, L. C. Identification of a sex pheromone of the female brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 68, p. 485-488, 1975.

DANTAS-TORRES, F., FIGUEREDO, L. A., BRANDÃO-FILHO, S. P. *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae), the brown dog tick, parasitizing humans in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, p. 64-67, 2006.

DEMMA LJ, TRAEGER MS, NICHOLSON WL, PADDOCK CD, BLAU DM, EREMEEVA ME, DASCH GA, LEVIN ML, SINGLETON JJR, ZAKI SR, CHEEK JE, SWERDLOW DL, MCQUISTON JH. Rocky mountain spotted fever from an unexpected tick vector in Arizona. **New England Journal of Medicine**, v. 353, p. 587-594, 2005.

DIAS, E., MARTINS, A. V.. Spotted fever in Brazil. A summary. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 19, p. 103-108, 1939.

GUEDES, E., LEITE, R. C., PRATA, M. C. A., PACHECO, R.C.P., WALKER, D.H., LABRUNA, M. B. Detection of *Rickettsia rickettsii* in *Amblyomma cajennense* in a new Brazilian spotted fever-endemic area in the state of Minas Gerais. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 841-845, 2005.

HAMILTON, J. G. C., SONENSHINE, D. E. Evidence for the occurrence of mounting sex pheromone on the body surface of female *Dermacentor variabilis* (Say) (Acari: Ixodidae). **Journal of Chemical Ecology**, v.14, p. 401-410, 1988.

HAMILTON JGC, SONENSHINE DE, LUSBY WR. Cholesteryl oleate: mounting sex pheromone of the hard tick *Dermacentor variabilis* (Say) (Acari: Ixodidae). **Journal of Insect Physiology**, v. 11, p. 873-879, 1989

HORTA, M., LABRUNA, M. B., SANGIONI, L. A., VIANNA, M. C. B., GENNARI, S. M., GALVÃO, M. A. M., MAFRA, C. L., VIDOTTO, O., SCHUMAKER, T. T. S., WALKER, D. H. Prevalence of antibodies to spotted fever group rickettsiae in humans and domestic animals in a Brazilian spotted fever-endemic area in the state of São Paulo, Brazil: serologic evidence for infection by *Rickettsia rickettsii* and another spotted fever group rickettsia. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 71, p. 93-97, 2004.

KELLUM, D., BERGER, R. S. Relationship of the occurrence and function of 2,6-dichlorophenol in two species of *Amblyomma* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 20, p. 701-705, 1977.

LEAHY, M. G., BOOTH, K. S. Perception of a sex pheromone, 2,6-dichlorophenol, in hard ticks. In: JKH Wilde, Tick-borne Diseases and their Vectors, Ed. **Procedures of International Conference of the Centre Tropical Veterinary Medicine**, Edinburgh University Press, Scotland, p. 88, 1976.

LEMOS, E. R. S., MACHADO, R. D., PIRES, F. D. A., MACHADO, S. L., COSTA, L. M. C.. Rickettsiae-infected ticks in an endemic area of spotted fe-

ver in the State of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 92, p. 477-481, 1997.

LIU, J. Z., JIANG, Z. J., YANG, Y. P., SUN, R. Y. Quantitative variation of the sex pheromone, 2, 6-dichlorophenol, of *Haemaphysalis longicornis* (Acari: Ixodidae), and its role in biology. **Acta of Parasitology and Medical Entomology Sinica**, v. 5, p. 253-257, 1998.

LOULY, C. C. B., FONSECA, I. N., OLIVEIRA, V. F., BORGES, L. M. F. Ocorrência de *Rhipicephalus sanguineus* em trabalhadores de clínicas veterinárias e canis, no município de Goiânia, GO. **Ciencia Animal Brasileira**, v. 7, p. 103-106, 2006.

MAYER, M. S., MCLANGLIN, J. R. **Handbook of insect pheromones and sex attractants**, CRC Press, Boca Raton, 1083 pp, 1991.

RECHAV, Y., GOLDBERG, M., FIELDEN, L. J. Evidence for attachment pheromones in the cayenne tick (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 34, p. 234-237, 1997.

SAMPAIO, I. V. B. **Estatística aplicada à experimentação animal**, Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária, Belo Horizonte, 221 pp, 1998.

SILVERSTEIN, R., WEST, J. R., KHALIL, G. M., SONENSHINE, D. E. Occurrence of 2,6-dichlorophenol in the hard ticks *Hyalomma dromedarii* and *Hyalomma anatolicum excavatum* with note on its role in mating regulation in these species. **Journal of Chemical Ecology**, v. 9, p. 1543-1549, 1983..

SOBBHY, H., AGGOUR, M.G., SONENSHINE, D.E., BURRIDGE, M.J. Cholesteryl esters on the body surfaces of the camel tick, *Hyalomma dromedarii* (Koch, 1844) and the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806). **Experimental and Applied Acarology**, v. 18, p. 265-280, 1994.

SONENSHINE, D. E. 1991. **Biology of ticks**, Vol. 1, Oxford Univ. Press, New York, 119 pp.

SONENSHINE, D. E. Tick pheromones and their use in tick control. **Annals of Revised Entomology**, v. 51, p. 557-580, 2006.

SONENSHINE, D. E., SILVERSTEIN, R. M., PLUMMER, E., WEST, J. R., MCCULLOUGH, T. 2,6-dihlorophenol, the sex pheromone of the Rocky Mountain wood tick, *Dermacentor andersoni* Stiles and the American dog tick, *Dermacentor variabilis* (Say). **Journal of Chemical Ecology**, v. 2, p. 201-209, 1976.

SONENSHINE, D. E., TAYLOR, D., CORRIGAN, G. Studies to evaluate the effectiveness of sex pheromone-impregnated formulations for control of

populations of the American dog tick, *Dermacentor variabilis* (Say) (Acari: Ixodidae). **Experimental and Applied Acarology**, v. 1, p. 23-34, 1985.

WOLDEHIWET, Z., RISTIC, M. **Rickettsial and Chlamydial diseases of domestic animals**, Pergamon, Oxford, 427 pp, 1993.

ZAR, J. H. **Biostatistical Analysis**. 4th ed., Prentice Hall, New Jersey, xii + 663pp, 1999.

ZIV, M., SONENSHINE, D. E., SILVERSTEIN, R. M., WEST, J. R., GINGHER, K. H. Use of sex pheromone, 2.6-dichlorophenol, to disrupt mating by American dog tick, *Dermacentor variabilis* (Say). **Journal of Chemical Ecology**, v. 7, p. 829-840, 1981.

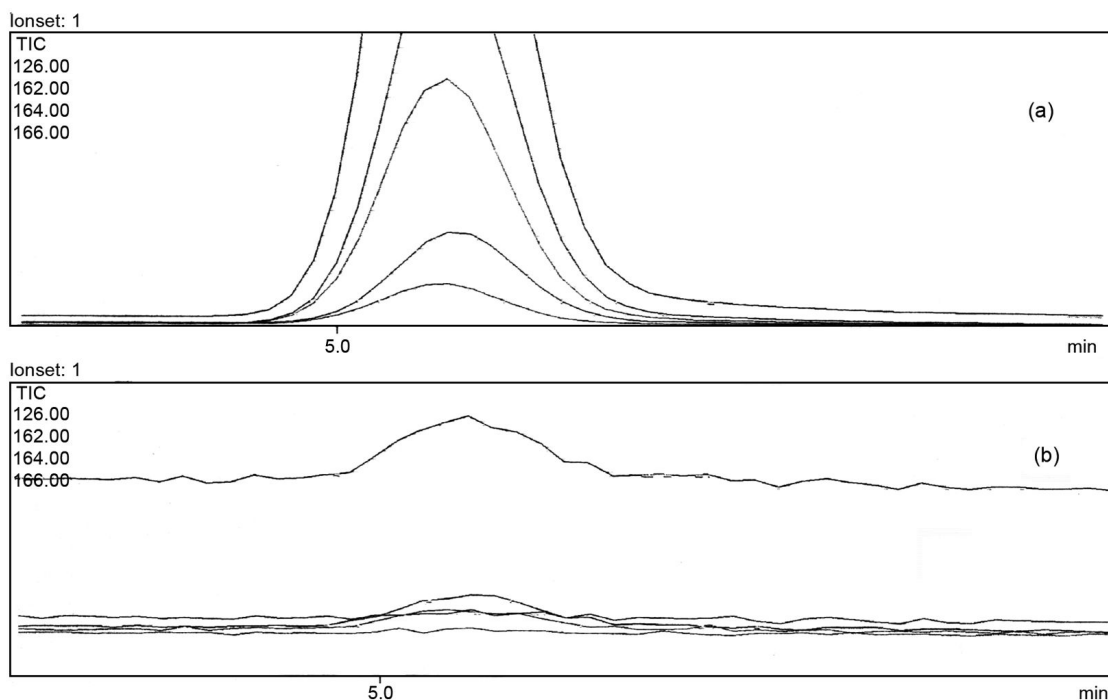


Figure 1 - total ion chromatogram (TIC) of authentic samples of 2,6-dichlorophenol (2,6-DCP) (a) and of the SPE-purified hexane extract of *Amblyomma cajennense* showing the 2,6-DCP in retention time at 5.03 min (b). Numerical value refers to monitored ion-fragments.

TABLE - Percentage of orientation (O), mount (M) and ventral positioning (VP) of the odor source by males of *Rhipicephalus sanguineus* and *Amblyomma cajennense* when exposed to different stimulus, in an olfactometer.

Odor source	<i>R. sanguineus</i>			<i>A. cajennense</i>		
	Orientation	Mount	Ventral positioning	Orientation	Mount	Ventral positioning
Control	35 ^a	0 ^a	0	30 ^a	0 ^a	0
Female	60 ^a	42 ^b	20	55 ^a	73 ^b	62,5
50ng 2,6 DCP	60 ^a	0 ^a	0	53 ^a	0 ^a	0
500ng 2,6 DCP	60 ^a	0 ^a	0	90 ^b	67 ^b	42
5000ng 2,6 DCP	60 ^a	17 ^a	0	47 ^a	0 ^a	0

a, b: different letters within the same column indicate significant differences by Kruskal-Wallis test ($p < 0.05$).

