

ALIMENTAÇÃO ARTIFICIAL POR MEIO DE TUBOS CAPILARES DE FÊMEAS PARCIALMENTE INGURGITADAS DO CARRAPATO *Dermacentor (Anocentor) nitens**

CHARLES P. RANGEL¹; NATHALIE C. DA CUNHA¹; JANIA DE REZENDE¹; FÁBIO J. M. DA SILVA¹; FABÍOLA DO N. CORRÊA¹; RAFAELLA C. TEIXEIRA¹; JENEVALDO B. DA SILVA²; BRUNA DE A. BAÊTA²; ADIVALDO H. DA FONSECA³

ABSTRACT:- RANGEL, C.P.; CUNHA, N.C.; REZENDE, J.; SILVA, F.J.M.; CORRÊA, F.N.; TEIXEIRA, R.C.; SILVA, J.B.; BAÊTA, B.A.; FONSECA, A.H. [Artificial feeding through capillaries tubes of engorged partially females of the tick *Dermacentor (Anocentor) nitens*]. Alimentação artificial por meio de tubos capilares de fêmeas parcialmente ingurgitadas do carrapato *Dermacentor (Anocentor) nitens*. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 17, supl. 1, p. 35-39, 2008. Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, UFRRJ, IV, DPA, Laboratório de Doenças Parasitárias, Km 07 da BR 465, Seropédica, RJ 23890-000, Brasil. E-mail: adivaldo@ufrj.br

Artificial feeding is an important toll for studying ticks feeding mechanism and transmission of pathogenic agents in the absence of vertebrate host. The objective was to feed artificially of engorged partially females of *Dermacentor (Anocentor) nitens*, proceeding of infested naturally equines and evaluate the influence of this technique on biological parameters of species. Engorged partially females were collected, weighted and separate by weight in two range of 40 to 60 milligrams and 61 to 100 milligrams. Each range was further sorted in four groups with homogeneous weight which were fed for 6, 12, 24 and 36 hours through capillaries tubes containing citrated bovine blood. It was observed that artificial feeding promoted increase weight of females in both range and definitive times. The Ticks fed artificially for periods more drawn out, had presented parameters of the non-parasitic phase next to the observed ones in conditions to laboratory for this species. Females of *D. (A.) nitens* partially engorged ingested great volume of blood when submitted to artificial feeding through capillaries tubes, without any effect in their biological parameters.

KEY WORDS: Ixodideo, *Anocentor nitens*, feeding in vitro.

RESUMO

Alimentação artificial é uma importante ferramenta para estudar o mecanismo de alimentação de carrapatos e a transmissão de agentes patogênicos na ausência de hospedeiros vertebrados. O objetivo foi alimentar artificialmente fêmeas parcialmente ingurgitadas de *Dermacentor (Anocentor) nitens*, provenientes de equinos naturalmente infestados e verificar a influência dessa técnica sobre os parâmetros biológicos da espécie. Fêmeas parcialmente ingurgitadas foram coletadas,

pesadas e separadas em faixas de peso de 40 a 60 miligramas e 61 a 100 miligramas. Para cada faixa foram formados quatro grupos de peso homogêneo, alimentados nos períodos de 6, 12, 24 e 36 horas por meio de tubos capilares contendo sangue bovino citratado. Observou-se que a alimentação artificial promoveu ganho do peso crescente em ambas as faixas e em todos os tempos determinados. Os carrapatos alimentados artificialmente por períodos mais prolongados apresentaram parâmetros da fase não-parasitária próximos aos observados em condições de laboratório para essa espécie. Fêmeas de *D. (A.) nitens* parcialmente ingurgitadas foram capazes de ingerir grande volume de sangue, quando submetidas à alimentação artificial por meio de tubos capilares, sem causar influência nos parâmetros biológicos.

PALAVRAS-CHAVE: Ixodídeo, *Anocentor nitens*, alimentação *in vitro*.

¹ Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Instituto de Veterinária (IV), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Km 7 da BR 465, Seropédica, RJ 23890-000, Brasil

² Curso de graduação em Medicina Veterinária, IV, UFRRJ, Seropédica, RJ.

³ Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, IV, UFRRJ, Cx. Postal 74548, Seropédica, RJ 23890-970, Brasil. E-mail: adivaldo@ufrj.br

INTRODUÇÃO

A primeira descrição do método de alimentação artificial por meio de tubos capilares foi realizada por Chabaud (1950). Desde então, essa técnica vem sendo empregada na alimentação de carrapatos vetores (DE LA VEGA et al., 2000; ABEL, 2004) e na transmissão de agentes patogênicos na ausência de hospedeiros (BURGDORFER, 1957; KOCAN et al., 2005). A alimentação artificial pode ainda ser empregada em testes de acaricidas sistêmicos e vacinas, na elucidação de aspectos relacionados à fisiologia da alimentação e componentes da saliva dos carrapatos (DE LA VEGA et al., 2000; KRÖBER; GUERIN, 2007).

Dermacentor (Anocentor) nitens é uma espécie de carrapato de grande importância no Brasil, encontrada naturalmente parasitando equídeos, porém outros vertebrados podem servir de hospedeiros (LABRUNA et al., 2001). Esta espécie tem predileção pelas regiões da orelha, divertículo nasal, perineo e crina de seus hospedeiros, acarretando prejuízos, como queda da produtividade devido ao estresse dos animais durante a espoliação sanguínea (BORGES et al., 2000).

O estabelecimento de colônias de *D. (A.) nitens* em laboratório enfrenta dificuldades no que diz respeito à adaptação do carrapato aos hospedeiros alternativos e à manutenção de animais para a sua alimentação. Além disto, a comunidade científica, preocupada com questões relacionadas à ética, vem estimulando cada vez mais a diminuição do uso de animais na experimentação científica (MARQUE FONTES, 1995). Nesse contexto, a alimentação artificial é uma ferramenta importante por possibilitar a análise dos parâmetros biológicos, a avaliação da eficiência do vetor, além de tornar possível a redução do número de animais de laboratório necessários para pesquisas que envolvam a transmissão de bioagentes (HOKAMA et al., 1987; KRÖBER; GUERIN, 2007).

Os objetivos do presente trabalho foram alimentar artificialmente, por meio de tubos capilares, fêmeas parcialmente ingurgitadas de *D. (A.) nitens*, provenientes de infestação natural de equinos, e verificar a influência da técnica sobre os parâmetros biológicos da espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi conduzido no Laboratório de Doenças Parasitárias do Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). Foram utilizadas fêmeas parcialmente ingurgitadas de *D. (A.) nitens*, provenientes de equinos naturalmente infestados, pertencentes ao Setor de Matrizes da Fazenda do Instituto de Zootecnia da UFRRJ. Após a coleta manual, os carrapatos foram transportados para o laboratório, lavados com água destilada, secos, examinados quanto à integridade do aparelho bucal com auxílio de lupa estereoscópica e pesados em balança analítica. O experimento foi dividido em duas etapas; na primeira, foram utilizadas 40 fêmeas com peso entre 40 e 60 mg e, na segunda, 40 fêmeas pesando de 61 a 100 mg. Em cada etapa, os carrapatos

foram separados em quatro grupos de peso homogêneo para serem submetidos à alimentação artificial por meio de tubos capilares, nos períodos de 6, 12, 24 e 36 horas.

O sistema de alimentação por meio de tubos capilares foi conduzido conforme descrito por Abel (2004), com modificações. Foi utilizado sangue coletado assepticamente da veia jugular de um bovino sadio em tubo contendo citrato de sódio como anticoagulante. O sangue foi conservado sob refrigeração a 4 °C, e aquecido em banho-maria a 37 °C antes do preenchimento dos capilares. Os carrapatos foram fixados em bandejas de isopor com a face ventral voltada para cima, com auxílio de fita dupla face. Em seguida, microcapilares sem anticoagulante, utilizados na determinação de hematócrito (75mm x 1,0mm x 1,5mm), repletos de sangue, foram dispostos sobre as peças bucais dos carrapatos. Durante o período de alimentação artificial, os microcapilares foram trocados a cada intervalo de 60 minutos, e os grupos mantidos em estufa para Demanda Biológica de Oxigênio (B.O.D.), à temperatura de 27 ± 1 °C e umidade relativa superior a 80%.

Ao término dos referidos tempos de exposição, as fêmeas foram pesadas para verificação da ingestão de sangue e fixadas em placas de Petri para análise dos parâmetros biológicos. Posteriormente, foram mantidas em estufa tipo B.O.D. sob as mesmas condições controladas de temperatura e umidade acima referidas.

