

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**CARACTERIZAÇÃO DO PARASITISMO POR *Ornithodoros brasiliensis* (Chelicerata:  
Argasidae) E DA TOXICOSE INDUZIDA EM HUMANOS E ANIMAIS**

**JOSÉ RECK Jr.**

Porto Alegre, julho de 2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

CENTRO DE BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**CARACTERIZAÇÃO DO PARASITISMO POR *Ornithodoros brasiliensis*  
(Chelicerata: Argasidae) E DA TOXICOSE INDUZIDA EM HUMANOS E ANIMAIS**

**JOSÉ RECK Jr.**

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação  
em Biologia Celular e Molecular da UFRGS  
como requisito parcial para a obtenção do grau de  
**Doutor** em Ciências.

Orientador: **Dr. Carlos Termignoni**

Co-orientação: **Dr. Jorge Almeida Guimarães**

**Dr. João Ricardo Martins**

Porto Alegre, julho de 2011

COMISSÃO AVALIADORA DA TESE DE DOUTORADO:

**Prof. Dr. Carlos Termignoni**

Orientador  
Presidente da comissão

**Prof. Dr. Jorge Almeida Guimarães**

Co-orientador

**Dr. João Ricardo Martins**

Co-orientador

**Prof. Dr. João Luiz Horacio Faccini**

Instituto de Veterinária  
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ)  
Seropédica, RJ, Brasil

**Profa. Dra. Rosângela Zacarias Machado**

Departamento de Patologia Veterinária  
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP)  
Jaboticabal, SP, Brasil

**Prof. Dr. David Driemeier**

Departamento de Patologia Clínica Veterinária  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)  
Porto Alegre, RS, Brasil

**Dra. Renata Terra**

(revisora da tese e suplente)  
Centro de Biotecnologia  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)  
Porto Alegre, RS, Brasil

Este trabalho foi desenvolvido no **Laboratório de Parasitologia** do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF), e no **Laboratório de Bioquímica Farmacológica** do Centro de Biotecnologia da UFRGS.

Tempo de execução do doutorado: **24 meses**

*Apoio financeiro:* Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Programa Nacional de Excelência (PRONEX), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT) em Entomologia Molecular, Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (FEPAGRO).

Parte do curso de doutorado foi realizada com bolsa CAPES.

*“Veni, vidi, vici”*

Este trabalho é dedicado...

*À Fernanda...*

*... por estar sempre ao meu lado, e*

*por fazer tudo valer a pena.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por tudo...

Ao Dr. João Ricardo Martins (IPVDF), um grande exemplo de pessoa, cientista, mestre amigo; e o grande responsável por essa nossa “aventura”. Um sincero obrigado pelas incontáveis oportunidades, ensinamentos, amizade, pelo apoio incondicional e por ser uma pessoa que faz a diferença.

Ao professor Carlos Termignoni, pela orientação e amizade, pela parceria de longa data, oportunidades e incentivo; e em especial por ter topado o desenvolvimento deste (diferente) projeto e pela paciência em ouvir e ponderar os fatos.

Ao professor Jorge Guimarães, pelas oportunidades, grande e constante incentivo e todos os ensinamentos.

Aos integrantes da comissão avaliadora, Prof. Dr. João Luiz Faccini, Profa. Dra. Rosângela Machado e Prof. Dr. David Driemeier pelo pronto aceite do convite para comporem a minha banca e pela revisão desta tese.

À Dra. Renata Terra, revisora desta tese, pelas valiosas sugestões.

Aos integrantes de minha comissão de acompanhamento (CA), professores Guido Lenz (Departamento de Biofísica - UFRGS) e Carlos Alexandre Ferreira (Instituto de Biociências - PUC-RS), pelas sugestões, paciência e valiosos conselhos ao longo deste trabalho. Particularmente, ao Prof. Carlos Alexandre, um obrigado pela amizade, incentivo, apoio e agradáveis discussões.

Ao Professor David Driemeier (Departamento de Patologia Clínica - UFRGS) e a sua equipe, em especial meu grande amigo Paulo Bandarra, DVM, MSc, pelo apoio em experimentos desta tese e valiosas sugestões.

Ao Professor Marcelo Bahia Labruna (Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade de São Paulo, USP) e ao amigo João Fábio Soares, DVM, MSc, pelo incentivo, sugestões, discussões científicas e pelo apoio fundamental em experimentos desta tese.

À Fernanda Marks, DVM, MSc, (Laboratório de Virologia, Faculdade de Veterinária – UFRGS) pelo apoio fundamental na execução de experimentos deste trabalho e pelas diversas idéias, discussões e esclarecimentos.

À Dra. Valéria Onofrio e à Dra. Darci Barros-Battesti (Instituto Butantan) pelo incentivo, discussões, esclarecimentos, e grande apoio na pesquisa com *Ornithodoros brasiliensis*.

À Kátia Moura (Centro de Informações Toxicológicas, CIT-RS) pelo apoio e amizade.

À Inspeção Veterinária de São Francisco de Paula, em especial a Hélio Castilhos, DVM, e ao Sr. Ângelo Valim, personagens essenciais no desenrolar deste trabalho e sem os quais nada teria sido possível.

Aos demais professores que de alguma maneira contribuíram para este trabalho ou fizeram diferença na minha formação, seja através da vontade de compartilhar conhecimento como também através do exemplo profissional.

Aos integrantes (colegas e professores) de laboratórios da UFRGS e do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF) pelo apoio. Em especial aos professores Marilene Vainstein, Augusto Schrank, Guido Lenz, e João Gonzalez; e aos auxiliares técnicos André Moraes e Zelma Regina.

Aos grandes amigos do Centro de Biotecnologia da UFRGS (em ordem alfabética: Antônio, Lucélia, Markus, Renata e Walter) pela agradável convivência, amizade e apoio em todos os momentos da minha formação. Um especial obrigado por terem sempre ficado ao meu lado e por tudo que aprendi com vocês.

Aos amigos e colegas Ugo Araújo, DVM, e Anelise Webster, DVM, pelo grande apoio e incentivo e pela amizade sincera.

Aos insubstituíveis Silvia e Luciano, secretários do PPGBCM, pela ajuda e participação fundamental no dia a dia dos alunos do programa.

À CAPES, CNPq e à UFRGS que possibilitaram construir minha carreira profissional com bolsa de estudos, um financiamento público federal essencial para o desenvolvimento da



ciência. E à Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (FEPAGRO) pelo apoio institucional a este projeto.

À Universidade Federal do Amazonas (UFAM) pela oportunidade de vivenciar uma das mais gratificantes experiências da minha vida: a docência. Pelo incentivo à conclusão desta tese e gentil recepção e acolhimento da minha pessoa.

Aos meus queridos alunos da UFAM, pois, certamente, eu aprendi muito mais com vocês do que o contrário.

À população de São Francisco de Paula e Jaquirana, especialmente das localidades de Vargem do Cedro e Faxinal dos Pelúcios, pela concordância e acolhida ao nosso trabalho, gentil recepção em suas casas, e por permitirem que pesquisadores entrassem em suas propriedades para buscar carrapatos!

Aos meus queridos amigos Thiago Cruz e Carla Rodenbusch, por sempre estarem dispostos a nos ouvir e incentivar e pela divertida convivência e apoio em todos os momentos.

Aos meus sogros (Carlos e Marilene) por sempre me receberem como um filho, pelo estímulo, apoio em nossas decisões, e pelas informações sobre a “região serrana”.

Aos meus pais e irmãs (Nídia, José, Alexandra e Cássia) por tudo o que representam em minha vida, pelo estímulo em buscar meus objetivos, apoio, paciência, carinho, amor incondicional, e por terem feito todos os esforços para permitir e incentivar meu acesso e interesse em sempre estudar.

À minha querida esposa Fernanda, pelo exemplo de pessoa e profissionalismo, pelo irrestrito apoio (emocional e profissional) e força em todas as horas, pelos momentos divertidos e pelo que aprendi (e continuo aprendendo), e especialmente pela amizade, carinho, compreensão, paciência e amor. Por estar sempre ao meu lado, mesmo nos momentos mais difíceis. Enfim, por me fazer acreditar que tudo pode dar certo...

## ÍNDICE

	Página
<b>LISTA DE ABREVIATURAS &amp; SÍMBOLOS</b> .....	11
<b>RESUMO</b> .....	14
<b>ABSTRACT</b> .....	16
<b>PRÓLOGO</b> .....	18
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	22
<b>1.1. Carrapatos: características gerais</b> .....	22
<b>1.2. Argasídeos e o gênero <i>Ornithodoros</i></b> .....	29
<b>1.3. Toxicoses causadas por carrapatos</b> .....	40
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	40
<b>3. PARTE EXPERIMENTAL &amp; RESULTADOS</b> .....	50
<b>3.1. Capítulo I</b> .....	51
<i>Manuscrito: Epidemiology of <i>Ornithodoros brasiliensis</i> (mouro tick) in Southern Brazil highlands: prevalence, risk factors and analysis of retrospective human/animal cases of tick toxicosis</i>	
<b>3.2. Capítulo II</b> .....	88
<i>Artigo científico: Tick toxicosis in a dog bitten by <i>Ornithodoros brasiliensis</i></i>	
<b>3.3. Capítulo III</b> .....	104
<i>Manuscrito: Experimentally induced tick toxicosis in rats bitten by <i>Ornithodoros brasiliensis</i> (mouro tick): a clinico-pathological characterization</i>	
<b>3.4. Capítulo IV</b> .....	133
<i>Manuscrito: <i>Ornithodoros brasiliensis</i> (mouro tick) salivary gland homogenate inhibits in vivo wound healing and in vitro endothelial cell proliferation</i>	
<b>4. DISCUSSÃO &amp; CONCLUSÕES</b> .....	148
<b>5. REFERÊNCIAS</b> .....	154
<b>6. ANEXOS</b> .....	162
<b>7. CURRICULUM VITAE</b> .....	173

## LISTA DE ABREVIATURAS & SÍMBOLOS

Abs <sub>540</sub>	<i>Absorbance at 540 nanometers</i> (absorbância a 540 nanômetros)
a.C.	Antes de Cristo
ALT	<i>Alanine aminotransferase</i> (alanina aminotransferase)
ANOVA	<i>Analysis of variance</i> (análise de variância)
AST	<i>Aspartate aminotransferase</i> (aspartato aminotransferase)
aPTT	<i>Activated partial thromboplastin time</i> (tempo de tromboplastina parcialmente ativada)
bpm	<i>Beats per minute</i> (batimentos por minuto)
CEUA	Comitê de ética no uso de animais
CI	<i>Confidence interval</i> (intervalo de confiança)
CPK	<i>Creatine phosphokinase</i> (creatina fosfoquinase)
CRP	<i>C-reactive protein</i> (proteína C reativa)
CRT	<i>Capillary refill time</i> (tempo de reenchimento capilar)
d.C.	Depois de Cristo
dL	<i>Deciliter</i> (decilitro)
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonucléico)
DVM	<i>Doctor in veterinary medicine</i> (médico veterinário)
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> (ácido etilenodiaminotetracético)
e.g.	<i>Exempli gratia</i> (por exemplo)
EUA	Estados Unidos da América
FCS	<i>Fetal calf serum</i> (soro fetal bovino)
h	<i>Hours</i> (horas)
Hb	<i>Hemoglobin</i> (hemoglobina)
HE	<i>Hematoxylin-eosin</i> (hematoxilina-eosina)
HR	<i>Heart rate</i> (frequência cardíaca)
Ht	<i>Hematocrit</i> (hematócrito)
g	<i>Gram</i> (grama)
IC <sub>50</sub>	<i>Inhibitory concentration to reduce 50% cell proliferation</i> (concentração inibitória para reduzir 50% da proliferação celular)

<i>i.e.</i>	<i>id est</i> (isto é)
IFA	<i>Immunofluorescence assay</i> (ensaio de imunofluorescência)
IHC	<i>Immunohistochemistry</i> (imunohistoquímica)
Inc.	<i>Incorporation</i>
i.p.	Intraperitoneal
Kg	<i>Kilogram</i> (quilograma)
Km	<i>Kilometer</i> (quilômetro)
L	<i>Liter</i> (litro)
LC <sub>50</sub>	<i>Lethal concentration for 50% cells</i> (concentração letal para 50% das células)
LDH	<i>Lactate dehydrogenase</i> (lactato desidrogenase)
m	<i>Meter</i> (metro)
m <sup>2</sup>	<i>Square meter</i> (metro quadrado)
MCHC	<i>Mean corpuscular hemoglobin concentration</i> (concentração de hemoglobina corpuscular média)
MCV	<i>Mean corpuscular volume</i> (volume corpuscular médio)
MHD	<i>Minimal hemorrhagic dose</i> (dose hemorrágica mínima)
mg	<i>Miligram</i> (miligrama)
mL	<i>Mililiter</i> (mililitro)
mm	<i>Milimeter</i> (milímetro)
nm	<i>Nanometers</i> (nanômetros)
mp	<i>Megapixels</i>
Mr	<i>Mister</i> (senhor)
NSAIDs	<i>Non-steroidal anti-inflammatory drugs</i> (anti-inflamatórios não-esteroidais)
OR	<i>Odds ratio</i> (razão de chance)
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Reação em cadeia da polimerase)
PO	<i>Per oralis</i> (via oral)
PPGBCM	Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular
PT	<i>Prothrombin time</i> (tempo de protrombina)
RBC	<i>Red blood cell</i> (hemácias)
RS	Rio Grande do Sul
RR	<i>Respiratory rate</i> (frequência respiratória)
s	<i>Seconds</i> (segundos)
S	<i>South</i> (Sul)

S.E.M.	<i>Standard error of the mean</i> (média do erro padrão)
SID	<i>Semel in die</i> (uma vez ao dia)
s. str.	<i>Sensu stricto</i>
TM	<i>Trade mark</i> (marca registrada)
TSGP's	<i>Tick salivary glands proteins</i>
U	<i>Units</i> (unidades)
US\$	<i>United States dollars</i> (dólares americanos)
W	<i>Western</i> (oeste)
≈	<i>Approximately equal to</i> (aproximadamente)
°	<i>Degrees</i> (graus)
μ	Micro
%	<i>Percentage</i> (percentual)
±	Mais ou menos

## RESUMO

Carrapatos são artrópodos hematófagos com ampla distribuição mundial, sendo capazes de parasitar quase todos os animais vertebrados terrestres. Estes parasitos causam grandes impactos em saúde pública e na produção animal por serem vetores de diversas doenças infecciosas e, também, pelos distúrbios diretos associados ao parasitismo. O *Ornithodoros brasiliensis*, conhecido popularmente como carrapato mouro, é uma espécie de carrapato somente encontrada no Brasil, e com distribuição restrita à região dos Campos de Cima da Serra no Rio Grande do Sul (RS). Desde os primeiros relatos, *O. brasiliensis* tem sido considerado um potencial risco à saúde pública no RS devido a ocorrência de parasitismo em humanos. Somado a isto, alguns relatos indicam que sua picada é capaz de induzir distúrbios locais e sistêmicos severos nas pessoas e animais parasitados, possivelmente enquadrando-se na definição de toxicose induzida pela picada de carrapatos. Depois de mais de 50 anos sem relatos sobre *O. brasiliensis*, recentemente, novos casos de parasitismo humano e animal foram observados na mesma região onde este carrapato foi originalmente descrito. O objetivo deste trabalho é caracterizar o parasitismo pelo carrapato *O. brasiliensis*, bem como a síndrome tóxica desencadeada nos hospedeiros parasitados. Com esta finalidade, neste trabalho realizamos: (i) um estudo epidemiológico sobre o parasitismo por *O. brasiliensis*, determinando sua prevalência em propriedades situadas nos municípios de São Francisco de Paula e Jaquirana (regiões de ocorrência natural), descrevendo características de seu habitat e determinando possíveis fatores de risco associados à sua ocorrência; (ii) a descrição de casos retrospectivos de parasitismo em humanos e animais domésticos; (iii) a descrição de um caso clínico de toxicose induzida por *O. brasiliensis* em cão naturalmente parasitado; (iv) a caracterização clínico-patológica do parasitismo e da toxicose

experimentalmente induzida pela picada de *O. brasiliensis* em ratos; (v) a caracterização dos efeitos do conteúdo salivar sobre o processo de cicatrização *in vivo* e sobre células endoteliais. Entre as propriedades incluídas na amostragem, em 16,7% foram coletados exemplares de *O. brasiliensis*. *O. brasiliensis* foram encontrados perto das habitações humanas e enterrados no solo em pequenas áreas com grande densidade de parasitos, em uma espécie de “ninho”. A análise dos fatores de risco demonstrou que somente duas das 17 variáveis estudadas (falta de higiene e a presença de porão com chão de terra na propriedade) aumentam a probabilidade de ocorrência deste carrapato. Foram identificadas 28 pessoas e 11 cães previamente parasitados. A partir de relatos foi possível identificar os principais sintomas associados ao parasitismo: prurido, eritema, edema, dor, lesão de lenta cicatrização. Evidências indicam que, além do homem e do cão, *Conepatus chinga* (zorrilho) e *Dasypus hybridus* (tatu-mulita) podem servir de hospedeiros. A síndrome associada à picada do *O. brasiliensis* foi caracterizada em detalhes através do registro do progresso clínico de um cão naturalmente exposto ao carrapato, e em ratos experimentalmente infestados. Os achados decorrentes destas observações são compatíveis entre si e com as descrições dos casos retrospectivos em humanos, e evidenciam a severidade do quadro induzido pela picada de *O. brasiliensis*. Por fim, foi demonstrado que o extrato de glândula salivar de *O. brasiliensis* inibe a cicatrização *in vivo*, possivelmente por inibir a proliferação endotelial e por ser citotóxico. Esta atividade relaciona-se diretamente a uma das características marcantes da picada por *O. brasiliensis*: a indução de uma lesão de lenta cicatrização. O conjunto dos resultados aqui mostrados fornece novos subsídios para a compreensão das peculiaridades evolutivas, de habitat, biológicas e ecológicas do *O. brasiliensis*, bem como dos efeitos desencadeados pelo seu parasitismo.

## ABSTRACT

Ticks are blood-sucking arthropods distributed worldwide and able to parasitize almost all terrestrial vertebrate animals. Ticks are considered a great hazard for both public health and animal breeding due to their ability to transmit infectious diseases and to induce direct toxic effects leading to clinical disturbances. *Ornithodoros brasiliensis*, popularly known as mouro tick, is a specie only found in highlands region of Rio Grande do Sul state, Southern Brazil. Since initial reports, *O. brasiliensis* is considered a potential public health hazard in Rio Grande do Sul state due to the possibility of human parasitism. In addition, few reports indicate that *O. brasiliensis* bite is able to induce severe local and systemic disturbances in humans and animals. This clinical profile possibly fits in the definition of tick toxicosis syndrome. After more than 50 years without reports about *O. brasiliensis*, new cases of human and animal parasitism were recently reported in the same region of its original description. This work aimed to describe the characteristics of *O. brasiliensis* parasitism, as well as the toxicosis observed in bitten hosts. Thus, we performed: (i) an epidemiological study about *O. brasiliensis* parasitism in farms located in the municipalities of São Francisco de Paula and Jaquirana (endemic region) to determine its prevalence and risk factors, and also, to describe the characteristics of its habitat; (ii) an analysis of retrospective cases of human and animal parasitism; (iii) the report of a clinical case of tick toxicosis in a dog naturally parasitized; (iv) a clinico-pathological characterization of the toxicosis induced in experimentally bitten rats; (v) the evaluation of salivary glands effects on skin wound healing. *in vivo* and upon endothelial cells. Specimens of *O. brasiliensis* were collected in 16.7% of sampled farms. Ticks were found near human houses and buried in sand. They were found in a very restricted area and in great density, in a kind of tick “nest”. Risk factor



analysis showed that only two of the 17 studied variables (insufficient sanitary conditions and presence of house basement with sand floor) were significantly associated with an increased probability to find *O. brasiliensis*. Twenty-eight people and eleven bitten dogs were identified by analysis of retrospective cases. This analysis also showed the most common symptoms associated to parasitism (pruritus, erythema, edema, pain and slow healing lesion). Our results indicate that in addition to human and dogs, *Conepatus chinga* (hog-nosed skunk) and *Dasypus hybridus* (long nosed armadillo) may serve as potential hosts. The toxicosis syndrome induced by tick bite was characterized registering the clinical progress of a naturally bitten dog, and in experimentally infested rats. The clinical findings both in the dog and in rats were similar, and also were compatible with the symptoms reported by bitten humans. The set of all clinical findings evinced the clinical severity of this syndrome. Finally, it was shown that salivary gland extract inhibit *in vivo* wound healing, possibly due to inhibition of endothelial cell proliferation and cytotoxicity. This biological activity may explain one of the most common symptoms of *O. brasiliensis* bite: the induction of a slow healing lesion. The set of all results showed here gives new evidences for the understanding of habitat distribution, biology, ecology and peculiarities of *O. brasiliensis*, as well as for the clinical signs induced by its parasitism.

## PRÓLOGO

*“Certa vez, foi (Dom João VI, rei do Brasil e Portugal) picado por um carrapato na fazenda de Santa Cruz, onde passava o verão. O ferimento inflamou...”<sup>1</sup>*

Este interessante ocorrido está documentado nos anais da história brasileira e dele pode se ilustrar a capacidade dos carrapatos em igualarem nobres e plebeus, ou seja, diferentes hospedeiros, não fazendo distinção entre o suposto “sangue azul” e o sangue comum dos hospedeiros tradicionais. Este exemplar de carrapato que picou nosso ilustre D. João VI talvez tenha sido, na história recente da humanidade, um dos poucos carrapatos que teve a “honra” de se alimentar de um monarca (*e ficar registrado na história por isso!*). O relato histórico ainda ressalta que a picada do carrapato não passou despercebida e causou um ferimento sério que inflamou e (como registrado posteriormente) foi motivo de preocupação dos médicos reais. Esse fato nos lembra que por vezes as picadas dos carrapatos podem ocasionar lesões sérias e incômodas à suas vítimas (*assunto este que será tratado nesta tese!*). A sequência do relato, ainda exemplifica outra característica interessante e que continua a ocorrer em nossos dias: como tratar a lesão induzida pela picada do carrapato? Sem saber o que fazer para tratar a lesão que tanto incomodava nosso monarca os médicos da corte *“recomendaram-lhe um banho de mar”<sup>1</sup>*. O que resultou em outro famoso episódio da história do Brasil, onde o D. João *“mandou construir uma caixa de madeira, dentro da qual era mergulhado nas águas da Praia do Caju, nas proximidades do Palácio de São Cristóvão. A caixa era uma banheira portátil com dois varões transversais e furos laterais por onde a água do mar podia entrar. O rei permanecia ali dentro por alguns minutos, com a caixa imersa e*

<sup>1</sup>Trechos extraídos do livro “1808” de Laurentino Gomes (Editora Planeta, 2007).

*sustentada por escravos, para que o iodo marinho ajudasse a cicatrizar a ferida [sic]. Esses mergulhos improvisados na Praia do Caju, a conselho médico, são a única notícia que se tem de um banho de Dom João nos treze anos em que permaneceu no Brasil”<sup>1</sup>*. De todo esse tragicômico episódio se evidencia o risco que os carrapatos podem representar. Ademais serviu para que o nosso ilustre monarca tivesse a oportunidade de tomar banhos nos trópicos. Conta-se ainda que foi devido a este episódio que se popularizou no Brasil o hábito de banhar-se de mar nas praias. Tudo, graças a um carrapato!

Todos esses acontecimentos talvez também tenham motivado a famosa e polêmica declaração da Princesa Carlota Joaquina que certa vez referiu-se ao Brasil “pretensamente” de modo pejorativo como “*um país rico em carrapatos*”. Aqui cabe um questionamento: será que esta definição é, de fato, pejorativa? Creio que não. Antes de tudo é intrigante e estimulante aos pesquisadores e reforça a riqueza de nossa biodiversidade. Se vivemos em uma terra rica em carrapatos, temos sim é muito trabalho a fazer!

Como evidenciado no curioso e engraçado episódio contado acima, os artrópodos constituem indubitavelmente um grupo responsável por grandes impactos na saúde e hábitos da humanidade. É o mais numeroso e provavelmente mais adaptado grupo de animais que habitam a Terra. As diferentes espécies de artrópodos podem ser encontradas em todos os climas conhecidos e em distintos nichos ecológicos. A capacidade de adaptação e diversidade destes animais é evidenciada pela variedade de artrópodos com estratégias de vida bastante diferentes, como, por exemplo, espécies com complexas redes de interação social, ou animais capazes de produzirem secreções venenosas para alimentação ou defesa, ou, ainda, um grupo altamente especializado em viver a partir dos recursos de outros animais, através do fenômeno denominado parasitismo. Entre os

<sup>1</sup>Trechos extraídos do livro “1808” de Laurentino Gomes (Editora Planeta, 2007).

artrópodos parasitos, existe ainda um grupo de animais que desenvolveu como estratégia parasitária o hematofagismo. Esse recurso permite a obtenção de um alimento rico e amplamente encontrado em qualquer ambiente onde haja animais vertebrados.

Os artrópodos hematófagos constituem um grupo bastante heterogêneo, mas, que de maneira geral, apresentam grande importância na saúde pública, podendo causar reações severas à sua picada e sendo importantes vetores de doenças humanas e animais. Entre os hematófagos mais estudados e causadores de problemas sanitários, estão: os mosquitos (família *Culicidae*), como o *Aedes aegypti* (vetor da dengue e da febre amarela) e o *Anopheles* spp. (vetor da malária); os flebotomíneos (subfamília *Phlebotominae*) como a *Lutzomyia* spp. (vetor da leishmaniose); os barbeiros (família *Reduviidae*), *Triatoma* spp. e *Rhodnius* spp. (vetores da tripanossomíase ou Doença de Chagas); e os carrapatos (ordem *Ixodida*), como o *Ixodes scapularis* (vetor da Doença de Lyme), o *Amblyomma cajennense* (vetor da febre maculosa brasileira), o *Rhipicephalus microplus* (vetor do complexo tristeza parasitária bovina), o *Ornithodoros coriaceus* (vetor do aborto epizootico bovino), e o *Ornithodoros moubata* (vetor da febre recorrente africana em humanos e da peste suína africana). Os carrapatos ainda representam um risco potencial maior, por sua capacidade de causar prejuízos ou danos à saúde de seus hospedeiros mesmo sem a veiculação de doenças infecciosas. Estes danos não relacionados à sua capacidade vetorial estão associados diretamente ao parasitismo, seja por grande espoliação de sangue ou por reações induzidas pelos componentes salivares. Os parasitos e doenças supracitados são responsáveis por inúmeras mortes de humanos e animais anualmente, sendo também gastos milhões de dólares em medidas de controle e prevenção. Este impacto torna-se ainda maior em países em desenvolvimento (América Latina, África e Ásia continental), onde a dificuldade de implantação de programas

estratégicos de prevenção, diagnóstico e controle, associada com as condições sanitárias e aspectos climáticos, torna o ambiente ideal para propagação de vetores e de doenças associadas.

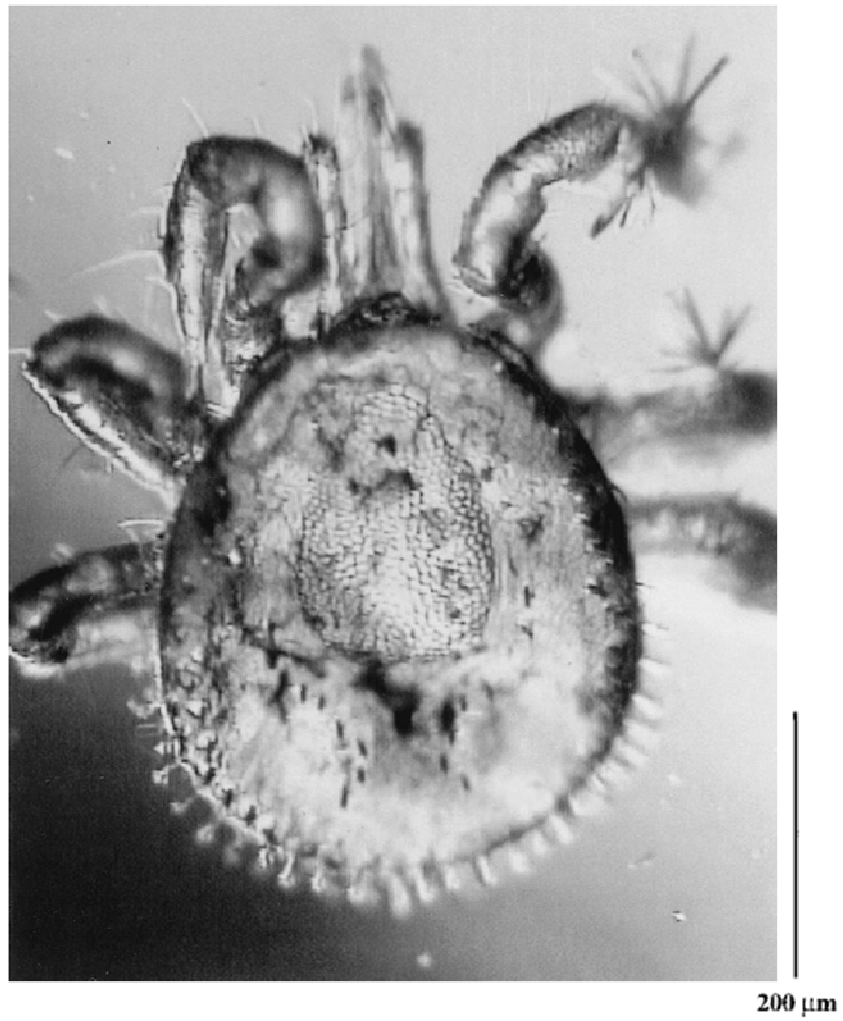
A infestação por parasitos hematófagos, bem como as doenças transmitidas por estes vetores estão entre os principais problemas de saúde pública a serem enfrentados no século XXI (MOORE, 2008). Para a compreensão e controle dos danos associados com vetores artrópodos é necessário que haja um maior entendimento dos fenômenos relacionados a ciclo de vida, biologia, flutuação sazonal e epidemiologia, mecanismos moleculares de parasitismo e capacidade de adaptação a habitats e hospedeiros, o que só pode ser obtido por meio de estudos com equipes e abordagens multidisciplinares (MOORE, 2008). Desse modo, os estudos sobre os artrópodos hematófagos ainda apresentam grandes desafios a serem vencidos pelos pesquisadores.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Carrapatos: características gerais

Os carrapatos são artrópodos hematófagos pertencentes ao subfilo Chelicerata, classe Arachnida (aracnídeos), subclasse Acari (ácaros), superordem (ou *coorte*) Parasitiformes, ordem Ixodida. A ordem Ixodida é dividida em três famílias, Ixodidae, Argasidae e Nuttellidae, contabilizando um total de mais de 800 espécies (CAMICAS et al., 1998).

Os carrapatos estão entre os primeiros aracnídeos que habitaram a terra, sendo seu surgimento estimado há cerca de 300 milhões de anos (MANS & NEITZ, 2004). Os integrantes da subclasse Acari são considerados os mais antigos integrantes do subfilo Chelicerata, que inclui animais como aranhas e escorpiões (KLOMPEN & GRIMALDI, 2001). O mais antigo representante da superordem Parasitiformes já encontrado foi um exemplar de *Carios jerseyi* (Argasidae) impressionantemente bem preservado em âmbar (**Figura 1**), e com data estimada de fossilização em 90-94 milhões de anos atrás (KLOMPEN & GRIMALDI, 2001). As primeiras descrições sobre a ocorrência de carrapatos foram encontradas em uma tumba egípcia (de 1500 a.C.), onde desenhos mostram um animal com parasitos (semelhantes a carrapatos) no pavilhão auricular interno. Em obras clássicas de Homero (800 a.C.), Aristóteles (355 a.C.) e Plínio (77 d.C.), também, são encontradas referências e algumas descrições e comentários sobre carrapatos (PEREIRA, 2009). Em relação ao Brasil, outra obra clássica traz uma das primeiras descrições sobre a presença de carrapatos em nosso país, o Diário da viagem do Beagle. Segundo esta pioneira obra, na manhã de 16 de fevereiro de 1832, o naturalista inglês Charles Darwin desembarcou no Brasil, no rochedo de São Paulo.



**Figura 1** - Exemplar de *Carios jerseyi* preservado em âmbar com data estimada entre 90-94 milhões anos atrás. Fonte: KLOMPEN & GRIMALDI, 2001.

Na isolada área que visitou nesta manhã, Darwin descreveu a presença de alguns insetos e crustáceos e somente de dois tipos de vertebrados (mergulhões e andorinhas-do-mar). Contudo, como o cientista ressaltou, mesmo sendo este ambiente inóspito, sem vegetação e com poucos vertebrados, foi observada a ocorrência de um carrapato, que como concluiu Darwin, possivelmente chegou ao local como parasita das aves (DARWIN, 1839).