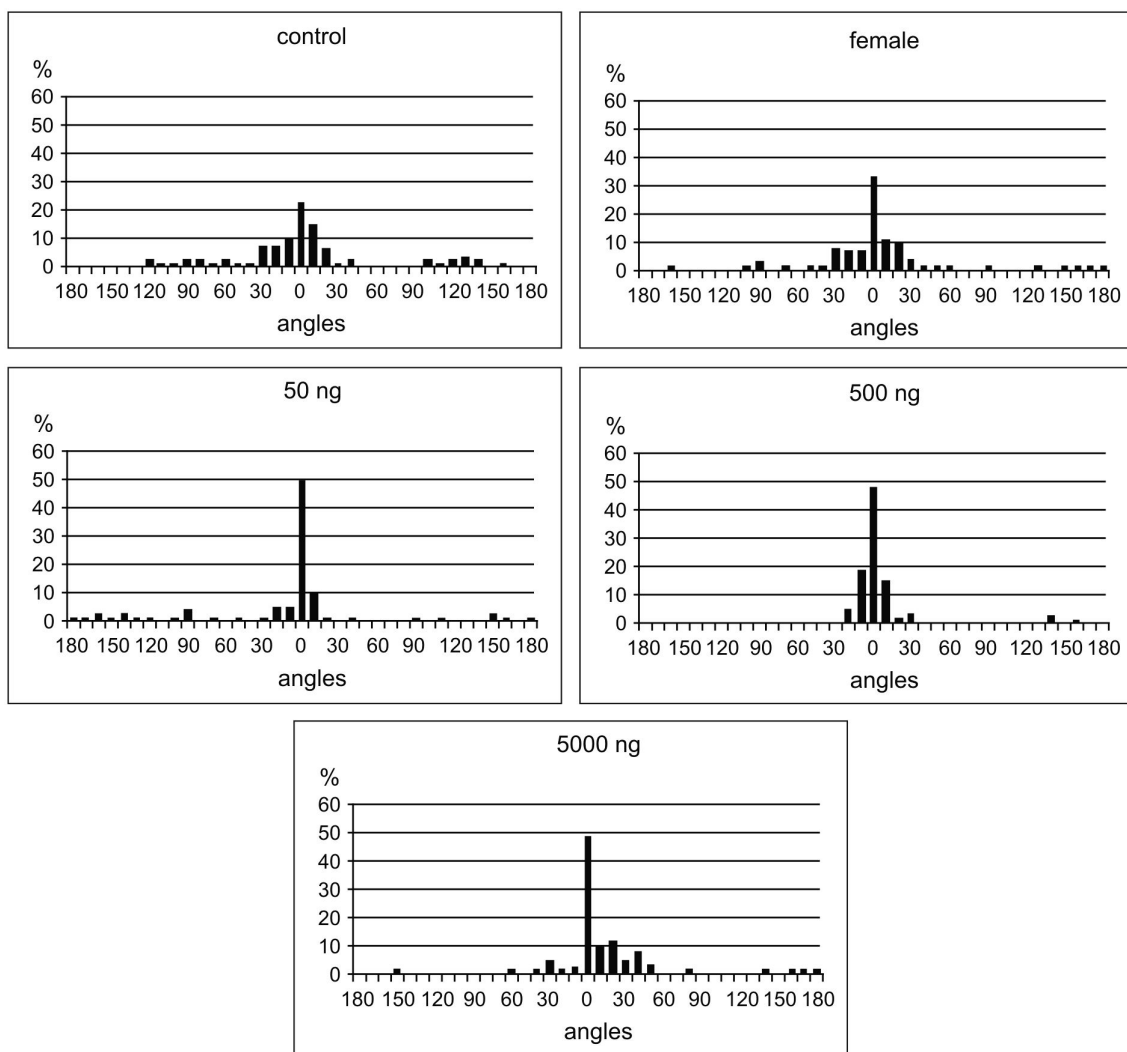
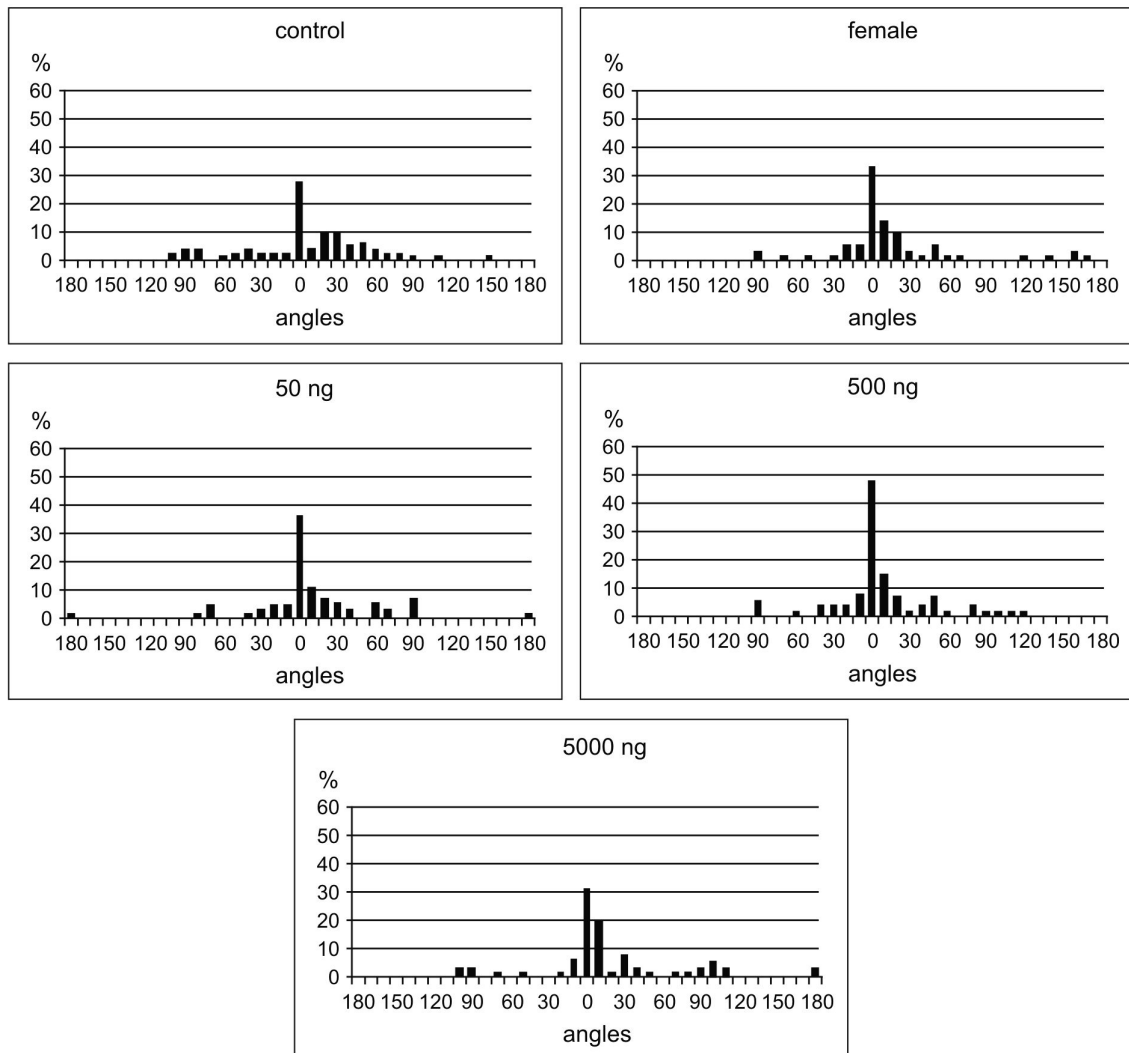


Figure 2 - Frequencies of displacement angles of *Amblyomma cajennense* males to different odor sources in an olfactometer bioassay.



Figures 3 - Frequencies of angles of *Rhipicephalus sanguineus* males to different odor sources in an olfactometer bioassay.

CAPÍTULO 3: Comparison of the susceptibility to *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) of two breeds of dogs, The English Cocker Spaniel and Beagle

Carla C. B. Louly¹, Sara F. Soares², Diana N. Silveira³, Osvaldo J. S. Neto, Andréa C. Silva⁴, Lígia M. F. Borges

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar a diferença de susceptibilidade em duas raças de cães ao *Rhipicephalus sanguineus*: o Cocker Spaniel Inglês e o Beagle. Três infestações artificiais usando uma cápsula fixada no dorso dos cães foram realizadas em intervalos de 15 dias. Seis cães de cada raça foram infestados com 100 larvas, 50 ninfas e 20 adultos (10 machos e 10 fêmeas). A cada dois dias, os carrapatos nos cães foram avaliados e contados e os ingurgitados eram colhidos. Os carrapatos foram armazenados em câmaras climáticas e inspecionados cada dois dias por 14 dias. Os seguintes parâmetros foram avaliados: número de carrapatos ingurgitados, período de ingurgitamento, percentual da ecdise, peso das fêmeas, conversão do peso corporal em ovos, e eclodibilidade larval. A comparação entre as raças e as infestação foi feita usando o teste do Qui-quadrado ou a análise de variância e o de teste T de Student, com um nível de significância de $P < 0,05$. Nos carrapatos recuperados do grupo Cocker Spaniel, percentuais mais elevados de ecdise das larvas e das ninfas, número maior de adultos fixados e ingurgitados e um desempenho reprodutivo mais elevado das fêmeas (conversão em ovos e eclodibilidade) foi observado. Os parâmetros, período de ingurgitamento, o número de ninfas ingurgitadas e peso das fêmeas não diferiram muito entre as raças, mas mais larvas se fixaram e ingurgitaram no grupo Beagle. Nas duas

¹ Ph.D. Student, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás (UFG), Caixa Postal 131, CEP: 74.001-970, Goiânia, Goiás, Fax: 55 62 35211574. carlalouly@gmail.com

² Master's Student in Animal Science (UFG). sfsoares@gmail.com

³ Veterinarian Student in Veterinary School, (UFG).

⁴ Laboratory of Parasitology/DMIPP/IPTSP/UFG, Rua 235, s/n CEP: 74650-050, Goiânia-GO, Fax: 55 62 35211839. ligia@iptsp.ufg.br

raças, uma redução no número de larvas e ninfas ingurgitadas recuperadas ao longo das infestações foi observado, demonstrando o desenvolvimento de uma resposta à infestação nestes estágios. Entretanto, o percentual de ecdise e de conversão em ovos foram afetados somente nos Beagle, mais resistentes. Baseado no que foi apresentado, pode-se concluir que os animais da raça Cocker Spaniel Inglês são mais suscetíveis ao *R. sanguineus* do que os da raça Beagle, e que as infestações afetam o desenvolvimento do carrapato, especialmente em indivíduos resistentes.

Palavras Chave: *Rhipicephalus sanguineus*, resistência do hospedeiro, raças de cães.

Abstract

The objective of this study was to evaluate the difference in susceptibility to *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille) of two breeds of dogs: English cocker spaniel and beagle. Three artificial infestations of ticks using a capsule on the back of the dogs were carried out at 15-day intervals. Six dogs of each breed were infested with 100 larvae, 50 nymphs and 20 adults (10 males and 10 females). Every two days, the ticks on the dogs were evaluated and the engorged ones counted and collected. The ticks were stored in climatic chambers and inspected every two days for 14 days. The following parameters were recorded: number of engorged ticks, engorgement period, percentage of ecdysis, female weight, conversion of body weight to eggs, and larval hatchability. The comparison between the breeds and infestations was performed using the chi-square test or analysis of variance and Student's t-test, with a significance level of $P < 0.05$. In the ticks recovered from the cocker spaniel, higher percentages of ecdysis of larvae and nymphs, greater number of adults attached and engorged and higher reproductive performance of the females (conversion to eggs and hatchability) were observed. The parameters, period of engorgement, number of engorged nymphs and weight of the females did not differ very much by breed, but more larvae were attached and engorged in the beagle.

In the two breeds, an effect of the successive infestations on the number of engorged larvae and nymphs was observed, which demonstrates the development of a response to the infestation in these stages. However, the percentage of ecdysis and the conversion to eggs was affected only in the more resistant beagles. Based on what was presented, it can be concluded that the animals of the race English cocker spaniel are more susceptible to *R. sanguineus* than the beagles and that the infestations affect the development of the tick, especially in resistant individuals.

Key Words: *Rhipicephalus sanguineus*, host resistance, dog breeds.

Introduction:

Rhipicephalus sanguineus (Latreille) is a three-host tick species widely distributed around the world. It is one of the most important dog ectoparasites (Labruna, Pereira 2001), causing direct damage such as blood loss, dermatitis, discomfort and transmission of diseases to the host. (Woldehiwet, Ristic, 1993, Duywer, Massard, 2001). Like other ectoparasites, the tick elicits a response in its host, which generally stimulates defense mechanisms that include the production of antibodies, the mobilization of lymphocytes T and B, antigen presenter cells, basophiles, eosinophils, mastocytes, the complement system, several cytokines and other bioactive molecules (Bechara, 2006). These defenses can appear together or separately and affect the tick in several ways. The intensity of the response will vary according to the host-parasite interaction level. When a tick species has a well-established host-parasite relationship, the immunological response of the host is less intense than that of a non-preferred host (Szabó, Bechara, 1997).

The effect of the immunological response of the host on the tick can be expressed in reduced engorgement weight, longer feeding periods, decreased egg production, reduced egg hatchability and survival of instars, and inhibited molting. Different species or breeds of hosts have a marked dissimilarity in their resistance to the same tick species. *Bos taurus indicus*

Linnaeus has been reported to have higher resistance to *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini) when compared with *Bos taurus taurus* Linnaeus. It has also been shown that this resistance is a hereditary characteristic, present in crossbred animals. The more *Bos taurus indicus* blood, the greater the resistance (Gonzales, 1975, Rechav, 1992, Latif, 1991; Bekele, 2002, Veríssimo et al. 2002;). In South Africa, Kostrzewski (1989) demonstrated that *Hyalomma truncatum* Koch, *Hyalomma marginatum rufipes* Koch and *Rhipicephalus evertsi evertsi* Neumann are found in lesser number in Nguni, a native cattle race there, than in Brahman, a relatively new breed in the region. *Rhipicephalus (Boophilus) decoloratus* (Koch) were found in higher number in Simental and Santa Gertrudes bovines than in Brahman and Nguni (Rechav, Kostrzewski, 1991). Louly et al. (2007) observed that English cocker spaniels were up to 10 times more infested by *R. sanguineus* than mongrel dogs, when both breeds were kept in the same kennel for one year, suggesting that the cocker spaniel is more susceptible to *R. sanguineus*.

Alterations in the biological parameters of tick development, such as reduction in the number of attached stages, increase in engorgement time, inhibition of ecdysis and reduction of female reproductive efficiency, have been demonstrated, after successive infestations, in some models of host-parasite interaction (Riek, 1961; Chiera et al. 1985; Kaufman, 1989; Tatchell 1987; Rechav, 1992). Successive infestations by *Ixodes ricinus* (Linnaeus) in rodents of the species *Clethrionomys glareolus* (Schreber) resulted in a gradual reduction in the number of engorged larvae recovered and their percentage of ecdysis (Dizij, Kurtenbach, 1995). In rabbits of the New Zealand breed, after two successive infestations with *Amblyomma americanum* (Linnaeus) a significant reduction in the reproductive efficiency of females and in larval viability was observed (Loftis et al. 2004). After successive infestations of rabbits with *Rhipicephalus appendiculatus* Neumann, a significant reduction in female weight and in egg mass weight was observed (Kheir et al. 1999). In *R. sanguineus*, even after successive infestations in dogs, there are studies reporting the non-occurrence of alterations in the biological parameters of adults. However, when fed on non-natural hosts, significant alterations could already be observed after the first

infestation (Ferreira, Bechara, 1995; Bechara et al., 1995; Szabó et al., 1995; Jittapalapong et al., 2000). On the other hand, Inokuma et al. (1997) demonstrated that beagles displayed a significant reduction in the number of females of *R. sanguineus* recovered after successive infestations. The objective of this study was to determine if there was a difference in susceptibility between two breeds of dogs, English cocker spaniel and beagle, to *R. sanguineus* and the effect of successive infestations on the development of this tick.

