

# **Percepção de odores de cães resistentes (Beagle) e sensíveis (Cocker Spaniel Inglês) pelo carrapato *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae)**

**Manuella C. Oliveira<sup>1</sup>, Nadjnaira B. Abrão, Carla C. B. Louly, Sabrina C. Duarte, Lígia M. F. Borges<sup>2</sup>**

Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública e Escola de Veterinária

Palavras-chave: cães, resistência, carrapato, repelência

## **INTRODUÇÃO**

O *Rhipicephalus sanguineus* é um carrapato trioxênico que se distribui mundialmente, que parasita principalmente o cão doméstico e cujos estágios de vida livre são bem adaptados ao ambiente de seu hospedeiro. É responsável por danos diretos e pela transmissão de patógenos aos cães, como *Ehrlichia canis*, *Babesia canis*, *Haemobartonella canis* e *Hepatozoon canis* (WOLDEHIWET & RISTIC, 1993). No Brasil, ele assume especial importância uma vez que há relatos de parasitismo humano por este carrapato (DANTAS-TORRES et al., 2006; LOULY et al., 2006).

Como uma forma de comunicação, os animais utilizam substâncias químicas, e estas substâncias são conhecidas como semioquímicos e podem atuar entre indivíduos de uma mesma espécie, como os feromônios, ou entre indivíduos de espécies diferentes, como os alomônios e cairomônios (SONENSHINE, 1991). Entre os carrapatos a comunicação também é existente. O encontro de hospedeiros adequados é fundamental para a sobrevivência e reprodução dos ixodídeos. Através da alimentação os carrapatos asseguram sua sobrevivência, mas também causam danos aos seus hospedeiros e transmitem agentes patogênicos. Interferência com a alimentação é uma possível estratégia a ser utilizada para o controle de carrapatos (WALADDE & RICE, 1982), já que os acaricidas usados atualmente possuem uma forte correlação com poluição ambiental, intoxicação dos animais e com o rápido desenvolvimento de resistência pelos carrapatos (MILLER et al., 2001)

Existem diversas substâncias que são liberadas pelo hospedeiro e que contribuem para o comportamento de localização e parasitismo do carrapato. Estas substâncias são os cairomônios. O CO<sub>2</sub>, componentes da urina, moléculas liberadas pela respiração ou substâncias encontradas na pele dos animais foram demonstradas como atrativas para várias espécies de carrapatos (GARCIA et al., 1965, CARROLL, 1999, OSTERKAMP et al., 1999, MACMAHON & GUERIN, 2002). Dentre as várias modalidades

1-Aluno de Iniciação Científica - manuella.co@hotmail.com

2-Orientador – ligia@iptsp.ufg.br

sensoriais utilizadas pelos carrapatos na localização de seus hospedeiros a olfação é de vital importância, uma vez que não apresentam órgãos dos sentidos desenvolvidos, como olhos e ouvidos. Os odores são potencialmente os estímulos mais específicos encontrados por eles no campo, segundo WALADDE & RICE (1982).

O reconhecimento de feromônios e de outros odores são realizados pelas sensilas do tarso do primeiro par de patas, numa estrutura conhecida como órgão de Haller. A gustação também é importante no comportamento de alimentação de carrapatos, nas fases de exploração do hospedeiro e fixação, as quais precedem o ingurgitamento. Quimiossensilas de contato envolvidas com a gustação localizam-se principalmente nos palpos e quelíceras (WALADDE & RICE, 1982) e diferem-se das sensilas olfatórias por possuírem um único poro terminal enquanto as sensilas olfativas apresentam múltiplas perfurações em sua parede.

