



INVESTIGAÇÃO MOLECULAR DE *Wolbachia* EM *Amblyomma sculptum* (ACARI: IXODIDAE) DE ÁREAS ENDÊMICAS PARA FEBRE MACULOSA BRASILEIRA

DEBORAH MIRELA DE MELO ROMANO

**SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO DO ESTADO
DE SÃO PAULO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO BIOLÓGICO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE,
SEGURANÇA ALIMENTAR E AMBIENTAL NO AGRONEGÓCIO**

**INVESTIGAÇÃO MOLECULAR DE *Wolbachia* EM *Amblyomma
sculptum* (ACARI: IXODIDAE) DE ÁREAS ENDÊMICAS PARA FEBRE
MACULOSA BRASILEIRA**

DEBORAH MIRELA DE MELO ROMANO

Dissertação apresentada para a obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio. Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema.

SÃO PAULO

2024

DEBORAH MIRELA DE MELO ROMANO

INVESTIGAÇÃO MOLECULAR DE *Wolbachia* EM *Amblyomma sculptum* (ACARI: IXODIDAE) DE ÁREAS ENDÊMICAS PARA FEBRE MACULOSA BRASILEIRA

Dissertação apresentada para a obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agronegócio

Orientadora: Professora Dra. Márcia Cristina Mendes

Coorientador: Dr. Thiago Nunes Pereira

SÃO PAULO

2024

Eu **Deborah Mirela de Melo Romano**, autorizo o Instituto Biológico (IB-APTA), da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, a disponibilizar gratuitamente e sem ressarcimento dos direitos autorais, o presente trabalho acadêmico de minha autoria, no portal, biblioteca digital, catálogo eletrônico ou qualquer outra plataforma eletrônica do IB para fins de leitura, estudo, pesquisa e/ou impressão pela Internet desde que citada a fonte.

Assinatura: _____ Data ___/___/___

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo
Núcleo de Informação e Documentação – IB

Romano, Deborah Mirela de Melo.

Investigação molecular de *Wolbachia* em *Amblyomma sculptum* (Acari: Ixodidae) de áreas endêmicas para febre maculosa brasileira. / Deborah Mirela de Melo Romano. - São Paulo, 2024.

60 p.

doi: 10.31368/PGSSAAA.2024D.DR08

Dissertação (Mestrado). Instituto Biológico (São Paulo). Programa de Pós-Graduação.

Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema.

Linha de pesquisa: Manejo integrado de pragas e doenças em ambientes rurais e urbanos.

Orientador: Márcia Cristina Mendes

Coorientador: Thiago Nunes Pereira

Versão do título para o inglês: Molecular investigation of *Wolbachia* in *Amblyomma sculptum* (Acari: Ixodidae) from endemic areas for brazilian spotted fever.

1. Endossimbiontes 2. Vetor 3. Carrapato-estrela 4. Interactoma
5. Microbioma I. Romano, Deborah Mirela de Melo II. Mendes, Márcia Cristina
III. Instituto Biológico (São Paulo) IV. Título.

IB/Bibl./2024/08

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à **Deus** por me amar, me guiar, me sustentar e por permitir que eu chegasse até aqui.

Aos meus pais **Antônio Denilson Romano** e **Joelma da Conceição de Melo Romano** por me criarem com humildade, incentivarem os meus estudos e me apoiarem em todas as situações.

Aos meus **familiares** e **amigos** pelo carinho e por compreenderem a minha ausência durante esse período.

Às minhas gatas **Bella Mirela** e **Willa Maria**, que considero como filhas e completarão 9 anos ao meu lado neste ano, à gata **Mavis** e às cachorras **Cacau** e **Balu** que estiveram do meu lado quando me senti sozinha.

À minha orientadora **Dra. Márcia Cristina Mendes** por confiar em mim e acreditar no meu potencial, investir na minha pesquisa e me ensinar muitas coisas.

Ao meu co-orientador **Dr. Thiago Nunes Pereira** por estar sempre disposto a me ajudar e me ensinar.

À minha **banca** de qualificação e de defesa por compartilharem sua experiência comigo e tornarem meu trabalho de excelência.

Às minhas amigas, mestranda **Caroline Santos Gambini Coelho** e doutoranda **Isabella de Almeida Barboza** por pularem de cabeça na loucura que foi este trabalho e me ajudaram quando mais precisei.

À técnica e minha amiga **Brysa Natamy de Amorim Cavalcante**, pois não sei o que seria de mim sem a ajuda dela no laboratório.

Ao mestrando e meu melhor amigo **Anderson dos Anjos Sant'Ana** por me ajudar, me encorajar e estar sempre ao meu lado, me apoiando durante longas madrugadas de escrita e me acalmando em momentos difíceis.

À minha psicóloga **Juliana Pereira Pacheco** pelo carinho, por acreditar em mim e me mostrar o quanto sou capaz.

Aos pesquisadores **Fernanda Calvo Duarte, Leonardo Costa Fiorini, Ricardo Harakava, Luara Lucena Cassiano e Líria Hiromi Okuda** por compartilharem ideias comigo e me auxiliarem nas resoluções de problemas. Além disso, agradeço aos três últimos mais uma vez por abrirem às portas de seus laboratórios sempre que precisei.

Aos mestrandos e meus amigos **Lucas de Mello Morán, Elianai Ribeiro de Souza e Thais Araújo Moura** e à minha colega doutoranda **Karina Araújo dos Anjos** por me auxiliarem em vários momentos e por compartilharem risadas e preocupações.

À estagiária **Tamara de Oliveira Silva** pelo cuidado e pela competência que teve realizando parte do meu trabalho.

À técnica **Márcia do Laboratório de Virose de Bovídeos** e à mestranda **Laura Rossetto Pereira** pelo suporte que me deram.

Ao **Instituto Biológico** e à toda **equipe multidisciplinar**, desde pesquisadores aos demais colaboradores, pela oportunidade, pela inspiração e por todo conhecimento que adquiri durante esses dois anos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

“Marielle, presente!”

ROMANO, Deborah Mirela de Melo. **Investigação molecular de *Wolbachia* em *Amblyomma sculptum* (Acari: Ixodidae) de áreas endêmicas para febre maculosa brasileira.** 2024. 90 f. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, São Paulo, 2024.

Os carrapatos são ectoparasitos hematófagos, entre eles, a espécie *Amblyomma sculptum* se destaca como vetor de patógenos para animais e seres humanos no Brasil, principalmente pela transmissão da bactéria *Rickettsia rickettsii*, causadora da febre maculosa brasileira. O controle de *A. sculptum* é complexo, incentivando estudos sobre o uso de bioinsumos para manejo. A bactéria endossimbionte *Wolbachia* pode manipular a reprodução de artrópodes e bloquear patógenos, sendo utilizada para o controle biológico de pragas, vetores e de doenças. Embora seja abundante entre os invertebrados, a associação de *Wolbachia* com carrapatos ainda é pouco explorada. Este estudo teve como objetivo detectar e identificar a *Wolbachia* em populações de *A. sculptum* de Campinas e Jundiaí, São Paulo. Carrapatos adultos foram coletados, identificados morfológicamente como *A. sculptum* e analisados em dois ensaios separados. Nos dois testes as amostras de carrapatos foram higienizadas e submetidas à extração de DNA com o reagente DNAzol, amplificação por PCR, eletroforese em gel de agarose e sequenciamento. Durante o primeiro ensaio, as amostras de carrapato extraídas foram amplificadas por PCR para detectar o gene 16S rRNA (mtDNA) de *Amblyomma* spp., 16S rRNA de *Wolbachia* e COX I (mtDNA) da vespa parasitóide *Ixodiphagus hookeri*. Enquanto no segundo ensaio, além dessas reações, as amostras também foram submetidas à amplificação dos genes 12S rRNA (mtDNA) de Onchocercidae, 16S rRNA das bactérias *Coxiella* spp., *Francisella* spp. e *ompB* de *Rickettsia* spp. Sequências parciais de diferentes marcadores foram identificadas utilizando BLASTn e as sequências do gene 16S rRNA de *Wolbachia* obtidas no Ensaio 1 foram submetidas a análises filogenéticas. Análises estatísticas foram conduzidas com os dados observados e o custo do método utilizado para extração de DNA foi calculado. Durante o Ensaio 1, 187 amostras de *A. sculptum* foram analisadas e 15 (8%) foram positivas para *Wolbachia*, a partir disso, a árvore filogenética das sequências do gene 16S rRNA de *Wolbachia*, sugere que as bactérias identificadas estão relacionadas a grupos filogenéticos associados aos fenótipos de parasitismo reprodutivo e mutualismo da *Wolbachia*. Em relação ao Ensaio 2, apenas seis amostras (3%) foram positivas para

Wolbachia, 146 (68%) para *Coxiella* spp., 24 (11%) para *Francisella* spp. e 208 (96%) para Onchocercidae, de um total de 216 amostras de *A. sculptum* testadas. Nenhuma amostra foi positiva para *Rickettsia* spp. e as amostras *Wolbachia*-positivas não foram positivas para *I. hookeri*. Não houve diferença estatística significativa em relação à sazonalidade, local ou sexo das amostras, nem em relação à coinfeção com outras bactérias. A partir deste trabalho, é possível concluir que as populações de *A. sculptum* de Campinas e Jundiaí não são hospedeiras comuns de *Wolbachia*. Esses resultados são importantes para o desenvolvimento de estratégias de manejo de carrapatos, destacando a relevância da pesquisa sobre o uso da *Wolbachia* como agente de controle biológico.

Palavras-chave: Endossimbiontes. Vetor. Carrapato-estrela. Febre maculosa brasileira. Microbioma.

ROMANO, Deborah Mirela de Melo. **Investigação molecular de *Wolbachia* em *Amblyomma sculptum* (Acari: Ixodidae) de áreas endêmicas para febre maculosa brasileira.** 2024. 90 f. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, São Paulo, 2024.

Ticks are hematophagous ectoparasites, among them, the *Amblyomma sculptum* species stands out as a vector of pathogens for animals and humans in Brazil, mainly through the transmission of the bacterium *Rickettsia rickettsii*, the causative agent of Brazilian spotted fever. The control of *A. sculptum* is complex, encouraging studies on the use of bioinputs for management. The endosymbiont bacterium *Wolbachia* can manipulate the reproduction of arthropods and block pathogens, being used for the biological control of pests, vectors and diseases. Although abundant among invertebrates, the association of *Wolbachia* with ticks is still underexplored. This study aimed to detect and identify *Wolbachia* in populations of *A. sculptum* from Campinas and Jundiaí, São Paulo. Adult ticks were collected, morphologically identified as *A. sculptum*, and analyzed in two separate assays. In both tests, tick samples were cleaned and subjected to DNA extraction with DNazol reagent, PCR amplification, agarose gel electrophoresis, and sequencing. During the first assay, tick samples were amplified by PCR to detect the 16S rRNA gene (mtDNA) of *Amblyomma* spp., *Wolbachia* 16S rRNA and COX I (mtDNA) of the parasitoid wasp *Ixodiphagus hookeri*. While in the second assay, in addition to these reactions, samples were also subjected to amplification of the 12S rRNA gene (mtDNA) of *Onchocercidae*, 16S rRNA of bacteria *Coxiella* spp., *Francisella* spp. and ompB of *Rickettsia* spp. Partial sequences of different markers were identified using BLASTn, and the *Wolbachia* 16S rRNA gene sequences obtained in Assay 1 were subjected to phylogenetic analyses. Statistical analyses were conducted with the observed data and the cost of the DNA extraction method was calculated. During Assay 1, 187 *A. sculptum* samples were analyzed, and 15 (8%) were positive for *Wolbachia*, from which the phylogenetic tree of *Wolbachia* 16S rRNA gene sequences suggests that the identified bacteria are related to phylogenetic groups associated with the reproductive parasitism and mutualism phenotypes of *Wolbachia*. Regarding Assay 2, only six samples (3%) were positive for *Wolbachia*, 146 (68%) for *Coxiella* spp., 24 (11%) for *Francisella* spp. and

208 (96%) for Onchocercidae, out of a total of 216 *A. sculptum* samples tested. No sample was positive for *Rickettsia* spp. and *Wolbachia*-positive samples were not positive for *I. hookeri*. There was no statistically significant difference regarding the seasonality, location, or sex of the samples, nor regarding co-infection with other bacteria. From this work, it can be concluded that the populations of *A. sculptum* from Campinas and Jundiaí are not common hosts of *Wolbachia*. These results are important for the development of tick management strategies, highlighting the relevance of research on the use of *Wolbachia* as a biological control agent.

Keywords: Endosymbionts. Vector. Star tick. Brazilian spotted fever. Microbiome.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	15
	2.1.1 Geral.....	15
	2.1.2 Específicos.....	15
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
	3.1 Classificação e distribuição geográfica de <i>A. sculptum</i>	16
	3.2 Biologia de <i>A. sculptum</i>	17
	3.3 Morfologia externa de <i>A. sculptum</i>	18
	3.4 Hospedeiros de <i>A. sculptum</i>	20
	3.5 Impactos causados por <i>A. sculptum</i>	22
	3.5.1 <i>Rickettsia</i>	22
	3.5.1.1 Febre maculosa brasileira	23
	3.6 Controle de <i>A. sculptum</i>	24
	3.7 Microbioma e endossimbiontes dos carrapatos.....	26
	3.8 <i>Wolbachia</i>	28
	3.9 Classificação e evolução de <i>Wolbachia</i>	29
	3.10 Transmissão e tropismo de <i>Wolbachia</i>	30
	3.11 Genoma de <i>Wolbachia</i>	31
	3.12 Fenótipos da <i>Wolbachia</i> e sua utilização no biocontrole	32
	3.13 <i>Wolbachia</i> em carrapatos	34
4	MATERIAL E MÉTODOS	36
	4.1 Locais dos ensaios	36
	4.2 Obtenção e identificação dos carrapatos	36
	4.3 Preparação das amostras	37
	4.4 Obtenção de controles positivos.....	38
	4.5 Ensaio 1.....	38
	4.5.1 Extração de DNA	38
	4.5.2 PCR de <i>Amblyomma</i> spp	39

4.5.3	PCR de <i>Wolbachia</i>	39
4.5.4	PCR de <i>I. hookeri</i>	39
4.5.5	Eletroforese.....	40
4.5.6	Análises filogenéticas	40
4.6	Ensaio 2.....	40
4.6.1	Otimização da extração de DNA	40
4.6.2	PCR de <i>Amblyomma</i> spp	41
4.6.3	PCR de <i>Wolbachia</i>	42
4.6.4	PCR de <i>I. hookeri</i>	42
4.6.5	PCR de Onchocercidae.....	42
4.6.6	PCR de <i>Coxiella</i> spp	43
4.6.7	PCR de <i>Francisella</i> spp	43
4.6.8	PCR de <i>Rickettsia</i> spp	43
4.6.9	Eletroforese.....	44
4.7	Sequenciamento.....	44
4.8	Bioinformática.....	44
4.9	Registro das sequências	44
4.10	Análises estatísticas	44
4.11	Levantamento de custos	45
5	RESULTADOS	46
5.1	Ensaio 1.....	46
5.2	Ensaio 2.....	50
5.3	Análises estatísticas.....	53
5.4	Levantamento de custo.....	53
6	DISCUSSÃO	55
7	CONCLUSÃO.....	61
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62

1 INTRODUÇÃO

Os carrapatos (Arthropoda: Acari) são ectoparasitas hematófagos obrigatórios e se alimentam de vertebrados, especialmente mamíferos e aves (TAYLOR *et al.*, 2017). São os principais transmissores de doenças aos animais e, após os mosquitos, são os vetores de patógenos com maior impacto na saúde humana (HUSSAIN *et al.*, 2022).

Existem cerca de 900 espécies de carrapatos descritas no mundo, reunidas na ordem Ixodida, que se divide em três famílias: Ixodidae, Argasidae e Nuttalliellidae (CRUZ, 2017; NAVA *et al.*, 2017; DANTAS-TORRES *et al.*, 2019). Os carrapatos duros, como são conhecidas as espécies da família Ixodidae (GUGLIELMONE, ROBIN, 2018), são agrupados em 14 gêneros (GUGLIELMONE *et al.*, 2010), sendo que na região Neotropical ocorrem cinco deles: *Amblyomma*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Ixodes* e *Rhipicephalus* (ONOFRIO *et al.*, 2006).

A região Neotropical abriga cerca da metade da população de carrapatos do gênero *Amblyomma* (HORAK *et al.*, 2018; GUGLIELMONE *et al.*, 2010), sendo que no Brasil, se registra a presença de 34 espécies do gênero (SOARES *et al.*, 2023). Os carrapatos *Amblyomma* são importantes pois várias espécies podem parasitar seres humanos e são capazes de adquirir e transmitir patógenos (ENRÍQUEZ *et al.*, 2020).

A espécie *Amblyomma sculptum*, conhecida como "carrapato-estrela", ocorre predominantemente no bioma do Cerrado e tem as capivaras, os cavalos e as antas como seus principais hospedeiros primários. No entanto, devido ao seu comportamento generalista, pode se alimentar de uma variedade de vertebrados, incluindo seres humanos. Esse carrapato causa um impacto significativo para saúde pública no Brasil, por ser o principal vetor do agente etiológico da febre maculosa brasileira (FMB) no país (ANDREOTTI, GARCIA, PAIVA, 2021).

O controle de *A. sculptum* através da aplicação de produtos químicos em equinos é bem estabelecido (LABRUNA *et al.*, 2004), porém como as capivaras são animais silvestres, é inviável aplicar a mesma estratégia para o controle deste carrapato nesses roedores (VALE *et al.*, 2021), tornando necessário o uso de métodos alternativos para o manejo de *A. sculptum*.

Estudos com aplicação de fungos entomopatogênicos no habitat de capivaras já mostrou grande potencial para o controle de *A. sculptum* (SILVA, 2019). Além disso, outros microorganismos entomopatogênicos também têm sido empregados para o controle biológico de carrapatos (FONTES, VALADARES-INGLIS, 2020).

A microbiota dos carrapatos é composta por microorganismos procariontes e eucariontes, que são simbioses, comensais e patogênicos. Nos últimos 13 anos, o estudo do microbioma aumentou a compreensão da composição das comunidades bacterianas dos carrapatos, além de revelar a riqueza predominante de bactérias endossimbiontes mutualísticas, que regulam diversas funções fisiológicas importantes nesses artrópodes (NARASIMHAN, FIKRIG, 2015; GREAY *et al.*, 2018; BUYSSE, DURON, 2021).

Wolbachia é um gênero de alfa-proteobactérias endossimbiontes intracelulares (DOUDOUMIS *et al.*, 2012), que estão difundidas em cerca de 50% das espécies de artrópodes terrestres e nematóides filariais (WEINERT *et al.*, 2015; LEFOULON *et al.*, 2016). Algumas cepas de *Wolbachia* podem causar manipulações reprodutivas em seus hospedeiros e bloquear patógenos, tornando-as agentes promissoras no controle biológico de pragas e vetores de doenças (BI, WANG, 2020).

Embora a *Wolbachia* seja comum em muitas espécies de artrópodes, existem poucos trabalhos que relataram sua presença em carrapatos, dos quais a maioria não descarta a possibilidade do status *Wolbachia*-positiva das amostras ser devido uma contaminação secundária com outros organismos hospedeiros da bactéria, além de ainda não se saber qual seria a função de *Wolbachia* em carrapatos (MADHAV *et al.*, 2020).

O conhecimento sobre quais espécies de ixodídeos são suscetíveis a *Wolbachia* e a identificação de quais cepas de *Wolbachia* ocorrem naturalmente em carrapatos, são essenciais para investigar possíveis interações da *Wolbachia* com carrapatos, com o restante da composição microbiana desses ectoparasitos e sua utilização no biocontrole de carrapatos (BOBO, 2020). Assim, este trabalho visa contribuir com conhecimento sobre a ocorrência de *Wolbachia* em populações do carrapato *A. sculptum* presentes em áreas de alerta para saúde pública no Brasil.

2 OBJETIVOS

2.1.1 Geral

Detectar e identificar a bactéria *Wolbachia* nas populações do carrapato *A. sculptum* dos municípios de Campinas e Jundiaí, São Paulo, Brasil.

2.1.2 Específicos

- Estabelecer um protocolo eficiente e econômico de extração de DNA total de *A. sculptum*;
- Investigar a presença de outros organismos hospedeiros de *Wolbachia* em amostras de *A. sculptum* positivos para essa bactéria;
- Verificar a presença e coinfeção entre *Wolbachia* e outras endossimbiontes de carrapatos em *A. sculptum*.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Classificação e distribuição geográfica de *A. sculptum*

O carrapato *Amblyomma sculptum*, popularmente conhecido como carrapato-estrela, é um ectoparasito hematófago obrigatório, que pertence à família Ixodidae, da ordem Acari (ANDREOTTI, GARCIA, PAIVA, 2021). Até 2014, essa espécie era sinônima de *Amblyomma cajennense*, quando Nava e colaboradores baseando-se em observações morfológicas, biológicas e moleculares sugeriram uma reclassificação da espécie *A. cajennense*, separando esse táxon em seis espécies diferentes chamadas de *A. cajennense sensu stricto* (*s.s.*), *Amblyomma mixtum*, *A. sculptum*, *Amblyomma interandinum*, *Amblyomma tonelliae* e *Amblyomma patinoi*, reunidas no complexo *Amblyomma cajennense sensu lato* (*s.l.*) (NAVA *et al.*, 2014; MARTINS *et al.*, 2016).

Os carrapatos *A. sculptum* e *A. cajennense s.s.* coexistem no Brasil, mas apresentam distribuições geográficas distintas no país (Figura 1). A espécie *A. cajennense s.s.* tem sua distribuição mais concentrada na região amazônica, enquanto a espécie *A. sculptum* está

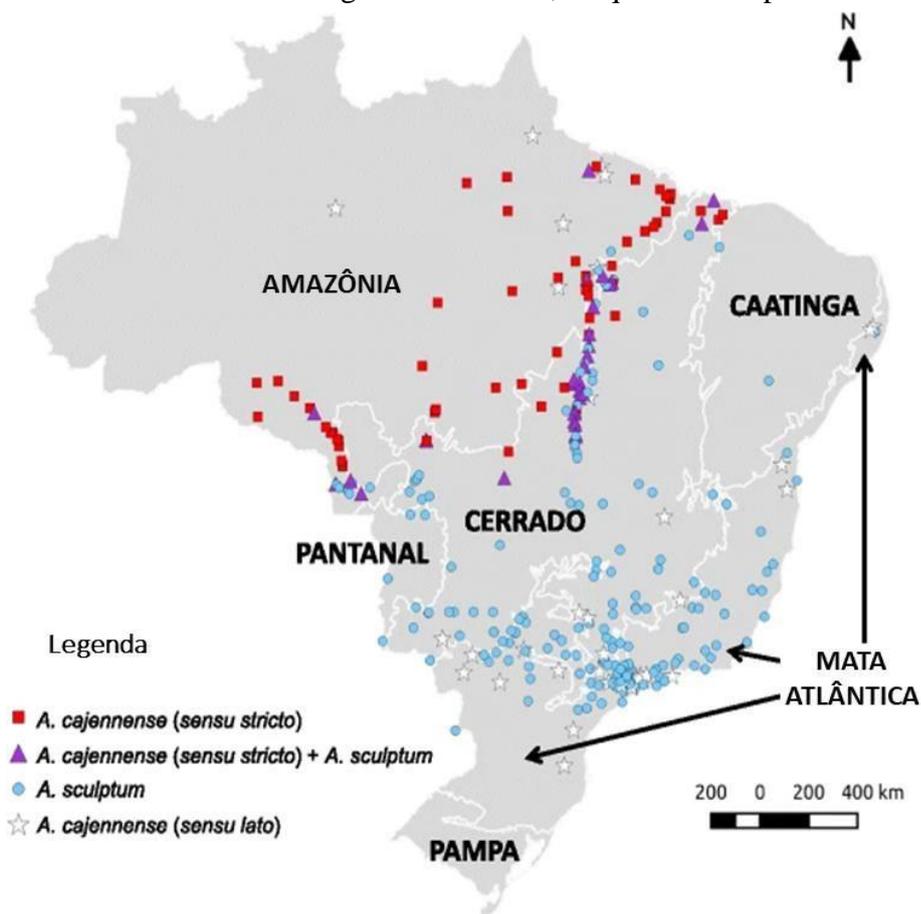


Figura 1. Mapa do Brasil mostrando a localização dos carrapatos *A. cajennense* (*s.s.*), *A. sculptum* e *A. cajennense* (*s.l.*). Carrapatos identificados segundo os seis principais biomas (Amazônia, Mata Atlântica, Caatinga, Cerrado, Pantanal, Pampa) que compõem o solo brasileiro. Fonte: MARTINS *et al.* (2016).

amplamente distribuído no território brasileiro, sendo encontrado nos biomas do Cerrado, Mata Atlântica, Pantanal e Caatinga. Além disso, este ixodídeo que apresenta forte capacidade de resiliência e adaptação em ambientes degradados e antropizados, também pode ser encontrado em outros países da América do Sul, incluindo o norte da Argentina, Bolívia e Paraguai (BITENCOURTH *et al.*, 2017; LABRUNA, 2018).

3.2 Biologia de *A. sculptum*

O carrapato *A. sculptum* é trioxeno, ou seja, necessita de três hospedeiros para completar seu ciclo de vida de quatro estágios: ovo, larva, ninfa e adulto (Figura 2). Inicialmente, as larvas aguardam por um hospedeiro nas pontas das folhas de vegetação. Após se fixarem ao hospedeiro, se alimentam, caem ao solo e buscam um local adequado para a ecdise, transformando-se em ninfas (RODRIGUES *et al.*, 2019).

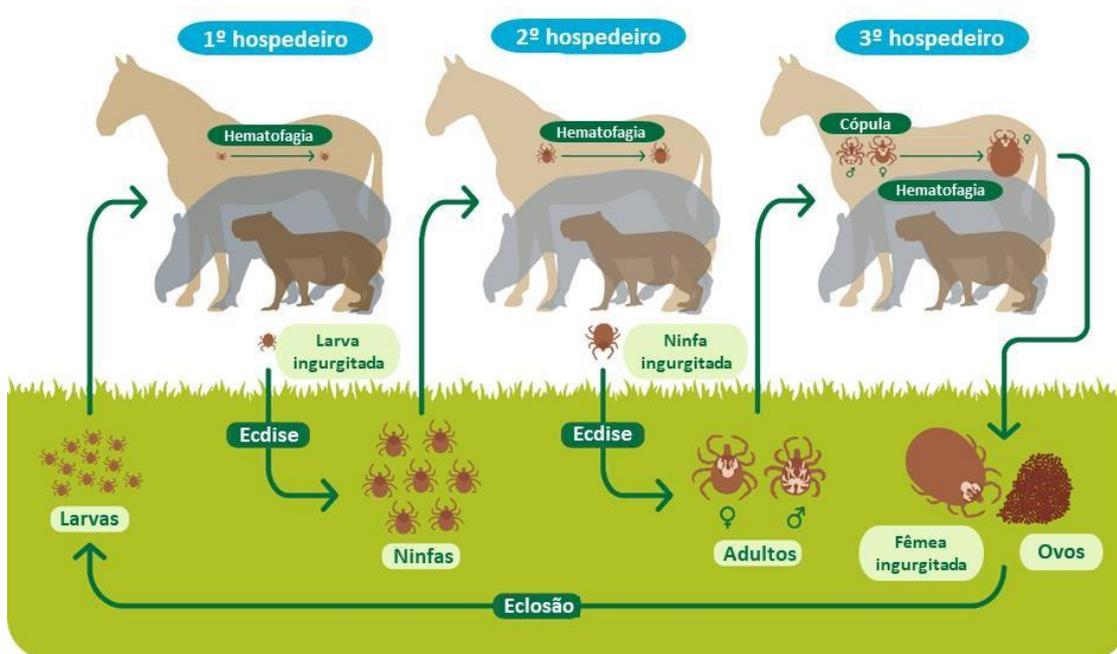


Figura 2. Ciclo de vida de *A. sculptum*. Fonte: PAULA *et al.* (2022).

As ninfas podem buscar ativamente hospedeiros ou esperar na vegetação e depois do repasto sanguíneo, também caem ao solo, mudando para o estágio adulto. Já os adultos, com dimorfismo sexual, se fixam a hospedeiros da mesma forma que as ninfas, se alimentam e acasalam. Apenas as fêmeas ficam cheias de sangue (ingurgitadas) e por essa razão são ser chamadas de teleóginas (RODRIGUES *et al.*, 2019).

Os machos continuam no hospedeiro em busca de mais fêmeas para copular, enquanto as fêmeas teleóginas se desprendem dos hospedeiros e retornam ao solo à procura de local seguro na vegetação para realizar a oviposição. Após o período de incubação, as larvas eclodem

dos ovos, iniciando um novo ciclo de vida (RODRIGUES *et al.*, 2019). A fase parasitária dura cerca de 3 a 7 dias para larvas e ninfas, enquanto as fêmeas se alimentam de seus hospedeiros por aproximadamente 7 a 10 dias (GUGLIELMONE *et al.*, 2006).

A. sculptum completa uma geração por ano, onde as larvas ocorrem entre os meses de abril a julho, durante o clima mais seco e frio; as ninfas são mais predominantes nos meses de julho a outubro e os adultos evidenciam-se nos meses de outubro a março quando o clima é mais quente e úmido (TARRAGONA *et al.*, 2018; RODRIGUES, 2022). Contudo, todos estágios de vida podem ser encontrados ao decorrer dos meses, pois a dinâmica sazonal de *A. sculptum* pode variar de acordo com a localização geográfica e condições climáticas (PAULA *et al.*, 2022).