Materials and Methods

Place and duration of the experiment - The dogs were kept in the kennel of the Veterinary Hospital in the Veterinary Medicine School of the Federal University of Goiás. The study was carried out from February 12 until June 09, 2006. The dogs were kept in a common bay for the period of adaptation (15 days), but during the infestation periods they were kept in individual bays in a kennel. The collective bay was a recently constructed room, which had never been used, with an area of 2 m², ceramic floor, and walls coated with synthetic enamel to facilitate cleaning. The kennel contained a covered area, with 12 individual bays (1 m x 1.5 m) and an open area (3 m x 5 m). The kennel was subjected to a 30-day sanitary quarantine, after being cleaned with a flame thrower and sprayed with acaricide (Amitraz 12.5%, Bayer, diluted in accordance with the manufacturer's directions and applied with backpack sprayer).

Animals - 12 dogs that had previously been in contact with *R. sanguineus*, six English cocker spaniels and six beagles, were used. Both groups consisted of three males and three females, their ages varying from 60 to 75 days. From 42 days of age, the animals began to receive doses of vaccine (Duramune Max/Fort Dodge), at intervals of 21 days, and received a total of 3 doses. About 30 days before being subjected to the experiment, the animals were treated with fipronil spray (Merial). In the first day of the adaptation period, all the dogs were inspected and were found to be free of parasites. Afterwards, they were lodged in the collective bay, and treated for

intestinal worms on the first and fifth days after the start of the experiment (Drontal Puppy/Bayer). After the period of adaptation, they were transferred to the individual bays. The dogs were fed two times a day (Max Filhote), as recommended by the manufacturer, and received all the water they wanted.

Ticks - Engorged *R. sanguineus* females had been collected from naturally infested dogs for establishment of a colony. The ticks were kept in climatic chambers (27°C and URA > 80%) and were fed on domestic rabbits, *Oryctolagus cuniculus* (Linnaeus), for attainment of stadia to be used in the infestations.

Infestations - On the shaved back of the dogs, a rectangular 2 mm-thick piece of EVA foam (10 cm x 15 cm) with a central opening (9 cm x 13 cm) was attached with Brascoplast glue (Brascola) to restrict the ticks' feeding site. Each dog was infested with 100 larvae, 50 nymphs and 20 adults (10 males and 10 females). Three infestations were carried out at 15-day intervals. During this phase of the study, cervical necklaces were used on the dogs to prevent the removal of the capsules. The capsules were opened every two days and the engorged and detached ticks were collected and taken to the laboratory. The attached males were also counted but were only removed after all the females had been harvested. The engorged females were weighed individually and then attached with double-sided tape in Petri dishes for oviposition, facilitating the harvesting of individual egg masses. Each egg mass was harvested 15 days after the start of oviposition, weighed and placed in plastic disposable syringes, with the upper part removed and plugged with a cotton stopper. Twenty engorged larvae and nymphs were placed, in each glass bottle (10 ml), which was plugged with a cotton wool stopper. The ticks were stored in climate chambers, in conditions similar to those mentioned above and inspected every two days for 14 days, to monitor the biological parameters. The following parameters were recorded: number of engorged ticks, engorgement period, percentage of ecdysis, female weight, conversion of corporal weight to eggs, and larval hatchability.

Statistics - The comparison between the breeds and infestations was done using the chi-square test for the number of engorged ticks, percentage of ecdysis and larval hatchability parameters. For comparison of the averages of weights of the females and percentage of conversion of body weight to

eggs, analysis of variance and Student's t-test were used. In both tests the significance level of $P < 0.05$ was used.

Results

Larvae - The engorgement period varied from 48 to 144 h; however, in the three infestations, the majority of the larvae detached from their host 96 h after attachment (FIGURE 1). The total number of larvae harvested in the three infestations was significantly higher in the beagle group (246) than in the cocker spaniels (144) (FIGURE 2). When the groups were analyzed separately, it was observed that the number of larvae decreased significantly in the two breeds. In the cocker spaniel group the drop occurred in a gradual form throughout the three infestations, whereas in the beagle group an abrupt reduction was observed from the first infestation to the second. From the second to the third infestation, the number of larvae harvested remained about the same. The percentage of ecdysis of the collected engorged larvae in the cocker spaniel group was significantly higher than that of the beagles and it remained higher in the three infestations, while in the beagle group ecdysis was observed only in the first infestation (Table 1).

Nymphs - As was observed for larvae in the three infestations, the majority of the nymphs engorged and detached from their host 96 h after attachment, and this period varied from 48 to 144 hours (FIGURE 1). The total numbers of nymphs harvested in the two groups were almost the same (160 in the cocker spaniel and 166 in the beagles). When the breeds were analyzed separately, a significant increase in the number of engorged nymphs from the first infestation (59) to the second infestation (96) and a significant drop in the number of engorged nymphs in the third infestation (5) were observed in the cocker spaniel group. However, in the beagle group the number of nymphs did not increase significantly from the first infestation (73) to the second infestation (89); as in the cocker spaniel group, there was a significant drop during the third infestation (4) (FIGURE 2). Whereas the total number of nymphs collected from the animals was about the same in the two groups, a significant difference in the percentage of ecdysis of these nymphs

was observed, and remained high in the three infestations in the cocker spaniel group, while it dropped significantly throughout the three infestations in the beagle group (TABLE. 1).

Males - The total number of males harvested in the three infestations was significantly higher in the cocker spaniel (115) than in the beagle group (39) (FIGURE 1). The number of males harvested in the cocker spaniel group increased from the first infestation (22) to the second (46) and remained unchanged in the third (47). In the beagle group the numbers of males harvested were not significantly different in the three infestations, and were 11, 19 and 9 respectively ($P < 0.05$).

Females - In all the infestations, the females of the beagle group engorged in six days. The female engorgement period of the cocker spaniel group varied from four to 12 days; however, the majority engorged in six days. There was a significant increase in the number of females harvested in the cocker spaniel group from the first (13) to the second infestation (34); however, there was no significant difference between these and the third one (20). In the beagle group, there were no significant differences in the numbers of females recovered in the three infestations, which were 13, 7 and 6, respectively. Comparing the infestations between the groups, the total number of females recovered was higher ($P < 0.05$) in the cocker spaniel (37% of recovery) than in the beagle group (14% of recovery) (FIGURE 2).

There was no significant difference in the weight of the females in the three infestations, either within or between the two groups. The percentage of conversion of corporal weight to eggs in the cocker spaniel group increased, while in the beagle group it decreased. The egg hatchability percentage did not vary significantly during the three infestations in the two groups; however, it was significantly higher in the cocker spaniel group than in the beagle (TABLE 1).

Discussion

Generally, ticks fed on cocker spaniels had a better biological performance than those obtained from beagles, indicating that the latter breed is more resistant to *R. sanguineus* than the English cocker spaniel Spaniel. Resistance of hosts to ticks has been extensively reported in the literature (Gonzales, 1975, Kostrzewski, 1989, Rechav, 1992, Latif, 1991; Rechav, Kostrzewski, 1991, Bekele, 2002, Veríssimo et al. 2002) but is rarely reported in dogs. With the exception of the assumption of Louly et al. (2007) that the cocker spaniel is more susceptible to parasitism by *R. sanguineus*, and reports by Inoculate et al. (1997) and Jittapallapong et al. (2000a and 2000b) showing development of resistance after successive infestations, the majority of studies indicate either that dogs are incapable of developing resistance to this tick or point to the ability of this tick to counter canine resistance mechanisms (Ferreira and Bechara, 1995; Bechara et al. 1995; Szabó et al. 1995).

In our study, ticks recovered from cocker spaniels were characterized by higher percentages of larval and nymphal ecdysis, greater numbers of adults attached and engorged, and higher female reproductive performance (conversion to eggs and hatchability). Little variation was observed in the engorgement period, number of engorged nymphs, and female weight parameters. More larvae had attached and engorged in the beagle. Normally, lesser numbers of the immature stages attach in resistant individuals (Moraes al., 1986, Castangolli et al. 2003 and Loftis et al. 2004), an observation that differs from our own but that can be explained by the methodology adopted. Resistant animals normally have a greater inflammatory response, which is responsible for grooming behavior. Because the immature stages are more fragile, these would more likely be harmed by grooming (Rechav, 1961, Tatchel, 1987). Therefore, it is reasonable to assume that use of the cervical necklace and the capsule interfered with the grooming of these animals and the removal of larvae.

The percentage of engorged females recovered in the beagle group was less than in the cocker spaniel group, and the number of engorged females recovered in the latter group rose, while among the beagles it

remained unchanged throughout three infestations. The percentage of recovered females in both groups was smaller than that observed by Bechara et al. (1995), Szabó et al. (1995) and Inokuma et al. (1997); however, in beagles, the lack of reduction in the percentage of recovered *R. sanguineus* females after successive infestations accorded with reports by Bechara et al. (1995) and Szabó et al. (1995), while Inokuma et al. (1997) observed a significant reduction in the percentage of recovered *R. sanguineus* females after two successive infestations in beagles. As the animals used in the present experiment were known to have had previous contact with ticks, it cannot be excluded that this may have interfered with the number of females recovered in the two groups. However, the first artificial infestation was carried out about 50 days after the dogs had had contact with ticks. Inokuma et al. (1999), comparing the serum of dogs infested successively with all stages of *R. sanguineus* with the serum of naïve animals, reported that 24 days after the last infestation the titers of antibodies were lower in the artificially infested group than in the control. As mentioned before, it is reasonable to assume that the 50-day period was enough for the animals to become as susceptible to infestations by *R. sanguineus* as naïve animals. Confirming this assumption, Bechara et al. (1995) and Szabó et al. (1995), who worked with dogs with and without previous tick contact, did not observe differences in the recovery of these parasites between the two groups.

As was observed for females, the percentage of male tick recovery in the beagle group was lower than in cocker spaniel group, and in the beagles this percentage remained low throughout the three infestations, while in the cocker spaniel group it increased. Previous studies have not reported interference by successive infestations in the recovery of male ticks, although Szabó et al. (1995) suggested that males can suffer deleterious effects to their reproductive and digestive systems, as was observed in females. In the two dog breeds, consecutive infestations interfered with the number of larvae and nymphs that engorged, demonstrating an immune response to infestation by these stages. However, percentage of ecdysis and conversion to eggs was affected only in resistant beagles. When evaluating the development of resistance in dogs to *R. sanguineus*, Bechara et al.

(1995a, b) and Szabó et al. (1995) did not observe a reduction in the percentage of recovery and in reproductive parameters after successive infestations in mongrel dogs. These results are similar to those for cocker spaniels in the present study. These authors, however, affirm that either dogs are unable to develop resistance to this tick or the tick is very efficient at evading the resistance mechanisms of dogs. However, results obtained with immature stages and observations on conversion to eggs in beagle infestations do not corroborate this affirmation. Our results agree in part with observations by Jitapallapong et al. (2000b), who reported a reduction in all reproductive parameters, as well as lower female recovery after successive infestations in beagles.

The modal engorgement period for larvae and nymphs was 96h and did not depend on host breed, as shown by Sartor et al. (1996) and Silva, Felipi (1997) using rabbits and Bechara et al. (1995) using guinea pigs, *Cavia porcellus* (Linnaeus), as hosts. Although these authors used non-preferred *R. sanguineus* hosts, the animals used were considered susceptible to the first tick infestation. Bechara et al. (1995) and Szabó et al. (1995) observed, however, that after the second and third infestations in hamsters (*Mesocricetus auratus*) (Waterhouse) and guinea pigs, the engorgement period increased significantly, indicating the development of host resistance. This, however, was not observed in the present study. The female engorgement period was similar to that observed by Bechara et al. (1995) and Szabó et al. (1995). Some authors report a significant increase in the female engorgement period due to the females' lack of fertilization (Szabó et al., 1995; Brown et al., 1984). It is suggested that this occurred in our experiment because some females remained attached but did not engorge. There is a possibility that if the ticks had been allowed to remain on the dogs longer, these females would have engorged.

Based on what has been presented, we conclude that cocker spaniels are more susceptible to *R. sanguineus* than beagles and that there is interference in tick development, especially in resistant dogs. For this reason, it is suggested that when evaluating the development of resistance, the breed of dog must be considered, since the modified parameters in susceptible dogs are few and subtle, and are more evident in resistant

individuals. It is further recommended that studies of the immature stages be included since they are more affected in the resistant individuals.

Acknowledgment

We thank the National Council of Technological and Scientific Development (CNPq) for its financial support of this project. Thanks also to the Veterinary School of the Federal University of Goiás (UFG) for providing the kennels used in this study.