Os carrapatos podem apresentar grande variação na capacidade de parasitar diferentes hospedeiros, desde algumas espécies que parasitam um único hospedeiro, até outras que potencialmente podem parasitar qualquer vertebrado. O processo de hematofagia é um fenômeno essencial para a sobrevivência dos carrapatos e compreende sua fase de vida parasitária, sendo que sua duração varia grandemente entre diferentes gêneros e espécies. A fase de vida livre ocorre após a eclosão das larvas e após o término da hematofagia. Algumas espécies realizam o acasalamento sobre o hospedeiro, enquanto outras o fazem no ambiente (BALASHOV, 1972; SONENSHINE, 1991; GUIMARÃES et al., 2001). As diferenças entre hábitos alimentares e ciclo de vida são tão marcantes entre as espécies que se torna difícil a descrição destes hábitos de maneira generalizada e, ao mesmo tempo, detalhada.

A hematofagia depende de um processo de fixação realizado por estruturas altamente especializadas dos carrapatos. O aparato bucal é localizado no gnatossoma, e seus constituintes principais são o hipostômio, as quelíceras e os palpos. O processo de fixação ocorre quando o carrapato posiciona-se em um ângulo aproximado de 45° em relação a pele da vítima, com a base do hipostômio encostando na pele do hospedeiro. Os palpos se abrem fornecendo apoio ao parasito e os afiados dígito distais das quelíceras seccionam a pele e os tecidos subjacentes. Parte das quelíceras e do hipostômio é



introduzida na pele, e inicia-se então a fase de alimentação associada ao processo de salivação, que leva à inoculação de diversas moléculas do parasito. Este processo de hematofagia é diferente daquele realizado por outros hematófagos (como os mosquitos), visto que os carrapatos não “canulam” um vaso sanguíneo e sim laceram pequenos capilares formando uma “poça hemorrágica” na qual mantém suas peças bucais e de onde obtém o alimento. Esta poça de sangue é mantida em estado de fluidez devido à secreção de inúmeras moléculas que interferem nas respostas do hospedeiro. Em geral, as quelíceras e o hipostômio possuem estruturas denteadas que se dispõem no sentido da fixação do carrapato, o que faz com que seja necessária uma tração mecânica intensa para remover o parasito. (LAVOPIERRE, 1964; BALASHOV, 1972; GONZALES et al., 1974; GUIMARÃES et al., 2001).

No que se refere ao seu papel em saúde pública, os carrapatos se destacam pela grande quantidade de doenças que podem transmitir a homens e animais (TELFORD & GOETHERT, 2008). Além disso, possuem significativa importância na produção pecuária pelos imensos prejuízos causados na produção de animais, principalmente na bovinocultura (MARTINS, 2005).

A capacidade dos carrapatos causarem grandes impactos sanitários começou a ser reconhecida com os trabalhos pioneiros de três pesquisadores norte-americanos, Theobald Smith, Frederick Kilbourne e Cooper Curtice. Os trabalhos destes pesquisadores introduziram o conceito de doenças transmitidas por vetores, ou seja, que artrópodos eram capazes de transmitir doenças infecciosas. A consolidação deste conceito foi decorrente da observação que o carrapato *Rhipicephalus microplus* transmitia a febre do gado do Texas (babesiose) e que o controle do vetor poderia reduzir a incidência da doença (SMITH & KILBOURNE, 1893; ASSADIAN & STANEK, 2002).

A partir de então, vários artigos relataram a capacidade dos carrapatos em servirem como vetores de diversos agentes infecciosos. Embora a maior parte das mortes por doenças transmitidas por vetores artrópodos sejam decorrentes da picada de mosquitos (principalmente pelo papel do *Anopheles* spp. na transmissão da malária), nenhum outro vetor é capaz de transmitir uma variedade tão ampla de agentes patológicos como os carrapatos. A competência vetorial dos carrapatos é atestada por sua incomparável capacidade de transmitir diversas espécies de bactérias, riquetsias e protozoários, e uma grande variedade de vírus para diferentes hospedeiros (MARTINS, 2004; TELFORD & GOETHERT, 2008; NUTALL & LABUDA, 2008; PIESMAN & GERN, 2008; LABUDA & NUTALL, 2008), sendo nenhum outro artrópodo tão “eclético” quanto a sua capacidade vetorial.

No Brasil, a principal preocupação com os carrapatos em relação à saúde pública é com a transmissão da febre maculosa brasileira. A febre maculosa brasileira é causada pela bactéria *Rickettsia rickettsii* e é transmitida principalmente pela picada do carrapato *Amblyomma cajennense*. As espécies do gênero *Amblyomma* são comumente encontradas no território brasileiro, e podem parasitar diferentes hospedeiros, inclusive o homem (LABRUNA & PEREIRA, 1998; GUIMARÃES et al., 2001).

No estado do Rio Grande do Sul (RS), a ocorrência de doenças transmitidas por carrapatos em humanos parece ser incomum (Del FIOLE, 2010). Ademais, o carrapato *A. cajennense*, principal representante do gênero no Brasil e também principal responsável por casos de parasitismo humano (e mais importante vetor da febre maculosa) parece ser muito raramente encontrado no RS (EVANS et al., 2000; GUIMARÃES et al., 2001). Soma-se a isso o fato de que no RS o parasitismo humano por carrapatos é raramente relatado. No RS, as espécies *R. microplus* (carrapato bovino) e *R. sanguineus* (carrapato

comum do cão) parecem responder pela quase totalidade de exemplares de carrapatos coletados em áreas urbanas, peridomiciliares e rurais (ARTECHE & LARANJA, 1979; RIBEIRO et al., 1997). Estas espécies são dificilmente associadas ao parasitismo humano e, quando isto ocorre, é classificado como parasitismo acidental/errático, pois os carrapatos não conseguem completar seu ciclo de vida. A ocorrência de espécies de *Amblyomma*, principalmente *A. aureolatum*, no RS é geralmente restrita a animais silvestres, ou esporadicamente a cães em áreas rurais (RIBEIRO et al., 1997; EVANS et al., 2000, MARTINS et al., 2010). Desse modo, existe no RS uma convicção entre entomologistas, profissionais de saúde pública, e pesquisadores que o potencial de ocorrência de parasitismo humano é baixo, não gerando uma casuística suficiente e clinicamente relevante. Essa impressão talvez justifique a pouca ênfase ou ausência de estudos sobre parasitismo humano por carrapatos nos currículos dos cursos de graduação das áreas da saúde, biológicas e veterinárias no Rio Grande do Sul.

Além da transmissão de doenças infecciosas, existem outros problemas decorrentes do parasitismo por carrapatos. Entre eles, podemos citar a espoliação de grandes quantidades de sangue quando o animal é parasitado por muitos carrapatos. Isso pode acarretar em alterações hemodinâmicas desencadeando consequências como diminuição da produção leiteira em vacas de produção e até mesmo causando a morte do hospedeiro (RIEK, 1957; GUIMARÃES et al., 2001; MARTINS, 2005; PEREIRA & LABRUNA, 2009). Nos carrapatos que realizam parasitismo de longa duração (membros da família Ixodidae), a inoculação de componentes salivares no hospedeiro por um longo período de tempo interfere em diversas funções fisiológicas, o que pode desencadear, por exemplo, imunossupressão e alterações no sistema hemostático (INOKUMA et al., 1993; RECK et al., 2009). Além disso, em alguns casos, o parasitismo pode causar desconforto

no local da picada e gerar lesões pruriginosas que facilitam a ocorrência de infecções secundárias e de míases. Entretanto, estas reações parecem ser efeitos adversos do parasitismo, sendo mediadas principalmente por reações do organismo à agressão sofrida. Estas reações adversas tendem a não ser frequentes nos hospedeiros preferenciais e quando não há um desequilíbrio proeminente da relação parasito-hospedeiro e no equilíbrio populacional do parasito (WIKEL, 1996; PEREIRA & LABRUNA, 2009).

Considera-se que os carrapatos (principalmente os de parasitismo de longa duração) evoluíram em uma perspectiva na qual a contenção das respostas dos hospedeiros fornece uma adaptação vantajosa que favorece um parasitismo bem sucedido. Nesse sentido, observamos que, apesar de esporadicamente ocorrerem lesões locais induzidas pela picada, a grande maioria dos carrapatos secreta moléculas que suprimem as várias respostas de defesa do hospedeiro (ANDERSON & VALENZUELA, 2008).

Por outro lado, a picada de algumas espécies de carrapatos (mais comumente aqueles que realizam parasitismo de curta duração) pode desencadear uma série de efeitos deletérios e desagradáveis ao seu hospedeiro que variam desde sintomas locais severos até síndromes sistêmicas e morte. Nesses casos a ocorrência de efeitos deletérios parece ocorrer na maior parte dos hospedeiros, mesmo quando parasitados por somente um exemplar de carrapato. Muito antes de parecerem efeitos adversos de um desequilíbrio ou parasitismo não-adaptado, estes efeitos parecem ser características-chave na evolução do parasitismo. De fato, parece ser muito mais provável que estes efeitos sejam desencadeados diretamente por componentes salivares do que por respostas do hospedeiro ao parasitismo. O conjunto dos efeitos deletérios e nocivos de origem não-infecciosa e diretamente associados à picada de carrapatos recebe o nome de toxicose por

carrapato (MANS et al., 2002; MANS et al., 2004; MANS & NEITZ, 2004; MANS et al., 2008). As síndromes tóxicas associadas à picada de carrapatos serão tratadas em detalhe na seção “Toxicoses causadas por carrapatos” (*item 1.3 desta tese*).

## **1.2. Argasídeos e o gênero *Ornithodoros***

Os carrapatos argasídeos são os integrantes da família Argasidae, e também são conhecidos como *soft-ticks* ou carrapatos moles, pela ausência de escudo dorsal esclerotizado. De acordo com as listas de espécies válidas, a família Argasidae é composta por 193 espécies (GUGLIELMONE et al. 2010). Estas espécies são geralmente agrupadas em cinco gêneros principais *Argas*, *Ornithodoros*, *Otobius*, *Antricola* e *Nothoaspis* (HOOGSTRAAL, 1985). Contudo, ainda existe muita controvérsia na divisão dos gêneros de Argasídeos de modo que, algumas vezes, são considerados também como gêneros *Alectorobius* (GUGLIELMONE et al. 2010) e *Carios* (KLOMPEN & OLIVER, 1993).

A maior parte dos argasídeos é considerada nidícola, ou seja, vivem dentro (*endophilous nidicoles*) ou abrigados próximos (*harborage nidicoles*) do refúgio, toca ou abrigo de seus hospedeiros (sob rochas, entulhos ou em depressões arenosas). Algumas vezes os carrapatos nidícolas podem utilizar habitações humanas como abrigo (SONENSHINE, 1991). Diversos carrapatos nidícolas têm o hábito de viverem enterrados no solo sob finas camadas de areia. De fato, esse hábito rendeu aos integrantes do gênero *Ornithodoros* a denominação de *ground ticks* (carrapatos do chão) (EVANS et al., 2000). Esse tipo de hábito e comportamento de parasitismo é acentuadamente diferente da maior parte dos carrapatos comumente estudados. Os carrapatos nidícolas

vivem em grandes grupos populacionais, numa espécie de ninho, e são atraídos para o hospedeiro quando este retorna ao seu refúgio ou chega próximo do ninho. Isto faz com que os casos de parasitismo sejam frequentemente associados à exposição a um grande número de parasitos. Geralmente, estes carrapatos não apresentam comportamento de busca ativa por hospedeiros que envolva percorrer grandes distâncias. De maneira geral, os carrapatos nidícolas apresentam distribuição e localização geográfica bastante restritas (SONENSHINE, 1991).

Além dos hábitos alimentares e das evidentes diferenças morfológicas entre os argasídeos e os ixodídeos (membros na família Ixodidae), existem marcantes diferenças entre a biologia destas duas famílias. A **tabela I** exemplifica algumas das principais diferenças entre as duas principais famílias de carrapatos. A **figura 2** mostra o aspecto de um representante dos Ixodidae (*R. microplus*) e dos Argasidae (*O. brasiliensis*).

Entre os argasídeos, o gênero *Ornithodoros* é o mais estudado e com maior impacto em saúde pública. O gênero *Ornithodoros* abriga mais de 100 espécies (GUGLIELMONE et al. 2010), sendo que esse número pode variar de acordo com a classificação de gênero seguida. Estes carrapatos geralmente apresentam uma longa expectativa de vida, existindo relatos de espécimes que viveram em condições de laboratório por mais de uma década (SONENSHINE, 1991). São muito conhecidos por

*Quadro comparativo de características de Argasídeos e Ixodídeos*

CARACTERÍSTICA	ARGASIDAE	IXODIDAE
<b>MORFOLOGIA</b>		
Capítulo nos adultos	Sub-terminal (geralmente não visível dorsalmente)	Terminal (visível dorsalmente)
Membros	Inserção ventral ( <i>spidery legs</i> )	Inserção lateral
Superfície corporal	Mamilada (áspera), com cutícula espessa	Lisa, com cutícula fina
Escudo dorsal esclerotizado	Ausente	Presente
Ornamentos	Ausentes	Geralmente presente
Coloração	Geralmente cor de terra	Diversas
<b>ALIMENTAÇÃO</b>		
Duração	Rápida (minutos/horas)	Lenta (dias/semanas)
Cemento	Ausente	Presente
Cutícula	Expande	Expande e cresce
Aumento de peso após ingurgitamento	100-400%	1000-1500%
Nº de alimentações do adulto	Diversas	Geralmente uma
<b>CICLO</b>		
Número de instares ninfais	Diversos (5-6 ínstars)	Poucos (1 a 3 ínstars)
Acasalamento	No ambiente	Geralmente no hospedeiro
Número de ovos	Centenas (100-300)	Milhares (3-30 mil)
Postura	Diversas	Única
Morte pós-postura	Não	Sim
Expectativa de vida	Anos	Dias / meses
<b>OSMORREGULAÇÃO</b>		
Órgão responsável	Glândula coxal	Glândula salivar
<b>HABITAT</b>		
Nidícolas	Geralmente sim	Geralmente não
Localização	Tocas, ninhos, cavernas, casas	Vegetação

*Tabela modificada de Sonenshine, 1991*



1mm



1mm

**Figura 2** - Exemplos de fêmeas de *R. microplus* (ixodídeo, esquerda) e *O. brasiliensis* (argasídeo, direita) (Fotos: José Reck).

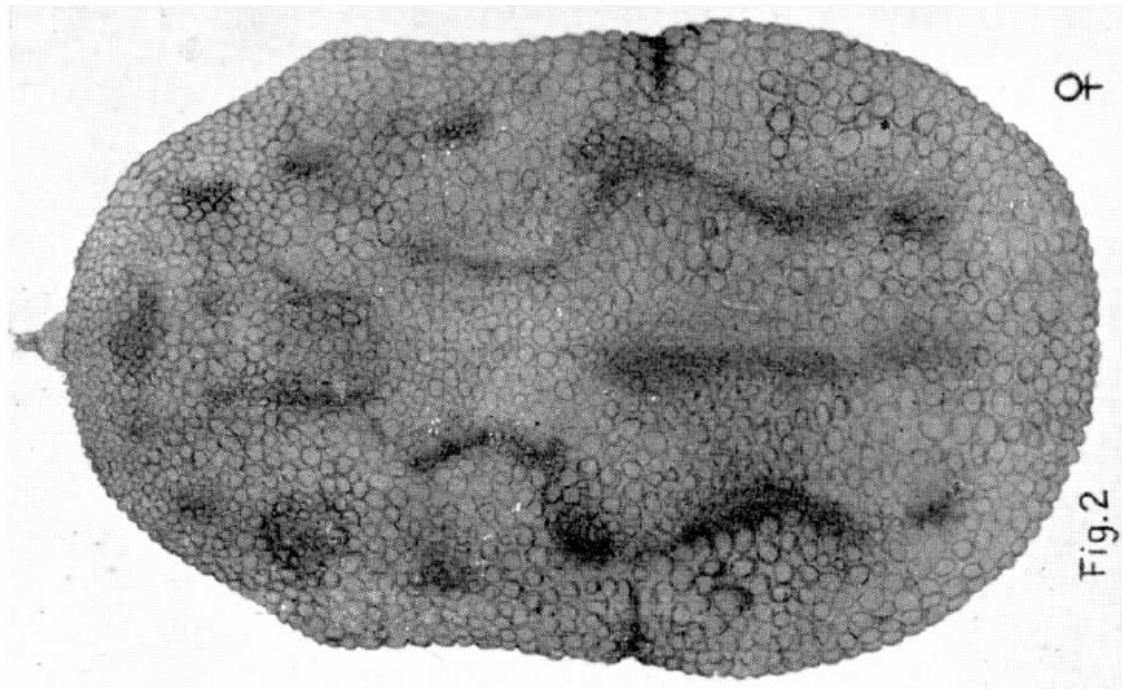


sua picada dolorosa e pela vasta gama de patógenos que podem transmitir aos seus hospedeiros, sendo também referidos como “*relapsing fever ticks*” (carrapatos da febre recorrente) (HOOGSTRAAL & GALLAGHER, 1982; MANS et al., 2004; WALKER et al., 2003).

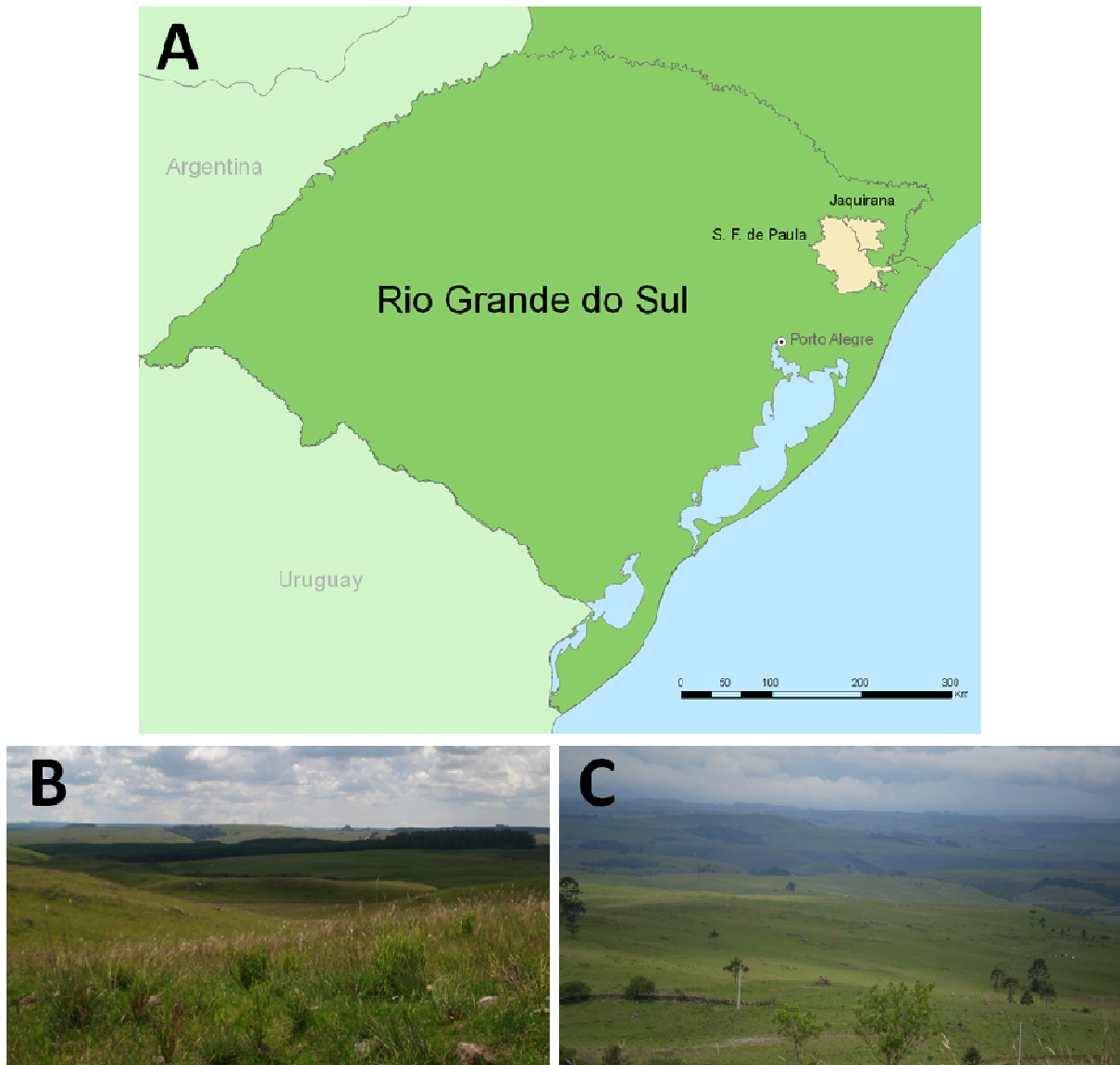
As espécies de *Ornithodoros* mais estudadas são *O. coriaceus*, *O. moubata* e *O. savignyi*. O *O. coriaceus*, também conhecido como *pajaroello tick*, tem grande importância na costa oeste norte-americana por ser vetor do aborto epizoótico bovino. Já o *O. moubata*, representa grande risco no continente africano. Este carrapato tem importância tanto como vetor do vírus da peste suína africana (podendo ser encontrado em grandes quantidades em granjas suínas); como vetor da febre recorrente africana em humanos. *O. savignyi*, conhecido como *sand tampan tick* (algo como “carrapato venenoso das areias”, em tradução livre), também tem destacada importância no continente africano, sendo capaz de causar uma toxicose severa que pode levar a morte dos animais parasitados (CHEN et al., 2007; MANS et al., 2008; RAVAOMANANA et al., 2011).

Na região neotropical, já foram descritas 50 espécies de *Ornithodoros*. No Brasil, já foram relatadas 13 espécies, sendo que a maior parte destas espécies é geralmente enquadrada dentro do gênero *Carios* (DANTAS-TORRES et al., 2009). As quatro espécies de *Ornithodoros* (s. str.) encontradas no Brasil são *O. rostratus*, *O. talaje*, *O. brasiliensis* e *O. nattereri*.

O *Ornithodoros brasiliensis* (**figura 3**) foi descrito em 1923 por Henrique de Beaurepaire Aragão a partir de exemplares coletados no município de São Francisco de Paula (ARAGÃO, 1923), na região dos Campos de Cima da Serra, no RS (**figura 4**).



**Figura 3** - Representação de fêmea adulta de *O. brasiliensis*. Fonte: ARAGÃO, 1931.



**Figura 4** - Região dos Campos de Cima da Serra, Rio Grande do Sul. Painel A, mapa do Rio Grande do Sul, indicando os municípios de São Francisco de Paula e Jaquirana (desenvolvido por José Reck). Painel B e C, aspecto típico de relevo e vegetação dessa região (Fotos: José Reck).

Os exemplares foram coletados por Napoleão de Moura, proeminente cidadão de São Francisco de Paula, e primeiro presidente da associação rural do município. Na localidade onde foi coletado, o *O. brasiliensis* é conhecido como carrapato mouro, bicho mouro ou simplesmente mouro. Informações obtidas com os moradores locais dão conta de que a denominação “mouro” refere-se à coloração característica do *O. brasiliensis*, contrastante com os carrapatos comumente identificados na região (*R. microplus* e *R. sanguineus*). Outras hipóteses levantadas por moradores locais correlacionam a denominação “mouro” a uma corruptela do sobrenome de Napoleão de Moura (RECK & MARTINS, dados não publicados). Como muito bem notado por Evans e colaboradores, algumas publicações estrangeiras tratam, por vezes, o *O. brasiliensis* sob a designação errônea de *dog tick*. Apesar de poder parasitar cães não há motivos para essa denominação, sendo provavelmente decorrente de um erro de tradução da expressão “carrapato do chão” que deve ter sido traduzida como “carrapato do cão” (EVANS et al., 2000).

O *O. brasiliensis* apresenta grande semelhança morfológica com os demais *Ornithodoros* encontrados no Brasil, principalmente com *O. rostratus*. Apesar da semelhança, estes carrapatos são classificados em espécies diferentes, baseando-se principalmente na morfologia dos tarsos, e na localização geográfica restrita de *O. brasiliensis*. Recentemente, trabalhos de análise molecular demonstraram que o *O. brasiliensis* é filogeneticamente distinto dos demais *Ornithodoros* encontrados no Brasil (BARROS-BATTESTI, *in press*).

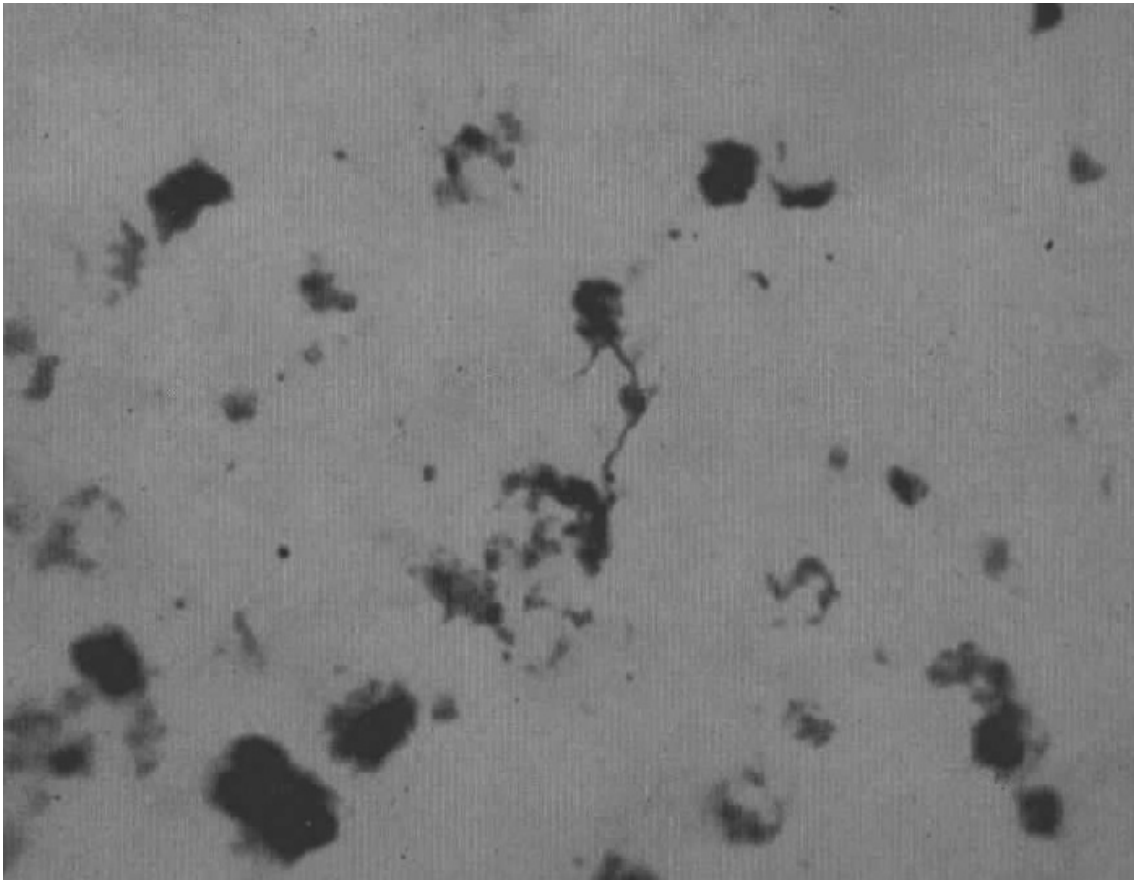
Os primeiros relatos sobre *O. brasiliensis* são descrições morfológicas (ARAGÃO, 1923; 1931). Seguiram-se alguns relatos, principalmente em boletins técnicos, comentando a capacidade do *O. brasiliensis* de desencadear lesões severas nas pessoas e animais picados e discutindo seu potencial como risco à saúde pública no Rio

Grande do Sul (di PRIMIO 1937). Em 1936, Aragão transcreveu relatos locais afirmando que *O. brasiliensis* era um carrapato frequentemente encontrado em habitações rurais de pessoas de baixa renda em São Francisco de Paula, e parasitava pessoas induzindo lesões cutâneas profundas (ARAGÃO, 1936). Além das sérias lesões locais associadas ao parasitismo por *O. brasiliensis* registrou-se também relatos populares afirmando que este carrapato era capaz de induzir distúrbios sistêmicos (PINTO & di PRIMIO, 1931; DAVIS, 1952). Todos os relatos sobre *O. brasiliensis* publicados até hoje dizem respeito a exemplares coletados em São Francisco de Paula. Além da ocorrência em habitações humanas, existem informações que associam a presença de *O. brasiliensis* a refúgios de *Conepatus chinga* (zorrilho) e de *Tayassu tajacu* (porco-do-mato, atualmente extinto na região) (EVANS et al., 2000).

*O. brasiliensis* realiza postura de algumas dezenas de ovos (de tamanho muito maior que os ovos de ixodídeos) aproximadamente duas semanas após o coito. A eclosão dos ovos ocorre duas a três semanas após a postura. As larvas eclodem hexapodas e frequentemente realizam ecdise para ninfas N1 rapidamente (horas após a eclosão) sem se alimentarem (MARTINS, comunicação pessoal). Alternativamente, já registrou-se que as larvas podem realizar a ecdise em um intervalo de até 10 dias (DAVIS, 1952). O *O. brasiliensis* apresenta diversas formas ninfais (entre 5 a 7 estágios) e fazem ecdises alguns dias após alimentarem-se (DAVIS, 1952). De maneira geral, todos os estágios apresentam alimentação rápida, que varia entre 30 a 120 minutos (RECK & MARTINS, dados não publicados). Dependendo do local onde os carrapatos se fixam nos hospedeiros há significativa variação no tempo de alimentação. Carrapatos fixados em áreas ricamente vascularizadas tendem a alimentar-se mais rapidamente que outros fixados em áreas menos vascularizadas ou em extremidades corporais (RECK, dados não

publicados). Os adultos acasalam logo após a alimentação, tão logo encontrem um exemplar do sexo oposto. O tempo de coito dura aproximadamente 40 a 60 minutos e após a cópula é possível identificar as fêmeas fecundadas pela presença de um tampão hialino selando o poro genital. Caso o tampão seja mecanicamente removido, as fêmeas prontamente buscam um novo macho e acasalam novamente (RECK, dados não publicados). Desde as primeiras tentativas de manter o *O. brasiliensis* em laboratório foi verificado que a taxa de mortalidade (principalmente dos estágios ninfais) é bastante elevada e a eclodibilidade dos ovos muito baixa (DAVIS, 1952; MARTINS, comunicação pessoal).

Em 1952, foi identificada a presença de uma espiroqueta no sangue de um camundongo picado por uma ninfa de *O. brasiliensis*. O sangue contaminado foi re-injetado por sucessivas vezes em camundongos e cobaios sendo recuperadas pequenas quantidades de bactérias no esfregaço sanguíneo em dias não-sucessivos até a sétima passagem (**figura 5**). Esta espiroqueta não foi isolada para estudos detalhados, mas com base na distribuição geográfica restrita do *O. brasiliensis* foi proposto que se trataria de uma nova espécie de agente infeccioso transmitido por este carrapato. Esta nova espécie de espiroqueta foi denominada *Borrelia brasiliensis* (DAVIS, 1952). Contudo, até hoje não se obtiveram evidências da circulação de *Borrelia* spp. na região de ocorrência do *O. brasiliensis*. Além disso, a observação de uma espiroqueta transmitida por *O. brasiliensis* ainda não foi confirmada por outros relatos.



**Figura 5** - Esfregaço sanguíneo de camundongo experimentalmente parasitado por *O. brasiliensis*. Neste material foi acusada a presença de microorganismos compatíveis com *Borrelia* spp. Fonte: DAVIS, 1952.

Após o relato de 1952 (DAVIS, 1952), houve um intervalo de mais de 50 anos sem qualquer publicação relatando a coleta de novos exemplares de *O. brasiliensis*. Este longo período sem informações sobre a ocorrência deste parasito suscitou a suspeita de que o *O. brasiliensis* pudesse ter sido extinto (EVANS et al., 2000).

Em 2007, Martins e colaboradores registraram relatos populares de parasitismo humano e animal por *O. brasiliensis* e coletaram exemplares vivos deste carrapato em um sítio em São Francisco de Paula (MARTINS et al., 2011). Nesta ocasião, registrou-se que os moradores locais relatavam casos de parasitismo com lesões locais severas, apresentando dor no local da picada, irritação, edema, eritema e o desenvolvimento de uma lesão de lenta cicatrização (**figura 6**). Além das lesões locais, algumas pessoas vítimas de múltiplas picadas apresentavam mal-estar e febre (MARTINS et al., 2011). O conjunto das reações descritas para *O. brasiliensis* neste último relato e nos artigos anteriores é compatível com o quadro de toxicose induzida por picada de carrapato.

