
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR)

**DISSEMINAÇÃO DE *Rickettsia rickettsii* NAS GLÂNDULAS
SALIVARES E OVÁRIOS DE FÊMEAS DE *Rhipicephalus sanguineus*
(LATREILLE 1806) (ACARI:IXODIDAE) POR MEIO DA APLICAÇÃO DE
TÉCNICAS MORFOLOGICAS.**

Luís Flávio da Silva Costa

Orientadora: PROFA. DRA. MARIA IZABEL CAMARGO MATHIAS

Co-Orientador: PROF. DR. MARCELO BAHIA LABRUNA

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular)

595.42 Costa, Luís Flávio da Silva
C837d Disseminação de *Rickettsia rickettsii* nas glândulas salivares nos
ovários de fêmeas de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille 1806)
(Acari:ixodidae) por meio da aplicação de técnicas morfológicas / Luís
Flávio da Silva Costa. - Rio Claro : [s.n.], 2012
57 f. : il., figs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de
Biotecnologia de Rio Claro

Orientador: Maria Izabel Camargo Mathias

Co-Orientador: Marcelo Bahia Labruna

1. Ácaro. 2. Febre Maculosa Brasileira. 3. Ovário. 4. Glândula salivar.
I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP

Sumário

Resumo	1
Abstract	2
1. Introdução	3
2. Justificativa	6
3. Objetivos.....	7
3.1 Objetivo Geral	7
3.2. Objetivos específicos.....	7
4. Material e Métodos.....	8
4.1. Materiais.....	8
4.2. Métodos	10
4.2.1. Análise dos Carrapatos	10
4.2.1.1 Análise da Hemolinfa	11
4.2.1.2 Extração de DNA dos Carrapatos.....	11
4.2.1.3 PCR (Polymerase chain reaction)	12
4.2.1.4. Técnicas Histológicas.....	13
4.2.1.4.1. Técnica de Giemsa	13
4.2.1.4.2. Técnica de Gimenez.....	13
5. Resultados	15
5.1. Capítulo 1.	16
DISTRIBUTION OF <i>Rickettsia rickettsii</i> IN OVARIE’S CELLS OF <i>Rhipicephalus sanguineus</i> (LATREILLE 1806) (ACARI:IXODIDAE) (Aceito para publicação no periódico <i>Parasites and Vectors</i>).	
5.2. Capítulo 2.	24
LOCALIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA BACTÉRIA <i>Rickettsia rickettsii</i> NA GLÂNDULA SALIVAR DE <i>Rhipicephalus sanguineus</i> (LATREILLE 1806) (ACARI:IXODIDAE).	
6. Discussão Geral.....	46
7. Conclusões	49
8. Referências Bibliográficas	50

Agradeço de modo muito especial,

Aos meus pais Luiz Antônio Ferreira da Costa e Mirian ap. da Silva Costa, pelo apoio, incentivo e por sempre acreditarem em mim...

À Profa. Dra. Maria Izabel Camargo Mathias e ao Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna pela oportunidade, orientação e atenção.

À Luciane Diniz Vieira pela paciência, apoio, incentivo e companheirismo. Amo-te.

Aos meus irmãos Dado e Ique, pelo apoio e por sempre terem torcido pela realização desse meu sonho.

Aos meus sobrinhos, Pedrão, João, Juju, Pipo, Lelê, Luca e Matheus, pelos muitos momentos de alegria.

Aos meus amigos, Dr. Pablo Henrique Nunes (Pablito) e, Ms. Alexandro Santana Vieira (Lequinho), pela ajuda na realização deste estudo, pelo conhecimento comigo compartilhado e, pelo companheirismo.

Muito Obrigado!

Agradecimentos

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo apoio financeiro concedido para realização deste trabalho.

Aos técnicos de laboratório Gerson de Mello Souza, Mônica Iamonte e Antônio T. Yabuki, pela ajuda na realização deste estudo.

Aos docentes do Departamento de Biologia da UNESP de Rio Claro, pelo carinho e, por estarem sempre dispostos a esclarecer minhas dúvidas, em especial, a Profa. Dra. Carmem Silvia Fontanetti Christofolletti, pelo estágio docência, pela atenção e carinho.

Aos meus amigos e colegas da Pós-Graduação, pelo carinho, companheirismo e, pelas trocas de informações.

Aos colegas e técnicos do Laboratório de Doenças Parasitárias do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP), por me receberem tão bem e, pelos ensinamentos. Em especial, ao Ms. João Fábio Soares, pela ajuda na obtenção do material analisado neste estudo.

Aos médicos veterinários Tânia Mara de Oliveira Ribeiro, Acílio Manoel Ribeiro Jr. e toda equipe da CLIVEP. Obrigado pelo apoio, principalmente, no início desse estudo.

Aos meus Tios, primos e, cunhadas, pela torcida e pela energia positiva.

Aos meus amigos, os de perto e os de longe, muito obrigado pelo apoio e incentivo, em especial, ao Alexandre Reanho (Melão), por me hospedar na fase inicial desse estudo.

Obrigado!

RESUMO

A *Rickettsia rickettsii*, bactéria Gram-negativa intracelular obrigatória, é o principal agente etiológico da Febre Maculosa Brasileira (FMB) e da Febre Maculosa das Montanhas Rochosas nos Estados Unidos. A sua transmissão para o homem e para outros animais, ocorre principalmente pela picada do carrapato infectado. Os sintomas no hospedeiro aparecem depois de um período de incubação, que varia de 2 a 14 dias após a picada. As riquetsias são bactérias que se disseminam nos carrapatos ixodídeos, por se multiplicarem no citoplasma das células intestinais, ovarianas, de glândulas salivares, e de túbulos de Malpighi sendo encontradas também na própria hemolinfa do ectoparasito. Na América Latina o carrapato *Amblyomma cajennense* tem sido considerado o principal vetor da *R. rickettsii* para humanos, todavia o *Rhipicephalus sanguineus*, por ser o principal carrapato que parasita os cães, e estando presente principalmente em áreas urbanas, pode ser também um possível portador do patógeno. Embora ainda não confirmado como vetor da Febre Maculosa para humanos no Brasil, o ixodídeo é da *R. rickettsii* nos EUA, no México e, possivelmente na Colômbia. Sendo assim, este estudo teve por objetivo investigar como ocorre a disseminação e a distribuição da bactéria *R. rickettsii* em ovários e glândulas salivares de fêmeas adultas de carrapatos *R. sanguineus*, por meio de técnicas histológicas. A análise dos resultados revelou a presença da bactéria nos ovários e glândulas salivares das fêmeas do carrapato *R. sanguineus*. Nos ovários as bactérias estavam presentes em todos os estágios de desenvolvimento dos ovócitos (I, II, III, IV e V), preferencialmente, no pólo voltado para o pedicelo, produzindo lesão, bem como nas células do pedicelo. Nas glândulas salivares, a *R. rickettsii* foi observada em todos os tipos de ácinos (agranulares e granulares), bem como, na parede e na luz dos ductos excretórios. A análise histológica dos ovários indicou que a presença da bactéria *R. rickettsii* pode interferir negativamente no processo de reprodução do carrapato, uma vez que causa danos aos ovócitos. Por outro lado, nas glândulas salivares as análises não indicaram alterações morfológicas.

Palavras chave: Febre Maculosa Brasileira, *Rickettsia rickettsii*, *Rhipicephalus sanguineus*, Ovário, Glândula Salivar.

ABSTRACT

Rickettsia rickettsii, a Gram negative bacterium, obligate intracellular, is the main pathogen of the Brazilian Spotted Fever (BSF) and Rocky Mountain Spotted Fever in the United States. Its transmission to humans and other animals occurs primarily through the bite of infected ticks. The symptoms in the host come after an incubation period of two to 14 days after the bite. Rickettsiae are bacteria that spread in ixodid ticks by multiplying in the cytoplasm of intestinal cells, ovary, salivary glands and Malpighian tubules and can be found also in the hemolymph of the ectoparasite. In Latin America the tick *Amblyomma cajennense* has been considered the main vector of *R. rickettsii* to humans, however *Rhipicephalus sanguineus* as the main tick that parasitizes dogs and largely present in urban areas, can become a possible vector. This ixodid has not been confirmed as a vector of spotted fever to humans in Brazil, but it can transmit *R. rickettsii* in the U.S., Mexico, and possibly in Colombia. Thus the main objective of this study was to investigate how *R. rickettsii* spreads and what is its behavior in different tissues of adult female ticks *R. sanguineus*, through application of histologic techniques. The results showed the presence of the bacterium in the ovaries and salivary glands of females of the tick. In the ovaries bacteria were present in all stages of development of oocytes (I, II, III, IV and V), and causing lesion preferably at the pole of oocytes, as well as in pedicel cells. In the salivary glands, *R. rickettsii* was observed in all acini types (agranular and granular), beyond the wall and the lumen of the excretory ducts. Histological analysis of ovaries showed that infection by the *R. rickettsii* negative impact the process of reproduction of the tick *R. sanguineus*, since it causes damage in oocytes, unlike that observed in salivary glands.

Keywords: Brazilian spotted fever, *Rickettsia rickettsii*, *Rhipicephalus sanguineus*, ovary, salivary gland.

1. INTRODUÇÃO

Rickettsia rickettsii, uma bactéria Gram-negativa, intracelular obrigatória que sobrevive pouco tempo fora do hospedeiro (VRANJAC 2002), é o agente etiológico da Febre Maculosa Brasileira (FMB) e da Febre Maculosa das Montanhas Rochosas nos Estados Unidos (MELLES, et al. 1999), sendo transmitida ao homem e aos outros animais, por diferentes espécies de carrapatos. Estes organismos têm geralmente 0,8 a 2 µm de comprimento e 0,3 a 0,5 µm de diâmetro, possuem parede celular composta por peptidoglicano e lipopolissacáridos (LPS). As riquetsias possuem na sua membrana proteínas de diferentes pesos moleculares, que foram denominadas de rOmp (*rickettsia outer membrane protein*) (DUARTE, 2008; LA SCOLA & RAOULT 1997).

Nos vertebrados, incluindo os humanos, as riquetsias infectam preferencialmente células endoteliais que revestem pequenos vasos sanguíneos (SILVA, 2007). Pelo processo de adaptação ao ambiente intracelular, estes organismos têm a capacidade de se movimentar dentro das células infectadas via microfilamentos de actina e capacidade de passar de uma célula para a outra sem provocar destruição das mesmas (DUARTE, 2008).

Os dados disponíveis na literatura até o momento têm demonstrado que a transmissão da *R. rickettsii* ocorre principalmente pela picada do carrapato infectado, que somente após um período de alimentação (após ficar fixado no hospedeiro por um período de 6 a 10 horas) elimina suas secreções, via saliva contendo o patógeno. Esta bactéria necessita de um período de incubação, que varia de 2 a 14 dias, entre a picada e as manifestações dos primeiros sintomas no hospedeiro (VRANJAC, 2002).

Animais que abrigam microrganismos sem sofrerem os sintomas de sua presença são denominados de reservatórios. Os reservatórios das riquetsias são representados principalmente pelos roedores, sendo a capivara o principal em algumas áreas do Brasil, além dos próprios carrapatos (FONSECA; MARTINS, 2007). A contaminação do carrapato pelas riquetsias pode se dar por: a) ingestão da mesma durante o repasto sanguíneo, em hospedeiro infectado e riquetsêmico, b) aquisição por transmissão transovariana ou transtestadial (CARDOSO, 2004). Tanto as *R. rickettsii* como as demais rickettsias podem ser transmitidas transovariamente onde fêmeas adultas

infectadas repassam a bactéria, via ovo, para toda sua prole, que os caracteriza como reservatórios naturais das riquetsioses (FONSECA e MARTINS, 2007).

As riquetsias são bactérias que se disseminam nos carrapatos (Ixodídeos) por se multiplicarem no citoplasma de células intestinais, ovarianas, das glândulas salivares, dos túbulos de Malpighi, sendo encontradas também na própria hemolinfa do ectoparasito (SILVA, 2007). A presença generalizada da bactéria nos órgãos do carrapato explicaria a transmissão transestadial, a infecção dos ovários e a transmissão transovariana (CARDOSO, 2004).

Nos ixodídeos em diapausa, as riquetsias entram em estágio de “dormência celular” e, após o repasto sanguíneo, quando há um aumento no metabolismo do carrapato, as bactérias entram em atividade e começam a se multiplicar, culminando no sucesso da transmissão (HAYES e BURGDORFER, 1982; CARDOSO, 2004).

Na América Latina o carrapato *Amblyomma cajennense* tem sido considerado o principal vetor de *R. rickettsii* para humanos (SILVA, 2007; LABRUNA, 2006). No Brasil o *R. sanguineus*, por ser o principal carrapato que parasita os cães, e estando presente principalmente nas áreas urbanas (LABRUNA, 2004a), pode se tornar um possível vetor de *R. rickettsii* para os humanos, visto que este já foi considerado portador da bactéria *R. rickettsii* em regiões dos estados de São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro (MORAES FILHO et al 2009; CUNHA et al. 2009; PACHECO et al 2010) e ainda com relatos de parasitismo humano nos estados de Goiás e Pernambuco (DANTAS-TORRES et al 2006; LOULY et al 2006). Mesmo não tendo sido ainda confirmado como vetor da Febre Maculosa para humanos no Brasil, este ixodídeo já o foi nos EUA (DEMMA et al., 2005), no México e possivelmente na Colômbia (SILVA, 2007).

O carrapato *R. sanguineus*, originário da África e vulgarmente conhecido como "carrapato do cão", apresenta ainda ampla distribuição geográfica (PEGRAM et al., 1987). Esta espécie foi introduzida no ambiente urbano por meio do cão doméstico, também considerado o seu principal hospedeiro (SEXTON et al., 1976). Vale ressaltar que *R. sanguineus* é a única espécie de carrapato considerada atualmente como “praga urbana”, por parasitar cães de áreas urbanas, além de ser o chamado hospedeiro intermediário de microorganismos de maior prevalência (*Ehrlichia canis*, *Babesia canis*, *Hepatozoon canis*) e com distribuição por todo território brasileiro segundo Labruna et al. (2001).

A espécie *R. sanguineus* é trióxena, visto que necessita de três hospedeiros para completar seu ciclo de vida, sendo todas as mudas realizadas fora do corpo do mesmo (PAZ et al.2001). Segundo Labruna e Pereira (2001), este carrapato tem hábito nidícola, ou seja, vive em ninhos e tocas; quando não está parasitando o hospedeiro (formas de vida livre), encontra-se abrigado nas frestas e buracos das tocas, de preferência nas proximidades do ambiente frequentado pelos hospedeiros. Estudos têm considerado que o *R. sanguineus*, por ser um animal essencialmente hematófago, seja o vetor de vários hemoparasitas (SEXTON et al., 1976). No entanto, estudos realizados com carrapatos tem fornecido informações sobre os aspectos envolvidos na interação entre eles e os humanos, incluindo indivíduos da espécie *R. sanguineus*. Embora os estudos sejam escassos, já é sabido que estes indivíduos mantêm estreita relação com os cães, parasitando-os; sabe-se ainda que essa interação tem resultado em grande transmissão de patógenos ao homem.

2. JUSTIFICATIVA

Em virtude do exposto anteriormente justifica-se a realização deste estudo, pelo fato da FMB ser uma zoonose e, do cão doméstico, atualmente, habitante de grande número de residências, em virtude do crescimento do hábito de ter-se estes animais como “pets”, companheiros, guias (cegos), etc, pode ser um possível reservatório da bactéria *Rickettsia rickettsii*.

O que ainda tornou esse estudo importante na relação *R. sanguineus* x cão foi o fato de existirem poucos estudos disponíveis na literatura, que descrevem o comportamento da *R. rickettsii* no interior do corpo do carrapato *R. sanguineus*. Isto motivou a realização de estudos morfológicos que pudessem esclarecer como dár-se-ia a sua disseminação, bem como qual seria o comportamento deste microrganismo no interior do ectoparasita, questões estas que se pretendeu elucidar por meio da aplicação de técnicas histológicas, em dois dos principais órgãos do carrapato: reprodutor e glândulas salivares.