Foram avaliados parâmetros biológicos da fase não-parasitária referentes a período de pré-postura, período de postura, peso da massa de ovos, índice de eficiência nutricional e índice de eficiência reprodutiva, calculados segundo Bennett (1974).

Para análise estatística dos resultados, foram utilizados ANOVA e o teste de Tukey com nível de significância de 5%, para comparação das médias.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A pesagem dos carrapatos antes e após a exposição aos capilares foi uma maneira simples e eficiente para determinação do ganho de peso dos grupos nas duas faixas de peso, assim como observado por Abel (2004) e De la Vega (2000). Método mais sofisticado foi realizado por Kocan et al. (2005), que, ao estudarem a interação entre *D. variabilis* e *Anaplasma marginale* a partir de sistema de alimentação por meio de tubos capilares, observaram a ingestão de sangue pelos carrapatos através de micro-esferas fluorescentes e pela diminuição do volume de sangue nos tubos. Dessa forma, foi detectada presença das micro-esferas na hemolinfa, fezes e intestino dos carrapatos.

Na Tabela 1, estão apresentados os resultados referentes ao peso das fêmeas de *D. (A.) nitens*, antes e após a alimentação artificial, por meio de tubos capilares em todos os períodos analisados.

O ganho de peso dos carrapatos foi crescente à medida que se aumentou o tempo de exposição aos capilares, sendo observada diferença estatística a partir de 24 horas de alimentação nas duas faixas de peso estudadas. Dessa forma sugere-

Tabela 1. Avaliação do ganho de peso médio em fêmeas de *Dermacentor (Anocentor) nitens*, nas faixas de peso entre 40 a 60 mg e 61 a 100 mg, submetidas à alimentação artificial por meio de tubos capilares, nos períodos de 6, 12, 24 e 36 horas.

Períodos de alimentação	Peso médio dos grupos alimentados artificialmente					
	40-60 mg			61-100 mg		
	Antes média±dp	Depois média±dp	Ganho de peso média±dp	Antes média±dp	Depois média±dp	Ganho de pes média±dp
6 horas	48,16±5,84 ^a (40,30-58,80)	64,01±24,32 ^a (44,90-93,30)	15,85±13,64 ^{a.A}	76,03±10,43 ^d (61,40-93,80)	113,90±12,49 ^c (88,90-123,40)	37,87±13,35 ^{c.B}
12 horas	47,50±6,08 ^a (40,20-58,40)	78,44±24,32 ^a (46,70-115,90)	30,94±22,55 ^{a.A}	75,74±10,30 ^d (62,20-93,60)	130,90±20,93 ^c (86,00-153,40)	55,17±19,91 ^{c.A}
24 horas	47,56±5,19 ^a (40,80-55,30)	128,03±45,49 ^b (44,40 -177,40)	80,47±45,71 ^{b.A}	75,97±10,80 ^d (63,00-96,70)	206,62±28,42 ^d (159,50-239,10)	130,63±28,44 ^{d.B}
36 horas	47,76±5,12 ^a (41,60-57,20)	170,24±27,13 ^c (123,40 -222,80)	122,48±25,61 ^{c.A}	76,1±10,62 ^d (63,60-92,60)	222,09±36,63 ^d (155,90-268,60)	146,00±35,17 ^{d.A}

^A Nas linhas, médias com letras maiúsculas comuns são equivalentes (P<0,05).

^a Nas colunas, médias com pelo menos uma letra minúscula comum são equivalentes (P<0,05).

se que este período seja suficiente para uma ingestão significativa de sangue. Abel (2004) relatou um grande volume de sangue ingerido por fêmeas de *Amblyomma cajennense* parcialmente ingurgitadas a partir de seis horas de exposição aos capilares. Esses resultados corroboram os encontrados por Cunha et al. (2006), que, ao alimentarem artificialmente fêmeas parcialmente ingurgitadas de *Rhipicephalus sanguineus*, por meio de tubos capilares, determinaram que o ganho de peso estava relacionado com o período de exposição dos carrapatos aos capilares.

Os grupos de carrapatos com peso de 61 a 100 mg apresentaram maior ganho de peso em todos os períodos de alimentação artificial em relação aos grupos pesando entre 40 e 60 mg. No entanto, somente foi observada diferença estatística entre os grupos seis e 24 horas, quando comparadas ambas as faixas de peso. Tais resultados sugerem que a determinação do peso inicial das fêmeas submetidas à alimentação artificial por meio de tubos capilares influencie no peso final dos carrapatos.