### **1.3. Toxicoses causadas por carrapatos**

Ao contrário de outros quelicerados, como aranhas e escorpiões, que utilizam sistemas especializados e toxinas para defesa e predação, os carrapatos evoluíram para um modo de vida diferente, o parasitismo. A evolução parece ter favorecido seletivamente os artrópodos hematófagos que dispunham de moléculas bioativas secretadas na saliva capazes de bloquear as defesas do hospedeiro. De fato, o papel dos compostos salivares de artrópodos hematófagos na modulação de fenômenos como inflamação, resposta imune, hemostasia é objeto de intenso estudo (para revisões mais detalhadas ver: MANS & NEITZ, 2004; ANDERSON & VALENZUELA, 2008).





**Figura 6** - Lesão cutânea induzida pela picada de *O. brasiliensis* na perna de uma moradora de São Francisco de Paula. Foto tirada 18 dias após a picada. Fonte: MARTINS, 2011.

Esses compostos salivares bioativos parecem interferir em mecanismos fisiológicos de defesa do hospedeiro contra agressão e fazer com que o parasito não seja percebido, o que aumenta a chance de um parasitismo bem sucedido (MARITZ-OLIVIER et al., 2007).

Contudo algumas espécies de carrapatos, além de produzirem diversas substâncias bioativas essenciais para a hematofagia (como anticoagulantes e vasodilatadores) também produzem moléculas que são muito mais adequadamente descritas como toxinas do que como mediadores de supressão da resposta do hospedeiro. Estes carrapatos podem causar uma série de efeitos nocivos diretamente relacionados com a ação de moléculas salivares inoculadas. O conjunto destes efeitos danosos não-infecciosos, diretamente associados à picada dos carrapatos, é designado como toxicose por carrapatos (do inglês, *tick toxicosis*), sendo a paralisia a síndrome tóxica mais estudada e conhecida (MANS et al., 2004; MANS et al., 2008).

As toxicoses por carrapatos geralmente desencadeiam lesões locais, oriundas tanto da ação direta dos componentes salivares (hemorragia e necrose), como em decorrência da reação do hospedeiro aos componentes inoculados (edema, eritema). Os casos de toxicose também podem cursar com manifestações sistêmicas, como mal-estar, prostração, náuseas, cefaléia e dispnéia. Ainda, algumas espécies de carrapatos podem induzir casos de paralisia. A apresentação clínica sistêmica e a paralisia podem evoluir para a morte do hospedeiro (DOLAN & NEWSON, 1980; HOOGSTRAAL & GALLAGHER, 1982; MANS et al., 2004; MANS et al., 2008; DIAZ, 2010; HALL-MENDELIN et al., 2011).

São relativamente poucas as espécies de carrapatos associadas ao desencadeamento de toxicoses (s. str.). Em geral, essas espécies são capazes de provocar

distúrbios aos hospedeiros mesmo quando parasitados por poucos carrapatos ou, em alguns casos, por apenas um único exemplar (CRAWFORD & MITCHELL, 2009). Excetuando-se alguns poucos casos, a maioria dos carrapatos implicados em casos de toxicose são nidícolas.

Contudo, se considerarmos como toxicose todo efeito adverso oriundo do parasitismo, poderíamos ampliar a gama de carrapatos causadores até quase a totalidade de espécies conhecidas, marcadamente quando ocorrem situações de desequilíbrio populacional. Um exemplo disso, pode ser visto com os carrapatos *R. microplus* (nos bovinos) e *R. sanguineus* (nos cães). Quando estas espécies de carrapatos parasitam seus hospedeiros preferenciais, raramente são observados evidentes efeitos nocivos não-infecciosos (não relacionados com sua capacidade vetorial); sendo que o parasitismo passa despercebido na maior parte das vezes. Entretanto, em situações de imunossupressão do hospedeiro ou frente a parasitismo com alta carga parasitária, podem aparecer efeitos danosos associados ao parasitismo, sendo a maior parte deles indiretos (como, por exemplo, apatia oriunda de anemia) (RIEK, 1957; MARTINS, 2005; PEREIRA & LABRUNA, 2009). Nestes casos, o aparecimento destes efeitos tem muito mais relação com o hospedeiro e o ambiente do que com a capacidade destas espécies em produzirem toxinas. Conseqüentemente estas situações não devem ser consideradas casos de toxicose propriamente dita.

Ao longo dos anos tem se discutido muito qual seria a vantagem evolutiva (e se há) de parasitos induzirem uma síndrome tóxica, mesmo quando a carga parasitária é muito baixa e os hospedeiros são saudáveis. Stone e colaboradores (1989) propuseram que a ocorrência de toxicoses poderia ser um vestígio evolutivo da descendência de ancestrais quelicerados predadores e não-parasitas. Apesar de poder ser um resquício

vestigial da evolução, a indução de toxicoses pode ser uma característica importante na bem sucedida adaptação destes animais ao seu estilo de vida.

Também foi levantada a possibilidade de que a indução de toxicoses seria decorrente de um parasitismo errático, em hospedeiros acidentais. Contudo, diversas espécies de carrapatos que causam toxicoses são capazes de induzir a ocorrência desses efeitos nocivos em todas as espécies de hospedeiros testadas. Além disso, alguns carrapatos envolvidos em toxicoses apresentam características bastante específicas de ecologia e habitat (principalmente os nidícolas), que faz com que dificilmente parasitem hospedeiros erráticos (SONENSHINE, 1991; MANS et al, 2008).

Em nossa opinião, a hipótese mais interessante que busca entender a vantagem evolutiva das toxicoses foi proposta por pesquisadores sul-africanos (MANS et al., 2004; MANS et al., 2008). Esta abordagem foi fundamentada tendo como base a suposta vantagem evolutiva da paralisia, principal forma de toxicose causada por carrapatos. A paralisia poderia conferir algumas vantagens para a ocorrência do parasitismo, como (i) diminuição da auto-limpeza (*grooming*), e (ii) redução da mobilidade do hospedeiro. Estes fenômenos reduziriam a chance do carrapato ser removido pelo hospedeiro e também aumentaria a chance de contato parasito-hospedeiro, devido à diminuição da deambulação, visto que a maior parte dos carrapatos que causam toxicoses é nidícola. Além disso, a ocorrência de toxicoses (não somente paralisia) frequentemente cursa com taquipnéia. Isto aumentaria a produção de CO<sub>2</sub> pelo hospedeiro, e conseqüentemente o estímulo semioquímico de atração de novos parasitos (MANS et al., 2004; MANS et al., 2008).

Pensamos que a teoria supracitada também pode ser aplicada aos carrapatos que causam toxicoses não-paralíticas visto que na maior parte dos animais (incluindo o

homem), a indução de lesões severas e de distúrbios sistêmicos aumenta o tempo de repouso (HART, 1988). Conseqüentemente o tempo de permanência do hospedeiro no abrigo, toca ou refúgio é aumentando, favorecendo o contato com o parasito, uma vez que nestes locais os carrapatos nidícolas estão presentes em grande número (SONENSHINE, 1991). Esta hipótese é condizente com um relato popular de toxicose por *O. brasiliensis*. Segundo tal relato, um cão foi picado por alguns carrapatos sob uma das casas de uma propriedade rural, lugar utilizado frequentemente para seu descanso. O cão apresentou lesões e sinais sistêmicos, como apatia e prostração. Com a evolução dos sintomas o animal refugiou-se no local onde habitualmente descansava (e onde fora picado), justamente onde haviam centenas de exemplares de *O. brasiliensis* (futuramente coletados pela nossa equipe). Os proprietários do animal relataram que ele não respondeu aos apelos de sair do local onde se encontrava. Após um período de tempo tentando remover o animal do local sem sucesso, os donos notaram que o cão apresentou uma piora de seu estado geral até morrer sob a casa e próximo do ninho dos carrapatos. Quando removido o animal apresentava inúmeras lesões hemorrágicas de pele (MARTINS & RECK, dados não publicados).

A mais importante forma de toxicose é a paralisia, que tem sido objeto de diversos estudos. Sessenta e nove espécies de carrapatos já foram relacionados com a ocorrência de paralisia. Desses, a maior parte (cerca de 55 espécies) são ixodídeos. Entretanto, diversos relatos carecem de confirmação experimental ou evidências clínicas claras. As formas mais importantes de paralisia estão associadas ao parasitismo pelos carrapatos *Ixodes holocyclus* (na Austrália), *Dermacentor andersoni* e *D. variabilis* (nos EUA), e *R. evertsi* (no continente africano). A paralisia está associada a estágios específicos do desenvolvimento do carrapato. Além disso, a síndrome geralmente ocorre após alguns

dias de parasitismo. O tempo entre a picada e o desenvolvimento dos sintomas pode explicar porque a maior parte dos causadores de paralisia são ixodídeos. De maneira geral, apenas os estágios larvais de alguns argasídeos (que podem se alimentar por vários dias) são relacionados a casos de paralisia (MANS et al., 2008).

Nos EUA, *D. andersoni* é apontado como causador de diversos casos severos de paralisia em humanos, sendo considerado um agente de alto risco em áreas de grande infestação (DIAZ, 2010). Na Austrália, o *I. holocyclus* causa diversos casos de paralisia, principalmente em cães e gatos. A severidade dos casos e a dificuldade de tratamento levaram ao desenvolvimento de um soro hiperimune para o tratamento de animais paralisados por *I. holocyclus* (ATWELL & CAMPBELL, 2001). Em geral, os quadros de paralisia são progressivos e podem evoluir para parada cardiorrespiratória (DIAZ, 2010).

Entre as toxicoses não-paralíticas, diversas formas de apresentação foram descritas para diferentes espécies de carrapatos. Nesse sentido, destacam-se os efeitos causados pela picada de distintas espécies de carrapatos do gênero *Ornithodoros*, que são responsáveis por indução de lesões cutâneas severas e algumas vezes sistêmicas em diferentes hospedeiros (HERMS, 1916; HOOGSTRAAL & GALLAGHER, 1982; MANS & NEITZ, 2005; VENZAL et al., 2007). As toxicoses não-paralíticas mais estudadas e de maior impacto na saúde dos hospedeiros parecem ser as causadas pelos carrapatos *O. savignyi* e *Hyalomma truncatum* (DOLAN & NEWSON, 1980; MANS et al., 2008).

*O. savignyi* é o agente causador de uma síndrome severa e algumas vezes letal conhecida como *sand tampan toxicosis*. *O. savignyi* causa uma toxicose sistêmica, caracterizada por dispnéia e colapso, além de uma severa reação local à picada. Relatos indicam que a síndrome sistêmica e morte atingem diversas espécies de mamíferos,

incluindo animais de grande porte como bovinos. Ressalta-se aqui que o quadro clínico não relaciona-se com qualquer agente infeccioso (MANS et al., 2008). *O. savignyi* é único carrapato causador de toxicose que teve suas toxinas estudadas detalhadamente. Mans e colaboradores (MANS et al., 2002; MANS & NEITZ, 2005) estudaram a composição molecular da saliva de *O. savignyi*, bem como o mecanismo de ação de suas toxinas. Estes autores relatam que uma família de proteínas (TSGP's), com alto grau de similaridade com lipocalinas, seriam as principais toxinas de *O. savignyi*. Além dos efeitos locais da saliva, no sítio de fixação do carrapato, as toxinas de *O. savignyi* teriam ação cardiotoxica direta, o que acarretaria em um comprometimento sistêmico do hospedeiro (MANS et al., 2002).

*H. truncatum* é o agente causal da *sweating sickness* no continente africano. Esta síndrome, mais frequentemente relatada até a década de 80, acomete bovinos e é causada por exemplares adultos de *H. truncatum*, tendo sido associada à mortalidade em terneiros. Os sinais clínicos da doença são hiperemia de mucosas; grande quantidade de densas descargas oro-nasais; sialorréia; anorexia; edema de lábios, períneo e tecidos periorculares; e dermatite eczematosa das orelhas, pescoço, axilas e região inguinal. O aspecto do animal, com a pele umedecida pelas lesões e com suor em decorrência, provavelmente, do desconforto causado pelo seu estado geral e febre dá o nome à síndrome. Além desses sinais, podem ocorrer diversas outras alterações sistêmicas e de parâmetros sanguíneos. Existem diferentes formas de apresentação da toxicose por *H. truncatum*, que podem variar desde sinais transitórios leves até o comprometimento de órgãos e morte do animal (DOLAN & NEWSON, 1980).

No Brasil, apesar do vasto território e da grande fauna de carrapatos, parecem ser raras as descrições de toxicoses associadas a carrapatos. Uma citação de caso de paralisia

decorrente de parasitismo pelo raro (e controverso em relação à taxonomia) *Haemaphysalis cinnabarina* foi registrada (MANS et al., 2008). Contudo, não encontramos material disponível na literatura que sustente esta afirmação.

O primeiro relato de paralisia por carrapatos no Brasil foi realizado em 1983. Este trabalho descreve um tipo de paralisia ascendente progressiva que se inicia nos membros inferiores de bovinos, ovinos e caprinos parasitados *Amblyomma cajennense* (SERRA-FREIRE, 1983). Embora o *A. cajennense* seja um dos carrapatos mais comuns e estudados do Brasil, não existe nenhum outro relato de paralisia associada a sua picada. Em 1987, Magalhães e colaboradores relataram a capacidade de estágios imaturos de *Argas miniatus* de induzir paralisia em aves (MAGALHÃES et al., 1987). Além desses relatos, recentemente, pesquisadores brasileiros iniciaram a caracterização da síndrome paralítica associada ao carrapato *Ixodes schulzei* em animais de laboratório (SOARES & LABRUNA, comunicação pessoal).

Relatos referentes a toxicoses não-paralíticas também parecem raros no Brasil. Nos últimos anos, pesquisadores brasileiros têm gerado informações importantes sobre a biologia e casos de parasitismo por *O. rostratus* e tem mostrado que estes carrapatos são capazes de induzir lesões e quadros semelhantes aos produzidos por *O. brasiliensis* (CANÇADO, 2008), enquadrando-se também na definição de toxicose causada por carrapatos.



## 2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho é caracterizar o parasitismo pelo carrapato *Ornithodoros brasiliensis*, bem como o a síndrome tóxica desencadeada nos hospedeiros parasitados. Nesse sentido, os objetivos específicos consistem em:

- Realizar a caracterização epidemiológica do parasitismo por *O. brasiliensis*, determinando sua prevalência em São Francisco de Paula e Jaquirana (regiões de ocorrência natural), descrevendo características de seu habitat e determinando os fatores de risco associados à sua ocorrência.
- Descrever casos retrospectivos de parasitismo por *O. brasiliensis* em humanos e animais domésticos.
- Descrever um caso clínico de toxicose induzida por *O. brasiliensis* em cão naturalmente parasitado.
- Realizar a caracterização clínico-patológica da toxicose induzida experimentalmente pela picada de *O. brasiliensis* em ratos.
- Investigar os efeitos do conteúdo salivar de *O. brasiliensis* sobre o processo de cicatrização *in vivo* e sobre células endoteliais.

### **3. PARTE EXPERIMENTAL & RESULTADOS**

Esta seção está organizada em quatro capítulos que compreendem a descrição do trabalho experimental da tese desenvolvido durante o período de execução do doutorado. Os resultados estão apresentados na forma de manuscritos preparados de acordo com normas de revistas científicas internacionais. Segundo as orientações vigentes do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM), quando da inclusão de manuscrito aceito para publicação em periódicos científicos na tese, os resultados obtidos no doutorado podem ser apresentados sob a forma de capítulos que compreendam manuscritos submetidos ou a serem submetidos para publicação.

### **3.1. Capítulo I**

#### **Epidemiology of *Ornithodoros brasiliensis* (mouro tick) in Southern Brazil highlands: prevalence, risk factors and analysis of retrospective human/animal cases of tick toxicosis**

Manuscrito a ser submetido para periódico científico internacional.

Neste capítulo, descreve-se o estudo epidemiológico sobre o carrapato *O. brasiliensis* nos municípios de São Francisco de Paula e Jaquirana, ambos localizados na região dos Campos de Cima da Serra do Rio Grande do Sul. Este trabalho apresenta análise da prevalência do carrapato nesta região, as características de seu habitat, a análise de fatores de risco associados à sua presença e um levantamento de casos retrospectivos de parasitismo em humanos e animais.

**Epidemiology of *Ornithodoros brasiliensis* (mouro tick) in Southern Brazil  
highlands: prevalence, risk factors and analysis of retrospective human/animal cases  
of tick toxicosis**

Reck *et al.*

Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS),

Porto Alegre, RS, Brasil.

Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF), Eldorado do Sul, RS,

Brasil.

## ABSTRACT

*Ornithodoros brasiliensis*, also known as “mouro” tick, is an argasid tick only found in Southern Brazil highlands. *O. brasiliensis* parasitism has been frequently associated to severe symptoms directly induced by its bite, a condition compatible to the definition of tick toxicosis. The aims of this work are (i) to determine the prevalence of *O. brasiliensis* in farms located in the tick endemic region; (ii) to describe the characteristics of *O. brasiliensis* habitats; (iii) to analyze if there are risk factors associated to *O. brasiliensis* presence; and (iii) to describe retrospective cases of human and animal parasitism by *O. brasiliensis*. From 30 visited farms, five were positive for *O. brasiliensis* presence (prevalence 16.7%), allowing the collection of several ticks found in great density buried in sand. Information about tick habitats and about local population was recorded. Our results indicated that *O. brasiliensis* feeds in humans, dogs, armadillos (*Dasypus hybridus*) and possibly in skunks (*Conepatus chinga*). Analysis of risk factors associated with *O. brasiliensis* occurrence indicated that the presence of house basement (with floor of sand) in farms and insufficient sanitary conditions significantly enhances the probability to find *O. brasiliensis*. Also, we describe retrospective cases of tick parasitism in 28 humans and in 11 dogs, recording the most common symptoms, which are compatible with a non-infectious tick toxicosis syndrome. This is the first study concerning *O. brasiliensis* epidemiology, distribution and habitat, and also, it is the most comprehensive characterization of bite-associate toxicosis syndrome clinical findings.

**Key-words:** argasidae tick, epidemiology, risk factor, human parasitism, toxicosis

## INTRODUCTION

Ticks are obligate blood-feeding arthropods distributed worldwide. Ticks can be found parasitizing almost all terrestrial vertebrate animals. In several regions, the noxious effects of tick feeding and related tick-borne diseases placed these parasites as a serious hazard both to human health and animal breeding (Jongejan & Uilenberg, 2004).

There are hundreds of tick species, divided into three families, Ixodidae, Nuttalliellidae and Argasidae. Argasidae ticks, also called soft-ticks because the lack of sclerotized dorsal plate, are generally divided in four genera: *Argas*, *Carios*, *Ornithodoros* and *Otobius* (Horak et al., 2002). *Ornithodoros* are nidicolous ticks, i.e., they live in a high-density population near or inside the host burrow. Ticks belonging to the *Ornithodoros* genus are well known for its large competence as disease-vectors transmitting several diseases, particularly relapsing fever and viruses (Sonenshine, 1991). Another noteworthy characteristic of *Ornithodoros* ticks is the ability to induce severe injuries directly associated to its bite. This kind of non-infectious injuries directly associated to tick bite is commonly designed as tick toxicosis, which may range from mild local effects (e.g. pain and pruritus) to death (Mans et al., 2004).

*Ornithodoros brasiliensis*, locally known as “mouro” tick, is an argasid first described in 1923 after the collection of few specimens in São Francisco de Paula municipality, in Southern Brazil highlands (Aragão, 1923). It is important to note that, until now, this tick was only found in this region. Since early reports, *O. brasiliensis* parasitism has been frequently associated (based on anecdotal information) to immediate severe reactions to its bite (Pinto and di Primio, 1931; Aragão, 1936; di Primio, 1937), a clinical profile compatible with the definition of a tick toxicosis syndrome. Later, it was demonstrated that in addition to a toxicosis syndrome, *O. brasiliensis* may be related to

pathogen transmission; since a potential tick-borne microorganism (*Borrelia brasiliensis*) was once associated with *O. brasiliensis* under laboratory conditions (Davis 1952).

After more than 50 years without any reports on *O. brasiliensis*, its extinction was a great suspicion. Nevertheless, in 2007, a few tick specimens were collected in São Francisco de Paula, Southern Brazil, and cases of human parasitism were noticed by population and local veterinary authorities (Martins et al., 2011). In addition, we recently described a case report showing detailed clinical findings of a tick toxicosis syndrome in a dog bitten by *O. brasiliensis* in São Francisco de Paula (Reck et al., *in press*).

In spite of *O. brasiliensis* tick was first identified several decades ago there is no information concerning its ecology, habitat, distribution in its endemic region, and the factors that can be associated to its presence. Also, there is a lack of reports concerning detailed characteristics of *O. brasiliensis* toxicosis syndrome. Surprisingly, there are no retrospective analysis of clinical case series or even a single case report associated with human parasitism. It contrasts with the amount of anecdotal information of human cases of parasitism, including some with severe clinical findings (Pinto and di Primio, 1931; di Primio, 1937; Aragão, 1936; Davis, 1952).

In this sense, considering the recent re-emergency of *O. brasiliensis* parasitism in Southern Brazil and the lack of knowledge about its ecology; an epidemiological study become peremptory to describe the characteristics of this potential health issue. Thus, this work aims to (i) determine the prevalence of *O. brasiliensis* in farms located in the tick endemic region; (ii) describe the characteristics of its habitat; (iii) analyze if there are risk factors associated with the tick occurrence; and (iii) relate retrospective cases of human and animal parasitism.

## MATERIALS AND METHODS

### Study area and sampling

The study was carried out in a region that includes the neighbor localities/villages of Vargem do Cedro and Faxinal dos Pelúcius, located in the municipalities of São Francisco de Paula and Jaquirana (former district of São Francisco de Paula), respectively, state of Rio Grande do Sul, Brazil. This region belongs to Southern Brazil highlands region, with an average elevation of 920 m, annual temperature ranging from -8 to 36 °C, and average precipitation  $\approx$ 1500 mm per year. Southern Brazil highlands region was chosen to be studied because it is the only region in the world where *O. brasiliensis* were already described. Considering all literature about *O. brasiliensis*, since first description (Aragão, 1923) to latest reports (Martins et al., 2011; Reck et al, *in press*), all specimens found until now, were collected within the study area proposed by this work. According to the local authorities, in this area there are 180 farms.

The farms within the study area were submitted to a sampling procedure, in order to allow the collection of significant information about *O. brasiliensis* prevalence and retrospective human and animal cases. The sampling procedure was done by hypergeometric-based sampling. This sampling approach is indicated for small size population and also for rare individuals (Venette et al., 2002). Since there are no previous reports determining *O. brasiliensis* prevalence in any environment, the hypothetical value of 10% prevalence obtained by anecdotal information of local veterinary office was utilized for sampling calculation. Thus, considering 180 farms as target study (N), 10% of expected prevalence (p) and absolute precision (E), and 95% confidence level (z), the calculated sample size (n) was 30 farms. The sampling calculation was determined by the



following equation:  $n = N \cdot z^2 \cdot p \cdot q / (E^2 \cdot (N-1) + z^2 \cdot p \cdot q)$ . The q value was 1-p. The farm selection was done by random procedures.

### **Information collection and questionnaires**

Technical visits were performed in the 30 selected farms during spring-summer of 2009/2010, in association with local veterinary authorities. In these visits people were submitted to an interview/questionnaire in order to collect information (i) about basic characteristics of target area and its population; (ii) to analyze if there are risk factors associated to *O. brasiliensis* presence; (iii) and to describe retrospective cases of human and animal parasitism. The analyses of retrospective cases was performed collecting information of all previous human/animal cases that questionnaire respondent have direct contact. To be considered direct contact it was necessary that the respondent witnessed the tick bite and the clinical progression for, at least, the next six hours. For animal retrospective cases only histories reported by the animal owner were considered. To be considered as a retrospective case in this study, the respondent must give full identification of the bitten person/animal, in order to avoid the same case report by different respondents. To give more reliability to respondent's retrospective histories and to verify if they had actually seen an *O. brasiliensis*, an adult specimen was shown to the respondents before the interview and they were asked to identify the animal. All respondents that state that have seen mouro tick before and correctly identified the specimen showed as "mouro tick" were included in the study. Between the people who never saw mouro tick before, only one person identify the specimen as "mouro tick", and the rest were not able to identify the specimen at all. The reason of visit was previous exposed to people by local authorities and all inhabitants orally agreed to answer the

questionnaire and give information to this study. The interview/questionnaire was always performed by the same person, a trained DVM (J.R.) and, preferentially, directed to the farm owner. A general view of the interview/questionnaire is shown in the Table 1.

### **Active tick search**

In addition to interview/questionnaire, an active tick search was conducted in the selected farms to determine if the properties are positive or negative to *O. brasiliensis* presence. The tick search was done by careful examination and sifting of sand from house floor, sheds, storehouse, hen house, domestic animals shelter, and house basements. All areas with sand were inspected, since this tick lives preferentially buried in sand (Martins et al., 2011; Reck et al., *in press*). Domestic animals were also inspected. All tick searches were done during the period of day-light and with non-rainy conditions. The tick search was always conducted by the same investigators, two DVM (J.R. and J.R.M) and a member of the local technical staff (A.V.S.), all of them with previous experience in tick ecology.

### **Statistical analysis**

A logistic regression was performed to evaluate the relationship between *O. brasiliensis* presence and the following variables (potential risk factors): farm size, insufficient sanitary conditions, respondent education level, monthly family income, presence of domestic animals (dogs, cats, chicken, swine, bovine, horses), veterinary assistance, presence of other tick species in the farm, presence of basement-like structure with sand floor, presence of shed/storehouse with sand floor, presence of hen house, pest control procedures, and if the people had ever heard about mouro tick. These variables

were adjusted to be expressed as categorical (farm size, education level, family income) or dichotomic (all other variables). Logistic regression and odds ratio determination were performed using SISA–Tables Quantitative Skills software (Simple Interactive Statistical Analysis - SISA, Hilversum, The Netherlands, available on-line at [www.quantitativeskills.com/downloads](http://www.quantitativeskills.com/downloads)). Statistical significance of the relationship between *O. brasiliensis* presence and the variables cited above was verified using Fisher's exact test, as recommended for analysis of variables with low absolute frequency (< 5). A *p* value less than 0.05 was considered statistically relevant.

## RESULTS

### Characterization of target area/population

The interview/questionnaire allowed the characterization of target area/population. The mainly characteristics of the target area/population collected by interview/questionnaire are summarized in **Table 2**.

### Active tick search

By active tick search we have identified *O. brasiliensis* specimens in 5 (farms 1, 6, 10, 12, 28) of 30 sampled farms. This number yielded an estimated prevalence of 16.7% (ratio of positives and total sampled farms), with a calculated prevalence at 95% confidence interval between 4.5 and 28.9% (**Table 3**). The localization of visited farms is shown in **Figure 1**, with indication of positive farms.

In all farms, *O. brasiliensis* specimens were identified in just one site. In four farms (farm 1, 10, 12, and 28) the ticks were collected in the sand, under the floor of the inhabitant's wood-house, a kind of basement-like structure, used to store firewood, tools

and to discard unutilized objects (**Figure 2A-C**). Frequently, these places were also visited by domestic animals (dogs and chickens). In the studied region, these basement-like structures were very common in the past. The height of these basement-like structures (from sand floor to wood-house floor) ranges from  $\approx 20$  cm (farm 12) to 70 cm (farm 1). In another farm (farm 6) ticks were collected in sand of a shed/storehouse (**Figure 2D**), used to store wood and farm tools. In this farm, the ticks were found next to the burrow of a hog-nosed skunk (*Conepatus chinga*), locally known as “zorrilho” (**Figure 2E**). In this place it was also found cracked eggs, feathers from unidentified species, fruits, seeds, and animal feces. The skunk escaped immediately after its visualization, being its capture to evaluate tick infestation impossible.

The active tick search allowed the collection of 462 ticks (all nymph stages and adults) and several eggs in farm 1; 221 ticks (all nymph stages and adults) and several eggs in farm 6; 64 ticks (most adults) in farm 10; 81 ticks (most adults) in farm 12; and 47 ticks (some nymphs and several adults) and  $\approx 10$  eggs in farm 28. Several ticks found in farms 6 and 12 seem partially to fully engorged, indicating that these ticks fed recently.

The ticks were found in a very restricted area and in a great density, i.e., a high number of individuals in a small area inside positive farms. This description is consistent with the “tick nest” concept (**Figure 2G-H**). Usually they were found buried in sand (5-40 mm deep). The “tick nests” have an area  $\approx 0.3$  m<sup>2</sup>. In all nests were found feathers and unidentified animal hair. Near to tick nest ( $\approx 40$  cm) identified in farm 1, a dead rat was found.

After the end of data collection we revisited an *O. brasiliensis* positive farm (farm 1). This farm was visited again because we received the information that the family who lived there moved out two months earlier. The house and all farm constructions were

demolished and the debris was removed. Also, all domestic animals were removed from farm. We searched for *O. brasiliensis* in the sand, and we were able to find ticks once more in this area. At this time, we collected 109 ticks (some nymphs and several adults) buried in the sand under a rock (**Figure 2F**). A few ticks found at this time seem partially engorged.

In our visits we observed just once a behavior compatible with a host-presence response. During the active tick search, when we were sifting the sand, a few ticks came our way and was only noticed when already above the shoe of a team member (**Figure 2I**).

### **Analysis of risk factors**

Seventeen variables were analyzed to evaluate their potential relationship with *O. brasiliensis* presence. From these variables, two were significantly associated with *O. brasiliensis* presence, being considered risk factors: insufficient sanitary conditions and presence of house basement (with floor of sand) (**Table 4**). There was no relationship among variables studied, being all of them independent from each other. Despite the two variables significantly associated with *O. brasiliensis* presence not showing interdependence (estimated correlation value = 0.02), they concomitantly occurred in 80% of the positive farms for *O. brasiliensis*. In this sense, a new logistic regression was performed considering both insufficient sanitary conditions and the presence of house basement as a single variable; and its relationship with *O. brasiliensis* presence was determined. Thus, in farms where these characteristics occur concomitantly there is a great increase in the probability of *O. brasiliensis* occurrence (OR = 56; 95% CI: 2.82 – 1,109.43;  $P = 0.004$ ) in comparison with farms where both characteristics were absent.

### **Retrospective human cases**

The interviews/questionnaires allowed the identification of 28 human retrospective cases. From these 28 people, 16 were bitten in the last four years; six between 4 and 10 years ago; and other 6 more than 10 years ago (**Table 5**). The main clinical findings were pruritus, development of a slow healing lesion at the tick bite site, edema, erythema, focal skin rash. Local pain, induction of blisters, limb edema, malaise, and headaches was also frequently reported. In few cases, victims also described transient fever and dyspnea. All reported symptoms and their relative frequency are summarized in **Table 6**.

Usually tick bites occurred in feet, legs and, in some cases, in abdomen. In general, people were bitten when (i) walked without shoes inside the farm; and/or (ii) went to storage places, like sheds or basements with floor of sand. In few cases people were bitten when were resting (seated on the floor) around the house. Three cases were in persons sleeping on the floor inside storehouses. These people awaked because they felt discomfort and itching at the tick bite site and saw the tick attached to their skin.

According to victim's reports, people did not immediately note the tick bite. They noticed that some minutes after tick attachment an intense itching sensation, and a local pain (ranging to mild to severe) begins. Usually at this time, the victim removes the tick. Some people reported a great difficulty to remove ticks attached to the skin, particularly the small ones.

Usually, the tick bite causes discomfort for a long period. Reported symptoms usually range from three days to four weeks after bite. The local symptoms are severe and more frequently than systemic disturbances. Typically, the tick bite induces a severe local

lesion (**Figure 3A-B**). Edema, erythema, skin rash and local pain usually last for 1 to 4 days. Malaise and headache are frequent in first three days after tick bite and then cease. Dyspnea was only registered in 2 persons, and occurred within 48 hours after tick bite. Transient fever can occur at an early period (e.g.: 1-2 days after tick bite), and also in a late period (more than a week after tick bite). Blistering, when present, appears usually a couple of days after tick bite, and can last for two weeks. Limb edema can last for 5-7 days. The lesion at tick attachment site usually ( $\approx$  90% cases) progress to development of a slow healing wound. In few cases, this injury can last for more than 90 days. This persistent lesion can remain producing exudates. While this lesion remains, most part of bitten people showed pruritus. However, pruritus appears to be more noticeable at first three days after tick bite.

From the 28 bitten people, 10 sought medical assistance, and 4 persons were admitted for hospital treatment. Bitten people reported that medical professionals (physicians and nurses) usually have not heard about mouro tick, or neither known about any tick specie able to parasitize humans in Southern Brazil. One bitten people reported that the physician who attend him (a week after tick bite) said that the patient “probably imagined the ticks” (sic). According to the bitten people, the medical treatments were directed to “insect” allergy and to wound management, by local assepsy. Few bitten people also received antimicrobial drugs to prevent a potential infection.