Amplas variações ocorrem na especificidade por hospedeiros, duração e multiplicidade de contatos e no comportamento de localização do hospedeiro. Mosquitos (HEATH 2000) e moscas (GIKONYO et al., 2002) são atraídos de forma diferenciada para hospedeiros distintos, sendo que o papel das substâncias químicas está bem definido nesta mediação. WANZALA et al. (2004) estudando os carrapatos *R. appendiculatus* e *R. evertsi evertsi*, ambos parasitas de bovídeos, mas com sítios de fixação distintos (orelhas e região anal, respectivamente), verificaram que *R. appendiculatus* foram atraídos por substâncias extraídas de orelhas de bovinos e repelidos por substâncias da região anal. Para *R. evertsi* aconteceu exatamente o contrário. LOULY et al. (2007) observaram que cães da raça Cocker Spaniel Inglês apresentavam-se até 11 vezes mais parasitados por adultos de *R. sanguineus* do que cães sem raça definida. Em um experimento recente (LOULY et al., 2010), com duas raças de cães, uma considerada sensível, Cocker Spaniel inglês e outra resistente, beagle (LOULY, et al., 2009), foi demonstrado que adultos de *R. sanguineus* conseguiam diferenciar as substâncias das duas raças. Quando testados frente às substâncias de contato colhidas dos dois hospedeiros, os adultos preferiam ficar arrestados (cessar a locomoção) nas substâncias colhidas dos Cocker do que na dos Beagle. Estes resultados reproduzem achados observados *in vivo*, pois quando cães de ambas as raças foram mantidos em um canil infestado por *R. sanguineus*, os cães Cocker apresentavam um número significativamente maior de carrapatos (LOULY et al., 2009).

Descreve-se que o carrapato utiliza de ferramentas importantes antes de iniciar o repasto sanguíneo, mas não foi demonstrado quais as sensilas de maior influência nesta decisão do carrapato, se são as sensilas olfatórias ou as sensilas gustativas. Propõe-se então, avaliar a capacidade do carrapato adulto em diferenciar as substâncias atraentes/repelentes

presentes nos odores de cães da raça Beagle e Cocker, seja pelos órgãos olfativo (órgão de Haller) ou pelo órgão gustativo (palpos e quelíceras).

## **METODOLOGIA**

### **Carrapatos**

Foram colhidas fêmeas ingurgitadas de *R. sanguineus* de cães naturalmente infestados para estabelecimento de uma colônia. Os carrapatos foram mantidos em estufa (27°C e 80% U.R.) e alimentados em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) para obtenção de adultos (estágio de testes). A cada 15 dias realizavam-se infestações de larvas, ninfas ou adultos nos coelhos, com o objetivo de manter carrapatos adultos de 7 a 21 dias de idade, fase ideal pra realização dos testes.

### **Teste de Arrestamento com carrapatos bloqueados e não bloqueados**

Foram colhidas substâncias de contato da pele de quatro cães da raça Cocker Spaniel Inglês (3 machos e 1 fêmea) e de 5 cães da raça Beagle (5 fêmeas), os quais já foram definidos por LOULY et al. (2009) como sensíveis e resistentes, respectivamente, ao *R. sanguineus*. Para isso, os cães ficaram um período de 15 dias sem banho e 30 dias sem tratamento acaricida.

As substâncias foram colhidas usando uma modificação da técnica de CARROLL (2002) descrita por LOULY et al. (2010). Várias flanelas de algodão foram lavadas com detergente neutro, enxaguadas com água destilada e secas em estufa a 100°C por uma hora. Posteriormente foram imersas em hexano, depois em acetona e secas em estufa a 100°C por uma hora. As flanelas foram esfregadas nas costas, cabeça e parte externa das orelhas dos cães, por aproximadamente 5 minutos. As amostras colhidas de cada cão foram acondicionadas em plásticos selados e estocadas em freezer a -20°C.

Os cães foram numerados aleatoriamente de 1 a 5, sendo que, nos cães da raça Cocker houve uma repetição de um cão para totalizar 5 pares, sendo classificados da seguinte maneira: B1- Brigitte, B2- Luna, B3- Bela, B4- Mel, B5- Clara, C1 e C5- Nino, C2- Mel fêmea, C3- Príncipe, C4- Mel macho.