Estudos anteriores obtiveram sucesso na alimentação artificial com o uso de tubos capilares em ixodídeos previamente alimentados em animais de laboratório (ABEL, 2004; KOCAN et al., 2005; CUNHA et al., 2006). No presente trabalho, foi possível verificar um ganho de peso significativo, a partir da alimentação de *D. (A.) nitens* provenientes de infestação natural de equinos, contribuindo para diminuir o uso de animais em experimentações.

A troca dos capilares a cada 60 minutos permitiu que os carrapatos recebessem sangue fresco regularmente. Essa é uma grande vantagem da técnica, que, apesar de laboriosa, não torna necessária a adição de conservantes (STONE et al., 1983), assim como o armazenamento de sangue, o que poderia levar à produção de toxinas (OSBORNE; MELLOR, 1986).

Nas Tabelas 2 e 3, estão expostos os valores médios referentes aos parâmetros biológicos das fêmeas de *D. (A.) nitens* alimentadas artificialmente. Esses resultados foram equivalentes aos observados por Bastos et al. (1996) e Sanavria;

Tabela 2. Parâmetros biológicos referentes à fase não-parasitária de fêmeas parcialmente ingurgitadas de *Dermacentor (Anocentor) nitens*, pesando entre 40 e 60 miligramas, submetidas à alimentação artificial por meio de tubos capilares, durante 6, 12, 24 e 36 horas.

Parâmetros biológicos	Períodos de alimentação artificial por meio de tubos capilares			
	6 horas média±dp	12 horas média±dp	24 horas média±dp	36 horas média±dp
Peso das fêmeas alimentadas (mg)	64,01±17,20 ^a (44,90-93,30)	78,44±24,32 ^a (46,70-115,90)	128,03±45,49 ^b (44,40-177,40)	170,24±27,13 ^c (123,40-222,80)
Período de Pré-Postura (dias)	6,30±1,25 ^a (5,00-8,00)	4,50±0,97 ^b (4,00-7,00)	4,90±1,61 ^{a.b} (4,00-9,00)	4,30±0,48 ^b (4,00-5,00)
Período de Postura (dias)	5,30±1,16 ^a (3,00-7,00)	6,50±1,43 ^a (4,00-9,00)	8,56±2,56 ^b (2,00-10,00)	9,30±0,95 ^b (8,00-11,00)
Peso massa de ovos (mg)	17,15±12,17 ^a (4,50-38,30)	30,47±17,39 ^a (9,00-60,40)	60,14±28,82 ^b (0,80-87,20)	80,85±12,46 ^b (58,90-94,90)
Índice de Eficiência Nutricional (%)	42,81±16,26 ^a (24,09-69,51)	64,40±14,34 ^b (41,67-89,21)	60,14±24,85 ^{a.b} (3,74-76,22)	70,10±9,23 ^b (47,55-80,37)
Índice de Eficiência Reprodutiva (%)	24,01±11,78 ^a (9,43-41,05)	35,82±11,87 ^{a.b} (19,27-52,11)	41,06±17,81 ^b (1,80-55,02)	48,07±7,43 ^b (32,26-55,58)

^a Nas linhas, médias com pelo menos uma letra minúscula comum são equivalentes (P<0,05).

Tabela 3. Parâmetros biológicos referentes à fase não-parasitária de fêmeas parcialmente ingurgitadas de *Dermacentor (Anocentor) nitens*, pesando entre 61 e 100 miligramas, submetidas à alimentação artificial por meio de tubos capilares, durante 6, 12, 24 e 36 horas.