References:

- Bechara, G.H. 2006. Imunopatologia da interação carrapato-hospedeiro. IN: Carrapatos de Importância médico-veterinária da região neotropical, um guia ilustrado para identificação das espécies; por Darci Moraes Barros-Battesti, Márcia Arzua e Gervásio Henrique Bechara. São Paulo, Vox/ICTTD-3/Butantan, 223ps.
- Bechara, G.H., M. P. J. Szabó, B.R. Ferreira e M.V. Garcia. 1995. *Rhipicephalus sanguineus* tick in Brazil: feeding and reproductive aspects under laboratorial conditions. Rev. Bras. Parasitol. 4 (2): 61-66.
- Bekele, T. 2002. Studies on seasonal dynamics of ticks on Ogaden cattle and individual variation in resistance in eastern Ethiopia. J. Vet. Med., 49: 285-288.
- Brown, S.J., R.W. Barker, P.W. Askenase. 1984. Bovine resistance to *Amblyomma americanum* ticks: an acquired immune response characterized by cutaneous basophils infiltrates. Vet. Parasitol. 16: 147-165.
- Castangnolli, K.C., L.B. de Figueiredo, D.A. Santana, M.B. de Castro, M.A. Romano, M.P.J. Szabó. 2003. Acquired resistance of horses to *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) ticks. Veterinary Parasitology, 117: 271–283.
- Chiera, J. W., R. M. Newson, M. P. Cunnighan. 1985. Cumulative effects of host resistance on *Rhipicephalus appendiculatus* Neumann (Acarina: Ixodidae) in the laboratory. Parasitol, 90: 401-408.
- Dizij, A.A., K. Kurtenbach. 1995. *Clethrionomys glareolus*, but not *Apodemus flavicollis*, acquires resistance to *Ixodes ricinus*, the main European vector of *Borrelia burgdorferi*. Par. Immun., 17(4): 177-183.
- Ferreira, B. R., G. H. Bechara. 1995. Imunidade a carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* (acari: Ixodidae) em cachorro – do – mato

Cerdocyon thous (LINNAEUS) e no cão doméstico. Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, 32(4): 232-237.

Ferreira, B. R., M. J. P. Szabó, K. A. Cavasani, G. H. Bechara, J. S. Silva. 2003. Antigens from *Rhipicephalus sanguineus* ticks elicit potent cell-mediated immune responses in resistant but not in susceptible animals. Vet. Parasitol. 115(1): 35-48.

Inokuma, H.; K. Tamura, T. Onishi,. 1997. Dogs develop resistance to *Rhipicephalus sanguineus*. Vet. Parasitol. 68: 295-297.

Inokuma, H.; M. Mukay, Y. Yamamoto, K. Ohno.; T. Onishi,. 1999. Duration of antibodies against 24kd protein of *Rhipicephalus sanguineus* extract in dogs infested with the adult ticks. J. Vet. Med. Sci. 61(2): 179-181.

Jittapalapong, S.; R.W. Stich.; T. E. Wittum,; O. O. Barriga. 2000. Performance of female *Rhipicephalus sanguineus* fed on dogs exposed to a multiple infestation or imunuzation with tick salivary gland or midgut. J. Med. Entomol. 37: 601-611.

Kaufman, W. R. 1989. Tick-Host interaction: A synthesis of current concepts. Parasitol. Today 5(2): 47-56.

Kheir, S. M., H. S. Abdala, O.O. Dipeolu. 1999. Comparative study of immunization systems against *Rhipicephalus appendiculatus* (Acari: Ixodidae) in rabbits. Sudan J. Vet. Res. 13: 41-50.

Kostrzewski, M. V., 1989. Differential resistance to *Amblyomma hebreum* and other common South África tick species by different cattle breeds under field conditions. Ph.D. Thesis. Medical University of Southern Africa, South Africa.

Labruna, M.B., M.C. Pereira. 2001. Carrapatos em cães no Brasil. Clínica Veterinária 6(30): 24-32.

Latif, A. A., D. K. Punyua, S. Nokoe and P. B. Capstick. 1991. Ticks Infestation on Zebu cattle in West Kenya: Individual Host Variation. J. Med. Entomol. 28(1) 114-121.

Loftis, A. D., D. E. Ross, M. L. Levin. 2004. Susceptibility of mice (*Mus musculus*), to repeated infestation with *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) ticks. J. Med. Entomol., 41(6) 1171-1174.

Louly, C. C. B., I N. Fonseca, V. F. Oliveira, G. F. C. Linhares, L. B. Menezes, L. M. F. Borges. 2007. Seasonal Dynamics Of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) on Dogs From A Policy Unit In Goiânia, Goiás, Brazil. Ciên. Rur., 37: 464-469,.

Moraes, F.R., A.J. Costa, C.R. Woelz, J.R.E. Moraes, U.F. Rocha. 1986. Ecologia de carrapatos, XV: Suscetibilidade natural comparative entre taurinos e zebrinos ao *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acari: ixodidae). Ars. Vet., 2(1) 45-52.

O'Dwyer, L.H., C.L. Massard. 2001. Aspectos Gerais da Hepatozoonose Canina. Clínica Veterinária, 31: p 34-40

Rechav, Y. 1992. Naturally acquired resistance to ticks- A global view. Ins. Sci. Appl., 13(4) 495-504.

Rechav, Y., M. W. Kostrzewski. 1991. Relative resistance of six cattle breeds to tick *Boophilus decoloratus* in South Africa. Onderstepoort J. Vet. Res., 58: 181-186.

Riek, R. F. 1962. Studies on the reactions of animals to infestation with ticks. IV. Resistance of cattle to infestation with the tick *Boophilus microplus* (Canestrini). Austr. J. Agric. Res., 13: 532-550.

Santos Silva, M. M., A. R. Filipe. 1998. Ciclos biológicos de ixodídeos (Acari: Ixodidae) em condições de laboratório. Rev. Port. de Ciên. Vet. 93(527) 143-148.

Sartor, A. A., D. W. Cunha, E. Daemon. 1996. Aspectos da biologia de *Rhipicephalus sanguineus* (Latrielle, 1806) (Acari: Ixodidae) em condições de laboratório: Fase parasitária de larvas, ninfas e fêmeas e não parasitária de larvas e ninfas. Revista brasileira de Medicina Veterinária, 18(1): 14-17.

Szabó, M. P. J., G. H. Bechara. 1997. Immunisation of dogs and guinea pigs against *Rhipicephalus sanguineus* ticks using gut extract. Vet. Parasitol., 68: 283-294.

Szabó, M.P.J., L.S. Mukai, P. C. S. Rosa, G. H. Bechara. 1995. differences in the acquired resistance of dogs, hamsters and guinea pigs to repeated infestations with adult ticks *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: ixodidae). Braz. J. Vet. Res. Anim.Sci., 32(1): 43-50.

Tatchel, R. J. 1987. Interactions between ticks and their hosts. Int. J. of Parasitol., 17(2): 597-605.

Verissimo, C.J.; C.V.J Nicolau,.; V.L. Cardoso, M.G. Pinheiro. 2002. Haircoat characteristics and tick infestation on Gyr (zebu) and crossbred (Holstein x Gyr) cattle. Arch. de Zootecnia, Córdoba, 51: 196.

Waladde, S. M., M. J. Rice. 1982. The sensory basis of tick feeding behaviour pp. 71-118. In: Obenchain, F. D.; R. Galun. Physiology of ticks. Great Britain: Pergamon Press.

Woldehiwet, Z., M. Ristic. 1993. Rickettsial and Chlamydial, Diseases of Domestic Animals. New York. USA. 427p

TABLE 1: Percentage of larval (LE) and nymphal ecdysis (NE), average $\pm$ standard deviation of the female weight (FW), and percentage of conversion of body weight in eggs (CBWE) and of larval hatchability (LH) of *R. sanguineus* collected from dogs of the Cocker spaniel and Beagle groups, during three artificial infestations.

Groups	Infestation	LE (%)	NE (%)	FW (mg)	CBWE (%)	LH (%)
Cocker spaniel	1 st	100 a, A	93 a, A	85 $\pm$ 29 a, A	60 $\pm$ 20 a, A	77 a, A
	2 nd	98 a, A	100 a, A	113 $\pm$ 20 a, A	78 $\pm$ 9 b, A	83 a, A
	3 rd	100 a, A	100 a, A	95 $\pm$ 23 a, A	73 $\pm$ 10 b, A	85 a, A
	Average	99,3 A	97,5 A	102 $\pm$ 25 A	73 $\pm$ 14 A	81,4 A
Beagle	1 st	14 a, B	89 a, A	98 $\pm$ 24 a, A	62 $\pm$ 13 b, A	36 a, B
	2 nd	0 b, B	46 b, B	111 $\pm$ 37a, A	53 $\pm$ 23 a, b B	25 a, B
	3 rd	0 b, B	0 c, B	111 $\pm$ 49 a, A	42 $\pm$ 23 a, B	28 a, B
	Average	4,7 B	45 B	105 $\pm$ 34A	55 $\pm$ 20 B	29,4 B

Legend: Different letters in the same column indicate significant differences. Capital letters indicate comparison between infestations within a breed. Lowercase letters indicate comparison between breeds for the same infestation.

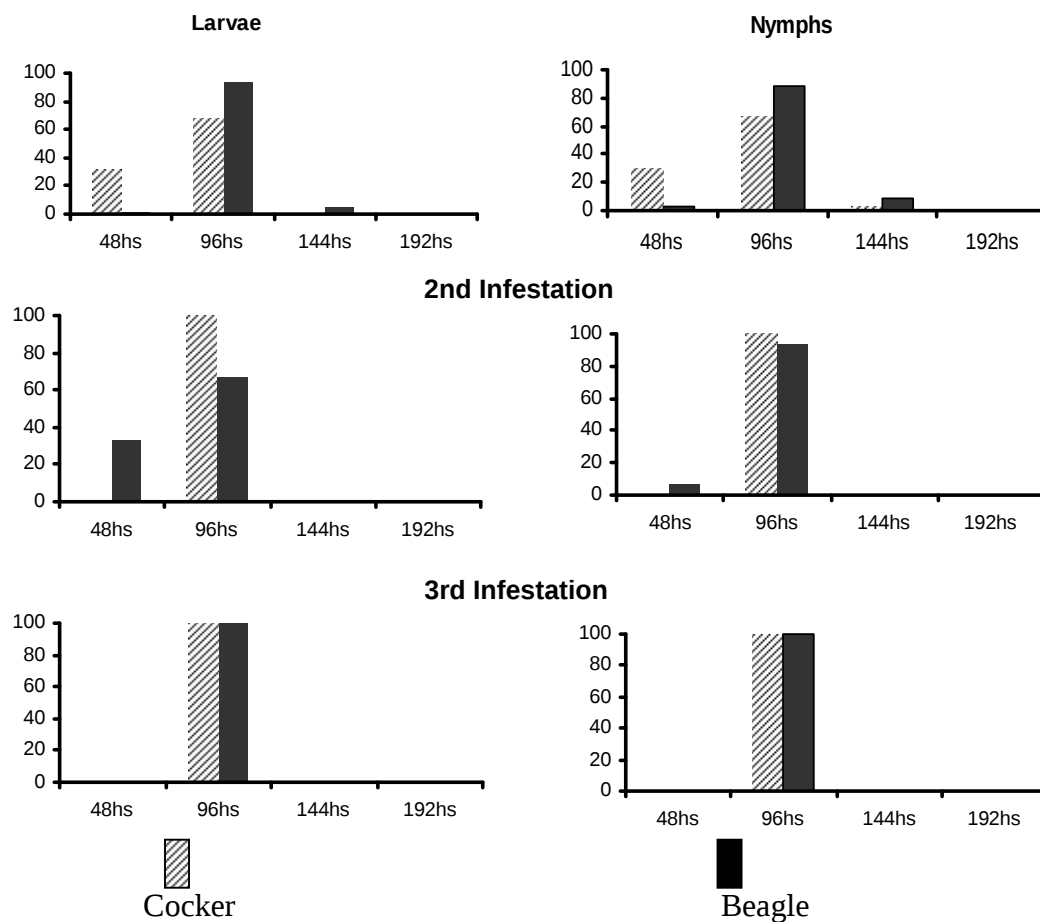


FIGURE 1 - Engorgement period of larvae and nymphs recovered from the dogs of the Cocker and Beagle groups, at intervals of 48, 96 and 144 hs, during the three infestations.