Para realização dos testes utilizaram-se bandejas retangulares (20 cm x 40 cm x 8 cm) contendo água destilada. Um retângulo de isopor (15 cm x 30 cm x 2 cm) foi fixado no centro da bandeja usando agulhas fixadas com esparadrapo, evitando assim a fuga dos carrapatos. Na

extremidade oposta do isopor foi colocado um pedaço da flanela de algodão contendo uma das substâncias em teste (Cocker ou Beagle). Dez carrapatos adultos, cinco machos e cinco fêmeas, não alimentados, com idade de 7 a 21 dias foram liberados no centro do isopor. Após 1, 18 e 24 horas da liberação, o local e número de carrapatos arrestados foram registrados. Quatro repetições de cada tratamento foram feitas.

Os órgãos sensoriais responsáveis pela detecção das substâncias percebidas pelos carrapatos nos testes de arrestamento foram avaliados. Carrapatos com os principais órgãos sensoriais bloqueados foram testados frente às substâncias colhidas do Beagle 1 e Cocker 1. Para isso, usando Tinta para Tecido Acrilex, os carrapatos foram bloqueados alternadamente, o primeiro artículo dos palpos e quelíceras ou o primeiro par de patas. Carrapatos com todos os órgãos sensoriais bloqueados também foram avaliados. Foram feitas 10 repetições com 10 carrapatos em cada, sendo 5 machos e 5 fêmeas nas mesmas condições mencionadas anteriormente.

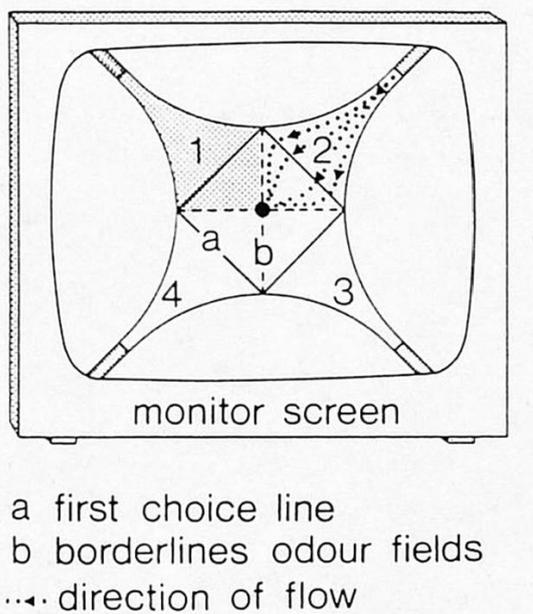
### **Teste de repelência/atratividade**

Colheu-se o odor de um Beagle e de um Cocker como descrito por GIKONYO (2000) e LOULY et al. (2010). Uma cápsula retangular (10 cm x 8 cm) similar a um envelope, envolta de papel alumínio, e contendo um sache de filtro de papel (9 cm x 7 cm) (Whatman nº1 Qualitativo) com carvão ativado (350 mg, 40 µm Fluka - Sigma Aldrich) e Octadecyl ligado a sílica-C18 (450 mg, tamanho da partícula 40 µm JT Baker - Hexis-Sigma Aldrich) como adsorventes. Quatro cápsulas foram fixadas no pescoço dos cães, com a face de papel filtro em contato com a pele e deixada por 12 h e a face de alumínio pregada ao esparadrapo, o qual formou uma coleira no pescoço dos animais. Os saches foram estocados em freezer a -20°C até a extração. Os adsorventes dos saches foram agrupados e transferidos para um cartucho de ODS (Accu Bond, Solid Phase Extraction-J&W Scientific), diluídos com 8 ml de hexano e posteriormente concentrados até 150 µL sobre uma corrente de nitrogênio limpo e estocado a -20°C.