In some cases bitten people did not sought for medical assistance or quit the prescribed treatment and began homemade popular treatments. Some of these non-medical treatments were to drink a local tea and infusions of popular medicine plants, topical application of vinegar or alcohol, or garlic plaster. A great part of bitten people also used human commercial drugs without medical prescription; being the most common

employed drugs, metamizole (dipyrone), acetaminophen (paracetamol), and promethazine. One bitten person reported the use of kerosene to detach ticks from his skin.

### **Retrospective animal cases**

The investigation of retrospective animal cases allowed the identification of 11 cases of *O. brasiliensis* parasitism in dogs over the last four years. The main clinical findings were apathy, skin rash, petechiae, fever and tachy/dyspnea, as reported by dog owners (**Table 7**). None of the owners actually checked the dog's body temperature; however two of them noticed fever, and according to them, the fever was observed since the dogs showed the "classical dog fever appearance" (sic). Thus, fever was included in the symptom list.

From these 11 bitten dogs, 3 dogs died within three weeks of tick bites without another apparent cause. Owners usually collected the ticks attached to dog paws and limbs, abdomen, and ears. All ticks observed in dogs were approximately bigger than 8-10 mm, suggesting they were adult specimens.

The most part of the dogs did not receive veterinary assistance (10/11). They were usually not treated by the owners, even when they showed severe symptoms, as dyspnea. In a few cases, animals were treated by the owners without veterinary support. Some examples of these treatments were bath with cattle-formulation deltamethrin (Butox<sup>TM</sup>, Coopers Saúde Animal, Cotia, Brazil), bath with used car motor oil, and daily milk administration (p.o.) for a week.

Just one dog received veterinary medical support, being treated with non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and anti-histaminics. Also, it was removed from the



infested place. This animal initially showed marked skin rash, apathy, fever, and several blood tests parameters altered. It presented a complete recovery three weeks after the beginning of the treatment. Details of this case were presented elsewhere (Reck et al., *in press*).

An inhabitant of one farm also reported an animal retrospective case of parasitism which did not occurred in a dog. This farmer reported that he and his family captured a long-nosed armadillo (*Dasypus hybridus*), locally known as “tatu-mulita”, that had 8 mouro ticks attached to its paws. The armadillo was captured within the farm, in a basement-like structure, under the floor of the inhabitant’s wood-house. The farmer noticed that the armadillo seemed normal, except for reddish spots at the sites of tick attachment.

## **DISCUSSION**

Human parasitism by ticks is a reason of concern in several places mainly due to the possibility of infectious pathogens transmission (Luz et al., 2010). Thus, a great part of epidemiological data related to human parasitism by ticks is from reports on serological or molecular detection of tick-borne pathogens (Arnez & Avsic-Zupanc, 2009; Salinas et al., 2010). Nevertheless, tick bite can directly cause severe impact on human health, which can be easily demonstrated by several reports concerning human cases of tick paralysis (Diaz, 2010; Hall-Mendelin et al., 2011), a kind of tick toxicosis. In spite of the serious noxious effects some ticks cause to humans, works concerning epidemiological characteristics and clinical findings of human parasitism by ticks are not so common as the ones on tick-borne infectious diseases. In this work, we conducted an epidemiological characterization of *O. brasiliensis* parasitism, determining its prevalence

in an endemic region and potential risk factor associated to its occurrence. Also, here we describe clinical characteristics of human and animal retrospective cases of parasitism by *O. brasiliensis*.

The area of *O. brasiliensis* occurrence is characterized as a rural area near to town ( $\approx$  30-50 Km). The majority of properties are small-middle sized farms, and almost all labour in these farms is done by family members. The income of the inhabitants of this region is mainly related to vegetables garden plantation and cattle breeding. Most part of the local population has a monetary income less than five minimal Brazilian national salary, *i.e.*, approximately less than US\$ 1,600 monthly. Considering the average number of inhabitants per farm (3 people), the income was not high. More than 50% of the interviewed people went only four or less years to school, indicating a low education level. At least, a third of visited farms showed insufficient sanitary conditions. Surprisingly, there was no clear evidence relating monetary income or education level with sanitary conditions. Indeed, we visited farms from very poor people in better sanitary conditions than some farms from families with a much higher income.

Domestic animals were present in all farms, and wild animals were frequently visualized in all visited places. Contrastingly, in spite of the presence of domestic animals in all farms, just 11 from 30 properties have access to veterinary assistance. The occurrence of other ticks was reported in 24 from 30 farms. Other ticks were identified by respondents as the “cattle tick” *Rhipicephalus microplus* and the “common dog tick” *R. sanguineus*, the two most abundant ticks in Rio Grande do Sul state (Arteche & Laranja, 1979; Ribeiro et al., 1997). Pest control was done in 60% of the visited farms, being the most common procedure the use of acaricide in cattle.

Over 90% of the people from visited farms had already heard about mouro tick. It clearly demonstrates the great impact of this parasite within this region. Also, approximately 70% of the interviewed people had already seen mouro tick at least one time, which implies that *O. brasiliensis* is commonly visualized in this region. All people who answer that had already saw mouro tick, correctly described this tick characteristics.

The prevalence of *O. brasiliensis* in Southern Brazil highlands was never determined before. The estimated prevalence gives novel information to design public health policies to this region. Data about *Ornithodoros* ticks prevalence are quite rare in literature, particularly in highly anthropized environment or around human habitations. Prevalence for other *Ornithodoros* ticks were determined just for very few tick species, such as for *O. erraticus*, which prevalence can range from 30 to 70% in pig farms located in Spain (Oleaga-Pérez et al., 1990).

The identification of *O. brasiliensis* under the sand of houses basements or shelters confirmed previous observations that this tick was usually found buried (Martins, et al., 2011). Also, our results are in accordance with other characteristics of *Ornithodoros* genus, like the habit to live near to their host burrow and the presence of large amount of ticks in a small area (Sonenshine, 1991).

*Ornithodoros* ticks are usually able to feed in several vertebrate animals (Sonenshine, 1991). The searching of natural host to *O. brasiliensis* had never given indubitable evidences of who they actually are. Some ancient information asserted that wild-pigs could be the most possible natural host for this species (Evans et al., 2000). Since free-living wild-pigs were no longer found in Southern Brazil highlands the search for alternative hosts begins. Our results indicated that *O. brasiliensis* are using humans, dogs, long-nosed armadillos, and probably hog-nosed skunks as hosts. The report of a

respondent about armadillo parasitism gives novel evidence for a non-domestic animal as a host. Armadillos are very common in this region. Approximately 16% of respondents indicated that armadillos are the most visualized wild animal inside their farms. Moreover, armadillo habits to dig and to live in sand floor holes may favor the contact with *O. brasiliensis* ticks.

Also, it is highly possible that hog-nosed skunks are used as hosts, since several partially engorged ticks were found very close to a skunk burrow. This finding reinforces previous reports that also considered skunks as potential hosts, since some ticks were already collected in a burrow of this animal in the 50's (Davis, 1952). Skunks are also frequently found in this region, usually living in burrows near or inside human habitations. Approximately 30% of respondents indicated that skunks are the most visualized wild animal within their farms and usually very near to human houses.

It is also possible that avian hosts may be used as blood source for *O. brasiliensis*, since feathers were found in sand over all identified "tick nests". It is important to state that farms with *O. brasiliensis* had also several animal species, as swines, cats and bovines, which in turn can also serve as hosts. In addition, since *O. brasiliensis* was already found parasitizing dogs (Reck et al., *in press*), we have to consider the possibility that this tick also feeds in wild canids. The pampas fox (*Pseudalopex gymnocercus*), a wild canid highly abundant in this region and popularly known as "graxaim" or "sorro", may also serve as host for *O. brasiliensis*. This animal was indicated in 47% of the questionnaires as the most frequently seen wild animal. Studies to identify pampas fox ectoparasites within this region, as well as the presence of tick-borne pathogens can give information to improve local public health policies.

Anecdotal information from local inhabitants always associated *O. brasiliensis* presence with human habitations that preserve the natural sand floor intact. This information was confirmed by our results, since all tick specimens were found in human-made structures that maintained the natural sand floor. Possibly, *O. brasiliensis* ticks spread in this region many years before human arrival. It is plausible to assume that some human habitations and animal facilities were build over “tick nests”. It is possible that the habitations that keep the natural sand floor, an ancient tradition in this region, favored tick persistence and survival. On the other hand, buildings that cemented the floor favored tick elimination or migration to other sites. Another hypothesis to explain this close human-tick contact is if ticks initially do not live in farm houses neighborhood. In this case, hosts, such as dog, wild-pig and skunk would had brought ticks near or inside farms. Once arrived to farm area, ticks met a propitious environment to survive, with shelters to protect against weather conditions and a high abundance of hosts.

From the seventeen variables selected to be analyzed as risk factor, only two of them were significantly associated to *O. brasiliensis* occurrence: the presence of house basement with floor of sand and the insufficient sanitary conditions. It seems that these characteristics may provide an ideal environment to tick survival and reproduction and protected against adverse weather conditions. A previous report stated - supported by anecdotal information - that *O. brasiliensis* tick was frequently found in Southern Brazil highlands region mainly in houses of poor people (Davis, 1952). However, no relationship between monetary income and *O. brasiliensis* occurrence was found. The fact that the probability to found *O. brasiliensis* is higher in farms with insufficient sanitary conditions (odds ratio 12.66) may led to the misinterpretation in the previous cited report that this farms were inhabited by poor people.

The presence of house basement with floor of sand markedly increased the probability to find *O. brasiliensis* in farms (odds ratio 16). This finding confirms the suspicion on its importance, raised by recent reports that located *O. brasiliensis* ticks buried in sand of house basements (Martins et al., 2011; Reck et al., *in press*). In addition, few respondents reported that the replacement of sand floor by concrete floor in basements resulted in cessation of *O. brasiliensis* human parasitism.

Several potential related variables were not significantly associated with *O. brasiliensis* presence. Particularly, it is important to note that the presence of any specific domestic animal or other ticks in the farm, and the use of pest control procedures (including acaricide treatments of farm animals) do not influence the probability to find *O. brasiliensis*.

Taking into account the restrict distribution of *O. brasiliensis*, the analysis of retrospective human cases showed a relative high frequency of human parasitism by mouro tick. This finding draw attention to human parasitism by ticks in Rio Grande do Sul state. It is important to notice that in this state, human parasitism by ticks is considered rare (Evans et al., 2000).

Clinical findings associated to *O. brasiliensis* bite are compatible with a non-infectious tick toxicosis syndrome. Also, the findings described here are compatible with early reports that briefly described some clinical findings associated with *O. brasiliensis* bite (Pinto and di Primio, 1931; Aragão, 1936; di Primio 1937; Davis, 1952; Martins et al., 2011). Indeed, the onset of disturbances and lesions immediately after tick bite and in an early period after bite (24-48 hours) reinforces the hypothesis of a non-infectious condition. Usually, in tick-borne diseases the onset of symptoms begins 5-10 days after tick bite (Bratton & Corey, 2005). The bitten victims reported that tick bite was not

immediately noticed, but after some minutes of tick attachment they felt an intense itching sensation and, sometimes, local pain. This characteristic can explain how the parasitism by this tick is possible, since noxious effects of parasitism were only perceived after some host blood was already taken. There is little information available concerning clinical findings associated with *Ornithodoros* tick bites in humans. Even for *Ornithodoros* tick bite syndromes previously studied, there is little detailed clinical information. The bite of the Arabian tick *O. muesebecki* may cause long-term blisters, intense pruritus, and headache in humans (Hoogstraal and Gallagher 1982). The parajoello tick *O. coriaceus* may induce pruritus, pain, edema, erythemic lesion and even tissue necrosis at the site of tick attachment (Failing et al., 1972). The bite of *O. amblyus* can induce intense pruritus and severe local inflammation and, probably, systemic disturbances (Clifford et al., 1980).

Despite the severe clinical findings of tick bite, the great part of bitten people did not sought medical assistance. From those who sought medical treatment there was a serious complaint, the lack of knowledge of medical professionals about tick bite and *O. brasiliensis*, even taken into account that the region is endemic for this parasite. Another reason of great concern is the indiscriminate use of homemade popular treatments and non-prescribed commercial drugs. Some of these treatments may even worsen the clinical picture. This situation deserves attention in order to define guidelines to recognize and treat tick bites and to prevent new cases.

Clinical findings in bitten dogs reported by respondents were compatible with the only previous report about *O. brasiliensis* parasitism in dogs (Reck et al., *in press*). The clinical cases described here for bitten dogs indicate that *O. brasiliensis* induced toxicosis syndrome can be quite severe, and also introduces, for the first time, the concept that this

syndrome can be potentially lethal. The report that three from 11 bitten dogs died can be considered a high fatality rate. It is important to note that none of the dead dogs were necropsied to confirm the cause of death, since this was a retrospective study. However, it is quite plausible to assume that tick bite was related to the deaths of dogs previously healthy that died within three weeks after contact with *O. brasiliensis*. The alternate hypothesis that dog deaths were associated to treatment made by owner was excluded since animals bathed with deltamethrin and motor oil did not die. Two of the dead animals were under one year old and another was an adult female that gave birth some weeks earlier. The dog condition (age and reproductive status) may have been determinant in the cases progression.

This is the first study concerning *O. brasiliensis* epidemiology, distribution and habitat and, also, it is the most comprehensive characterization of clinical findings of the toxicosis syndrome associated to its bite. The identification of risk factors associate with *O. brasiliensis* occurrence, as well as the description of characteristics of human parasitism could help to develop guidelines to reduce the impact of parasitism by the re-emergent tick *O. brasiliensis* on people of São Francisco de Paula and Jaquirana, Southern Brazil. Also, this report brings novel information that could be useful in the understanding of other close tick-human relationships (particularly for argasidae ticks), and to give more attention to a kind of neglected and unusual tropical issue, the tick toxicosis syndrome.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

We thank Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for PhD fellowship to J.R., and Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (FEPAGRO)



and Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT) em Entomologia Molecular for institucional support to this work. Special thanks to Inspeção Veterinária de São Francisco de Paula, namely to Mr. Ângelo Valim for the valuable technical support, and to Dr. Renata Terra (UFRGS) for critical review of this manuscript.

## REFERENCES

Aragão HB. *Ornithodoros brasiliensis* n. sp. *Bras Med.* 1923; 37: 20.

Aragão HB. Ixodidas brasileiros e de alguns países limitrophes. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1936; 31: 759-844.

Arnez M, Avsic-Zupanc T. Tick-borne encephalitis in children: an update on epidemiology and diagnosis. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2009; 7(10): 1251-1260.

Arteche CCP, Laranja RJ. Epidemiologia do *Boophilus microplus* (Can.,1888): Incidência sazonal no Sudeste do Rio Grande do Sul. *Bol Inst Pesq Vet Desidério Finamor.* 1979; 6: 29-43.

Bratton RL, Corey R. Tick-borne disease. *Am Fam Physician.* 2005; 71(12): 2323-2330.

Clifford CM, Hoogstraal H, Radovsky FJ, Stiller D, Keirans JE. *Ornithodoros (Alectorobius) amblus* (Acarina: Ixodoidea: Argasidae): identity, marine bird and human hosts, virus infections, and distribution in Peru. *J Parasitol.* 1980; 66(2): 312-323.

Davis GE. Observations on the biology of the Argasid tick, *Ornithodoros brasiliensis* Aragão, 1923, with the recovery of a spirochaete *Borrelia brasiliensis*, n. sp. *J Parasitol.* 1952; 38: 473-476.

di Primio R. Transmissores de doenças no Rio Grande do Sul. *Arq Riogrand Med.* 1937; 306: 406-408.

Diaz JH. A 60-year meta-analysis of tick paralysis in the United States: a predictable, preventable, and often misdiagnosed poisoning. *J Med Toxicol.* 2010; 6(1): 15-21.

Evans DE, Martins JR, Guglielmone AA. A review of the ticks (Acari: ixodida) of Brazil, their hosts and geographic distribution - 1. The state of Rio Grande do Sul, southern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2000; 95(4): 453-470.

Failing RM, Lyon CB, McKittrick JE. The pajaroello tick bite. The frightening folklore and the mild disease. *Calif Med.* 1972; 116(5):16-19.

Hall-Mendelin S, Craig SB, Hall RA, O'Donoghue P, Atwell RB, Tulsiani SM, Graham GC. Tick paralysis in Australia caused by *Ixodes holocyclus* Neumann. *Ann Trop Med Parasitol.* 2011; 105(2): 95-106.

Hoogstraal H, Gallagher MD. Blisters, pruritus, and fever after bites by the Arabian tick *Ornithodoros (Alectorobius) muesebecki*. *Lancet.* 1982; 2(8293): 288-289.

Horak IG, Camicas JL, Keirans JE. The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida): a world list of valid tick names. *Exp Appl Acarol.* 2002; 28(1-4): 27-54.

Jongejan F, Uilenberg G. The global importance of ticks. *Parasitology.* 2004; 129 Suppl: S3-14.

Luz PM, Struchiner CJ, Galvani AP. Modeling transmission dynamics and control of vector-borne neglected tropical diseases. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010; 4(10): e761.

Mans BJ, Gothe R, Neitz AW. Biochemical perspectives on paralysis and other forms of toxicoses caused by ticks. *Parasitology.* 2004; 129 Suppl: S95-111.

Martins JR, Doyle R, Barros-Battesti DM, Onofrio VC, Guglielmone AA. On the occurrence of *Ornithodoros brasiliensis* ARAGÃO (Acari: Argasidae) in São Francisco de Paula, RS, Southern Brazil. *Neotrop Entomol.* 2011; 40(1): 143-144.

Oleaga-Pérez A, Pérez-Sánchez R, Encinas-Grandes A. Distribution and biology of *Ornithodoros erraticus* in parts of Spain affected by African swine fever. *Vet Rec.* 1990; 126(2): 32-37.

Pinto C, di Primio R. Contribuição para a biologia dos Ixodidae do Estado do Rio Grande do Sul (Brasil). *Rev Med Cir Bras.* 1931; 34: 5-6.

Reck J, Soares JF, Termignoni C, Labruna MB, Martins JR. Tick toxicosis in a dog due to parasitism by *Ornithodoros brasiliensis* (mouro tick). *Vet Clin Pathol. in press.*

Ribeiro VLS, Weber MA, Fetzer LO, Vargas CRB. Espécies e prevalência das infestações por carrapatos em cães de rua da cidade de Porto Alegre, RS, Brasil. *Ciênc. Rural.* 1997; 27(2): 285-289.

Salinas LJ, Greenfield RA, Little SE, Voskuhl GW. Tickborne infections in the southern United States. *Am J Med Sci.* 2010; 340(3): 194-201.

Sonenshine DE. Ecology of nidicolous ticks. In: \_\_\_\_\_. *Biology of ticks.* v. 2, Oxford University Press, New York, 1991, p. 66-91.

Venette RC, Moon RD, Hutchison WD. Strategies and statistics of sampling for rare individuals. *Annu Rev Entomol.* 2002; 47: 143-174.

## Figure captions

Figure 1 – Study area map. Panel A, map showing Brazil, Rio Grande do Sul state and municipalities of São Francisco de Paula and Jaquirana (in black). Panel B, map showing visited farms, indicating positive farms, where *O. brasiliensis* were found (white circles), and negative farms (black circles).

Figure 2 – Active tick search in visited farms. Panel A-C, typical aspect of wood house basement-like structures with sand of floor found in the study area. Panel D, farm shed/storehouse of farm 6. Panel E, Hog nosed skunk (*C. chinga*) found inside the storehouse of farm 6; near to its burrow several *O. brasiliensis* were collected. Panel F, several *O. brasiliensis* ticks were found in the sand under a rock in an empty (no humans and domestic animals) farm. Panel G and H, ticks were found in sand in a very restricted area and in a large density, being consistently with the “tick nest” concept. Panel I, a specimen of *O. brasiliensis* tick over a team member shoe during active tick search in a visited farm.

Figure 3 – Typical aspect of lesions induced by *O. brasiliensis* single bite in humans. Panel A, local lesion in the top of foot, three weeks after tick bite. Panel B, local lesion in heel, two weeks after tick bite.

Table 1

General view of interview/questionnaire

Section/subject	Information collected
General characteristics	Farm size, number of inhabitants, family income, occurrence of basement (with sand floor), hen house, and shed/storehouse
Respondent characteristics	Age, education level
Health	Medical assistance, veterinary assistance
Animals	Domestic animals in the farm, wild animals visualized within the farm, other ticks seen in farm, pest control
Mouro tick	Have you ever heard about mouro tick? From who? Have you have ever seen a mouro tick?
Author observation	Sanitary conditions
Retrospective cases	Human/animal cases, identification of bitten person, clinical symptoms, progression, medical assistance, treatment.

Table 2

Characterization of target area/population

Characteristic	Frequency
Farm size	
1-20 ha	15/30
20-100 ha	9/30
More than 100 ha	6/30
Education level (years of study from respondent)	
Less than 4 years	15/30
4 to 8 years	4/30
8 to 11 years	2/30
More than 11 years	9/30
Average number of inhabitants (per farm)	3 (average value)
Family monthly income	
Until 1 minimal Brazilian national salary (mBns) <sup>1</sup>	5/30
1-5 mBns <sup>1</sup>	14/30
More than 5 mBns <sup>1</sup>	11/30
Access to medical assistance <sup>2</sup>	29/30
Insufficient sanitary conditions	10/30
Presence of domestic animals	
Dogs	30/30
Chickens	25/30
Bovines	22/30
Horses	16/30
Cats	10/30
Swine	6/30
Access to veterinary assistance <sup>2</sup>	12/30
Most visualized wild animal inside the farm	
Pampas fox ( <i>Pseudalopex gymnocercus</i> )	14/30
Hog-nosed skunk ( <i>Conepatus chinga</i> )	9/30
Long-nosed armadillo ( <i>Dasyus hybridus</i> )	5/30
Cruzeira pitviper ( <i>Bothrops alternatus</i> )	2/30
Occurrence of other ticks	23/30
Pest control	18/30
Farm structure	
House basement (with floor of sand)	9/30
Hen house	19/30
Sheds/storehouse (with floor of sand)	26/30
Have you ever heard about mouro tick?	
Yes	27/30
No	3/30
If yes, from who?	
From relatives	25/28
From local authorities	2/28
Have you ever seen a mouro tick?	
Yes	21/30
No	9/30

<sup>1</sup> minimal Brazilian national salary = R\$ 545 monthly (equivalent to approximately US\$ 320).

<sup>2</sup> access to medical or veterinary assistance, at least, once a year.

Table 3

<i>Ornithodoros brasiliensis</i> prevalence				
Total farms in target area	Farms investigated (sample)	Farms positive to <i>O. brasiliensis</i> (by active tick search)	Prevalence	
			Apparent	95% CI
180	30	5/30	16.7%	4.5 – 28.9%



Table 4  
Analysis of risk factors associated with *O. brasiliensis* occurrence

Variables	OR <sup>#</sup>	OR <sup>#</sup> , 95% CI	P value <sup>§</sup>
Farm size			
1-20 ha	1.25	0.10 – 15.10	0.646
20-100 ha	0.62	0.03 – 12.41	0.638
More than 100 ha ( <i>referent</i> )	-	-	-
Insufficient sanitary conditions*	12.66	1.17 – 136.28	0.029
Education level			
Less than 4 years	1.23	0.09 – 15.87	0.432
4 to 8 years	2.66	0.12 – 57.82	0.868
8 to 11 years	8.00	0.25 – 255.77	0.270
More than 11 years ( <i>referent</i> )	-	-	-
Monthly family income			
Until 1 mBns <sup>1</sup>	2.50	0.12 – 50.44	0.745
1-5 mBns <sup>1</sup>	2.72	0.24 – 30.66	0.587
More than 5 mBns <sup>1</sup> ( <i>referent</i> )	-	-	-
Presence of dogs	ND <sup>2</sup>	ND <sup>2</sup>	ND <sup>2</sup>
Presence of cats	3.85	0.52 – 28.24	0.160
Presence of chicken	0.76	0.06 – 8.72	0.443
Presence of swine	1.00	0.09 – 11.02	0.447
Presence of bovine	1.55	0.14 – 16.45	0.410
Presence of horses	1.38	0.19 – 9.76	0.357
Access to veterinary assistance	0.31	0.03 – 3.26	0.257
Presence of other ticks	1.26	0.11 – 13.59	0.435
Presence of house basement* (with floor of sand)	16.00	1.45 – 176.44	0.018
Presence of shed/storehouse (with floor of sand)	0.54	0.04 – 6.65	0.419
Presence of hen house	2.66	0.25 – 27.48	0.299
Pest control	1.00	0.14 – 7.09	0.377
Heard about mouro tick	0.34	0.02 – 4.80	0.369

<sup>#</sup>OD = Odds ratio

<sup>§</sup> by Fisher's exact test

<sup>1</sup>mBns = minimal Brazilian national salary (R\$ 545, equivalent to approximately US\$ 320)

<sup>2</sup>ND = Not determined. Since dogs were found in all farms, it is not possible to consider dog presence as a variable, as well as to calculate its odds ratio.

\*Variables significantly associated with *O. brasiliensis* presence ( $P < 0.05$ )

Table 5

Retrospective human cases

Time line	Bitten people
Last 4 years	16
Between 4 and 10 years ago	6
More than 10 years ago	6
Total	28

Table 6

## Clinical findings of retrospective human cases

Clinical finding	Number of people
Local pruritus	26/28
Slow-healing lesion	25/28
Local edema and erythema	25/28
Focal skin rash	20/28
Local pain	15/28
Blisters	12/28
Limb edema	10/28
Malaise	10/28
Headache	8/28
Transient fever	4/28
Dyspnea	2/28
Total	28

Table 7

Retrospective dog cases

Clinical findings	Number of animals
Skin rash	9/11
Apathy	8/11
Diffuse petechiae	5/11
Fever <sup>1</sup>	2/11
Tachy/dyspnea	1/11
Death <sup>2</sup>	3/11
<b>Total</b>	<b>11</b>

<sup>1</sup> body temperature was not checked by owner, they just refer the so-called “dog fever appearance”.

<sup>2</sup> Animals died within three weeks of tick bites, without any other apparent cause.

Figure 1

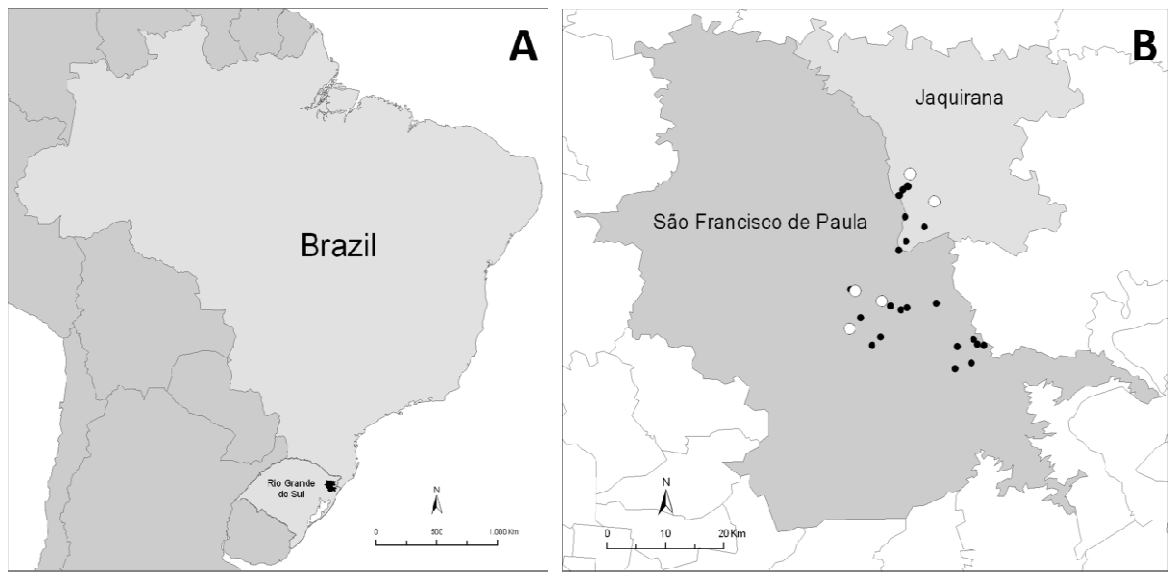


Figure 2

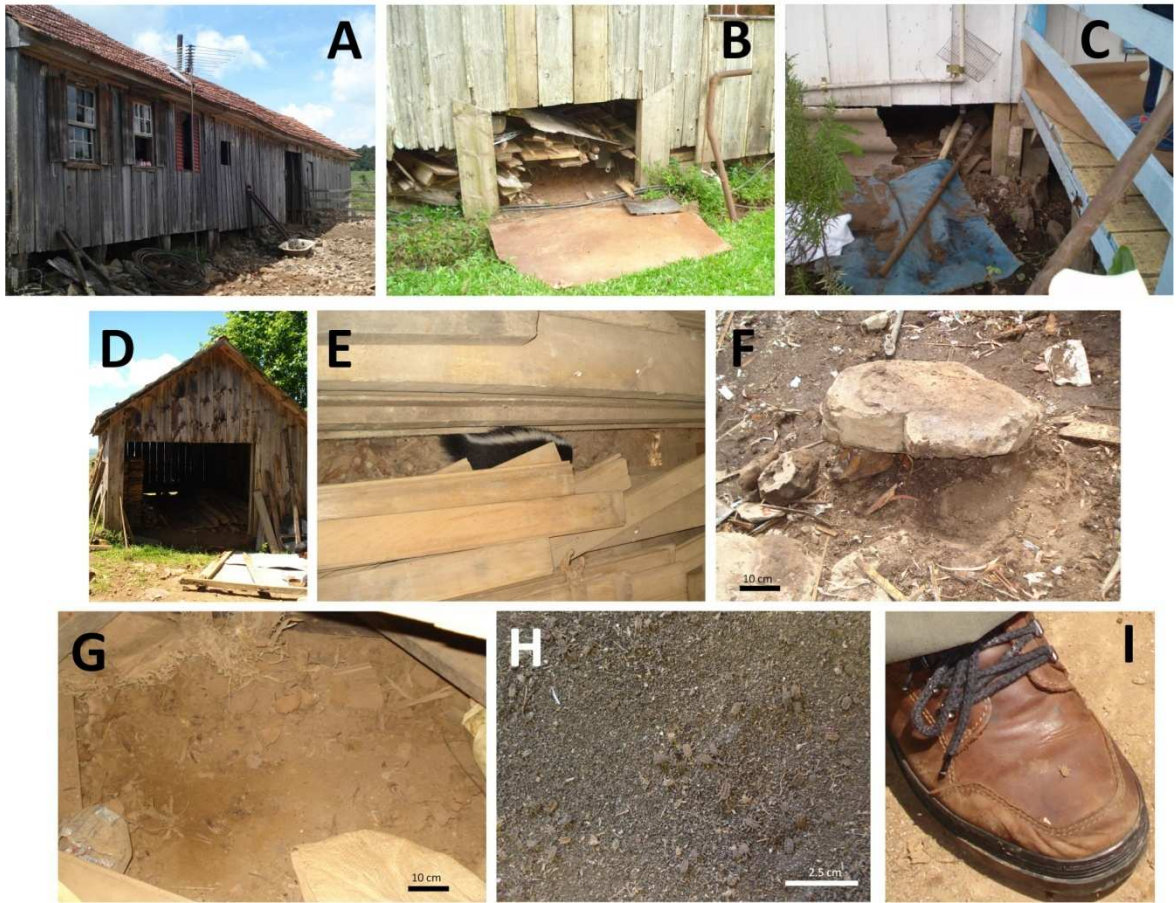
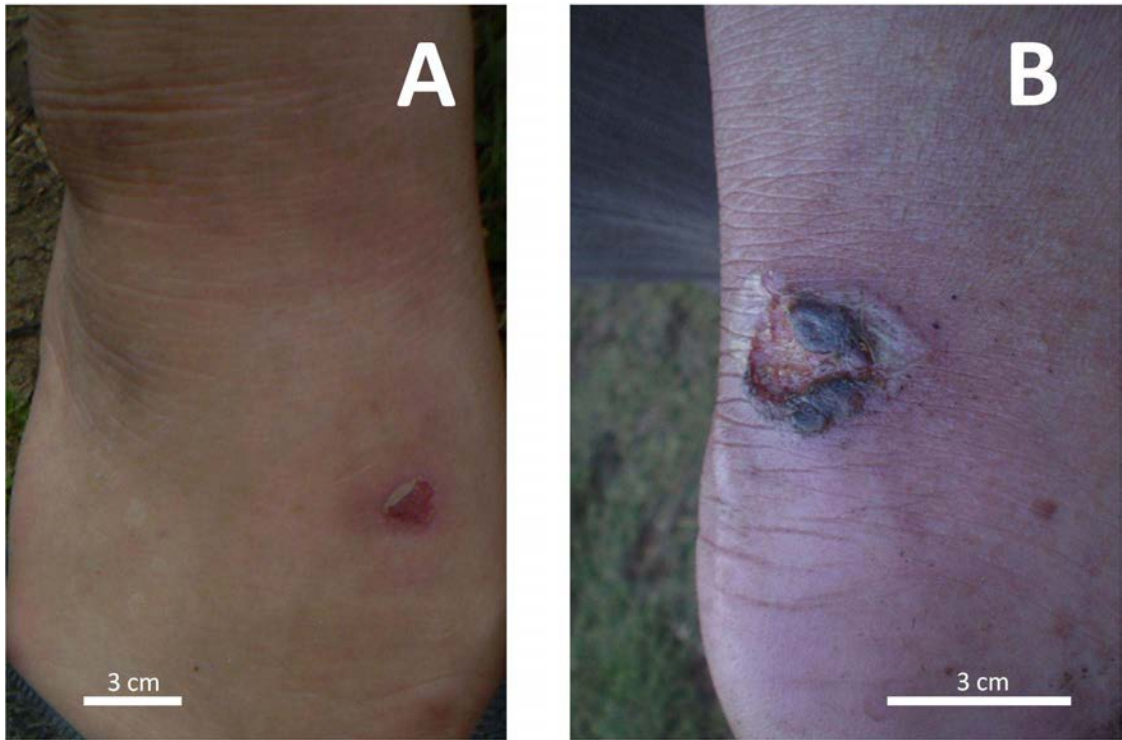


Figure 3



### 3.2. Capítulo II

#### **Tick toxicosis in a dog bitten by *Ornithodoros brasiliensis***

Artigo aceito para publicação no periódico científico *Veterinary Clinical Pathology*.