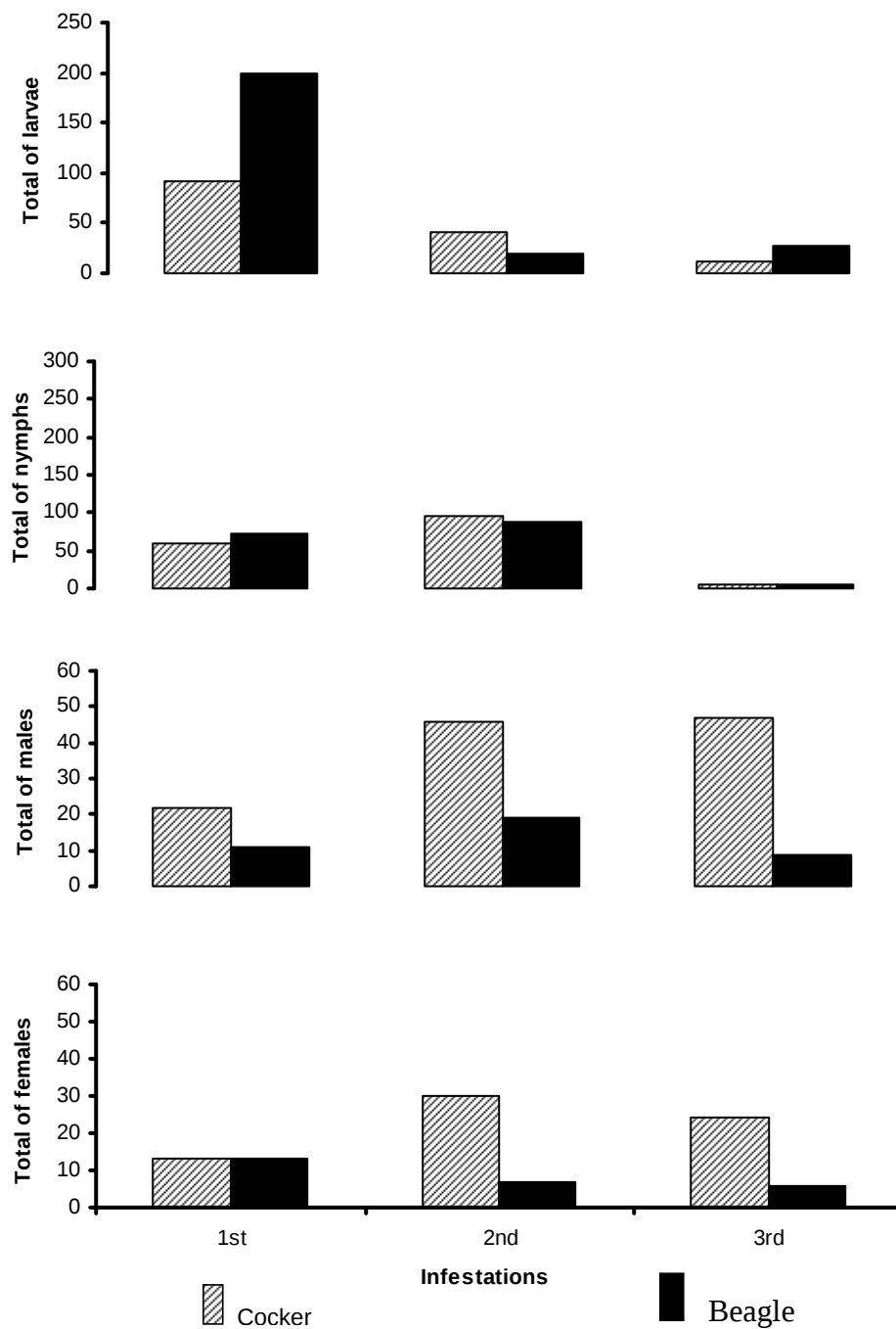


FIGURE 2 - Total number of larvae, nymphs, males and females of *R. sanguineus* recovered from the dogs of the Cocker and Beagle groups, during the three infestations.

CAPÍTULO 4: Diferença de arrestamento de *Rhipicephalus sanguineus* em odor de cães resistentes e sensíveis.

Carla Cristina Braz Louly¹, Sara Fernandes Soares¹, Diana Da Nóbrega Silveira², Marcelo Sales Guimarães², Lígia Miranda Ferreira Borges³

Resumo

Visando avaliar se *Rhipicephalus sanguineus* diferencia hospedeiros resistentes (Beagle) dos sensíveis (Cocker Spaniel Inglês), foram conduzidos estudos através de infestações artificiais e de testes comportamentais. Cinco cães de cada raça, com idade entre 90 e 105 dias, foram liberados em um canil com as paredes infestadas com 21.000 larvas, 960 ninfas e 480 adultos e posteriormente inspecionados para a colheita dos ixodídeos. Substâncias da pele de cada cão foram colhidas de duas formas: a) flanelas limpas foram esfregadas nos cães para os testes de arrestamento (parada das atividades locomotoras) e b) cápsulas contendo sílica e carvão ativado, fixadas por 12 h nos cães, foram eluídas em diclorometano para testes de atratividade em olfatometria. Três tratamentos: Cocker x controle; Beagle x controle e Cocker x Beagle foram realizados, com cada substância. Para o arrestamento, cinco machos e cinco fêmeas, não alimentados, foram liberados no centro de um isopor (15 x 30 cm) colocado dentro de bandeja com água. Nas extremidades opostas do isopor foram colocados os tecidos impregnados e a posição dos carrapatos foi avaliada após 1, 18 e 24 horas. Foram realizadas 10 repetições para cada tratamento. Em um olfatômetro em Y foram testados 15 machos e 15 fêmeas, em cada tratamento. Quando liberados no meio ambiente, 5x mais carrapatos se fixaram nos Cocker que nos Beagle. Um número expressivo de carrapatos já estava arrestado após 1 hora de exposição a substâncias das duas raças, mas houve um pequeno incremento nas leituras de 18 e 24

¹ Pós-Graduação em Sanidade Animal/ Escola de Veterinária/ UFG, caixa postal 131, CEP:74001-970, Goiânia, Goiás.

² Graduação em Medicina Veterinária/ Escola de Veterinária/ UFG

³ Laboratório de Parasitologia Veterinária/ DMIPP/ IPTSP/ UFG

horas. O arrestamento foi mais expressivo nas substâncias provenientes dos Cocker tanto nos testes com o controle quanto nos testes com as duas raças, simultaneamente. Na olfatometria, não houve atração para o odor de qualquer raça avaliada, entretanto o odor dos Beagle foi aparentemente repelente para os carrapatos. Os resultados indicam que *R. sanguineus* utiliza substâncias químicas provenientes dos cães para separar aqueles da raça susceptível Cocker Spaniel Inglês daqueles da raça resistente Beagle. Este comportamento é biologicamente aceitável, pois carrapatos alimentados em Beagle têm comprometimento da sua viabilidade biológica.

Palavras Chave: caiomônios, arrestantes, atraentes, *R. sanguineus*,

Abstract

Aiming to evaluate if *Rhipicephalus sanguineus* differentiates resistant hosts (Beagle) of the sensible ones (Cocker English Spaniel), had been lead studies through artificial infestations and of manning tests. Five dogs of each breed, with age between 90 and 105 days, had been set free in a kennel with the walls infested with 21.000 larvae, 960 nymphs and 480 adults and later inspected for harvest the ticks. Extracts of the skin of each dog had been collected of two forms: clean flannels had been rubbed in the dogs for the arrestment tests (stop of the locomotive activities) and b) capsules contend silica and activated charcoal, fixed for 12 h in the dogs, had been eluated with dichloromethane for tests of attractiveness in the olfactometer. Three treatments: Cocker x control; Beagle x control and Cocker x Beagle had been carried through, with each extract. For the arrestment, five males and five females, not fed, had been set free in the center of a styrofoam (15 x 30 cm) placed inside of tray with water. In the opposing extremities of the styrofoam the impregnated filter paper had been placed and the position of the ticks was evaluated after 1, 18 and 24 hours. 10 repetitions for each treatment had been carried through. In one Y olfactometer had been tested 15 males and 15 females, in each treatment. When set free in the environment, 5x more ticks had fixed in the Cocker than in the Beagle. A expressive number of ticks was already arrested 1 hour after exposition

the extracts of the two breeds, but it had a small increment in the readings of 18 and 24 hours. The arrestment was expressively higher in extracts from the Cocker in the tests with the control and in the tests with the two races, simultaneously. In the olfatometer, it did not have attraction for the odor of any evaluated breed, however the odor of the Beagle was apparently repellent for the ticks. The results indicate that *R. sanguineus* uses chemical substances from the dogs to separate those of the susceptible breed English Cocker Spaniel than those of the resistant breed Beagle. This behavior is biologically acceptable, therefore ticks that fed in Beagle had its biological viability damaged.

Key Words: Kairomones, arrestants, attractants, *R. sanguineus*.

Introdução:

Rhipicephalus sanguineus (Latreille) é uma das espécies de carrapatos mais amplamente distribuída pelo mundo e tem o cão como seu hospedeiro preferencial. No Brasil, a espécie raramente é encontrada parasitando outros hospedeiros, como cavalos, bovinos e o homem, e quando ocorre este parasitismo geralmente está associado com um estreito contato destes hospedeiros com o cão (Labruna, Pereira, 2001; Louly et al., 2006). Já em outras partes do mundo sua ocorrência é compartilhada com outras espécies do mesmo gênero, muito próximas entre si e morfologicamente muito semelhantes constituindo o que se conhece como o grupo *R. sanguineus*, sendo elas *Rhipicephalus turanicus* (Pomerantsev) e *Rhipicephalus camicasi* (Morel, Mouchet, Rodhain) além da *R. sanguineus*, existem relatos destas espécies parasitando diversos mamíferas e até aves rasteiras, mas como a sua diferenciação muitas vezes não é possível, não existe um consenso entre os pesquisadores sobre a especificidade parasitária das mesmas (Soulsby, 1966, Uspensky, 1997, Guglielmone et al., 2006). Ao cão causa danos diretos tais como a espoliação de sangue, dermatites, desconforto e a paralisia provocada por neurotoxinas liberadas pelo carrapato durante sua alimentação e indiretos como a transmissão de

babesiose, hemobartelonose, hepatozoonose e erliquiose (Woldehiwet, Ristic, 1993, O'Dwyer, Massard, 2001).

Louly *et al.* (2007) estudaram, por um ano, infestações naturais de cães mantidos em um mesmo canil. Os cães da raça Cocker Spaniel Inglês foram até 10 vezes mais infestados por *R. sanguineus* do que aqueles sem raça definida, sugerindo que o Cocker é mais susceptível a este carrapato. Posteriormente, através de infestações artificiais e acompanhamento de parâmetros biológicos, Louly *et al.* (2008) confirmaram que os animais da raça Cocker eram mais susceptíveis a espécie *R. sanguineus* do que cães Beagle e as infestações sucessivas afetaram o desenvolvimento do carrapato, especialmente nos indivíduos resistentes.

Estudos sobre a capacidade sensorial dos carrapatos demonstram que estes artrópodes são capazes de responder a uma grande variedade de estímulos mecânicos, térmicos, gustativos, ópticos e olfativos, porém existem poucos estudos sobre a resposta de *R. sanguineus* aos estímulos produzidos pelo cão, com exceção dos trabalhos confirmando a atração deste para o CO₂ (Stella *et al.*, 1998, Louly *et al.*, 2007). Para o encontro do hospedeiro, os carrapatos podem perceber substâncias voláteis ou não voláteis, liberadas pelo hospedeiro, ou subprodutos do desenvolvimento destes como fezes e urina. (Waladde, Rice, 1982 Carroll, 1998). *R. sanguineus* é uma espécie nidícola, ou seja, se desenvolve no ambiente próximo do hospedeiro e pode buscar ativamente este para realizar o repasto sanguíneo (Labruna, Pereira, 2001), ou mesmo usa a estratégia de emboscada (Uspensky, 2002).

Substâncias produzidas pelo hospedeiro têm atuado como arrestantes para *Ixodes scapularis*, *Amblyomma americanum* e *Dermacentor variabilis* (Carroll *et al.*, 1995; Carroll, 1998; Carroll *et al.*, 1998). *Rhipicephalus evertsi evertsi* e *Rhipicephalus appendiculatus*, duas espécies de carrapatos que parasitam bovinos, são capazes de diferenciar locais preferenciais de fixação em um mesmo hospedeiro, através de substâncias químicas (Wanzalla *et al.* 2004). Wallade, Rice (1977) sugeriram que os animais resistentes podem apresentar substâncias na pele ou no soro, que quando percebidas por sensilas gustativas podem inibir a realização do

repasto sanguíneo pelo carrapato, participando tanto da seleção do hospedeiro, quanto na manifestação da resistência por parte deste.

Sabendo que existe diferença de susceptibilidade entre as raças Beagle e Cocker ao *R. sanguineus* (Louly et al., 2008). Existe também a possibilidade da participação de substâncias químicas produzidas pelo hospedeiro como sinalizador desta resistência (Wallade, Rice, 1977). Diante destes fatos, este trabalho foi conduzido visando avaliar se *R. sanguineus* diferencia hospedeiros resistentes (Beagle) dos sensíveis (Cocker). Para isto, animais das duas raças foram submetidos a infestações artificiais e substâncias químicas produzidas por eles foram avaliadas através de testes comportamentais.