Parâmetros biológicos	Períodos de alimentação artificial por meio de tubos capilares			
	6 horas média±dp	12 horas média±dp	24 horas média±dp	36 horas média±dp
Peso das fêmeas alimentadas (mg)	113,90±12,49 ^a (88,90-123,40)	130,90±20,93 ^a (86,00-153,40)	206,62±28,42 ^b (159,50-239,10)	222,09±36,63 ^b (155,90-268,60)
Período de Pré-Postura (dias)	4,70±0,48 ^a (4,00-5,00)	4,20±0,63 ^a (4,00-6,00)	4,20±0,42 ^a (4,00-5,00)	2,90±0,32 ^b (2,00-3,00)
Período de Postura (dias)	8,10±0,57 ^a (7,00-9,00)	8,00±1,25 ^a (5,00-10,00)	10,50±1,40 ^b (7,00-12,00)	11,30±1,16 ^b (10,00-13,00)
Peso massa de ovos (mg)	53,20±8,58 ^a (40,00-69,80)	67,11±17,40 ^a (30,30-85,90)	116,60±24,31 ^b (75,80-146,80)	124,23±32,95 ^b (56,90-171,00)
Índice de Eficiência Nutricional (%)	70,52±4,84 ^a (63,79-77,90)	76,29±4,70 ^{a,b} (65,58-81,82)	77,70±6,64 ^b (67,02-85,40)	78,95±4,63 ^b (69,83-83,09)
Índice de Eficiência Reprodutiva (%)	46,50±2,80 ^a (42,66-51,70)	50,37±6,54 ^{a,b} (35,23-56,00)	56,06±5,92 ^b (45,01-62,28)	55,21±8,56 ^b (36,50-63,66)

^aNas linhas, médias com pelo menos uma letra minúscula comum são equivalentes (P<0,05).

Prata (1996), os quais trabalharam com fêmeas ingurgitadas provenientes de infestação de *D. (A.) nitens* em equinos. A alimentação artificial não interferiu na biologia dos carrapatos, fato observado por Rechav et al. (1999) para *A. americanum*, De La Vega et al. (2000) para *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e Abel (2004) para *A. cajennense*.

Nos resultados observados para o período de pré-postura dos carrapatos, com peso de 40 a 60 mg, não houve diferença significativa a partir de 12 horas de alimentação artificial (Tabela 2). Esse parâmetro sofreu redução conforme o aumento do tempo de exposição dos carrapatos aos capilares. Na faixa de peso de 61 a 100 mg, os carrapatos alimentados por 36 horas iniciaram postura antes dos demais grupos, diferindo estatisticamente (Tabela 3).

Nos parâmetros período de postura e peso da massa de ovos, foi encontrada diferença significativa entre os grupos a partir de 24 horas de alimentação, nas duas faixas de peso (Tabelas 2 e 3). Esse fato pode ser explicado em decorrência da maior ingestão de sangue pelos carrapatos desses grupos. Hooker et al. (1912), trabalhando com fêmeas de *D. (A.) nitens* naturalmente alimentadas e provenientes de bovinos, observaram uma alta correlação entre o peso das teleóginas e o número de ovos produzidos.

Nos índices de eficiência nutricional e reprodutiva, foi observada diferença estatística, a partir de 24 horas, nas duas faixas de peso estudadas. Com exceção do índice de eficiência nutricional dos carrapatos de peso entre 40 e 60mg alimentados por 12 horas.

Em relação à fertilidade dos ovos, verificou-se a eclosão das larvas em 92% dos carrapatos dos grupos com peso entre 40 e 60 mg; e 100% para os grupos pesando de 61 a 100 mg. Os resultados indicam ainda, que nas faixas de peso estudadas, as fêmeas alimentadas artificialmente por períodos mais prolongados, apresentaram parâmetros da fase não-parasitária próximos aos observados em condições de laboratório para essa espécie (BASTOS et al., 1996; SANAVRIA; PRATA, 1996).

CONCLUSÕES

Carrapatos *D. (A.) nitens* parcialmente ingurgitados, provenientes de infestação natural em equinos, foram capazes de ingerir grande volume de sangue quando submetidos à técnica de alimentação artificial por meio de tubos capilares.

A determinação do peso inicial das fêmeas submetidas à alimentação artificial por meio de tubos capilares influenciou no peso final dos carrapatos.