Neste capítulo, descreve-se o um relato de caso de toxicose por picada de carrapato em um cão picado por *O. brasiliensis*. Este trabalho é o primeiro relato de caso sobre toxicose por *O. brasiliensis* e fornece detalhes sobre a progressão clínica e achados de patologia clínica em um cão adulto naturalmente parasitado por cinco carrapatos.



## CASE REPORT

### **Tick toxicosis in a dog bitten by *Ornithodoros brasiliensis***

José Reck<sup>1,2</sup>, João Fábio Soares<sup>3</sup>, Carlos Termignoni<sup>1,4</sup>, Marcelo B. Labruna<sup>3</sup>,

João Ricardo Martins<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF), Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (FEPAGRO), Eldorado do Sul, RS, Brazil; <sup>2</sup>Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil; <sup>3</sup>Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP, Brazil; and <sup>4</sup>Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil.

**Key Words:** Argasidae tick, arthropod bite, basophilia, eosinophilia, pruritus, skin rash

#### **Correspondence**

José Reck, Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF), Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (FEPAGRO). Address: Estrada do Conde, 3000, Eldorado do Sul, RS, 92990-000, Brazil. E-mail: [jose.reck@gmail.com](mailto:jose.reck@gmail.com)

**Running short title:** Tick toxicosis in a dog

**Running authors:** Reck et al

**Abstract:** Ticks are hematophagous parasites of humans and animals and are a public health hazard in several countries. They are vectors of infectious diseases; and in addition, the bite of some ticks, mainly from the *Ornithodoros* genus, may lead to local lesions and systemic illness, referred as tick toxicosis. In this report, we describe the case of a dog bitten by *Ornithodoros brasiliensis*, popularly known as mouro tick. The main clinical findings were disseminated skin rash, pruritus, mucosal hyperemia, lethargy, and fever. Laboratory abnormalities 48 hours after the bites occurred and included mild nonregenerative anemia, eosinophilia, basophilia, increased serum creatine kinase activity, increased serum C-reactive protein concentration, and prolonged coagulation times. Tick-borne pathogens were not detected by PCR analysis or serologic testing, supporting the theory of a non-infectious syndrome due to tick bite, compatible with a tick toxicosis.

## **Introduction**

Ticks are blood-feeding parasites capable of parasitizing people and almost any vertebrate animal. These arthropods are public health hazards, as they can be vectors of various infectious diseases,<sup>1</sup> and also can cause non-infectious injuries directly associated tick bites.<sup>2,3</sup> The non-infectious noxious consequences related to tick bites are generally designed as tick toxicosis, which can vary from mild local reactions to severe cases of paralysis.<sup>4,5</sup> Several ticks, including the Australian paralysis tick (*Ixodes holocyclus*), the Rocky Mountain wood tick (*Dermacentor andersoni*), and the African sand tampan tick (*Ornithodoros savignyi*) can cause toxicosis.<sup>5</sup> The genus *Ornithodoros* is widely known to cause severe host reactions to tick bite, ranging from local pain and pruritus to death.<sup>2</sup> Despite the well known toxic potential of *Ornithodoros* ticks, detailed clinical reports on reactions to the bite of these ticks in people or domestic animals are lacking.

The tick, *Ornithodoros brasiliensis*, was first described in 1923 based on specimens collected in the municipality of São Francisco de Paula (annual temperature ranging from -8 to 36°C) in the highland region of Rio Grande do Sul, a state in Southern Brazil.<sup>6</sup> Since then, distribution of *O. brasiliensis* has been restricted to this area. During the last 50 years, lack of consistent information about this tick led to the suspicion of its extinction. However, there have been recent reports of the re-emergence of parasitism by *O. brasiliensis*, popularly known as “mouro” tick, in the same region as originally described.<sup>7</sup>

## **Case Presentation**

During a technical visit in December 2009 by the authors (J.R. and J.R.M.) to a small farm (29°15'01.6"S, 50°31'12.1"W, elevation 935 m) in São Francisco de Paula, where

previous cases of human parasitism by *O. brasiliensis* had occurred, the farmer indicated that his dog was sick and had recently been bitten by *O. brasiliensis* ticks. Two days earlier the owner had removed 5 mouro ticks, ranging from 5.5 to 13 mm in length, attached to the dog's skin over the chest and abdomen. During the visit, a "nest" of *O. brasiliensis* was found on the sand under the floor of a wood house (Figure 1A). In the nest were 64 live specimens of *O. brasiliensis* in different live stages, and several tick eggs and exuviae were collected. The ticks collected from the dog by its owner and those collected on the sand were identified as *O. brasiliensis*, based on published descriptions.<sup>6,8</sup>

According to the owner, the dog was healthy before the tick bites. A few hours after removal of the ticks, the dog had signs of lethargy and continuous pruritus over the chest and abdomen. Approximately 24 hours after the bites, there were focal skin rashes and petechiae on the ventral surface of the body. By 48 hours after bites the dog was found in lateral recumbency and one adult *O. brasiliensis* tick was found under the dog's body (Figure 1B). The owner reported that during the previous two years, 3 other dogs had been bitten by "mouro" ticks on the same farm, and all animals developed a similar syndrome, characterized by the sudden appearance of a diffuse skin rash and lethargy. In addition to the cutaneous lesions, one dog had dyspnea and a recurrent tremor and died approximately 2 weeks after being bitten.

This 3-year-old mixed breed male dog (Figure 2A), weighting 23 kg, had no history of previous diseases. On physical clinical examination 48 hours after tick bites, the dog was prostrate, lethargic, and had hyperemia of the ocular mucosa, fever (rectal temperature 41.3°C), tachypnea (52 breaths per minute), and prolonged capillary refill time (CRT, measured in oral mucosa, 3 seconds). Heart and lung auscultation were

normal. There were no signs of neurologic disorders, paresthesia, or paralysis. The dog had a cutaneous rash characterized by several circular hemorrhagic and erythemic lesions (Figure 2B-D), mainly on the ventral surface of the body, and persistent pruritus in this area. A reaction compatible with a pain response was elicited when some lesions were touched.

Blood samples were collected 48 hours after the bites in EDTA for a complete blood cell (CBC) examination, tubes without anticoagulant for serum biochemical analysis, and 3.8% sodium citrate for coagulation testing. Laboratory abnormalities included mild nonregenerative anemia (RBC count  $5 \times 10^6/\mu\text{L}$ , reference interval [RI]  $5.5\text{-}8.5 \times 10^6/\mu\text{L}$ ; hemoglobin [Hb] concentration 11 g/dL, RI 12-18 g/dL; reticulocyte count  $< 1\%$  and absence of polychromasia; and HCT 32%, RI 37-55%), mild thrombocytosis (platelet count  $600 \times 10^3/\mu\text{L}$ , RI  $200\text{-}500 \times 10^3/\mu\text{L}$ ), eosinophilia ( $2,500/\mu\text{L}$ , RI  $100\text{-}1,250/\mu\text{L}$ ), and basophilia ( $450/\mu\text{L}$ , RI  $< 200/\mu\text{L}$ ). The total leukocyte count was normal ( $15,430/\mu\text{L}$ , RI  $6,000\text{-}17,000/\mu\text{L}$ ). Significant abnormalities on serum biochemical analysis were increased creatine kinase (CK) activity (850 U/L, RI  $< 125$  U/L) and increased C-reactive protein (CRP) concentration (200 mg/L, RI 1-100 mg/L). One-stage prothrombin time (PT) (24 seconds, RI 5-15 seconds) and activated partial thromboplastin time (aPTT) (56 seconds, RI 10-30 seconds) were prolonged.

Additional blood samples collected from the dog at 48 hours and 21 days after the tick bites were analyzed for tick-borne pathogens by serologic and molecular tests. DNA was extracted from the blood samples collected in EDTA using the DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions, and tested by a battery of polymerase chain reaction (PCR) protocols targeting DNA of members of the genera *Babesia*, *Hepatozoon*, *Coxiella*, *Borrelia*, *Ehrlichia*, and

*Anaplasma*.<sup>9-14</sup> For each PCR run, appropriate positive and negative control DNA samples were analyzed, as previously described.<sup>9,10</sup> Paired sera collected from the dog at 48 hours and 21 days after the tick bites were tested by immunofluorescence assay (IFA) for antigens of 6 *Rickettsia* (*R. rickettsii*, *R. parkeri*, *R. bellii*, *R. amblyommii*, *R. rhipicephali*, and *R. felis*) and *Ehrlichia canis*, as previously described,<sup>15,16</sup> using appropriate negative and positive canine control sera. DNA samples from the dog yielded no amplicons through the PCR tests, and sera were considered to be non-reactive (titer < 1:64) for the 6 *Rickettsia* antigens and *E. canis*.

The owner did not permit the dog to be admitted to a veterinary hospital, and additional testing was not done at that time. Ketoprofen (Ketofen, Merial, Paulínia, SP, Brazil) 1 mg/kg body weight PO SID for 3 days and dexchlorpheniramine (Polaramine, Mantecorp, Rio de Janeiro, RJ, Brazil) 0.25 mg/kg body weight PO (single dose) were administered. A combination of cypermethrin and ethion acaricides (Ciperthion, Intervet Schering-Plough, Jandira, SP, Brazil) was pulverized and spread on the sand under the wood-house floor and in the backyard. In the following weeks, several dead ticks were observed in soil on the farm. The family and the dog subsequently (temporarily) moved to an urban area of another city, and the dog had no additional contact with *O. brasiliensis* ticks. The dog was examined weekly for 3 months. Three weeks after the tick bites the dog was completely recovered and laboratory values were within RIs.

## **Discussion**

The majority of reports of tick toxicosis concern cases of tick paralysis.<sup>4</sup> Nevertheless, *Ornithodoros* tick bites may induce local and systemic non-paralytic syndromes.<sup>5,17,18</sup> The bite of the Arabian tick, *O. muesebecki*, may lead to long-term blisters and pruritus,

fever, and headache in people.<sup>18</sup> In experimental and domestic animals the bite of the African sand tampan tick, *O. savignyi*, the most studied *Ornithodoros* involved in toxic syndromes, can induce intense local pain, dyspnea, hemorrhage, and death, probably associated with anaphylactic shock or cardiac arrest.<sup>2,5</sup> Salivary glands of *O. savignyi* have been shown to contain cardiotoxins.<sup>19</sup> In fact, tick salivary secretion contains a cocktail of complex pharmacologic compounds, which include anticoagulants, proteases, vasoactive peptides, and allergens,<sup>20</sup> which in turn, may exert systemic effects on the host.

Since the initial reports, *O. brasiliensis* has been considered a public health problem in the highland region of Southern Brazil.<sup>28</sup> Bites from *O. brasiliensis* in people are associated with severe skin lesions and systemic disturbances.<sup>29</sup> Aragão reported that mouro ticks were frequently found in rural habitats and parasitized poor people; the bite is painful and able to induce deep skin lesions.<sup>30</sup> Davis reported that in addition to local effects, people bitten by *O. brasiliensis* often had headache, dyspnea, and fever.<sup>27</sup>

In this report, the dog had dermatologic lesions, including skin rashes, which are common findings in reactions to tick bite.<sup>18,21</sup> In addition, signs of toxic syndrome, such as prostration, continuous pruritus, mucosal hyperemia, fever, tachypnea, and increased CRT, were present.<sup>5,18,22</sup> Mild anemia may have resulted from blood loss owing to tick feeding,<sup>23</sup> and may have been too acute to observe a regenerative response. It is important to note that we cannot exclude the possibility that the dog may have been bitten by > 5 ticks, and a high parasite load can spoil a great amount of host blood. Increased eosinophil and basophil counts have been frequently found in parasitic diseases and non-infectious inflammatory skin lesions, such as allergy.<sup>24</sup> Increased CK activity has been reported in human tick toxicosis and could be related to tick salivary toxicity to skeletal

or cardiac muscle.<sup>25</sup> Prolonged PT and aPTT indicated impaired hemostasis, which, in addition to thrombocytosis, have been previously associated with tick parasitism,<sup>26</sup> possibly due to a systemic effect of tick anti-hemostatics inoculated into the host. Increased concentration of CRP, an acute-phase marker of inflammation, along with the absence of neutrophilia, suggested the occurrence of non-infectious inflammatory disease. Although the laboratory abnormalities in the dog were not pathognomonic for tick toxicosis, they shed new light on our understanding of the pathways involved in its pathogenesis. Moreover, as detailed reports of non-paralytic tick toxicosis are uncommon in the literature, our findings provide valuable information to veterinary clinical pathologists and practitioners for diagnosis and management of this condition.

Although tick-borne pathogens were not identified in this dog, tick-borne diseases must not be excluded in other cases of *O. brasiliensis* parasitism. Indeed, *Borrelia brasiliensis* has been associated with *O. brasiliensis* in an experimental setting,<sup>27</sup> but not yet under natural conditions.

Recently, studies concerning *O. brasiliensis* parasitism in Southern Brazil have indicated that people bitten by ticks have severe local reactions and often systemic illness (unpublished data). However, medical and veterinary personnel have little information about this tick and the toxicosis it causes. Re-emergence of human and animal parasitism by *O. brasiliensis*, the toxic effects related to its bite, and the limited knowledge about this tick place this parasite as an emerging public health concern in Southern Brazil.

### **Acknowledgments**

We are indebted to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for



financial support. The authors also thank the Inspeção Veterinária e Zootécnica (IVZ) de São Francisco de Paula, namely Mr. Ângelo Valim, for valuable technical support; and Fernanda Marks, DVM (Faculdade de Veterinária, UFRGS) for critical review of this manuscript.

## References

1. Walker DH. Tick-transmitted infectious diseases in the United States. *Annu Rev Public Health*. 1998;19:237–269.
2. Mans BJ, Gothe R, Neitz AW. Biochemical perspectives on paralysis and other forms of toxicoses caused by ticks. *Parasitology*. 2004;129:s95-s111.
3. Adamantos S, Boag A, Church D. Australian tick paralysis in a dog imported into the UK. *Vet Rec*. 2005;156:327.
4. Sharifi K, Mohammadi GR, Tafti AK. Outbreak of tick paralysis in a nomadic sheep flock in Iran. *Vet Rec*. 2003;153:631-632.
5. Mans BJ, Gothe R, Neitz AW. Tick toxins: perspectives on paralysis and other forms of toxicoses caused by ticks. In Bowman AS, Nutall PA, eds. *Ticks – Biology, Disease and Control*. New York, NY: Cambridge University Press; 2008:108-126.
6. Aragão HB. *Ornithodoros brasiliensis* n. sp. *Bras Med*. 1923;37:20.
7. Martins JR, Doyle R, Barros-Battesti DM, Onofrio VC, Guglielmone AA. On the occurrence of *Ornithodoros brasiliensis* ARAGÃO (Acari: Argasidae) in São Francisco de Paula, RS, southern Brazil. *Neotrop Entomol*. 2011;40:143-144.
8. Aragão HB. Notas sobre os *Ornithodoros brasiliensis*, *rostratus* e *turicata* [Notes on *Ornithodoros brasiliensis*, *rostratus* and *turicata*]. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1931;25:227-231.

9. Spolidorio MG, Labruna MB, Machado RZ, et al. Survey for tick-borne zoonoses in the state of Espírito Santo, southeastern Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 2010;83:201-206.
10. Spolidorio MG, Labruna MB, Zago AM, Donatele DM, Caliari KM, Yoshinari NH. *Hepatozoon canis* infecting dogs in the state of Espírito Santo, southeastern Brazil. *Vet Parasitol.* 2009;163:357 – 361.
11. Reeves WK, Loftis AD, Sanders F, et al. *Borrelia*, *Coxiella*, and *Rickettsia* in *Carios capensis* (Acari: Argasidae) from a brown pelican (*Pelecanus occidentalis*) rookery in South Carolina, USA. *Exp Appl Acarol.* 2006;39:321–329.
12. Stromdahl EY, Williamson PC, Kollars TMJr, et al. Evidence of *Borrelia lonestari* DNA in *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) removed from humans. *J Clin Microbiol.* 2003;41:5557–5562.
13. Aguiar DM, Hagiwara MK, Labruna MB. In vitro isolation and molecular characterization of an *Ehrlichia canis* strain from São Paulo, Brazil. *Braz J Microbiol.* 2008;39:489–493.
14. Anderson BE, Sumner JW, Dawson JE, et al. Detection of the etiologic agent of human ehrlichiosis by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1992;30:775–780.
15. Aguiar DM, Saito TB, Hagiwara MK, Machado RZ, Labruna MB. Serological diagnosis of canine monocytic ehrlichiosis with Brazilian antigen of *Ehrlichia canis*. *Ciênc Rural.* 2007;37:796– 802.
16. Labruna MB, Horta MC, Aguiar DM, et al. Prevalence of *Rickettsia* infection in dogs from the urban and rural areas of Monte Negro municipality, western Amazon, Brazil. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2007;7:249–255.
17. Herms WB. The Pajaroello tick (*Ornithodoros coriaceus* Koch) with special reference to life history and biting habits. *J Parasitol.* 1916;2:137-142.

18. Hoogstraal H, Gallagher MD. Blisters, pruritus, and fever after bites by the Arabian tick *Ornithodoros (Alectorobius) muesebecki*. *Lancet*. 1982;320:288-289.
19. Mans BJ, Steinmann CM, Venter JD, Louw AI, Neitz AW. Pathogenic mechanisms of sand tampan toxicoses induced by the tick, *Ornithodoros savignyi*. *Toxicon*. 2002;40:1007-1016.
20. Mans BJ, Neitz AW. Adaptation of ticks to a blood-feeding environment: evolution from a functional perspective. *Insect Biochem Mol Biol*. 2004;34:1-17.
21. di Primio R. Transmissores de doenças no Rio Grande do Sul [Agents of disease transmission in Rio Grande do Sul]. *Arq Riogrand Med*. 1937;306:406-408.
22. Pinto C, di Primio R. Contribuição para a biologia dos Ixodidae do Estado do Rio Grande do Sul (Brasil) [Contribution to the biology of Ixodidae from Rio Grande do Sul state (Brazil)]. *Rev Med Cir Bras*. 1931;34:5-6.
23. Aragão HB. Ixodidas brasileiros e de alguns países limitrofes [Ixodidae from Brazil and from adjacent countries]. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1936;31:759-844.
24. Davis GE. Observations on the biology of the Argasid tick, *Ornithodoros brasiliensis* Aragão, 1923, with the recovery of a spirochaete *Borrelia brasiliensis*, n. sp. *J Parasitol*. 1952;38:473-476.
25. Dana AN. Diagnosis and treatment of tick infestation and tick-borne diseases with cutaneous manifestations. *Dermatol Ther*. 2009;22:293-326.
26. Venzal JM, Estrada-Peña A, Fernández de Luco D. Effects produced by the feeding of larvae of *Ornithodoros* aff. *puertoricensis* (Acari: Argasidae) on laboratory mice. *Exp Appl Acarol*. 2007;42:217-223.

27. Corrier DE, Vizcaino O, Terry M, et al. Mortality, weight loss and anaemia in *Bos taurus* calves exposed to *Boophilus microplus* ticks in the tropics of Colombia. *Trop Anim Health Prod.* 1979;11:215-221.
28. Costa JJ, Weller PF, Galli SJ. The cells of the allergic response: mast cells, basophils, and eosinophils. *JAMA.* 1997;278:1815-1822.
29. Boffey GC, Paterson DC. Creatine phosphokinase elevation in a case of tick paralysis. *Can Med Assoc J.* 1973;108 866-868.
30. Reck Jr J, Berger M, Terra RM, et al. Systemic alterations of bovine hemostasis due to *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infestation. *Res Vet Sci.* 2009;86:56-62.

**Figure Captions:**

**Figure 1.** (A) *O. brasiliensis* nest located on sand under the wood-house floor. Note the high mimicry with the environment (sand). The red arrows indicate adult ticks. (B) Adult *O. brasiliensis* tick found under the dog's body during author's first visit to the farm.

**Figure 2.** (A) An apathetic and recumbent dog 48 hours after being bitten by ticks. (B) Hemorrhagic and erythemic lesion on right ventral surface of the dog's body. (C, D) Widespread multifocal skin rashes on axilla and medial surfaces of right and left forelegs.

Figure 1

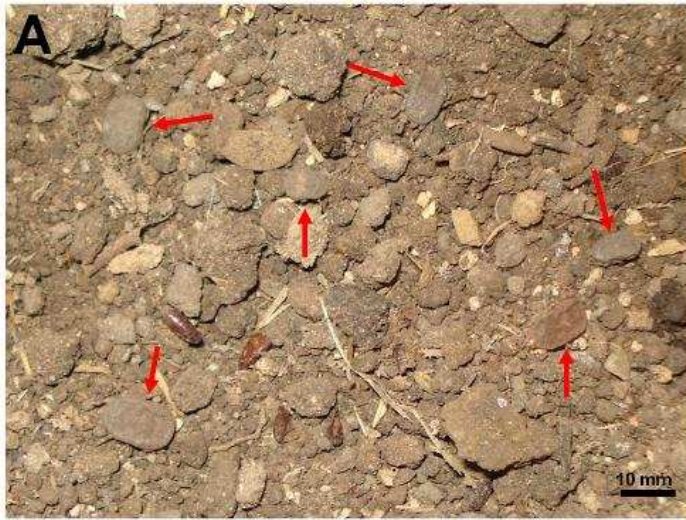
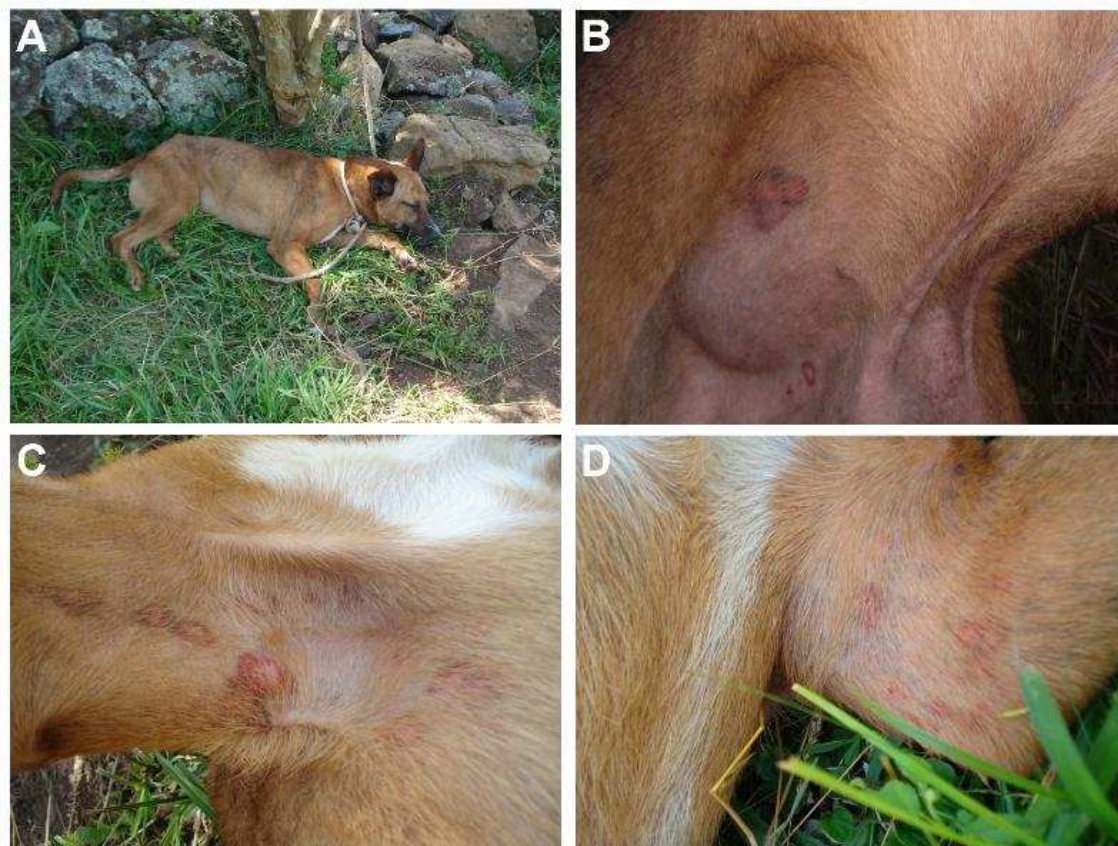


Figure 2



### 3.3. Capítulo III

#### **Experimentally induced tick toxicosis in rats bitten by *Ornithodoros brasiliensis* (mouro tick): a clinico-pathological characterization**

Manuscrito a ser submetido para periódico científico internacional.

Neste capítulo, descreve-se a caracterização clínico-patológica da toxicose experimentalmente induzida em ratos picados por *O. brasiliensis*. Este trabalho apresenta análise dos sinais clínicos, achados de patologia clínica e análises histológicas dos ratos picados por cinco exemplares adultos de *O. brasiliensis*. É o primeiro relato detalhado dos efeitos do parasitismo pelo carrapato mouro em condições controladas.



**Experimentally induced tick toxicosis in rats bitten by *Ornithodoros brasiliensis*  
(mouro tick): a clinico-pathological characterization**

Reck *et al.*

Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS),

Porto Alegre, RS, Brasil.

Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF), Eldorado do Sul, RS,

Brasil.

## ABSTRACT

*O. brasiliensis*, also known as mouro tick, is an argasid tick only found in Southern Brazil highland region. *O. brasiliensis* parasitism is associated with severe reactions on host ranging from local pruritus and pain to systemic disturbances. Recently, the re-emergence of *O. brasiliensis* parasitism in humans and dogs draw attention to the clinical findings induced by its bite, which is poorly understood and described. Moreover, rare or nil experimental data about tick bite effects under controlled conditions were available. Thus, this study aimed to describe clinical and pathological findings induced by *O. brasiliensis* bites in rats experimentally parasitized. Ticks feed for  $\approx 40$  minutes in rats and their weight increased about four times after the blood meal. Rats bitten by five adult ticks showed hyperemia of oral/ocular mucosa, piloerection, tachypnea, claudication, ocular and nasal discharge, pruritus, and swollen and erythemic lesions. A large hemorrhagic lesion was observed on rat skin in tick attachment sites, reaching  $\approx 17$  mm diameter at 12 hours after bite. Bitten rats also presented an increased bleeding tendency ( $\approx 50\%$ ) at 6 hours after tick bite, evaluated by tail-cut rat model of bleeding. Blood samples of bitten rats were taken and clinical pathology analysis showed significant alteration of eosinophil and basophil count, CPK, CPK-MB and LDH activity, and fibrinogen level. Histopathological analysis revealed marked subcutaneous hemorrhage, edema and slight muscle degeneration at the bite site. Also, muscle degeneration and necrosis were observed in myocardium of bitten rats 72 hours after bites by histopathology and immunohistochemistry against troponin C. This work showed the ability of *O. brasiliensis* to cause severe disturbances to rats experimentally parasitized, compatible with a tick toxicosis syndrome. This observation associated with re-

emergence of *O. brasiliensis* parasitism; place this parasite as a public health hazard in Southern Brazil.

**Key-words:** argasidae, *Ornithodoros*, tick toxicosis, arthropod bite, skin lesion, hemorrhage

## INTRODUCTION

Ticks are hematophagous parasites distributed worldwide. Tick parasitism could cause serious deleterious consequences both to humans and animals. These consequences can be related to transmission of tick-borne pathogens, or directly associated to tick bite. The non-infectious noxious consequences related to tick bite are generally referred as tick toxicosis (Walker, 1998; Sharifi et al., 2003; Mans et al., 2008).

Ticks of the *Ornithodoros* genus are well known because their bite can cause non-infectious severe disturbances to their hosts. The effect of *Ornithodoros* tick bite may range from local pain and pruritus to severe toxicosis that can progress to death (Hoogstraal & Gallagher, 1982; Mans et al., 2008; Venzal et al., 2007).

*O. brasiliensis* is a tick species only found in Southern Brazil highlands. Since first reports this tick has been associated to severe reactions to tick bite, particularly in humans. *O. brasiliensis* bite in humans is frequently followed by pruritus, development of a slow healing lesion at the site of tick bite, edema, erythema and focal skin rash (Martins et al., 2011). It was also reported this tick bite causes local pain, induction of blisters, limb edema and malaise. In few cases, victims also reported headaches and dyspnea. In dogs, *O. brasiliensis* parasitism was frequently associated to apathy, skin rash, petechiae,

and tachy/dyspnea (Reck et al., unpublished data). These information place *O. brasiliensis* as a public health concern because its potential to causes toxicosis.

With the exception of one clinical case report about a dog bitten by five *O. brasiliensis* specimens (Reck et al., *in press*), all information available concerning *O. brasiliensis* bite effects are from epidemiological/retrospective analysis (Reck et al., unpublished data) or ancient anecdotal reports. Moreover, rare or nil experimental data about tick bite effects under controlled conditions is available. Thus, this study aims to describe the clinical and pathological effects induced in rats experimentally parasitized by *O. brasiliensis*.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Ticks**

Ticks used in this study were collected in the field, in municipality of São Francisco de Paula (29° 20' 00" S, 48° 30' 21" W), in Southern Brazil highlands region, Rio Grande do Sul state, Brazil. They were collected in 2010 summer and were maintained under laboratory conditions (20 °C, ± 80% humidity) in Petri dishes with sterile sand (1mm) for three months until the experiment was performed. Ticks used in this work were never feed under laboratory conditions before this experiment. They were identified as *O. brasiliensis* ticks according to Aragão description (1923 and 1931).

### **Animals**

Male Wistar rats ( $\approx$  300 g) were utilized in this work. The rats were maintained in temperature-controlled (21–24 °C, in 12-h light/dark cycles) rooms, and had access to water and food *ad libitum*. All experiments performed in this work were carried out in

accordance with ethical guidelines about animal experimentation, and all procedures approved by local ethical committee (CEUA/IPVDF protocol number 04/2011). All procedures were also in accordance with the NIH Animal Care Guidelines.

### **Study design**

Rats were divided in control (10 animals) and experimental groups (30 animals). Rats of experimental group were bitten by 5 adult specimens of *O. brasiliensis* (> 10 mm length). Rats of experimental group were slight sedate with acepromazine (6 mg/Kg, i.p.) to avoid tick removal, and 10 minutes later ticks were placed over rat skin (one tick in each hind-limb, and three over the abdomen) to feed. Rats of control group only received acepromazine and were not submitted to any other treatment.

From these animals cited above, four rats of control group and 12 of experimental group were used for determination of bleeding effect (tail-cut bleeding model), as further described. The control group of tail-cut bleeding model was submitted to tail cut procedure 6 hours after acepromazine administration.

All other animals (six rats from control group and 18 from experimental group) were utilized for the observation of clinical findings, determination of clinical pathology parameters, and histopathological analysis. Blood samples for clinical pathology tests were taken from rats of experimental group at 6, 24 and 72 hours after tick bites (six animals at each time). Blood samples were obtained by puncture of femoral veins (after inguinal incision) of previously anesthetized rats (xylazine/ketamine, 15/90 mg/kg, i.p.). Blood samples of control group (six rats) were obtained 72 hours after acepromazine administration. After blood collection rats were killed by xylazine/ketamine overdose.

### **Clinical findings**

Rats were observed at indicated times and any clinical finding was recorded. The main characteristics observed in rats were the traditional clinical signs used for rodent clinical visual examination, as mucosa coloration, piloerection, respiratory frequency, dehambulation, presence of itching, self grooming, aspect of lesion, general conditions. Rats from experimental group were inspected 6, 24 and 72 hours after tick bites. Animals from control group were inspected 6, 24 and 72 hours after acepromazine administration. The record of clinical findings was performed by inspection of the animals for 30 minutes. Rats were maintained in their habitual cages and rooms during the observation, and inspection was always made by the same observer.