Os dados obtidos neste trabalho poderão contribuir para o desenvolvimento de métodos de controle ou mesmo profiláticos na prevenção da FMB, doença que desde 2002, tem sido considerada “doença de notificação compulsória” no Estado de São Paulo, segundo declaração do Ministério da Saúde.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Investigar a disseminação e a distribuição da bactéria *R. rickettsii* em glândulas salivares e ovários de fêmeas adultas de carrapatos *R. sanguineus* inoculadas experimentalmente com o patógeno.

3.2. Objetivo Específico

Identificar a presença da *R. rickettsii* nas glândulas salivares e ovários, e avaliar morfológicamente, por meio de técnicas de histológicas a presença da *R. rickettsii* nos referidos órgãos de fêmeas adultas de carrapatos *R. sanguineus* inoculadas experimentalmente com o patógeno.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Materiais

Foram utilizadas fêmeas adultas de *R. sanguineus* infectadas com *R. rickettsii*, a partir de infestação realizada no Laboratório de Doenças Parasitárias do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal – VPS, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo USP sob a responsabilidade do Prof. Dr. Marcelo B. Labruna. As fêmeas de *R. sanguineus* infectadas foram obtidas através de ninfas de uma colônia laboratorial, cedidas pelo Prof. Dr. Matias Pablo Juan Szabó da Universidade Federal de Uberlândia -UFU. Essas ninfas infestaram cobaias inoculadas com homogenato de *R. rickettsii* de órgãos (cérebro e fígado da primeira passagem na cobaia) infectados de outras cobaias, segundo protocolo descrito por Labruna et al. (2008).

Todos os procedimentos ocorreram no infectório e no laboratório do VPS que contavam com total infraestrutura para o desenvolvimento deste tipo de pesquisa.

Para obtenção das fêmeas de *R. sanguineus* infectadas, foram utilizadas seis cobaias machos (guinea pig) que foram divididas em dois grupos, o controle (não infectado) com três indivíduos (C1,C2 e C3) e o infectado também com três indivíduos (I1,I2 e I3). Em cada cobaia do grupo dos infectados, foi inoculado via peritoneal, após assepsia realizada na região do abdômen, 3mL de suspensão contendo homogenato de cérebro (nº:7/9/2009), fígado (nº:1-16/03/09) de cobaias positivas para *Rickettsia rickettsii* e BHI .

No dia seguinte à inoculação (dia 1), cada cobaia de ambos os grupos, teve o dorso tricotomizado para fixação de câmaras para alimentação dos carrapatos. No dia 2, todas as cobaias foram infestadas com ninfas de *R. sanguineus*.

A temperatura das cobaias foi aferida diariamente, durante todo o período de alimentação das ninfas (Tabela 1). Uma das cobaias do grupo infectado veio a óbito no 9º dia P.I. .

Tabela 1: Temperatura das cobaias inoculadas e não inoculadas (controle) durante a fase da alimentação das ninfas de *R. sanguineus*.

DIA	C1	C2	C3	I1	I2	I3
0	38,7 °C	38,5°C	37.2°C	37.6°C	37.8°C	37.8°C
1	37.7°C	37.2°C	37.7°C	38.0°C	38.4°C	37.9°C
2	37.5°C	37.5°C	38.0°C	37.5°C	37.4°C	37.6°C
3	37.6°C	37.7°C	38.2°C	37.6°C	37.6°C	38.7°C
4	38.2°C	38.0°C	37.8°C	37.8°C	37.7°C	39.9°C
5	38.0°C	38.1°C	38.1°C	38.5°C	40.0°C	40.3°C
6	37.9°C	37.9°C	38.3°C	38.2°C	40.5°C	40.1°C
7	38.9°C	38.2°C	38.4°C	40.0°C	40.8°C	40.0°C
8	37.7°C	38.1°C	38.5°C	40.3°C	40.5°C	37.1°C
9	-----	38.2°C	38.1°C	40.4°C	-----	-----

----- cobaia eutanasiada para coleta de material para estudos futuros.

----- cobaia veio a óbito.

As ninfas foram coletadas ao final de sua alimentação, período este, que variou entre o 6° e o 9° dias de infestação.

Após o período de alimentação, as ninfas completamente ingurgitadas foram acondicionadas em estufa BOD a 27°C no Laboratório de Doenças Parasitárias do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal – VPS, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo USP, onde permaneceram por 48 dias. Neste período, as ninfas sofreram ecdise, passando assim para a fase seguinte (adulto). Um segundo período de alimentação dos carrapatos necessário para a obtenção das glândulas salivares e ovários infectados de fêmeas adultas, foi realizado em outras seis cobaias, divididas em dois grupos (controle e o infectado). Após a colocação das câmaras de alimentação nas cobaias, os indivíduos do grupo controle foram infestados com adultos de *R. sanguineus* oriundos do grupo controle do primeiro período de alimentação e os indivíduos do grupo infectado, foram infestados com adultos de *R. sanguineus* oriundos do grupo infectado do primeiro período de alimentação. Uma parte das fêmeas adultas, da segunda infestação, foi coletada no quinto dia de alimentação, para a realização do teste da hemolinfa e retirada das glândulas salivares e dos ovários (procedimento realizado no Laboratório de Doenças Parasitárias do VPS, sob a supervisão do Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna, o restante das fêmeas foi coletado no final de sua alimentação, enviado ao laboratório para

a realização do teste da hemolinfa e para a retirada das glândulas salivares e dos ovários. Dez fêmeas do grupo controle e 10 do grupo infectado foram armazenadas em freezer - 20°C, sendo realizadas a extração de DNA e PCR, para confirmação da presença da *R. rickettsii*.

Como na primeira fase da alimentação, a temperatura das cobaias foi aferida diariamente, durante todo o período de alimentação dos adultos (tabela 2).

Tabela 2: Temperatura das cobaias durante a alimentação dos adultos de *Rhipicephalus sanguineus*.

DIA	C1	C2	C3	I1	I2	I3
0	39.0 °C	38,9°C	37.5°C	38.7°C	38.3°C	38.5°C
1	37.9°C	38.27°C	38.2°C	38.9°C	38.4°C	38.6°C
2	38.6°C	38.5°C	37.9°C	39.0°C	38.9°C	38.8°C
3	38.3°C	38.4°C	38.8°C	39.3°C	38.8°C	39.0°C
4	38.7°C	38.8°C	38.9°C	40.2°C	39.9°C	39.5°C
5	38.5°C	39.0°C	38.8°C	40.7°C	40.2°C	40.5°C
6	38.8°C	38.5°C	38.5°C	40.6°C	40.4°C	40.7°C
7	39.5°C	38.8°C	38.9°C	40.6°C	40.5°C	40.3°C
8	38.7°C	38.9°C	38.4°C	39.5°C	40.4°C	40.6°C
9	-----	38.5°C	38.3°C	-----	-----	40.4°C

----- fim da alimentação dos adultos.

----- cobraia veio a óbito

O material coletado (glândulas salivares e ovários) foi encaminhado para procedimento histológico no Laboratório de Histologia do Departamento de Biologia do Instituto de Biociências da UNESP de Rio Claro, SP, Brasil.

4.2. MÉTODOS

4.2.1. Análise dos carrapatos

As fêmeas de *R. sanguineus* com cinco dias de alimentação, bem como aquelas completamente ingurgitadas, foram encaminhadas para a retirada dos órgãos.

4.2.1.1. Análise da hemolinfa.

Este teste seguiu o protocolo descrito por Burgdorfer (1970), onde a porção distal de uma das patas dianteiras dos carrapatos foi cortada com auxílio de tesoura e uma ou duas gotas de hemolinfa foram colocadas em lâmina de vidro previamente limpa e desengordurada (etapa realizada no Laboratório VPS, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo USP). Na sequência as lâminas foram fixadas em temperatura ambiente, coradas pelo método de Gimenez (1964) e examinadas e documentadas ao fotomicroscópio MOTIC BA 300, no Laboratório de Histologia do Departamento de Biologia do Instituto de Biociências da UNESP de Rio Claro (SP).

4.2.1.2. Extração de DNA dos carrapatos

Foram utilizadas fêmeas de *R. sanguineus* que se alimentaram em cobaias infectadas com *R. rickettsii* e fêmeas de *R. sanguineus* que se alimentaram de cobaias saudáveis. A técnica foi feita de acordo com o protocolo descrito por Sangioni et al. (2005). Os carrapatos foram triturados em microtubo de 15 mL, com auxílio de um micropistilo. Ao tubo foram adicionados 150 µL de tampão TE pH 8,0 (10 mM Tris HCL pH 8,0, 1mM EDTA pH8,0) seguido de homogeneização no vórtex e centrifugação (Eppendorf® Centrifuge 5415D) por 6 segundos. Acrescentado então, 450 µL de GT (5 mL Tris HCE pH 7,5; 10 mL de EDTA 0,5M, pH 8,0; 60g de isotiocianato de guanidina) essa mistura foi homogeneizada no vórtex a cada 2 minutos e meio, até o tempo total de 10 min. Foram acrescentados 100µL de clorofórmio e os tubos centrifugados a 12.000 rpm, durante 5 min. Após a retirada da fase aquosa superior o tubo com o carrapato foi descartado e o líquido recolhido, colocado em um novo microtubo ao qual foram adicionados 400 µL de propanol e colocado em freezer (-20°C) para descanso (no mínimo 2 horas). Após o repouso a amostra foi centrifugada (Eppendorf® Centrifuge 5804R) e refrigerada a 12.000 rpm, durante 15min, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuscitado em 800 µL de etanol a 70%, centrifugado refrigerado (4°C) a 12.000 rpm, por 15 min., para facilitar a dissolução do DNA previamente precipitado. O material genético extraído foi quantificado em

espectrofotômetro digital em comprimento de onda de 50-60 Hz (Eppendorf® AG Biophotometer), antes de ser congelado (-20°C), para realização do PCR.

4.2.1.3. Polymerase Chain Reaction (PCR)

O DNA extraído dos carrapatos dos grupos controle e infectado ambos da segunda infestação, foi submetido a técnica de PCR utilizando quatro conjuntos de iniciadores para amplificação dos genes (tabela 3) (CUNHA et al, 2009; PINTER; LABRUNA, 2006). Este procedimento foi realizado no Laboratório do VPS, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo USP.

Tabela 3: Iniciadores (primers) para realização do PCR (CUNHA et al., 2009; PINTER; LABRUNA, 2006).

Pares de Primers	Genes e primers	Sequência dos primers (5'-3')	Posição relativa à ORF
1	<i>gltA</i> RpCS.877p	GGGGGCCTGCTCACGGCGG	638–656
	RpCS.1258n	ATTGCAAAAAGTACAGTGAACA	1015–995
2	17-kDa 17k-5	GCTTTACAAAATTCTAAAAACCATATA	-62–34
	17k-3	TGTCTATCAATTCACAACCTTGCC	+6–464
3	<i>ompA</i> Rr190.70p	ATGGCGAATATTTCTCCAAAA	478–499
	Rr190.602n	AGTGCAGCATTGCTCCCCCT	990–969
4	<i>ompB</i> BG1-21	GGCAATTAATATCGCTGACGG	696–716
	BG2-20	GCATCTGCACTAGCACTTTC	1349–330

4.2.1.4. Técnicas Histológicas

Foram retirados as glândulas salivares e os ovários de *R. sanguineus*, no Laboratório do VPS, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo USP, que foram posteriormente fixados em paraformoldeído 4% para rotina histológica.

4.2.1.4.1 Técnica de Giemsa (GUSTAV GIEMSA 1904)

As glândulas salivares e os ovários foram fixados em paraformoldeído 4% e em formalina neutra tamponada 10% (pH 7- 7.4) e acetona, na proporção de 9:1, durante 1 hora e 30 minutos, a 4°C. Então o material foi desidratado em concentração crescente de álcool (70%, 80%, 90% e 95%), banhos de 15 minutos cada, transferido para resina de embebição, incluído e seccionado. A embebição e a inclusão foram efetuadas em resina Leica. Os cortes, com espessura de 3 µm, foram recolhidos em lâminas de vidro, reidratados em água destilada por 1 minuto e corados, com solução de trabalho contendo 8g de corante Giemsa em pó, 500 mL de glicerol e metanol (tamponado pH 6,8) q.s.p. 1000 mL, diluído em solução tamponada NaOH4 1:50, por 30 minutos, depois lavadas em tampão. Após a secagem o material foi observado e documentado em fotomicroscópio MOTIC BA 300, no Laboratório de Histologia do Departamento de Biologia do Instituto de Biociências da UNESP de Rio Claro (SP)

4.2.1.4.2 Técnica de Gimenez (GIMENEZ 1964)

As glândulas salivares e ovários foram fixados em paraformol 4% e em formalina neutra tamponada 10% (pH 7- 7.4) e acetona, na proporção de 9:1, durante 1 hora e 30 minutos, a 4°C. Então o material foi desidratado em concentração crescente de álcool (70%, 80%, 90% e 95%), banhos de 15 minutos cada, transferido para resina de embebição, incluído e seccionado. A embebição e a inclusão foram efetuadas em resina Leica. Os cortes, com espessura de 3 µm, foram recolhidos em lâminas de vidro, reidratados em água destilada por 1 minuto e corados com solução de trabalho contendo 4 mL de solução estoque (100 mL de 10% p/v fuccinade base em 95% etanol, 250 mL de 4% p/v fenol aquosa e 650 mL de água destilada) e 10mL de tampão de trabalho (35 mL de 0.2M NaH₂PO₄, 155 mL de 0.2M Na₂HPO₄ e 190 mL de água destilada) por 2

minutos, depois lavadas em água. Após a lavagem as lâminas foram cobertas com solução de verde malaquita por 9 segundos e lavadas em água mais uma vez. As lâminas foram cobertas com solução de verde malaquita por 9 segundos e lavadas em água. Após a secagem o material foi observado e documentado em fotomicroscópio MOTIC BA 300, no Laboratório de Histologia do Departamento de Biologia do Instituto de Biociências da UNESP de Rio Claro (SP).

O presente projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa e Mérito Científico – UNIARARAS e aprovado sob protocolo n° 007/2009.

5. RESULTADOS.

Os resultados aqui obtidos estão apresentados na forma de artigos. Um deles foi aceito para publicação no periódico **Parasites & Vectors**, e o outro encontra-se em fase de submissão.

5.1 Capítulo 1.

COSTA, L.F.; Nunes, P.H.; Soares, J.F., Labruna, M.B., Camargo-Mathias, M.I. 2011: **Distribution of *Rickettsia rickettsii* in ovary cells of *Rhipicephalus sanguineus* (LATREILLE 1806) (ACARI: IXODIDAE), Parasites & Vectors, DOI: 10.1186/1756-3305-4-222.**

5.2. Capítulo 2.

COSTA, L.F.; Labruna, M.B; Soares, J.F., Nunes, P.H.; Camargo-Mathias, M.I. 2011 **Localização e caracterização da bactéria *Rickettsia rickettsii* na glândula salivar de *Rhipicephalus sanguineus* (LATREILLE 1806) (ACARI:IXODIDAE).**

5.1. Capítulo 1.

DISTRIBUTION OF *Rickettsia rickettsii* IN OVARY CELLS OF *Rhipicephalus sanguineus* (LATREILLE 1806) (ACARI: IXODIDAE)

Luís Flávio da Silva Costa^{1*}; Pablo Henrique Nunes^{1*}; João Fábio Soares^{2*}; Marcelo Bahia Labruna^{2*}; Maria Izabel Camargo-Mathias^{1§}.

¹UNESP - Rio Claro/SP, Brasil.

²USP – São Paulo, Brasil.