3.3 Morfologia externa de *A. sculptum*

A parte anterior do corpo dos carrapatos chama-se gnatossoma e a parte posterior é conhecida como idiossoma (Figura 3). No gnatossoma encontra-se o capítulo, formado pelas peças bucais e a abertura oral, onde prendem-se as quelíceras, que são constituídas de numerosos dentículos especializados em cortar, rasgar ou fixar e os palpos, que auxiliam na localização do alimento. O hipostômio (Figura 4), que fica localizado na região basal do gnatossoma, é a peça mediano-ventral do aparelho de fixação, formado por fileiras de dentes retrógrados que se prendem no hospedeiro. O conjunto dessas estruturas é chamado de rostro (GUIMARÃES, TUCCI, BARROS-BATTESTI, 2001).

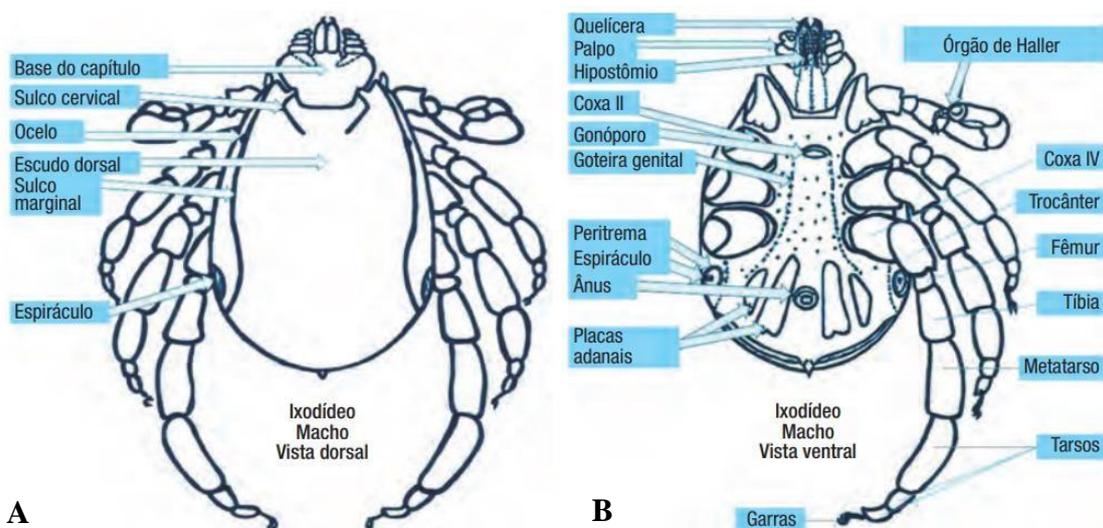


Figura 3. Morfologia externa de carrapatos Ixodidae. A: vista dorsal. B: vista ventral. Fonte: ANDREOTTI, R.; KOLLER, W. W.; GARCIA, M. V. (2016).

Já no idiossoma encontram-se todas as estruturas responsáveis pelas funções locomotoras, respiratórias, sensoriais e secretoras. A face dorsal dos idiossoma dos carrapatos da família Ixodidae é composto por um escudo esclerotizado, que tem como função a proteção contra desidratação e predadores. Na face ventral encontram-se a placa anal, a placa genital, a placa esternal, as placas espiraculares e nas bordas laterais estão dispostas as pernas, que são divididas em seis peças articuladas: coxa, trocânter, fêmur, patela, tíbia e tarso. Por fim, na face dorsal do par de tarsos das pernas I, encontra-se o órgão de Haller, que desempenha as funções de detecção de umidade e sentido olfativo (GUIMARÃES, TUCCI, BARROS-BATTESTI, 2001).



Figura 4. Hipostômio com seis fileiras de dentes de um indivíduo *A. sculptum* adulto, clarificado com proteinase K.

Por ser um aracnídeo, o *A. sculptum* possui quatro pares de pernas, com exceção das larvas. Com o corpo oval arredondado, os machos (Figura 5c) têm em média 3,8 a 5,3 mm de comprimento, enquanto as fêmeas (Figura 5d) medem cerca de 4,5 a 5,34 mm. Eles possuem coloração marrom avermelhada e escudo ornamentado e as placas espiraculares têm formato de vírgula (NAVA *et al.*, 2014).

As ninfas (Figura 5b) têm de 1,2 a 1,4 mm de tamanho e não possuem abertura genital desenvolvida, sendo assim, nesse estágio os carrapatos ainda não possuem a maturidade sexual, o escudo dorsal não possui ornamentos e a placa espiracular em formato triangular arredondado (MARTINS *et al.*, 2010).

Já as larvas (Figura 5a) têm um tamanho médio de 0,42 a 0,49 mm, também são sexualmente imaturas e não possuem abertura respiratória, realizando a troca gasosa por meio do exoesqueleto (SERRA-FREIRE, 2011; BRITES-NETO *et al.*, 2018).

Nos machos o escudo recobre quase totalmente a face dorsal, enquanto nas fêmeas, ninfas e larvas o escudo dorsal encontra-se apenas na região anterior (GUIMARÃES, TUCCI, BARROS-BATTESTI, 2001).

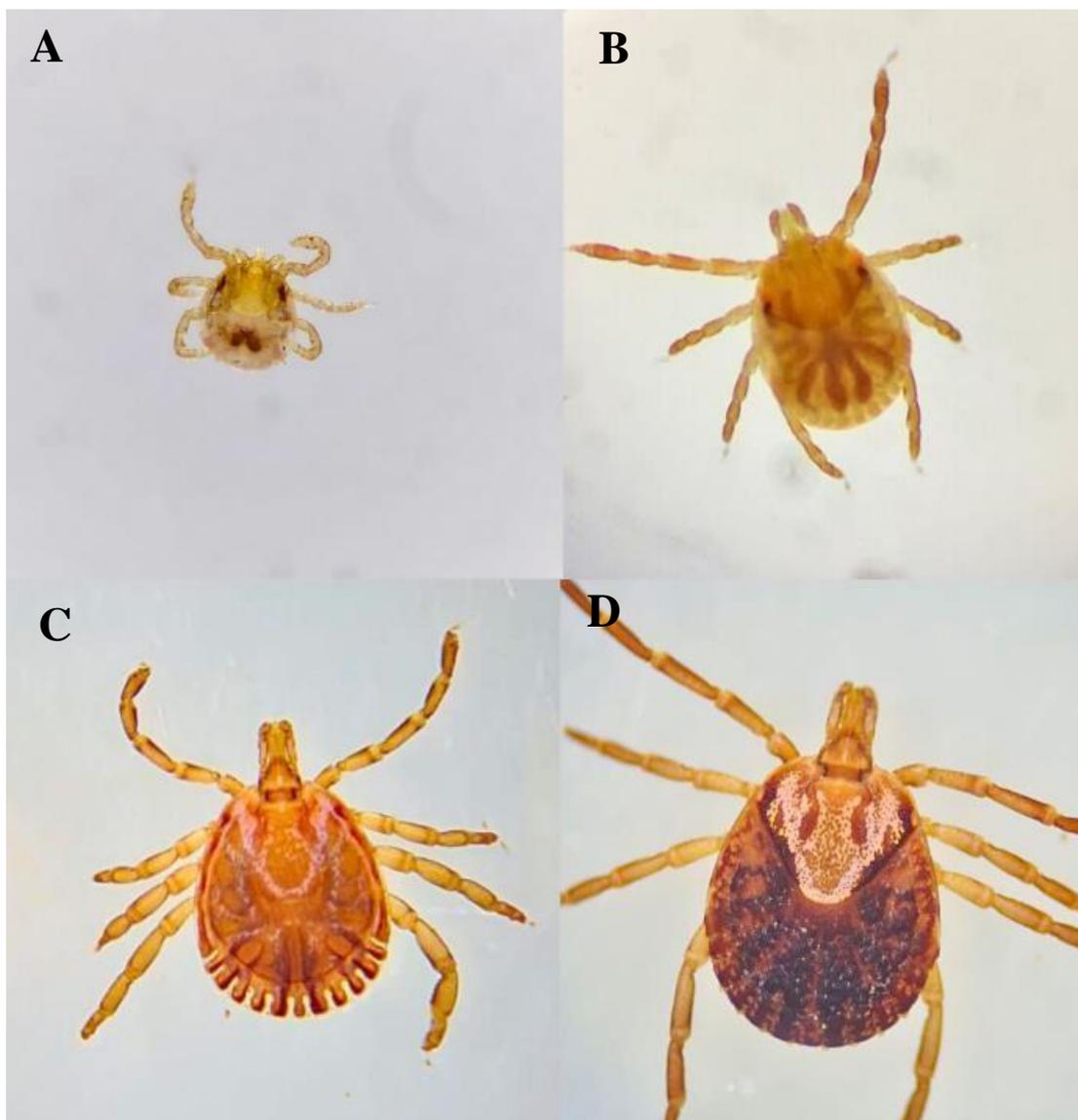


Figura 5. *A. sculptum* durante os quatro estágios do seu desenvolvimento. A: larva. B: ninfa. C: macho. D: fêmea.

3.4 Hospedeiros de *A. sculptum*

Os hospedeiros primários em maior abundância para *A. sculptum* são as capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*), os cavalos (*Equus caballus*) e antas (*Tapirus terrestris*). Contudo, devido a sua baixa especificidade parasitária, esse carrapato pode se alimentar de

diferentes vertebrados, como aves, répteis, anfíbios e mamíferos, incluindo os seres humanos, que são parasitados predominantemente por larvas e ninfas (Figura 6) (PAULA *et al.*, 2022).



Figura 6. Ninfa de *Amblyomma* sp. parasitando humano.

As capivaras são as principais hospedeiras de *A. sculptum* e apresentam hierarquia de macho dominante, alguns machos submissos, várias fêmeas e filhotes. São encontradas na América Latina desde o Panamá até o norte da Argentina e vivem em locais quentes, que apresentem cursos d'água, áreas para pastoreio, mata para proteção anti-predatória e abrigo para os partos (ALHO, RONDON, 1987).

Em decorrência à expansão agrícola, principalmente relacionada ao cultivo de cana-de-açúcar e milho, que se estendeu até as margens da água, o habitat natural das populações de capivaras estendeu-se no sudeste do Brasil. Isso resultou em condições favoráveis para o aumento reprodutivo e a ocupação de áreas rurais e urbanas, principalmente em parques públicos, por uma quantidade considerável de capivaras. A ausência de predadores naturais, como onças e jacarés e a proibição de caça pela lei brasileira também é um fator que beneficia o aumento populacional das capivaras nessa região do país e, conseqüentemente, traz uma densidade populacional maior de *A. sculptum* (LABRUNA *et al.*, 2007; QUEIROGAS *et al.*, 2012; PACHECO *et al.*, 2017; LOPES *et al.*, 2021).

A presença de capivaras também está relacionada a áreas endêmicas de FMB no estado de São Paulo, pois esses roedores são amplificadores eficientes da bactéria *Rickettsia rickettsii*, agente etiológico da doença. Em condições naturais, a taxa de aquisição de *R. rickettsii* por *A. sculptum* é muito baixa e a transmissão transovariana da bactéria é ineficiente nesses carrapatos, fazendo com que as capivaras possuam um papel importante na epidemiologia da FMB, atuando não só na amplificação da bactéria, mas também na circulação de *R. rickettsii* e na manutenção e transporte dos carrapatos (PACHECO *et al.*, 2017; LUZ *et al.*, 2019; NUNES *et al.*, 2019; DIAS *et al.*, 2020).

3.5 Impactos causados por *A. sculptum*

Entre os dados causados por *A. sculptum* podemos citar a espoliação cutânea nos hospedeiros causada pelo parasitismo, miíases, a perda de sangue, custos associados a serviços veterinários, medicamentos e estratégias de manejo desse carrapato. No entanto, o impacto mais significativo provocado por esse carrapato consiste na disseminação de patógenos para animais e humanos (PIRES *et al.*, 2013; RODRIGUES *et al.*, 2015; SOARES, 2021).

Já foi constatada a presença dos microrganismos *Babesia* sp., *Theileria* sp., *Cytauxzoon* spp., *Anaplasma* sp. e *Ehrlichia* sp. em *A. sculptum*, os quais estão associados à piroplasmose, anaplasmose e erliquiose, respectivamente. Esses microrganismos apresentam genótipos semelhantes aos agentes causadores dessas doenças em equinos, canídeos, felinos e bovinos. Isso acarreta consequências negativas em termos econômicos, sanitários e ecológicos para a pecuária, a sociedade e a fauna brasileira, respectivamente (WIDMER *et al.*, 2011; MELO *et al.*, 2015; SOUSA *et al.*, 2017; SOUSA *et al.*, 2018; MURARO *et al.*, 2021; FAGUNDES-MOREIRA *et al.*, 2022; SANTANA *et al.*, 2022; NEVES *et al.*, 2023; PEREIRA *et al.*, 2023).

Ainda nesse contexto, *A. sculptum* também é um problema de saúde pública no Brasil, por ser o principal vetor da bactéria *R. rickettsii* no país (BINDER *et al.*, 2022).

3.5.1 *Rickettsia*

Rickettsia é um gênero de bactérias intracelulares obrigatórias gram-negativas, pertencentes ao grupo das alfa-proteobactérias, da ordem Rickettsiales (PERLMAN, HUNTER, ZCHORI-FEIN, 2006). São consideradas endossimbiontes por conta do vínculo que possuem com seus hospedeiros invertebrados, mas podem causar patogenicidade quando transmitidas aos vertebrados por meio de vetores hematófagos (MERHEJ *et al.*, 2014).

As bactérias do gênero *Rickettsia* podem ter transmissão vertical (transovariana), horizontal (infecciosa) ou mista e são divididas em quatro grupos filogenéticos: o grupo da febre maculosa (GFM), o grupo tifo (GF) e os grupos basais *Rickettsia bellii* e *Rickettsia canadensis* (LAUKAITIS, MACALUSO, 2021; IGOLKINA *et al.*, 2023).

As riquetisioses do GFM são zoonoses causadas por mais de 25 espécies validas ao redor do mundo (WITTER *et al.*, 2016), das quais a espécie *R. rickettsii* é a mais patogênica e está distribuída pelas Américas, sendo identificada no Canadá, Estados Unidos, México, Costa Rica, Panamá, Colômbia, Brasil e Argentina (OGRZEWALSKA *et al.*, 2012).

3.5.1.1 Febre maculosa brasileira

A febre maculosa das montanhas rochosas (RMSF), como é conhecida a riquetsiose causada por *R. rickettsii* nos EUA (LABRUNA, 2009), foi reportada pela primeira vez em 1896 em Idaho, Estados Unidos e publicada na literatura médica três anos depois, sendo chamada de febre maculosa de Idaho (THORNER, WALKER, PETRI Jr., 1998).

Em 1902, Wilson e Chowning observaram sete mortes em Bitterroot Valley em Montana, Estados Unidos, mais tarde em 1904, ao analisaram 126 casos que ocorreram no oeste de Bitterroot River, os dois pesquisadores atribuíram a transmissão da doença ao carrapato da madeira (*Dermacentor* spp). Já em 1906, também trabalhando na área de Bitterroot Valley, Howard Ricketts isolou o microrganismo do sangue de pacientes infectados, inoculando-o em porquinhos-da-índia, que apresentavam sintomas da RMSF (THORNER, WALKER, PETRI Jr., 1998; DANTAS-TORRES, 2007; FANG, BLANTON, WALKER, 2017).

Até o ano de 1910 ele também detectou a presença desse mesmo microrganismo em carrapatos, a capacidade vetorial desses indivíduos e observou a transmissão transovariana da bactéria para ovos de carrapatos infectados. Antes de morrer, descreveu a espécie *R. prowazekii*, agente etiológico do tifo endêmico, transmitida por piolhos (THORNER, WALKER, PETRI Jr., 1998; DANTAS-TORRES, 2007).

Após seis anos, Wolbach publicou dois artigos sobre a aparência dessa bactéria em vasos sanguíneos e em seu trabalho publicado em 1919 descreveu-a como um patógeno intracelular, principalmente de células endoteliais e a nomeou como *Dermacentroxenus rickettsii*. Posteriormente esse gênero foi unificado ao gênero *Rickettsia* e o nome *R. rickettsii* foi proposto por Brumpt em 1922 (THORNER, WALKER, PETRI JR., 1998; DANTAS-TORRES, 2007).

No Brasil, o primeiro relato da FMB foi em 1929 no estado de São Paulo, na região suburbana da capital paulista. Em 1932, Piza descreveu a doença como tifo exantemático paulista e o patógeno de *R. brasiliensis*, porém um ano ao observar uma imunidade cruzada entre o tifo exantemático e a então RMSF, concluiu que ambas as doenças eram causadas pelo mesmo agente etiológico, a bactéria *R. rickettsii* (KATZ *et al.*, 2009; MORAES-FILHO, 2017).

Depois de muitos quadros registrados até a década de 1940, os relatos dessa riquetsiose caíram nos anos subsequentes, mas a partir da década de 1980 houve um reaparecimento dos casos da FMB no Brasil e em 1996 se tornou uma doença de notificação compulsória (GRECA, LANGONI, SOUZA, 2008; LABRUNA, 2009; KATZ *et al.*, 2009).

A partir de 2007, os dados epidemiológicos da FMB passaram a ser registrados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) (BARROS E SILVA *et al.*, 2014).

Atualmente, o estado de São Paulo apresenta a maior endemia de FMB, com 327 casos confirmados, dos quais culminaram em 151 óbitos durante os anos de 2020 a 2023 (BRASIL, 2024).

A FMB é uma doença infecciosa febril aguda, com taxa de letalidade acima de 50% (MORAES-FILHO, 2017). O quadro clínico inicial manifesta sintomas inespecíficos como febre alta, cefaleia, mialgia, prostração, náuseas e vômitos. O exantema é um sintoma característico, que desempenha um papel crucial como indicador clínico da doença, embora possa não estar presente, o que pode atrasar a suspeita de FMB. Normalmente, o exantema aparece entre o segundo e o sexto dia após o início da doença e apresenta uma aparência maculopapular (Figura 7). Manifesta-se primeiramente nos punhos e tornozelos, avançando para as plantas dos pés e palmas das mãos, antes de progredir e afetar todo o corpo (PINTER *et al.*, 2016).



Figura 7. Erupção cutânea típica na mão direita e no pulso de uma criança com febre maculosa. Fonte: DANTAS-TORRES, F. (2007).

A correlação entre os sintomas e as mudanças nos resultados laboratoriais (aumento dos leucócitos e diminuição das plaquetas) frequentemente leva a FMB ser confundida com casos de dengue e outras arboviroses. Devido à natureza genérica dos sintomas, atrasos na procura por assistência médica e diagnósticos incorretos, são as principais razões por trás dos óbitos (BORGES, 2023).

3.6 Controle de *A. sculptum*

No Brasil, o método convencional para o manejo de carrapatos é a aplicação de produtos químicos (carrapaticidas), por via tópica, à base de lactonas macrocíclicas, fenilpirazóis,

piretróides e organofosforados (BORGES *et al.*, 2020). Para o tratamento de infestações em equinos, apenas formulações à base de piretróide são permitidas, porém os carrapatos em fase adulta de *A. sculptum* são naturalmente mais resistentes a esses produtos comerciais, fazendo com o que o controle desse ectoparasito seja um desafio. Dessa maneira, o controle estratégico proposto por Leite *et al.* (1997), que consiste em banhos carrapaticidas aplicados semanalmente em equinos durante os meses de maior prevalência de larvas e ninfas, é o método que tem se mostrado mais eficaz (LABRUNA *et al.*, 2004).

O fato do hospedeiro primário principal de *A. sculptum* ser um animal silvestre, inviabiliza o controle desses ectoparasitas através da aplicação de acaricidas diretamente no hospedeiro, devido à dificuldade de conter e ter acesso às capivaras (VALE *et al.*, 2021), bem como por serem protegidas por lei (PEREZ *et al.*, 2008). Outros animais silvestres são atraídos para áreas de vegetação mista, contendo arbustos e ervas, o que favorece o aumento da população de *A. sculptum* pela presença de hospedeiros. Além disso, esse carrapato passa a maior parte de seu ciclo de vida em fase não parasitária, livre ao solo (PIRES *et al.*, 2013; RODRIGUES *et al.*, 2015), assim, a aplicação do produto químico Lambda-cyhalothrin nas vegetações é mais indicada em casos de infestações de *A. sculptum*, porém sabe-se que o uso desse piretróide causa intoxicação em peixes (MONTANHA *et al.*, 2012).

Dessa forma, para o combate desses carrapatos em áreas de risco de FMB, o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (IBAMA) estabeleceu diretrizes para o manejo de capivaras, que consiste em preservar áreas protegidas e evitar desequilíbrios que afetem populações naturais de capivaras, incluindo controle de ocupações, recuperação de matas ciliares e revisão de critérios de licenciamento, bem como o manejo do habitat, que envolve modificações para atender às necessidades das capivaras, como a redução da capacidade de suporte e consultas a especialistas de saúde pública (IBAMA, 2008), todavia este sistema não tem sido eficaz.

Desde o século passado, o controle biológico tem sido alvo de pesquisas como uma estratégia alternativa para o manejo de carrapatos, utilizando microrganismos entomopatogênicos, parasitoides e predadores naturais. Alguns fatores aumentam o interesse pelo uso do biocontrole em áreas infestadas por esses ectoparasitos, como a preocupação com a preservação ambiental e a saúde humana e animal, devido aos efeitos deletérios dos produtos químicos, o custo elevado dos acaricidas e a resistência cada vez maior dos carrapatos às formulações comerciais, gerando a necessidade de buscar abordagens alternativas (SAMISH, GINSBERG, GLAZER, 2004; RAJPUT *et al.*, 2006).

Em um estudo conduzido por Reis *et al.* (2004), foi observado a aplicação dos fungos entomopatogênicos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* em fêmeas ingurgitadas de *A. sculptum*. Os resultados dos bioensaios evidenciaram a eficiência do controle *in vitro* com o fungo *M. anisopliae*. A aplicação da concentração fúngica mais elevada resultou em percentuais de controle superiores a 90% (REIS, MELO, BITTENCOURT, 2004). Anteriormente, sua eficácia em ovos e larvas também foi observada *in vitro*, onde a eclosão de ovos tratados atingiu taxas abaixo de 15% para *M. anisopliae*, 25% para *B. bassiana* e a sobrevivência de larvas foi abaixo de 14% para *M. anisopliae* e 5% para *B. bassiana* nas concentrações mais altas (SOUZA, REIS, BITTENCOURT, 1999).

Ninfas tratadas com as concentrações 3×10^7 e 5×10^7 conídios/ml alcançaram 100% de mortalidade após seis dias do tratamento com *M. anisopliae* sob condições controladas (LOPES *et al.*, 2007). O uso de ambos os fungos em campo também se mostrou eficaz contra todos os estágios de vida de *A. sculptum* (SILVA, 2019). Ainda, cepas de *M. anisopliae*, *B. bassiana* e *Purpureocillium lilacinum* foram encontradas naturalmente infectando fêmeas ingurgitadas de *A. sculptum* e no solo das pastagens de equinos. Os isolados desses fungos apresentaram efeito deletério excelente sobre os carrapatos (D'ALESSANDRO, HUMBER, LUZ, 2012).

Apesar das bactérias e nematóides ainda não serem alvos de estudo para o manejo de *A. sculptum*, pesquisas mostram a eficácia desses microrganismos no controle de outras espécies de carrapatos (KOCAN *et al.*, 1998; SAMISH, GLAZER, 2001; SOLANKE, NARLADKAR, 2018).

3.7 Microbioma e endossimbiontes dos carrapatos

O conhecimento de que a microbiota de um organismo é capaz de moldar seu fenótipo, levou diversos pesquisadores a estudarem a composição microbiana de várias espécies nas duas últimas décadas. A microbiota foi descrita por Joshua Lederberg (2001) como o conjunto de microorganismos simbiotes, comensais e patogênicos que ocupam um corpo. A maioria dos trabalhos focam em eubactérias, mas a microbiota também é composta por arqueas, vírus, fungos, protozoários e nematoides (NARASIMHAN, FIKRIG, 2015).

O microbioma é o estudo da microbiota e seus metabólitos, elementos estruturais e condições ambientais encontradas em um local específico. O sequenciamento de nova geração (NGS) revolucionou os estudos sobre microbioma, permitindo o desenvolvimento de abordagens metagenômicas que revelam a complexidade da microbiota (PORTILLO *et al.*, 2019; WIESINGER *et al.*, 2023).

Vários fatores bióticos e abióticos influenciam a diversidade bacteriana de um carrapato como espécie, localização geográfica, características ambientais, alimentação, imunidade, estágio de vida, sexo, órgão e estresse fisiológico. O primeiro trabalho sobre o microbioma de carrapatos foi publicado por Andreotti e colaboradores (2011), em que investigou-se a composição das comunidades bacterianas presentes no carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* por meio do pirosequenciamento do gene 16S rRNA, e desde então, o número de estudos só cresceu, contabilizando 58 artigos publicados entre 2015 e 2021 (WU *et al.*, 2021).

A microbiota de artrópodes hematófagos obrigatórios se adaptou para suplementar a alimentação desses indivíduos, fornecendo vitaminas do complexo B, que são deficientes no sangue dos hospedeiros vertebrados, por exemplo (NARASIMHAN *et al.*, 2021). As bactérias endossimbiontes *Coxiella* spp., *Rickettsia* spp. e *Francisella* spp. foram frequentemente identificadas no microbioma bacteriano dos carrapatos (PAPA *et al.*, 2017). Essas simbioses obrigatórias são transmitidas verticalmente (da mãe para prole) e coevoluíram por milhões de anos com os carrapatos para influenciar na fisiologia, adaptação nutricional, aptidão e imunidade, facilitando ou competindo com patógenos nesses artrópodes (HUSSAIN *et al.*, 2022).

As endossimbiontes semelhantes a *Coxiella* (CLE) se localizam nos ovários e túbulos de Malpighi e são essenciais para o desenvolvimento e reprodução dos carrapatos, além de produzirem moléculas precursoras do neurotransmissor serotonina. Apesar do mecanismo ainda ser desconhecido, sabe-se que a ausência de CLE em *Rhipicephalus haemaphysaloides* permitiu a colonização do carrapato pelo protozoário *Babesia microti*. As endossimbiontes semelhantes a *Rickettsia* (RLE) são alfa-proteobactérias que colonizam as glândulas salivares, o intestino médio, ovário e túbulos de Malpighi dos carrapatos e podem bloquear outras riquetsias patogênicas e inibir a infecção da bactéria patogênica *Anaplasma marginale* nesses artrópodes. As endossimbiontes semelhantes a *Francisella* (FLE) são bactérias intracelulares facultativas, estão localizadas em diversos órgãos dos carrapatos e possuem uma importância nutricional similar à de CLE (BONNET, POLLET, 2020; ZHONG, WANG, WANG, 2024).

3.8 *Wolbachia*

A bactéria *Wolbachia pipientis* é uma endossimbionte, intracelular e gram-negativa (Figura 8), que está presente em aproximadamente 50% dos artrópodes terrestres e nematoides filariais (Onchocercidae) (WEINERT *et al.*, 2015; LEFOULON *et al.*, 2016). Foi descrita pela primeira vez em 1924 por Hertig e Wolbach, no tecido germinativo do mosquito *Culex pipiens* (HERTIG, WOLBACH, 1924 *apud* WERREN, 1997). Entretanto, essa descoberta foi negligenciada por não se tratar de uma bactéria patogênica aos seres humanos, como, por exemplo, *Rickettsia* sp. (GUIMARÃES, 2017).

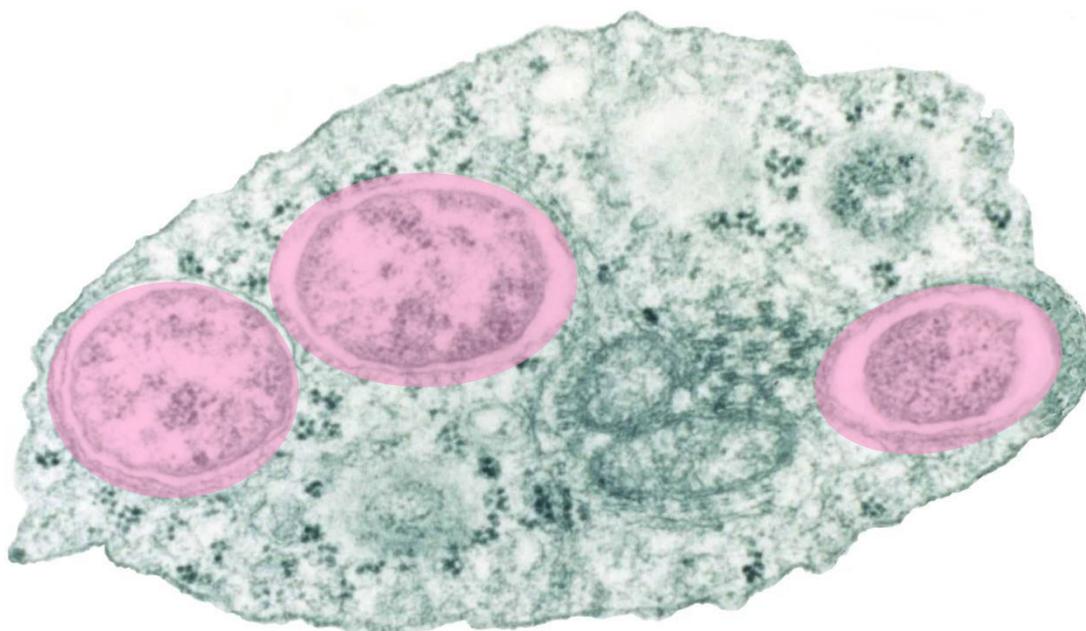


Figura 8. Micrografia eletrônica de transmissão de *Wolbachia* (em rosa) dentro de uma célula de inseto. Fonte: PLOS (2004).