Os testes foram realizados em um olfatômetro de quatro entradas de acordo com LOUISE et al. (1983). No tempo em que o carrapato cruzou uma das linhas “first choice” (Figura 1) foi marcado a primeira escolha. Em seguida acompanhou seu comportamento por 10 minutos, registrando o setor escolhido e o tempo em cada setor. Quando o carrapato entrou no tubo de captura e nele permaneceu por 2 minutos, o teste foi considerado terminado, registrando assim sua escolha final. Também, a permanência do carrapato por 2 minutos em

qualquer lugar do olfatômetro, exceto no local de entrada do carrapato, foi considerado como última escolha e fim do teste. Foram testados 40 carrapatos fêmeas, não alimentadas e com idade de 7 a 21 dias. Após testes com 10 indivíduos a câmara foi rotacionada 90° e limpa com álcool 96%. Antes de iniciar os testes, a câmara foi lavada com detergente neutro, seca e limpa com álcool 96%. Testou-se primeiro, como padronização do olfatômetro, NH<sub>4</sub>OH e HCL (teste de fumaça) para verificar a distribuição equilibrada do fluxo de ar nos quatro campos do olfatômetro. Os odores de um Cocker e de um Beagle foram liberados em braços adjacentes do olfatômetro.

Figura 1 - Olfatômetro de 4 vias utilizado nos testes de atração/repelência



### Análise estatística

Os resultados de tempo, nos testes de olfatometria foram submetidos à análise de variância de Friedman. Tanto os resultados de arretamento, quanto os resultados de escolha das arenas nos testes de olfatometria foram comparados pelo teste do chi-quadrado. Em ambos os testes considerou-se um nível de significância de  $P < 0,05$ .

### RESULTADOS

Com 1 hora de teste, o número de carrapatos não arrestados era bastante alto (31 a 38), mas nas leituras de 18 e 24 horas, este número diminuiu significativamente, sendo de 0 a 10. Nas leituras de 18 e 24 horas, em todos os pares de cães avaliados nos testes de arrestamento os carrapatos cessaram os movimentos com mais intensidade nas substâncias dos cães da raça Cocker (22 a 31) que nos Beagle (2 a 12) (Tabela 1).

Na primeira escolha, embora o número de carrapatos tenha sido menor no odor do Beagle, não houve diferença significativa entre os diferentes setores. Por outro lado, na escolha final, o odor de Beagle foi repelente para as fêmeas de *R. sanguineus*, pois menos carrapatos foram encontrados neste setor ( $P=0,009$ ) e o tempo gasto pelo carrapato no setor do Beagle foi menor (2585 segundos) contra 7569 segundos no odor do Cocker e 13621 segundos nos dois braços controle (Tab. 2).

Nos testes para se avaliar quais órgãos sensoriais estariam envolvidos na detecção das substâncias dos cães Cocker e Beagle, observou-se, assim como mostrado anteriormente, que os *R. sanguineus* não bloqueados se arrestaram mais significativamente nas substâncias dos Cocker. Nestes testes, poucos carrapatos ficaram sem se arrestar (11 a 13). Por outro lado, quando os carrapatos foram bloqueados, muitos não se arrestaram (29 a 46), mesmo 24 horas após o início dos testes. Nos carrapatos bloqueados, tanto no órgão de Haller, quanto nos palpos e quelíceras, o arrestamento nas substâncias dos Cocker e dos Beagle foi estatisticamente similar ( $P<0,05$ ), demonstrando que o carrapato já não conseguiu mais distinguir uma raça da outra.

Tabela 1- Número de adultos de *Rhipicephalus sanguineus* arrestados em substâncias de cinco cães da raça Beagle (B) ou quatro Cocker Spaniel Inglês (C). N = carrapatos não arrestados.

T= total de carrapatos

Tempo	C1	B1	N	C2	B2	N	C3	B3	N	C4	B4	N	C1	B5	N
1H	6	0	33	4	0	32	4	2	36	1	0	38	1	4	31
18H	31	8	1	29	4	7	28	2	9	29	9	2	22	10	8
24H	28	8	4	30	4	6	28	2	10	28	12	0	22	10	8

Após 18 horas, em todos os pares de cães avaliados, houve diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre o número de carrapatos arrestados – Teste do  $\chi^2$

Tabela 2- Número de fêmeas de *Rhipicephalus sanguineus* em cada quadrante de um olfatômetro 04 vias tratados com diferentes odores: Beagle, Cocker e dois controles.