A alimentação artificial de fêmeas parcialmente ingurgitadas de *D. (A.) nitens* não influenciou nos parâmetros biológicos desta espécie.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEL, I. *Alimentação artificial de fêmeas de Amblyomma cajennense (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) através de tubos capilares*. 2004. 56f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2004.
- BASTOS, K. M. S.; DAEMON, E.; FACCINI, J. L. H.; DA CUNHA, D. W. Efeitos de diferentes temperaturas sobre a fase não parasitária de *Dermacentor (Anocentor) nitens* (Neumann, 1897) (Acari: Ixodidae) em condições de laboratório. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 5, n. 1, p. 29-32, 1996.
- BENNETT, G.F. Oviposition of *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acarina: Ixodidae). I. Influence of tick size on egg production. *Acarologia*, v.16, n.1, p. 52-61, 1974.
- BORGES, L. M. F.; OLIVEIRA, P. R.; RIBEIRO, M. F. B. Seasonal dynamics of *Anocentor nitens* on horses in Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 89, n. 1, p. 165-171, 2000.
- BURGDORFER, W. Artificial feeding of ixodid ticks for studies on the transmission of disease agents. *Journal of Infectious Diseases*, v. 100, n. 3, p. 212-214. 1957.
- CHABAUD, A. G. Sur la nutrition artificielle des tiques. *Annales de Parasitologie*, v. 25, n. 1-2, p. 42-47. 1950.

- CUNHA, N. C.; RANGEL, C. P.; PIRANDA, E. M.; REZENDE, J.; TEIXEIRA, R. C.; FONSECA, A. H. Avaliação do ganho de peso em fêmeas de *Rhipicephalus sanguineus* (acari: Ixodidae) alimentadas artificialmente por meio de tubos microcapilares. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 14 E SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE RICKETTSIOSES, 2, 2006, Ribeirão Preto. *Anais ... Jaboticabal: CBPV*, 2006. p. 215.
- DE LA VEGA, R.; DIAZ, G.; FINLAY, L. Artificial feeding of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) through micropipettes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 916, n. 1, p. 315-319, 2000.
- HOKAMA, Y.; LANE, R. S.; HOWARTH, J. A. Maintenance of adult and nymphal *Ornithodoros coriaceus* (Acari: Argasidae) by artificial feeding through a parafilm membrane. *Journal of Medical Entomology*, v. 24, n. 3, p. 319-323, 1987.
- HOOVER, W.A.; BISHOPP, F.C.; WOOD, H.P. *The life history and bionomics of some North American ticks*. Washington: United States Bureau of Entomology Bulletin, n. 106, 1912. 239 p.
- KOCAN, K. M.; YOSHIKA, J.; SONENSHINE, D. E.; FUENTE, J.; CERAUL, S. M.; BLOUIN, E. F.; ALMAZÁN, C. Capillary tube feeding system for studying tick-pathogen interactions of *Dermacentor varibilis* (Acari: Ixodidae) and *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae). *Journal of Medical Entomology*, v. 42, n. 5, p. 864-874, 2005.
- KRÖBER, T.; GUERIN, P. M. In vitro feeding assays for hard ticks. *Trends in Parasitology*, v. 23, n. 9, p. 445-449, 2007.
- LABRUNA, M. B.; KERBER, C. E.; FERREIRA, F.; FACCINI, J. L. H.; DE WAAL, D. T.; GENNARI, S. M. Risk factors to tick infestations and their occurrence on horses in the State of São Paulo, Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 97, n. 1, p. 1-14, 2001.
- MARQUE FONTES, E. Aplicação de métodos alternativos à experimentação animal em estudos farmacológicos e toxicológicos. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, v. 514, n. 1, p. 85-88, 1995.
- OSBORNE, R. W.; MELLOR, P. S. Development and mortality of *Ornithodoros moubata* after feeding through an artificial membrane. *Tropical Animal Health and Production*, v. 18, n. 1, p. 41-47, 1986.
- RECHAV, Y.; ZYZAK, M.; FIELDEN, L. J.; CHILDS, J. E. Comparison of methods for introducing and producing artificial infection of ixodid ticks (Acari: Ixodidae) with *Ehrlichia chaffeensis*. *Journal of Medical Entomology*, v. 36, n. 4, p. 414-419, 1999.
- SANAVRIA, A.; PRATA, M. C. A. Ensaio metodológico para estudo do ciclo biológico do *Anocentor nitens* (Neumann, 1897) (Acari: Ixodidae) em equinos experimentalmente infestados. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 5, n. 2, p. 91-93, 1996.
- STONE, B. F.; COMMINS, M. A.; KEMP, D. H. Artificial feeding of the Australian paralysis tick, *Ixodes holocyclus* and collection of paralyzing toxin. *International Journal of Parasitology*, v. 13, n. 5, p. 447-454, 1983.

Recebido em 30 de abril de 2008.

Aceito para publicação em 14 de setembro de 2008.