O gênero foi oficialmente nomeado apenas em 1936 (HERTIG, 1936 *apud* PIETRI, DEBRUHL, SULLIVAN, 2016), mas somente em 1952 um dos seus mecanismos de manipulação reprodutiva foi observado (GHELELOVITCH, 1952) e denominado de “incompatibilidade citoplasmática” em 1967 (LAVEN, 1967). Porém, apenas no início da década de 1970 esse mecanismo foi associado com a *Wolbachia* (YEN, BAR, 1971). Posteriormente, uma cepa virulenta que ataca as células do sistema nervoso central do hospedeiro, matando-o precocemente, conhecida como “wMelPop” foi detectada em moscas *Drosophila melanogaster* (MIN, BENZER, 1997). Em 2004 o genoma dessa cepa foi sequenciado, sendo o primeiro genoma completo da *Wolbachia* a ser disponibilizado (WU *et al.*, 2004).

3.9 Classificação e evolução de *Wolbachia*

O gênero *Wolbachia* pertence à classe Alphaproteobacteria, a ordem Rickettsiales e a família Anaplasmataceae. É um gênero muito próximo de *Rickettsia*, *Ehrlichia* e *Anaplasma*, mas não infecta vertebrados (DRISCOLL *et al.*, 2020). Inicialmente, a *Wolbachia* era caracterizada utilizando os genes 16S rRNA e *wsp* (*Wolbachia* Surface Protein), porém a taxa evolutiva lenta e a alta recombinação desses marcadores faziam com que fosse um desafio investigar a filogenia desta bactéria. Assim, padronizou-se o método de genotipagem Multilocus Sequencing Typing (MLST), que utiliza cinco genes housekeeping para classificar as cepas de *Wolbachia* (BALDO *et al.*, 2006).

Devido à alta diversidade dentro do gênero *Wolbachia*, não existe certeza se trata-se apenas de uma única espécie, assim, a maneira mais apropriada de categorizar a variedade bacteriana dentro desse táxon é por meio de supergrupos (RAMALHO *et al.*, 2021). Os supergrupos são clados monofiléticos que organizam as diferentes linhagens evolutivas de *Wolbachia* e estima-se que existam pelo menos 17 deles (KAUR *et al.*, 2021).

Os supergrupos A e B são encontrados em artrópodes e frequentemente atuam como parasitos reprodutivos, manipulando a reprodução do hospedeiro para promover sua própria disseminação (LO *et al.*, 2007). Já os supergrupos C e D são mutualistas obrigatórios restritos a nematoides filariais, contribuindo na fertilidade e no desenvolvimento de seus hospedeiros (BANDI *et al.*, 1998).

O supergrupo E é encontrado em artrópodes primitivos, conhecidos como colêmbolos (CZARNETZKI, TEBBE, 2004). O supergrupo F de *Wolbachia* está associado a artrópodes e nematoides filariais (CASIRAGHI *et al.*, 2005). Os supergrupos H, I, J e K são detectados em cupins, pulgas, nematoides filariais e ácaros, respectivamente (GORHAM, FANG, DURDEN, 2003; CASIRAGHI *et al.*, 2004; BORDENSTEIN, ROSENGAUS, 2005; ROS *et al.*, 2009).

Já o nematoide parasita de plantas *Pratylenchus penetrans* é hospedeiro da *Wolbachia* do supergrupo L (HAEGEMAN *et al.*, 2009), enquanto os supergrupos M e N estão presente em pulgões (WANG *et al.*, 2014). Ácaros de pena são hospedeiros dos supergrupos Q e P (GLOWSKA *et al.*, 2015), enquanto o supergrupo O ocorre em mosca-branca (BING *et al.*, 2014). O supergrupo S é encontrado em pseudoescorpiões. E por fim, supostamente existe um supergrupo T que pode infectar percevejos da espécie *Cimex hemipterus* (LAIDOUDI *et al.*, 2020).

Análises genômicas e filogenéticas mostram que as bactérias do supergrupo L formam o grupo mais basal, dando origem para todas as outras cepas de *Wolbachia*. Posteriormente,

essas bactérias ancestrais estariam presentes em plantas, carregadas por nematoides parasitas de plantas, sendo transmitidas horizontalmente para pulgões que se alimentavam da seiva de vegetais contaminados, dando origem ao supergrupo M. A melada de pulgões, contaminada com *Wolbachia*, pode ter caído no solo e atraído colêmbolos e ácaros oribatídeos, dando origem ao supergrupo E. A origem do supergrupo H pode estar associada à relação dos colêmbolos com insetos sociais através da foresia com cupins e pseudoescorpiões (Figura 9) (RODRIGUES *et al.*, 2023).

Os supergrupos A e B divergiram há aproximadamente 200 milhões de anos e fenômenos como interações predador-presa, hospedeiro-parasitoide, proximidade física, cópula do hospedeiro com outra espécie e compartilhamento de interações tróficas, podem ter influenciado nas mudanças de hospedeiro (GERTH, BLEIDORN, 2016).

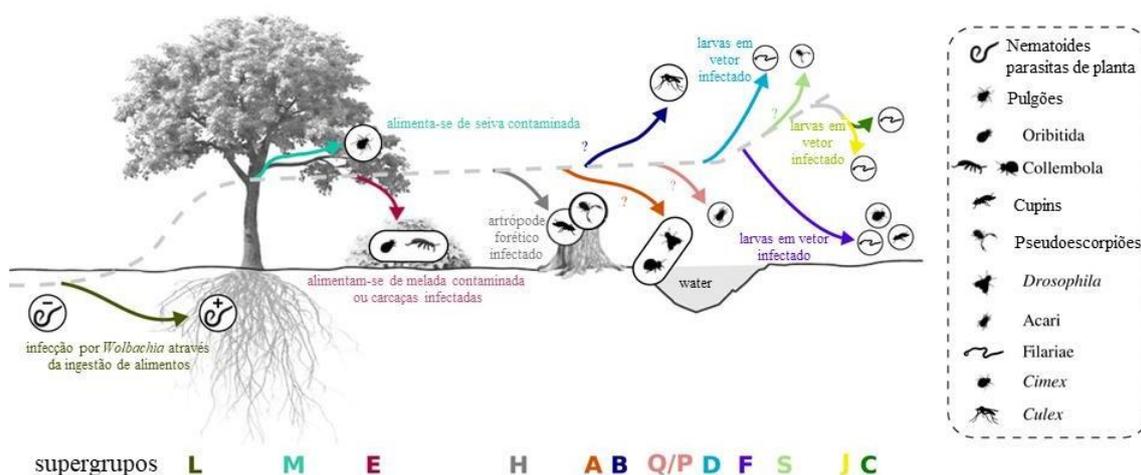


Figura 9. Uma hipótese ilustrada para a evolução da *Wolbachia* baseada na integração de fatores ecológicos e biológicos. A linha cinza tracejada representa a evolução da *Wolbachia*, polarizada dos clados mais antigos (à esquerda) para os mais recentes (à direita). Cada seta colorida representa um evento hipotético de troca de hospedeiro em direção a um supergrupo atual. Fonte: RODRIGUES, J. *et al.* (2023).

3.10 Transmissão e tropismo de *Wolbachia*

A *Wolbachia* possui tropismo pelo tecido reprodutivo de seus hospedeiros (FRYDMAN *et al.*, 2006; LANDMANN *et al.*, 2012; TOOMEY *et al.*, 2013). São nessas células onde elas mais se proliferam, pois são transmitidas de mãe para prole através da linha germinativa feminina. De fato, parte do sucesso de *Wolbachia* se deve a essa eficiente capacidade (SERBUS *et al.*, 2008).

A transmissão vertical de *Wolbachia* consiste em duas rotas: a via direta, que envolve a migração de *Wolbachia* das células-tronco da linhagem germinativa no oócito em desenvolvimento para o oócito maduro do hospedeiro, ou a via indireta, onde durante o

desenvolvimento embrionário, a *Wolbachia* se acumula em células-tronco somáticas e a linha germinativa fica livre da bactéria, mas que posteriormente, invade e reocupa o tecido germinativo (OTE, YAMAMOTO, 2019; PORTER, SULLIVAN, 2023).

Através de linhagens embrionárias infectadas ou migrando de célula para célula, a *Wolbachia* também está presente em células somáticas, como do sistema nervoso, intestino, glândulas salivares, hemócitos, túbulos de Malpighi, tecido muscular, hipoderme entre outros (PIETRI, DEBRUHL, SULLIVAN, 2016). Nesses tecidos, a *Wolbachia* pode atuar da regulação da imunidade, bioenergia, sono, na capacidade de aprendizado e memória, no comportamento de acasalamento, alimentação, locomoção e agressividade do hospedeiro (BI, WANG, 2020).

A ocorrência de *Wolbachia* em células somáticas pode conferir benefícios para seus hospedeiros e aumentar a transmissão vertical, além de ser uma estratégia evolutiva que auxilia na sua transmissão horizontal (PIETRI, DEBRUHL, SULLIVAN, 2016).

Um organismo pode adquirir *Wolbachia* horizontalmente pelo contato direto ou indireto com outro indivíduo infectado, através do canibalismo e predação, parasitismo, introgressão híbrida ou por meio de interações com o ambiente (KAUR *et al.*, 2021; RAMALHO *et al.*, 2021). Apesar dos fatores que influenciam nessa rota ainda não terem sido esclarecidos, a transferência horizontal de *Wolbachia* explica sua alta ocorrência entre diferentes espécies de invertebrados e a incongruência entre a filogenia dessa endossimbionte com a filogenia dos seus hospedeiros (SANAIE, CHARLAT, ENGELSTÄDTER, 2020).

3.11 Genoma de *Wolbachia*

Fatores ecológicos como a coevolução com seus hospedeiros, mudança para novos hospedeiros, extinção do hospedeiro e a perda de simbiose, aparentemente influenciaram no processo evolutivo da *Wolbachia*, modulando o tamanho do genoma (redução ou expansão), a gama de hospedeiros (nematóides e artrópodes) e os fenótipos (mutualista ou parasita) destas bactérias (KAUR *et al.*, 2021; RODRIGUES *et al.*, 2023).

O genoma de *Wolbachia* de artrópodes é aproximadamente 30% maior do que o de oncocercídeos (1,2 a 1,6 Mb e 0,9 a 1,1 Mb, respectivamente), devido a presença de elementos móveis como regiões repetidas, transposons e profragos, que assim codificam mais proteínas que auxiliam em estratégias de infecção. Apesar de possuir um genoma menor, as simbiotes dos nematóides filariais mantêm genes codificadores de enzimas que auxiliam no processo de

produção de nutrientes e metabólitos que são essenciais para esses hospedeiros, destacando sua relação mutualística (LANDMANN, 2019; KAUR *et al.*, 2021).

3.12 Fenótipos da *Wolbachia* e sua utilização no biocontrole

Grande parte do sucesso de *Wolbachia* se dá a sua capacidade manipular a reprodução dos seus hospedeiros para otimizar sua transmissão vertical, assim aumentando sua ocorrência (Figura 10). O fenótipo de *Wolbachia* mais estudado é a incompatibilidade citoplasmática (CI), onde machos infectados copulam com fêmeas não infectadas (CI unidirecional) ou machos e fêmeas infectados com cepas incompatíveis acasalam (CI bidirecional), gerando esterilidade por meio de mortalidade embrionária (BAIÃO *et al.*, 2021).

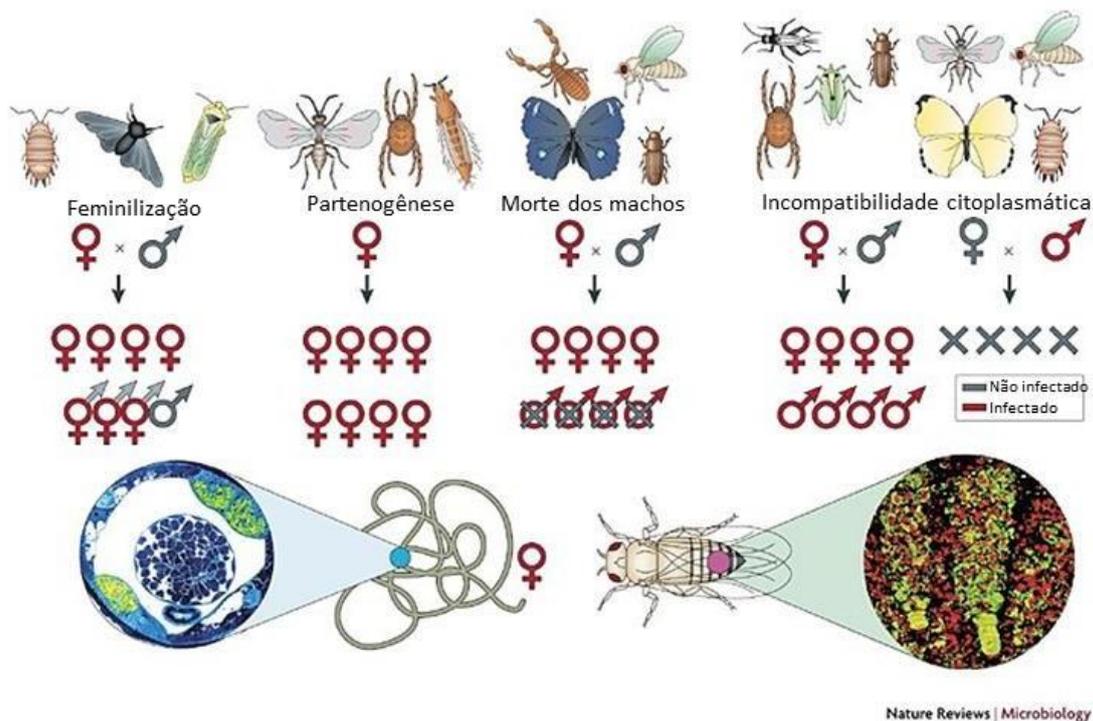


Figura 10. Fenótipos induzidos por *Wolbachia*. Fonte: WERREN, J. H.; BALDO, L.; CLARK, M. E. (2008).

Outras estratégias de manipulação reprodutiva são: a feminilização, onde a *Wolbachia* inibe hormônios androgênicos de seu hospedeiro, transformando indivíduos geneticamente machos em fêmeas com ovários funcionais; a indução de partenogênese, onde algumas cepas de *Wolbachia* podem interromper o ciclo celular do hospedeiro durante o primeiro estágio embrionário e transformar óvulos haploides não fertilizados, em gametas diploides, gerando uma prole feminina; e a morte dos machos, que seleciona a progênie masculina para morrer

durante a embriogênese, mantendo apenas a prole feminina, que não precisará competir por recursos limitados com os machos (WERREN, BALDO, CLARK, 2008).

Esses fenótipos estão presentes em linhagens parasitas de artrópodes e são processos adaptativos que favorecem as fêmeas portadoras de *Wolbachia*, pois elas são as responsáveis pela sua propagação (LANDMANN, 2019). Esses mecanismos de manipulação reprodutiva têm sido visados como método de controle biológico de pragas agrícolas e vetores de doenças (GONG *et al.*, 2023). Por exemplo, a incompatibilidade citoplasmática de *Wolbachia* está sendo utilizada como estratégia para supressão populacional de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*, através da técnica inseto incompatível (IIT), onde machos infectados são liberados para copular com fêmeas livres de *Wolbachia*, reduzindo a população desses mosquitos (CRAWFORD *et al.*, 2020; McCLURE *et al.*, 2020).

Algumas cepas de *Wolbachia* exibem fenótipos que a colocam em uma relação mutualística com seus hospedeiros. Estas são capazes de sintetizar heme, vitaminas e cofatores como: CoA, NADH, ubiquinona, folato, ácido lipóico e vitaminas B2, B6 e B7. Isso faz com que os hospedeiros oncocercídeos se tornem dependentes da bactéria para biossíntese de moléculas importantes na manutenção do seu metabolismo, sendo essencial para fertilidade, fecundidade e longevidade de várias espécies de nematoides filariais. Em certos casos essa associação pode ser facultativa, onde hospedeiros artrópodes se beneficiam não apenas nutricionalmente, mas também obtêm proteção contra estresse oxidativo e otimização de vias de sinalização, porém não dependem dela para manter seus processos biológicos (ZUG, HAMMERSTEIN, 2014; KAUR *et al.*, 2021).

Determinadas bactérias do gênero *Wolbachia* também conseguem alterar a expressão de genes do sistema imune de artrópodes, induzir microRNAs, interferir diretamente na replicação de RNA viral e competição por recursos (colesterol, por exemplo) com patógenos. E por sua vez, *Wolbachia* pode depender do hospedeiro para adquirir aminoácidos e lipídios, já que não possui vias metabólicas completas (ROSS, TURELLI, HOFFMANN, 2019; LANDMANN, 2019).

Dessa forma, no controle de doenças, a presença de *Wolbachia* em nematoides filariais fez com que o tratamento de pacientes parasitados mudasse de abordagem, substituindo o uso de antiparasitários, que podem causar toxicidade ao indivíduo, pelo uso de bactericidas para atacar essas simbioses (JOHNSTON *et al.*, 2017).

Além disso, *Wolbachia* já se mostrou capaz de reduzir a infecção e transmissão dos vírus da dengue, febre amarela, chikungunya, mayaro, zika, arroz atrofiado e inibir o parasita causador

de malária (MOREIRA *et al.*, 2009; KAMBRIS *et al.*, 2009; CARAGATA, DUTRA, MOREIRA, 2016; JOUBERT *et al.*, 2016; ROCHA *et al.*, 2019; HOFFMANN, 2020; GONG *et al.*, 2020; PEREIRA *et al.*, 2021).

A capacidade de bloquear patógenos em *Wolbachia* é muito valioso para controle de arboviroses (PAN *et al.*, 2018). Por exemplo, a substituição populacional de *A. aegypti* por fêmeas infectadas por *Wolbachia* mostrou diminuição nos casos de dengue e hospitalizações na área de estudo (UTARINI *et al.*, 2021). Atualmente, o World Mosquito Program utiliza essa tecnologia em diversos lugares do mundo, inclusive no Brasil (CARAGATA *et al.*, 2021; FIOCRUZ, 2023).

3.13 *Wolbachia* em carrapatos

A presença de *Wolbachia* foi relatada em algumas espécies de carrapatos ao redor do mundo. Cepas do supergrupo A foram detectadas em *R. microplus* em estudos desenvolvidos nos EUA e Tailândia (ANDREOTTI *et al.*, 2011; HIRUNKANOKPUN *et al.*, 2018), em *Rhipicephalus annulatus* no Irã (POURALI *et al.*, 2009); *Ixodes ricinus* na Itália, França, Alemanha, Marrocos e Eslováquia (BENSON *et al.*, 2004; HARTELT *et al.*, 2004; SARIH *et al.*, 2005; van OVERBEEK *et al.*, 2008; CARPI *et al.*, 2011; REIS *et al.*, 2011; SUBRAMANIAN *et al.*, 2012; PLANTARD *et al.*, 2012; MOUTAILLER *et al.*, 2016), supergrupo A e B em *Rhipicephalus sanguineus* no Japão, Irã e China (INOKUMA, RAOULT, BROUQUI, 2000; POURALI *et al.*, 2009; CHAO, CASTILLO, SHIH, 2020) e do supergrupo F em *Amblyomma americanum* nos EUA (ZHANG, NORRIS, RASGON, 2011; WILLIAMS-NEWKIRK *et al.*, 2014).

Amostras de *R. microplus*, *Hyalomma anatolicum* e *Ixodes scapularis* dos EUA e *Haemaphysalis bispinosa*, *Haemaphysalis hystricis* e *Haemaphysalis wellingtoni* da Malásia também foram positivas para *Wolbachia*, mas sem identificação de supergrupo (BENSON *et al.*, 2004; KHOO *et al.*, 2016; BOBO, 2020). Já no Brasil, houve a detecção de *Wolbachia* em alguns espécimes de *Amblyomma aureolatum* e *Ornithodoros rietcorraei* (MUÑOZ-LEAL *et al.*, 2019; DALL'AGNOL *et al.*, 2021).

Bobo (2020) observou que o bacterioma dos carrapatos portadores de *Wolbachia* é menos rico e diverso, em comparação com carrapatos negativos. Além disso, células de ixodídeos se mostram capazes de manter *in vitro* diferentes cepas de *Wolbachia* por muitas passagens (KHOO *et al.*, 2020), enquanto Andreotti *et al.* (2011) não relatou a presença da

bactéria no tecido germinativo das fêmeas de *R. microplus* positivas, sugerindo que esse carrapato não sustentaria a transmissão vertical de *Wolbachia*.

De forma geral, a maioria das infecções de *Wolbachia* em carrapatos é considerada secundária ou transitória (MADHAV *et al.*, 2020), principalmente devido à presença do endoparasitoide hemíptero *Ixodiphagus hookeri*, que apresenta uma taxa alta (99,2%) de infecção por essas endossimbiontes (PLANTARD *et al.*, 2012). Além disso, os carrapatos podem abrigar espécies de nematoides filariais que são, na maioria das vezes, hospedeiras de *Wolbachia* (ZHANG, NORRIS, RASGON, 2011; TAYLOR *et al.*, 2012; NAMRATA *et al.*, 2014; LEFOULON *et al.*, 2016; SANTOS *et al.*, 2017; BINETRUY, DURON, 2023), sendo outro fator plausível de contaminação.

Assim, mais estudos são necessários para esclarecer a capacidade carrapatos sustentarem infecções de *Wolbachia* e a possível relação simbiótica entre eles, além disso, se faz necessário elucidar o seu efeito na biologia de carrapatos e sua interação com o microbioma desses ectoparasitos (MADHAV *et al.*, 2020).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Locais dos ensaios

Os ensaios foram realizados no Instituto Biológico de São Paulo, no Laboratório de Parasitologia Animal, na Unidade Laboratorial de Referência em Biologia Molecular Aplicada, no Laboratório de Vírus de Bovídeos e no Laboratório Interinstitucional de Sanidade em Aquicultura.

4.2 Obtenção e identificação dos carrapatos

Os carrapatos foram coletados nos municípios de Jundiaí [23°11'03" S; 46°53'18" W] e Campinas [22°53'57" S; 47°03'42" W], São Paulo, Brasil, durante os meses de dezembro de 2021 a março de 2022 e de março a maio de 2023, utilizando armadilhas de CO₂ confeccionadas com panos de tecido sintético branco com área de 350 cm², com aproximadamente 100g de gelo seco no centro (Figura 11) (GRAY, 1985). As armadilhas ficaram expostas no ambiente durante 40 minutos antes de serem recolhidas. Os carrapatos adultos capturados foram armazenados a 4 °C em etanol 95%. Este trabalho foi registrado na plataforma SISGEN (código do projeto A57F59F).



Figura 11. Carrapatos sendo atraídos para armadilha de CO₂. Fonte: ALMEIDA, I. B. (2022).

Os carrapatos foram separados de acordo com o sexo (machos e fêmeas), depois foram morfológicamente identificados como *A. sculptum* de acordo com Andreotti, Garcia, Paiva (2021).

4.3 Preparação das amostras

Os carrapatos da espécie *A. sculptum* adultos foram higienizados com imersões em etanol 70% por 1 minuto, em hipoclorito de sódio 2% por 30 segundos e em água destilada duas vezes (Figura 12). Depois de secos, os carrapatos foram seccionados em quatro partes em placas de Petri com lâminas nº24 estéreis e armazenados em tubos 1,5ml estéreis (Figura 13).

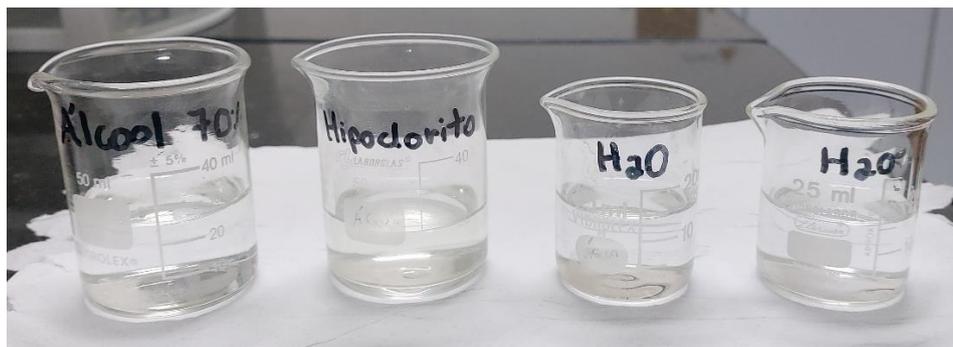


Figura 13. Seção de higienização dos carrapatos.

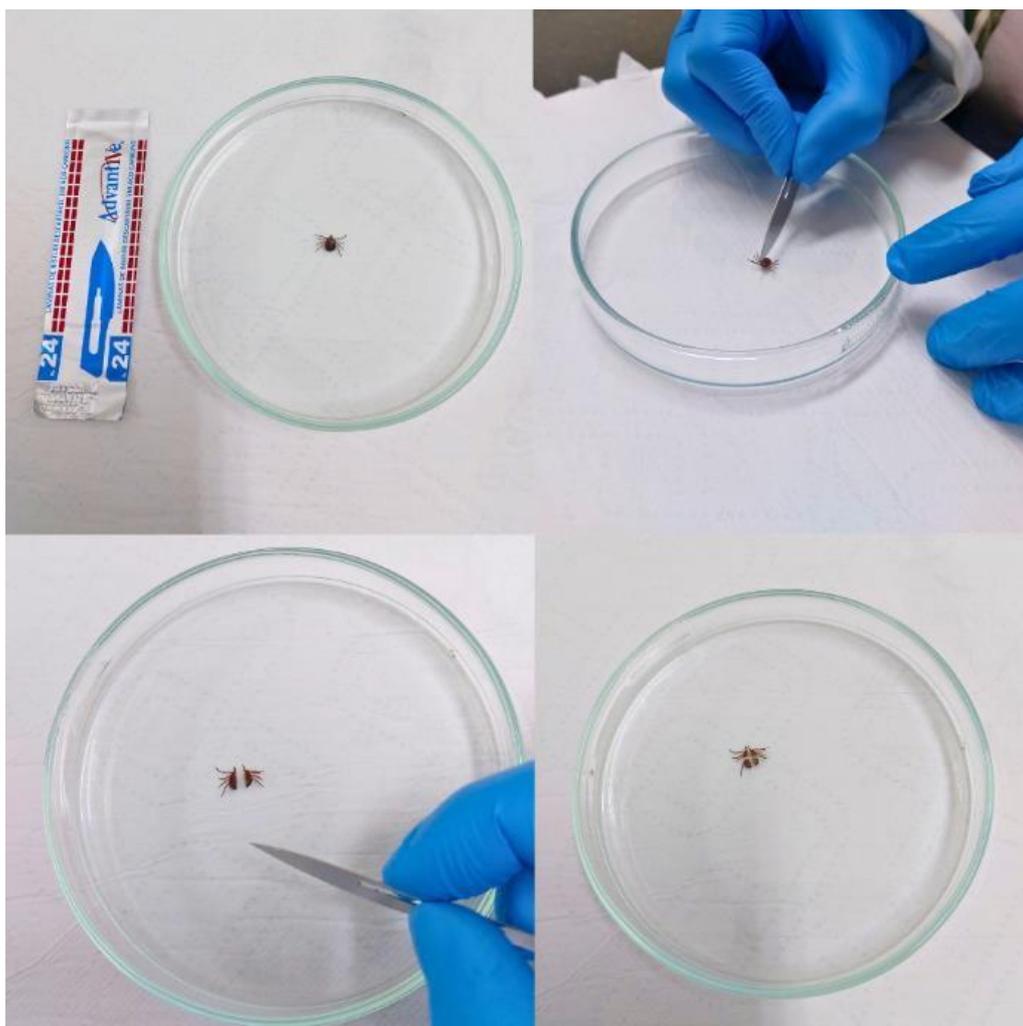


Figura 12. Corte dos carrapatos para extração de DNA.

4.4 Obtenção de controles positivos

Amostras de DNA isoladas de mosquitos *Aedes albopictus* (*Wolbachia*-positivos) foram concedidas pelo pesquisador Dr. Thiago Nunes Pereira (Fiocruz Minas), DNA extraído do nematoide filarial *Cercopithifilaria binae* foi concedido pelo Dr. Rafael Antonio do Nascimento Ramos (Universidade Federal do Agreste de Pernambuco), amostras contendo material genético das bactérias *Coxiella* sp. e *Rickettsia* sp. foram fornecidas pela M.^a Maria Carolina Serpa (Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo) e uma amostra de *Francisella* sp. foi cedida pela Dra. Luara Lucena Cassiano (Instituto de Pesca), para utilização como controles positivos nas reações PCR de *Wolbachia*, Onchocercidae, *Coxiella* spp., *Rickettsia* spp. e *Francisella* spp., respectivamente.