*These authors contributed equally to this work

§Corresponding author.

Email addresses:

LFSC: luisvet@rc.unesp.br

PHN: phnunes@rc.unesp.br

JFS: jfsvet@gmail.com

MBL: labruna@usp.br

MICM: micm@rc.unesp.br

RESUMO

Considerando o grande potencial do *Rhipicephalus sanguineus* carrapato marrom do cão, em se tornar, no Brasil o vetor da Febre maculosa Brasileira (FMB) para o homem, o presente estudo teve como objetivo descrever a localização da bactéria *Rickettsia rickettsii*, agente etiológico da FMB, nas diferentes regiões dos ovários de fêmeas de *R. sanguineus* fazendo uso de técnicas da histologia. Os ovários analisados foram obtidos através de fêmeas positivas para o teste de hemolinfa, as quais foram alimentadas em seu estágio de ninfas em cobaias inoculadas com *R. rickettsii*. Os resultados mostraram uma disseminação geral da *R. rickettsii* no ovário, sendo as mesmas encontradas nos ovócitos em todos os estágios de desenvolvimento (I, II, III, IV e V) preferencialmente em sua periferia, bem como nos citoplasmas das células do pedicelo.

Palavras chave: *Rickettsia rickettsii*, *Rhipicephalus sanguineus*, Febre Maculosa Brasileira, ovário, histologia.

RESEARCH

Open Access

Distribution of *Rickettsia rickettsii* in ovary cells of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille 1806) (Acari: Ixodidae)

Luís Flávio da Silva Costa^{1†}, Pablo Henrique Nunes^{1†}, João Fábio Soares^{2†}, Marcelo Bahia Labruna^{2†} and Maria Izabel Camargo-Mathias^{1*}

Abstract

Background: Considering the fact that the dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*, has a great potential to become the vector of Brazilian Spotted Fever (BSF) for humans, the present study aimed to describe the distribution of the bacterium *Rickettsia rickettsii*, the etiological agent of BSF, in different regions of the ovaries of *R. sanguineus* using histological techniques. The ovaries were obtained from positive females confirmed by the hemolymph test and fed in the nymph stage on guinea pigs inoculated with *R. rickettsii*.

Results: The results showed a general distribution of *R. rickettsii* in the ovary cells, being found in oocytes in all stages of development (I, II, III, IV and V) most commonly in the periphery of the oocyte and also in the cytoplasm of pedicel cells.

Conclusions: The histological analysis of the ovaries of *R. sanguineus* infected females confirmed the presence of the bacterium, indicating that the infection can interfere negatively in the process of reproduction of the ticks, once alterations were detected both in the shape and cell structure of the oocytes which contained bacteria.

Keywords: *Rickettsia rickettsii*, *Rhipicephalus sanguineus*, Brazilian Spotted Fever, ovary, histology

Background

Rickettsia rickettsii, the etiological agent of Brazilian Spotted Fever (BSF) in Brazil and Rocky Mountain Spotted Fever in the United States [1] is an obligatory intracellular gram-negative bacterium which survives for a short time out of the host [2], being transmitted to humans and other animals by different species of ticks. These organisms are usually 0.8 to 2 µm long, with a diameter of 0.3 to 0.5 µm [3] and having a cellular wall formed by peptidoglycan and lipopolysaccharides [4]. The infection caused by rickettsiae is systemic in ticks as they multiply in the cytoplasm of the intestine, ovaries, salivary glands, Malpighian tubules cells and are also found in the hemolymph of the ectoparasite [5]. Following infection of the ovaries, transstadial and transovarial transmission of the pathogen can happen [6].

Rickettsia rickettsii is considered the most pathogenic species of rickettsia, being reported in Canada, United State, Mexico, Costa Rica, Panama, Brazil, Colombia and Argentina [7]. Many ticks are known as vectors of *R. rickettsii* in the world. In Brazil the known vectors are *Amblyomma cajennense*, tick vector in most of the endemic areas in the country and *A. aureolatum*, responsible for the transmission in some metropolitan areas of São Paulo [8,9]. Recent studies point to *R. sanguineus* as a possible vector of *R. rickettsii* for humans in some regions of Brazil. Moraes-Filho *et al.* [10] reported the presence of *R. sanguineus* positive for *R. rickettsii* in the metropolitan region of São Paulo and Cunha *et al.* [11] reported the same for Rio de Janeiro state and Pacheco *et al.* [12] in Juiz de Fora, Minas Gerais. Although *R. sanguineus* has not been confirmed as vector of spotted fever for humans in Brazil, it has been confirmed as a vector in the USA and Mexico [13] and has also been considered as a possible vector in Colombia [5]. Dantas-Torres *et al.* [14] and Louly *et al.* [15]

* Correspondence: micm@rc.unesp.br

† Contributed equally

¹Departamento de Biologia, Instituto de Biociências UNESP - Rio Claro/SP, Brasil

Full list of author information is available at the end of the article

reported human parasitism by *R. sanguineus* in the Brazilian states of Pernambuco and Goiás, reinforcing the hypothesis that this tick can become a vector of *R. rickettsii* for humans in Brazil.

The *R. sanguineus* tick is originally from Africa and is commonly known as the “brown dog tick”, with a wide geographic distribution [16]. This species was introduced into the urban environment by the domestic dog, which is considered its main host [17]. It is important to emphasize that *R. sanguineus* is the only species of tick that is considered an “urban plague” as it parasitizes dogs in urban and rural areas [18].

The ovary of the tick is located in the posterior third of the body, having a horseshoe shaped. The ovary of *R. sanguineus* is histologically classified as panoistic, with the lumen delimited by a delicate wall of small epithelial cells where the oocytes are fixed by the pedicel in all phases of development (stages I to V) [19].

Considering these facts, the aim of this study was to analyze through histological techniques the distribution of the bacterium *R. rickettsii* in the ovaries of fully-fed and semi-engorged *R. sanguineus* females, contributing to a better knowledge about the interaction between *R. rickettsii* and ticks in general.

Results

Confirmation of infection by *R. rickettsii*

In the first infestation (feeding of the nymphs), on the fifth day after the inoculation of the homogenate containing the bacterium, the guinea pigs presented with fever (temperature > 40°C) and one of them presented with a scrotal lesion and died on the ninth day. The animals of the control group did not present with a temperature increase during the whole infestation.

In the second infestation (feeding of adults) the three guinea pigs infested by adult ticks from the infected group of the first phase presented with fever (temperature > 40°C) and one of them presented with a scrotal lesion and died on the ninth day. The individuals of the control group did not present with a temperature increase during the whole infestation.

For the confirmation of infection in *R. sanguineus* females, a hemolymph test [20] was followed, where all the tested females of the control group presented hemocytes with normal morphology (Figure 1A) and the females of the infected group presented hemocytes with the cytoplasm filled with several bacteria (strongly stained) (Figure 1B). PCR showed that ten females from the control group did not react to the test and of ten females from the infected group, nine were positive in the test, confirming the infection by *R. rickettsii*.

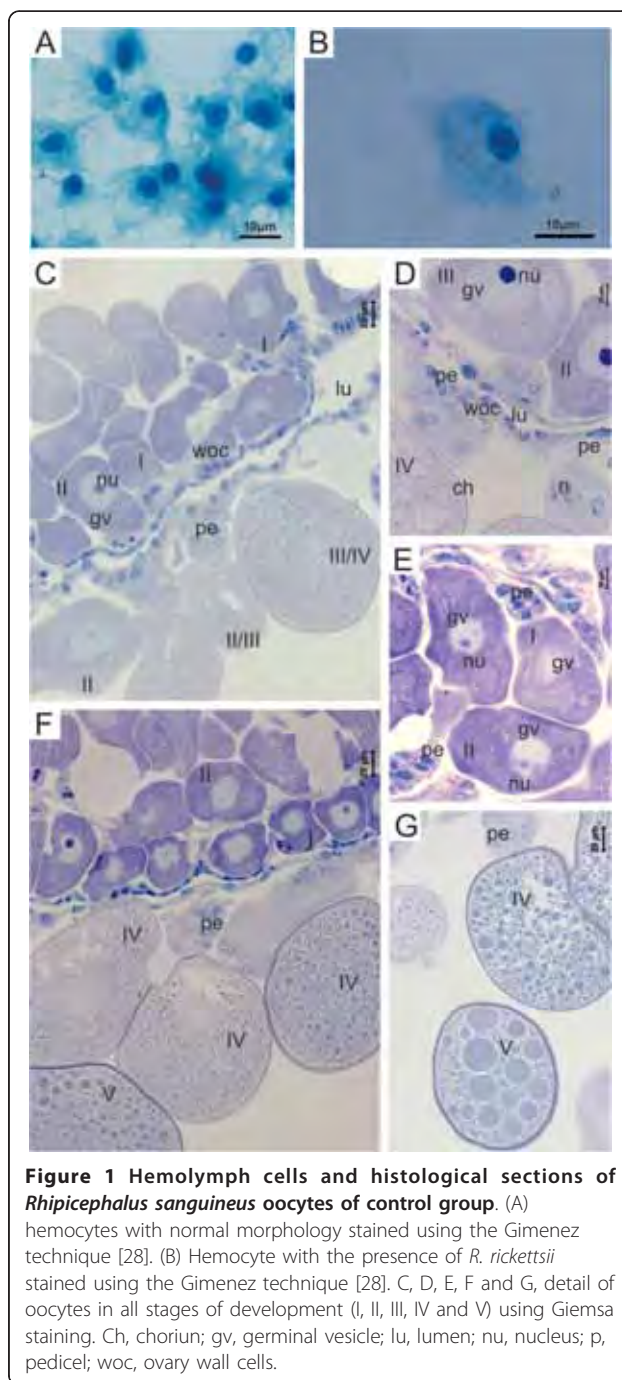


Figure 1 Hemolymph cells and histological sections of *Rhipicephalus sanguineus* oocytes of control group. (A) hemocytes with normal morphology stained using the Gimenez technique [28]. (B) Hemocyte with the presence of *R. rickettsii* stained using the Gimenez technique [28]. C, D, E, F and G, detail of oocytes in all stages of development (I, II, III, IV and V) using Giemsa staining. Ch, chorium; gv, germinal vesicle; lu, lumen; nu, nucleus; p, pedicel; woc, ovary wall cells.

Histology of the ovaries in the Control Group

The ovaries of the females of the control group did not present any morphological variation, having as reference the pattern established by Oliveira *et al.* [19] in the first description of *R. sanguineus* ovary. Oocytes in several stages of development can be observed (Figure 1C-G), in addition to the pedicel cells connecting each oocyte to the ovary wall (Figure 1C-G).

Histology of the ovaries in the Infected Group

The ovaries of the semi-engorged infected females contained oocytes in all stages of development. Although *R. rickettsii* has been detected in the oocytes in all stages of development they are more frequently found in the oocytes II and III (Figure 2A, B, D and 2F) and are most commonly located in the periphery of the oocyte (Figure 2A-F). It was also observed that the highest concentration of bacteria is located in the pole of the oocyte adjacent to the pedicel cells (Figure 2B and 2D), which were also colonized by the bacteria, although with fewer bacteria than found in the oocytes. Many oocytes with altered morphology were observed (Figure 2C and 2F) in contrast to oocytes from the control group. No *R. rickettsii* were observed in the cells of the ovary's wall.

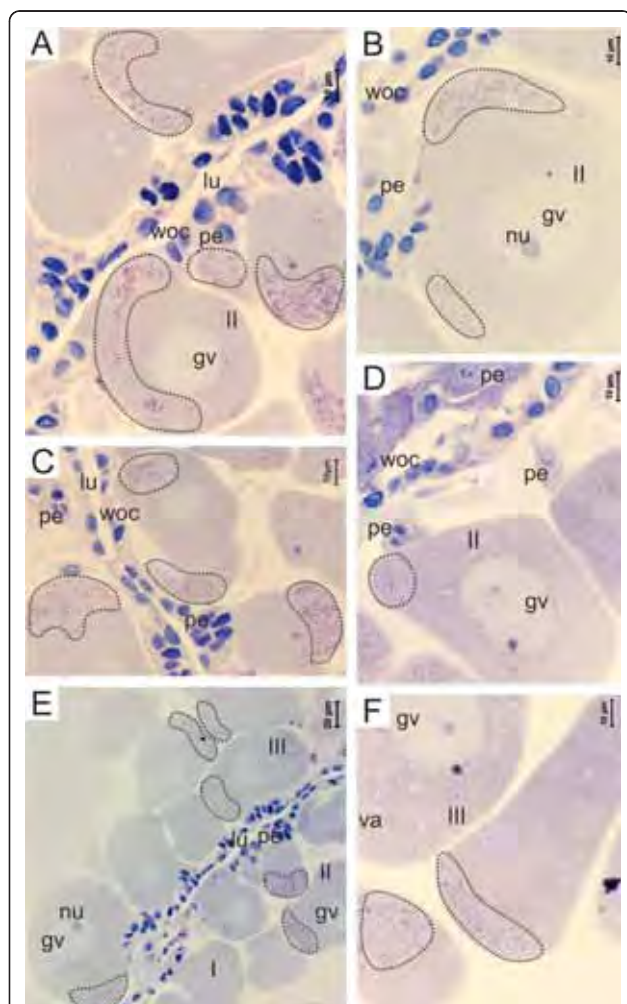


Figure 2 Histological sections of the ovary of semi-engorged females infected by *R. rickettsii*, using Giemsa staining. (A-F) Detail of the oocytes in developmental stages I, II and III with the presence of the bacterium *R. rickettsii* in the cytoplasm (dotted circle). ch, chorion; gv, germinative vesicle; lu, lumen; nu, nucleus; p, pedicel; woc, ovarian wall cells.

Oocytes in the five stages of development were identified in the ovaries of engorged females (Figure 3 and 4). Infection by *R. rickettsii* was observed in the oocytes in all the stages of development (Figure 3B, 4B-D). The distribution of *R. rickettsii* in the oocytes was not homogeneous; in the semi-engorged females, groups of bacteria are most commonly located in the periphery of the oocytes (Figure 3A, 4C, D and 4F). In some cases bacteria are grouped around the germinal vesicle (Figure 3A and 4E).

The pedicel cells are also parasitized by *R. rickettsia* in semi-engorged and engorged females; with fewer numbers of bacteria in the cells of semi-engorged females (Figure 3A-E, 4C-D). As with the semi-engorged females, in engorged females the cells of the ovary wall were not infected with *R. rickettsii*.

Discussion

The present study brings morphological data of the occurrence of transstadial and transovarial transmission of *R.*

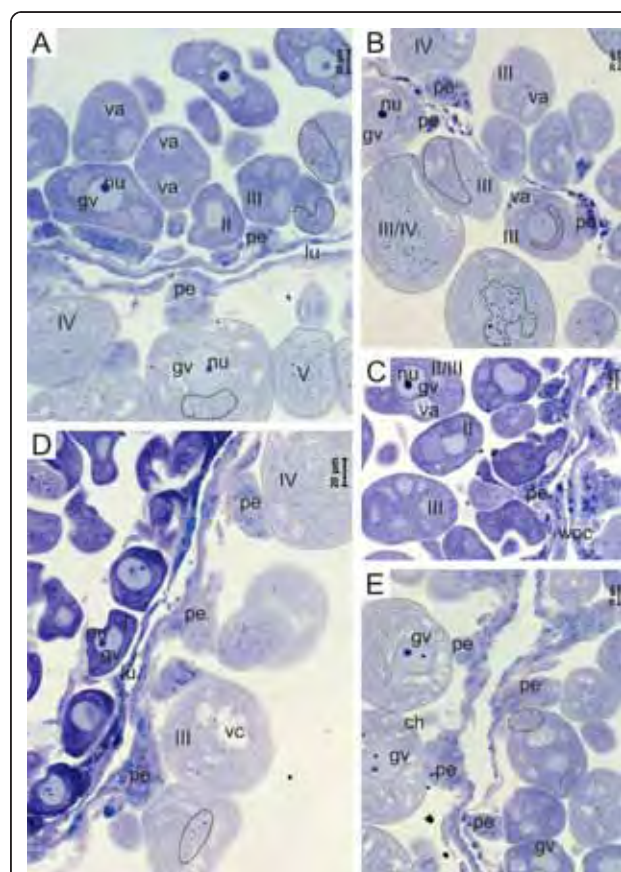


Figure 3 Histological sections of the ovary of engorged females infected by *R. rickettsii*, stained using Giemsa. (A-E) Detail of oocytes in all the stages of development with the presence of the bacterium *R. rickettsii* in the cytoplasm (dotted circle). ch, chorion; gv, germinal vesicle; lu, lumen; nu, nucleus; p, pedicel; woc, ovarian wall cells.