Resposta	N	Controle 1	Controle 2	Beagle	Cocker
1ª escolha	40	11	14	4	11
Escolha final	40	9	15	1	11

Teste do  $\chi^2$  escolha final ( $P = 0,009$ )

Tabela 3- Arrestamento de adultos de *Rhipicephalus sanguineus*, com os órgãos sensoriais (Órgão de Haller – OH, Palpos e quelíceras - PQ) bloqueados ou não, em setores contendo flanelas impregnadas com odor de Cocker (Ck) ou Beagle (Be).

Tempo	Carrapatos bloqueados						Carrapatos sem bloqueio		
	OH			PQ			Ck	Be	N
	Ck	Be	N	Ck	Be	N			
1h	28	26	39	24	26	21	38	42	12
18h	34	20	29	20	26	13	48	29	11
24h	39	28	33	36	26	38	58	29	13

Às 18 e 24 horas, não houve diferença significativa ( $P > 0,05$ ) entre o número de carrapatos arrestados nas duas raças, nos carrapatos bloqueados tanto no órgão de Haller quanto nos palpos e quelíceras. Nos carrapatos sem bloqueio esta diferença foi significativa ( $P < 0,05$ )

## **DISCUSSÃO**

A sobrevivência do carrapato depende da escolha de um animal sensível para realização do repasto sanguíneo. LOULY et al. (2009) verificaram que *R. sanguineus* que se alimentam em cães resistentes (Beagle), tem a sua viabilidade biológica extremamente comprometida, quando comparados com carrapatos alimentados em animais sensíveis (Cocker).

O reconhecimento de feromônios e de outros odores são realizados pelas sensilas do tarso do primeiro par de patas, numa estrutura conhecida como órgão de Haller. Quimiossensilas de contato, envolvidas com a gustação, localizam-se principalmente nos palpos e quelíceras (WALADDE & RICE, 1982) e diferem-se das sensilas olfatórias por possuírem um único poro terminal enquanto as sensilas olfativas apresentam múltiplas perfurações em sua parede. O bloqueio tanto dos órgãos de Haller, quanto dos palpos e quelíceras, impediu que o *R. sanguineus* separasse os cães resistentes dos cães sensíveis. Estes resultados indicam que tanto as sensilas olfativas quanto as gustativas participam deste processo.

As substâncias produzidas pelos cães Beagle têm a capacidade de repelir ou impedir que o *R. sanguineus* se arreste. A percepção destas substâncias tem valor biológico para o carrapato, pois permite que ele diferencie o hospedeiro antes de iniciar o repasto sanguíneo. Em estudos realizados recentemente (Borges, L.M.F. dados não publicados), através de cromatografia-gasosa, observou-se que os odores de Beagle contem muito mais compostos que os odores de Cocker. PICKETT et al. (2010) hipotetizaram que hospedeiros resistentes produzem substâncias que os caracterizam como hospedeiros não adequados. A caracterização destas substâncias pode ser explorada para o desenvolvimento de novos compostos repelentes.