Um fragmento do DNA mitocondrial (mtDNA) de *I. hookeri* foi sintetizado pela empresa Exxtend Biotecnologia para ser utilizado como controle positivo na PCR para vespa parasitoide. Como controle positivo da reação de amplificação do DNA do hospedeiro, foram utilizadas amostras extraídas de *Amblyomma* sp. no Laboratório de Parasitologia Animal do Instituto Biológico.

4.5 Ensaio 1

4.5.1 Extração de DNA

As amostras de carrapato foram submetidas à extração de DNA utilizando o reagente DNAzol™ (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), com modificação do protocolo do fabricante. Cada amostra foi incubada a 55 °C por 3 horas, com 250 µl do reagente e 10 µl de Proteinase K (PK) Solution (20 mg/ml) (Promega, Madison, WI, EUA). As amostras foram maceradas com pistilos e brevemente agitadas durante este processo. O lisado das amostras foi então centrifugado a 8.000 rpm por 10 min e apenas o sobrenadante foi transferido para novos tubos estéreis de 1,5 ml. 130 µl de etanol absoluto foram aplicados às amostras, que foram então centrifugadas a 14.000 rpm por 5 min. O precipitado resultante foi submetido a dois banhos de etanol 75% e a mesma centrifugação. Após a evaporação do álcool, o pellet de DNA foi ressuspenso em 43,1 µl de NaOH 8 mM e 6,9 µl de HEPES 0,1 M. A concentração de DNA das amostras extraídas foi obtida através de um espectrofotômetro NanoDrop™ 8000 (Thermo Fisher, EUA).

4.5.2 PCR de *Amblyomma* spp.

Todas as amostras foram submetidas à amplificação de um fragmento de >400 pares de bases (pb) do gene mitocondrial 16S rRNA de *Amblyomma* spp. para confirmar a eficiência da extração de DNA. A PCR foi realizada em um volume final de 25 µL, contendo 12,5 µL de reagente GoTaq Green Master Mix (Promega, Madison, WI, EUA), 5,5 µL de água ultrapura, 0,4 µM de cada oligonucleotídeo e ~200ng de DNA. Os iniciadores utilizados foram 16S+ 5' – TCGGTITAAACTCAGATCATGT – 3' e 16S- 5' – CTGCTCAATGAIIIIITTAATTTGCTGTGG – 3' (FIORINI *et al.*, 2014) e as condições de ciclagem foram: desnaturação inicial a 94°C por 3 min, seguida de 35 ciclos a 94°C por 30 seg, 49°C por 30 seg e 72°C por 1 min e extensão final a 72°C por 5 min.

4.5.3 PCR de *Wolbachia*

As amostras foram submetidas à amplificação de um fragmento de 438 pb do gene 16S rRNA de *Wolbachia* sp. A PCR foi realizada em um volume final de 25 µL, contendo 12,5 µL de reagente GoTaq Green Master Mix (Promega, Madison, WI, EUA), 5,5 µL de água ultrapura, 0,4 µM de cada oligonucleotídeo e ~200ng de DNA. Os iniciadores utilizados foram wspeCF 5' – YATACCTATTCGAAGGGATAG – 3' e wspeCR 5' – AGCTTCGAGTGAAACCAATTC – 3' (DOUDOUMIS *et al.*, 2012) e as condições de ciclagem foram: desnaturação inicial a 94°C por 5 min, seguida de 35 ciclos a 94°C por 30 seg, 54°C por 30 seg e 72°C por 1 min e extensão final a 72°C por 10 min.

4.5.4 PCR de *I. hookeri*

As amostras positivas para *Wolbachia* foram submetidas à amplificação de um fragmento de ~200 pb do gene mitocondrial COX I de *I. hookeri*. A PCR foi realizada em um volume final de 25 µL, contendo 12,5 µL de reagente GoTaq Green Master Mix (Promega, Madison, WI, EUA), 5,5 µL de água ultrapura, 0,4 µM de cada oligonucleotídeo e ~200ng de DNA. Os iniciadores utilizados foram Iphag583f 5' – TTGCTGTTCCAACAGGAGTAAA – 3' e Iphag820r R 5' – CAAAAAATTGCAAAAACTGC – 3' (BOHACSOVA *et al.*, 2016) e as condições de ciclagem foram: desnaturação inicial a 94°C por 3 min, seguida de 35 ciclos a 94°C por 30 seg, 58°C por 30 seg e 72°C por 1 min e extensão final a 72°C por 10 min.

4.5.5 Eletroforese

Os produtos de PCR e o marcador molecular 100bp Ladder Plus (Sinapse Inc., Hollywood, FL, EUA) foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,7% e o padrão de bandas foi analisado com o fotodocumentador Axygen® Gel (Corning Inc., Corning, NY, EUA).

4.5.6 Análises filogenéticas

Todas as sequências obtidas de *Wolbachia* do Ensaio 1, sequências do gene 16S rRNA de *Wolbachia* isoladas de diferentes organismos já depositadas no banco de dados GenBank (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) e uma sequência do mesmo gene de *Rickettsia* sp., foram alinhadas com o algoritmo MAFFT por meio do servidor GUIDANCE2 (<http://guidance.tau.ac.il/>).

Através do software MEGA11, as análises de distância genética foram conduzidas e o melhor modelo de substituição de nucleotídeos foi definido como K2+G. Nessa análise, foram consideradas 16 sequências nucleotídicas, com todas as posições ambíguas sendo excluídas para cada par de sequências (opção de deleção em pares). O conjunto final de dados continha um total de 405 posições.

A análise filogenética, com base no gene 16S rRNA de *Wolbachia*, foi enraizada utilizando uma sequência de *Rickettsia* sp. como grupo externo. A história evolutiva foi inferida por meio do método de máxima verossimilhança (ML) e do modelo K2+G. Isso foi realizado por meio do software raxmlGUI 2.0, com 1000 réplicas de bootstrap para avaliar a confiabilidade. A análise abrangeu 17 sequências nucleotídicas. A árvore filogenética foi visualizada através da plataforma iTOL v6 (<https://itol.embl.de/>).

4.6 Ensaio 2

4.6.1 Otimização da extração de DNA

Observou-se que as amostras de carrapato submetidas à extração de DNA durante o Ensaio 1 pararam de amplificar. Para aumentar o tempo de armazenamento das amostras sem que sofressem degradação do DNA, fez-se necessária uma otimização do método de extração anterior. Amostras conservadas de *A. sculptum* (machos e fêmeas), foram higienizadas e seccionadas em quatro partes e submetidas ao protocolo já descrito, com as seguintes modificações:

Tabela 1. Variações utilizadas para otimização da extração de DNA de *A. sculptum*.

Variação	Amostra	Sexo	Volume de Proteinase K	Tempo de incubação	Eluição
A	1	M	10 µL	3 horas	NaOH+Hepes
B	2	M	10 µL	18 horas	NaOH+Hepes
A	3	F	10 µL	3 horas	NaOH+Hepes
B	4	F	10 µL	18 horas	NaOH+Hepes
C	5	M	1,30 µL	3 horas	NaOH+Hepes
D	6	M	1,30 µL	18 horas	NaOH+Hepes
C	7	F	1,30 µL	3 horas	NaOH+Hepes
D	8	F	1,30 µL	18 horas	NaOH+Hepes
E	9	M	10 µL	3 horas	TE Buffer
F	10	M	10 µL	18 horas	TE Buffer
E	11	F	10 µL	3 horas	TE Buffer
F	12	F	10 µL	3 horas	TE Buffer
G	13	M	1,30 µL	3 horas	TE Buffer
H	14	M	1,30 µL	18 horas	TE Buffer
G	15	F	1,30 µL	3 horas	TE Buffer
H	16	F	1,30 µL	18 horas	TE Buffer

M: macho; F: fêmea; NaOH+HEPES = combinação de solução de hidróxido de sódio e tampão Hepes; TE buffer: tampão Tris-EDTA; µL = microlitros.

As amostras foram quantificadas por espectrofotômetro NanoDrop™ 8000 (Thermo Fisher, EUA) e submetidas a amplificação do marcador endógeno 16S rRNA de *Amblyomma* spp. A melhor variação foi definida baseada na intensidade da banda gerada através da amplificação por PCR do gene mitocondrial 16S rRNA de *Amblyomma* spp. Esse novo protocolo foi utilizado para isolar o material genético das amostras de carrapato analisadas no Ensaio 2.

Um limiar de detecção foi realizado para obter as concentrações (ng) de DNA ideais para amplificação dos alvos. Uma vez observado que as amostras amplificavam de 200ng a 10ng e levando em consideração os diferentes números de cópias de DNA dos organismos presentes nas amostras, definiu-se: 20ng para amplificação do controle endógeno (*Amblyomma* spp.), 50ng para endoparasitos (*I. hookeri* e Onchocercidae) e 200ng para bactérias (*Wolbachia*, *Coxiella*, *Francisella* e *Rickettsia*).

4.6.2 PCR de *Amblyomma* spp.

Todas as amostras foram submetidas à amplificação de um fragmento de >400 pb do gene mitocondrial 16S rRNA de *Amblyomma* spp. para confirmar a eficiência da extração de

DNA. A PCR foi realizada em um volume final de 25 µL, contendo 12,5 µL de reagente GoTaq Green Master Mix (Promega, Madison, WI, EUA), 9,5 µL de água ultrapura, 0,4 µM de cada oligonucleotídeo e ~20ng de DNA. Os iniciadores utilizados foram 16S+ 5' – TCGGTITAAACTCAGATCATGT – 3' e 16S- 5' – CTGCTCAATGAIIIIIITTAATTGCTGTGG – 3' (FIORINI *et al.*, 2014) e as condições de ciclagem foram: desnaturação inicial a 94°C por 3 min, seguida de 40 ciclos a 94°C por 30 seg, 49°C por 30 seg e 72°C por 1 min e extensão final a 72°C por 5 min.

4.6.3 PCR de *Wolbachia*

Todas as amostras foram submetidas à amplificação de um fragmento de 438 pb do gene 16S rRNA de *Wolbachia* sp. A PCR foi realizada em um volume final de 25 µL, contendo 12,5 µL de reagente GoTaq Green Master Mix (Promega, Madison, WI, EUA), 5,5 µL de água ultrapura, 0,4 µM de cada oligonucleotídeo e ~200ng de DNA. Os iniciadores utilizados foram wspecF 5' – YATACCTATTCGAAGGGATAG – 3' e wspecR 5' – AGCTTCGAGTGAAACCAATTC – 3' (DOUDOUMIS *et al.*, 2012) e as condições de ciclagem foram: desnaturação inicial a 94°C por 5 min, seguida de 40 ciclos a 94°C por 30 seg, 54°C por 30 seg e 72°C por 1 min e extensão final a 72°C por 10 min.

4.6.4 PCR de *I. hookeri*

As amostras positivas para *Wolbachia* foram submetidas à amplificação de um fragmento de ~200pb do gene mitocondrial COX I de *I. hookeri*. A PCR foi realizada em um volume final de 25 µL, contendo 12,5 µL de reagente GoTaq Green Master Mix (Promega, Madison, WI, EUA), 8 µL de água ultrapura, 0,4 µM de cada oligonucleotídeo e ~50ng de DNA. Os iniciadores utilizados foram Iphag583f 5' – TTGCTGTTCCAACAGGAGTAAA – 3' e Iphag820r 5' – CAAAAAATTGCAAAAACACTGC – 3' (BOHACSOVA *et al.*, 2016) e as condições de ciclagem foram: desnaturação inicial a 94°C por 3 min, seguida de 40 ciclos a 94°C por 30 seg, 58°C por 30 seg e 72°C por 1 min e extensão final a 72°C por 10 min.

4.6.5 PCR de Onchocercidae

As amostras positivas para *Wolbachia* foram submetidas à amplificação de um fragmento de ~500pb do gene mitocondrial 12S rRNA de Onchocercidae. A PCR foi realizada em um volume final de 25 µL, contendo 12,5 µL de reagente GoTaq Green Master Mix (Promega, Madison, WI, EUA), 8 µL de água ultrapura, 0,4 µM de cada oligonucleotídeo e

~50ng de DNA. Os iniciadores utilizados foram 12SF 5' – GTTCCAGAATAATCGGCT – 3' e 12SR 5' – ATTGACGGATGRTTTGTACC – 3' (HUANG *et al.*, 2021) e as condições de ciclagem foram: desnaturação inicial a 94°C por 3 min, seguida de 40 ciclos a 94°C por 30 seg, 50°C por 45 seg e 72°C por 1 min e extensão final a 72°C por 10 min.

4.6.6 PCR de *Coxiella* spp.

Todas as amostras foram submetidas à amplificação de um fragmento de 532 pb do gene 16S rRNA de *Coxiella* spp. A PCR foi realizada em um volume final de 25 µL, contendo 12,5 µL de reagente GoTaq Green Master Mix (Promega, Madison, WI, EUA), 5,5 µL de água ultrapura, 0,4 µM de cada oligonucleotídeo e ~200ng de DNA. Os iniciadores utilizados foram 16S rRNA F 5' – GGGGAAGAAAGTCTCAAGGGTAATATCCTT – 3' e 16S rRNA R 5' – CTGCTCAATGAIIIIIITTAATTGCTGTGG – 3' (ALMEIDA *et al.*, 2012) e as condições de ciclagem foram: desnaturação inicial a 94°C por 5 min, seguida de 40 ciclos a 94°C por 1 min, 64°C por 1 min e 72°C por 1 min e extensão final a 72°C por 10 min.

4.6.7 PCR de *Francisella* spp.

Todas as amostras foram submetidas à amplificação de um fragmento de 286 bp do gene 16S rRNA de *Francisella* spp. A PCR foi realizada em um volume final de 25 µL, contendo 12,5 µL de reagente GoTaq Green Master Mix (Promega, Madison, WI, EUA), 5,5 µL de água ultrapura, 0,4 µM de cada oligonucleotídeo e ~200ng de DNA. Os iniciadores utilizados foram FLB16S180F 5' – GCGGATTAAGGTGGCCTTTGC – 3' e FLB16S465R 5' – CCTCGAAGCTATTAACACAGG – 3' (HSIEH *et al.*, 2007) e as condições de ciclagem foram: desnaturação inicial a 94°C por 5 min, seguida de 40 ciclos a 94°C por 30 seg, 58°C por 30 seg e 72°C por 30 seg e extensão final a 72°C por 5 min.

4.6.8 PCR de *Rickettsia* spp.

Todas as amostras foram submetidas à amplificação de um fragmento de 800 pb do gene *ompB* de *Rickettsia* spp. A PCR foi realizada em um volume final de 25 µL, contendo 12,5 µL de reagente GoTaq Green Master Mix (Promega, Madison, WI, EUA), 5,5 µL de água ultrapura, 0,4 µM de cada oligonucleotídeo e ~200ng de DNA. Os iniciadores utilizados foram Ric F 5' – CAGCAAGGTAATAAGTTTAATAC – 3' e Ric R 5' – GCTATACCGCCTGTAGTAACAG – 3' (HIRUNKANOKPUN *et al.*, 2022) e as condições de ciclagem foram: desnaturação inicial a 94°C por 5 min, seguida de 40 ciclos a 94°C por 1 min, 60°C por 1 min e 72°C por 1 min e extensão final a 72°C por 10 min.

4.6.9 Eletroforese

Os produtos de PCR marcador molecular Mid Range DNA Ladder (Cellco Biotech, São Carlos, SP, Brasil) foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,8% e o padrão de bandas foi analisado com o fotodocumentador Axygen® Gel (Corning Inc., Corning, NY, EUA).

4.7 Sequenciamento

Amplicons de *Wolbachia*, Onchocercidae, *Coxiella* e *Francisella* foram purificados utilizando os kits DNA Cleanup PCR Purification e Agarose Gel Extraction Kit (Cellco Biotech, São Carlos, SP, Brasil), QIAquick PCR Purification Kit (50) (Qiagen, Hilden, Alemanha) e Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, EUA) e sequenciados na plataforma de sequenciamento da Fiocruz (Sanger).

4.8 Bioinformática

Os cromatogramas senso e antisenso obtidos através do sequenciamento de cada amostra foram editados usando o software Geneious Prime (versão 2022.2.2) (<https://www.geneious.com>) durante o Ensaio 1 e BioEdit 7.7 durante o Ensaio 2 para obter sequências consenso dos genes sequenciados, que foram então comparadas contra o banco de dados Nucleotide (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>) usando a ferramenta BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

4.9 Registro das sequências

As sequências parciais do gene 16SrRNA de *Wolbachia* obtidas durante o Ensaio 1 foram depositadas no GenBank, com os seguintes números de acesso: OP872635, OP872636, OP872637, OP872638, OP872639, OP872640, OP872641, OP872642, OP872643, OP872644, OP872645, OP872646 e OP872647.

4.10 Análises estatísticas

Utilizando o software GraphPad Prism 10.2.1, os números de amostras positivas e negativas nas diferentes PCR foram analisados pelo teste Qui-quadrado e teste exato de Fisher 2x2, aplicando o método de Wilson-Brown para calcular os intervalos de confiança, onde um valor $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4.11 Levantamento de custos

O preço em real brasileiro (BRL) dos reagentes DNAzol™ (10503027) (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), Proteinase K (PK) Solution (20 mg/ml) (MC5005) (Promega, Madison, WI, EUA), NaOH (221465-25G) e HEPES (H3375-25G) (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) foram obtidos através do site da empresa da Thermo Fisher Scientific em março de 2024 (<https://www.thermofisher.com/>), de contato com um representante comercial da Promega em março de 2023 e do site da empresa Merck (<https://www.sigmaaldrich.com/>) em março de 2024, respectivamente.

O preço médio dos kits comerciais DNeasy Blood & Tissue Kit (50) (Qiagen, Hilden, Alemanha) e PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (K182001) (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) foi utilizado para comparação de custo. Os valores dos kits foram obtidos através de busca no site da distribuidora Pró-Análise para o produto da Qiagen (<https://www.pro-analise.com.br/>) em março de 2024 e por meio do site da Thermo Fisher Scientific para o produto da Invitrogen (<https://www.thermofisher.com/>) em março de 2024. O custo de outros materiais (etanol, microtubos, ponteiras e afins) não foi considerado por serem necessários nos dois métodos.

O preço final dos produtos listados acima foi convertido para dólar americano (USD) sob cotação 1 BRL = 4,95 USD. As diferenças percentuais entre os preços da extração de DNA com DNAzol e com kits foram calculadas com equações de comparação de proporções.

Equação 1. Análise da Diferença Percentual entre os valores dos dois métodos de extração de DNA.

$$\text{A) Percentual mais caro} = \frac{x - y}{y} \times 100\%$$

$$\text{B) Percentual mais barato} = \frac{x - y}{x} \times 100\%$$

x: preço em USD da média dos kits por amostra; y: preço em USD do método com DNAzol por amostra.

5 RESULTADOS

5.1 Ensaio 1

Um total de 187 amostras foram testadas, sendo 94 de Jundiaí (47 machos e 47 fêmeas, denominadas MJ e FJ, respectivamente) e 93 de Campinas (49 machos e 44 fêmeas, denominadas MC e FC, respectivamente) (Figura 14a). As amostras de ambas as localidades geraram produtos de PCR correspondentes ao fragmento do gene mitocondrial 16S rRNA de *Amblyomma* spp., e 15 delas (8%) também apresentaram bandas de aproximadamente 438 pb, correspondentes ao fragmento do gene 16S rRNA de *Wolbachia*. Dentro desse total, 80%

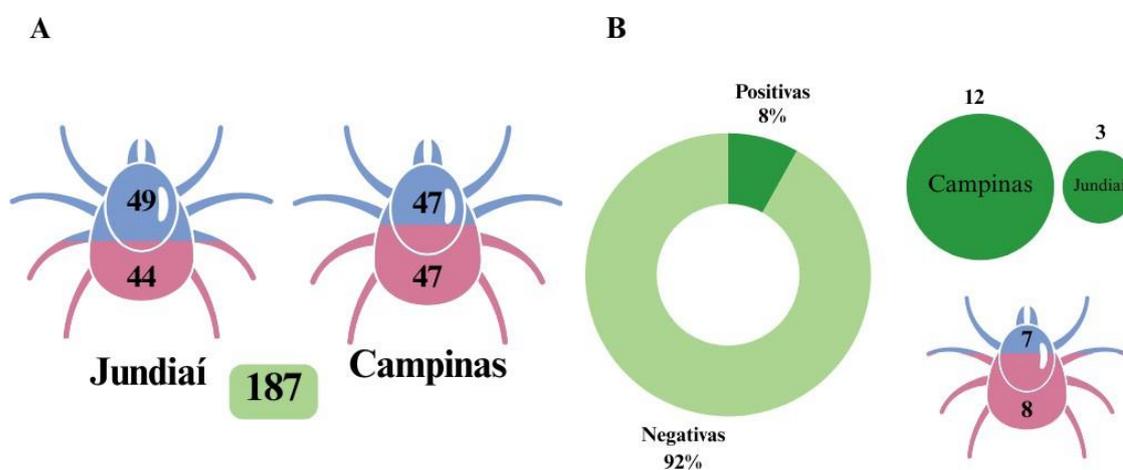


Figura 14. Esquema das amostras testadas durante o Ensaio 1. A: quantidade de amostras, sexo e localização geral (azul: machos; rosa: fêmeas). B: quantidade de amostras *Wolbachia*-positivas, localização e sexo (azul: machos; rosa: fêmeas; verde claro: amostras *Wolbachia*-negativas; verde escuro: amostras *Wolbachia*-positivas).

(12/15) das amostras eram de Campinas e 20% (3/15) eram de Jundiaí; 47% (7/15) eram machos e 53% (8/15) eram fêmeas (Figura 14b). Nenhuma das amostras positivas apresentou produtos de PCR de *I. hookeri*.

Foram obtidas sequências parciais de *Wolbachia* a partir de 13 amostras positivas: FC21, FC22, FC23, FC24, FC33, FC44, FJ28, MC01, MC02, MC04, MC05, MC06 e MJ46. Por serem idênticas, as amostras MC01, MC05, MC06, FC21, FC22, FC23 e FC24 foram agrupadas como “Grupo 1”, enquanto as amostras FC33 e FC44 foram agrupadas como “Grupo 2”.

Através da análise BLAST, todas as amostras apresentaram mais de 96% de similaridade com outras sequências de *Wolbachia* já registradas no GenBank (Tabela 2). Todas as sequências de *Wolbachia* compartilhavam um ancestral comum, confirmando a formação de um grupo monofilético (Figura 15). As cepas de *Wolbachia* presentes em *A. sculptum* detectadas neste estudo pertenciam a três clados distintos. Observou-se que a amostra MJ46 compartilhava o mesmo clado que uma cepa do supergrupo B, a qual foi isolada do pulgão *Cervaphis quercus*. A amostra MC02 formou um ramo separado, porém com uma distância genética (DG) (Tabela 3) insignificante em relação às amostras do Grupo 1 (DG=0,0) e à MC04 (DG=0,003), que formaram um clado isolado. Essas amostras apresentaram distâncias genéticas muito pequenas em relação à *Wolbachia* isolada do percevejo *Kleidocerys resedae* (DG=0,013, 0,003, 0,005 e 0,008, respectivamente).

Tabela 2. Resultado do BLAST das sequências de *Wolbachia* do Ensaio 1.

Amostra	Sequência mais próxima (% I/C)	Organismo hospedeiro de <i>Wolbachia</i>	Nº acesso GenBank	e-value	Amostra	Sequência mais distante (% I/C)	Organismo hospedeiro de <i>Wolbachia</i>	Nº acesso GenBank	e-value
Grupo 1	100/100	<i>Aedes albopictus</i>	CP041923.1	0.0	Grupo 1	99.29/100	<i>Aedes koreicus</i>	MT809043.1	0.0
MC02	99.71/100	<i>Aedes albopictus</i>	CP041923.1	9e-172	MC02	99.13/100	<i>Aedes koreicus</i>	MT809043.1	5e-169
MC04	100/100	<i>Anopheles gambiae</i>	KJ728741.1	0.0	MC04	98.96/100	<i>Pammene fasciana</i>	OX366360.1	0.0
MJ46	100/100	<i>Philaenus maghresignus</i>	AB772263.1	0.0	MJ46	99.07/100	<i>Nilaparvata lugens</i>	GU124506.1	0.0
Grupo 2	97.9/100	<i>Cruorifilaria tubero cauda</i>	CP046579.1	0.0	Grupo 2	96.03/100	<i>Eupithecia tripunctaria</i>	OX366369.1	0.0
FJ28	97.64/100	<i>Cruorifilaria tubero cauda</i>	CP046579.1	0.0	FJ28	96.23/100	<i>Dirofilaria immitis</i>	ON259766.1	0.0

% I/C: porcentagem de identidade e cobertura, respectivamente.

Essa busca foi realizada utilizando a base de dados Nucleotide collection (nr/nt) do NCBI e otimizada com o algoritmo Blastn.

As sequências do Grupo 2 e FJ28 também compartilharam um clado único, porém estavam em um ramo topologicamente distante dos anteriores. Além disso, essas amostras iniciaram a partir do mesmo ponto de ramificação de uma cepa de *Wolbachia* do supergrupo F, que havia sido isolada do nematoide filarial *Dipetalonema gracile*.

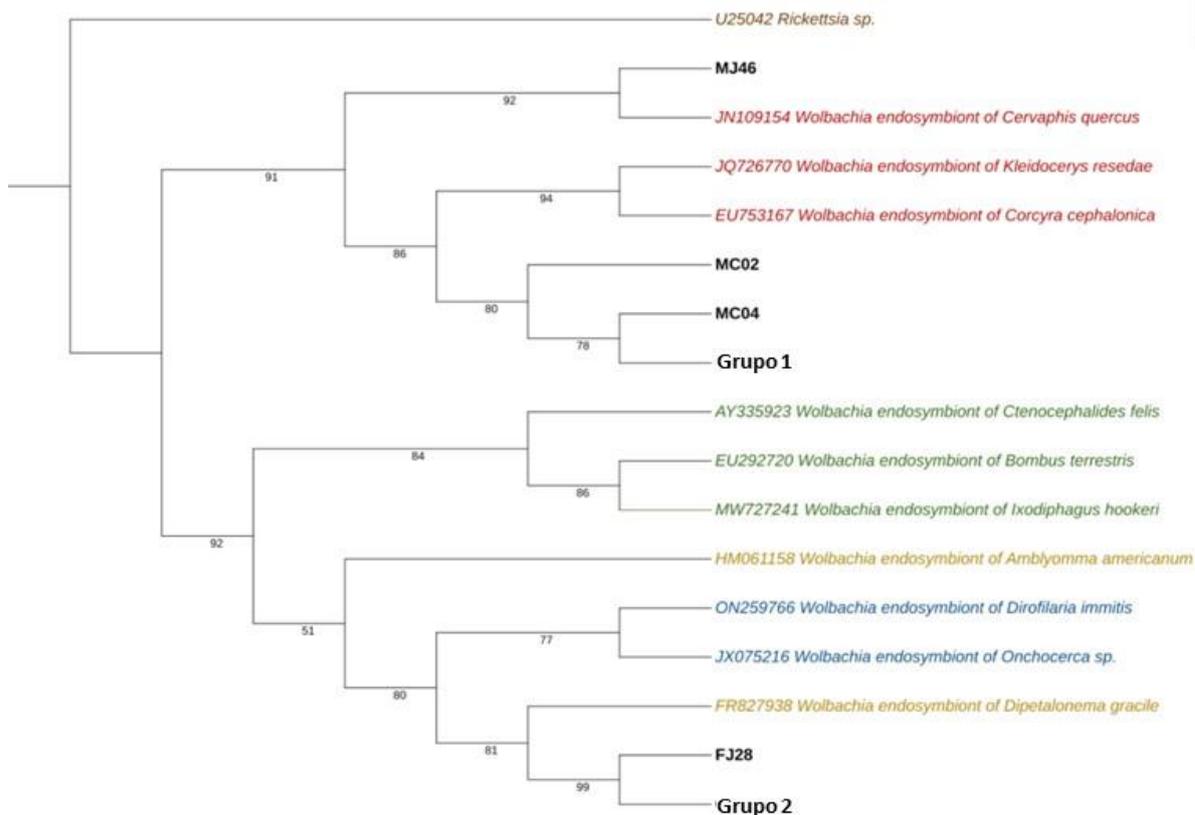


Figura 15. Árvore filogenética baseada em sequências do gene 16S rRNA de *Wolbachia*. Sequência 16S rRNA de *Rickettsia* sp. como grupo externo (marrom); sequências de 16S rRNA dos supergrupos A (verde), B (vermelho), C (azul) e F (amarelo) de *Wolbachia*; e sequências 16S rRNA de *Wolbachia* isoladas nas amostras de *A. sculptum* deste trabalho (negrito). Os números abaixo dos ramos mostram o valor de confiança do bootstrap. Fonte: ROMANO, D. M. M. *et al.* (2023).