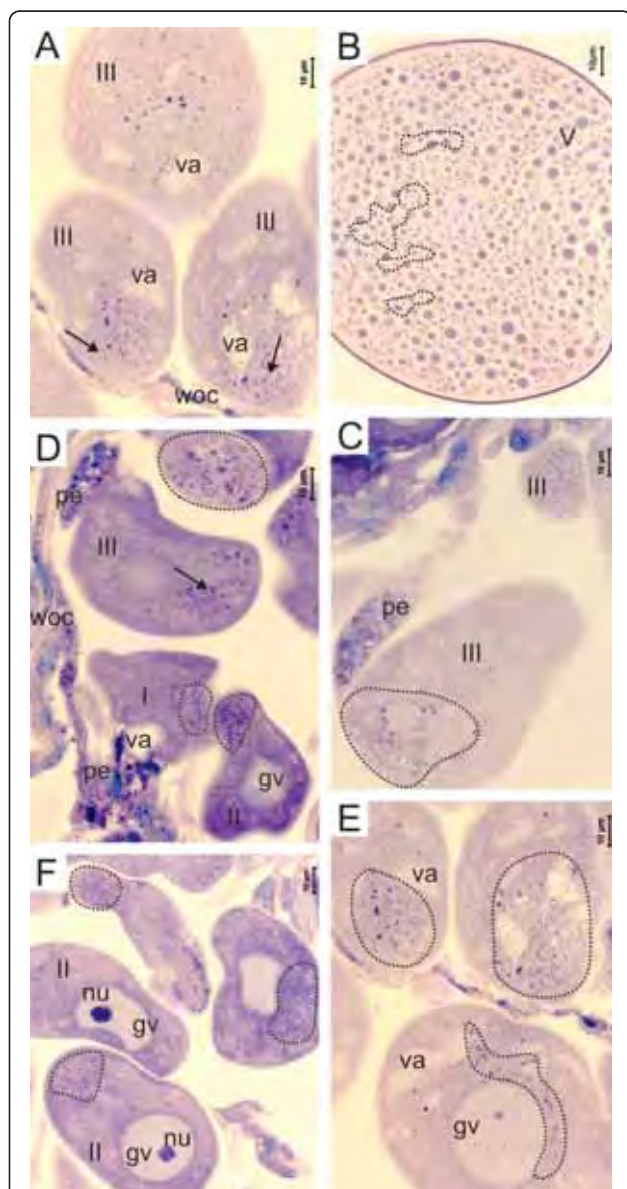


Figure 4 Histological sections of a Giemsa-stained ovary of an engorged female infected by *R. rickettsii*. (A-E) Detail of the oocytes in all development stages with the presence of the bacterium *R. rickettsii* in the cytoplasm (dotted circle). (B) Detail of the oocyte V with *R. rickettsii* in its interior. ch, chorion; gv, germinative vesicle; lu, lumen; nu, nucleus; p, pedicel; woc, ovary wall cells; arrow, bacterium *R. rickettsii*.

rickettsii in the dog tick *R. sanguineus* through histological analysis of the ovaries of semi-engorged and fully engorged females. The analysis of the results demonstrated that the infection provoked in the guinea pigs by adult *R. sanguineus* caused characteristic signs of BSF, as demonstrated by Mancini *et al.* [21], i.e., the animals presented temperature equal or higher than 40°C, in addition to scrotal lesion, with death of one individual. These results demonstrate the

effective transstadial transmission in *R. sanguineus* when infected in the phase of nymph, corroborating the results obtained by Parker *et al.* [22] and Piranda *et al.* [23]. According to Burgdorfer & Brinton [24], the successful transovarial transmission depends primarily on the degree of rickettsial development in ovaries tissues. In this study *R. rickettsii* was observed in the oocytes in almost all of the stages of development, both in semi-engorged and in fully engorged females, corroborating Burgdorfer [25] and, Burgdorfer and Brinton [24] studying in the tick *Dermacentor andersoni*. Furthermore, Piranda *et al.* [23] using a PCR technique reported the transovarial transmission of *R. rickettsii* in *R. sanguineus*, also infected in nymph phase

The histological analysis of the ovaries of *R. sanguineus* infected females confirmed the presence of the bacterium, and indicated that the infection can interfere negatively in the process of reproduction of the ticks, as alterations were detected both in the shape and in the cell structure of the oocytes, which contained bacteria mainly in the fully engorged females - the ones that would be ready for oviposition. This supports the theory of Macdade and Newhouse [26], which postulates that the relationship between *R. rickettsii* and ticks is not always of perfect symbiosis; i.e., in some cases the microorganisms could harm the tick's organs causing damage to threaten its survival. Therefore, the fact that the oocytes of *R. sanguineus* infected by *R. rickettsii* show morphological alterations could suggest that the bacterium, in addition to being harmful for the host, could also be harmful to the reproductive process of the infected females.

The preferred distribution of *R. rickettsii* in the oocyte cytoplasm was at the oocyte pole in direct contact with the pedicel cells. Its presence in these cells and its absence from the ovary wall cells could suggest that, in addition to the hemolymph, the bacteria use the pedicel cells as a route of entry to the oocytes environment. This may occur when the cells of the pedicel transfer lipid, protein and polysaccharide material to the interior of the oocytes, helping in the production of yolk [19]. The pedicel cells are in turn infected by the bacteria from the hemolymph, from where they extract material to be used in vitellogenesis.

Conclusions

Studying the relationship between ticks and pathogens has been very important to understand the mechanisms of infection and transmission of these pathogens, as well as to elaborate efficient strategies to avoid the diseases caused by them. Therefore, the present study clearly demonstrated that the transstadial transmission of *R. rickettsii* in *R. sanguineus* is efficient when these are infected in the phase of nymph. Although there is transovarial transmission in the females derived from these infected nymphs, the bacteria interfere negatively in the

reproductive process by altering the morphology of the oocytes.

Methods

Adult females of *R. sanguineus* infected with *R. rickettsii* were used in this study, which was performed in the Laboratory of Parasitary Diseases of the Department of Preventive Veterinary Medicine and Animal Health - VPS, Veterinary Medicine and Zootechny College of USP - University of Sao Paulo, SP, Brazil, under the supervision of Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna.

Two phases of infestation were necessary for the experiment, in accordance to Piranda *et al.* [23]. In the first phase, six guinea pigs were divided in two groups, the control group with three individuals (C1, C2, C3) and the infected group also with three individuals (I1, I2, I3). In each guinea pig of the infected group a 3 mL solution containing brains (n°: 7/9/2009) and liver (n°: 1-16/03/09) of guinea pigs positive for *R. rickettsii* and brain-heart infusion (BHI) was inoculated intraperitoneally after asepsis in the abdominal region according to the protocol described by Labruna *et al.* [8]. The temperature of the guinea pigs was measured daily during the whole feeding period in order to confirm the infection. After the feeding period the fully engorged nymphs were placed in a biochemical oxygen demand (BOD) incubator at 27°C, remaining there for 48 days. During this period the nymphs completed ecdysis, reaching the adult phase.

In the second phase of infection, six other guinea pigs were used, being divided into two groups (control and infected). The individuals from the control group were infested by adult *R. sanguineus* from the control groups of the first feeding period, while the individuals from the infected group were infested by *R. sanguineus* adults from the infected group of the first feeding period. As in the first phase, the temperature of the guinea pigs was measured daily for confirmation of infection.

Analysis of the ticks

Females of *R. sanguineus*, which had fed for 5 days and the fully engorged females were prepared for the hemolymph test to confirm the infection and the ovaries were removed to be processed for histology. Ten females from the control group and 10 from the infected group were kept in a freezer at -20°C, for the extraction of DNA and performance of PCR according to the protocol described by Labruna *et al.* [27], for the confirmation of infection by *R. rickettsii*.

Hemolymph test

The performance of the test followed the protocol described by Burgdorfer [20], where the distal portion of

one of the front legs of the ticks was cut with scissors and one or two drops of hemolymph were placed onto a glass slide previously cleaned and de-greased. The slides were then fixed at room temperature, stained by the method of Gimenez [28] and examined and photographed using a Leica photomicroscope, in the Histology Laboratory of the Biology Department of the Biosciences Institute of UNESP *campus* Rio Claro (SP), Brazil.

Histological technique

For the performance of histological techniques the ovaries were removed and fixed in 4% paraformaldehyde and in 10% neutral-buffered formaldehyde solution (pH 7-7.4) and acetone in the proportion 9:1 for 1 hour at room temperature and for 30 minutes at 4°C. The material was then dehydrated in increasing concentrations of ethanol (70%, 80%, 90% and 95%), for 15 minutes each, transferred to embedding resin and sectioned with a microtome in 3 µm-thick sections, which were collected on glass slides, rehydrated in distilled water for 1 minute and stained with solution containing Giemsa (8 g), Glycerol (500 mL) and Methanol (buffered pH 6.8, 1000 mL), dissolved in a buffered solution of NaOH4 (1:50), for 40 minutes, and washed in buffer. After drying, the slides were diaphanized in xylol, mounted in synthetic Canada balsam and covered with a coverslip. The material was observed and photographed using a Leica photomicroscope in the Histology Laboratory of the Biology Department of the Biosciences Institute of UNESP *campus* Rio Claro (SP), Brazil.

Acknowledgements

Gerson Mello Souza and Ms. Alexandro Santana Vieira for technical support and CAPES for financial support.

Author details

¹Departamento de Biologia, Instituto de Biociências UNESP - Rio Claro/SP, Brasil. ²Laboratório de Doenças Parasitárias do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal - VPS, USP - São Paulo, Brasil.

Authors' contributions

LFSC and JFS performed the infection of ticks with *R. rickettsii*, LFSC and PHN performed the histological analysis and wrote the manuscript, MBL and MICM supervised the research and the writing of the manuscript. All authors approved the final, version of the manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 15 September 2011 Accepted: 25 November 2011

Published: 25 November 2011

References

1. Melles HHB, Colombo S, Lemos ERS: Isolamento de *Rickettsia* em cultura de células Vero. *Rev Soc Bras Med Trop* 1999, **32**(Suppl 5):469-473.
2. Vranjac A: Informe Técnico Sobre a Febre Maculosa Brasileira. *Secretaria de Estado da Saúde Coordenação dos Institutos de Pesquisa Divisão de Zoonoses, São Paulo* 2002.

3. La Scola B, Raoult D: **Laboratory diagnosis of rickettsioses: current approaches to diagnosis of old and new rickettsial diseases.** *J clin microbiol* 1997, **35**(Suppl 11):2715-2727.
4. Mcdade JE: **Rickettsial diseases.** In *Microbiology and Microbial Infections*. 9 edition. Edited by: Hausler Jr WJ, Sussman M. London: Topley and Wilson's; 1998:995-1011.
5. Silva ME: **Frequência De Anticorpos Anti-Rickettsia Spp Em Cães Da Cidade De Belo Horizonte.** *Dissertação de mestrado apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais UFMG, Faculdade de Veterinária de Belo Horizonte* 2007.
6. Cardoso LD: **Detecção e caracterização da Rickettsia spp circulante em foco inativo periurbano do município de Caratinga, MG.** *Dissertação de Mestrado apresentada à Universidade Federal de Ouro Preto, Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas* 2004.
7. Labruna MB: **Ecology of Rickettsia in South America.** In *Rickettsiology and Rickettsial Diseases-Fifth International Conference. Volume 1166.* Edited by: Hechmy KE, Samuel JE, Brouqui P, Raoult DA. Annals of the New York Academy of Sciences: May 2009; New York; 2009:156-166.
8. Labruna MB, Ogrzewalska M, Martins TF, Pinter A, Horta MC: **Comparative Susceptibility of Larval Stages of Amblyomma aureolatum, Amblyomma cajennense, and Rhipicephalus sanguineus to Infection by Rickettsia rickettsii.** *J med entomol* 2008, **45**(Suppl 6):1156-1159.
9. Pinter A, Labruna MB: **Isolation of Rickettsia rickettsii and Rickettsia bellii in cell culture from the tick Amblyomma aureolatum in Brazil.** *Ann NY Acad Sci* 2006, **1078**:523-529.
10. Moraes-Filho J, Pinter A, Pacheco RC, Gutmann TB, Barbosa SO, Gonzáles MARM, Cecílio SRM, Labruna MB: **New Epidemiological Data on Brazilian Spotted Fever in an Endemic Area of the State of São Paulo, Brazil.** *Vector Borne Zoonotic Dis* 2009, **9**(Suppl 1):73-78.
11. Cunha NC, Fonseca AH, Rezende J, Rozental T, Favacho ARM, Barreira JD, Massard CL, Lemos ERS: **First identification of natural infection of Rickettsia rickettsii in the Rhipicephalus sanguineus tick, in the State of Rio de Janeiro.** *Pesqui Vet Bras* 2009, **29**(Suppl 2):105-108.
12. Pacheco RC, Moraes-Filho J, Guedes E, Silveira I, Richtzenhain LJ, Leite RC, Labruna MB: **Rickettsial Infections of Dogs, Horses and Ticks In Juiz de Fora, Southeastern Brazil, and Isolation of Rickettsia rickettsii from Rhipicephalus sanguineus Ticks.** *Med vet entomol* 2011, **25**:148-155.
13. Demma LJ, Traeger MS, Nicholson WL, Paddock DR, Blau DM, Eremeeva ME, Dasch GA, Levin MJ, Singleton J Jr, Zaki SR, Cheek JE, Swerdlow DL, Mcquiston JH: **Rocky Mountain Spotted Fever from an Unexpected Tick Vector in Arizona.** *N Engl J Med* 2005, **353**(Suppl 6):587-594.
14. Dantas-Torres F, Figueredo LA, Brandão-Filho SP: **Rhipicephalus sanguineus (Acari: Ixodidae), The Brown Dog Tick, Parasitizing Humans in Brazil.** *Rev So Bras Med Trop* 2006, **39**(Suppl 1):64-67.
15. Louly CCB, Fonseca IN, Oliveira VF, Borges LMF: **Ocorrência de Rhipicephalus sanguineus em Trabalhadores de Clínicas Veterinárias e Canis, no Município de Goiânia, GO.** *Ci Anim Bras* 2006, **7**(Suppl 1):103-106.
16. Pegram RG, Clifford CM, Walker JB, Keirans JE: **Classification of the Rhipicephalus sanguineus, Rhipicephalus sulcatus and Rhipicephalus turanicus.** *Syst Parasitol* 1987, **10**:3-26.
17. Sexton DJ, Burgdorfer W, Thomas L: **Rocky Mountain spotted fever in Mississippi: survey for spotted fever antibodies in dogs and for spotted fever group Rickettsial in dog ticks.** *Am J Epidemiol* 1976, **103**:192-197.
18. Labruna MB, Pereira MC: **Carrapatos em cães no Brasil.** *Clin Vet* 2001, **30**:24-32.
19. Oliveira PR, Bechara GH, Denardi SE, Saito KC, Nunes ET, Camargo-Mathias MI: **Morphological characterization of the ovary and oocytes vitellogenesis of the tick Rhipicephalus sanguineus (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae).** *Exp Parasitol* 2005, **110**:146-156.
20. Burgdorfer W: **The hemolymph test.** *Am J Trop Med Hyg* 1970, **19**:1010-1014.
21. Mancini DAP, Nascimento EMM, Tavares VR, Soares MA: **A ocorrência de rickettsioses do gruporickettsia rickettsii.** *Rev Saúde Públ* 1983, **17**:493-499.
22. Parker R, Philip CB, Jellinson WL: **Rocky Mountain spotted fever. Potentialities of tick transmission in relation to geographic occurrence in the United States.** *Am J Trop Med* 1933, **13**:241-378.
23. Piranda EM, Faccini JLH, Pinter A, Pacheco RC, Cançado PHD, Labruna MB: **Experimental Infection of Rhipicephalus sanguineus Ticks with the Bacterium Rickettsia rickettsii, Using Experimentally Infected Dogs.** *Vector Borne Zoonotic Dis* 2011, **11**(Suppl 1):29-35.
24. Burgdorfer W, Brinton LP: **Mechanisms of transovarial infection of spotted fever rickettsiae in ticks.** *Ann N Y Acad Sci* 1975, **266**:61-72.
25. Burgdorfer W: **Investigation of "Transovarial Transmission" of Rickettsia rickettsii in the Wood Tick, Dermacentor andersoni.** *Exp Parasitol* 1963, **14**:152-159.
26. Mcdade JE, Newhouse VF: **Natural History of Rickettsia rickettsii.** *Ann Rev Microbiol* 1986, **40**:287-309.
27. Labruna MB, Whitworth T, Horta MC, Bouyer DH, McBride JW, Pinter A, Popov V, Gennari SM, Walker DH: **Rickettsia species infecting Amblyomma cooperi ticks from an area in state of São Paulo, Brazil, where Brazilian spotted fever is endemic.** *J clin microbiol* 2004, **42**:90-98.
28. Giménez DF: **Staining rickettsiae in yolk sacs cultures.** *Stain Technol* 1964, **39**:135-140.