Materiais e Métodos

Experimento 1 – Localização do hospedeiro em infestações artificiais

Animais e carrapatos: foram utilizados 10 cães com contato prévio com *R. sanguineus*, divididos em dois grupos de cinco animais em cada, sendo um da raça Cocker e um da raça Beagle. Ambos os grupos com números iguais de machos e fêmeas e com idade variando de 90 a 105 dias. Os cães não foram tratados com carrapaticida pelo menos 30 dias antes do início do estudo. Os cães recebiam ração (Max Filhote - Total) duas vezes por dia, seguindo a quantidade recomendada pelo fabricante e água a vontade. Fêmeas ingurgitadas de *R. sanguineus* foram colhidas de cães naturalmente infestados para estabelecimento de uma colônia. Os carrapatos foram mantidos em estufa climatizada (27°C e 80% de URA) e eram alimentados em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) para obtenção dos estádios a serem usados nas infestações. Os coelhos eram infestados com um máximo de 30 adultos, 200 ninfas ou 1000 larvas e após duas a três infestações foram doados. Durante as infestações, tanto os cães como os coelhos eram examinados diariamente e nenhum mostrou sintomas devido ao parasitismo por carrapatos.

Local: os cães foram mantidos no canil do Hospital Veterinário da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás. O canil tinha uma área

coberta, com 12 baias individuais (1 m largura x 1,5 m comprimento), uma área aberta com solário (3 m de largura x 5 m de comprimento), era cimentado, com as paredes do pátio azulejadas, e as paredes das baias e da área coberta revestidas com esmalte sintético para facilitar a higienização. Um mês antes das infestações o canil foi pulverizado, usando uma bomba costal, com amitraz 12,5%, Bayer, diluído de acordo com as instruções do fabricante e passou por um vazio sanitário, durante o qual foi higienizado com vassoura de fogo semanalmente até o início do experimento.

Infestações: foram distribuídos nas paredes do canil 7000 larvas, 320 ninfas e 160 adultos (80 machos e 80 fêmeas) em 3 infestações, com intervalo de 10 dias. Os cães de ambos os grupos ficaram soltos neste canil. Os cães Cocker foram tosados para terem os pelos do mesmo comprimento que os Beagle, oferecendo as mesmas condições para infestação pelos carrapatos. Após 2 dias da primeira infestação, os cães foram inspecionados, duas vezes por dia, às nove da manhã e às cinco da tarde por 40 dias. Os carrapatos encontrados foram contados e colhidos para identificação do estágio parasitário.

Experimento 2 – Testes de arrestamento e atratividade para odores do hospedeiro

Local: Os testes de arrestamento e atratividade foram desenvolvidos em uma sala climatizada ($T = 27^{\circ}\text{C}$, $\text{UR} = 70\%$ e 12:12 luz:escuro), localizada no Laboratório de Artropodologia do Centro de Parasitologia da Universidade Federal de Goiás.

Testes de arrestamento: Substâncias da pele dos cães foram colhidas utilizando uma modificação da técnica descrita por Carroll, na qual os tubos de vidro foram substituídos por pedaços de flanela de algodão. Os pedaços de flanela de algodão foram lavados com detergente, autoclavados, secos em temperatura ambiente, imersos em hexano, em sequência em acetona e posteriormente secos a 100°C . Os cães eram deixados por 15 dias sem banho e por 30 dias sem contato com carrapaticidas. As flanelas foram esfregadas nas regiões do dorso, cabeça e parte externa do pavilhão auricular dos cães, por aproximadamente 15 minutos (5 minutos em cada

região). Depois da colheita, as amostras eram identificadas e acondicionadas em sacos plásticos lacrados e armazenadas em freezer a -20°C. Foram colhidas amostras de todos os cães.

Para os testes foram usadas bandejas brancas, de formato retangular (20 cm x 40 cm x 8cm), com água destilada no fundo e fita dupla face nas bordas para evitar a fuga dos carrapatos. No centro destas bandejas foi disposto um retângulo de isopor (15 cm x 30 cm x 2 cm). Nas extremidades opostas do isopor foram colocadas duas placas de isopor (5 cm x 5 cm x 1cm) sendo uma com a amostra e a outra uma flanela limpa como controle. Os tratamentos foram: 1-Cocker versus controle; 2- Beagle versus controle; 3- Cocker versus Beagle. Foram realizadas 10 repetições de cada tratamento com o odor de cada cão. Cada cão de uma mesma raça foi numerado sequencialmente de 1 a 5 e os cães de mesmo número foram testados simultaneamente. Cinco machos e cinco fêmeas de *R. sanguineus*, não alimentados, com idade variando de 7 a 21 dias, foram liberados no centro do isopor. Após 1, 18 e 24 horas da liberação foram contados quantos carrapatos chegavam e permaneciam arrestados em cada amostra.

Testes de atratividade:

O odor dos cães foi colhido seguindo a técnica descrita por Gikonyo (2000). Uma cápsula retangular (10 cm x 8 cm) com formato parecido com o de um envelope com um lado feito de alumínio e o outro de tela de aço, com malha de 100 µm (9 cm x 7cm) continha um envelope de papel filtro (9 cm x 7cm) (Whatman nº1 Qualitative), contendo 250 mg de carvão ativado (40µm Fluka – Sigma Aldrich) e 350 mg de silicagel-C18, 40µm (JT Baker – Hexis-Sigma Aldrich). A cápsula foi fixada na região dorsal de um cão, com a face telada em contato com a pele permanecendo por 12 horas e após a colheita, foi armazenada em freezer a -20°C até a eluição. Em seguida, o conteúdo do envelope foi transferido para um cartucho ODS (Accu Bond, Solid Phase Extraction-J&W Scientific) e eluído com 4ml de diclorometano grau HPLC (EM Science-Merck) e depois concentrado a um volume de 150 µL com gás nitrogênio. Foram colhidos os odores dos cinco cães de cada raça

Os testes foram realizados em um olfatômetro em Y (20 cm), feito de vidro, conectado pelos dois braços por mangueiras de silicone à saída frontal de um Kitasato de vidro contendo água destilada. Na entrada superior

do Kitasato estava conectada uma mangueira de silicone que se ligava na outra extremidade à saída da fonte de vento, sendo esta um compressor de ar Diapump da Fanem. A umidade mantida dentro do olfatômetro era de 80%, a velocidade do vento era de 30 cm/s e a temperatura ambiente por volta de 25 °C, em uma sala climatizada. A amostra (10 µL) de cada cão foi colocada em papel filtro de 5 x 5 mm, como controle um papel filtro recebeu volume igual de diclorometano grau HPLC (EM Science-Merck). O odor de cada cão foi testado frente a 15 machos e 15 fêmeas e os tratamentos foram os mesmos descritos anteriormente nos testes de arrestamento. Cada carrapato era liberado no corpo do olfatômetro e observado até a escolha de um dos braços ou por até um minuto, no caso do carrapato não escolher nenhum dos dois braços ou deixar o olfatômetro, este era recolocado no corpo do olfatômetro novamente, sendo que eram dadas até três oportunidades a cada carrapato, se este não escolhesse nenhum dos braços era substituído.

Estatística: foi utilizado o teste do χ^2 para comparação dos resultados obtidos, sendo o nível de significância $P < 0,05$.

Resultados

Infestações no meio ambiente:

Foram recuperadas 87 (0,4%) larvas de um total de 21.000 liberadas no canil, sendo que o número de larvas foi significativamente maior no grupo dos Cocker nas duas primeiras infestações do que no grupo Beagle, mas não houve diferença entre os grupos na terceira. Foram recuperadas 276 (29%) das 960 ninfas liberadas no ambiente. O número de ninfas colhido no grupo Cocker foi significativamente maior do que nos Beagle, nas três infestações. Foram recuperados 230 (50%) de um total de 460 adultos liberados no ambiente. O número total de machos e fêmeas foi significativamente maior no grupo Cocker (98 e 80) do que no Beagle (35 e 17), tendo sido maior nas três infestações (TABELA 1).

Testes de arrestamento

Somando os resultados obtidos para todos os cães, um número expressivo de carrapatos já estava arrestado após 1 hora de exposição a substâncias de uma das raças, sendo 67% na dos Cocker e 47% na dos Beagle, contra 17% e 16% no controle de cada raça, respectivamente. Após 18 e 24 horas houve um pequeno incremento no número de carrapatos arrestados, alcançando, na última leitura, 77% nas substâncias colhidas de Cocker e 55% na dos Beagle, contra 10 e 13% nas flanelas controle, respectivamente (Fig. 1).

Devido ao maior arrestamento após 24 horas, as raças foram comparadas neste período. Quando as substâncias das duas raças foram testadas frente ao controle, sempre houve arrestamento, sendo este mais expressivo nas substâncias provenientes dos Cocker. Nesta raça houve mais de 70% de arrestamento com as substâncias de todos os animais avaliados, enquanto nos Beagle este arrestamento só atingiu este patamar em um animal. Em ambas as raças, alguns carrapatos não se arrestaram, permanecendo no isopor ou ficando retidos na fita ou na água, no grupo Cocker este número foi sempre menor que os carrapatos arrestados, mas para os Beagle foi às vezes maior (Fig. 2a e 2b). Quando testadas as duas raças simultaneamente, um número significativamente maior de carrapatos foi arrestado nas flanelas tratadas com as substâncias de Cocker do que na de Beagle, em quatro dos cinco cães testados (Fig. 2c).

Não houve diferença significativa entre o número de machos e fêmeas encontrados nas flanelas tratadas em nenhum dos três tratamentos. Quando comparados com o controle, na flanela tratada com odor de Cocker, do total de carrapatos encontrados 48,8% eram machos e 51,2% eram fêmeas e nas flanelas tratadas com odor de Beagle eram 53,2% machos e 46,8% fêmeas. Quando comparado entre as duas raças, foram observados 53,1% machos e 46,9% fêmeas no grupo Cocker, e 66,3% de machos e 33,7% de fêmeas no grupo Beagle.

Testes de atratividade

Somando os resultados obtidos para todos os cães avaliados, observou-se que nem os machos (45%) nem as fêmeas (55%) de *R. sanguineus* foram atraídos pelos odores de Cocker. Quando frente aos odores de Beagle, 31% e 21% dos machos e das fêmeas, respectivamente, foram para o braço tratado. Estes resultados parecem indicar uma repelência do odor de Beagle para adultos de *R. sanguineus*. Quando as duas raças foram confrontadas não houve diferença entre o percentual de machos se dirigindo para o odor de qualquer uma das raças, sendo de 43% para Beagle e 57% para Cocker. Exatamente os mesmos resultados foram observados com as fêmeas.

Quando os animais foram analisados individualmente, não houve diferença significativa entre o odor de nenhum dos cinco cães Cocker e o controle quando testados com machos e fêmeas de *R. sanguineus*. Frente ao odor de Beagle, para fêmeas, em quatro dos cinco cães e um em cinco para os machos, o número de carrapatos que escolheu o controle foi maior. Quando as duas raças foram comparadas, os machos e fêmeas de *R. sanguineus* não distinguiram o odor de nenhuma das raças avaliadas (Figuras 3 e 4).

Discussão

Os resultados observados tanto nos experimentos de infestação artificial quanto nos testes comportamentais indicam que o *R. sanguineus* utiliza substâncias químicas provenientes dos cães para separar os da raça susceptível Cocker Spaniel Inglês daqueles da raça resistente Beagle.

O total de larvas recuperado nos dois grupos foi baixo não chegando a representar 1% do total de larvas liberado no ambiente. Mesmo levando-se em consideração as perdas que são esperadas como, por exemplo, por dessecação ou por predação, este percentual foi muito baixo. Um dos fatores que pode ter colaborado para esta baixa recuperação é a auto-limpeza realizada pelos animais. Como já foi relatado, este comportamento pode remover de 30% a 80% dos carrapatos que chegam ao animal para se

alimentar e esta remoção é mais intensa nos animais mais resistentes (Penna, 1990). O fato de não ter sido utilizado nenhum método para impedir que os animais removessem os carrapatos permitiu este tipo de controle. As larvas por características particulares como seu tamanho reduzido e por se fixar e se desprender várias vezes no hospedeiro antes de iniciar o repasto são o estágio mais susceptível a este tipo de remoção por parte do hospedeiro (Penna, 1990; Rechav, 1992; Mooring, 2004). Os resultados aqui obtidos reforçam esta idéia, pois nos cães Cocker foram contadas quase seis vezes mais larvas que nos cães Beagle.

Para os outros estágios também foram contados mais carrapatos nos cães do grupo Cocker do que no grupo Beagle, chegando a um número quase cinco vezes maior. Poderia se pensar que estes efeitos foram devido à maior auto-limpeza assim como discutido anteriormente, no entanto o comportamento dos adultos frente às substâncias provenientes das duas raças indicam que *R. sanguineus* pode distingui-las e usá-las na escolha de indivíduos sensíveis em um grupo de cães sensíveis e resistentes antes de iniciar a alimentação.