Esses resultados foram publicados na revista *Veterinary Parasitology* sob o título “First molecular evidence of/ *Wolbachia* occurrence in *Amblyomma sculptum* (Acari: Ixodidae)” em março de 2023, doi: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2023.109907>

Tabela 3. Estimativas de divergência evolutiva entre sequências do gene 16S rRNA de *Wolbachia*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1 Grupo 1																
2 MC02	0,000															
3 MC04	0,003	0,003														
4 MJ46	0,018	0,016	0,023													
5 Grupo 2	0,071	0,069	0,082	0,071												
6 FJ28	0,068	0,069	0,078	0,067	0,003											
7 EU753167 <i>Wolbachia</i> endosymbiont of <i>Coreyra cephalonica</i>	0,005	0,003	0,008	0,013	0,077	0,074										
8 JQ726770 <i>Wolbachia</i> endosymbiont of <i>Kleidocerys resedae</i>	0,005	0,003	0,008	0,013	0,077	0,074	0,000									
9 JN109154 <i>Wolbachia</i> endosymbiont of <i>Cervaphis quercus</i>	0,027	0,026	0,032	0,008	0,080	0,077	0,021	0,021								
10 AY335923 <i>Wolbachia</i> endosymbiont of <i>Ctenocephalides felis</i>	0,115	0,132	0,098	0,108	0,116	0,112	0,115	0,115	0,119							
11 EU292720 <i>Wolbachia</i> endosymbiont of <i>Bombus terrestris</i>	0,052	0,053	0,061	0,040	0,046	0,043	0,046	0,046	0,049	0,072						
12 MW727241 <i>Wolbachia</i> endosymbiont of <i>Ixodiphagus hookeri</i>	0,046	0,049	0,054	0,040	0,041	0,038	0,046	0,046	0,049	0,066	0,005					
13 HM061158 <i>Wolbachia</i> endosymbiont of <i>Amblyomma americanum</i>	0,046	0,054	0,054	0,041	0,044	0,041	0,046	0,046	0,049	0,082	0,024	0,018				
14 ON259766 <i>Wolbachia</i> endosymbiont of <i>Dirofilaria immitis</i>	0,065	0,068	0,075	0,058	0,041	0,044	0,064	0,064	0,067	0,092	0,032	0,026	0,029			
15 JX075216 <i>Wolbachia</i> endosymbiont of <i>Onchocerca</i> sp.	0,059	0,060	0,068	0,052	0,035	0,038	0,058	0,058	0,061	0,085	0,026	0,021	0,024	0,005		
16 FR827938 <i>Wolbachia</i> endosymbiont of <i>Dipetalonema gracile</i>	0,071	0,076	0,082	0,064	0,035	0,038	0,070	0,070	0,073	0,112	0,049	0,043	0,041	0,026	0,026	

Negrito: sequências deste estudo. Fonte: ROMANO, D. M. M. *et al.* (2023).

5.2 Ensaio 2

A variação D da otimização do protocolo de extração de DNA de *A. sculptum* foi a melhor dentre todas, gerando as bandas com maior intensidade (Figura 16). Apesar da variação C também apresentar bandas brilhantes, após aproximadamente um mês, essas amostras não amplificaram mais, indicando degradação do material genético, ao passo que as amostras D6 e D8 continuaram gerando amplicons.

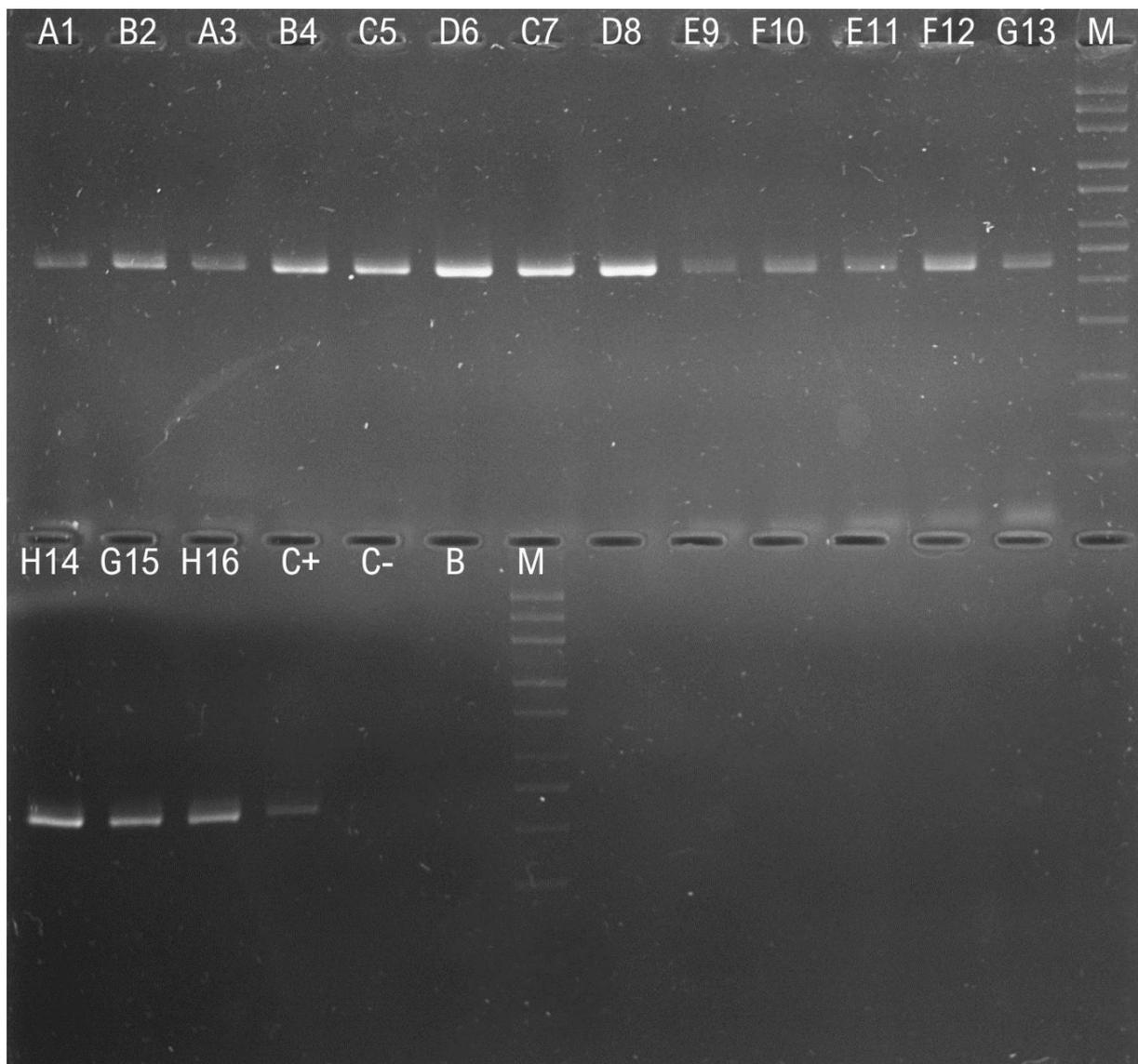


Figura 16. Gel de eletroforese dos produtos de PCR da padronização da extração de DNA. C+: controle positivo. C-: controle negativo. B: branco. M: marcador molecular de 100 a 3.000pb.

Um total de 216 carrapatos foram analisados, dos quais 107 eram de Jundiaí (53 machos e 54 fêmeas, nomeados de MJ e FJ, respectivamente) e 109 eram de Campinas (52 machos e 57 fêmeas, nomeados de MC e FC, respectivamente). Todas as amostras geraram produtos de PCR correspondentes ao fragmento do gene mitocondrial 16S rRNA de *Amblyomma* spp. Um total de seis amostras (3%) amplificaram fragmentos correspondentes ao gene 16S rRNA de

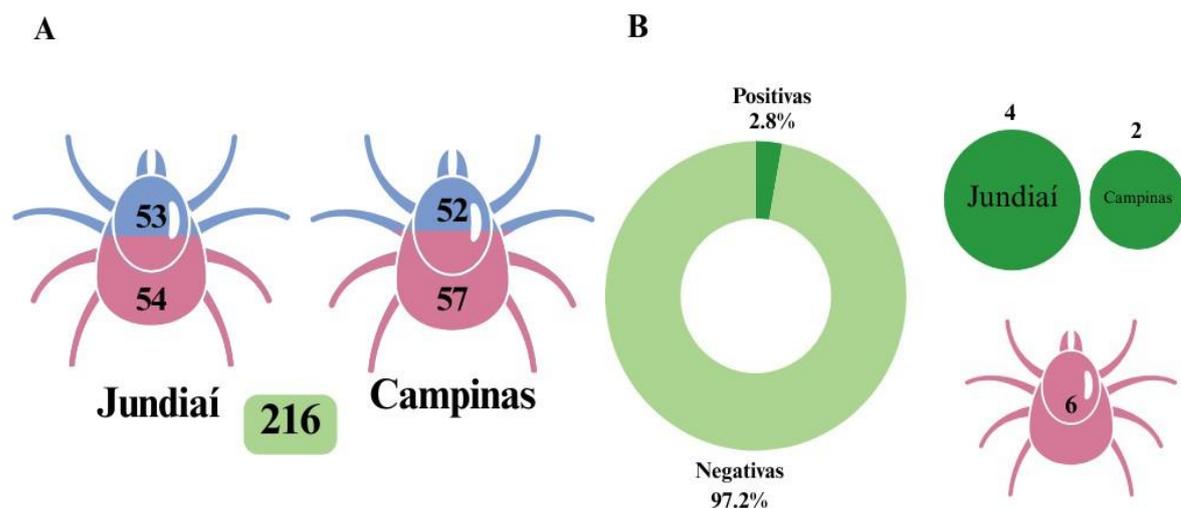


Figura 17. Esquema das amostras testadas durante o Ensaio 2. A: quantidade de amostras, sexo e localização geral (azul: machos; rosa: fêmeas). B: quantidade de amostras *Wolbachia*-positivas, localização e sexo (azul: machos; rosa: fêmeas; verde claro: amostras *Wolbachia*-negativas; verde escuro: amostras *Wolbachia*-positivas).

Wolbachia e todas essas amostras pertenciam ao sexo feminino, das quais quatro proviam de Jundiaí e duas de Campinas.

Foram obtidas sequências parciais de todas as amostras positivas para *Wolbachia*, sendo FJ53 com 438pb, FJ56 com 333pb, FJ64 com 255pb, FJ92 com 361pb, FJ60 com 437pb e FJ97 com 438pb. Todas as amostras apresentaram mais de 96% de similaridade com outras sequências de *Wolbachia* já registradas no GenBank (Tabela 4).

Das 216 amostras, 208 (96%) produziram amplicons para o gene mitocondrial 12S rRNA de Onchocercidae, sendo que apenas a amostra FJ64 foi a única entre as *Wolbachia*-positivas que não foi positiva para nematóide filarial. Obteve-se sequências parciais do gene de

Tabela 4. Resultado do BLAST das sequências de *Wolbachia* do Ensaio 2.

Amostra	Sequência mais próxima (% I/C)	Organismo hospedeiro de <i>Wolbachia</i>	Nº acesso GenBank	e-value	Amostra	Sequência mais distante (% I/C)	Organismo hospedeiro de <i>Wolbachia</i>	Nº acesso GenBank	e-value
FJ53	100/97	<i>Amblyomma sculptum</i>	OP872640.1	0.0	FJ53	96.12/100	<i>Endotricha flammealis</i>	OX366352.1	0.0
FJ56	99.40/100	<i>Cruorifilaria tubero cauda</i>	CP046579.1	1e-164	FJ56	96.40/100	<i>Cimex hemipterus</i>	CP061738.1	5e-151
FJ64	100/100	População de inseto	MH470286.1	4e-164	FJ64	100/100	<i>Oreina cacaliae</i>	HG325884.1	4e-125
FJ92	99.72/99	<i>Cruorifilaria tubero cauda</i>	CP046579.1	1e-179	FJ92	96.68/100	<i>Philanthus gibbosus</i>	HM110637.1	4e-166
FC60	100/97	<i>Amblyomma sculptum</i>	OP872640.1	0.0	FC60	96.11/100	<i>Bibio marci</i>	OX366364.1	0.0
FC97	100/97	<i>Amblyomma sculptum</i>	OP872640.1	0.0	FC97	96.12/100	<i>Endotricha flammealis</i>	OX366352.1	0.0

% I/C: porcentagem de identidade e cobertura, respectivamente.

Essa busca foi realizada utilizando a base de dados Nucleotide collection (nr/nt) do NCBI e otimizada com o algoritmo Blastn.

oncocercídeos de quatro amostras *Wolbachia*-positivas (FJ53, FJ56, FJ92 e FC60) e de duas amostras *Wolbachia*-negativas (FJ65 e FC98). As sequências de FJ53, FJ 65, FJ92, FC60 e FC98 apresentaram ~92% de identidade com a sequência do nematoide filarial *Yatesia hydrochoerus*, enquanto a sequência da amostra FJ56 foi 96,33% semelhante com a sequência do nematoide filarial *Cruorifilaria tubero cauda* (Tabela 5).

Nas reações para detectar a presença de outras endossimbiontes, 146 (68%) amostras foram positivas para *Coxiella* spp., incluindo cinco amostras *Wolbachia*-positivas, 24 (11%) amostras positivas para *Francisella* spp., nenhuma amostra foi positiva para *Rickettsia* spp. e 66 amostras não foram positivas para nenhuma das bactérias investigadas. Obteve-se 16 sequências parciais do gene 16S rRNA de *Coxiella* spp., as quais apresentaram de 98.52% a 100% de identidade com a bactéria *Coxiella* endossimbionte de *Amblyomma sculptum* e quatro sequências parciais do gene 16S de *Francisella* spp. que tiveram entre 99% e 100% de identidade com a bactéria *Francisella orientalis* (Tabela 5).

Tabela 5. Resultado do BLAST das sequências de Onchocercidae, CLE e FLE.

Amostra	Alvo	pb	I%	C%	Organismo	e-value	Nº acesso GenBank
FJ 92	Nema	486	92.94	84	<i>Yatesia hydrochoerus</i>	0	KP760357.1
FC 60	Nema	462	92.48	88	<i>Yatesia hydrochoerus</i>	0	KP760357.1
FC 98	Nema	447	92.27	91	<i>Yatesia hydrochoerus</i>	0	KP760357.1
FJ 56	Nema	421	96.33	98	<i>Cruorifilaria tubero cauda</i>	0.0	KP760322.1
FJ 53	Nema	397	91.39	97	<i>Yatesia hydrochoerus</i>	5e-153	KP760357.1
FJ 65	Nema	375	92.04	98	<i>Yatesia hydrochoerus</i>	1e-148	KP760357.1
FC 47	CLE	469	99.79	100	<i>Coxiella</i> endosymbiont of <i>Amblyomma sculptum</i>	0.0	CP033868.1
MJ 62	CLE	458	100	100	<i>Coxiella</i> endosymbiont of <i>Amblyomma sculptum</i>	0.0	CP033868.1
MC 68	CLE	459	99.78	100	<i>Coxiella</i> endosymbiont of <i>Amblyomma sculptum</i>	0.0	CP033868.1
FJ 73	CLE	460	99.78	100	<i>Coxiella</i> endosymbiont of <i>Amblyomma sculptum</i>	0.0	CP033868.1
FJ 75	CLE	445	99.55	100	<i>Coxiella</i> endosymbiont of <i>Amblyomma sculptum</i>	0.0	CP033868.1
FC 77	CLE	456	100	100	<i>Coxiella</i> endosymbiont of <i>Amblyomma sculptum</i>	0.0	CP033868.1
FC 86	CLE	461	100	100	<i>Coxiella</i> endosymbiont of <i>Amblyomma sculptum</i>	0.0	CP033868.1
FJ 94	CLE	459	100	100	<i>Coxiella</i> endosymbiont of <i>Amblyomma sculptum</i>	0.0	CP033868.1
FJ 97	CLE	456	100	100	<i>Coxiella</i> endosymbiont of <i>Amblyomma sculptum</i>	0.0	CP033868.1
MC 100	CLE	416	99.76	100	<i>Coxiella</i> endosymbiont of <i>Amblyomma sculptum</i>	0.0	CP033868.1
MC 81	CLE	333	98.52	100	<i>Coxiella</i> endosymbiont of <i>Amblyomma sculptum</i>	0	CP033868.1
FC 83	CLE	283	99.65	100	<i>Coxiella</i> endosymbiont of <i>Amblyomma sculptum</i>	0	CP033868.1
FJ 56	CLE	455	100	100	<i>Coxiella</i> endosymbiont of <i>Amblyomma sculptum</i>	0.0	CP033868.1
FJ 92	CLE	455	100	100	<i>Coxiella</i> endosymbiont of <i>Amblyomma sculptum</i>	0.0	CP033868.1
FC 60	CLE	455	100	100	<i>Coxiella</i> endosymbiont of <i>Amblyomma sculptum</i>	0.0	CP033868.1
FC 97	CLE	455	100	100	<i>Coxiella</i> endosymbiont of <i>Amblyomma sculptum</i>	0.0	CP033868.1
MC 76	FLE	289	99	100	<i>Francisella orientalis</i>	7e-143	CP022953.1
MC 74	FLE	289	99	100	<i>Francisella orientalis</i>	7e-143	CP022953.1
FC 100	FLE	283	100	100	<i>Francisella orientalis</i>	0	CP022953.1
FC 99	FLE	288	100	100	<i>Francisella orientalis</i>	7e-143	CP022953.1

Nema: nematoide filarial (Onchocercidae); CLE: endossimbiontes semelhantes à *Coxiella*; FLE: endossimbiontes semelhantes à *Francisella*; pb: número de pares de bases da sequência; I%: porcentagem de identidade; C%: porcentagem de cobertura.

Essa busca foi realizada utilizando a base de dados Nucleotide collection (nr/nt) do NCBI e otimizada com o algoritmo Blastn.

5.3 Análises estatísticas

As análises estatísticas gerais relacionando a presença de *Wolbachia* com a sazonalidade, local e sexo das amostras não foram significativas ($P = 0.1196$, $P = 0.1775$ e $P = 0.1775$, respectivamente).

Houve diferença estatisticamente significativa entre a ocorrência de *Wolbachia* e *Coxiella* (Figura 18a) e entre a ocorrência de *Wolbachia* e *Francisella* (Figura 18b), mas não houve diferença estatística significativa entre a coinfeção de *Wolbachia* e *Coxiella* (Figura 18c) e de *Wolbachia* e *Francisella* (Figura 18d).

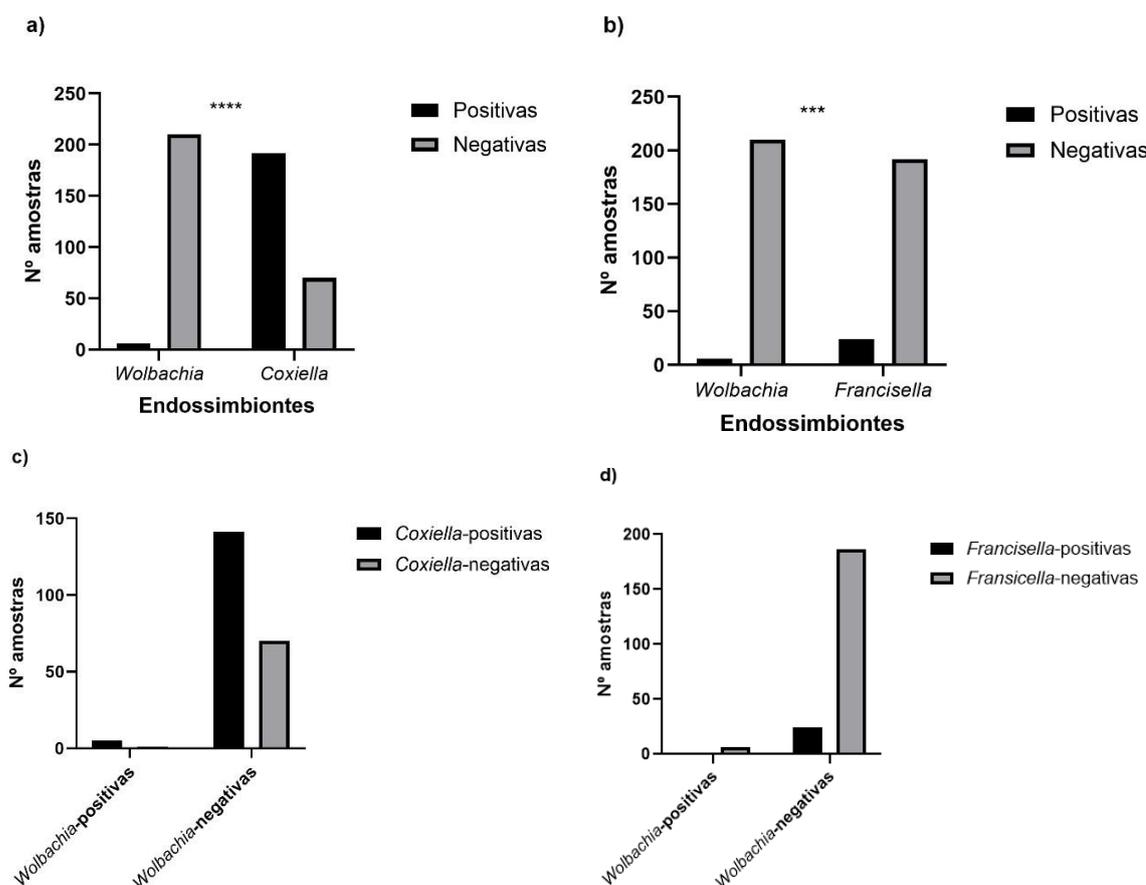


Figura 18. Análise estatística da presença de endossimbiontes. a) Amostras positivas e negativas para *Wolbachia* e *Coxiella* (**** $P = <0.0001$). b) Amostras positivas e negativas para *Wolbachia* e *Francisella* (***) $P = 0.0010$). c) Análise de coinfeção de *Wolbachia* e *Coxiella*. d) Análise de coinfeção de *Wolbachia* e *Francisella*.

5.4 Levantamento de custo

O valor final com todos os reagentes necessários para realizar 100 reações da extração de DNA estabelecida neste trabalho foi de R\$ 451,00, contra o valor médio dos kits de R\$3.194,00 para 100 reações. Após a fração dos preços por reação e conversão para USD, o valor por reação da extração de DNA com kits comerciais custou 609% mais caro do que com

DNAzol (por reação) ou a extração com DNAzol foi 86% mais acessível do que as extrações com kits (por reação) (Tabela 6).

Tabela 6. Levantamento e comparação de custo da extração de DNA com DNAzol e com kits comerciais de extração de DNA.

Reagente	Volume	Valor	Volume 100 reações	Valor 100 reações	Total 100 reações	Média	Total por reação
DNAzol	0,1 L	R\$ 1.686,00	0,02487 L	R\$ 419,30			
Proteinase K (20mg/mL)	0,004 L	R\$ 961,00	0,00013 L	R\$ 31,42	R\$ 451,00	—	R\$ 4,51/ US\$ 0,91
NaOH 8 mM	0.32 g/L	R\$ 3,12	0,00431 L	R\$ 0,01			
HEPES 0,1 M	23,83 g/L	R\$ 384,10	0,00069 L	R\$ 0,26			
Kit Qiagen	50 reações	R\$ 1.874,00	-	R\$ 3.748,00	R\$ 6.388,00	R\$ 3.194,00	R\$ 31,94/ US\$ 6,45
Kit Invitrogen	50 reações	R\$ 1.320,00	-	R\$ 2.640,00			

L: litro; g: grama; R\$: real brasileiro (BRL); US\$: dólar americano (USD).

6 DISCUSSÃO

Durante ambos os ensaios se garantiu uma extração de DNA eficiente, utilizando um protocolo novo e oligonucleotídeos complementares ao mtDNA de *A. sculptum* como controle endógeno, com o objetivo de evitar resultados falsos negativos. O protocolo otimizado para extração de DNA de carrapatos adultos descrito nesta dissertação, chega a ser 86% mais econômico do que a extração com kits comerciais.

A extração de DNA de carrapatos é um desafio devido ao exoesqueleto quitinoso e a maior facilidade de degradação do material genético de ixodídeos (HILL, GUTIERREZ, 2003; HALOS *et al.*, 2004). Outro problema são os inibidores de PCR que dificultam análises que necessitam de amostras alta nível de pureza (OKEYO *et al.*, 2019).

Apesar de Hill *et al.* (2003) ter descrito que a extração de DNA de ixodídeos com DNazol não foi bem-sucedida, a utilização deste reagente, com modificações do protocolo do fabricante, se mostrou eficiente neste trabalho.

O DNazol é um reagente para isolamento de DNA não tóxico e pronto para uso, que contém tiosulfato de guanidina e detergente na sua fórmula, garantindo uma extração eficiente do gDNA de uma ampla variedade de tecidos e células (CHOMCZYNSKI *et al.*, 1997). O tiosulfato de guanidina ou isotiosulfato de guanidina (GITC) é um agente caotrópico, ou seja, interfere nas redes de ligações de hidrogênio em solução aquosa. Por ser um potente desnaturante de proteínas, é utilizado na biologia molecular para extração de DNA e RNA, para inativar nucleases e estabilizar os ácidos nucleicos (SHEN, 2023; THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2024). Nakayima, Magona e Sugimoto (2014) também descreveram um protocolo modificado produtivo com esse reagente, porém com uma execução morosa, por possuir uma etapa de pré-extração que demanda de 3 a 5 dias.

A diminuição do volume utilizado de proteinase K combinada com o maior tempo de digestão da protease aparenta ser o motivo do sucesso da variação D. Estudos mostram que o excesso de proteinase K na reação pode aumentar a degradação do DNA, a liberação de inibidores de PCR e diminuir o rendimento de DNA (SANTOS *et al.*, 2018; SIGMA-ALDRICH CORPORATION, 2023). A saliva dos carrapatos contém vários componentes que modulam o sistema imune do hospedeiro vertebrado. Dentre esses componentes, estão os inibidores de serina proteases, que são altamente expressos nas glândulas salivares desses ectoparasitos. A resposta imunológica do hospedeiro vertebrado ao parasitismo é mediada por cascatas de proteases, logo, os inibidores desempenham um papel crucial como mecanismo de evasão do carrapato do sistema imunológico (MARTINS *et al.*, 2020). Além disso, apesar de

ainda não existirem evidências, a saliva dos carrapatos também pode conter nucleases, que teriam como finalidade degradar as armadilhas extracelulares de neutrófilos (NET) geradas para defender o hospedeiro, que consistem na liberação do DNA desses leucócitos para reter e matar bactérias (MENTEN-DEDOYART *et al.*, 2012). Nesse contexto, a proteinase K, que é uma serina protease, poderia ter parte da sua atividade inibida quando aplicada nas amostras de *A. sculptum*, sendo necessário mais tempo para que as enzimas pudessem desnaturar uma quantidade hipoteticamente maior de nucleases do que em outros tipos de amostra.

O tampão TE foi testado durante a otimização do protocolo de extração de DNA neste estudo, por ser recomendado para armazenamento de ácidos nucleicos a longo prazo (ROSS, HAITES, KELLY, 1990). A eluição do DNA com tampão TE une a capacidade tamponante do Tris, que mantém a amostra com pH neutro, com o princípio quelante do EDTA, que se liga aos cátions metálicos de Mg²⁺ e protege as moléculas do material genético da degradação por nucleases, que utilizam esse mineral como cofator enzimático (PANDA, MEHER, HAZRA, 2019). Porém, como indicado no protocolo do fabricante, o pellet precipitado não é totalmente solubilizado com tampão TE. Além disso, o EDTA pode agir como inibidor da PCR, sequestrando o magnésio que também é cofator da Taq polimerase, diminuindo a eficiência e atividade enzimática (CHAUDHARI, 2017). Isso pode explicar a intensidade mais baixa nas bandas geradas na PCR das variações da extração que tiveram o tampão TE como eluente de DNA.

Ao todo, apenas 5% dos carrapatos analisados neste trabalho foram positivos para *Wolbachia*. Esse resultado está de acordo com estudos anteriores, que investigaram a presença dessa endossimbionte em outras espécies de carrapatos, e demonstraram que a taxa de ocorrência de *Wolbachia* nessas populações geralmente é baixa (HARTELT *et al.*, 2004; SARIH *et al.*, 2005; POURALI *et al.*, 2009; ANDREOTTI *et al.*, 2011; KHOO *et al.*, 2016; HIRUNKANOKPUN *et al.*, 2018; ADEGOKE *et al.*, 2020; BOBO, 2020). Isso difere da associação de carrapatos com outras bactérias, como os gêneros *Rickettsia*, *Coxiella* e *Francisella*, que são endossimbiontes abundantes nos carrapatos (HUSSAIN *et al.*, 2022).

Durante o Ensaio 1, todas as amostras *Wolbachia*-positivas foram negativas para o gene mitocondrial COX I da vespa parasitoide *I. hookeri* em PCR. O que era esperado, pois em um estudo conduzido em carrapatos *A. sculptum* no município de Salto (São Paulo, Brasil), localizado a 42km e 50km de Campinas e Jundiaí, respectivamente, não foram observadas ocorrências dessa vespa em nenhuma das amostras (SOARES *et al.*, 2022). Esse resultado é importante, pois difere da maioria das infecções por *Wolbachia* em carrapatos relatadas

anteriormente, que são de origem inconclusiva, principalmente devido à presença de *I. hookeri* (MADHAV *et al.*, 2020).

Através da análise filogenética do gene 16S rRNA, acredita-se que as cepas de *Wolbachia* em *A. sculptum* do Ensaio 1 provavelmente pertencem ao supergrupo B (Grupo 1, MC02, MC04 e MJ16) e ao supergrupo F (Grupo 2 e FJ28). Também já se sabe que células de carrapatos podem ser infectadas e hospedar cepas desses supergrupos por um longo período (KHOO *et al.*, 2020). Ainda, a sequência de *Wolbachia* da amostra FJ64 do Ensaio 2 é similar com sequências de *Wolbachia* do supergrupo A detectadas em mosquito, aranha, mosca, mariposa, abelha e besouros.