doi:10.1186/1756-3305-4-222

Cite this article as: da Silva Costa et al.: **Distribution of Rickettsia rickettsii in ovary cells of Rhipicephalus sanguineus (Latreille1806) (Acari: Ixodidae).** *Parasites & Vectors* 2011 **4**:222.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



5.2 Capítulo 2.

LOCALIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA BACTÉRIA *Rickettsia rickettsii* NAS GLÂNDULAS SALIVARES DE FÊMEAS DE CARRAPATOS *Rhipicephalus sanguineus* (LATREILLE 1806) (ACARI:IXODIDAE).

**Luís Flávio da Silva Costa^{1*}; Marcelo Bahia Labruna^{2*}; João Fábio Soares^{2*};
Pablo Henrique Nunes^{1*}; Maria Izabel Camargo-Mathias^{1§}.**

¹UNESP – Avenida 24A, nº1515 – CEP: 13.506-900, Rio Claro, SP. Brasil.

²USP – Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87 CEP 05508 270 - Cidade
Universitária São Paulo/SP - Brasil

RESUMO

A glândula salivar para os carrapatos é um órgão essencial na manutenção da vida desses animais. Estas são estruturas pares, as quais se localizam dentro do idiossoma na porção dorsal do corpo, apresentando um ducto excretor comum de grande calibre, os ductos intermediários e os acinares, estes últimos fazendo a coleta da secreção produzida em cada ácino. Nas fêmeas dos ixodídeos são descritos três tipos de ácinos (I, II e III) e nos machos quatro (I, II, III e IV). Por ser hoje em dia considerado no Brasil, como possível vetor da Febre Maculosa Brasileira (FMB) para humanos, por se apresentarem infectados pela bactéria *Rickettsia rickettsii* em regiões do país e por parasitar humanos em outras regiões, fêmeas do carrapato *R. sanguineus* neste estudo tiveram suas glândulas salivares analisadas e os resultados mostraram que carrapatos alimentados em cobaias inoculados, possuem, nas suas glândulas salivares muitas bactérias *Rickettsia rickettsii* as quais encontram-se distribuídas tanto nos ácinos (agranulares e granulares) como nas células dos ductos em geral.

Palavras chave: *Rickettsia rickettsii*, *Rhipicephalus sanguineus*, Febre Maculosa Brasileira, glândula salivar, histologia.

1. INTRODUÇÃO

As glândulas salivares dos carrapatos são órgãos essenciais para a sua biologia e ciclo de vida, visto serem, responsáveis pela produção de substâncias que ao se misturarem permitem que o processo de alimentação do animal seja bem sucedido. Sua importância torna-se ainda mais relevante, visto que elas são rotas para a transmissão de patógenos aos hospedeiros (WALKER, 1985). Nos carrapatos as glândulas salivares são estruturas pares localizadas dorsalmente no interior do idiossoma, sendo constituídas por duas porções: uma tubular (condutora) e outra acinar (secretora) (BALASHOV, 1983; WALKER et al., 1985; SAUER ; HAIR, 1986). Em cada glândula salivar estão presentes aproximadamente 1400 ácidos, classificados de acordo com sua morfologia (MEGAW; BEADLE 1979). Nas fêmeas são encontrados três tipos (I, II e III) e nos machos quatro (I, II, III e IV). Nos carrapatos ixodídeos, as glândulas salivares são responsáveis por várias funções inclusive a de manter a osmoregulação (MEGAW, 1976).

Os ácidos I são ditos agranulares por não possuírem células secretoras com citoplasma granuloso sendo compostos por uma célula central cercada por outras menores ou periféricas. Estes se localizam na região anterior do ducto excretor comum (FAWCETT, 1986; SAUER, 1995; SONENSHINE, 1991; BINNINGTON, 1978; BOWMAN, 1997). Os ácidos II são granulares apresentando oito tipos celulares (a,b, c1,c2,c3,c4, c5 e c6), sendo que os tipos c5 e c6 foram recentemente descritos no carrapato *Rhipicephalus sanguineus* por Furquim (2007). Durante a alimentação do carrapato esse ácido aumenta consideravelmente de tamanho devido ao aumento da produção de grânulos secretores. O ácido III é granular e morfologicamente muito semelhante ao II, possuindo três tipos de células (d, e e f) estando localizado nas regiões posterior e periférica da glândula (FURQUIM, 2007; SAUER, 1995; SONENSHINE, 1991; BINNINGTON, 1978; BOWMAN, SAUER 2004; WALKER, 1985; GILL; WALKER, 1988). O ácido IV é exclusivo dos machos, sendo formado por apenas um tipo de célula (g), e sua secreção está relacionada com o comportamento de cópula (SAUER, 1995).

No presente estudo o carrapato *R. sanguineus* foi selecionado como modelo por ser atualmente considerado como “praga urbana”, por parasitar cães tanto nas áreas urbanas como nas rurais (LABRUNA et al, 2001), bem como por ser considerado hoje no Brasil, um possível vetor da Febre Maculosa Brasileira (FMB) para humanos, já tendo sido relatados casos de infecção pela bactéria *Rickettsia rickettsii* (causadora desta doença) em regiões dos estados de São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro (MORAES FILHO et al 2009; CUNHA et al 2009; PACHECO et al 2010). O *R. sanguineus* atualmente, é também considerado um ectoparasita de humanos, como relatado por Dantas-Torres et al (2006) e Louly et al (2006), a partir de casos observados nos estados brasileiros de Pernambuco e Goiás.

Desta forma, considerando que a glândula salivar dos carrapatos é uma importante via de transmissão da bactéria *R. rickettsii* para os hospedeiros e visto ser o carrapato *R. sanguineus*, um possível vetor da FMB, o presente trabalho analisou por meio de técnicas histológicas a morfologia das glândulas salivares de fêmeas desta espécie contendo a bactéria *R. rickettsii*, trazendo assim maiores informações sobre a localização e a disseminação destas bactérias nestes órgãos considerados essenciais para o sucesso biológico dos carrapatos.

2. MATERIAIS E METODOS

Para realização deste trabalho foram utilizadas fêmeas adultas de *R. sanguineus* infectadas com a bactéria *R. rickettsii* (grupo infectado) provindas de um grupo de ninfas alimentadas em cobaia infectada pela bactéria *R. rickettsii*, e fêmeas não infectadas (grupo controle). Este procedimento a partir de ninfas alimentadas em cobaias sadias foi realizado no Laboratório de Doenças Parasitárias do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal – VPS, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, USP, sob a supervisão do Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna.

2.1. Análise dos Carrapatos

Fêmeas de *R. sanguineus*, do grupo infectado bem como do grupo controle, alimentadas em cobaias por cinco dias, bem como fêmeas completamente ingurgitadas, foram coletadas e encaminhadas para o teste da hemolinfa, a fim de verificar a presença ou ausência bacteriana. Em seguida as glândulas salivares foram retiradas e, processadas, seguindo protocolo para aplicação de técnicas histológicas. Das fêmeas do experimento, 10 do grupo controle e, 10 do grupo infectado foram separadas e armazenadas em freezer -20°C, para extração de DNA e, para a realização do PCR segundo protocolo de Labruna et al. (2004), confirmando assim a presença da bactéria *R. rickettsii*.

2.1.2 Teste da Hemolinfa

Para a realização deste teste foi seguido o protocolo de Burgdorfer (1970). A porção distal de uma das patas dianteiras de cada carrapato foi cortada com auxílio de tesoura e gotas de hemolinfa caíram sobre a superfície lâmina de vidro previamente limpa e desengordurada. As lâminas obtidas foram na sequência fixadas em temperatura ambiente, coradas pelo método de Gimenez (1964), examinadas e documentadas em fotomicroscópio Leica, no Laboratório de Histologia do Departamento de Biologia do Instituto de Biociências da UNESP de Rio Claro (SP), Brasil.

2.2. Histologia

2.2.1 Técnica de Giemsa (GIEMSA, 1904)

Para realização dessa técnica as glândulas salivares foram retiradas e fixadas em paraformoldeído 4% e em formalina neutra tamponada 10% (pH 7- 7.4) e acetona, na proporção de 9:1, durante 1 hora e 30 minutos, a 4°C. Então o material foi desidratado em serie crescente de álcoois (70%, 80%, 90% e 95%), com banhos de 15 minutos cada. Depois foi transferido para resina de embebição, incluído e seccionado em micrótomo com secções de 3 µm, as quais foram recolhidas em lâminas de vidro, reidratadas em água destilada por 1 minuto e coradas, com solução de trabalho contendo 8g de corante Giemsa em pó, 500 mL de glicerol e metanol (tamponado pH 6,8) q.s.p. 1000 mL, diluído em solução tamponada NaOH4 (1:50), por 40 minutos. Na sequencia foram lavadas em tampão e após a secagem as lâminas foram diafanizadas em xilol, montadas com balsamo sintético do Canadá e recobertas com lamínula. O material foi observado e documentado em fotomicroscópio Leica no Laboratório de Histologia do Departamento de Biologia do Instituto de Biociências da UNESP *campus* de Rio Claro (SP), Brasil.

2.2.2 Técnica de Gimenez (GIMENEZ, 1964)

As glândulas salivares foram retiradas e fixadas em paraformoldeído 4% e em formalina neutra tamponada 10% (pH 7- 7.4) e acetona, na proporção de 9:1, durante 1 hora e 30 minutos, a 4°C. Então o material foi desidratado em série crescente de álcoois (70%, 80%, 90% e 95%), com banhos de 15 minutos cada, foi transferido para resina de embebição, incluído e seccionado (inclusão em resina Leica). Os cortes, com 3 µm, foram recolhidos em lâminas de vidro, reidratados em água destilada por 1 minuto e corados, com solução de trabalho contendo 4 mL de solução estoque (100 mL de 10% p/v fuccinade base em 95% etanol, 250 mL de 4% p/v fenol aquosa e 650 mL de água destilada) e 10 mL de tampão de trabalho (35 mL de 0.2M NaH₂PO₄, 155 mL de 0.2M Na₂HPO₄ e 190 mL de água destilada) por 2 minutos, sendo depois lavadas em água, cobertas com solução de verde malaquita por 9 segundos e lavadas em água mais uma vez. As lâminas foram

cobertas com solução de verde malaquita por 9 segundos e lavadas em água. Após a secagem o material foi observado e documentado em fotomicroscópio MOTIC BA 300, no Laboratório de Histologia do Departamento de Biologia do Instituto de Biociências da UNESP *campus* de Rio Claro (SP).

3. RESULTADOS.

3.1. Grupo Controle

Nas glândulas salivares das fêmeas do grupo controle, não foram observadas variações morfológicas repetindo-se, portanto, o padrão histológico já anteriormente descrito por Furquim et.al (2009).

Todos os tipos de ácinos descritos na literatura foram observados nas glândulas salivares das fêmeas deste grupo (Fig. 1. A-H). Foram observados também o ducto excretor comum (Fig. 1. A) e as células acinares (Fig. 1. A-H). Nas glândulas das fêmeas completamente ingurgitadas, foi observado o início da degeneração dos ácinos (Fig. 1. E-H), processo esse que ocorre naturalmente depois que o processo de alimentação é concluído (ingurgitamento completo).

3.2 Grupo Infectado

Nas glândulas salivares das fêmeas semi-ingurgitadas bem como daquelas, completamente ingurgitadas foram observadas estruturas com morfologia compatível com a de *Rickettsias*, tanto nos ácinos que compõe as glândulas salivares como nas células e luz dos ductos salivares. As bactérias foram observadas no interior das células ácinares (Fig.2A-D; 3A, B; 4A, B e D), e em alguns casos elas estavam presentes no lúmen dos ácinos (Fig.2A), além de estarem presentes nos ductos salivares tanto na luz (Fig. 3 C, D) como nas células que compõe o ducto (Fig. 4 B, C).

Nas fêmeas totalmente ingurgitadas foi possível observar os ácinos em processo de degeneração (natural), mas ainda contendo *R. rickettsii* (Fig. 4A, D). Nestas fêmeas, as bactérias foram observadas também no interior das células que compõem os ductos salivares, porém, com menor frequência (Fig. 4B, C).

Figura 1. Secções histológicas das glândulas salivares de fêmeas de *R. sanguineus* do grupo controle mostrando morfologia inalterada.

Coloração de Gimenez (A,C,D,G e H), coloração de Giemsa (B, E e F).

Glândula salivar de fêmeas semi-ingurgitadas (A-D).

Glândula salivar de fêmeas totalmente ingurgitadas (E-H). I: ácino I; II: ácino II; III: ácino III e ced: ducto excretor comum.