Carrapatos utilizam substâncias liberadas pelos animais para localizar um hospedeiro para realizar o repasto sanguíneo (Carroll et al., 1998, Carroll 1999, Carroll, 2002), assim como, para identificar no hospedeiro locais mais adequados para se alimentar (Wanzala et al., 2004). Wallade, Rice (1977) sugeriram que os animais resistentes podem apresentar substâncias na pele ou no soro, que quando percebidas por sensilas gustativas podem inibir a realização do repasto sanguíneo pelo carrapato, participando tanto da seleção do hospedeiro, quanto na manifestação da resistência por parte deste. Afora esta suposição, não há até o que se sabe, outros relatos confirmando esta idéia.

Quando testados frente ao controle, os carrapatos preferiram se arrestar nas substâncias dos cães de qualquer raça. No entanto, este arrestamento foi mais expressivo nas substâncias provenientes dos Cocker. Por outro lado, quando os carrapatos tiveram que optar entre as substâncias das duas raças preferiram, nitidamente, aquelas provenientes dos Cocker. Quando testados frente aos odores obtidos dos cães das duas raças, no olfatômetro, não foi observada atratividade para nenhuma delas. Por outro

lado, nos testes com odor de Beagle e o controle os adultos de *R. sanguineus* apresentaram o comportamento de deixar o olfatômetro, o que não foi observado para o odor de Cocker Spaniel, sugerindo que possa haver substâncias repelentes no odor dos Beagles. Estes resultados necessitam ser confirmados, pois de acordo com Dautel (2004) o olfatômetro em “Y” não é o ensaio biológico mais indicado para avaliação de repelência. Esta deficiência do teste pode explicar porque quando as duas raças foram confrontadas no olfatômetro não houve repelência, pois pode ter ocorrido mistura dos odores no olfatômetro, neutralizando assim as substâncias repelentes dos Beagle.

A espécie *R. sanguineus* é conhecida como um carrapato de caça (Labruna, Pereira 2001), embora a estratégia de emboscada não possa ser totalmente descartada (Uspensky, 2002). Pelos resultados observados no presente estudo, aparentemente, para evitar parasitar cães resistentes, como os Beagle, ele usaria substâncias voláteis repelentes. As substâncias arrestantes poderiam ser percebidas após o carrapato subir no hospedeiro incitando-o a iniciar o repasto sanguíneo. Poderiam ainda ser usadas para a detecção de pontos de vantagem caso este carrapato use a estratégia de emboscada. Neste caso as substâncias deixadas pelos cães no ambiente indicariam ao carrapato os locais mais adequados para se posicionar e encontrar um hospedeiro assim como demonstrado por Carroll (2001) para *Ixodes scapularis* Say.

Mesmo que tenha sido demonstrado que as substâncias químicas participam de alguma forma na modulação do parasitismo de *R. sanguineus* em animais resistentes, esta estratégia não é totalmente eficaz, uma vez que os Beagle também foram infestados artificialmente, houve arrestamento nas substâncias desta raça e é conhecido que animais desta raça se infestam por este carrapato em situações naturais (Inokuma, 1997, Jittapalapong, 2000a, Jittapalapong, 2000b). Salienta-se que *R. sanguineus* é fortemente atraído pelo CO₂ (Stella, 1998, Louly, 2003) e Sonenshine (1993) relata a resposta de *R. sanguineus* ao latido de cães provavelmente estes fatores podem contribuíram para as infestações artificiais observadas no presente estudo, assim como as infestações naturais já relatadas na literatura.

O desenvolvimento de resistência por parte do hospedeiro ocasiona uma série de mudanças na pele do animal como aumento da temperatura, migração de células de defesa e liberação de substâncias que estimulem o comportamento de auto-limpeza do hospedeiro como a histamina (Penna, 1990; Engracia et al., 2006). Essas alterações poderiam resultar em alterações nas substâncias químicas produzidas pelos cães que seriam perceptíveis para o carrapato, permitindo que este possa diferenciar os animais resistentes dos susceptíveis.

A escolha de hospedeiros pelo *R. sanguineus* é vantajosa para a sua sobrevivência, uma vez que permite ao carrapato burlar os efeitos deletérios ocasionados ao se alimentar em um indivíduo resistente assim como demonstrado por Louly et al. (2008) que observaram um comprometimento na viabilidade biológica de carrapatos alimentados em cães da raça Beagle

Agradecimentos

Agradecemos ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) pelo apoio financeiro para realização do projeto. À Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás (UFG) pela cessão dos canis para realização do trabalho.

Referências:

CARROLL, J. F. How specific are host-produced kairomones to host-seeking ixodid ticks? **Experimental and Applied Acarology**, v 28, p 155-161, 2002.

CARROLL, J. F. Interdigital Gland Substances of White-Tailed Deer and The Response of Host-Seeking Ticks (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 38(1), p. 114-117, 2001.

CARROLL, J. F. Kairomonal activity of White-Tailed Deer metatarsal gland substances: A more sensitive behavioural bioassay using *Ixodes scapularis* (Acari:ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v.35, n.1, p. 90-93, 1998.

CARROLL, J. F. Notes on the Responses of Host-Seeking Nymphs and Adults of the Ticks *Ixodes scapularis* and *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) to Canine, Avian and Deer-Produced Substances.

Proceedings of the Entomological Society of Washington, v. 104(1), p. 73-78, 2002.

CARROLL, J. F. Responses of Adult *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) to Urine Produced by White-Tailed Deer of Various Reproductive Conditions. **Journal of Medical Entomology**, v. 37(3), p. 472-475, 2000.

CARROLL, J. F. Responses of Three Species of Adult Ticks (Acari: Ixodidae) to Chemicals in the Coats of Principal and Minor Hosts. **Journal of Medical Entomology**, v. 36 (3), 238-242, 1999.

DAUTEL, H. Test System For Ticks Repellents. **International Journal Of Medical Microbiology**, v. 293 (37), p. 182-188, 2004.

ENGRACIA FILHO, J. R., BECHARA, G. H., TEODORO, R.L. Dermal Mast Cell in F2 Holstein X Gir Crossbred Cattle Artificially Infested With the Tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Annals of the New York Academy of Science**, v. 1081, p. 476-478, 2006.

GIKONYO, N. K., HASSANALI, A., NJAGI, P.G.N., GITU, P. M., MIDIWO, J. O. Odor composition of Preferred (Buffalo and Ox) and Nonpreferred (Watherbuck) Hosts of Some Savanna Tsetse Flies. **Journal Of Chemical Ecology**, v. 28 (5), p. 969-981, 2000.

GUGLIELMONE, A. A., SZABÓ, M. P. J., MARTINS, J. R. S., ESTRADA-PEÑA, A. 2006. Diversidade e importância de carrapatos na sanidade animal. IN: Carrapatos de Importância médico-veterinária da região neotropical, um guia ilustrado para identificação das espécies; por Darci Moraes Barros-Battesti, Márcia Arzua e Gervásio Henrique Bechara. São Paulo, Vox/ICTTD-3/Butantan, p. 115-138.

INOKUMA, H., TAMURA, K., ONISHI, T. Dogs develop resistance to *Rhipicephalus sanguineus* . **Veterinary Parasitology**, v 68. p 295-297. 1997.

JITTAPALAPONG, S.; STICH, R. W.; GORDON, J.C.; BREMER, C. A.; BARRIGA, O. O. Humoral immune response of dogs immunized with salivary gland, midgut, or repeated infestation with *Rhipicephalus sanguineus*. **Annals New York Academy of Sciences**. 2000a.

JITTAPALAPONG, S.; STICH, R.W.; WITTUM, T. E.; BARRIGA, O. O. Performance of female *Rhipicephalus sanguineus* fed on dogs exposed to a multiple infestation or immunization with tick salivary gland or midgut. **Journal of Medical Entomology**. V 37, p 601-611. 2000b.

LABRUNA, M.B., M.C. PEREIRA. Carrapatos em cães no Brasil. **Clínica Veterinária**, 6(30): 24-32. 2001.

LOULY, C. C. B. **Dinâmica sazonal de *Rhipicephalis sanguineus*, no canil da policia militar, em Goiânia-Goiás, Brasil**. 54f. Dissertação

(Mestrado em Sanidade Animal)- Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiânia. 2003.

LOULY, C. C. B., FONSECA, I. N., OLIVEIRA, V. F., LINHARES, G. F. C., MENEZES, L. B., BORGES, L. M. F. Seasonal dynamics of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in dogs from a police unit in Goiânia, Goiás, Brazil. **Ciência Rural**, v.37, n.2, p.464-469. 2007.

LOULY, C. C. B., I N. FONSECA, V. F. OLIVEIRA, G. F. C. LINHARES, L. B. MENEZES, L. M. F. BORGES. 2007. Seasonal Dynamics Of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) on Dogs From A Policy Unit In Goiânia, Goiás, Brazil. **Ciência Rural**, 37: 464-469,.

LOULY, C. C. B., SOARES, S. F., SILVEIRA, D. N., SILVEIRA NETO, O. J., SILVA, A. C., BORGES, L. M. F. Effect Of *Rhipicephalus Sanguineus* (Acari: Ixodidae) On The Suceptibility Of Two Breeds Of Dogs, The English Cocker Spaniel And Beagle In Brazil. **International Journal of Acarology**, 34(3), Prelo, 2008.

MOORING, M. S., BLUMSTEIN D. T., STONER, C. J. The evolution of parasite-defence grooming in ungulates. **Biological Journal of the Linnean Society**, 81, 17–37, 2004.

O'DWYER, L.H., C.L. MASSARD. 2001. Aspectos Gerais da Hepatozoonose Canina. **Clínica Veterinária**, 31: p 34-40

RECHAV, Y. Naturally acquired resistance to ticks- A global view. **Insect Science Applied**, v 13, n 4. p 495-504. 1992.

SONENSHINE, D.E. **Biology of Ticks**. New York: Oxford University Press. EUA. 2: 1993. 463p.

SOULSBY, E.J.L. **Biology of Parasites. Emphasis on Veterinary Parasitism**. Academic Press. New York an London, 1966. p 72-77.

STELLA, E., KHOURY, C., D'AMATO, F.R., RIVOSECCHI, L. New data on the biology of *R. sanguineus* in the outskirts of Rome. **Rivista di Parasitologia**, 49, 1988. p 3-12.

USPENSKY, I. I., MUMCUOGLU, K. Y., USPENSKY, I. GALUN, R. *Rhipicephalus sanguineus* and *R. turanicus* (Acari: Ixodidae): Closely Related species with Different Biological Characteristics. **Journal of Medical Entomology**, 34(1), p. 74-81, 1997.

USPENSKY, I. Preliminary observation on specific adaptations of exophilic ixodid ticks to forests or open country habitats. **Experimental and Applied Acarology**, 28, p. 147-154, 2002.

WALADDE, S. M., RICE, M. J. 1977. The sensory nervous system of the adult cattle tick *Boophilus microplus* (Canestrini) Ixodidae. Part III. Ultra-

structure and electrophysiology of cheliceral receptors. **Journal of the Australian Entomological Society**, 16: 441-453.

WALADDE, S. M.; RICE, M. J. The sensory basis of tick feeding behaviour In: OBENCHAIN, F. D.; GALUN, R. **Physiology of ticks**. Great Britain: Pergamon Press, p. 71-118. 1982.

WANZALA, W., SIKI, N.F.K., GULE, S. HASANALI, A. Attractive and repellent host odours guide ticks to their respective feeding sites. **Chemoecology**, v 14, p 229-232. 2004.

WOLDEHIWET, Z., M. RISTIC. Rickettsial and Chlamydial, Diseases of Domestic Animals. New York. USA. 427p. 1993.

TABELA 1: Numero total larvas, ninfas, machos e fêmeas de *R. sanguineus* colhidos de cinco cães da raça Beagle e cinco Cocker, após três infestações realizadas nas paredes de um canil.

Grupo	Infestação	Larva	Ninfa	Macho	Fêmea	Total
Cocker	1 ^a	19	24	43	33	119
	2 ^a	52	38	35	32	157
	3 ^a	3	184	20	15	222
	Total	74	246	98	80	498
Beagle	1 ^a	1	10	19	6	36
	2 ^a	9	5	9	8	32
	3 ^a	3	15	7	3	28
	Total	13	30	35	17	96

Em uma mesma infestação, o número de carrapatos foi sempre maior no grupo Cocker que no Beagle, pelo teste do χ^2 ($P < 0,05$), com exceção do número de larvas na 3^a infestação que foi igual.