Cepas de *Wolbachia* do supergrupo A foram detectadas em diferentes espécies de carrapato, do supergrupo B em *R. sanguineus* e do supergrupo F em *A. americanum* (ZHANG, NORRIS, RASGON, 2011; WILLIAMS-NEWKIRK *et al.*, 2014; MADHAV *et al.*, 2020; CHAO, CASTILLO, SHIH, 2020) e apesar da interação dessa endossimbionte com carrapatos ainda ser desconhecida, é interessante notar que as bactérias *Wolbachia* do supergrupo A e B são conhecidas por manipular a reprodução de seus hospedeiros, enquanto as cepas do supergrupo F podem ter uma relação mutualística com artrópodes (NIKOH *et al.*, 2014; KAUR *et al.*, 2021; MAHMOOD *et al.*, 2021).

Bobo (2020) isolou uma sequência de *Wolbachia* de *Rhipicephalus microplus* semelhante à do percevejo *K. resedae*, que também é semelhante às amostras do Grupo 1, MC02, MC04 e MJ46 do presente estudo, indicando que pode haver semelhança entre essas cepas. Isso é importante porque, como observado por Bobo (2020), carrapatos que carregavam *Wolbachia* possuíam um microbioma menos rico e diverso. Portanto, sugere-se que essa descoberta esteja associada à capacidade desta bactéria de bloquear patógenos.

Das seis amostras positivas para *Wolbachia* durante o Ensaio 2, apenas uma não foi positiva para nematoide filarial e 203 amostras *Wolbachia*-negativas também amplificaram um fragmento do mtDNA de Onchocercidae. Os nematóides filariais *C. tubero caudata* e *Y. hydrochoerus* são endoparasitas de capivaras que podem causar ou não, respectivamente, danos graves à saúde destes roedores (CUETO, 2012). A presença de ambas as espécies filariais já foi relatada em ixodídeos e ensaios demonstraram a capacidade vetorial de carrapatos para nematóides filariais (BINETRUY, DURON, 2023), dessa maneira, as sequências de Onchocercidae obtidas neste trabalho serem similares ao mtDNA de *C. tubero caudata* e *Y. hydrochoerus* não é incomum.

As filárias *C. tubero caudata* e *Y. hydrochoerus* são conhecidas por hospedar cepas de *Wolbachia* do supergrupo J (LEFOULON *et al.*, 2020) e a alta semelhança das sequências de *Wolbachia* das amostras FJ53, FJ56, FJ92, FC60 e FC97 com sequências do gene 16S rRNA de *Wolbachia* de *C. tubero caudata* e *Y. hydrochoerus* sugere que, na verdade, este resultado seja fruto de uma contaminação secundária. Porém, esse não explica a ausência do DNA de *Wolbachia* nas amostras positivas para Onchocercidae (*Wolbachia*-negativas), nem a presença do DNA de *Wolbachia* na amostra FJ64 (Onchocercidae-negativa). Zhang, Norris, Rasgon (2011) e Manoj *et al.* (2021) também detectaram a presença de *Wolbachia* em carrapatos sem Onchocercidae, onde os autores do primeiro estudo não atribuem a presença de *Wolbachia* em seus carrapatos a nematóides filariais, enquanto no segundo trabalho, os autores discutem a excreção de *Wolbachia*, morte do nematoide filarial liberando a bactéria e transferência horizontal como possíveis resoluções para essas incógnitas.

Durante o Ensaio 2, a prevalência de CLE em *A. sculptum* foi de 68% e está de acordo com o encontrado em outros carrapatos: 58.33% em *Haemaphysalis shimoga* da Tailândia (ARTHAN *et al.*, 2015), 52.4% em *Haemaphysalis longicornis* da Coreia do Sul (SEO *et al.*, 2016), 61 % de *R. sanguineus* do Brasil (MACHADO-FERREIRA *et al.*, 2016), 51.7 % nos carrapatos analisados da Argélia (RAHAL *et al.*, 2020), 52.9% nos carrapatos da Colômbia (COTES-PERDOMO, OVIEDO, CASTRO, 2020), 69% nos carrapatos da Itália (CHISU *et al.*, 2021) e 54% em *Amblyomma variegatum* da Zâmbia (KOBAYASHI *et al.*, 2021). A CLE detectada por Grostieta *et al.* (2022) em *Amblyomma mixtum* no México também foi 98% idêntica a sequência de *Coxiella* endossimbionte de *Amblyomma sculptum* (CP033868).

A ocorrência de FLE em *A. sculptum* apresentada (11%) foi maior do que no carrapato *H. longicornis* na China (<10%), mas menor do que encontrada nos ixodídeos dos gêneros *Ixodes* (92.3%), *Hyalomma* (80,5%) e *Rhipicephalus* (35.7%) (SESMERO-GARCÍA; CABANERO-NAVALON; GARCIA-BUSTOS, 2023). Amostras de *Amblyomma* spp. apresentaram taxa infecção de 46% na Tailândia (SUMRANDEE *et al.*, 2014), 70-75% nos EUA (KUMAR *et al.*, 2022) e 100% no México por FLE (MUNÓZ-GARCÍA *et al.*, 2023). No Brasil, uma amostra de *A. dubitatum* foi positiva para o gene 16S de *Francisella* (MACHADO-FERREIRA *et al.*, 2009) e essa bactéria foi predominante na fauna bacteriana de *A. aureolatum* (DALL'AGNOL *et al.*, 2021).

A presença da bactéria patogênica para peixes *Francisella orientalis* não foi reportada anteriormente em carrapatos. *F. orientalis* é uma bactéria gram-negativa intracelular facultativa que afeta animais aquáticos de água quente, principalmente a tilápia (CHANG *et al.*, 2021).

Apesar de não parecer existir uma relação óbvia entre esta bactéria e *A. sculptum*, uma hipótese poderia ser a contaminação de lagos e rios com *F. orientalis* (COLQUHOUN, DUODU, 2011), mesmos ambientes habitados por capivaras. Contudo, este achado precisa de uma investigação mais detalhada, pois os fragmentos do gene 16S aqui amplificados são pequenos e podem não ser suficientes para identificar corretamente a espécie de FLE.

A suposição de que a colonização de RLE pudesse diminuir a capacidade do carrapato de suportar a presença de *Wolbachia* (BOBO, 2020), uma vez que ambas podem interferir na reprodução de seus hospedeiros artrópodes (GIORGINI *et al.*, 2010), não é sustentada pelos resultados obtidos nesse trabalho. Como nenhuma amostra foi positiva para *Rickettsia* spp., esta não parece ser uma justificativa plausível para a baixa ocorrência de *Wolbachia* em *A. sculptum*. No entanto isso pode ser preocupante, pois evidências mostram que RLE podem diminuir a transmissão transtadial de *R. rickettsii* no carrapato (LEVIN, SCHUMACHER, SNELLGROVE, 2018) e possuem genes antimicrobianos, sendo capazes de inibir o crescimento de *Rickettsia monacensis* e *Rickettsia parkeri* em células de carrapato (CULL *et al.*, 2022). Assim, a ausência de RLE nas amostras deste trabalho sugere que a população de *A. sculptum* de Campinas e Jundiáí pode estar mais susceptível a adquirir e transmitir riquetsias patogênicas.

A *Wolbachia* de cigarrinhas e do percevejo *Cimex lectularius* expressam genes necessários para vias biossintetizantes da biotina (vitamina B7) e riboflavina (vitamina B2) (JU *et al.*, 2019), assim como as FLE de carrapatos (BUYSSE *et al.*, 2022). A RLE reportada por Hunter *et al.* (2015) no carrapato *Ixodes pacificus* possui genes ortólogos aos envolvidos na biossíntese do folato (vitamina B9). Enquanto o genoma completo da bactéria *Coxiella* endossimbionte de *Amblyomma sculptum* (GCA_009883795.1) conta com a anotação de mais genes que estão envolvidos na via metabólica de produção da vitamina B (folA, folB, folC, folD, folK e folP), além disso as CLE de carrapato possuem outros genes para produção de outras vitaminas do complexo B e de cofatores importantes (vitaminas B1, B2, B3, B5, B6, B7, B9, FAD, CoA e NADH⁺), mostrando ser suficiente para suprir a necessidade nutricional de *A. sculptum* (GOTTLIEB, LALZAR, KLASSON, 2015). Dessa forma, a alta taxa de colonização de *A. sculptum* por CLE que possui vias biossintetizantes completas para produção de nutrientes essenciais, parece ser uma hipótese considerável para baixa ocorrência de *Wolbachia* e outras endossimbiontes nesse carrapato.

Adicionalmente, Binetruy *et al.* (2020) notou a ausência de CLE e FLE e outras bactérias em apenas um espécime de *Amblyomma romitii*, que estava contaminado com a

bactéria *Ehrlichia* sp., sugerindo que esse microorganismo pode mascarar a presença de outras bactérias, abrindo um caminho para investigação nas amostras negativas para qualquer endossimbionte deste trabalho.

No geral, as populações do carrapato *A. sculptum* de Campinas e Jundiaí não são hospedeiras de *Wolbachia*. Este resultado, obtido a partir de triagem e identificação de amostras positivas, é muito importante para o desenvolvimento de tecnologias de manejo de carrapatos que utilizem a *Wolbachia* como agente de controle biológico. A presença de *Wolbachia* de ocorrência natural em uma população-alvo, pode prejudicar estratégias que tenham como objetivo a substituição da população ou supressão de patógenos (ATEUTCHIA-NGOUANET *et al.*, 2024). Assim, agora sabe-se que não há impedimentos - relacionados a pré-existência da *Wolbachia* em *A. sculptum* - para introdução de cepas de *Wolbachia* de interesse no biocontrole neste ixodídeo.

7 CONCLUSÃO

Este trabalho detectou a presença da bactéria endossimbionte *Wolbachia* em amostras do carrapato *A. sculptum* coletadas nos municípios paulistas de Campinas e Jundiaí e as cepas da bactéria foram identificadas através do gene 16S rRNA. Para isso, foi estabelecido uma extração de DNA de carrapatos adultos da espécie *A. sculptum* eficiente e econômica, capaz de amplificar vários alvos presentes no metagenoma das amostras, sendo 86% mais econômica que a extração de DNA com kits comerciais. Foi observado a presença do DNA de nematoides filariais em grande parte dos carrapatos extraídos, inclusive nas amostras *Wolbachia*-positivas, além da ausência do DNA da vespa parasitoide *I. hookeri* em amostras positivas para *Wolbachia*. Também foi detectada a presença do DNA das bactérias endossimbiontes *Coxiella* spp. e *Francisella* spp. em várias amostras, mas a coinfeção com *Wolbachia* não foi estatisticamente significativa e não foi observado a presença da bactéria endossimbionte *Rickettsia* spp. em nenhuma amostra.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADEGOKE, A.; KUMAR, D.; BOBO, C.; RASHID, M. I.; DURRANI, A. Z.; SAJID, M. S.; KARIM, S. Tick-Borne Pathogens Shape the Native Microbiome Within Tick Vectors. *Microorganisms*, v. 8, n. 9, p. 1299, 2020. <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms8091299>
2. ALHO, C. J.R.; RONDON, N. L. Habitats, population densities, and social structure of capybaras (*Hydrochaeris Hydrochaeris*, Rodentia) in the Pantanal, Brazil. *Revista Brasileira de Zoologia*, v. 4, n. 2, p. 139-149, 1987. <http://dx.doi.org/10.1590/s0101-81751987000200006>
3. ALMEIDA, A. P.; MARCILI, A.; LEITE, R. C.; NIERI-BASTOS, F. A.; DOMINGUES, L. N.; MARTINS, J. R.; LABRUNA, M. B. Coxiella symbiont in the tick *Ornithodoros rostratus* (Acari: argasidae). *Ticks And Tick-Borne Diseases*, [S.L.], v. 3, n. 4, p. 203-206, set. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2012.02.003>.
4. ANDREOTTI, R.; GARCIA, M. V.; PAIVA, F. Carrapatos com importância em Saúde Única e produção animal no Brasil. 1. ed. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte. 2021. 38 p.
5. ANDREOTTI, R.; KOLLER, W. W.; GARCIA, M. V.. Carrapatos: protocolos e técnicas para estudo. Brasília: Embrapa, 2016. 240 p.
6. ANDREOTTI, R.; LEÓN, A. A. P.; DOWD, S.; GUERRERO, F. D.; BENDELE, K. G; SCOLES, G. A. Assessment of bacterial diversity in the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* through tag-encoded pyrosequencing. *Bmc Microbiology*, v. 11, n. 1, 2011. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2180-11-6>
7. ARTHAN, W.; SUMRANDEE, C.; HIRUNKANOKPUN, S.; KITTHAWEE, S.; BAIMAI, V.; TRINACHARTVANIT, W.; AHANTARIG, A. Detection of Coxiella-like endosymbiont in *Haemaphysalis* tick in Thailand. *Ticks And Tick-Borne Diseases*, [S.L.], v. 6, n. 1, p. 63-68, fev. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2014.09.005>.
8. ATEUTCHIA-NGOUANET, S.; NANFACK-MINKEU, F.; MAVRIDIS, K.; WANJI, S.; DEMANOU, M.; VONTAS, J.; DJOUAKA, R.. Monitoring *Aedes* populations for arboviruses, *Wolbachia*, insecticide resistance and its mechanisms in various agroecosystems in Benin. *Acta Tropica*, [S.L.], v. 253, p. 107178-0, maio 2024. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2024.107178>.

9. BAIÃO, G. C.; JANICE, J.; GALINOU, M.; KLASSON, L.. Comparative Genomics Reveals Factors Associated with Phenotypic Expression of Wolbachia. *Genome Biology And Evolution*, v. 13, n. 7, p. evab111, 2021. <http://dx.doi.org/10.1093/gbe/evab111>
10. BALDO, L.; HOTOPP, J. C. D.; JOLLEY, K. A.; BORDENSTEIN, S. R.; BIBER, S. A.; CHOUDHURY, R. R.; HAYASHI, C.; MAIDEN, M. C. J.; TETTELIN, H.; WERREN, J. H. Multilocus Sequence Typing System for the Endosymbiont Wolbachia pipientis. *Applied And Environmental Microbiology*, v. 72, n. 11, p. 7098-7110, 2006. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.00731-06>
11. BANDI, C.; ANDERSON, T. J. C.; GENCHI, C.; BLAXTER, M. L. Phylogeny of Wolbachia in filarial nematodes. *Proceedings Of The Royal Society Of London. Series B: Biological Sciences*, v. 265, n. 1413, p. 2407-2413, 1998. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.1998.0591>
12. BARROS-SILVA, P. M. R.; PEREIRA, S. V. C.; FONSECA, L. X.; MANIGLIA, F. V. P.; OLIVEIRA, S. V.; CALDAS, E. P. Febre maculosa: Uma análise epidemiológica dos registros do sistema de vigilância do Brasil. *Scientia Plena*, v. 10, n. 4(a), 2014.
13. BENSON, M. J.; GAWRONSKI, J. D.; EVELEIGH, D. E.; BENSON, D. R. Intracellular Symbionts and Other Bacteria Associated with Deer Ticks (*Ixodes scapularis*) from Nantucket and Wellfleet, Cape Cod, Massachusetts. *Applied And Environmental Microbiology*, v. 70, n. 1, p. 616-620, 2004. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.70.1.616-620.2004>
14. BI, J.; WANG, Y. F. The effect of the endosymbiont Wolbachia on the behavior of insect hosts. *Insect Science*, v. 27, n. 5, p. 846-858, 2019. <http://dx.doi.org/10.1111/1744-7917.12731>
15. BI, J.; WANG, Y. The effect of the endosymbiont Wolbachia on the behavior of insect hosts. *Insect Science*, v. 27, n. 5, p. 846-858, 2019. <http://dx.doi.org/10.1111/1744-7917.1273>
16. BINDER, L. C.; RAMÍREZ-HERNÁNDEZ, A.; SERPA, M. C. A.; PINTER, A.; SOUZA, C. E.; LABRUNA, M. B. Long-term persistence of anti-Rickettsia rickettsii antibodies in capybaras, with passive transfer to offspring. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 31, n. 3, 2022. <http://dx.doi.org/10.1590/s1984-29612022052>
17. BINETRUY, F.; BUYSSE, M.; LEJARRE, Q.; BAROSI, R.; VILLA, M.; RAHOLA, N.; PAUPY, C.; AYALA, D.; DURON, O. Microbial community structure reveals instability

- of nutritional symbiosis during the evolutionary radiation of *Amblyomma* ticks. *Molecular Ecology*, v. 29, n. 5, p. 1016-1029, 2020. <http://dx.doi.org/10.1111/mec.15373>
18. BINETRUY, F.; DURON, O. Molecular detection of *Cercopithifilaria*, *Cruorifilaria* and *Dipetalonema*-like filarial nematodes in ticks of French Guiana. *Parasite*, v. 30, p. 24, 2023. <http://dx.doi.org/10.1051/parasite/2023027>
 19. BING, X. L.; XIA, W. Q.; GUI, J. D.; YAN, G. H.; WANG, X. W.; LIU, S. S. Diversity and evolution of the *Wolbachia* endosymbionts of *Bemisia* (Hemiptera: aleyrodidae) whiteflies. *Ecology And Evolution*, v. 4, n. 13, p. 2714-2737, 2014. <http://dx.doi.org/10.1002/ece3.1126>
 20. BITENCOURTH, K.; AMORIM, M.; OLIVEIRA, S. V. de; CAETANO, R. L.; VOLOCH, C. M.; GAZÊTA, G. S.. *Amblyomma sculptum*: genetic diversity and rickettsias in the brazilian cerrado biome. *Medical And Veterinary Entomology*, v. 31, n. 4, p. 427-437, 28 jul. 2017. <http://dx.doi.org/10.1111/mve.12249>
 21. BOBO, C.G. Molecular Characterization of *Wolbachia* and Its Impact on the Microbiome of Exotic and United States Ticks. Honors Theses, 2020. p. 54.
 22. BOHACSOVA, M.; MEDIANNIKOV, O.; KAZIMIROVA, M.; RAOULT, D.; SEKEYOVA, Z. *Arsenophonus nasoniae* and *Rickettsiae* Infection of *Ixodes ricinus* Due to Parasitic Wasp *Ixodiphagus hookeri*. *Plos One*, [S.L.], v. 11, n. 2, p. 0149950-0, 22 fev. 2016. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0149950>.
 23. BONNET, S. I.; POLLET, T. Update on the intricate tango between tick microbiomes and tick-borne pathogens. *Parasite Immunology*, [S.L.], v. 43, n. 5, 20 dez. 2020. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/pim.12813>
 24. BORDENSTEIN, S.; ROSENGAUS, R. B. Discovery of a Novel *Wolbachia* Supergroup in Isoptera. *Current Microbiology*, v. 51, n. 6, p. 393-398, 2005. <http://dx.doi.org/10.1007/s00284-005-0084-0>
 25. BORGES, D. A. Fluazuron no Controle do Carrapato *Amblyomma sculptum*: Eficácia, Farmacocinética e Palatabilidade Utilizando *Cavia porcellus* (Cobaio) Como Modelo Experimental. 2023. 131 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Veterinárias, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2023.
 26. BORGES, D. A.; CID, Y. P.; AVELAR, B. R.; FERREIRA, T. P.; CAMPOS, D. R.; SANTOS, G. C. M.; ALVES, M. C. C.; SCOTT, F. B. In vitro acaricidal activity of different ectoparasiticide classes against *Amblyomma sculptum* larvae. *Revista Brasileira de*

- Parasitologia Veterinária, v. 29, n. 3, p. e003020, 2020. <http://dx.doi.org/10.1590/s1984-29612020052>
27. BRASIL. Ministério da Saúde/SVS - Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net. 2023. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/febremaculosasp.def>. Acesso em: 08 de agosto de 2023.
 28. BRASIL. Ministério da Saúde/SVS. Óbitos confirmados de febre maculosa. Brasil, Regiões e Unidades Federadas (Infecção) - 2007-2024, 2024. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/f/febre-maculosa/situacao-epidemiologica/obitos-confirmados-de-febre-maculosa-brasil-regioes-e-unidades-federadas-infeccao-2007-2023/view>. Acesso em 27 de março de 2024.
 29. BRITES-NETO, J.; BRASIL, J.; TAKEDA, G.A.C.G.; GUILLEN, A.C.; LABRUNA, M.B.; PINTER, A. Diferenciação morfométrica entre larvas de *Amblyomma sculptum* Berlese, 1888 e *Amblyomma dubitatum* Neumann, 1899. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 70, n. 5, p. 1521-1528, 2018. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4162-9774>
 30. BUYSSE, M.; BINETRUY, F.; LEIBSON, R.; GOTTLIEB, Y.; DURON, O. Ecological Contacts and Host Specificity Promote Replacement of Nutritional Endosymbionts in Ticks. *Microbial Ecology*, [S.L.], v. 83, n. 3, p. 776-788, 8 jul. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00248-021-01773-0>.
 31. BUYSSE, M.; DURON, O. Evidence that microbes identified as tick-borne pathogens are nutritional endosymbionts. *Cell*, [S.L.], v. 184, n. 9, p. 2259-2260, abr. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2021.03.053>.
 32. CARAGATA, E. P.; DUTRA, H. L.C.; SUCUPIRA, P. H.F.; FERREIRA, A. G.A.; MOREIRA, L. A. Wolbachia as translational science: controlling mosquito-borne pathogens. *Trends In Parasitology*, v. 37, n. 12, p. 1050-1067, 2021. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2021.06.007>
 33. CARAGATA, E.; DUTRA, H.; MOREIRA, L. Inhibition of Zika virus by Wolbachia in *Aedes aegypti*. *Microbial Cell*, v. 3, n. 7, p. 293-295, 2016. <http://dx.doi.org/10.15698/mic2016.07.513>
 34. CARPI, G.; CAGNACCI, F.; WITTEKINDT, N. E.; ZHAO, F.; QI, J.; TOMSHO, L. P.; DRAUTZ, D. I.; RIZZOLI, A.; SCHUSTER, S. C. Metagenomic Profile of the Bacterial

- Communities Associated with *Ixodes ricinus* Ticks. *Plos One*, v. 6, n. 10, p. e25604, 2011. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0025604>
35. CASIRAGHI, M.; BAIN, O.; GUERRERO, R.; MARTIN, C.; POCACQUA, V.; GARDNER, S. L.; FRANCESCHI, A.; BANDI, C. Mapping the presence of *Wolbachia pipientis* on the phylogeny of filarial nematodes: evidence for symbiont loss during evolution. *International Journal For Parasitology*, v. 34, n. 2, p. 191-203, 2004. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2003.10.004>
36. CASIRAGHI, M.; BORDENSTEIN, S. R.; BALDO, L.; LO, N.; BENINATI, T.; WERNEGREEN, J. J.; WERREN, J. H.; BANDI, C.. Phylogeny of *Wolbachia pipientis* based on *gltA*, *groEL* and *ftsZ* gene sequences: clustering of arthropod and nematode symbionts in the f supergroup, and evidence for further diversity in the wolbachia tree. *Microbiology*, v. 151, n. 12, p. 4015-4022, 2005. <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.28313-0>
37. CHANG, C. H.; POUDYAL, S.; PULPIPAT, T.; WANG, P. C.; CHEN, S. C. Pathological Manifestations of *Francisella orientalis* in the Green Texas Cichlid (*Herichthys cyanoguttatus*). *Animals*, [S.L.], v. 11, n. 8, p. 2284, 3 ago. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ani11082284>.
38. CHAO, L. L.; CASTILLO, C. T.; SHIH, C. M. Molecular detection and genetic identification of *Wolbachia* endosymbiont in *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: ixodidae) ticks of taiwan. *Experimental And Applied Acarology*, v. 83, n. 1, p. 115-130, 2020. <http://dx.doi.org/10.1007/s10493-020-00574-3>
39. CHAUDHARI, S. The Inhibitors Haunting Your PCR. 2017. Disponível em: <https://bitesizebio.com/35727/inhibitors-haunting-pcr/>. Acesso em: 25 mar. 2024.
40. CHISU, V.; MURA, L.; FOXI, C.; MASALA, G. Coxiellaceae in Ticks from Human, Domestic and Wild Hosts from Sardinia, Italy: high diversity of coxiella-like endosymbionts. *Acta Parasitologica*, [S.L.], v. 66, n. 2, p. 654-663, 25 jan. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11686-020-00324-w>.
41. CHOMCZYNSKI, P.; MACKEY, K.; DREWS, R.; WILFINGER, W. DNAzol®: a reagent for the rapid isolation of genomic dna. *Biotechniques*, [S.L.], v. 22, n. 3, p. 550-553, mar. 1997. Future Science Ltd. <http://dx.doi.org/10.2144/97223pf01>.
42. COLQUHOUN, D. J.; DUODU, S. *Francisella* infections in farmed and wild aquatic organisms. *Veterinary Research*, [S.L.], v. 42, n. 1, p. 47-0, 2011. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/1297-9716-42-47>.

43. COSTA-LIMA, A. The Chalcid, *Hunterellus hookeri*, Howard, a parasite of the tick *Rhipicephalus sanguineus*, Latreille, observed in Rio de Janeiro. *Rev. Vet. Zootechnia*, v. 5, n. 4, p. 201-203, 1915.
44. COTES-PERDOMO, A. P.; OVIEDO, Á.; CASTRO, L. R. Molecular detection of pathogens in ticks associated with domestic animals from the Colombian Caribbean region. *Experimental And Applied Acarology*, [S.L.], v. 82, n. 1, p. 137-150, 18 ago. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10493-020-00531-0>.
45. CRAWFORD, J. E. et al. Efficient production of male *Wolbachia*-infected *Aedes aegypti* mosquitoes enables large-scale suppression of wild populations. *Nature Biotechnology*, v. 38, n. 4, p. 482-492, 2020. and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41587-020-0471-x>
46. CRUZ, C. B. ASPECTOS ECOLÓGICOS, BIOLÓGICOS E DE RESISTÊNCIA DE *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) NA REGIÃO DE JABOTICABAL, SÃO PAULO, BRASIL. Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista (UNESP), São Paulo, 2017.
47. CUETO, G. R. Diseases of Capybara. In: MOREIRA, J. R. Capybara. Nova York: Springer, 2012. 169-184 p.
48. CULL, B.; BURKHARDT, N. Y.; WANG, X. R.; THORPE, C. J.; OLIVER, J. D.; KURTTI, T. J.; MUNDERLOH, U. G. The *Ixodes scapularis* Symbiont *Rickettsia buchneri* Inhibits Growth of Pathogenic *Rickettsiaceae* in Tick Cells: implications for vector competence. *Frontiers In Veterinary Science*, [S.L.], v. 8, p. 0-0, 6 jan. 2022. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fvets.2021.748427>.
49. CZARNETZKI, A. B.; TEBBE, Christoph C. Detection and phylogenetic analysis of *Wolbachia* in *Collembola*. *Environmental Microbiology*, v. 6, n. 1, p. 35-44, 2003. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1462-2920.2003.00537.x>
50. D'ALESSANDRO, W. B.; HUMBER, R. A.; LUZ, C. Occurrence of pathogenic fungi to *Amblyomma cajennense* in a rural area of Central Brazil and their activities against vectors of Rocky Mountain spotted fever. *Veterinary Parasitology*, v. 188, n. 1-2, p. 156-159, 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.02.016>.
51. DALL'AGNOL, B.; MCCULLOCH, J. A.; MAYER, F. Q.; SOUZA, U.; WEBSTER, A.; ANTUNES, P.; DOYLE, R. L.; RECK, J.; FERREIRA, C. A. S. Molecular characterization of bacterial communities of two neotropical tick species (*Amblyomma aureolatum* and

- Ornithodoros brasiliensis) using rDNA 16S sequencing. Ticks And Tick-Borne Diseases, v. 12, n. 5, p. 101746, 2021. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2021.101746>
52. DANTAS-TORRES, F. Rocky Mountain spotted fever. The Lancet Infectious Diseases, v. 7, n. 11, p. 724-732, 2007. [http://dx.doi.org/10.1016/s1473-3099\(07\)70261-x](http://dx.doi.org/10.1016/s1473-3099(07)70261-x)
53. DANTAS-TORRES, F.; MARTINS, T. F.; MUÑOZ-LEAL, S.; ONOFRIO, V. C.; BARROS-BATTESTI, D. M. Ticks (Ixodida: Argasidae, Ixodidae) of Brazil: Updated species checklist and taxonomic keys. Ticks And Tick-Borne Diseases, v. 10, n. 6, p. 101252-0, 2019. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.06.012>
54. DIAS, T. C.; STABACH, J. A.; HUANG, Q.; LABRUNA, M. B.; LEIMGRUBER, P.; FERRAZ, K. M. P. M. B.; LOPES, B.; LUZ, H. R.; COSTA, F. B.; BENATTI, H. R. Habitat selection in natural and human-modified landscapes by capybaras (Hydrochoerus hydrochaeris), an important host for Amblyomma sculptum ticks. Plos One, v. 15, n. 8, p. e0229277, 2020. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0229277>
55. DOUDOUMIS, V. et al. Detection and characterization of Wolbachia infections in laboratory and natural populations of different species of tsetse flies (genus Glossina). BMC Microbiol. v. 12, n. 1., p. 1-31, 2012.
56. DRISCOLL, T. P.; VERHOEVE, V. I.; BROCKWAY, C.; SHREWSBERRY, D. L.; PLUMER, M.; SEVDALIS, S. E.; BECKMANN, J. F.; KRUEGER, L. M.; MACALUSO, K. R.; AZAD, A. F. Evolution of Wolbachia mutualism and reproductive parasitism: insight from two novel strains that co-infect cat fleas. Peerj, v. 8, n. 0, p. e10646, 2020. <http://dx.doi.org/10.7717/peerj.10646>
57. ENRÍQUEZ, S.; GUERRERO, R.; ARRIVILLAGA-HENRÍQUEZ, J.; ARAUJO, P.; VILLACRÉS, E.; ENRÍQUEZ, A.; BENÍTEZ-ORTÍZ, W. New Records of Ticks of Genus Amblyomma Koch, 1844 (Acari: ixodidae) for Ecuador. Acta Parasitologica, v. 65, n. 2, p. 430-440, 2020. <http://dx.doi.org/10.2478/s11686-020-00173-7>
58. FAGUNDES-MOREIRA, R.; SOUZA, U. A.; MAY-JUNIOR, J. A.; BAGGIO-SOUZA, V.; BERGER, L.; WAGNER, P. G. C.; MAZIM, Fabio Dias; PETERS, F. B.; FAVARINI, M. O.; TORTATO, M. A. Epidemiological compatibility of Amblyomma sculptum as possible vector and Panthera onca as reservoir of Cytauxzoon spp. in Midwestern Brazil. Ticks And Tick-Borne Diseases, v. 13, n. 6, p. 102021, 2022. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2022.102021>