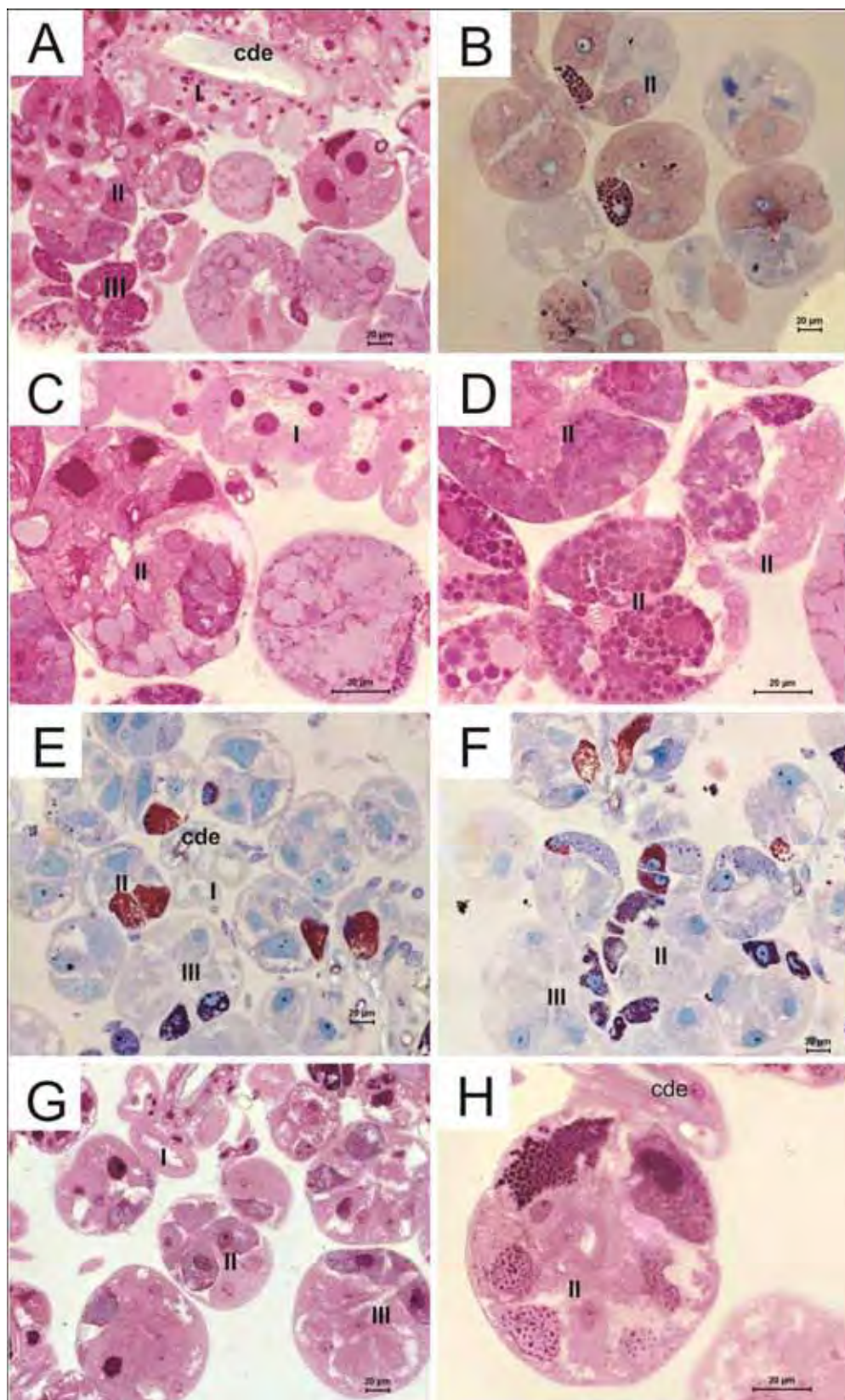


Figura 2. Secções histológicas coradas pelas técnicas de Gimenez (A-C) e de Giemsa (D) dos ácinos III das glândulas salivares de fêmeas semi-ingurgitadas de *R. sanguineus* do grupo infectado mostrando a presença da bactéria *R. rickettsii* (pontilhado) nas células e lumem (lu) dos ácinos. ced: ducto excretor comum; n: núcleo; pontilhado: *R. rickettsii*.

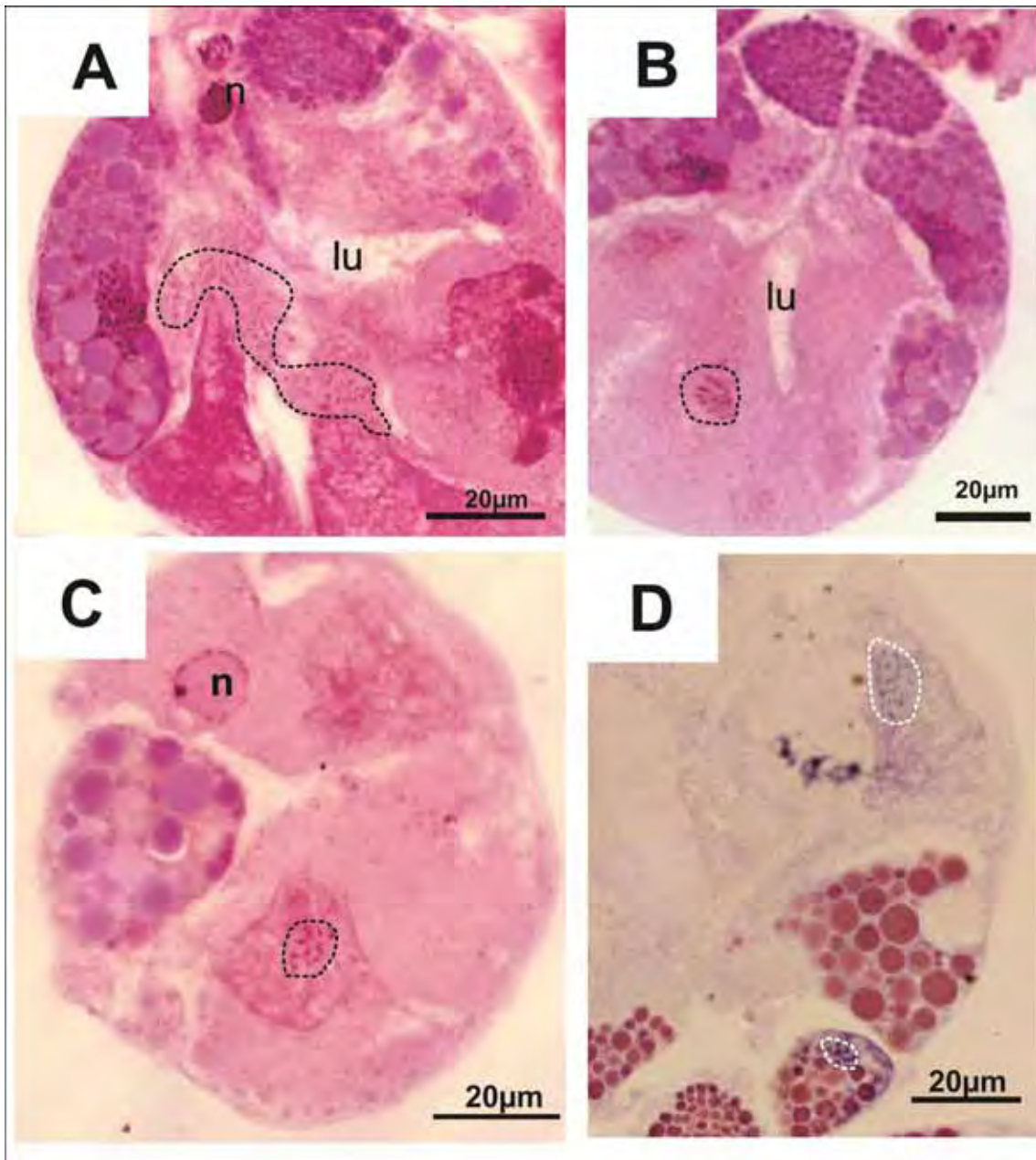


Figura 3. Secções histológicas coradas pela técnica de Gimenez (A-D) das glândulas salivares de fêmeas semi-ingurgitadas de *R. sanguineus* do grupo infectado mostrando a presença da bactéria *R. rickettsii* (pontilhado) nos ácinos (A e B) e na luz do ducto salivar (C e D). I: ácino I; II: ácino II; III: ácino III; ced: ducto excretor comum; n: núcleo das células secretoras; nd; núcleo das células do ducto; pontilhado: *R. rickettsii*.

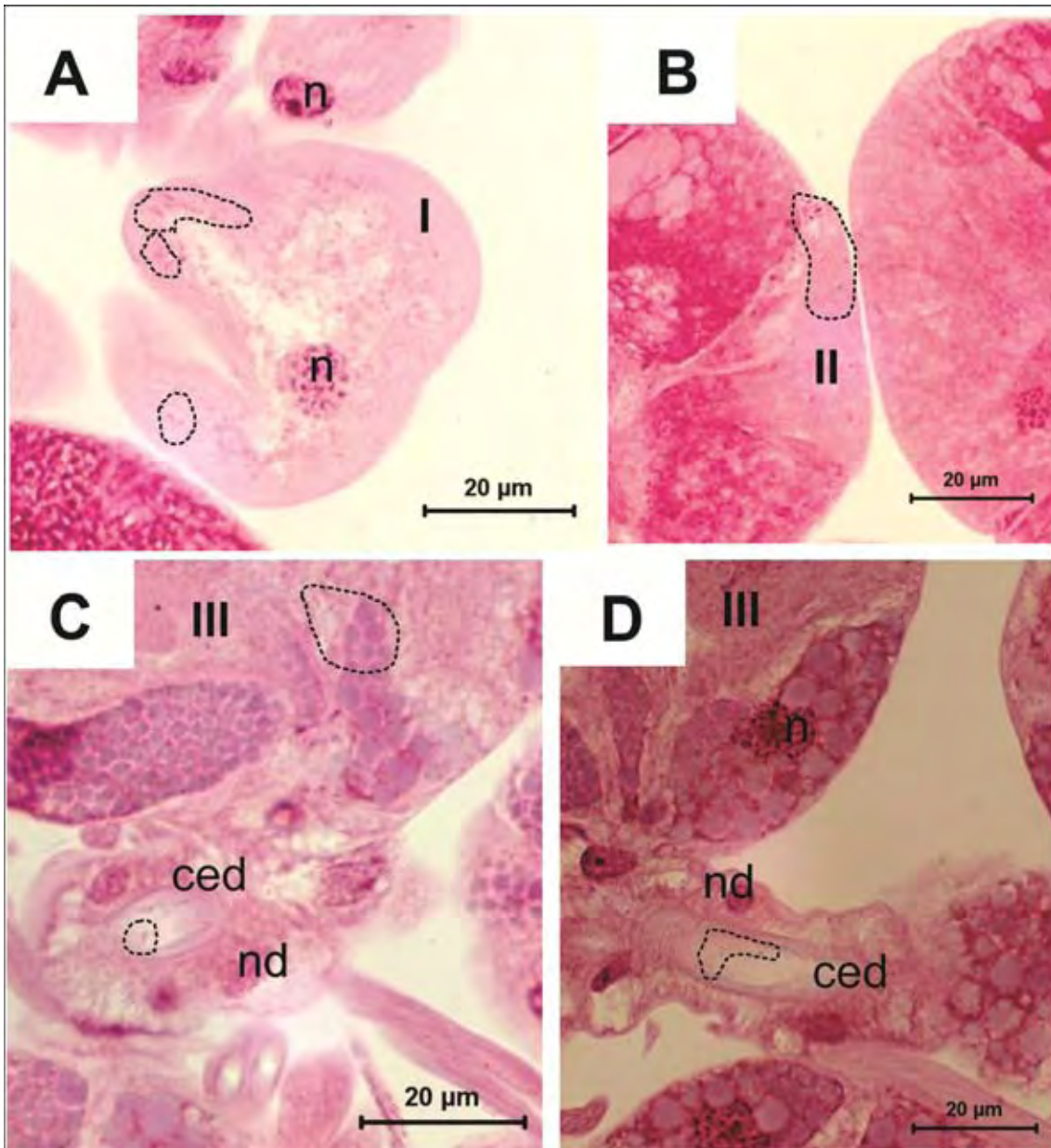
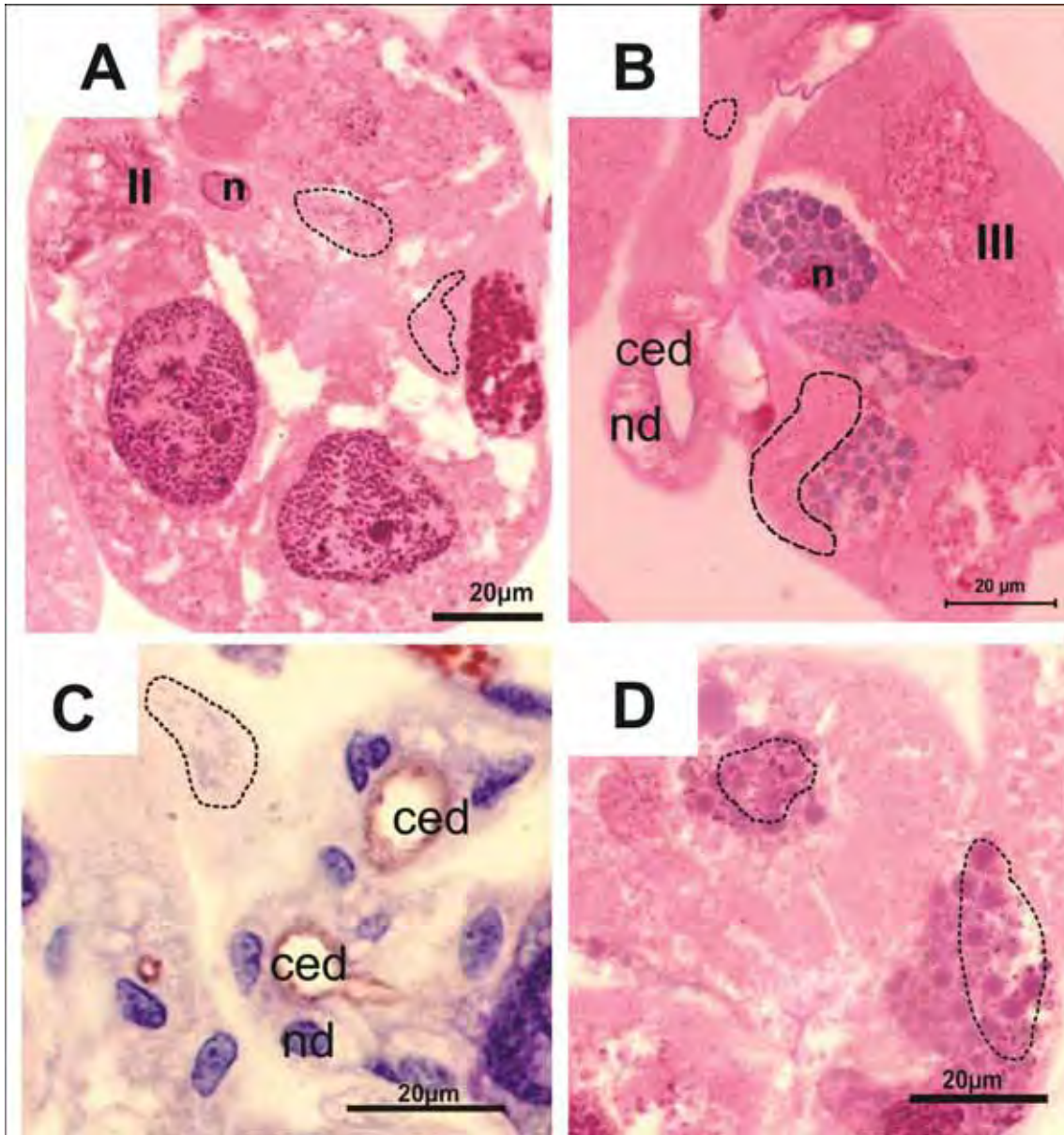


Figura 4. Secções histológicas coradas pelas técnicas de Gimenez (A, B e D) e de Giemsa (C) das glândulas salivares em processo de degeneração de fêmeas totalmente ingurgitadas de *R. sanguineus* do grupo infectado, mostrando a presença da bactéria *R. rickettsii* (pontilhado) nos ácinos (A, B e D) e na parede do ducto excretor comum (B e C). II: ácino II; III: ácino III; ced: ducto excretor comum; n: núcleo das células secretoras; nd; núcleo das células do ducto pontilhado: *R. rickettsii*.



4. DISCUSSÃO.

Os dados obtidos no presente trabalho revelaram que, tanto nos indivíduos do grupo controle como, nos dos infectados, as glândulas salivares apresentaram a morfologia das glândulas salivares das fêmeas de *R. sanguineus* compatível com o anteriormente descrito por Furquim (2007).