### **Skin hemorrhagic focus diameter**

Skin hemorrhage at the site of tick bite was measured at indicated times using a high-precision pachymeter (Mitutoyo, São Paulo, Brazil). The hemorrhagic focus was measured considering the bigger hemorrhagic diameter (mm) of skin lesions. This measurement was performed after the record of clinical findings, to avoid alterations in animal behavior due to handle.

### **Clinical pathology**

Blood was drawn from rats using EDTA and sodium citrate as anticoagulants. The following parameters were determined: complete blood cell examination (erythrocyte count; differential leukocytes count; hemoglobin content; hematocrit; mean corpuscular hemoglobin concentration, MCHC; mean corpuscular volume, MCV), platelet count, creatine phosphokinase (CPK) activity, creatine phosphokinase MB fraction (CPK-MB)

activity, total lactate dehydrogenase (LDH) activity, aspartate aminotransferase (AST) activity, alanine aminotransferase (ALT) activity, plasma urea and creatinine levels, fibrinogen, prothrombin time (PT), thromboplastin time (aPTT). Platelet count was performed using a Neubauer chamber (hemocytometer) by optical microscopy. CPK, CPK-MB, LDH, AST, and ALT activities, were determined by spectrophotometry using commercial kits (Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, Brazil). Plasma urea and creatinine levels were also determined by commercial kits (Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, Brazil). Fibrinogen level, PT and aPTT were evaluated as previously described (Reck et al., 2009). Other mentioned blood tests (erythrocytes and leukocytes count, hemoglobin content, hematocrit, MCHC, and MCV) were done by a specialized hematological laboratory, and were determined both by manual count and using an automated cell count system. Samples were kept at -80 °C until determination of plasma parameters. Blood cell count was performed immediately after blood collection. Rat blood samples were also analyzed for hemoparasites presence by Giemsa staining.

### **Histopathology and immunohistochemistry**

Histopathological investigation consisted of hematoxylin-eosin standard (HE) staining in thin sections of rat organs embedded in paraffin blocks. The organs were collected immediately after rat death and were placed in 10% buffered formalin solutions until use.

Heart tissue of experimental and control rats underwent immunohistochemistry (IHC) analysis against troponin C. For IHC, thin sections of heart tissue were prepared using ImmunoSlide® slide glass (EasyPath, São Paulo, Brazil). For antigen detection it was employed a monoclonal mouse antibody against troponin C (Novocastra Reagents,

Newcastle, UK) diluted to 1:40. IHC was performed using the streptavidin–biotin–peroxidase complex technique (DakoCytomation Inc., Carpinteria, USA), and revealed using diaminobenzidine (DakoCytomation Inc, Carpinteria, USA). Endogenous peroxidase was blocked using 10% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in methanol. Contra-staining was carried out using Harris hematoxylin. Troponin C IHC technique stains normal/health myocardial cells and a diminished or absent staining was observed in injured cells (Ortmann et al. 2000).

### **Tail-cut bleeding model (bleeding effect)**

Bleeding effect, i.e., systemic hemorrhagic tendency was evaluated using a classical rat model of tail-cut. The methodology was performed according to a previously described protocol (Nazareth et al., 2006), with minor modifications. Briefly, rats were anesthetized with sodium thiopental (85 mg/kg, i.p.) and their tail was put in a warm bath (37 °C) for 5 minutes. A segment of 5 mm of tail extremity was excised using a scalpel, and then the tail was placed inside a becker with distilled water (40 mL) at 37 °C for 30 minutes. After that rats were killed by sodium thiopental overdose. The blood loss, as index of bleeding effect, was evaluated by spectrophotometry, determining the solution absorbance at 540 nm. For data comparison, the Abs<sub>540</sub> of experimental group were expressed as fold of control.

### **Statistical analysis**

The results were expressed as mean ± S.E.M. of *n* samples. The statistical analyses were carried out using the one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett *post hoc* test. Values of *P* under 0.05 were considered statistically significant.



The statistical analyses were conducted using the GraphPad Prism 3.0 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

## **RESULTS**

### **Tick feeding characteristics**

Immediately after the contact with rat skin, ticks attached and start to feed. The average time to complete blood meal and spontaneous detachment (as an engorged tick) from rat was  $\approx$  40 minutes (ranging from 21 to 110 minutes). During feeding ( $\approx$  10 minutes after the blood meal starts), ticks start the production of a large amount of coxal fluid; a colorless liquid excreted by coxal glands. Most ticks excreted coxal fluid for an additional 60 minutes after detachment. The average volume of coxal fluid excreted was  $\approx$  120  $\mu$ L per tick (ranging from 30 to 200  $\mu$ L). After blood meal, ticks increased about four times its original weight. The estimated blood intake average per tick was  $\approx$  245 mg, calculated considering: (coxal fluid weight + final tick weight) – initial tick weight.

### **Clinical findings**

The main clinical findings observed were oral/ocular mucosa hypermia, piloerection, tachypnea, claudication, ocular and nasal discharge, pruritus, swollen and erythemic lesion. The relative frequency of clinical findings is summarized in **Table 1**.

### **Skin hemorrhagic focus diameter and tail-cut bleeding**

The hemorrhagic focus at tick bite site in rat skin progressively increases until 12 hours post-bite. At this time, the mean ( $n = 6$ ) diameter of lesions were  $\approx$  17 mm. **Figure**

**1** shows the progression of hemorrhagic focus diameter after tick bite. **Figure 2** shows the aspect of typical tick bite lesions in rat hind-limb.

The tail-cut bleeding time significantly increases ( $\approx 50\%$ ) at 6 hours after tick bite, compared to control animals (**Figure 3**). No statistic differences in tail bleeding were observed in any other tested time.

### **Clinical pathology**

The clinical pathology analysis showed significant alteration (at least in one tested time) of the following blood parameters: eosinophil and basophil count, CPK, CPK-MB and LDH activity, and fibrinogen level. All other measured clinical pathology parameters were not significantly altered. Clinical pathology parameters significantly altered in experimental group are summarized in **Table 2**. No hemoparasites or tick-borne microorganisms were found in rat blood smears stained with Giemsa.

### **Histopathology and IHC against troponin C**

Histopathological analysis revealed an extensive subcutaneous hemorrhage and edema at the site of the tick bite at all times (6, 24 and 72 hours). At 72 hours after tick bite, in addition to marked subcutaneous hemorrhage and edema it was also observed mild muscle fiber degeneration. Muscle degeneration was characterized by increased cytoplasmic eosinophilia and reduction of muscle characteristic striations. Also, intraepidermal hemorrhage with slight epidermal detachment was observed. **Figure 4** shows the typical histological findings of tick bite lesion at 72 hours after bite. Polymorphonuclear infiltration was rarely seen or absent at the site of tick bite. When present, infiltrated cells were predominantly eosinophils.

Morphological alterations were also seen in heart tissue of bitten rats 72 hours after tick bites (**Figure 5**). The main alteration observed was myocardium degeneration and necrosis, characterized by cell retraction, enhanced cytoplasmic eosinophilia, lack of cytoplasmic striations, nuclear piknosis and occasional nuclear karyorrhexis and karyolysis. The lesions were found mainly in heart papillary muscles and in areas near to inner (left) ventricle wall. Few focuses of subendocardial hemorrhage, particularly in left ventricle, were also observed in heart tissue (data not shown). Other organs and tissues presented no alterations.

The myocardial injury was confirmed by IHC against cardiac troponin C. Areas of myocardial necrosis and degeneration in HE sections co-localized with non-stained areas in IHC sections (**Figure 5**). In heart tissue from all control rats a marked and homogenous staining for troponin C was observed (data not shown).

## **DISCUSSION**

*O. brasiliensis* parasitism has been frequently associated to severe reactions to tick bite, particularly in humans. These noxious reactions to tick bite are also frequently observed after the bite by of several other *Ornithodoros* species. The bite of the Arabian tick *O. muesebecki* may lead to blisters, pruritus, fever and headache in humans (Hoogstraal & Gallagher 1982). In laboratory and domestic animals, the bite of the African sand tampan tick *O. savignyi* induce intense local pain, dyspnea, hemorrhages and death, probably associated with anaphylactic shock or cardiac arrest (Mans et al., 2008). *O. aff. puertoricensis* produced marked deleterious effects on laboratory mice, such as hyperaemia in both nasal and ocular mucosa, dyspnea, motor incoordination and death (Venzal et al., 2007).

Despite *O. brasiliensis* evident public health importance and its re-emergence in Southern Brazil (Martins et al, 2011; Reck et al., *in press*) there are no experimental data describing the effects of *O. brasiliensis* feeding in laboratory animals. In this study, we addressed this issue, characterizing the clinical and pathological effects induced by *O. brasiliensis* parasitism in rats. Clinical findings observed in the first 72 hours after tick bite were both local (pruritus, swollen lesion and erythemic lesion, claudication) and systemic (oral/ocular mucosa hyperemia, ocular and nasal discharge, piloerection, tachy/dyspnea). These symptoms were compatible/similar with those observed after bite by other *Ornithodoros* species and for humans bitten by *O. brasiliensis* (Venzal et al., 2007; Mans et al., 2008; Martins et al., 2011). Compared with the main clinical findings described for bitten humans there are some similarities, particularly in local symptoms, as pruritus, and erythemic and edematous lesion. The occurrence of dyspnea, despite rarely observed in experimental animals was also reported by a few bitten humans. In bitten humans it is frequently reported discomfort and malaise. Despite the fact that these characteristics cannot be directly recorded in rodents, some findings, as piloerection, indicate that rats are under a stressing situation (Carstens & Moberg, 2000). The occurrence of mucosa hyperemia seems to be a common finding in animals bitten by *O. savignyi* and *O. aff. puertoricencis* (Venzal et al., 2007; Mans et al., 2008) and was also observed in a dog bitten by *O. brasiliensis* (Reck et al., *in press*). Ocular and nasal discharge observed in bitten rats was characterized by a mucous reddish secretion, a clinical condition never described for *O. brasiliensis* naturally bitten animals. This finding may be associated with an increase in nasal/ocular mucous permeability, which is in accordance with mucosa hyperemia. Alternatively, this finding may be associated with a hemorrhagic tendency. However, the most reasonable cause of the nasal and ocular

discharge was the increased secretion of Harder's gland, a common finding in rats under highly stressing situations or after contact with irritating agents (Quinton, 2003). The occurrence of nasal and ocular discharge was also frequently observed in mice bitten by *O. aff. puertoricencis* and domestic animals bitten by *Hyalomma truncatum*, the agent of a tick toxicosis syndrome called sweating sickness (Dolan & Newson, 1980; Venzal et al., 2007). This set of observed symptoms in bitten rats is compatible with the definition of tick toxicosis syndrome.

A marked finding observed in both humans and animals bitten by *O. brasiliensis* is the extensive skin hemorrhagic lesion induced by tick bite. Here we registered the evolution of the hemorrhagic lesion, showing it increased until 12 hours after tick bite, when reached approximately 17 mm diameter. This hemorrhagic focus can be considered an extensive hemorrhagic lesion and usually takes 7-10 days to heal. Just for comparison purposes, researchers that work with snake venoms created the concept of Minimal Hemorrhagic Dose (MHD), which is useful to define and compare hemorrhagic snake venoms. The MHD is the minimum dose able to induce a hemorrhagic lesion of 10 mm diameter 24 hours after injection, a kind of threshold for hemorrhagic lesions induced by venoms (Gutiérrez et al., 1985). In this case, one tick bite is able to induce a hemorrhagic lesion over the MHD threshold for hemorrhagic venoms.

The hemorrhagic lesions induced by *O. brasiliensis* bites and the finding that a dog bitten by this tick has a slight delay in blood coagulation (Reck et al., *in press*), suggest that *O. brasiliensis* secretes potent anti-hemostatics. To verify if *O. brasiliensis* bites are able to disrupt host hemostatic system, we determined the bleeding tendency of bitten animals using rat tail-cut bleeding model and also measured the coagulation parameters PT and aPTT. The increased bleeding time at 6 hours after tick bite indicates

a systemic hemorrhagic tendency. Intriguingly, no alterations in PT and aPTT tests were observed. These findings could be explained by the differences among these methodologies; while PT and aPTT tests evaluate only the activity and levels of coagulation factors (Parry, 1989), the tail-cut bleeding model evaluate the hemostasis *in vivo*, which includes all components of this system, as coagulation factors, platelets and endothelium.

Clinical pathology information in victims of tick toxicosis, particularly in humans/animals bitten by *Ornithodoros* ticks are quite rare (Reck et al., *in press*). In this work we conducted a complete blood cell examination and examined the most important clinical pathology biochemical markers. Increase in eosinophil and basophil count has been frequently found in parasitic diseases and in non-infectious inflammatory skin lesions, such as allergy (Costa et al., 1997). This finding was also present in a dog bitten by *O. brasiliensis* (Reck et al., *in press*). The increase in CPK activity was also observed in the dog bitten by *O. brasiliensis* (Reck et al., *in press*) and in few human cases of tick toxicosis caused by other tick species (Boffey & Paterson, 1973). CPK increase can be attributed to potential tick saliva toxicity to skeletal muscle or cardiac tissue, since damage to these tissues are the mains causes of CPK increase (van der Veen & Willebrands, 1966). Lesions in cardiomyocytes were frequently related to the increase of specific CPK isoforms, particularly, the MB fraction (van der Veen & Willebrands, 1966). In bitten rats, a major increase in CPK-MB was observed 24 hours after tick bite, suggesting a cardiac injury in bitten animals. In some cases, the increase in CPK-MB activity could be associated to a sub-clinical condition (Gautam et al., 2004). Cardiac injury is the most severe clinical consequence of tick toxicosis induced by *O. savignyi*, which contains potent cardiotoxins in its saliva (Mans et al., 2002). Heart interstitial

edema and degeneration of myocytes were observed in mice bitten by *O. aff. puertoricencis* (Venzal et al., 2007). Despite the correlation between increased LDH activity and heart injury; this biochemical marker could be better described as a non-specific marker of cytotoxicity and tissue injury, since several pathological conditions can lead to LDH activity increase (Sobel & Shell, 1972). So, in bitten rats the increased LDH activity is possibly both a molecular marker of the extensive tissue damage at the site of tick bite and also myocardium injury.

Fibrinogen level showed a dual profile. At first, 6 hours after tick bite, animals showed a reduction in fibrinogen levels, which coincides with the time of increased bleeding (evaluated by tail-cut model). The causes of fibrinogen reduction are not clear to date, but may be associated with a fibrinolytic activity, already identified in some tick species (Francischetti et al., 2003). The presence of a fibrinolytic component in *O. brasiliensis* saliva remains as a subject for further investigations. Later, at 72 hours after tick bite, fibrinogen level increase. Although this fibrinogen increase seems paradoxal, it is a frequent finding in several inflammatory situations since this protein is also considered one of the most sensitive acute phase inflammation markers (Geiger et al., 1988).

The histopathological analysis showed a local lesion mainly characterized by severe hemorrhage, edema and slight cell degeneration. Occurrence of myocardial injury is compatible with CPK-MB increase and similar to what is observed for other *Ornithodoros* species, as *O. savignyi* and *O. aff. puertoricencis* (Venzal et al., 2007; Mans et al., 2008). These findings support the hypothesis of a cardiac injury associated with *O. brasiliensis* tick toxicosis and reinforces the severity of this condition. It is

important to note that histopathological analysis of animals bitten by *Ornithodoros* species are very rarely reported in literature.

All findings described here are compatible with an experimentally induced condition of tick toxicosis. The occurrence of disturbances and lesions immediately after tick bite and in an early period after bite (24-72 hours) reinforces the hypothesis of a non-infectious condition. Usually, in tick-borne diseases the onset of symptoms begins 5-10 days after tick bite (Bratton & Corey, 2005). In bitten rats, blood smears did not allowed the identification of any blood microorganism. It is important to note that, recently, studying a case of a dog showing a condition compatible with tick toxicosis after natural parasitism by *O. brasiliensis*, the possibility of infection by *Babesia* spp., *Hepatozoon* spp., *Coxiella* spp., *Borrelia* spp., *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp., and six *Rickettsia* species were excluded (Reck et al., *in press*). In this sense, *O. brasiliensis* is able to cause severe non-infectious disturbances directly associated with its bite, which is partially reproduced in experimental conditions. Moreover, this conclusion does not rule out the possibility that *O. brasiliensis* could be vector of a tick-borne disease. Indeed, this possibility is now under investigation.

This work showed that *O. brasiliensis* causes severe disturbances to its host. In spite of slightly differences between the condition observed in humans, dogs and rats, in all cases the tick bite could lead to both local and systemic disturbances. The finding that *O. brasiliensis* causes tick toxicosis together with recent epidemiological data (Reck et al., unpublished results) place this parasite as a serious public health hazard in Southern Brazil. Also, this work brings information to help in the understanding of the complex syndrome called tick toxicosis.



## Acknowledgements

The authors thank to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (FEPAGRO), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular (INCT-EM) for financial support. Special thanks to Dr. Renata Terra (UFRGS) for critical review of this manuscript.

## REFERENCES

- Aragão HB. *Ornithodoros brasiliensis* n. sp. *Bras Med.* 1923; 37: 20.
- Aragão HB. Notas sobre os *Ornithodoros brasiliensis*, *rostratus* e *turicata*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1931; 25: 227-231.
- Boffey GC, Paterson DC. Creatine phosphokinase elevation in a case of tick paralysis. *Can Med Assoc J.* 1973; 108: 866-868.
- Bratton RL, Corey R. Tick-borne disease. *Am Fam Physician.* 2005; 71(12): 2323-2330.
- Carstens E, Moberg GP. Recognizing pain and distress in laboratory animals. *ILAR J.* 2000; 41(2): 62-71.
- Costa JJ, Weller PF, Galli SJ. The cells of the allergic response: mast cells, basophils, and eosinophils. *JAMA.* 1997; 278, 1815-1822.
- Dolan TT, Newson RM. Sweating sickness in adult cattle. *Trop Anim Health Prod.* 1980; 12(2): 119-124.
- Francischetti IM, Mather TN, Ribeiro JM. Cloning of a salivary gland metalloprotease and characterization of gelatinase and fibrin(ogen)lytic activities in the saliva of the Lyme disease tick vector *Ixodes scapularis*. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003; 305(4): 869-875.

- Gautam PL, Katyal S, Wander GS, Kaur H. Isquemia miocárdica silenciosa em pacientes submetidos à prostatectomia transuretral: comparação entre anestesia subaracnóidea e peridural. *Rev Bras Anesthesiol.* 2004; 54(4): 491-500.
- Geiger T, Andus T, Klapproth J, Hirano T, Kishimoto T, Heinrich PC. Induction of rat acute-phase proteins by interleukin 6 in vivo. *Eur J Immunol.* 1988;18(5): 717-721.
- Gutiérrez JM, Gené JA, Rojas G, Cerdas L. Neutralization of proteolytic and hemorrhagic activities of Costa Rican snake venoms by a polyvalent antivenom. *Toxicon.* 1985; 23(6): 887-893.
- Hoogstraal H, Gallagher MD. Blisters, pruritus, and fever after bites by the Arabian tick *Ornithodoros (Alectorobius) muesebecki*. *Lancet.* 1982; 320: 288-289.
- Mans BJ, Gothe R, Neitz AW. Tick toxins: perspectives on paralysis and other forms of toxicoses caused by ticks. In Bowman AS, Nutall PA, eds. *Ticks – Biology, Disease and control*. New York, NY: Cambridge University Press; 2008: 108-126.
- Mans BJ, Steinmann CM, Venter JD, Louw AI, Neitz AW. Pathogenic mechanisms of sand tampan toxicoses induced by the tick, *Ornithodoros savignyi*. *Toxicon.* 2002; 40(7): 1007-1016.
- Martins JR, Doyle R, Barros-Battesti DM, Onofrio VC, Guglielmone AA. On the occurrence of *Ornithodoros brasiliensis* ARAGÃO (Acari: Argasidae) in São Francisco de Paula, RS, southern Brazil. *Neotrop Entomol.* 2011; 40(1): 143-144.
- Nazareth RA, Tomaz LS, Ortiz-Costa S, Atella GC, Ribeiro JM, Francischetti IM, Monteiro RQ. Antithrombotic properties of Ixolaris, a potent inhibitor of the extrinsic pathway of the coagulation cascade. *Thromb Haemost.* 2006; 96(1): 7-13.
- Ortmann C, Pfeiffer H, Brinkmann B. A comparative study on the immunohistochemical detection of early myocardial damage. *Int J Legal Med.* 2000; 113 :215–220.

- Parry BW. Laboratory evaluation of hemorrhagic coagulopathies in small animal practice. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 1989; 19: 729–742.
- Quinton JF. Nouveaux animaux de compagnie: petits mammifères. Issy les Moulineaux: Elsevier Masson; 2003: 208p.
- Reck J Jr, Berger M, Terra RM, Marks FS, da Silva Vaz I Jr, Guimarães JA, Termignoni C. Systemic alterations of bovine hemostasis due to *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infestation. *Res Vet Sci.* 2009; 86(1): 56-62.
- Reck J Jr, Soares JF, Termignoni C, Labruna MB, Martins JR. Tick toxicosis in a dog due to parasitism by *Ornithodoros brasiliensis* (mouro tick). *Vet Clin Pathol.* in press.
- Sharifi K, Mohammadi GR, Tafti AK. Outbreak of tick paralysis in a nomadic sheep flock in Iran. *Vet Rec.* 2003; 153: 631-632.
- Sobel BE, Shell WE. Serum enzyme determinations in the diagnosis and assessment of myocardial infarction. *Circulation.* 1972; 45(2): 471-482.
- van der Veen KJ, Willebrands AF. Isoenzymes of creatine phosphokinase in tissue extracts and in normal and pathological sera. *Clin Chim Acta.* 1966; 13(3): 312-316.
- Venzal JM, Estrada-Peña A, Fernández de Luco D. Effects produced by the feeding of larvae of *Ornithodoros* aff. *puertoricensis* (Acari: Argasidae) on laboratory mice. *Exp Appl Acarol.* 2007; 42: 217-223.
- Walker DH. Tick-transmitted infectious diseases in the United States. *Annu Rev Public Health.* 1998; 19: 237–269.

## Figure captions

Figure 1 - Hemorrhagic focus diameter: skin hemorrhage at the site of tick bite was measured at indicated times using a high-precision pachymeter. The results are expressed as mean  $\pm$  SEM of six animals *per* group.

Figure 2 - *O. brasiliensis* bite lesions: typical aspect of tick bite induced lesions in rat hind-limbs. Left panel, skin lesion 1 hour after tick bite. Right panel, skin lesion 12 hour after tick bite.

Figure 3 – Tail-cut bleeding assay: blood loss after tail cut was evaluated as an index of bleeding tendency. For data comparison, the bleeding was expressed as fold of control. The results are expressed as mean  $\pm$  SEM of four animals *per* group (\*\*  $p < 0.01$  compared with control group).

Figure 4 – Histological analysis of local lesion induced by *O. brasiliensis* bite: Histological (HE staining) findings of tick bite lesion (in rat hind-limb) at 72 hours after bite. Note the marked subcutaneous hemorrhage (triangles) and edema (asterisks); muscle degeneration (filled arrows), evinced by increased cytoplasmic eosinophilia and reduction of characteristic striations; and intraepidermal hemorrhage with epidermal detachment (open arrows). Bar 210  $\mu\text{m}$ .

Figure 5 – Histological analysis and IHC against troponin C in heart tissue of rats bitten by *O. brasiliensis*: Serial sections of heart papillary muscle of rats 72 hours after tick

bites. Panel A and B, HE staining showing myocardium degeneration; note retraction of cells, enhanced cytoplasmic eosinophilia and reduction/lack of muscle characteristic striations. Panel C and D, IHC against troponin C; note the diminished or absent staining for troponin C, which indicates cell injury. (Panel A and C, bar 350  $\mu\text{m}$ ; Panel B and D, bar 210  $\mu\text{m}$ )

Table 1

Clinical finding	Control <sup>#</sup>	Time after tick bites		
		6 h <sup>*</sup>	24 h <sup>**</sup>	72 h <sup>***</sup>
Hypermia of oral / ocular mucosa	0/6	61% (7/18)	42% (5/12)	17% (1/6)
Piloerection	0/6	72% (13/18)	33% (4/12)	17% (1/6)
Tachypnea	0/6	28% (5/18)	17% (2/12)	0% (0/6)
Claudication	0/6	17% (3/18)	8% (1/12)	0% (0/6)
Ocular and nasal discharge <sup>1</sup>	0/6	0% (0/18)	42% (5/12)	0% (0/6)
Pruritus <sup>2</sup>	0/6	72% (13/18)	50% (6/12)	33% (2/6)
Swollen lesion	0/6	89% (16/18)	75% (9/12)	33% (2/6)
Erythemic lesion	0/6	100% (18/18)	100% (12/12)	67% (4/6)

<sup>#</sup>Control animals were observed for the cited clinical findings during all experiment duration (72h)

<sup>\*</sup>Total animals observed at 6 hours after tick bite was 18

<sup>\*\*</sup>Total animals observed at 24 hours after tick bite was 12 (6 were killed at 6h)

<sup>\*\*\*</sup>Total animals observed at 72 hours after tick bite was 6 (6 were killed at 6h, and more 6 at 24h)

<sup>1</sup>Reddish mucous discharge

<sup>2</sup>Animals itching and licking the lesion site

Table 2

Blood parameters <sup>1</sup>	Control		Time after tick bite					
			6 h		24 h		72 h	
	Mean	± SEM	Mean	± SEM	Mean	± SEM	Mean	± SEM
Eosinophil count (/μL)	380 ± 36		1100 ± 150**		980 ± 130*		1020 ± 180*	
Basophil count (/μL)	90 ± 25		440 ± 110*		320 ± 90		290 ± 70	
CPK (U/L)	135 ± 37		149 ± 94		864 ± 156***		729 ± 116**	
CPK-MB (U/L)	18 ± 6		27 ± 9		91 ± 30*		31 ± 11	
Total LDH (U/L)	111 ± 39		109 ± 28		326 ± 63*		319 ± 57*	
Fibrinogen (g/L)	2.8 ± 0.1		1.5 ± 0.1*		2.2 ± 0.14		5.1 ± 0.5***	

<sup>1</sup>Other clinical pathology parameters revealed no significant alterations between control and experimental groups.

\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$

Figure 1

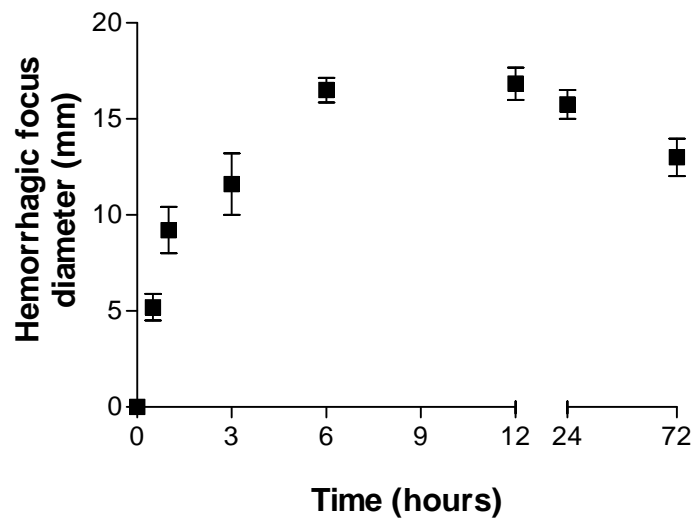




Figure 2



Figure 3

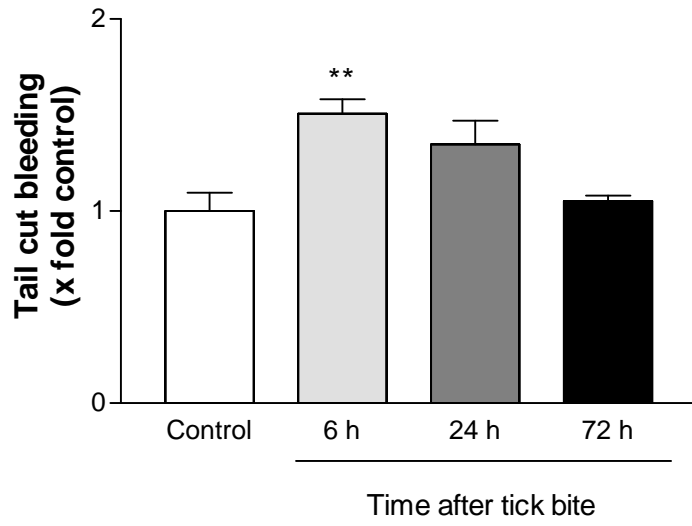


Figure 4

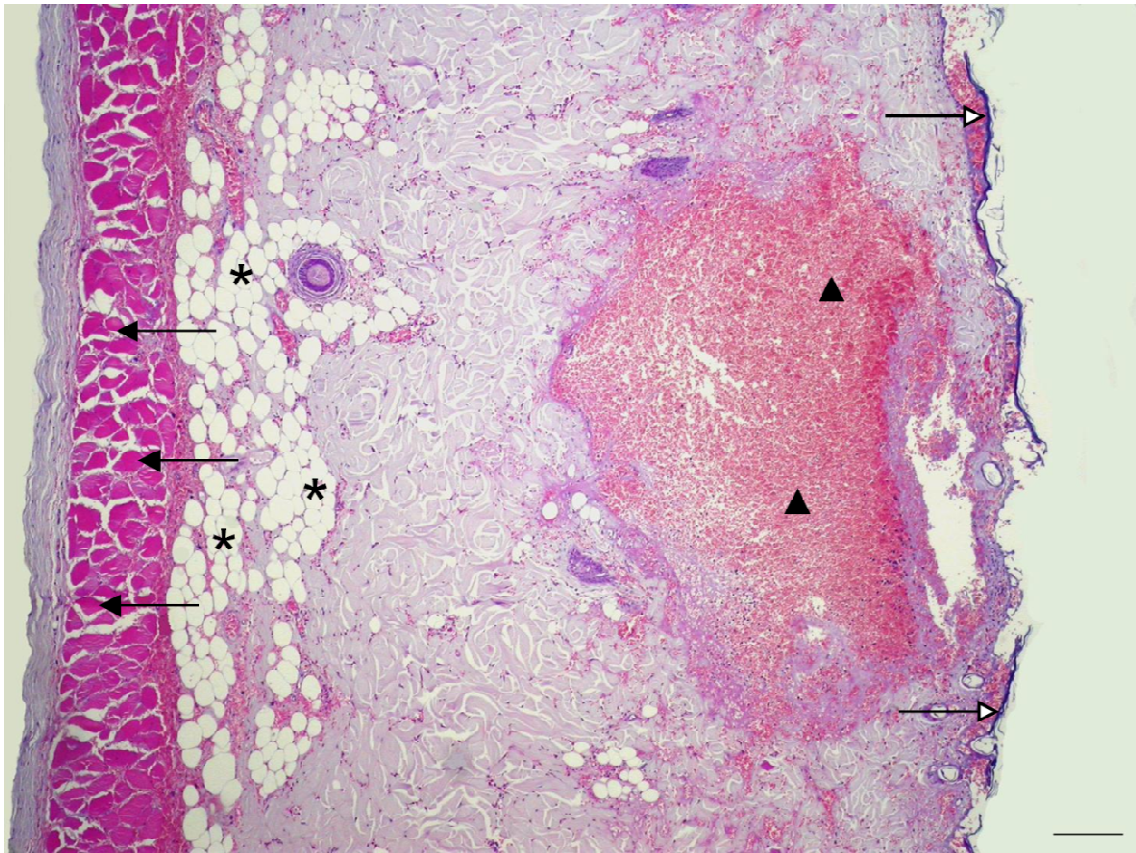
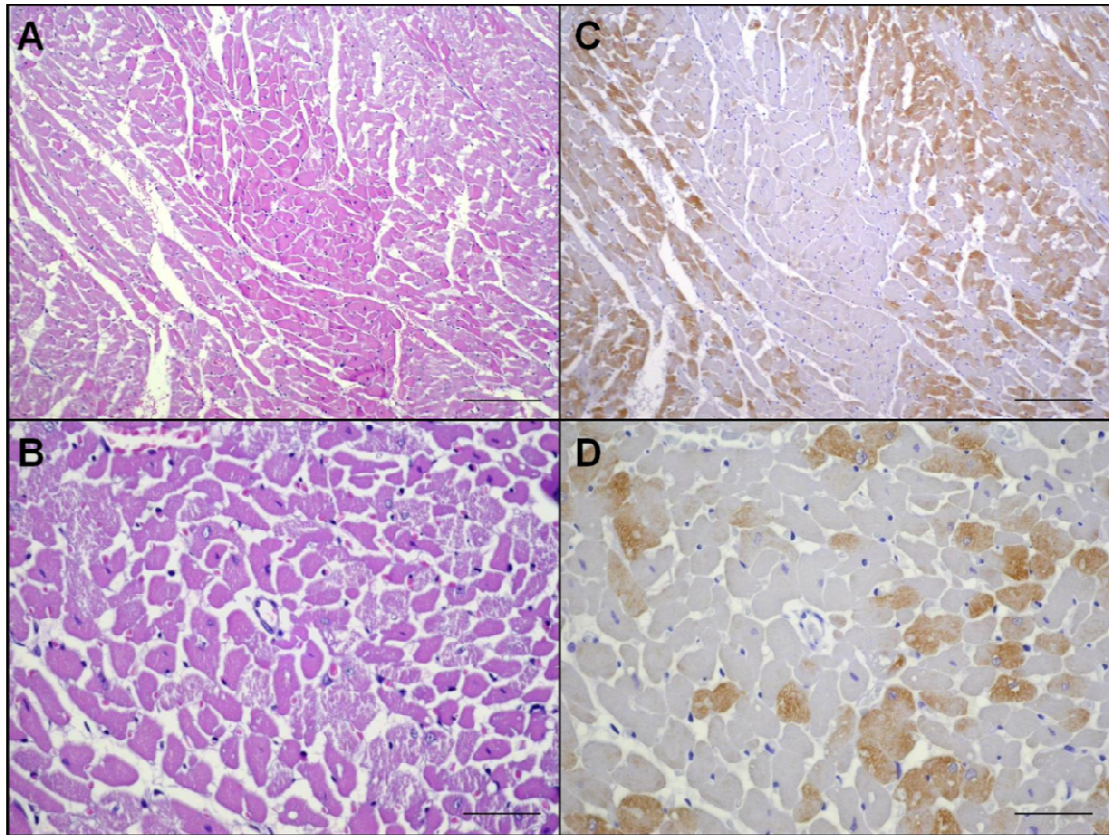


Figure 5



### 3.4. Capítulo IV

#### ***Ornithodoros brasiliensis* (mouro tick) salivary gland homogenate inhibits *in vivo* wound healing and *in vitro* endothelial cell proliferation**

Manuscrito a ser submetido para periódico científico internacional.