59. FANG, R.; BLANTON, L. S.; WALKER, D. H. Rickettsiae as Emerging Infectious Agents. *Clinics In Laboratory Medicine*, v. 37, n. 2, p. 383-400, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cll.2017.01.009>
60. FIOCRUZ. Nova parceria da Fiocruz com WMP vai auxiliar no controle de arboviroses. 2023. Disponível em: <https://agencia.fiocruz.br/nova-parceria-da-fiocruz-e-wmp-vai-auxiliar-no-controle-de-arboviroses>. Acesso em: 26 set. 2023
61. FIORINI, L. C.; CRAVEIRO, A. B.; MENDES, M. C.; CHIESORIN NETO, L.; SILVEIRA, R. da. Morphological and molecular identification of ticks infesting *Boa constrictor* (Squamata, Boidae) in Manaus (Central Brazilian Amazon). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, [S.L.], v. 23, n. 4, p. 539-542, dez. 2014. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1984-29612014084>.
62. FONTES, E. M. G.; VALADARES-INGLIS, M. C. (ed). *Controle biológico de pragas da agricultura*. Brasília: Embrapa, 2020. 1-514 p.
63. FRYDMAN, H. M.; LI, J. M.; ROBSON, D. N.; WIESCHAUS, E. Somatic stem cell niche tropism in *Wolbachia*. *Nature*, v. 441, n. 7092, p. 509-512, 2006. <http://dx.doi.org/10.1038/nature04756>
64. GERTH, M.; BLEIDORN, C. Comparative genomics provides a timeframe for *Wolbachia* evolution and exposes a recent biotin synthesis operon transfer. *Nature Microbiology*, v. 2, n. 3, p. 16241, 2016. <http://dx.doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.241>
65. GIORGINI, M.; BERNARDO, U.; MONTI, M. M.; NAPPO, A. G.; GEBIOLA, M. *Rickettsia* Symbionts Cause Parthenogenetic Reproduction in the Parasitoid Wasp *Pnigalio soemius* (Hymenoptera: eulophidae). *Applied And Environmental Microbiology*, [S.L.], v. 76, n. 8, p. 2589-2599, 2010. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.03154-09>
66. GIORGINI, M.; BERNARDO, U.; MONTI, M. M.; NAPPO, A. G.; GEBIOLA, M.. *Rickettsia* Symbionts Cause Parthenogenetic Reproduction in the Parasitoid Wasp *Pnigalio soemius* (Hymenoptera: eulophidae). *Applied And Environmental Microbiology*, [S.L.], v. 76, n. 8, p. 2589-2599, 15 abr. 2010. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.03154-09>.
67. GLOWSKA, E.; DRAGUN-DAMIAN, A.; DABERT, M.; GERTH, M. New *Wolbachia* supergroups detected in quill mites (Acari: syringophilidae). *Infection, Genetics And Evolution*, v. 30, p. 140-146, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2014.12.019>

68. GONG, J. T.; LI, T. P.; WANG, M. K.; HONG, X. Y. Wolbachia-based strategies for control of agricultural pests. *Current Opinion In Insect Science*, v. 57, p. 101039, 2023. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cois.2023.101039>
69. GONG, J. T.; LI, Y.; LI, T. P.; LIANG, Y.; HU, L.; ZHANG, D.; ZHOU, C. Y.; YANG, C.; ZHANG, X.; ZHA, S. S. Stable Introduction of Plant-Virus-Inhibiting Wolbachia into Planthoppers for Rice Protection. *Current Biology*, v. 30, n. 24, p. 4837-4845e5, 2020. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2020.09.033>
70. GORHAM, C. H.; FANG, Q. Q.; DURDEN, L. A. WOLBACHIA ENDOSYMBIONTS IN FLEAS (SIPHONAPTERA). *Journal Of Parasitology*, v. 89, n. 2, p. 283-289, 2003. [http://dx.doi.org/10.1645/0022-3395\(2003\)089\[0283:weifs\]2.0.co;2](http://dx.doi.org/10.1645/0022-3395(2003)089[0283:weifs]2.0.co;2)
71. GOTTLIEB, Y.; LALZAR, I.; KLASSON, L. Distinctive Genome Reduction Rates Revealed by Genomic Analyses of TwoCoxiella-Like Endosymbionts in Ticks. *Genome Biology And Evolution*, [S.L.], v. 7, n. 6, p. 1779-1796, 28 maio 2015. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/gbe/evv108>
72. GRAY, J. S. A carbon dioxide trap for prolonged sampling of *Ixodes ricinus* L. populations. *Experimental and Applied Acarology*, v. 1, p. 35-44., 1995.
73. GREAY, T. L.; GOFTON, A. W.; PAPANINI, A.; RYAN, U. M.; OSKAM, C. L.; IRWIN, P. J. Recent insights into the tick microbiome gained through next-generation sequencing. *Parasites & Vectors*, [S.L.], v. 11, n. 1, 4 jan. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-017-2550-5>.
74. GRECA, H.; LANGONI, H.; SOUZA, L.C. Brazilian spotted fever: a reemergent zoonosis. *Journal Of Venomous Animals And Toxins Including Tropical Diseases*, v. 14, n. 1, 2008. <http://dx.doi.org/10.1590/s1678-91992008000100002>
75. GROSTIETA, E.; ZAZUETA-ISLAS, H. M.; CRUZ-VALDEZ, T.; BALLADOS-GONZÁLEZ, G. G.; ÁLVAREZ-CASTILLO, L.; GARCÍA-ESPARZA, S. M.; CRUZ-ROMERO, A.; ROMERO-SALAS, D.; AGUILAR-DOMÍNGUEZ, M.; BECKER, I. Molecular detection of Coxiella-like endosymbionts and absence of *Coxiella burnetii* in *Amblyomma mixtum* from Veracruz, Mexico. *Experimental And Applied Acarology*, [S.L.], v. 88, n. 1, p. 113-125, set. 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10493-022-00748-1>.
76. GUGLIELMONE, A. A.; ROBBINS, R. G. Hard Ticks (Acari: Ixodida: Ixodidae) Parasitizing Humans: A Global Overview. 1. ed. Cham: Springer, 2018. p. 1-314.

77. 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*, v. 2528, n. 1, p. 1-0, 2010. <http://dx.doi.org/10.11646/zootaxa.2528.1.1>
78. GUIMARÃES, J.H.; TUCCI, E.C.; BARROS-BATTESTI, D.M. Ectoparasitas de Importância Veterinária. São Paulo: Editora Plêiade/FAPESP, 2001, 52-104 p.
79. GUIMARÃES, M. V. WOLBACHIA: CARACTERÍSTICAS GERAIS, INTERFERÊNCIAS NA REPRODUÇÃO DE ARTRÓPODES E SUA UTILIZAÇÃO CONTRA O DENGUE VÍRUS. 2017. 42 f. Monografia (Especialização) - Curso de Microbiologia Aplicada, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2017.
80. HAEGEMAN, A.; VANHOLME, B.; JACOB, J.; VANDEKERCKHOVE, T. T. M.; CLAEYS, M.; BORGONIE, G.; GHEYSEN, G. An endosymbiotic bacterium in a plant-parasitic nematode: member of a new wolbachia supergroup. *International Journal For Parasitology*, v. 39, n. 9, p. 1045-1054, 2009. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.01.006>
81. HALOS, L.; JAMAL, T.; VIAL, L.; MAILLARD, R.; SUAOU, A.; LE MENACH, A.; BOULOUIS, H. J.; VAYSSIER-TAUSSAT, M. Determination of an efficient and reliable method for DNA extraction from ticks. *Vet. Res.*, v. 35, p. 709–713, 2004.
82. HARTELT, K.; OEHME, R.; FRANK, H.; BROCKMANN, S. O.; HASSLER, D.; KIMMIG, P. Pathogens and symbionts in ticks: prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* (Ehrlichia sp.), *Wolbachia* sp., *Rickettsia* sp., and *Babesia* sp. in southern Germany. *International Journal Of Medical Microbiology Supplements*, v. 293, p. 86-92, 2004. [http://dx.doi.org/10.1016/s1433-1128\(04\)80013-5](http://dx.doi.org/10.1016/s1433-1128(04)80013-5)
83. HELELOVITCH, S. Genetic determinism of sterility in the cross-breeding of various strains of *Culex autogenicus* Roubaud. *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences*, v. 234, n. 24, p. 2386–8, 1952.
84. HERTIG, M. The rickettsia, *Wolbachia pipientis* (gen. et sp. n.) and associated inclusions of the mosquito, *Culex pipiens*. *Parasitol*, v. 28, nº 4, p. 453-486, 1936. <http://dx.doi.org/10.1017/s0031182000022666>
85. HERTIG, M.; WOLBACH, S. B. Studies on Rickettsia-Like Micro-Organisms in Insects. *J. Med. Res.*, v. 44, n. 3, p. 329-374.7, 1924.
86. HILL, C. A.; GUTIERREZ, A. A method for extraction and analysis of high quality genomic DNA from ixodid ticks. *Medical and Veterinary Entomology*, v. 17, p. 224–227, 2003.

87. HIRUNKANOKPUN, S.; AHANTARIG, A.; BAIMAI, V.; TRINACHARTVANIT, W..
A new record of *Wolbachia* in the elephant ticks from Thailand. *Scienceasia*, v. 44, n. 1, p. 44, 2018. <http://dx.doi.org/10.2306/scienceasia1513-1874.2018.44s.044>
88. Hirunkanokpun, S; Ahantarig, A.; Baimai, V.; Pramual, P.; Trinachartvanit, W. A new record of *Rickettsia japonica* in ticks infesting a Burmese ferret-badger in Thailand. *Tropical Biomedicine*, [S.L.], v. 39, n. 1, p. 55-59, 31 mar. 2022. Malaysian Society of Parasitology and Tropical Medicine. <http://dx.doi.org/10.47665/tb.39.1.007>.
89. HOFFMANN, A. *Wolbachia*. *Current Biology*, v. 30, n. 19, p. R1113-R1114, 2020. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2020.08.039>
90. HORAK, I. G.; HEYNE, H.; WILLIAMS, R.; GALLIVAN, G. J.; SPICKETT, A. M.; BEZUIDENHOUT, J. D.; ESTRADA-PENÑA, A. (ed.) *The Ixodid Ticks (Acari: Ixodidae) of Southern Africa: The Genus Amblyomma Koch, 1844*. Cham: Springer, 2018. 67–140 p.
91. HSIEH, C.Y.; WU, Z.B.; TUNG, M.C.; TSAI, S.S. PCR and in situ hybridization for the detection and localization of a new pathogen *Francisella*-like bacterium (FLB) in ornamental cichlids. *Diseases Of Aquatic Organisms*, [S.L.], v. 75, p. 29-36, 29 mar. 2007. Inter-Research Science Center. <http://dx.doi.org/10.3354/dao075029>.
92. HUANG, F.; SRISUKA, W.; AUPALEE, K.; STREIT, A.; FUKUDA, M.; PITASAWAT, B.; JUNKUM, A.; SAINGAMSOOK, J.; SOMBOON, P.; TAKAOKA, H. Diversity of nematodes infecting the human-biting black fly species, *Simulium nigrogilvum* (Diptera: simuliidae) in central thailand. *Acta Tropica*, [S.L.], v. 224, p. 106140-0, dez. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2021.106140>.
93. HUNTER, D. J.; TORKELESON, J. L.; BODNAR, J.; MORTAZAVI, B.; LAURENT, T.; DEASON, J.; THEPHAVONGSA, K.; ZHONG, J. The *Rickettsia* Endosymbiont of *Ixodes pacificus* Contains All the Genes of De Novo Folate Biosynthesis. *Plos One*, [S.L.], v. 10, n. 12, p. 0144552-0, 9 dez. 2015. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0144552>.
94. HUSSAIN, S.; PERVEEN, N.; HUSSAIN, A.; SONG, B.; AZIZ, M. U.; ZEB, J.; LI, J.; GEORGE, Da.; CABEZAS-CRUZ, A.; SPARAGANO, O. The Symbiotic Continuum Within Ticks: opportunities for disease control. *Frontiers In Microbiology*, v. 13, 2022. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2022.854803>
95. IBAMA. Diretrizes referentes ao controle da capivara e o controle da Febre Maculosa Brasileira. 2008. Disponível em:

- [http://www.saude.campinas.sp.gov.br/saude/doencas/febremaculosa/Diretrizes_IBAMA_c
apivaras_e_FMB.pdf](http://www.saude.campinas.sp.gov.br/saude/doencas/febremaculosa/Diretrizes_IBAMA_c
apivaras_e_FMB.pdf). Acesso em: 14 de setembro de 2023.
96. IGOLKINA, Y.; NIKITIN, A.; VERZHUTSKAYA, Y.; GORDEYKO, N.; TIKUNOV, A.; EPIKHINA, T.; TIKUNOVA, N.; RAR, V. Multilocus genetic analysis indicates taxonomic status of “*Candidatus Rickettsia mendelii*” as a separate basal group. *Ticks And Tick-Borne Diseases*, v. 14, n. 2, p. 102104, 2023. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2022.102104>
97. INOKUMA, H.; RAOULT, D.; BROUQUI, P. Detection of *Ehrlichia platys* DNA in Brown Dog Ticks (*Rhipicephalus sanguineus*) in Okinawa Island, Japan. *Journal Of Clinical Microbiology*, v. 38, n. 11, p. 4219-4221, 2000. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.38.11.4219-4221.2000>
98. JOHNSTON, K. L.; COOK, D. A. N.; BERRY, N. G.; HONG, W. D.; CLARE, R. H.; GODDARD, M.; FORD, L.; NIXON, G. L.; O’NEILL, P. M.; WARD, S. A. Identification and prioritization of novel anti- *Wolbachia* chemotypes from screening a 10,000-compound diversity library. *Science Advances*, v. 3, n. 9, 2017. <http://dx.doi.org/10.1126/sciadv.aao1551>
99. JOUBERT, D. A.; WALKER, T.; CARRINGTON, L. B.; BRUYNE, Jyotika T.; KIEN, D. H. T.; HOANG, N. L. T.; CHAU, N. van V.; ITURBE-ORMAETXE, I.; SIMMONS, C. P.; O’NEILL, S. L. Establishment of a *Wolbachia* Superinfection in *Aedes aegypti* Mosquitoes as a Potential Approach for Future Resistance Management. *Plos Pathogens*, v. 12, n. 2, p. e1005434, 2016. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1005434>
100. JU, J. F.; BING, X. L.; ZHAO, D. S.; GUO, Y.; XI, Z.; A HOFFMANN, A.; ZHANG, K. J.; HUANG, H. J.; GONG, J. T.; ZHANG, X. *Wolbachia* supplement biotin and riboflavin to enhance reproduction in planthoppers. *The Isme Journal*, [S.L.], v. 14, n. 3, p. 676-687, 25 nov. 2019. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1038/s41396-019-0559-9>.
101. KAMBRIS, Z.; COOK, P. E.; PHUC, H. K.; SINKINS, S. P. Immune Activation by Life-Shortening *Wolbachia* and Reduced Filarial Competence in Mosquitoes. *Science*, v. 326, n. 5949, p. 134-136, 2009. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1177531>
102. KATZ, G.; NEVES, V. L. F. C.; ANGERAMI, R. N.; NASCIMENTO, E. M. M.; COLOMBO, S. Situação epidemiológica e importância da febre maculosa no Estado de São Paulo. *Bepa*, v. 6, n. 69, p. 4-13, 2009.
103. KAUR, R.; SHROPSHIRE, J. D.; CROSS, K. L.; LEIGH, B.; MANSUETO, A. J.; STEWART, V.; BORDENSTEIN, S. R.; BORDENSTEIN, S. R. Living in the

- endosymbiotic world of Wolbachia: a centennial review. *Cell Host & Microbe*, v. 29, n. 6, p. 879-893, 2021. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2021.03.006>
104. KHOO, J. J. et al. Isolation and Propagation of Laboratory Strains and a Novel Flea-Derived Field Strain of Wolbachia in Tick Cell Lines. *Microorganisms*, v. 8, n. 7, p. 988, 2020. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8070988>
105. KHOO, J. J.; CHEN, F.; KHO, K. L.; SHANIZZA, A. I. A.; LIM, F. S.; TAN, K.K.; CHANG, L. Y.; ABUBAKAR, S. Bacterial community in Haemaphysalis ticks of domesticated animals from the Orang Asli communities in Malaysia. *Ticks And Tick-Borne Diseases*, v. 7, n. 5, p. 929-937, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.04.013>
106. KOBAYASHI, T.; CHATANGA, E.; QIU, Y.; SIMUUNZA, M.; KAJIHARA, M.; HANG'OMBE, B. M.; ETO, Yoshiki; SAASA, Ngonda; MORI-KAJIHARA, Akina; SIMULUNDU, Edgar. Molecular Detection and Genotyping of Coxiella-Like Endosymbionts in Ticks Collected from Animals and Vegetation in Zambia. *Pathogens*, [S.L.], v. 10, n. 6, p. 779-0, 21 jun. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/pathogens10060779>.
107. KOCAN, K. M.; PIDHERNEY, M. S.; BLOUIN, E. F.; CLAYPOOL, P. L.; SAMISH, M.; GLAZER, I. Interaction of Entomopathogenic Nematodes (Steinernematidae) With Selected Species of Ixodid Ticks (Acari: ixodidae). *Journal Of Medical Entomology*, v. 35, n. 4, p. 514-520, 1998. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jmedent/35.4.514>
108. KRAWCZAK, F. S.; MARTINS, T. F.; OLIVEIRA, C. S.; BINDER, L. C.; COSTA, F. B.; NUNES, P. H.; GREGORI, F.; LABRUNA, M. B. *Amblyomma yucumense* n. sp. (Acari: ixodidae), a parasite of wild mammals in southern Brazil. *Journal Of Medical Entomology*, v. 52, n. 1, p. 28-37, 2015. <http://dx.doi.org/10.1093/jme/tju007>.
109. KUMAR, D.; SHARMA, S. R.; ADEGOKE, A.; KENNEDY, A.; TUTEN, H. C.; LI, A. Y.; KARIM, S. Recently Evolved Francisella-Like Endosymbiont Outcompetes an Ancient and Evolutionarily Associated Coxiella-Like Endosymbiont in the Lone Star Tick (*Amblyomma americanum*) Linked to the Alpha-Gal Syndrome. *Frontiers In Cellular And Infection Microbiology*, [S.L.], v. 12, p. 0-0, 12 abr. 2022. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fcimb.2022.787209>.
110. LABRUNA, M. B.; LEITE, R. C.; GOBESSO, A. A. O.; GENNARI, S. M.; KASAI, N. Controle estratégico do carrapato *Amblyomma cajennense* em equinos. *Ciência Rural*, v. 34, n. 1, p. 195-200, 2004. <http://dx.doi.org/10.1590/s0103-84782004000100030>

111. LABRUNA, M. B.; PACHECO, R. C.; ATALIBA, A. C.; SZABÓ, M. P. J. HUMAN PARASITISM BY THE CAPYBARA TICK, *AMBLIOMMA DUBITATUM* (ACARI: ixodidae). *Entomological News*, v. 118, n. 1, p. 77-80, 2007. [http://dx.doi.org/10.3157/0013-872x\(2007\)118\[77:hpbtct\]2.0.co;2](http://dx.doi.org/10.3157/0013-872x(2007)118[77:hpbtct]2.0.co;2)
112. LABRUNA, Marcelo B.. Ecology of Rickettsia in South America. *Annals Of The New York Academy Of Sciences*, v. 1166, n. 1, p. 156-166, 2009. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04516.x>
113. LAIDOUDI, Y.; LEVASSEUR, A.; MEDKOUR, H.; MAALOU, M.; KHEDHER, M. B.; SAMBOU, M.; BASSENE, H.; DAVOUST, B.; FENOLLAR, F.; RAOULT, D. An Earliest Endosymbiont, *Wolbachia massiliensis* sp. nov., Strain PL13 from the Bed Bug (*Cimex hemipterus*), Type Strain of a New Supergroup T. *International Journal Of Molecular Sciences*, v. 21, n. 21, p. 8064, 2020. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms21218064>
114. LANDMANN, F.; BAIN, O.; MARTIN, C.; UNI, S.; TAYLOR, M. J.; SULLIVAN, W. Both asymmetric mitotic segregation and cell-to-cell invasion are required for stable germline transmission of *Wolbachia* in filarial nematodes. *Biology Open*, v. 1, n. 6, p. 536-547, 2012. <http://dx.doi.org/10.1242/bio.2012737>
115. LANDMANN, Frédéric. The *Wolbachia* Endosymbionts. *Microbiology Spectrum*, v. 7, n. 2, 2019. <http://dx.doi.org/10.1128/microbiolspec.bai-0018-2019>
116. LAUKAITIS, H. J.; MACALUSO, K. R. Unpacking the intricacies of Rickettsia–vector interactions. *Trends In Parasitology*, v. 37, n. 8, p. 734-746, 2021. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2021.05.008>
117. LAVEN, H.. Eradication of *Culex pipiens fatigans* through Cytoplasmic Incompatibility. *Nature*, v. 216, n. 5113, p. 383-384, 1967. <http://dx.doi.org/10.1038/216383a0>
118. LEFOULON, E.; BAIN, O.; MAKEPEACE, B. L.; D’HAESE, C.; UNI, S.; MARTIN, C.; GAVOTTE, L. Breakdown of coevolution between symbiotic bacteria *Wolbachia* and their filarial hosts. *Peerj*, v. 4, p. e1840, 2016. <http://dx.doi.org/10.7717/peerj.1840>
119. LEFOULON, E.; BAIN, O.; MAKEPEACE, B. L.; D’HAESE, C.; UNI, S.; MARTIN, C.; GAVOTTE, L. Breakdown of coevolution between symbiotic bacteria *Wolbachia* and their filarial hosts. *Peerj*, v. 4, p. e1840, 2016. <http://dx.doi.org/10.7717/peerj.1840>
120. LEFOULON, E.; CLARK, T.; BORVETO, F.; PERRIAT-SANGUINET, M.; MOULIA, C.; SLATKO, B. E.; GAVOTTE, L. Pseudoscorpion *Wolbachia* symbionts:

- diversity and evidence for a new supergroup s. *Bmc Microbiology*, v. 20, n. 1, 2020. <http://dx.doi.org/10.1186/s12866-020-01863-y>
121. LEITE, R.C. et al. Alguns aspectos epidemiológicos das infestações por *Amblyomma cajennense* : uma proposta de controle estratégico. In: VERÍSSIMO, C.J.; AUGUSTO, C. Simpósio sobre Controle de Parasitos, 2.: controle de parasitos de equinos Colina: Instituto de Zootecnia, 1997. 9-14 p.
 122. LEVIN, M. L.; SCHUMACHER, L. B.M.; SNELLGROVE, A. Effects of *Rickettsia amblyommatis* Infection on the Vector Competence of *Amblyomma americanum* Ticks for *Rickettsia rickettsii*. *Vector-Borne And Zoonotic Diseases*, [S.L.], v. 18, n. 11, p. 579-587, nov. 2018. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/vbz.2018.2284>
 123. LO, N.; PARASKEVOPOULOS, C.; BOURTZIS, K.; O'NEILL, S. L.; WERREN, J. H.; BORDENSTEIN, S. R.; BANDI, C. Taxonomic status of the intracellular bacterium *Wolbachia pipientis*. *International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology*, v. 57, n. 3, p. 654-657, 2007. <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.64515-0>
 124. LOPES, A. J. O.; NASCIMENTO-JÖNIOR, J. R. S.; SILVA, C. G.; PRADO, Â. P.; LABRUNA, M. B.; COSTA-JÖNIOR, L. M. Parasitism by *Ixodiphagus* Wasps (Hymenoptera: Encyrtidae) in *Rhipicephalus sanguineus* and *Amblyomma* ticks (Acari: Ixodidae) in Three Regions of Brazil. *Journal Of Economic Entomology*, v. 105, n. 6, p. 1979-1981, 2012. <http://dx.doi.org/10.1603/ec12012>
 125. LOPES, B.; M., John F; MORATO, R. G.; LUZ, H. R; COSTA, F. B.; BENATTI, H. R.; DIAS, T. C.; ROCHA, V. J.; RAMOS, V. N.; PIOVEZAN, U. Human-modified landscapes alter home range and movement patterns of capybaras. *Journal Of Mammalogy*, v. 102, n. 1, p. 319-332, 2021. <http://dx.doi.org/10.1093/jmammal/gyaa144>
 126. LOPES, R. B.; ALVES, S. B.; PADULLA, L. F.L.; PÉREZ, C. A. EFICIÊNCIA DE FORMULAÇÕES DE *Beauveria bassiana* E *Metarhizium anisopliae* PARA O CONTROLE DE NINFAS DE *Amblyomma cajennense* (FABRICIUS, 1787). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 16, n. 1, p. 27-31, 2007.
 127. LUZ, H. R.; COSTA, F. B.; BENATTI, H. R.; RAMOS, V. N.; SERPA, M. C. A.; MARTINS, T. F.; ACOSTA, I. C. L.; RAMIREZ, D. G.; MUÑOZ-LEAL, S.; RAMIREZ-HERNANDEZ, A.. Epidemiology of capybara-associated Brazilian spotted fever. *Plos Neglected Tropical Diseases*, v. 13, n. 9, p. e0007734, 2019. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0007734>

128. MACHADO-FERREIRA, E.; PIESMAN, J.; ZEIDNER, N. S.; SOARES, C. A. . Francisella-Like Endosymbiont DNA and Francisella tularensis Virulence-Related Genes in Brazilian Ticks (Acari: ixodidae). *Journal Of Medical Entomology*, [S.L.], v. 46, n. 2, p. 369-374, 1 mar. 2009. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1603/033.046.0224>.
129. MACHADO-FERREIRA, E.; VIZZONI, V. F.; BALSEMÃO-PIRES, E.; MOERBECK, L.; GAZETA, G. S.; PIESMAN, J.; VOLOCH, C. M.; SOARES, C. A. G. Coxiella symbionts are widespread into hard ticks. *Parasitology Research*, [S.L.], v. 115, n. 12, p. 4691-4699, 6 set. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-016-5230-z>.
130. MADHAV, M.; BAKER, D.; MORGAN, J. A. T.; ASGARI, S.; JAMES, P. Wolbachia: a tool for livestock ectoparasite control. *Veterinary Parasitology*, v. 288, p. 109297, 2020. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2020.109297>
131. MADHAV, M.; BAKER, D.; MORGAN, J. A. T.; ASGARI, S.; JAMES, P. Wolbachia: a tool for livestock ectoparasite control. *Veterinary Parasitology*, v. 288, p. 109297, 2020. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2020.109297>
132. MAHMOOD, S.; NOVÁKOVÁ, E.; MARTINŮ, J.; SYCHRA, O.; HYPLA, V. Supergroup F Wolbachia with extremely reduced genome: transition to obligate insect symbionts. *Microbiome*, v. 11, n. 1, 2023. <http://dx.doi.org/10.1186/s40168-023-01462-9>
133. MANOJ, R. R. S.; LATROFA, M. S.; EPIS, S.; OTRANTO, D. Wolbachia: endosymbiont of onchocercid nematodes and their vectors. *Parasites & Vectors*, v. 14, n. 1, 2021. <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-021-04742-1>
134. MARTINS, L. A.; KOTÁL, J.; BENSAOUD, C.; CHMELAŘ, J.; KOTSYFAKIS, M. Small protease inhibitors in tick saliva and salivary glands and their role in tick-host-pathogen interactions. *Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - Proteins And Proteomics*, [S.L.], v. 1868, n. 2, p. 140336-0, fev. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2019.140336>.
135. MARTINS, T. F. et al. Geographical distribution of *Amblyomma cajennense* (sensu lato) ticks (Parasitiformes: ixodidae) in Brazil, with description of the nymph of *A. cajennense* (sensu stricto). *Parasites & Vectors*, v. 9, n. 1, 2016. <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-016-1460-2>