Nos ácinos das fêmeas semi-ingurgitadas foi possível observar marcação das bactérias com maior intensidade quando comparadas àquela obtida das fêmeas completamente ingurgitadas. Isso ocorreu, devido ao fato de que nas fêmeas semi-ingurgitadas as células acinares apresentam maior atividade de síntese e liberação de secreção e, nas já ingurgitadas, a maior parte das células já estava inativa sugerindo que grande parte da secreção provavelmente já tivesse sido eliminada, junto com ela, as bactérias. Esses dados corroboraram os de Sauer et al. (1995) que descreveram um aumento (aproximado) de 25 vezes na produção de proteínas pelas glândulas salivares das fêmeas de carrapatos ixodídeos no seu período de alimentação e ainda com maior atividade de secreção após a cópula, o que ocorreu já nos últimos dias de alimentação da fêmea no hospedeiro. Segundo Kaufman (2010), o volume de saliva secretado pelo carrapato no corpo do hospedeiro, seria também um fator determinante para a eficácia da transmissão dos patógenos para os mesmos. Sendo assim, no presente estudo a menor marcação para bactérias nas fêmeas ingurgitadas observadas nas secções histológicas estaria corroborando esta hipótese.

Os resultados aqui obtidos demonstraram que as bactérias, além dos ovários desta espécie de ectoparasita (COSTA et al. 2011) podem, colonizar também as glândulas salivares das fêmeas. Todavia, ao contrário do que outros autores observaram quando estudaram os ovários, verificou-se aqui que as rickettsias não causaram alterações morfológicas nos ácinos nem nos ductos das glândulas salivares.

Neste trabalho pode-se confirmar que ocorre disseminação generalizada pela *R. rickettsii* as quais se alojam nas diferentes porções das glândulas salivares (ácinos, células da parede e luz dos ductos excretores), corroborando os dados obtidos por Santos et al. (2002) que observaram a presença de *R. conorii* nos ácinos e nos ductos salivares dos carrapatos *R. sanguineus*, e Hayes e Burgdorfer (1979), que descreveram a presença de *R. rhipicephali* em todos os ácinos das glândulas salivares de *R.*

sanguineus, sendo ainda observada maior predisposição de infecção nas células epiteliais das paredes dos ductos excretores. Os mesmos autores relataram ainda a ocorrência de moderados danos nas glândulas salivares causados pelas bactérias, ao contrário do observado no presente trabalho, onde as glândulas salivares de carrapatos da mesma espécie infectadas pela *R. rickettsii* e, não sofreram modificações morfológicas aparentes.

Nos ácinos (agranulares e granulares) foram observadas bactérias no citoplasma das células, muitas delas presentes entre os grânulos de secreção, dado que corroborou o de Brinton e Burgdorfer (1971) para *Dermacentor andersoni* infectado com *R. canada*, e ainda Santos et. al. (2002) em *R. sanguineus* infectado pela *R. conorii*.

Desta forma pela marcação da *R. rickettsii* nas glândulas salivares conclui-se que o carrapato *R. sanguineus* é um eficiente transmissor desses patógenos, o que vem corroborar Piranda et al. (2011). As bactérias foram preferencialmente encontradas nas glândulas salivares das fêmeas semi, mais do que nas daquelas totalmente ingurgitadas, provavelmente pelo fato de que nestas últimas a maioria das bactérias presentes nas células e ductos já tivessem sido transferidas ao hospedeiro junto com a secreção produzida durante o período de alimentação destas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

BALASHOV, Yu. S. **An Atlas of Ixodid Tick Ultrastructure**. In: RAIKHEL, A.S.; HOOGSTRAAL, I. I. (ed.), Entomological Society of America (Special Publication), Lanham, 1983. 289p.

BINNINGTON, K. C. Sequential changes in salivary gland structure during attachment and feeding of the cattle tick *Boophilus microplus*. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 8, p. 97-115, 1978.

BOWMAN, A. S.; COONS, L. B.; NEEDHAM, G. R.; SAUER, J. R. Tick saliva: recent advances and implications for vector competence. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, v.11, p. 277-285, 1997.

BRINTON, L.P.; BURGDORFER, W. Fine structure of *Rickettsia canada* in tissues of *Dermacentor andersoni* stiles. **Journal of Bacteriology**, v.105, n. 3, p. 1149-1159, 1971.

BURGDORFER W. The hemolymph test. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.19, 1010-1014, 1970.

COSTA, L. F. S; NUNES, P. H.; SOARES, J. F.; LABRUNA, M. B.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Distribution of *Rickettsia rickettsii* in ovary cells of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille1806) (Acari: Ixodidae). **Parasites & Vectors** , v.4, p. 222, 2011.

CUNHA, N. C.; FONSECA, A. H.; REZENDE, J.; ROZENTAL, T.; FAVACHO, A. R. M.; BARREIRA, J. D.; MASSARD, C. L.; LEMOS, E. R. S. First identification of natural infection of *Rickettsia rickettsii* in the *Rhipicephalus sanguineus* tick, in the State of Rio de Janeiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 2, p. 105-108, 2009.

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, n. 1, p. 64-67, 2006.

FAWCETT, D. W.; BINNINGTON, K. C.; VOIGHT, W. R. **The cell biology of the ixodid tick salivary gland**. In: SAUER, J. R.; HAIR, J. A. (ed.) *Morphology, Physiology and Behavioral Biology of Ticks*. Chichester: Ellis Horwood, 1986. p.22-45.

FURQUIM, K.C.S. **Estudo das Glândulas Salivares de Fêmeas e de Machos de Carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* (LATREILLE, 1806) (ACARI, IXODIDAE): Caracterização do Ciclo Secretor com Ênfase no Processo de Degeneração**. 2007, 265 f, Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Biologia Celular e Molecular) - Instituto de Biociências de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Rio Claro, 2007.

GILL, H. S.; WALKER, A. R. The salivary glands of *Hyalomma anatolicum*: nature of salivary gland components and their role in tick attachment and feeding. **International Journal for Parasitology**, v.18, n.1, p. 83-93, 1988.

GIMÉNEZ, D. F. Staining rickettsiae in yolk sacs cultures. **Stain Technology**, v. 39, p. 135-140, 1964.

HAYES, S. F.; BURGDORFER, W. Ultrastructure of *Rickettsia rhipicephali*, a new member of the spotted fever Group Rickettsiae in tissues of the host vector *Rhipicephalus sanguineus*. **Journal of Bacteriology**, v. 137, n. 1, p. 605-613, 1979.

KAUFMAN, W. R. Ticks; Physiological aspects with implications for pathogen transmission. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v.1, p. 11–22, 2010.

LABRUNA, M. B.; PEREIRA, M. C. Carrapatos em cães no Brasil. **Clin Vet**, v.30, p. 24-32, 2001.

LABRUNA, M. B. Biologia-ecologia de *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v.13, n.1, p. 123-124, 2004.

LABRUNA, M. B. et. al. *Rickettsia* species infecting *Amblyomma cooperi* ticks from an area in state of São Paulo, Brazil, where Brazilian spotted fever is endemic. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.42, p. 90-98, 2004.

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.

MEGAW, M. J. W.; BEADLE, D. J. Structure and function of the salivary glands of the tick *Boophilus microplus*. **International Journal of Insect Morphology and Embriology**, v.8, p. 67-83, 1979.

MEGAW, M. W. J. **Structure and function of the salivary glands of the tick *Boophilus microplus***. PhD Thesis, University of Cambridge, Cambridge, 1976.

MORAES-FILHO J.; PINTER A.; PACHECO R. C.; GUTMANN T. B.; BARBOSA S. O.; GONZÁLES M. A. R. M.; MURARO, M. A., CECÍLIO S. R. M.; LABRUNA, M. B. New epidemiological data on brazilian spotted fever in an endemic area of the state of São Paulo, Brazil. **Vector-borne and Zoonotic Diseases**, v. 9, n. 1, p. 73-78, 2009.

PACHECO, R.C. et al. Pesquisa de *Rickettsia* spp em carrapatos *Amblyomma cajennense* e *Amblyomma dubitatum* no Estado de São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.42, n.3, p.351-353, 2009.

PACHECO, R. C.; MORAES-FILHO, J.; GUEDES, E.; SILVEIRA, I.; RICHTZENHAIN, L. J.; LEITE, R.C.; LABRUNA, M.B. Rickettsial infections of dogs, horses and ticks in Juiz de Fora, Southeastern Brazil, and isolation of *Rickettsia rickettsii* from *Rhipicephalus sanguineus* ticks. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 25, p. 148–155, 2011.

PIRANDA, E. M.; FACCINI, J. L. H.; PINTER, A; PACHECO, R. C.; CANÇADO, P. H. D; LABRUNA, M. B. Experimental infection of rhipicephalus sanguineus ticks with the bacterium *Rickettsia rickettsii*, using experimentally infected dogs, **Vector-borne and Zoonotic Diseases**, v.11, n.1, p. 29-35, 2011.

SANTOS, A. S.; BACELLAR, F.; SANTOS-SILVA, M.; FORMOSINHO, P.; GRÁCIO, A. J. ; FRANCA, S. ultrastructural study of the infection process of *Rickettsia conorii* in the salivary glands of the vector tick *Rhipicephalus sanguineus*. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, v.2, n.3, p. 165-177, 2002.

SAUER, J. R; HAIR, J. A. **Morphology, physiology, and behavioral biology of ticks**. Chichester: Ellis Horwood, 1986. p.23-45, 457-471.

SAUER, J. R; McSWAIN, J. L.; BOWMAN, A. S.; ESSENBERG, R. C.. Tick salivary gland physiology. **Annual Review of Entomology, Stanford**, v. 40, p. 245- 267, 1995.

SONENSHINE, D. E. **Biology of ticks**. New York: Oxford University Press, 1991. p.141-158.

WALKER, D. H; GEAR, J. H. S. Correlation of the distribution of *Rickettsia conorii*, microscopic lesions, and clinical features in south african tick bite fever. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.34, n. 2, p. 361-371, 1985.

6. DISCUSSÃO GERAL

O presente trabalho trouxe informações morfológicas, importantes sobre a detecção da bactéria *Rickettsia rickettsii* nos ovários e glândulas salivares de fêmeas do carrapato *Rhipicephalus sanguineus*, órgãos estes, de grande importância no ciclo de vida dos mesmos e essenciais para o sucesso de alguns patógenos. Por meio destas informações (morfológicas) observou-se a ocorrência da transmissão transtadial e transovariana de *R. rickettsii* no carrapato fazendo uso de técnicas histológicas aplicadas nos ovários e nas glândulas salivares de fêmeas semi e totalmente ingurgitadas.

A análise dos resultados demonstrou que a infecção ocasionada por meio de adultos de *R. sanguineus* provocou sintomas característicos da Febre Maculosa Brasileira (FMB) nos hospedeiros como também demonstrado por Mancini et al. (1983), ou seja os animais apresentaram temperatura igual ou superior a 40°C, bem como lesão escrotal, com um deles vindo a óbito. A presença da bactéria *R. rickettsii* nas glândulas salivares e nos ovários, juntamente com os sintomas característicos da FMB nos hospedeiros, vem demonstrar a efetiva transmissão transtadial da bactéria em *R. sanguineus* quando os carrapatos são infectados na fase de ninfa, corroborando os resultados obtidos por Parker et al. (1933) e Piranda et al. (2011). Segundo Burgdorfer e Brinton (1975), o sucesso na transmissão transovariana depende primeiramente do grau de desenvolvimento das riquetsias nos tecidos do ovário. Neste estudo a *R. rickettsii* foi observada nos ovócitos em praticamente todos os estágios de desenvolvimento, tanto nas fêmeas semi como naquelas já ingurgitadas, corroborando Burgdorfer (1963) e Burgdorfer e Brinton (1975) em estudos com carrapato *Dermacentor andersoni*. Ainda, Piranda et al. (2011) detectaram pela técnica de PCR a transmissão transovariana de *R. rickettsii* em *R. sanguineus*, também infectados na fase de ninfa.

Neste trabalho observou-se a instalação da disseminação pela *R. rickettsii* nas glândulas salivares de fêmeas de *R. sanguineus*, tanto nos ácinos (agranulares e granulares), como nas células da parede e na luz dos ductos excretores, corroborando os dados obtidos por Santos et al. (2002) que observaram *R. conorii* nos ácinos e nos ductos salivares desta mesma espécie, e Hayes e Burgdorfer (1979), que descreveram a presença de *R. rhipicephali* em todos os ácinos das glândulas salivares de *R. sanguineus*, sendo ainda observada maior predisposição de infecção nas células

epiteliais das paredes dos ductos excretores. Nos ácinos as bactérias foram observadas no citoplasma das células, muitas delas presentes entre os grânulos de secreção, dado que corroborou o de Brinton e Burgdorfer (1971) em *Dermacentor andersoni* infectado com *R. canada*, e os de Santos et al. (2002) em *R. sanguineus* infectados pela *R. conorii*.

Segundo observado por Scooles (2007) estudando *Anaplasma marginale*, a capacidade de um patógeno ser transmitido pelo carrapato, depende da sua capacidade de escapar primeiramente da barreira epitelial do intestino, invadir células de outros órgãos, sobreviver, se reproduzir e ser eliminado pela saliva do vetor. Nos ácinos das fêmeas semi-ingurgitadas de *R. sanguineus* estudadas neste trabalho, foi possível observar mais intensa marcação das bactérias quando comparadas àquela obtida das fêmeas completamente ingurgitadas. Isso ocorreu devido ao fato de que nas fêmeas semi-ingurgitadas as células acinares apresentavam maior atividade de síntese e liberação de secreção. Nas totalmente ingurgitadas, a maior parte das células já estava inativa e grande parte da secreção já teria sido eliminada e, junto com ela, as bactérias, corroborando os dados de Sauer et al. (1995). Segundo Kaufman (2010), o volume de saliva secretado pelo carrapato no corpo do hospedeiro seria outro fator determinante para a eficácia da transmissão dos patógenos para os mesmos. Sendo assim, a menor marcação para bactérias nas fêmeas ingurgitadas observadas nas secções histológicas corroboraria esta hipótese.

Ao contrário do observado nos ovários infectados pela *R. rickettsii* deste estudo, e o relatado por Hayes e Burgdorfer (1979), onde a bactéria *R. rhipicephali* causou moderados danos nas glândulas salivares do carrapato *R. sanguineus*, as bactérias *R. rickettsii* aparentemente não causaram alterações morfológicas nos ácinos e nem nos ductos das glândula salivares das fêmeas de *R. sanguineus* aqui estudadas.

No caso dos ovários de *R. sanguineus* houve uma preferência das bactérias em se instalar no pólo do ovócito que faz contato direto com as células do pedicelo. A presença de bactérias dentro destas células e sua ausência (principalmente) nas células da parede do ovário poderia sugerir que as bactérias utilizariam, além da hemolinfa, as células do pedicelo como porta de entrada nos ovócitos. Isso seria explicado uma vez que as células do pedicelo transferem material lipídico, protéico e polissacarídeo para o interior dos ovócitos auxiliando na produção do vitelo (Oliveira, et al. 2005). As células do pedicelo, por sua vez seriam infectadas pelas bactérias vindas da hemolinfa, de onde retirariam material para ser utilizado no processo de vitelogênese.

A análise histológica dos ovários das fêmeas de *R. sanguineus* infectadas comprovou a presença da bactéria e, além disso, indicou que a infecção pode interferir negativamente no processo de reprodução dos carrapatos, pois foram detectadas alterações tanto na forma como na estrutura celular dos ovócitos que continham bactérias principalmente nas fêmeas ingurgitadas, aquelas que de fato já estariam prontas para ovipostura. Esses dados vem corroborar a teoria de Macdade e Newhouse (1986), que postularam a existência de uma relação entre a *R. rickettsii* e carrapatos a qual nem sempre poderia ser considerada uma relação de simbiose verdadeira, visto que os microorganismos poderiam causar prejuízo aos órgãos dos carrapatos, comprometendo assim a sua sobrevivência. Assim, o fato dos ovócitos de *R. sanguineus* infectados por *R. rickettsii* apresentarem alterações morfológicas poderia confirmar que a bactéria além de ser maléfica para o hospedeiro do carrapato, também o seria para o próprio ectoparasito.