Neste capítulo, descreve-se que o homogenato de glândulas salivares de *O. brasiliensis* é capaz de inibir o processo de cicatrização *in vivo* e a proliferação endotelial *in vitro*. Este trabalho apresenta evidências de atividade anti-angiogênica e citotóxica do conteúdo salivar de *O. brasiliensis*, que podem ser responsáveis pelo desencadeamento de lesões observadas nos indivíduos picados pelo carrapato.

- *Short communication* -

***Ornithodoros brasiliensis* (mouro tick) salivary gland homogenate inhibits *in vivo*  
wound healing and *in vitro* endothelial cell proliferation**

Reck *et al.*

Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS),

Porto Alegre, RS, Brasil.

Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF), Eldorado do Sul, RS,

Brasil.

## ABSTRACT

*O. brasiliensis*, popularly known as mouro tick, is a nidicolous tick only found in Southern Brazil highland region. *O. brasiliensis* parasitism is frequently associated with a toxicosis syndrome which can lead to severe reactions, ranging from local pruritus and pain to systemic disturbances both in humans and dogs. One of the most frequently finding associated with *O. brasiliensis* bite is the development of a slow healing lesion at the site of tick attachment, which can take several weeks to heal. This work aimed to determine if *O. brasiliensis* salivary gland homogenate is able to modulate the skin wound healing process *in vivo*, using a model of excisional skin lesion in rats. Also, it was evaluated if *O. brasiliensis* salivary gland homogenate interferes with endothelial cell proliferation, a key-role phenomenon in wound healing. *O. brasiliensis* salivary gland homogenate significantly delays skin wound healing. The time to skin lesion full healing in control rats was 15 days, contrasting with 24 days in rats topically treated with *O. brasiliensis* salivary gland homogenate. Salivary gland homogenate has a strong cytotoxic activity upon cultured endothelial cells (LC<sub>50</sub> 13.6 mg/mL). Also, at sub-lethal concentrations ( $\leq 3$  mg/mL) the salivary gland homogenate has a remarkable anti-proliferative activity (IC<sub>50</sub> 0.7 mg/mL) upon endothelial cells. This is the first report on the characterization of biological activities of *O. brasiliensis* salivary compounds and reinforces the concept of wound healing modulation by tick salivary secretion. Results showed here helps in the understanding of *O. brasiliensis* tick toxicosis syndrome, and also increase knowledge on tick salivary bioactive compounds.

**Key-words:** argasidae tick, wound healing, endothelial cells, animal model, salivary gland

Ticks are blood-feeding arthropods widely distributed in the world, which can parasite humans and almost any vertebrate animal. Ticks are considered important public health hazards, since these arthropods can be vectors of several microbial diseases (Walker, 1998). In addition to tick-borne diseases, some ticks themselves can cause severe non-infectious symptoms related to its bite, which are generally designed as tick toxicosis syndrome (Mans et al., 2004). Ticks belonging to *Ornithodoros* genus are argasidae nidicolous ticks. These ticks are frequently associated with severe reactions to their bite, *ranging from local pain and pruritus to death* (Mans et al., 2004).

*O. brasiliensis*, popularly known as mouro tick, was first described in 1923 in Southern Brazil highland region (Aragão 1923), and until now was only found in this area. Since early reports, *O. brasiliensis* was considered a potential public health issue in Southern Brazil highland region (di Primio 1937), since tick bites were already associated with skin lesions (Pinto and di Primio, 1931), painful lesions (Aragão, 1936), and often to systemic disturbances, as headache, dyspnea and rise in body temperature (Davis, 1952). In this endemic region, anecdotal information reports the increasing of human parasitism cases by mouro tick in last years.

Recently, we have identified and recorded the clinical history of 28 retrospective human cases of *O. brasiliensis* parasitism (Reck et al., unpublished data). Our work indicated that one of the most frequently symptom associated with *O. brasiliensis* bite (reported by victims) is the development of a slow healing lesion at the tick attachment



site, being this finding present in approximately 90% of bitten people. Interestingly, in some people, bite lesions take more than three months to heal. The persistent lesion causes discomfort and itching in patients and can also favor the occurrence of opportunistic bacterial infections. This abnormal delayed wound healing process in *O. brasiliensis* bite lesion seems to be uncommon for arthropod bites.

This unusual characteristic of *O. brasiliensis* bite could be associated with modulatory effects of its saliva secreted into the host. It is well known that tick salivary compounds can display a large array of pharmacological activities, which can modulate several local and systemic physiological processes (Mans & Neitz, 2004). In fact, recently it was shown that saliva of some hard-ticks inhibits angiogenesis (endothelium proliferation), and this modulation possibly interferes in the wound healing process (Francischetti et al., 2005). The aims of this work are to determine if *O. brasiliensis* salivary gland homogenate is able to modulate skin wound healing process *in vivo*, and if it modulates endothelial cell proliferation, a central process in wound healing.

In this work were utilized male Wistar rats (180 days,  $\approx$  400 g). The rats were maintained in temperature-controlled (21–24 °C, in 12-h light/dark cycles) rooms with water and food *ad libitum*. All experiments were carried out in accordance with ethical guidelines about animal experimentation, and all procedures were approved by local ethical committee (CEUA/IPVDF protocol number 04/2011). For *in vitro* experiments, EAhy926 endothelial cells were used. This lineage is a human derived endothelial cell line (Edgell *et al.*, 1983). EAhy926 has been used as a model to study the endothelium, since it displays conserved functional characteristics of an endothelial cell (Edgell *et al.*, 1983). Cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 10% fetal calf serum (FCS), penicillin/streptomycin (200 units/mL and 200

$\mu\text{g/mL}$ , respectively), and supplemented with 100  $\mu\text{M}$  hypoxanthine, 0.4  $\mu\text{M}$  aminopterin, and 16  $\mu\text{M}$  thymidine (HAT media supplement), at 37 °C in an incubator with humidified atmosphere of air/CO<sub>2</sub> (95%/5%). As previously described, this cell line does not require any additional growth factor (Edgell *et al.*, 1983).

To evaluate cutaneous wound healing *in vivo* the classical model of excisional wound healing of rat skin (Hegggers et al., 1996; Michalik et al., 2001; Martins et al., 2006) with minor modifications was employed. Briefly, rats were anesthetized with an association of xylazine/ketamine (15/90 mg/kg, i.p.), and placed in ventral decubitus. A full remove of dorsal hair and asepsis was performed. Then, a fragment (5 x 5 mm) of cutaneous tissue was carefully and quickly removed with a scalpel and tweezers by a DVM. Immediately after the tissue was removed, the treatments were performed applying 100  $\mu\text{L}$  saline solution or tick salivary gland homogenate over the excision lesion with a pipette (8 animals per group). *O. brasiliensis* tick salivary gland homogenate was prepared by sonication of fresh salivary glands carefully dissected (in cold sterile saline) from adult ticks 1 day after feeding on Wistar rats. The homogenate was kept at -80° C until use. The concentration of salivary gland homogenate applied over the excision lesion was adjusted to be equivalent to the protein amount of 1 whole salivary gland ( $\approx$  5  $\mu\text{g}$  protein). Lesion was inspected and a photographic record was obtained at days 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24 after excision. All photos were taken with a digital camera (12 mp) at the same distance to the rats. For picture record, rats were previous slight sedated with acepromazine (6 mg/Kg, i.p.) to facilitate animal handle and procedure. The photos were transferred to a computer and the lesion area were selected, analyzed and calculated by ImageTool 3.0 software (UTHSCSA, San Antonio, USA). The results are expressed as % of lesion area at day 0.

To address the effects of *O. brasiliensis* salivary gland homogenate in endothelium, EAhy926 cells were utilized. Before the investigation of anti-proliferative activity, the cytotoxicity of salivary gland homogenate was checked to avoid misinterpretation in the proliferation assays. Indeed, it has been shown that salivary secretion of some ticks induces cell death (Francischetti et al., 2005). Cytotoxicity of *O. brasiliensis* salivary gland homogenate to EAhy926 cells 6 hours after incubation was investigated by a quantitative spectrophotometric method using TOX-4<sup>®</sup> *in vitro* toxicology assay kit (Sigma-Aldrich, St Louis, USA), according the manufacturer instructions.

The effects of *O. brasiliensis* salivary gland homogenate on endothelial proliferation were investigated. Cells were seeded in 96-well microplates at a 100,000 cells/mL density. Two microplates were separated (and cell number quantified) to be further used as indicators of initial cell quantity, and other microplates were used in different treatments ( $\approx$  60% confluence). The cells were treated with saline or sub-lethal doses of salivary gland homogenate (3, 1.5, 0.75, 0.375, 0.1875, and 0.09375 mg of protein/mL) (6 wells per group). After 48 hours incubation the number of cells in each microplate well was determined by neutral red uptake (absorbance at 540nm) (Fautz et al., 1991). Cell proliferation was calculated according established by Zhang et al. (2000), with minor modifications. For data comparison, it was considered 100% cell proliferation the product of  $Abs_{540}$  (in neutral red assay) of saline treated cells after 48h minus  $Abs_{540}$  of cells not treated and quantified immediately after cell seeding (as mentioned before). The proliferation of cells treated with *O. brasiliensis* salivary gland homogenate was calculated subtracting the  $Abs_{540}$  of treated cells from the value of cells after seeding. Results were obtained by 6 independent experiments.

All results are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. of  $n$  samples. Statistical significance of *in vivo* wound healing model was analyzed by Student's  $t$  test, and statistical analysis of cytotoxicity and proliferation assays were carried out using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett *post hoc* test. Values of  $P$  that were under 0.05 were considered statistically different. All analyses were done using GraphPad Prism 3.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA) software.

The treatment of induced excisional lesion of rats with *O. brasiliensis* salivary gland homogenate significantly delayed skin wound healing (**Figure 1**). The wound area was significantly greater in treated rats during all experiment time. Moreover, the average time to complete healing in control rats were 15 days, in contrast with 24 days for rats topically treated with *O. brasiliensis* salivary gland homogenate.

*O. brasiliensis* salivary gland homogenate also has a strong cytotoxic activity upon endothelial cells (**Figure 2A**). The calculated  $LC_{50}$  (lethal concentration for 50% cells) was 13.6 mg/mL. In sub-lethal concentrations ( $\leq 3$  mg/mL), the salivary gland homogenate also display a remarkable anti-proliferative activity (**Figure 2B**). The calculated  $IC_{50}$  (inhibitory concentration to reduce 50% cell proliferation) was 0.7 mg/mL.

The concept that tick saliva could inhibit wound healing was recently introduced. It was suggested based on the observation that *Ixodes scapularis* saliva and salivary glands induce cell death, inhibit endothelial cell proliferation, and avoid sprouting formation in isolated aorta (Francischetti et al., 2005). Since angiogenesis is a key step in wound healing, it was proposed that ticks that evolved to long-term parasitism (hard-ticks) could block wound healing to allow hematophagy. However, despite the

importance of this seminal proposal, until now there was no direct *in vivo* demonstration showing tick salivary secretion modulating cutaneous wound healing.

As far as we are aware, the presence of a strong cytotoxic activity of tick salivary glands, particularly upon endothelium, is not fully documented yet. *Rhipicephalus microplus* saliva, even at high concentrations has no toxic effect upon endothelial cells (Reck et al., 2009). *I. scapularis* saliva is cytotoxic to endothelial cells (Francischetti et al., 2005), but unfortunately there is no DL<sub>50</sub> data available to compare with. The scarce number of reports on cytotoxicity of tick salivary compounds could be linked to the fact that studies on tick salivary biological activities were done almost only with hard-ticks. Hard-ticks evolved in a context of a long feeding time, in which it is essential for tick do not be “noted” by host. Thus, the presence of a marked cytotoxic activity, causing tissue damage, could lead to parasite remove/detachment before the blood meal was complete. In contrast, argasidae ticks do not show a long-term parasitism. These ticks induce severe clinical findings to the host, which can lead to massive tissue damage or even death, as observed in *O. savignyi* toxicosis (Mans et al., 2004). A hypothesis to justify the evolution advantage of these deleterious effects, like malaise and discomfort caused by lesions, can be a decrease in grooming habits and in host deambulatory activity, increasing the time spent in burrow (frequently where ticks are found).

Salivary gland homogenate of *O. brasiliensis* also inhibits endothelial proliferation, a crucial step of wound healing. This activity seems to be much greater than reported for other tick species: while in *I. scapularis*, the IC<sub>50</sub> for anti-proliferative effects is  $\approx 0.2$  salivary gland pairs (Francischetti et al., 2005); in *O. brasiliensis*, the IC<sub>50</sub> is  $\approx 0.03$  salivary gland pairs. Both cytotoxic and anti-proliferative activities seem to contribute to the delayed wound healing, and also to other clinical findings observed in

*O. brasiliensis* toxicosis. Further studies are necessary to identify the importance/impact of cytotoxic molecules in the pathological reactions to argasidae bite. In this sense and considering the reports of toxicosis induced by argasidae ticks (Herms 1916, Hoogstraal and Gallagher 1982, Mans et al., 2004), it is not unconceivable to consider that some ticks produce a venomous-like salivary secretion.

This work reports for the first time the characterization of biological activities of *O. brasiliensis* salivary compounds and reinforces the concept of wound healing modulation by tick salivary secretion. The set of results showed here contributes to the understanding of tick toxicosis syndromes, particularly the one caused by *O. brasiliensis*.

**Acknowledgements:** The authors thank to Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (FEPAGRO) for financial support. Special thanks to Dr. Renata Terra (UFRGS) for critical review of this manuscript.

## REFERENCES

- Aragão HB. *Ornithodoros brasiliensis* n. sp. *Bras Med.* 1923; 37: 20.
- Aragão HB. Ixodidas brasileiros e de alguns países limitrophes. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1936; 31: 759-844.
- Davis GE. Observations on the biology of the Argasid tick, *Ornithodoros brasiliensis* Aragão, 1923, with the recovery of a spirochaete *Borrelia brasiliensis*, n. sp. *J Parasitol.* 1952; 38: 473-476.

- di Primio R. Transmissores de doenças no Rio Grande do Sul. *Arq Riogrand Med.* 1937; 306: 406-408.
- Edgell CJ, McDonald CC, Graham JB. Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1983; 80: 3734-3737.
- Fautz R, Husein B, Hechenberger C. Application of the neutral red assay (NR assay) to monolayer cultures of primary hepatocytes: rapid colorimetric viability determination for the unscheduled DNA synthesis test (UDS). *Mutat Res.* 1991; 253(2):173-179.
- Francischetti IM, Mather TN, Ribeiro JM. Tick saliva is a potent inhibitor of endothelial cell proliferation and angiogenesis. *Thromb Haemost.* 2005; 94(1):167-174.
- Heggors JP, Kucukcelebi A, Listengarten D, Stabenau J, Ko F, Broemeling LD, Robson MC, Winters WD. Beneficial effect of Aloe on wound healing in an excisional wound model. *J Altern Complement Med.* 1996; 2(2):271-277.
- Hermes WB. The Pajaroello tick (*Ornithodoros coriaceus* Koch) with special reference to life history and biting habits. *J Parasitol.* 1916; 2: 137-142.
- Hoogstraal H, Gallagher MD. Blisters, pruritus, and fever after bites by the Arabian tick *Ornithodoros (Alectorobius) muesebecki*. *Lancet.* 1982; 320: 288-289.
- Mans BJ, Gothe R, Neitz AW. Biochemical perspectives on paralysis and other forms of toxicoses caused by ticks. *Parasitology.* 2004; 129: S95-S111.
- Mans BJ, Neitz AW. Adaptation of ticks to a blood-feeding environment: evolution from a functional perspective. *Insect Biochem Mol Biol.* 2004; 34: 1-17.
- Martins NLP, Malafaia O, Ribas-Filho JM, Heibel M, Baldez RN, Vasconcelos PRL, Moreira H, Mazza M, Nassif PAN, Wallbach TZ. Healing process in cutaneous

- surgical wounds in rats under the influence of *Orbignya phalerata* aqueous extract. *Acta Cir Bras*. 2006; 21(suppl. 3): 66-75.
- Michalik L, Desvergne B, Tan NS, Basu-Modak S, Escher P, Rieusset J, Peters JM, Kaya G, Gonzalez FJ, Zakany J, Metzger D, Chambon P, Duboule D, Wahli W. Impaired skin wound healing in peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)alpha and PPARbeta mutant mice. *J Cell Biol*. 2001; 154(4): 799-814.
- Pinto C, di Primio R. Contribuição para a biologia dos Ixodidae do Estado do Rio Grande do Sul (Brasil). *Rev Med Cir Bras*. 1931; 34: 5-6.
- Reck J Jr, Berger M, Marks FS, Zingali RB, Canal CW, Ferreira CA, Guimarães JA, Termignoni C. Pharmacological action of tick saliva upon haemostasis and the neutralization ability of sera from repeatedly infested hosts. *Parasitology*. 2009; 136(11): 1339-1349.
- Walker DH. Tick-transmitted infectious diseases in the United States. *Annu Rev Public Health*. 1998; 19: 237-269.
- Zhang JC, Claffey K, Sakthivel R, Darzynkiewicz Z, Shaw DE, Leal J, Wang YC, Lu FM, McCrae KR. Two-chain high molecular weight kininogen induces endothelial cell apoptosis and inhibits angiogenesis: partial activity within domain 5. *FASEB J*. 2000; 14(15): 2589-600.



## Figure captions

Figure 1. Effects of *O. brasiliensis* salivary gland homogenate upon rat skin wound healing model. The results are expressed as percentage of lesion area at day 0. The results showed are the mean  $\pm$  SEM of eight animals *per* group (\*p < 0.05, \*\*p < 0.01, compared with the value of control group at same day).

Figure 2. Effects of *O. brasiliensis* salivary gland homogenate upon endothelial cells.

Panel A, evaluation of cytotoxicity of *O. brasiliensis* salivary gland homogenate after 6 hours incubation with EAhy926 endothelial cells. Panel B, effects of *O. brasiliensis* salivary gland homogenate upon EAhy926 endothelial cell proliferation after 48 hours incubation. The results are expressed as mean  $\pm$  SEM of six independent experiments (\*p < 0.05, \*\*p < 0.01, compared with non-treated cells).

Figure 1

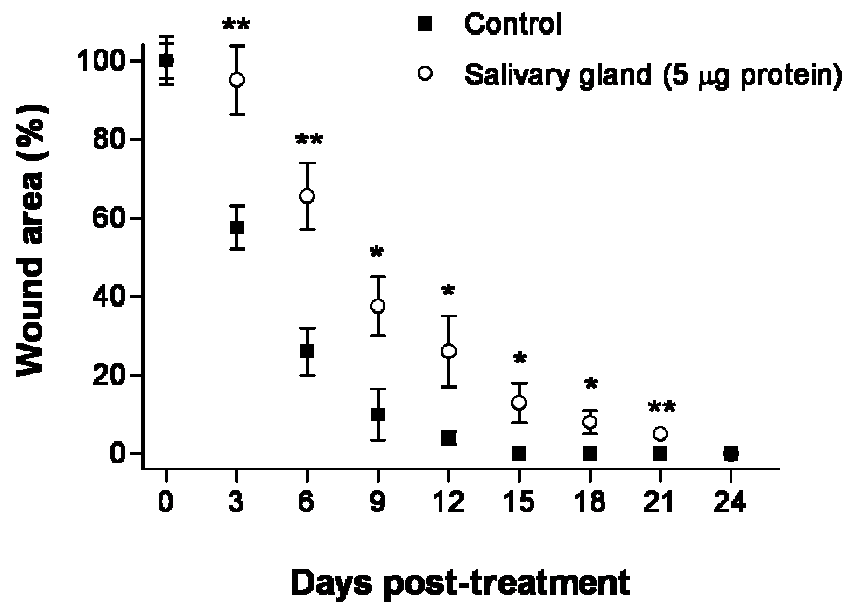
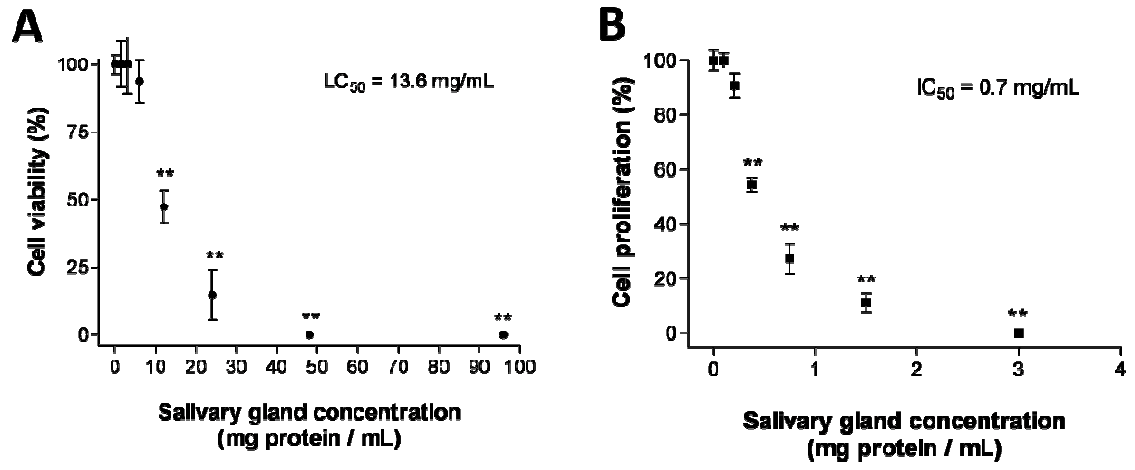


Figure 2



#### 4. DISCUSSÃO & CONCLUSÕES

É notável o impacto dos carrapatos na saúde humana e na produção animal (DANIEL et al., 2008). O entendimento das características biológicas e epidemiológicas do parasitismo pelas diferentes espécies de carrapatos, bem como das consequências deste fornecem informação científica que contribui significativamente para diferentes áreas do conhecimento (LUZ et al., 2010). Os avanços gerados com esses estudos são subsídios tanto para o avanço da ciência básica, como dão suporte para o planejamento de pesquisas aplicadas e para tomada de decisões referentes ao controle e prevenção.

Neste trabalho, buscamos caracterizar, com uma abordagem ampla, mas objetiva, os principais aspectos do parasitismo pelo *O. brasiliensis*, um carrapato com destacada importância regional, visto ser encontrado (pelo menos até o momento) somente no Estado do Rio Grande do Sul (RS). A restrita distribuição geográfica deste carrapato, assim como suas peculiaridades, tornou peremptória a dedicação de pesquisadores e instituições de pesquisa locais ao estudo deste parasito. Nesse sentido, buscamos realizar um trabalho que atendesse tanto as necessidades da identificação e caracterização de um problema regional, mas que simultaneamente fornecesse informações que tivessem um escopo global. Este escopo nos guiou para que buscássemos gerar informações que pudessem ajudar no entendimento (i) do parasitismo por argasídeos; (ii) das síndromes tóxicas associadas à picada de carrapatos; e (iii) dos fenômenos mediados pelos componentes salivares dos carrapatos. Todos estes aspectos, de relevância e com aplicação em diferentes áreas e regiões do mundo.

Iniciamos este trabalho a partir das informações e dados obtidos por Martins e colaboradores (2011). Esta publicação trouxe à tona a re-emergência de um antigo e quase esquecido problema característico da região dos Campos de Cima da Serra do RS:

o parasitismo pelo carrapato mouro. Este relato também nos levou a refletir sobre algumas das características marcantes do *O. brasiliensis* e levantou diversos questionamentos que, em nossa visão, deveriam ser investigados: (i) Qual a distribuição do *O. brasiliensis* na região de ocorrência? (ii) Quais as características de seu habitat e da população na sua área de ocorrência? (iii) Existem fatores de risco associados a sua ocorrência? (iv) Qual o real impacto do parasitismo em humanos? (v) Qual o impacto do parasitismo nos animais domésticos? (vi) Quais seus hospedeiros habituais/naturais? (vii) Como é seu ciclo, alimentação, reprodução? (viii) Qual sua relação genética com outras espécies de *Ornithodoros* spp? (ix) Qual a percepção da população e das autoridades sanitárias? (x) Quais os principais problemas clínicos desencadeados pelo parasitismo em humanos? (xi) Quais os principais problemas clínicos desencadeados pelo parasitismo em animais domésticos? (xii) O conjunto dos efeitos causados pela picada se enquadra na definição de toxicose não-infecciosa? (xiii) Os efeitos causados pelo parasitismo podem ser associados a um agente infeccioso? (xiv) É possível observar efeitos nocivos do parasitismo em condições experimentais? (xv) Quais as principais alterações clínicas, bioquímicas e patológicas induzidas pelo parasitismo em animais? (xvi) Qual a distribuição temporal dos casos de parasitismo em humanos e animais? (xvii) Quais as melhores abordagens de controle e prevenção? (xviii)? Qual mecanismo desencadeia as lesões induzidas pelo parasitismo? (xix) O conteúdo salivar do carrapato apresenta atividades biológicas que possam ser associadas ao quadro clínico? E (xx) quais são as principais “toxinas” encontradas na sua saliva?

Obviamente, não temos pretensão de imaginar que obtivemos todas estas respostas, contudo a caracterização do parasitismo por *O. brasiliensis* descrita nesta tese

pode fornecer boa parte destas respostas e indícios para que as perguntas restantes sejam futuramente respondidas.

No primeiro capítulo desta tese, descrevemos um estudo epidemiológico que descreve características da população e do habitat do *O. brasiliensis*, bem como de casos retrospectivos de parasitismo humano e em animais, particularmente em cães. Além disso, este estudo determinou a prevalência e os fatores de risco associados à presença do carrapato mouro. O levantamento de diversas informações sobre os locais de ocorrência de *O. brasiliensis* evidenciaram como e onde são geralmente encontrados: perto das habitações humanas e enterrados no solo em pequenas áreas com grande densidade de parasitos. A análise dos fatores de risco demonstrou que diversos fatores potencialmente importantes não influenciam a chance de ocorrência de *O. brasiliensis*, entre eles o uso de pesticidas, a renda familiar, a presença de suínos, a ocorrência de outras espécies de carrapatos. Os fatores que aumentam a probabilidade de ocorrência deste carrapato foram a falta de higiene e a presença de porão com chão de terra na propriedade. Ademais, identificamos 28 pessoas e 11 cães previamente parasitados. A partir de relatos fornecidos pela população local foi possível identificar os sintomas mais comuns associados a este parasitismo. Além do homem e do cão, coletamos evidências indicando que *Conepatus chinga* (zorrilho) e *Dasypus hybridus* (tatu-mulita) podem servir de hospedeiros. A grande falta de conhecimento das autoridades médicas sobre o assunto também chama a atenção, bem como a falta de procura por atendimento pelas pessoas picadas. Este trabalho forneceu detalhes sobre as características da área de ocorrência natural deste parasito e consolidou a idéia da severidade clínica do parasitismo por *O. brasiliensis*, que encaixa-se na definição de toxicose por carrapatos.

Os dois capítulos seguintes da tese apresentaram a descrição das evidências clínicas, bioquímicas e patológicas da síndrome associada à picada de *O. brasiliensis*. Primeiramente, em um cão naturalmente exposto ao carrapato, e no capítulo seguinte em ratos experimentalmente infestados. Estes capítulos fornecem os primeiros dados de um acompanhamento detalhado dos efeitos do parasitismo pelo carrapato mouro. Os achados de ambos os trabalhos são compatíveis entre si e com as descrições dos casos retrospectivos em humanos. Estes dados mostram a severidade do quadro induzido pela picada de *O. brasiliensis* e detalham as principais alterações nos animais. Tanto no parasitismo natural, como no protocolo experimental os animais não apresentaram agentes infecciosos associados aos sinais clínicos, o que reforça a idéia de que o parasitismo é capaz de levar diretamente a distúrbios no hospedeiro. O conjunto destes trabalhos, somados à descrição dos casos retrospectivos fornece diversas informações clinico-patológicas sobre esta condição. Contudo, como já ressaltado previamente na tese, isso não exclui a possibilidade de que o *O. brasiliensis* também possa ser vetor de agentes infecciosos.

Por fim, no último capítulo desta tese investigamos alguns efeitos biológicos do conteúdo da glândula salivar de *O. brasiliensis*, usando um modelo animal e também células em cultura. Como uma das características marcantes da picada por *O. brasiliensis* é a indução de uma lesão de lenta cicatrização, buscamos averiguar se componentes salivares deste carrapato apresentavam efeito direto sobre o processo de cicatrização. Demonstramos que o extrato de glândulas salivares inibe a cicatrização *in vivo*, possivelmente por inibir a proliferação endotelial, um passo-chave no processo cicatricial. Estes resultados não só ajudam a entender a síndrome clínica, como também podem servir de base para pesquisas de novos compostos anti-angiogênicos, uma área

emergente da biologia celular. Além desses efeitos, demonstramos que diferentemente da maior parte dos carrapatos, o conteúdo salivar do *O. brasiliensis* apresenta uma marcante atividade citotóxica que, por sua vez, também pode responder por alguns dos efeitos clinicamente relevantes.

*O. brasiliensis* é um carrapato que apresenta diversas características peculiares, mas, também algumas comuns a outros argasídeos e carrapatos causadores de toxicose (DAVIS, 1952; MARTINS et al., 2011). O entendimento de sua adaptação em seu habitat e o impacto disto na população de hospedeiros podem nos ajudar a compreender os processos que ocorrem em sua região endêmica, como também servir de modelo de estudo para entender outras relações parasito-hospedeiro. Os dados aqui apresentados ressaltam a necessidade de mais estudos para compreendermos um processo frequentemente negligenciado na parasitologia, principalmente na região neotropical: as toxicoses causadas por carrapatos.

Um dos maiores desafios da pesquisa na área biológica é a integração entre pesquisas básicas, de campo e aplicadas. Este desafio também é determinante no enriquecimento dos conhecimentos das áreas de parasitologia e toxicologia, que constituem áreas estratégicas nos países em desenvolvimento. Frente a isso, pensamos que a abordagem utilizada nesta tese buscou integrar dados de campo e de laboratório, experimentais e clínicos, básicos e aplicados, de modo a permitir uma ampla abordagem na caracterização da tão complexa problemática do carrapato mouro.

Nesse contexto, espera-se que o conjunto dos dados desta tese forneça não somente respostas e novos subsídios, mas também gere novos questionamentos, contribuindo no avanço da compreensão dos fatores que determinam as peculiaridades



evolutivas, de habitat e biológicas do *O. brasiliensis* (e quiçá de outros carrapatos), bem como dos efeitos desencadeados pelo seu parasitismo.