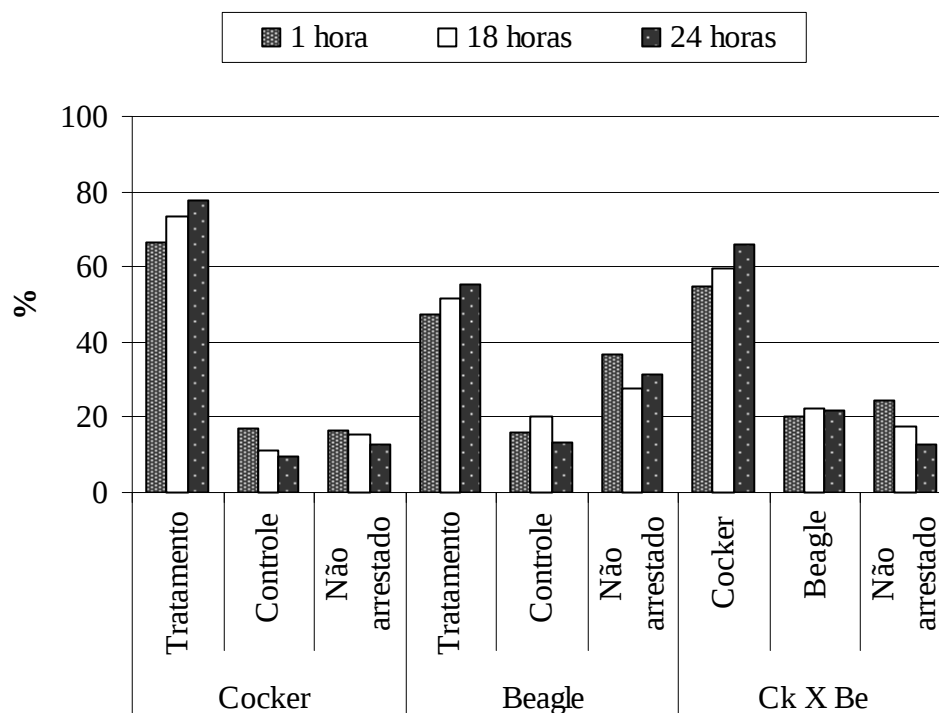


Figura 1 - Percentual de arrestamento de adultos de *Rhipicephalus sanguineus* após 1, 18 e 24 hs na presença de substâncias provenientes de duas raças de cães, Cocker Spaniel Inglês e Beagle

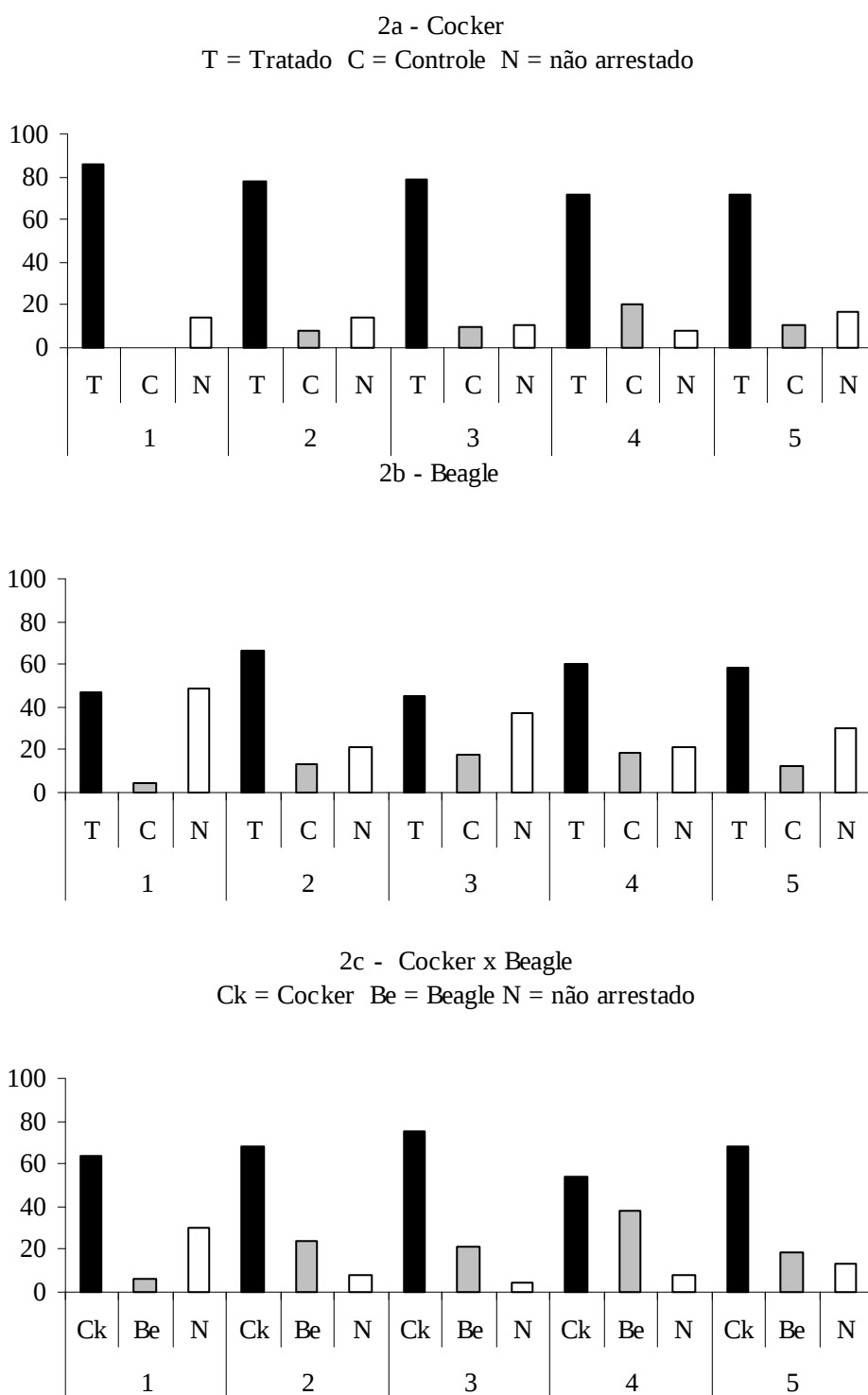


Figura 2 – Percentual de adultos de *Rhipicephalus sanguineus* arrestados frente a substâncias provenientes de duas raças de cães, Beagle ou Cocker Spaniel Inglês.

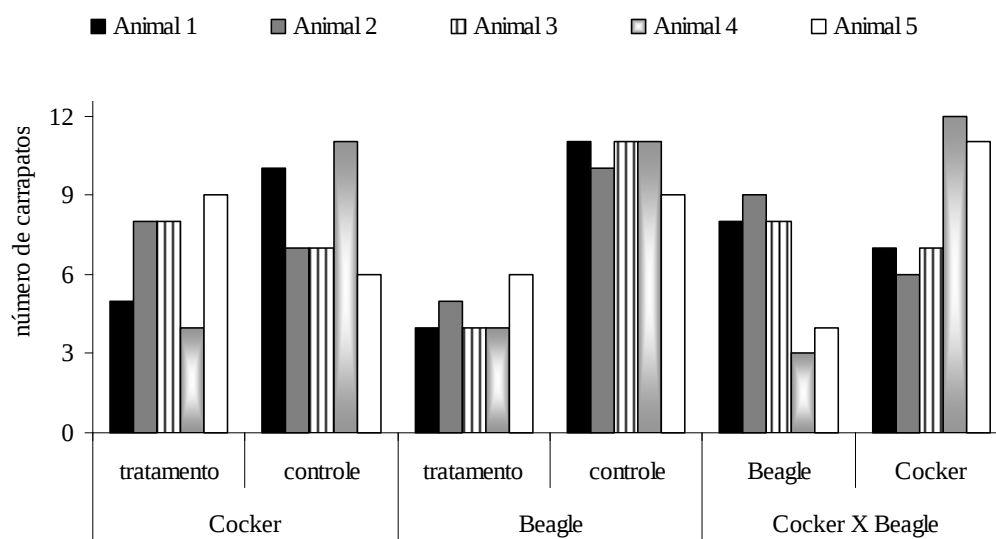


Figura 3 - Total de machos de *R. sanguineus* em um dos braços de um olfatômetro em Y tratado com o odor de cinco cães Cocker, cinco cães Beagle ou controle.

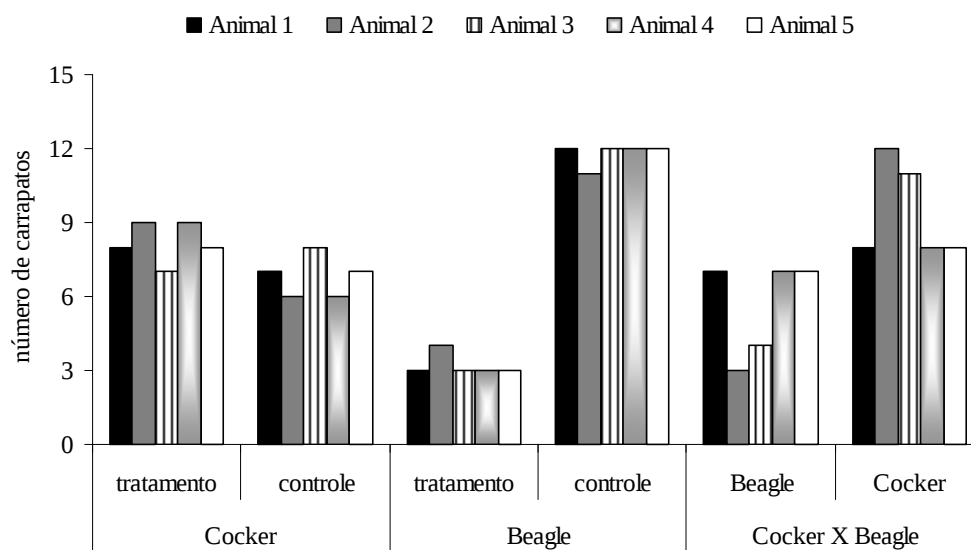


Figura 4 - Total de fêmeas de *R. sanguineus* em um dos braços de um olfatômetro em Y tratado com o odor de cinco cães Cocker, cinco cães Beagle ou controle.

CAPÍTULO 5: Considerações Finais

Baseado nos resultados apresentados no primeiro capítulo deste trabalho pode-se afirmar que o 2,6 diclorofenol não exerce o papel de atraente sexual na espécie *R. sanguineus*. O seu papel na ecologia desta espécie merece ser avaliado, uma vez que é produzido por fêmeas e há receptores no órgão de Haller para esta substância.

Com relação aos resultados do estudo de comparação da suscetibilidade entre as raças, podemos sugerir que a resistência do cão ao *R. sanguineus* varia de acordo com a raça, sendo os cães da raça Cocker Spaniel Inglês mais suscetíveis que os da raça Beagle. Pôde-se observar também que os estágios mais suscetíveis à resposta do hospedeiro são larvas e ninfas.

Também foi possível observar que o *R. sanguineus* é capaz de distinguir entre os animais resistentes e os sensíveis durante a fase de busca pelo hospedeiro, porém não se sabe até que ponto este mecanismo pode ser capaz de regular a alimentação em animais resistentes, visto que quando as infestações artificiais foram diretamente nos cães, os carrapatos também se alimentavam nos animais resistentes. Sabe-se também que cães Beagle são naturalmente infestados por *R. sanguineus*.

A comparação da resposta do *R. sanguineus* aos extratos de pele de cães das raças Cocker e Beagle, mostrou que as substâncias da pele isoladamente não foram atrativas para o carrapato em nenhuma das duas raças, porém as substâncias da pele dos Beagles se mostraram aparentemente repelentes. Testes específicos de repelência serão necessários para comprovar esta possibilidade. Já nos testes de arrestamento os extratos da pele dos Cocker foram mais eficientes em desencadear a resposta de arrestamento do que os extratos dos cães da raça Beagle porém quando comparados com o controle os carrapatos arrestavam nas substâncias de ambas as raças.

A ausência de atratividade observada nos extratos de pele dos cães pode ser devido ao fato de esta resposta ser mediada por uma combinação de fatores, e não poder ser reproduzida por um estímulo isolado. Estudos mais aprofundados serão necessários para avaliar se realmente o *R.*

sanguineus não é atraído por odor proveniente de substâncias da pele do cão ou se estes precisam estar associados com outras substâncias. Mas o fato destas substâncias serem arrestantes para carrapatos permite o desenvolvimento de iscas em associação com outros atraentes já descritos, como o CO₂, potencializando a ação dos mesmos, e assim a eficácia na captura deste ixodídeo. Iscas que associam substâncias que participem da ecologia do parasito alvo com inseticidas ou outras formas de controle tem sido usadas com bastante eficiência no controle de pragas agrícolas, e de moscas com importância para a pecuária.

Estudos visando aplicar este tipo de controle para carrapatos tem sido descritos, principalmente com o uso de feromônios sexuais, que se baseiam no princípio da confusão sexual e interrupção da cópula. Estudos sobre as substâncias que o carrapato utiliza para localizar o hospedeiro, vislumbram a possibilidade de controle do carrapato durante a fase de vida livre o que, a longo prazo diminuiria o número de carrapatos que chegam ao cão. Tal medida poderia reduzir o risco de transmissão de doenças e o uso de acaricidas no animal. Este trabalho foi apenas o primeiro passo de um longo percurso para se desvendar todos os fatores que envolvem a busca e identificação do hospedeiro pelo carrapato, o que é de fundamental importância para se chegar a este tipo de controle.