Estudar a relação carrapato/patógeno tem sido muito importante para tentar se compreender os mecanismos de infecção e de transmissão desses indivíduos, bem como para se buscar novas estratégias, porém eficientes, de combate às doenças causadas pelos mesmos. Assim, o presente trabalho demonstrou que a transmissão transtadiária de *R. rickettsii* em *R. sanguineus* seria eficiente quando estes estivessem infectados na fase de ninfa. O fato da marcação da *R. rickettsii* foi mais intensa nas glândulas salivares das fêmeas semi do que naquelas totalmente ingurgitadas indicou que, provavelmente, nestas últimas a maioria das bactérias presentes nas células e ductos acinares já tivessem sido transferidos ao hospedeiro no momento da liberação da secreção salivar ao longo do período de alimentação, o que permitiu concluir que o carrapato *R. sanguineus* seria considerado um eficiente vetor na transmissão desses patógenos.

7. CONCLUSÕES.

- A transmissão transestadial da bactéria *R. rickettsii* nos carrapatos *R. sanguineus* infectados em fase de ninfa mostrou ser eficiente.
- O carrapato do cão *R. sanguineus* é um vetor eficiente da bactéria *R. rickettsii* em laboratório, confirmado pela presença destas bactérias nas glândulas salivares das fêmeas, e uma vez que os hospedeiros (cobaias) apresentaram os sintomas da Febre Maculosa Brasileira.
- A bactéria *R. rickettsii* causa disseminação generalizada, ultrapassando a barreira do epitélio intestinal do carrapato, atingindo a hemolinfa e, a partir daí, ovário e glândulas salivares.
- A infecção dos ovários de fêmeas de *R. sanguineus* por *R. rickettsii* afeta negativamente o processo reprodutivo, uma vez que os ovócitos são prejudicados pelas mesmas.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALASHOV, Yu. S. **An Atlas of Ixodid Tick Ultrastructure**. In: RAIKHEL, A.S.; HOOGSTRAAL, I. I. (ed.), Entomological Society of America (Special Publication), Lanham, 1983. 289p.

BINNINGTON, K. C. Sequential changes in salivary gland structure during attachment and feeding of the cattle tick *Boophilus microplus*. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 8, p. 97-115, 1978.

BOWMAN, A. S.; COONS, L. B.; NEEDHAM, G. R.; SAUER, J. R. Tick saliva: recent advances and implications for vector competence. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, v.11, p. 277-285, 1997.

BRINTON, L.P.; BURGDORFER, W. Fine structure of *Rickettsia canada* in tissues of *Dermacentor andersoni* stiles. **Journal of Bacteriology**, v.105, n. 3, p. 1149-1159, 1971.

BURGDORFER W: Investigation of “Transovarial transmission” of *Rickettsia rickettsii* in the wood tick, *Dermacentor andersoni*. **Experimental parasitology**, v. 14, p. 152-159, 1963.

BURGDORFER W. The hemolymph test. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 19, 1010-1014, 1970.

BURGDORFER W, BRINTON LP: Mechanisms of transovarial infection of spotted fever rickettsiae in ticks. **Ann N Y Acad Sci** 1975, v. 266, p. 61–72.

CARDOSO, L. D. **Detecção e caracterização da *Rickettsia spp* circulante em foco inativo periurbano do município de Caratinga, MG**. 2004, 100f, Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Bioquímica) - Núcleo de Pesquisa em Ciências

Biológicas Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto MG, 2004.

COSTA, L. F. S; NUNES, P. H.; SOARES, J. F.; LABRUNA, M. B.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Distribution of *Rickettsia rickettsii* in ovary cells of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille1806) (Acari: Ixodidae). **Parasites & Vectors** ,v.4, p. 222, 2011.

COSTA, L. F. S; NUNES, P. H.; SOARES, J. F.; LABRUNA, M. B.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Distribution of *Rickettsia rickettsii* in ovary cells of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille1806) (Acari: Ixodidae). **Parasites & Vectors** , v.4, p. 222, 2011.

CUNHA, N. C.; FONSECA, A. H.; REZENDE, J.; ROZENTAL, T.; FAVACHO, A. R. M.; BARREIRA, J. D.; MASSARD, C. L.; LEMOS, E. R. S. First identification of natural infection of *Rickettsia rickettsii* in the *Rhipicephalus sanguineus* tick, in the State of Rio de Janeiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 2, p. 105-108, 2009.

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, n. 1, p. 64-67, 2006.

DEMMA, L. J.; et al. JH: Rocky Mountain Spotted Fever from an Unexpected Tick Vector in Arizona. **The New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 6, p. 587-594, 2005.

DUARTE, M. T. T. R., **Riquetsioses do Grupo das Febres Exantemáticas em Canídeos Domésticos em Portugal: Revisão Bibliográfica e Estudo Retrospectivo**. 2008, 71f. Dissertação (Mestrado integrado em Medicina Veterinária), Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2008

FAWCETT, D. W.; BINNINGTON, K. C.; VOIGHT, W. R. **The cell biology of the ixodid tick salivary gland**. In: SAUER, J. R.; HAIR, J. A. (ed.) *Morphology, Physiology and Behavioral Biology of Ticks*. Chichester: Ellis Horwood, 1986. p.22-45.

FONSECA, L. M. G. D. A.; MARTINS, A. V. Febre Maculosa: revisão de literatura-artigo de revisão. **Saúde & Ambiente em Revista**, v. 2, n. 1, p. 01-20, 2007.

FURQUIM, K.C.S. **Estudo das Glândulas Salivares de Fêmeas e de Machos de Carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* (LATREILLE, 1806) (ACARI, IXODIDAE):** Caracterização do Ciclo Secretor com Ênfase no Processo de Degeneração. 2007, 265 f, Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Biologia Celular e Molecular) - Instituto de Biociências de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Rio Claro-SP, 2007.

GILL, H. S.; WALKER, A. R. The salivary glands of *Hyalomma anatolicum*: nature of salivary gland components and their role in tick attachment and feeding. **International Journal for Parasitology**, v.18, n.1, p. 83-93, 1988.

GIMÉNEZ, D. F. Staining rickettsiae in yolk sacs cultures. **Stain Technology**, v. 39, p. 135-140, 1964.

HAYES, S.F.; BURGDORFER, W. Ultrastructure of *Rickettsia rhipicephali*, a new member of the Spotted Fever Group Rickettsiae in tissues of the host vector *Rhipicephalus sanguineu*. **Journal of Bacteriology**, v. 137, n. 1, p. 605-613, 1979.

HAYES, S. F.; BURGDORFER, W. Reactivation of *Rickettsia rickettsii* in *Dermacentor andersoni* ticks: an ultrastructural analysis, **Infection and Immunity**, v. 37, n. 2, p.779-785, 1982.

KAUFMAN, W. R. Ticks; Physiological aspects with implications for pathogen transmission. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v.1, p. 11–22, 2010.

LA SCOLA, B.; RAOULT, D. Laboratory diagnosis of rickettsioses: current approaches to diagnosis of old and new rickettsial diseases. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 11, p. 2715-2727, 1997.

LABRUNA, M. B.; PEREIRA, M. C. Carrapatos em cães no Brasil. **Clin Vet**, v.30, p. 24-32, 2001.

LABRUNA, M. B. Carta acarológica. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v.13, n.1, p. 199-202, 2004.

LABRUNA, M. B. Biologia-ecologia de *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v.13, n.1, p. 123-124, 2004.

LABRUNA, M. B. et. al. *Rickettsia* species infecting *Amblyomma cooperi* ticks from an area in state of São Paulo, Brazil, where Brazilian spotted fever is endemic. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.42, p. 90-98, 2004.

LABRUNA M. B.; WHITWORTH, T.; HORTA M. C.; BOUYER D. H.; MCBRIDE J. W.; PINTER, A.; POPOV, V.; GENNARI, S. M.; WALKER, D. H. *Rickettsia* species infecting *Amblyomma cooperi* ticks from an area in state of São Paulo, Brazil, where Brazilian spotted fever is endemic. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 42, p. 90-98, 2004.

LABRUNA, M. B. **Cultivo celular de Riquetsias no Brasil**. In: XIV CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA E II SIMPÓSIO LATINOAMERICANO DE RICKETTSIOSE, Ribeirão Preto-SP. **ANAIS**. Ribeirão Preto, 2006, p.132-133.

LABRUNA, M. B.; OGRZEWALSKA, M.; MARTINS, T. F.; PINTER, A.; HORTA, M. C. Comparative susceptibility of larval stages of *Amblyomma aureolatum*, *Amblyomma cajennense*, and *Rhipicephalus sanguineus* to infection by *Rickettsia rickettsii*. **Journal of Medical Entomology**, v. 45, n. 6, p. 1156-1159, 2008.

LABRUNA M. B. **Ecology of Rickettsia in South America**. In *Rickettsiology and Rickettsial Diseases-Fifth International Conference*. Annals of the New York Academy of Sciences; New York. Edited by HECHMY, K. E.; SAMUEL, J. E.; BROUQUI, P.; RAOULT, D. A. 2009, v. 1166, p. 156–166.

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.

MANCINI, D. A. P.; NASCIMENTO, E. M. M.; TAVARES, V. R.; SOARES, M. A. A Ocorrência de Rickettsioses do grupo da *Rickettsia rickettsii* **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v. 17, p. 493-499, 1983.

MCDADE J. E.; NEWHOUSE, V. F. Natural history of *Rickettsia rickettsii*. **Ann. Rev. Microbiol** , v. 40, p. 287-309, 1986.

MCDADE J. E. **Rickettsial diseases** In Microbiology and Microbial Infections; 9nd edition. Edited by Hausler Jr. WJ. and Sussman M. London: Topley and Wilson's; 1998, p. 995-1011.

MEGAW, M. J. W.; BEADLE, D. J. Structure and function of the salivary glands of the tick *Boophilus microplus*. **International Journal of Insect Morphology and Embriology**, v.8, p. 67-83, 1979.

MEGAW, M. W. J. **Structure and function of the salivary glands of the tick *Boophilus microplus***. PhD Thesis, University of Cambridge, Cambridge, 1976.

MELLES, H. H. B; COLOMBO, S.; LEMOS E. R. S. 1999. Isolamento de *Rickettsia* em cultura de células Vero. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 32(5), 469-473, set-out.

MORAES-FILHO J.; PINTER A.; PACHECO R. C.; GUTMANN T. B.; BARBOSA S. O.; GONZÁLES M. A. R. M.; MURARO, M. A., CECÍLIO S. R. M.; LABRUNA, M. B. New epidemiological data on Brazilian Spotted Fever in an endemic area of the state of São Paulo, Brazil. **Vector-borne and Zoonotic Diseases**, v. 9, n. 1, p. 73-78, 2009.

OLIVEIRA, P. R.; BECHARA, G. H.; DENARDI, S. E.; SAITO, K. C.; NUNES, E. T.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Morphological characterization of the ovary and oocytes vitellogenesis of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). **Exp. Parasitol.**, v. 110, p.146–156, 2005.

PACHECO, R.C. et al. Pesquisa de *Rickettsia* spp em carrapatos *Amblyomma cajennense* e *Amblyomma dubitatum* no Estado de São Paulo **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.42, n.3, p.351-353, 2009.

PACHECO, R. C.; MORAES-FILHO, J.; GUEDES, E.; SILVEIRA, I.; RICHTZENHAIN, L. J., LEITE, R. C.; LABRUNA, M. B.; Rickettsial infections of dogs, horses and ticks in Juiz de Fora, Southeastern Brazil, and isolation of *Rickettsia rickettsii* from *Rhipicephalus sanguineus* Ticks. **Medical and Veterinary Entomology**, v.25, p. 148-155, 2011.

PARKER, R.; PHILIP, C. B.; JELLINSON, W. L. Rocky Mountain spotted fever. Potentialities of tick transmission in relation to geographic occurrence in the United States. **Am J Trop Med**, v. 13, p. 241–378, 1933.

PAZ, G. F.; LEITE, R. C.; OLIVEIRA, P. R. Avaliação in vitro da eficácia de acaricidas sobre o *Rhipicephalus sanguineus* coletado no canil do Hospital Veterinário da UFMG. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 17, n. 1, p. 41-44, 2008.

PEGRAM, R. G.; CLIFFORD, C. M.; WALKER, J. B.; KEIRANS, J. E. Classification of the *Rhipicephalus sanguineus*, *Rhipicephalus sulcatus* and *Rhipicephalus turanicus*. **Systematic Parasitology**, v. 10, p. 3-26, 1987.

PINTER, A.; LABRUNA, M. B. Isolation of *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia bellii* in cell culture from the tick *Amblyomma aureolatum* in Brazil. **Ann. N.Y. Acad. Sci**, v. 1078, p. 523-529, 2006..

PIRANDA, E. M.; FACCINI, J. L. H.; PINTER, A; PACHECO, R. C.; CANÇADO, P. H. D; LABRUNA, M. B. Experimental infection of *Rhipicephalus sanguineus* ticks with the bacterium *Rickettsia rickettsii*, using experimentally infected dogs, **Vector-borne and Zoonotic Diseases**, v.11, n.1, p. 29-35, 2011.

SANGIONI, L. A.; HORTA, M. C.; VIANNA, M. C. B.; GENNARI, S. M.; SOARES, R. S.; GALVÃO, M. A. M.; SCHUMAKER, T. T. S.; FERREIRA, F.; VIDOTTO, O.; LABRUNA MB Rickettsial infection in animals and Brazilian spotted fever endemicity. **Emerg Infect Dis**, v. 11, p. 265-270, 2005.

SANTOS, A. S.; BACELLAR, F.; SANTOS-SILVA, M.; FORMOSINHO, P.; GRÁCIO, A. J. ; FRANCA, S. Ultrastructural study of the infection process of *Rickettsia conorii* in the salivary glands of the vector tick *Rhipicephalus sanguineus*. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, v.2, n.3, p. 165-177, 2002.

SAUER, J. R; HAIR, J. A. **Morphology, physiology, and behavioral biology of ticks**. Chichester: Ellis Horwood, 1986. p.23-45, 457-471.

SAUER, J. R; McSWAIN, J. L.; BOWMAN, A. S.; ESSENBERG, R. C. Tick salivary gland physiology. **Annual Review of Entomology, Stanford**, v. 40, p. 245-267, 1995.

SCOLES, G. A.; UETI, M. W.; NOH, S. M.; KNOWLES, D. P.; PALMER, G. H. Conservation of transmission phenotype of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) strains among *Dermacentor* and *Rhipicephalus* ticks (Acari: Ixodidae). **J. Med. Entomol.** v.44, n.3, p. 484-491, 2007.

SEXTON, D. J.; BURGDORFER, W.; THOMAS, L. Rocky Mountain spotted fever in Mississippi: survey for spotted fever antibodies in dogs and for spotted fever group Rickettsial in dog ticks. **American Journal of Epidemiology**, v. 103, p. 192-197, 1976.

SILVA, M. E. **Frequência de Anticorpos Anti-*Rickettsia Spp.* em cães da cidade de Belo Horizonte**, Minas Gerais, Brasil 2007. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais– UFMG, Belo Horizonte, 2007.

SONENSHINE, D. E. **Biology of ticks**. New York: Oxford University Press, 1991. p.141-158.

VRANJAC, A. **Informe Técnico Sobre a Febre Maculosa Brasileira**. Secretaria de Estado da Saúde Coordenação dos Institutos de Pesquisa Divisão de Zoonoses, São Paulo, setembro, 2002.

WALKER, D. H; GEAR, J. H. S. Correlation of the distribution of *Rickettsia conorii*, microscopic lesions, and clinical features in south african tick bite fever. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.34, n. 2, p. 361-371, 1985.

Luís Flávio da Silva Costa

Orientado

Maria Izabel Camargo-Mathias

Orientadora