## REFERÊNCIAS

- ANDERSON, J. M. & VALENZUELA, J. G. Tick saliva: from pharmacology and biochemistry to transcriptome analysis and functional genomics. In: Bowman, A. S. & Nutall, P. A. **Ticks – Biology, Disease and control**. Cambridge University Press, New York, p. 92-107, 2008.
- ARAGÃO, H. B. *Ornithodoros brasiliensis* n. sp. **Bras Med.**, 37: 20, 1923.
- ARAGÃO, H. B. Notas sobre os *Ornithodoros brasiliensis*, *rostratus* e *turicata*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 25: 227-231, 1931.
- ARAGÃO, H. B. Ixodidas brasileiros e de alguns países limitrophes. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 31: 759-844, 1936.
- ARTECHE, C. C. P. & LARANJA, R. J. Epidemiologia do *Boophilus microplus* (Can.,1888): Incidência sazonal no Sudeste do Rio Grande do Sul. **Bol Inst Pesq Vet Desidério Finamor**, 6: 29-43, 1979.
- ASSADIAN, O. & STANEK, G. Theobald Smith – The discoverer of ticks as vectors of disease. **Mid Eur J Med.**, 114(13-14): 479-481, 2002.
- ATWELL, R. B. & CAMPBELL, F. E. Reactions to tick antitoxin serum and the role of atropine in treatment of dogs and cats with tick paralysis caused by *Ixodes holocyclus*: a pilot survey. **Aust Vet J.**, 79(6): 394-397, 2001.
- BALASHOV, Y. S. **Bloodsucking ticks (Ixodoidea) - vectors of diseases of man and animals**. Entomological Society of America Publications, College Park, 1972.
- BARROS-BATTESTI, D. M.; ONOFRIO, V. C.; NIERI-BASTOS, F. A.; SOARES, J. F.; MARCILI, A.; FAMADAS, K. M.; FACCINI, J. L. H.; RAMIREZ, D. G.; DOYLE, R. L.; MARTINS, J. R.; RECK, J. Jr.; GUGLIELMONE, A. A.;

LABRUNA, M. B. *Ornithodoros brasiliensis* Aragão (Acari: Argasidae): description of the larva, redescription of male and female, and neotype designation. **Zootaxa**, *in press*.

CAMICAS, J. L.; HERVY J. P.; ADAM, F.; MOREL, P. C. **Les tique du monde**. Institut Français de Recherche Scientifique pour le Développement en Coopération, Paris, 1998.

CANÇADO, P. H. D. Carrapatos de animais silvestres e domésticos no Pantanal Sul Mato-grossense (sub-região da Nhecolândia): espécies, hospedeiros e infestações em áreas de manejos diferentes. Tese de doutorado, Programa de pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Seropédica, 2008.

CHEN, C. I.; KING, D. P.; BLANCHARD, M. T.; HALL, M. R.; ALDRIDGE, B. M.; BOWEN, L.; STOTT, J. L. Identification of the etiologic agent of epizootic bovine abortion in field-collected *Ornithodoros coriaceus* Koch ticks. **Vet Microbiol.**, 120(3-4): 320-327, 2007.

CRAWFORD, P. & MITCHELL, D. Tick paralysis as a cause of autonomic dysfunction in a 57-year-old female. **South Med J.**, 102(2): 190-192, 2009.

DANIEL, M.; KOLÁR, J.; ZEMAN, P. Analysing and predicting the occurrence of ticks and tick-borne diseases using GIS. In: Bowman, A. S. & Nutall, P. A. **Ticks – Biology, Disease and control**. Cambridge University Press, New York, p. 377-407, 2008.

DANTAS-TORRES, F.; ONOFRIO, V. C.; BARROS-BATTESTI, D. M. The ticks (Acari: Ixodida: Argasidae, Ixodidae) of Brazil. **Syst Appl Acarol.**, 14: 30-46, 2009.

DARWIN, C. **The voyage of HMS Beagle**. Smith, Elder and Co., London, 1839.

- DAVIS, G. E. Observations on the biology of the Argasid tick, *Ornithodoros brasiliensis* Aragão, 1923, with the recovery of a spirochaete *Borrelia brasiliensis*, n. sp. **J Parasitol.**, 38: 473-476, 1952.
- Del FIOLE, F. S.; JUNQUEIRA, F. M.; ROCHA, M. C. P.; TOLEDO, M. I.; BARBERATO FILHO, S. A febre maculosa no Brasil. **Rev Panam Salud Publica.**, 27(6): 461-466, 2010.
- di PRIMIO, R. Transmissores de doenças no Rio Grande do Sul. **Arq Riogrand Med.**, 306: 406-408, 1937.
- DIAZ, J. H. A 60-year meta-analysis of tick paralysis in the United States: a predictable, preventable, and often misdiagnosed poisoning. **J Med Toxicol.**, 6(1): 15-21, 2010.
- DOLAN, T. T. & NEWSON, R. M. Sweating sickness in adult cattle. **Trop Anim Health Prod.**, 12(2): 119-124, 1980.
- EVANS, D. E.; MARTINS, J. R.; GUGLIELMONE, A. A. A review of the ticks (Acari: Ixodida) of Brazil, their hosts and geographic distribution - 1. The state of Rio Grande do Sul, southern Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 95(4): 453-470, 2000.
- GONZALES, J. C.; SILVA, N. R.; WAGNER, E. M. O ciclo parasitário de *Boophilus microplus* (Can. 1887) em bovinos estabulados. **Arq Fac Med Vet UFRGS**, 2: 25-34, 1974.
- GUIMARÃES, J. H.; TUCCI, E. C.; BARROS-BATTESTI, D. M. **Ectoparasitos de importância veterinária**. Editora Plêiade, São Paulo, 2001.
- GUGLIELMONE, A. A.; ROBBINS, R. G.; APANASKEVICH, D. A.; PETNEY, T. N.; ESTRADA-PEÑA, A.; HORAK, I. G.; SHAO, R.; BARKER, S. C. The Argasidae,

Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world: a list of valid species names. **Zootaxa**, 2528: 1-28, 2010.

HALL-MENDELIN, S.; CRAIG, S. B.; HALL, R. A.; O'DONOGHUE, P.; ATWELL, R. B.; TULSIANI, S. M.; GRAHAM, G. C. Tick paralysis in Australia caused by *Ixodes holocyclus* Neumann. **Ann Trop Med Parasitol.**, 105(2): 95-106, 2011.

HART, B. L. Biological basis of the behavior of sick animals. **Neurosci Biobehav Rev.**, 12(2): 123-137, 1988.

HERMS, W. B. The Pajaroello tick (*Ornithodoros coriaceus* Koch) with special reference to life history and biting habits. **J Parasitol.**, 2: 137-142, 1916.

HOOGSTRAAL, H. Argasid and Nuttalliellid ticks as parasites and vectors. **Adv Parasitol.**, 24: 135-238, 1985.

HOOGSTRAAL, H. & GALLAGHER, M. D. Blisters, pruritus, and fever after bites by the Arabian tick *Ornithodoros (Alectorobius) muesebecki*. **Lancet**, 320: 288-289, 1982.

INOKUMA, H.; KERLIN, R. L.; KEMP, D. H.; WILLADSEN, P. Effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on the bovine immune system. **Vet Parasitol.**, 47(1-2): 107-118, 1993.

KLOMPEN, H. & GRIMALDI, D. First mesozoic record of a parasitiform mite: a larval argasid tick in cretaceous amber (Acari: Ixodida: Argasidae). **Ann Entomol Soc America.**, 94(1): 10-15, 2001.

KLOMPEN, J. S. H. & OLIVER Jr, J. H. Systematic relationships in the soft ticks (Acari: Ixodida: Argasidae). **Syst Entomol.**, 18: 313-331, 1993.

- LABRUNA, M. B. & PEREIRA, M. C. Febre Maculosa: aspectos clínicos epidemiológicos. **Rev Clin Vet.**, 12: 19-23, 1998.
- LABUDA, M. & NUTALL, P. A. Viruses transmitted by ticks. In: Bowman, A. S. & Nutall, P. A. **Ticks – Biology, Disease and control**. Cambridge University Press, New York, p. 253-280, 2008.
- LAVOPIERRE, M. M. J. Feeding mechanisms of blood-sucking arthropods. **Nature**, 208: 302–303, 1964.
- LUZ, P. M.; STRUCHINER, C. J.; GALVANI, A. P. Modeling transmission dynamics and control of vector-borne neglected tropical diseases. **PLoS Negl Trop Dis.**, 4(10): e761, 2010.
- MAGALHÃES, F. E. P.; MASSARD, C. L.; SERRA-FREIRE, N. M. Paralysis in *Gallus gallus* and *Carina moschata* induced by larvae of *Argas (Persicargas) miniatus*. **Pesq Vet Bras.**, 7(2): 47-49, 1987.
- MANS, B. J.; GOTHE, R.; NEITZ, A. W. Biochemical perspectives on paralysis and other forms of toxicoses caused by ticks. **Parasitology**, 129: S95-S111, 2004.
- MANS, B. J.; GOTHE, R.; NEITZ, A. W. Tick toxins: perspectives on paralysis and other forms of toxicosis caused by ticks. In: Bowman, A. S. & Nutall, P. A. **Ticks – Biology, Disease and control**. Cambridge University Press, New York, p. 108-126, 2008.
- MANS, B. J. & NEITZ, A. W. The sand tampan, *Ornithodoros savignyi*, as a model for tick–host interactions. **S Afr J Sci.**, 100: 283-288, 2005.
- MANS, B. J. & NEITZ, A. W. Adaptation of ticks to a blood-feeding environment: evolution from a functional perspective. **Insect Biochem Mol Biol.**, 34(1): 1-17, 2004.

- MANS, B. J.; STEINMANN, C. M.; VENTER, J. D.; LOUW, A. I.; NEITZ, A. W. Pathogenic mechanisms of sand tampan toxicoses induced by the tick, *Ornithodoros savignyi*. **Toxicon**, 40(7): 1007-1016, 2002.
- MARITZ-OLIVIER, C.; STUTZER, C.; JONGEJAN, F.; NEITZ, A. W.; GASPAR, A. R. Tick anti-hemostatics: targets for future vaccines and therapeutics. **Trends Parasitol.**, 23(9): 397-407, 2007.
- MARTINS, J. R. Tristeza parasitária bovina: aspectos epidemiológicos e estratégias de controle. **Cad Boas Prat Prod.**, 137-151, 2004.
- MARTINS, J. R. Carrapato bovino: epidemiologia e controle. **Cad Boas Prat Prod.**, 115-136, 2005.
- MARTINS, J. R.; DOYLE, R.; BARROS-BATTESTI, D. M.; ONOFRIO, V. C.; GUGLIELMONE, A. A. On the occurrence of *Ornithodoros brasiliensis* ARAGÃO (Acari: Argasidae) in São Francisco de Paula, RS, southern Brazil. **Neotrop Entomol.**, 40(1): 143-144, 2011.
- MARTINS, J. R. S.; RECK Jr., J.; DOYLE, R.; CRUZ, N. L. N.; VIEIRA, A.; SOUZA, U. *Amblyomma aureolatum* (Acari: Ixodidae) parasitizing margay (*Leopardus wiedii*) in Rio Grande do Sul. **Rev Bras Parasitol Vet.**, 19: 189-191, 2010.
- MOORE, C. G. Interdisciplinary research in the ecology of vector-borne diseases: opportunities and needs. **J Vector Ecol.**, 33(2): 218-224, 2008.
- NUTALL, P. A. & LABUDA, M. Saliva-assisted transmission of tick-borne pathogen. In: Bowman, A. S. & Nutall, P. A. **Ticks – Biology, Disease and control**. Cambridge University Press, New York, p. 205-219, 2008.

- PEREIRA, M. C. Introdução ao *R. (B.) microplus*. In: Pereira, M. C.; Labruna, M. B.; Szabó, M. J. P.; Klafke, G. M. ***Rhipicephalus (Boophilus) microplus – Biologia, controle e resistência***. MedVet Livros, São Paulo, p. 1-6, 2009.
- PEREIRA, M. C. & LABRUNA, M. B. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. In: Pereira, M. C.; Labruna, M. B.; Szabó, M. J. P.; Klafke, G. M. ***Rhipicephalus (Boophilus) microplus – Biologia, controle e resistência***. MedVet Livros, São Paulo, p. 15-56, 2009.
- PIESMAN, J. & GERN, L. Lyme borreliosis in Europe and North America. In: Bowman, A. S. & Nutall, P. A. **Ticks – Biology, Disease and control**. Cambridge University Press, New York, p. 220-252, 2008.
- PINTO, C. & di PRIMIO, R. Contribuição para a biologia dos Ixodidae do Estado do Rio Grande do Sul (Brasil). **Rev Med Cir Bras.**, 34: 5-6, 1931.
- RAVAOMANANA, J.; JORI, F.; VIAL, L.; PÉREZ-SÁNCHEZ, R.; BLANCO, E.; MICHAUD, V.; ROGER, F. Assessment of interactions between African swine fever virus, bushpigs (*Potamochoerus larvatus*), *Ornithodoros* ticks and domestic pigs in north-western Madagascar. **Transbound Emerg Dis.**, 58(3): 247-254, 2011.
- RECK, J. Jr.; BERGER, M.; TERRA, R. M.; MARKS, F. S.; da SILVA VAZ, I. Jr.; GUIMARÃES, J. A.; TERMIGNONI, C. Systemic alterations of bovine hemostasis due to *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infestation. **Res Vet Sci.**, 86(1): 56-62, 2009.
- RIBEIRO, V. L. S.; WEBER, M. A.; FETZER, L. O.; VARGAS, C. R. B. Espécies e prevalência das infestações por carrapatos em cães de rua da cidade de Porto Alegre, RS, Brasil. **Ciênc Rural.**, 27(2): 285-289, 1997.
- RIEK, R. F. Studies on the reactions of animals to infestation with ticks I: Tick anaemia. **Aus J Agric Res.**, 8: 209–214, 1957.



- SERRA FREIRE, N. M. Tick paralysis in Brazil. **Trop Anim Health Prod.**, 15(2): 124-126, 1983.
- SMITH, T. & KILBOURNE, F. L. Investigations into the nature, causation and prevention of Texas or Southern cattle fever. **Bur Anim Ind Bull.**, 1: 301-324, 1893.
- SONENSHINE, D. E. **Biology of ticks.** v. 1 e 2, Oxford University Press, New York, 1991.
- STONE, B. F.; BINNINGTON, K. C.; GAUCI, M.; AYLWARD, J. H. Tick/host interactions for *Ixodes holocyclus*: role, effects, biosynthesis and nature of its toxic and allergenic oral secretions. **Exp Appl Acarol.**, 7: 59-69, 1989.
- TELFORD, S. R. & GOETHERT, H. K. Emerging and emergent tick-borne infections. In: Bowman, A. S. & Nutall, P. A. **Ticks – Biology, Disease and control.** Cambridge University Press, New York, p. 344-376, 2008.
- VENZAL, J. M.; ESTRADA-PEÑA, A.; FERNÁNDEZ de LUCO, D. Effects produced by the feeding of larvae of *Ornithodoros* aff. *puertoricensis* (Acari: Argasidae) on laboratory mice. **Exp Appl Acarol.**, 42(3): 217-223, 2007.
- WALKER, A. R.; BOUATTOUR, A.; CAMICAS, J. L.; ESTRADA-PEÑA, A.; HORAK, I. G.; LATIF, A. A.; PEGRAM, R. G.; PRESTON, P. M. **Ticks of domestic animals in Africa: a guide to identification of species.** Bioscience Reports, Scotland, 2003.
- WIKEL, S. K. Immunology of the tick-host interface. In: Wikel, S. K. **The Immunology of Host-Ectoparasitic Arthropod Relationships.** CAB International, Wallingford, p. 204–231, 1996.

## ANEXOS

**Anexo 1** – Foto evidenciado aspecto de relevo e vegetação típicos dos Campos de Cima da Serra do Rio Grande do Sul. Município de São Francisco de Paula (Foto: José Reck).



**Anexo 2** – Fotos das entrevistas realizadas com os moradores da área de estudo nos municípios de São Francisco de Paula e Jaquirana (Fotos: João Ricardo Martins).



**Anexo 3** – Foto de dois filhotes de *Pseudalopex gymnocercus* (popularmente conhecidos como graxaim ou sorro) encontrados dentro de uma das propriedades visitadas no município de São Francisco de Paula (Foto: José Reck).



**Anexo 4** – Fotos do processo de busca ativa por carrapatos através da peneiragem da areia das propriedades visitadas (Fotos: José Reck, João Ricardo Martins e Ugo Souza)



**Anexo 5** – Fotos evidenciando falta de higiene e condições sanitárias adequadas e precariedade de algumas habitações visitadas (Fotos: José Reck)



**Anexo 6** – Foto de um exemplar de *O. brasiliensis* durante processo de hematofagia em rato, aproximadamente 10 minutos após a fixação (Foto: José Reck)





**Anexo 7** – Reprodução do questionário realizado nas propriedades visitadas na área de estudo.

## Estudo epidemiológico sobre o carrapato *Ornithodoros brasiliensis*

Número propriedade (*identificação do GPS*): \_\_\_\_\_

Entrevistador: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Proprietário: \_\_\_\_\_

Contato/telefone: \_\_\_\_\_

Respondente: \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_

Relação com o proprietário: \_\_\_\_\_

Município:       ( ) São Francisco de Paula                       ( ) Jaquirana

Localidade: \_\_\_\_\_

Tamanho da propriedade: ( ) até 20 ha       ( ) 20-100 ha       ( ) mais de 100 ha

### Investigação de presença de *Ornithodoros*:

Foram encontrados *Ornithodoros* na propriedade? ( ) Sim       ( ) Não

Local: ( ) ambiente       ( ) animais       ( ) dentro de casas       ( ) outros: \_\_\_\_\_

Descrição do local: \_\_\_\_\_

Número de carrapatos: \_\_\_\_\_

( ) Mortos       ( ) Vivos       ( ) Exúvias

( ) Ovos       ( ) Ninfas       ( ) Adultos

“Ninho” localizado? ( ) Sim ( ) Não

Encontrados em animais: ( ) Sim ( ) Não

Detalhamento: \_\_\_\_\_

### Investigação de presença de outros carrapatos:

Foram encontrados outros carrapatos na propriedade? ( ) Sim ( ) Não

Espécie: \_\_\_\_\_

Hospedeiros: \_\_\_\_\_

### Condições sanitárias e de higiene (*observação do entrevistador*):

( ) Satisfatórias

( ) Insatisfatória

## QUESTIONÁRIO

- 1) Quantos anos você frequentou a escola?  
a) até 4 anos  
b) de 4 a 8 anos  
c) de 8 a 11 anos  
d) mais de 11 anos
- 2) Quantas pessoas moram na casa? \_\_\_\_\_
- 3) Qual a renda familiar?  
a) até 1 salário mínimo  
b) de 1 a 5 salários mínimos  
c) mais de 5 salários mínimos
- 4) A família tem acesso a atendimento médico? ( ) Sim ( ) Não  
Qual? ( ) Posto de saúde ( ) Hospital ( ) Clínicas particulares ( ) \_\_\_\_\_  
Com que frequência? ( ) vezes por ano
- 5) Tem animais na propriedade? ( ) Sim ( ) Não  
Quais e quantos (indicar o número)?  
Cães: \_\_\_\_\_  
Gatos: \_\_\_\_\_  
Aves: \_\_\_\_\_  
Suínos: \_\_\_\_\_  
Bovinos: \_\_\_\_\_  
Equinos: \_\_\_\_\_  
Outros: \_\_\_\_\_ Quantidade: \_\_\_\_\_
- 6) A propriedade recebe assessoria de médico veterinário? ( ) Sim ( ) Não  
Com que frequência? ( ) vezes por ano
- 7) São observados animais silvestres na propriedade? ( ) Sim ( ) Não  
Qual é o animal mais avistado dentro da propriedade? \_\_\_\_\_
- 8) Há ocorrência de outros carrapatos na propriedade? ( ) Sim ( ) Não  
Quais? \_\_\_\_\_  
Em que animais? \_\_\_\_\_
- 9) Há na propriedade alguma das seguintes instalações?  
Porões com chão de terra ( )  
Galpões ou depósitos para estocagem ( )  
Galinheiros ( )
- 10) É feito algum controle de pragas na propriedade (para carrapatos, insetos ou na lavoura)?  
( ) Sim ( ) Não  
Qual? \_\_\_\_\_
- 11) Se você fosse picado por um carrapato procuraria atendimento médico? ( ) Sim ( ) Não
- 12) Já ouviu falar no carrapato mouro? ( ) Sim ( ) Não
- 13) Caso sim, você ouviu falar através de:  
a) Vizinhos e familiares  
b) Inspeção veterinária e profissionais da saúde?  
c) outros: \_\_\_\_\_
- 14) Você já viu o carrapato mouro? ( ) Sim ( ) Não

CASOS RETROPECTIVOS

16) Caso sim...

Quantas vezes você já observou o carrapato mouro? \_\_\_\_\_  
Já observou casos de humanos picados pelo carrapato mouro? ( ) Sim ( ) Não  
Já observou casos de animais picados pelo carrapato mouro? ( ) Sim ( ) Não  
Quais espécies animais? \_\_\_\_\_

17) **CASOS HUMANOS:**

Quem foi picado? Nome: \_\_\_\_\_ Relação com o respondente: \_\_\_\_\_  
Data do ocorrido: \_\_\_\_\_ Idade da vítima: \_\_\_\_\_  
Sexo: ( ) Masculino ( ) Feminino

Você visualizou o carrapato? ( ) Sim ( ) Não  
Você viu o carrapato fixado na vítima? ( ) Sim ( ) Não  
Acompanhou o caso por quanto tempo após a picada: \_\_\_\_\_

O que a picada causou (sintomas)?  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Por quanto tempo? \_\_\_\_\_  
Procurou atendimento médico? ( ) Sim ( ) Não  
Tratamento: ( ) Sim ( ) Não - Qual? \_\_\_\_\_  
Resolução: \_\_\_\_\_

18) **CASOS EM ANIMAIS:**

Espécie? \_\_\_\_\_  
Proprietário: \_\_\_\_\_  
Data do ocorrido: \_\_\_\_\_ Idade do animal: \_\_\_\_\_  
Sexo: ( ) Macho ( ) Fêmea

Você visualizou o carrapato? ( ) Sim ( ) Não  
Você viu o carrapato fixado no animal? ( ) Sim ( ) Não  
Acompanhou o caso por quanto tempo após a picada: \_\_\_\_\_

O que a picada causou (sintomas)?  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Por quanto tempo? \_\_\_\_\_  
Procurou atendimento veterinário? ( ) Sim ( ) Não  
Tratamento: ( ) Sim ( ) Não - Qual? \_\_\_\_\_  
Resolução: \_\_\_\_\_

Observações diversas:

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

## **CURRICULUM VITAE**

### **Versão resumida**

*Segundo recomendação do Programa Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM) deve ser incluído, ao final da tese um currículo resumido do autor.*

## **RECK Jr., J. / RECK, J.**

### **1. DADOS PESSOAIS**

Nome: **José Reck Júnior**  
Local de nascimento: Rio Grande, RS, Brasil  
Data de nascimento: 22 de setembro de 1983

Endereço profissional: Instituto de Ciências Biológicas  
Universidade Federal do Amazonas (UFAM)  
Av. Gen. Rodrigo Otávio, 3000  
Mini-campus da UFAM (Setor Sul), Bloco D  
CEP 69077-000  
Bairro Coroado - Manaus - AM - Brasil

Telefone: (51) 9904-2388

E-mail: [jose.reck@gmail.com](mailto:jose.reck@gmail.com)

### **2. FORMAÇÃO:**

2002 – 2007: Graduação em Medicina Veterinária  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)  
*Monografia:* Papel do sistema caliceínas-cininas no envenenamento por animais peçonhentos.  
*Orientação:* Carlos Termignoni  
*Bolsista:* Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

- 2008 – 2009: Mestrado em Biologia Celular e Molecular  
 Centro de Biotecnologia  
 Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)  
*Dissertação:* Farmacologia da saliva do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: papel da modulação da hemostasia na relação parasita-hospedeiro  
*Orientação:* Carlos Termignoni & Jorge Almeida Guimarães.  
*Bolsista:* Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).  
*Tempo de execução:* 18 meses
- 2009 - 2011: Doutorado em Biologia Celular e Molecular  
 Centro de Biotecnologia  
 Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)  
*Tese:* Caracterização epidemiológica e bioquímica da toxicose induzida por *Ornithodoros brasiliensis* (Chelicerata: Argasidae) em humanos e animais  
*Orientação:* Carlos Termignoni  
*Bolsista:* Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)  
*Tempo de execução:* 24 meses

### 3. ATIVIDADES CIENTÍFICAS:

- 2002 – 2007: Iniciação científica no Centro de Biotecnologia
- 2004 – 2006: Treinamento como plantonista veterinário no Hospital de Clínicas Veterinárias (HCV) da UFRGS  
 Atuando no atendimento clínico e cirúrgico do serviço de emergência do Hospital de Clínicas Veterinárias da UFRGS (1500 horas).
- 2005: Atividade de extensão - projeto de controle reprodutivo de animais  
 Atuando na execução de procedimentos cirúrgicos de controle reprodutivo de cães e gatos da comunidade em ação promovida pelo Hospital de Clínicas Veterinárias da UFRGS (12 meses).
- 2007: Estágio curricular na Escola Paulista de Medicina (EPM), Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP)
- 2008 – 2011: Pós-graduação no Centro de Biotecnologia
- 2009 – atual Participação como colaborador em projetos de pesquisa do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF)
- 2011 – atual Pesquisador do Laboratório de Farmacologia da Universidade Federal do Amazonas (UFAM)
- 2011 – atual Coordenador de projeto de extensão na Universidade Federal do Amazonas (UFAM)

#### 4. ATUAÇÃO PROFISSIONAL

2011 - : Professor assistente concursado da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), *campus* Manaus  
Atuando no Instituto de Ciências Biológicas da UFAM, ministrando disciplinas para os cursos de graduação em Medicina, Enfermagem e Biotecnologia.

#### 5. DISTINÇÕES e APROVAÇÕES EM CONCURSOS PÚBLICOS

2002: 1º lugar no concurso vestibular, curso de Medicina Veterinária (UFRGS)

2004: Trabalho destaque no encontro de iniciação científica UFRGS

2005: Trabalho destaque no encontro de iniciação científica UFRGS

2006: Trabalho destaque no encontro de iniciação científica UFRGS

2008: 1º lugar na seleção para mestrado – Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM, UFRGS)

2009: 1º lugar na seleção para doutorado – Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM, UFRGS)

2010: Aprovação em 1º lugar no concurso para professor assistente do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), *campus* Manaus-AM.

2010: Aprovação em concurso para professor da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), *campus* Realeza-PR.

2011: Aprovação em 1º lugar no concurso para pesquisador doutor (área Parasitologia) do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF) da Fundação Estadual de Pesquisas Agropecuárias (FEPAGRO), *campus* Eldorado do Sul-RS.

#### 6. ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS CIENTÍFICOS

RECK, J.; SOARES, J.F.; TERMIGNONI, C; LABRUNA, M.B.; MARTINS, J. R.  
Tick toxicosis in a dog bitten by *Ornithodoros brasiliensis*. **Veterinary Clinical Pathology**, *in press*.

BARROS-BATTESTI, D. M.; ONOFRIO, V. C.; NIERI-BASTOS, F. A.; SOARES, J. F.; MARCILI, A.; FAMADAS, K. M.; FACCINI, J. L. H.; RAMIREZ, D. G.; DOYLE, R. L.; MARTINS, J. R.; RECK Jr., J.; GUGLIELMONE, A. A.; LABRUNA, M. B. *Ornithodoros brasiliensis* Aragão (Acari: Argasidae): description of the larva, redescription of male and female, and neotype designation. **Zootaxa**, *in press*.

- MARTINS, J. R. S.; RECK Jr., J.; DOYLE, R.; CRUZ, N. L. N.; VIEIRA, A.; SOUZA, U. *Amblyomma aureolatum* (Acari: Ixodidae) parasitizing margay (*Leopardus wiedii*) in Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, p.189-191, 2010.
- MARKS, F. S.; RECK Jr., J.; ALMEIDA, L. L.; BERGER, M. O.; CORRÊA, A. M. R.; DRIEMEIER, D.; BARCELLOS, D. E. S.; GUIMARÃES, J. A.; TERMIGNONI, C.; CANAL, C. W. Porcine circovirus 2 (PCV2) induces a procoagulant state in naturally infected swine and in cultured endothelial cells. **Veterinary Microbiology**, v. 141, p. 22-30, 2010.
- BERGER, M. O.; RECK Jr., J.; TERRA, R. M. S.; SILVA, W. B.; SANTI, L.; PINTO, A. F. M.; VAINSTEIN, M. H.; TERMIGNONI, C.; GUIMARÃES, J. A. *Lonomia obliqua* venomous secretion induces human platelet adhesion and aggregation. **Journal of Thrombosis and Thrombolysis**, v. 30, p. 300-310, 2010.
- ALMEIDA, L. L.; MARKS, F. S.; RECK Jr., J.; SANTOS, A.S.; GOMES, D.C.; da SILVA VAZ JÚNIOR, I.; DRIEMEIER, D.; CANAL, C. W. . Detection of bovine viral diarrhoea virus in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ticks fed on persistently infected cattle. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 38, p.155-159, 2010.
- PINTO, A. F. M.; BERGER, M. O.; RECK Jr., J.; TERRA, R. M. S.; GUIMARÃES, J. A. *Lonomia obliqua* venom: *in vivo* effects and molecular aspects associated with the hemorrhagic syndrome. **Toxicon**, v. 56, p. 1103-1112, 2010.
- BERGER, M. O.; RECK Jr., J.; TERRA, R. M. S.; PINTO, A. F. M.; TERMIGNONI, C.; GUIMARÃES, J. A. The *Lonomia obliqua* caterpillar envenomation causes platelet hypoaggregation and blood incoagulability in rats. **Toxicon**, v. 55, p. 33-44, 2010.
- RECK Jr., J.; BERGER, M. O.; TERRA, R. M. S.; MARKS, F. S.; da SILVA VAZ JÚNIOR, I.; GUIMARÃES, J. A.; TERMIGNONI, C. Systemic alterations of bovine hemostasis due to *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infestation. **Research in Veterinary Science**, v. 86, p. 56-62, 2009.
- RECK Jr., J.; BERGER, M. O.; MARKS, F. S.; ZINGALI, R.; CANAL, C. W.; FERREIRA, C. A. S.; GUIMARÃES, J. A.; TERMIGNONI, C. Pharmacological action of tick saliva upon hemostasis and the neutralization ability of sera from repeated infested hosts. **Parasitology** (London), v. 136, p. 1339-1349, 2009.
- BOHRER, C. B.; RECK Jr., J.; FERNANDES, D.; de SORDI, R.; ASSREUY, J.; GUIMARÃES, J. A.; TERMIGNONI, C. Kallikrein kinin system activation by



*Lonomia obliqua* caterpillar bristles: Involvement in edema and hypotension responses to envenomation. **Toxicon**, v. 49, p. 663-669, 2007.

Número de citações em 1º/02/2011 (SCOPUS): 16

## **7. RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS**

12 resumos apresentados em congressos científicos internacionais

12 resumos apresentados em congressos científicos nacionais

1 trabalho completo apresentado em congresso científico

2 apresentações orais de trabalhos em congressos científicos

## **8. FORMAÇÃO COMPLEMENTAR (cursos de curta duração)**

- 2008: Citometria de fluxo  
Fundação Universitária de Cardiologia (IC-FUC)
- 2007: Medicina de animais selvagens  
Universidade de São Paulo (USP)
- 2006: Dermatologia em cães e gatos  
Associação Nacional de Clínicos Veterinários de Pequenos Animais (ANCLIVEPA – RS)
- 2005: Manipulação Genética  
Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA- UFRGS)
- 2005: Experimentação Animal  
UFRGS
- 2005: Biologia Molecular aplicada à clonagem gênica  
UFRGS
- 2005: Curso Teórico-prático de Ortopedia e Traumatologia Veterinária  
Hospital de Clínicas Veterinárias (HCV) da UFRGS
- 2004: Inseminação Artificial em Bovinos  
Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Estado do Rio Grande do Sul (EMATER-RS).
- 2004: Fundamentos e Aplicações da Eletroforese Capilar  
Is Biotech Co.

## **9. ORGANIZAÇÃO DE EVENTOS**

2008: Curso de férias - O método científico para alunos e professores do ensino médio. Centro de Biotecnologia, UFRGS. Porto Alegre, RS.

2006: Curso teórico-prático de atendimento de emergência em animais. Hospital de Clínicas Veterinárias (HCV), UFRGS.

2006: Curso teórico-prático de atualização em dermatologia animal. Hospital de Clínicas Veterinárias (HCV), UFRGS.

2006: VII Congresso Brasileiro de Tecnologia Enzimática - ENZITEC.

## **10. PARTICIPAÇÃO EM ÓRGÃOS E SOCIEDADES**

Membro associado do Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária (CBPV)

Membro associado do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA)

Membro associado da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência (SBPC)