## **CONCLUSÕES**

Cães da raça Beagle produzem compostos que os caracterizam como hospedeiros não adequados para o *R. sanguineus*, sendo estes compostos percebidos pelas sensilas olfativas do órgão de Haller e gustativas das quelíceras e palpos.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- CARROLL, J.F. Responses of three species of adult ticks (Acari: Ixodidae) to chemicals in the coats of principal and minor hosts. **Journal of Medical Entomology** 36:238–242, 1999.
- CARROLL, J.F. How specific are host-produced kairomones to host-seeking ixodid ticks? **Experimental and Applied Acarology**, 28:155–161, 2002.
- DANTAS-TORRES F., FIGUEREDO L.A., BRANDÃO-FILHO S.P. *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae), the brown dog tick, parasitizing humans in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 39: 64-67, 2006.
- GARCIA, R. Collection of *Dermacentor andersoni* (Stiles) with carbon dioxide and its application in studies of Colorado tick fever virus. **American Journal of Tropical Hygiene**, 14:6, 1965.
- GIKONYO, N.K., HASSANALI A., NJAGI, P.G.N., GITU, P.M., MIDIWO, J.O. Odor composition of preferred (Buffalo and Ox) and nonpreferred (Waterbuck) hosts of some savanna tsetse flies. **Journal of Chemical Ecology**, 28:969–981, 2000.
- LOUISE E.M. VET, J.C. VAN LENTEREN, M. HEYMANS, E. MEELIS. An airflow olfactometer for measuring olfactory response of Hymenopterous parasitoids and other small insects. **Physiological Entomology**, 8, 97-106, 1983.
- LOULY, C.C.B., FONSECA, I.N., OLIVEIRA, V.F., MENEZES, L.B., BORGES, L.M.F. Ocorrência de *Rhipicephalus sanguineus* em trabalhadores de clínicas veterinárias e canis, no município de Goiânia-GO. **Ciência Animal Brasileira**, 7:103–106, 2006.
- LOULY, C. C. B., I. N. FONSECA, V. F. OLIVEIRA, G. F.C. LINHARES, L. B. MENEZES AND L.M.F. BORGES. Seasonal dynamics of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) on dogs from a policy unit in Goiânia, Goiás, Brazil. **Ciência Rural** 37(2), 464–469, 2007.
- LOULY, C.C.B, SOARES, S.F, SILVEIRA, D.N., NETO O. J. S., SILVA A.C., BORGES L.M.F. Differences in the susceptibility of two breeds of dogs, English cocker spaniel and beagle, to *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). **International Journal of Acarology**, 35: 25–32, 2009.

- LOULY, C.C.B., SOARES, S.F. SILVEIRA, D.N., GUIMARÃES, M.S. BORGES, L.M.F. Differences in the behavior of *Rhipicephalus sanguineus* tested against resistant and susceptible dogs. *Experimental and Applied Acarology*, 51:353–362, 2010.
- MCMAHOM, C., GUERIN, P. M. Attraction of the tropical bont tick, *Amblyomma variegatum*, to human breath and to the breath components acetone, NO and CO<sub>2</sub>. *Naturwissenschaften*, 89: 311-31, 2002.
- MILLER, R.J., GEORGE, J.E., GERREIRO, F., CARPENTER, L., WELCH J.B. 2001. Characterization of acaricide resistance in *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille) (Acari: Ixodidae) collected from the Corozal Army Veterinary Quarantine Center, Panama. *Journal of Medical Entomology*, v. 38, p. 293-302, 2001.
- OSTERKAMP, J., WAHL, U. SCHMALFUSS, G. HAAS, W. Host-odour recognition in two species is cided in a blend of vertebrate volatiles. *Journal of Comparative Physiology*, 185: 59-67, 1999.
- PICKETT, J. A. BIRKETT, M. A. DEWHIRST, S. Y. LOGAN, J. G. OMOLO, M. O. TORTO, B. PELLETIER, J. SYED, Z. LEAL, W. S. Chemical Ecology of animal and human pathogen vector in a changing global climate (Special Issue: Human Impact). *Journal of Chemical Ecology*, 36: 113-121, 2010.
- SONENSHINE, D. E. Tick pheromones and their use in tick control. *Annals of Revised Entomology*, 51, p. 557-580, 2006.
- SONENSHINE, D.E. **Biology of Ticks**. New York: Oxford University Press. EUA. 1: 447p, 1991.
- WALADDE, S.M., RICE, M.J. The sensory basis of tick feeding behaviour. *In*: Obenchain, F. D.; Galun, R. **Physiology of Ticks**. Oxford: Pergamon, p. 71–118, 1982.
- WANZALA W., SIKA N.F.K, GULE, S., HASANALI, A. Attractive and repellent host odours guide ticks to their respective feeding sites. *Chemoecology* 14:229-232, 2004.
- WOLDEHIWET Z., M. RISTIC. **Rickettsial and Chlamydial, Diseases of Domestic Animals**. Pergamon Press, New York, USA. 427 pp, 1993.