136. MARTINS, T. F.; ONOFRIO, V. C.; BARROS-BATTESTI, D. M.; LABRUNA, M. B. Nymphs of the genus *Amblyomma* (Acari: ixodidae) of Brazil. *Ticks And Tick-Borne Diseases*, v. 1, n. 2, p. 75-99, 2010. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2010.03.002>
137. MCCLURE, K. Landscape-level Mosquito Suppression to Protect Hawai'i's Rapidly Vanishing Avifauna. 2020. Disponível em: <https://wildlife.cornell.edu/blog/landscape-level-mosquito-suppression-protect-hawaiis-rapidly-vanishing-avifauna>. Acesso em: 29 set. 2023.
138. MELO, A. L. T.; WITTER, R.; MARTINS, T. F.; PACHECO, T. A.; ALVES, A. S.; CHITARRA, C. S.; DUTRA, V.; NAKAZATO, L.; PACHECO, R. C.; LABRUNA, M. B. A survey of tick-borne pathogens in dogs and their ticks in the Pantanal biome, Brazil. *Medical And Veterinary Entomology*, v. 30, n. 1, p. 112-116, 2015. <http://dx.doi.org/10.1111/mve.12139>
139. MENTEN-DEDOYART, C.; FACCINETTO, C.; GOLOVCHENKO, M.; DUPIEREUX, I.; VAN LERBERGHE, P. B.; DUBOIS, S.; DESMET, C.; ELMOUALIJ, B.; BARON, F.; RUDENKO, N. Neutrophil Extracellular Traps Entrap and Kill *Borrelia burgdorferi* *Sensu Stricto* Spirochetes and Are Not Affected by *Ixodes ricinus* Tick Saliva. *The Journal Of Immunology*, [S.L.], v. 189, n. 11, p. 5393-5401, 1 dez. 2012. The American Association of Immunologists. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1103771>.
140. MERHEJ, V.; ANGELAKIS, E.; SOCOLOVSCHI, C.; RAOULT, D. Genotyping, evolution and epidemiological findings of *Rickettsia* species. *Infection, Genetics And Evolution*, [S.L.], v. 25, p. 122-137, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2014.03.014>
141. MIN, K. T.; BENZER, S. *Wolbachia*, normally a symbiont of *Drosophila*, can be virulent, causing degeneration and early death. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, v. 94, n. 20, p. 10792-10796, 1997. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.94.20.10792>
142. MONTANHA, F. P.; GALEB, L. A. G.; MIKOS, J. D.; GANECO, L. N.; PEREIRA, T. P.; TANAKA, A.; KIRSCHNIK, P. G.; PIMPÃO, C. T. Pyrethroid toxicity in silver catfish, *Rhamdia quelen*. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 32, n. 12, p. 1297-1303, 2012. <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-736x2012001200014>
143. MORAES-FILHO, J. Febre maculosa brasileira. *Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do Crmv-Sp*, v. 15, n. 1, p. 38-45, 2017. <http://dx.doi.org/10.36440/recmvz.v15i1.36765>
144. MOREIRA, L. A.; ITURBE-ORMAETXE, I.; JEFFERY, J. A.; LU, G.; PYKE, A. T.; HEDGES, L. M.; ROCHA, B. C.; HALL-MENDELIN, S.; DAY, A.; RIEGLER, M. A

- Wolbachia Symbiont in *Aedes aegypti* Limits Infection with Dengue, Chikungunya, and Plasmodium. *Cell*, v. 139, n. 7, p. 1268-1278, 2009. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2009.11.042>
145. MOUTAILLER, S.; MORO, C. V.; VAUMOURIN, E.; MICHELET, L.; TRAN, F. H.; DEVILLERS, E.; COSSON, J. F.; GASQUI, P.; VAN, V. T.; MAVINGUI, P. Co-infection of Ticks: the rule rather than the exception. *Plos Neglected Tropical Diseases*, v. 10, n. 3, p. e0004539, 2016. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0004539>
146. MUÑOZ-GARCÍA, C. I.; RENDÓN-FRANCO, E.; GROSTIETA, E.; NAVARRETE-SOTELO, M.; SÁNCHEZ-MONTES, S. Novel Francisella-like endosymbiont and Anaplasma species from Amblyomma nodosum hosted by the anteater Tamandua Mexicana in Mexico. *Experimental And Applied Acarology*, [S.L.], v. 91, n. 1, p. 111-121, 19 jul. 2023. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10493-023-00827-x>.
147. MUÑOZ-LEAL, S.; MACEDO, C.; GONÇALVES, T. C.; BARREIRA, J. D.; LABRUNA, M. B.; LEMOS, E. R. S.; OGRZEWALSKA, M. Detected microorganisms and new geographic records of Ornithodoros rietcorreai (Acari: Argasidae) from northern Brazil. *Ticks And Tick-Borne Diseases*, v. 10, n. 4, p. 853-861, 2019. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.04.004>
148. MURARO, L. S.; NOGUEIRA, M. F.; BORGES, A. M. C. M.; SOUZA, A. O.; VIEIRA, T. S. W. J.; AGUIAR, D. M. de. Detection of Ehrlichia sp. in Amblyomma sculptum parasitizing horses from Brazilian Pantanal wetland. *Ticks And Tick-Borne Diseases*, v. 12, n. 3, p. 101658, 2021. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2021.101658>
149. NAKAYIMA, J.; MAGONA, J. W.; SUGIMOTO, C. Molecular detection of tick-borne pathogens in ticks from Uganda. *Reaserch*, v. 1, n. 767, p. 1-11, 2014.
150. NAMRATA, P.; MILLER, J.; SHILPA, M.; REDDY, P.; BANDOSKI, C.; ROSSI, M.; SAPI, E. Filarial Nematode Infection in Ixodes scapularis Ticks Collected from Southern Connecticut. *Veterinary Sciences*, v. 1, n. 1, p. 5-15, 2014. <http://dx.doi.org/10.3390/vetsci1010005>
151. NARASIMHAN, S.; FIKRIG, E. Tick microbiome: the force within. *Trends In Parasitology*, [S.L.], v. 31, n. 7, p. 315-323, jul. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2015.03.010>.

152. NARASIMHAN, S.; SWEI, A.; ABOUNEAMEH, S.; PAL, U.; PEDRA, J. H.F.; FIKRIG, E. Grappling with the tick microbiome. *Trends In Parasitology*, [S.L.], v. 37, n. 8, p. 722-733, ago. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2021.04.004>.
153. NAVA, S.; BEATI, L.; LABRUNA, M. B.; CÁCERES, A. G.; MANGOLD, A. J.; GUGLIELMONE, A. A. Reassessment of the taxonomic status of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) with the description of three new species, *Amblyomma tonelliae* n. sp., *Amblyomma interandinum* n. sp. and *Amblyomma patinoi* n. sp., and reinstatement of *Amblyomma mixtum* Koch, 1844, and *Amblyomma sculptum* Berlese, 1888 (Ixodida: ixodidae). *Ticks And Tick-Borne Diseases*, v. 5, n. 3, p. 252-276, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2013.11.004>
154. NAVA, S.; VENZAL, J.; ACUÑA, D. G.; MARTINS, T.; GUGLIELMONE, A. Ticks of the southern cone of America: diagnosis, distribution, and hosts with taxonomy, ecology and sanitary importance. London, UK: Academic Press, Elsevier, p. 348, 2017.
155. NEVES, L. C.; PAULA, W. V. F.; PAULA, L. G. F. de; SILVA, B. B. F. da; DIAS, S. A.; PEREIRA, B. G.; SILVA, B. S. A.; SEVÁ, A. P.; DANTAS-TORRES, F.; LABRUNA, M. B. Detection of *Rickettsia* spp. in Animals and Ticks in Midwestern Brazil, Where Human Cases of Rickettsiosis Were Reported. *Animals*, v. 13, n. 8, p. 1288, 2023. <http://dx.doi.org/10.3390/ani13081288>
156. NIKOH, N.; HOSOKAWA, T.; MORIYAMA, M.; OSHIMA, K.; HATTORI, M.; FUKATSU, T. Evolutionary origin of insect– *Wolbachia* nutritional mutualism. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, v. 111, n. 28, p. 10257-10262, 2014. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1409284111>
157. NUNES, F. B. P.; SILVA, S. C. da; CIETO, A. D.; LABRUNA, M. B.. The Dynamics of Ticks and Capybaras in a Residential Park Area in Southeastern Brazil: implications for the risk of *rickettsia rickettsii* infection. *Vector-Borne And Zoonotic Diseases*, v. 19, n. 10, p. 711-716, 2019. <http://dx.doi.org/10.1089/vbz.2019.2479>
158. OGRZEWALSKA, M.; LITERAK, I.; CARDENAS-CALLIRGOS, J. M.; CAPEK, M.; LABRUNA, M. B. *Rickettsia bellii* in ticks *Amblyomma varium* Koch, 1844, from birds in Peru. *Ticks And Tick-Borne Diseases*, v. 3, n. 4, p. 254-256, 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2012.05.003>
159. OKEYO, M.; HARTBERGER, C.; MARGOS, G.; STRAUBINGER, R. K.; SING, A.; FINGERLE, V. Comparison of Methods for Economic and Efficient Tick and *Borrelia* DNA

160. ONOFRIO, V.C.; VENZAL, J.M.; PINTER, A.; SZABÓ, M.P.J. Família Ixodidae: características gerais, comentários e chave para gêneros. In. BARROS-BATTESTI, D.M.; ARZUA, M.; BECHARA G.H. (Ed.) Carrapatos de Importância Médico-Veterinária da Região Neotropical. São Paulo: Vox/ICTTD-3/Butantan, 2006. 29-39 p.
161. OTE, M.; YAMAMOTO, D. Impact of Wolbachia infection on Drosophila female germline stem cells. *Current Opinion In Insect Science*, v. 37, p. 8-15, 2020. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cois.2019.10.001>
162. PACHECO, F. C.; MORAES FILHO, J.; ROCHA, V. J.; SAMPIERI, B. R.; ZANIOLO, M. M.; PACHALY, J. R.; OTUTUMI, L. K.; VIDOTTO, O.; LABRUNA, M. B.; GONÇALVES, D. D. Anti-Rickettsia rickettsii antibodies in capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris* Linnaeus, 1766) from an agricultural landscape in Araras, São Paulo, Brazil. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 38, n. 41, p. 2543, 2017. <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2017v38n4supl1p2543>
163. PANDA, B. B.; MEHER, A. S.; HAZRA, R. K. Comparison between different methods of DNA isolation from dried blood spots for determination of malaria to determine specificity and cost effectiveness. *Journal Of Parasitic Diseases*, [S.L.], v. 43, n. 3, p. 337-342, 24 jun. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12639-019-01136-0>.
164. PAULA, L. G. F. de; NASCIMENTO, R. M. do; FRANCO, A. O.; SZABÓ, MATIAS, P. Juan; LABRUNA, M. B.; MONTEIRO, C.; KRAWCZAK, F. S. Seasonal dynamics of *Amblyomma sculptum*: a review. *Parasites & Vectors*, v. 15, n. 193, 2022. <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-022-05311-w>
165. PEREIRA, M. R.; TREIN, C. R.; WEBSTER, A.; DALLAGNOL, B.; GONCHOROSKI, G. Z.; PELLEGRINI, D. P.; DOYLE, R.; KLAFKE, G.; RECK, J. Comparison of Seroprevalence and Identification of Risk Factors for *Theileria equi* in Horses From Vector-Free and Infested Areas in Southern Brazil. *Journal Of Equine Veterinary Science*, v. 126, p. 104241, 2023. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jevs.2023.104241>
166. PEREIRA, T. N.; CARVALHO, F. D.; RUGANI, J. N.; CARVALHO, V. R. ; JARUSEVICIUS, J; SOUZA-NETO, J. A.; MOREIRA, L. A. Mayaro Virus: the potential role of microbiota and wolbachia. *Pathogens*, v. 10, n. 5, p. 525, 2021. <http://dx.doi.org/10.3390/pathogens10050525>
167. PEREZ, C. A.; ALMEIDA, Á. F.; ALMEIDA, A.; CARVALHO, V. H. B.; BALESTRIN, D. C.; GUIMARÃES, M. S.; COSTA, J. C.; RAMOS, L. A.; ARRUDA-

- SANTOS, A. D.; MÁXIMO-ESPÍNDOLA, C. P. Carrapatos do gênero *Amblyomma* (acari: ixodidae) e suas relações com os hospedeiros em área endêmica para febre maculosa no estado de São paulo. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 17, n. 4, p. 210-217, 2008. <http://dx.doi.org/10.1590/s1984-29612008000400008>
168. PERLMAN, Steve J; HUNTER, Martha s; ZCHORI-FEIN, Einat. The emerging diversity of *Rickettsia*. *Proceedings Of The Royal Society B: Biological Sciences*, v. 273, n. 1598, p. 2097-2106, 2006. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2006.3541>.
169. PIETRI, J. E.; DEBRUHL, H.; SULLIVAN, W. The rich somatic life of *Wolbachia*. *Microbiologyopen*, v. 5, n. 6, p. 923-936, 2016. <http://dx.doi.org/10.1002/mbo3.390>
170. PINTER, A.; COSTAI, C. S.; HOLCMAN, M. M.; CAMARA, M.; LEITE, R. M. A Febre Maculosa Brasileira na Região Metropolitana de São Paulo. *Bepa*, v. 151, n. 13, p. 1-45, 2016.
171. PIRES, M. S.; SANTOS, T. M. dos; SANTOS, H. A.; VILELA, J. A. R.; PEIXOTO, M. P.; ROIER, E. C. R.; SILVA, C. B. da; BARREIRA, J. D.; LEMOS, E. R. S. de; MASSARD, C. L. *Amblyomma cajennense* infestation on horses in two microregions of the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 22, n. 2, p. 235-242, 2013. <http://dx.doi.org/10.1590/s1984-29612013005000017>
172. PLANTARD, O.; BOUJU-ALBERT, A.; MALARD, M. A.; HERMOUET, A.; CAPRON, G.; VERHEYDEN, H. Detection of *Wolbachia* in the Tick *Ixodes ricinus* is Due to the Presence of the Hymenoptera Endoparasitoid *Ixodiphagus hookeri*. *Plos One*, v. 7, n. 1, p. e30692, 2012. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0030692>
173. PLOS BIOLOGY. Genome Sequence of the Intracellular Bacterium *Wolbachia*. V. 2, n. 3, p. 76, 16 mar. 2004. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.0020076>
174. PORTER, J.; SULLIVAN, W. The cellular lives of *Wolbachia*. *Nature Reviews Microbiology*, v. 21, p. 750-766, 2023. <http://dx.doi.org/10.1038/s41579-023-00918-x>.
175. PORTILLO, A.; PALOMAR, A. M.; TORO, M. de; SANTIBÁÑEZ, S.; SANTIBÁÑEZ, P.; OTEO, J; A. Exploring the bacteriome in anthropophilic ticks: to investigate the vectors for diagnosis. *Plos One*, [S.L.], v. 14, n. 3, p. e0213384, 19 mar. 2019. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0213384>.
176. Pourali, P; Roayaei Ardakani, M.; Jolodar, A.; Razi Jalali, H. M. PCR screening of the *Wolbachia* in some arthropods and nematodes in Khuzestan province. *Iranian Journal Of Veterinary Research*, v. 10, n. 3, p. 216-222, 2009.

177. Purification. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, v. 10, p. 1041-1045, 2019.
178. QUEIROGAS, V. L.; CLARO, K. del; NASCIMENTO, A. R. T.; SZABÓ, M. P. J. Capybaras and ticks in the urban areas of Uberlândia, Minas Gerais, Brazil: ecological aspects for the epidemiology of tick-borne diseases. *Experimental And Applied Acarology*, v. 57, n. 1, p. 75-82, 2012. <http://dx.doi.org/10.1007/s10493-012-9533-1>
179. RAHAL, M.; MEDKOUR, H.; DIARRA, A. Z.; BITAM, I.; PAROLA, P.; MEDIANNIKOV, O. Molecular identification and evaluation of Coxiella-like endosymbionts genetic diversity carried by cattle ticks in Algeria. *Ticks And Tick-Borne Diseases*, [S.L.], v. 11, n. 5, p. 101493, set. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2020.101493>
180. RAJPUT, Z. I.; HU, S. H.; CHEN, W.J.; ARIJO, A. G.; XIAO, C. W. Importance of ticks and their chemical and immunological control in livestock. *Journal Of Zhejiang University Science B*, v. 7, n. 11, p. 912-921, 2006. <http://dx.doi.org/10.1631/jzus.2006.b0912>
181. RAMALHO, M. O.; KIM, Z.; WANG, S.; MOREAU, C. S. Wolbachia Across Social Insects: Patterns and Implications. *Annals Of The Entomological Society Of America*, v. 114, n. 2, p. 206-218, 2021. <https://doi.org/10.1093/aesa/saaa053>
182. REIS, C.; COTE, M.; PAUL, R. E.L.; BONNET, S. Questing Ticks in Suburban Forest Are Infected by at Least Six Tick-Borne Pathogens. *Vector-Borne And Zoonotic Diseases*, v. 11, n. 7, p. 907-916, 2011. <http://dx.doi.org/10.1089/vbz.2010.0103>
183. REIS, R.C.S.; MELO, D. R.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Efeitos de *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill e *Metarhizium anisopliae* (Metsc) Sorok sobre fêmeas ingurgitadas de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) em condições de laboratório. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 56, n. 6, p. 788-791, 2004. <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-09352004000600014>
184. ROCHA, M. N.; DUARTE, M. M.; MANSUR, S. B.; SILVA, B. D. M.; PEREIRA, T. N.; ADELINO, T. É. R.; GIOVANETTI, M.; ALCANTARA, L. C. J.; SANTOS, F. M.; COSTA, V. R. M. Pluripotency of Wolbachia against Arboviruses: the case of yellow fever. *Gates Open Research*, v. 3, p. 161, 2019. <http://dx.doi.org/10.12688/gatesopenres.12903.2>
185. RODRIGUES, J.; LEFOULON, E.; GAVOTTE, L.; PERILLAT-SANGUINET, M.; MAKEPEACE, B.; MARTIN, C.; D'HAESE, C. A. Wolbachia springs eternal: symbiosis in collembola is associated with host ecology. *Royal Society Open Science*, v. 10, n. 5, 2023. <http://dx.doi.org/10.1098/rsos.230288>

186. RODRIGUES, V. S. ECOLOGIA, SAZONALIDADE E RESISTÊNCIA A ACARICIDAS DE CARRAPATOS EM PROPRIEDADES RURAIS DO TRIÂNGULO MINEIRO. Tese (Doutorado em Imunologia e Parasitologia Aplicadas) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2022.
187. RODRIGUES, V. S.; KOLLER, W. W.; GARCIA, M. V.; BARROS, J. C.; ANDREOTTI, R. (ed.) Carrapatos em cavalos: *Amblyomma sculptum* e *Dermacentor nitens*. In: ANDREOTTI, Renato. Carrapatos na cadeia produtiva de bovinos. 1 ed. Brasília: Embrapa, 2019. 28-43 p.
188. RODRIGUES, V. S.; PINA, F. T. B.; BARROS, J. C.; GARCIA, M. V.; ANDREOTTI, R. Carrapato-estrela (*Amblyomma sculptum*): ecologia, biologia, controle e importância. Brasília: Embrapa, 2015. 10 p.
189. ROMANO, D. M. M.; PEREIRA, T. N.; ALMEIDA, I. B. de; COELHO, C. S. G.; DUARTE, F. C.; HARAKAVA, R.; CASSIANO, L. L.; MENDES, M. C. First molecular evidence of *Wolbachia* occurrence in *Amblyomma sculptum* (Acari: ixodidae). *Veterinary Parasitology*, v. 317, p. 109907, 2023. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2023.109907>
190. ROMANO, D. M. M.; PEREIRA, T. N.; ALMEIDA, I. B.; COELHO, C. S. G.; DUARTE, F. C.; HARAKAVA, R.; CASSIANO, L. L.; MENDES, M. C. First molecular evidence of *Wolbachia* occurrence in *Amblyomma sculptum* (Acari: ixodidae). *Veterinary Parasitology*, v. 317, p. 109907, 2023. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2023.109907>
191. ROS, V. I. D.; FLEMING, V. M.; FEIL, E. J.; BREEUWER, J. A. J. How Diverse Is the Genus *Wolbachia* ? Multiple-Gene Sequencing Reveals a Putatively New *Wolbachia* Supergroup Recovered from Spider Mites (Acari: tetranychidae). *Applied And Environmental Microbiology*, v. 75, n. 4, p. 1036-1043, 2009. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.01109-08>
192. ROSS, K s; HAITES, N e; KELLY, K F. Repeated freezing and thawing of peripheral blood and DNA in suspension: effects on dna yield and integrity.. *Journal Of Medical Genetics*, [S.L.], v. 27, n. 9, p. 569-570, 1 set. 1990. BMJ. <http://dx.doi.org/10.1136/jmg.27.9.569>.
193. ROSS, P. A.; TURELLI, M.; HOFFMANN, A. A. Evolutionary Ecology of *Wolbachia* Releases for Disease Control. *Annual Review Of Genetics*, v. 53, n. 1, p. 93-116, 2019. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-genet-112618-043609>
194. SAMISH, M.; GINSBERG, H.; GLAZER, I. Biological control of ticks. *Parasitology*, v. 129, n. 1, p. S389-S403, 2004. <http://dx.doi.org/10.1017/s0031182004005219>

195. SAMISH, M.; GLAZER, I. Entomopathogenic nematodes for the biocontrol of ticks. Trends In Parasitology, v. 17, n. 8, p. 368-371, 2001. [http://dx.doi.org/10.1016/s1471-4922\(01\)01985-7](http://dx.doi.org/10.1016/s1471-4922(01)01985-7)
196. SANAËI, E.; CHARLAT, S.; ENGELSTÄDTER, J. Wolbachia host shifts: routes, mechanisms, constraints and evolutionary consequences. Biological Reviews, v. 96, n. 2, p. 433-453, 2020. <http://dx.doi.org/10.1111/brv.12663>
197. SANTANA, M. S.; HOPPE, E. G. L.; CARRARO, P. E.; CALCHI, A. C.; OLIVEIRA, L. B. de; AMARAL, R. B. do; MONGRUEL, A. C. B.; MACHADO, D. M. R.; BURGER, K. P.; BARROS-BATESTTI, D. M. Molecular detection of vector-borne agents in wild boars (*Sus scrofa*) and associated ticks from Brazil, with evidence of putative new genotypes of Ehrlichia , Anaplasma , and haemoplasmas. Transboundary And Emerging Diseases, v. 69, n. 5, 2022. <http://dx.doi.org/10.1111/tbed.14632>
198. SANTOS, A. L. F.; OLIVEIRA, C. Q. P.; ARRUDA, G. N. P. N.; MARTINS, J. K. Comparison of DNA extraction using proteinase K and extraction kit: analysis of the quality of the genetic material. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, v. 54, n. 2, 2018. <http://dx.doi.org/10.5935/1676-2444.20180013>
199. SANTOS, M. A. B.; MACEDO, L. O.; SOUZA, I. B.; RAMOS, C. A. N.; ALVES, L. C.; RAMOS, R. A. Na.; CARVALHO, G. A. Larvae of Ixodiphagus wasps (Hymenoptera: encyrtidae) in rhipicephalus sanguineus sensu lato ticks (Acari: Ixodidae) from Brazil. Ticks And Tick-Borne Diseases, v. 8, n. 4, p. 564-566, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2017.03.004>
200. SANTOS, M. A. B.; SOUZA, I. B.; MACEDO, L. O.; RAMOS, C. A. N.; REGO, A. G. O.; ALVES, L. C.; RAMOS, R. A. N.; CARVALHO, G. A.. Cercopithifilaria baina in Rhipicephalus sanguineus sensu lato ticks from dogs in Brazil. Ticks And Tick-Borne Diseases, v. 8, n. 4, p. 623-625, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2017.04.007>
201. SARIH, M'H.; M'GHIRBI, Y.; BOUATTOUR, A.; GERN, L.; BARANTON, G.; POSTIC, D. Detection and Identification of Ehrlichia spp. in Ticks Collected in Tunisia and Morocco. Journal Of Clinical Microbiology, v. 43, n. 3, p. 1127-1132, 2005. <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.43.3.1127-1132.2005>
202. SEO, M. G.; LEE, S.H.; OUH, I. O.; LEE, G. H.; GOO, Y.K.; KIM, S.; KWON, O.D.; KWAK, D. Molecular Detection and Genotyping of Coxiella-Like Endosymbionts in Ticks that Infest Horses in South Korea. Plos One, [S.L.], v. 11, n. 10, p. 0165784-0, 28 out. 2016. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0165784>.

203. SERBUS, L. R.; CASPER-LINDLEY, C.; LANDMANN, F.; SULLIVAN, W. The Genetics and Cell Biology of Wolbachia-Host Interactions. *Annual Review Of Genetics*, v. 42, n. 1, p. 683-707, 2008. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.genet.41.110306.130354>
204. SERRA-FREIRE, N.M. Ácaros (Carrapatos e Outros). In: MARCONDES, C.B. *Entomologia Médica e Veterinária*. 2º ed. Editora Atheneu. São Paulo, 2011. 379-426 p.
205. SESMERO-GARCÍA, C.; CABANERO-NAVALON, M. D.; GARCIA-BUSTOS, V. The Importance and Impact of Francisella-like Endosymbionts in Hyalomma Ticks in the Era of Climate Change. *Diversity*, [S.L.], v. 15, n. 4, p. 562-0, 17 abr. 2023. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/d15040562>.
206. SHEN, C. *Diagnostic Molecular Biology*. Academic Press, Salt Lake City UT. 2023. pp.87–116.
207. SIGMA-ALDRICH CORPORATION. Guide on How to Use Proteinase K in Different Procedures. 2023. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/technical-documents/technical-article/genomics/dna-and-rna-purification/guide-to-use-proteinase-k-procedures>. Acesso em: 21 set. 2023
208. SILVA, S. B. A. Controle integrado de *Amblyomma sculptum* em zonas rurais. Dissertação (Mestrado em Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema) – Programa de Pós-Graduação, Instituto Biológico, São Paulo, 2017.
209. SOARES, L. A. Controle integrado de *Amblyomma sculptum* em zonas rurais. Dissertação (Mestrado em Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema) – Programa de Pós-Graduação, Instituto Biológico, São Paulo, 2021.
210. SOARES, L. A.; FIORINI, L. C.; DUARTE, F. C.; ALMEIDA, I. B.; SAMPAIO, P. H. S.; ROMANO, D. M. M.; MENDES, M. C. Investigation of the parasitoid *Ixodiphagus hookeri* (Hymenoptera: encyrtidae) in *Amblyomma Aculptum* (Acari: Ixodidae) ticks in the municipality of Salto, São Paulo, Brazil. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 89, 2022. <http://dx.doi.org/10.1590/1808-1657000112022>
211. SOLANKE, P. B.; NARLADKAR, B. W. Status of bacterial biocontrol agents against cattle tick *Rhipicephalus (B.) microplus* (Acarina: Ixodidae): Review. *Journal Of Entomology And Zoology Studies*, v. 5, n. 6, p. 720-726, 2018.
212. SOUSA, K. C. M. de; CALCHI, A. C.; HERRERA, H. M.; DUMLER, J. S.; BARROS-BATTESTI, D. M.; MACHADO, R. Z.; ANDRÉ, M. R. Anaplasmataceae agents among wild mammals and ectoparasites in Brazil. *Epidemiology And Infection*, v. 145, n. 16, p. 3424-3437, 2017. <http://dx.doi.org/10.1017/s095026881700245x>

213. SOUZA, E. J.; REIS, R. C. S.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Efeito do contato dos fungos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* na ecdise ninfal de *Amblyomma cajennense*. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, v. 6, n. 2, p. 84-87, 1999. <http://dx.doi.org/10.4322/rbcv.2015.141>
214. SUBRAMANIAN, G.; SEKEYOVA, Z.; RAOULT, D.; MEDIANNIKOV, O. Multiple tick-associated bacteria in *Ixodes ricinus* from Slovakia. *Ticks And Tick-Borne Diseases*, v. 3, n. 5-6, p. 406-410, 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2012.10.001>
215. SUMRANDEE, C.; HIRUNKANOKPUN, S.; GRUBHOFFER, L.; BAIMAI, V.; TRINACHARTVANIT, W.; AHANTARIG, A. Phylogenetic relationships of Francisella-like endosymbionts detected in two species of *Amblyomma* from snakes in Thailand. *Ticks And Tick-Borne Diseases*, [S.L.], v. 5, n. 1, p. 29-32, fev. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2013.08.001>.
216. TARRAGONA, E. L.; SEBASTIAN, P. S.; BOTTERO, M. N. S.; MARTINEZ, E. I.; DEBÁRBORA, V. N.; MANGOLD, A. J.; GUGLIELMONE, A. A.; NAVA, S.. Seasonal dynamics, geographical range size, hosts, genetic diversity and phylogeography of *Amblyomma sculptum* in Argentina. *Ticks And Tick-Borne Diseases*, v. 9, n. 5, p. 1264-1274, 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.04.009>
217. TAYLOR, M. A., COOP, R. L., WALL, R. L. *Parasitologia Veterinária*. 4. ed. Rio de Janeiro: GUANABARA KOOGAN, 2017. 945 p.
218. TAYLOR, M.; MEDIANNIKOV, O.; RAOULT, D.; GREUB, G. Endosymbiotic bacteria associated with nematodes, ticks and amoebae. *Fems Immunol Med Microbiol*, v. 64, p. 21-31, 2012. DOI: 10.1111/j.1574-695X.2011.00916.x
219. THERMO FISHER SCIENTIFIC. Guanidium Thiocyanate Lysis Buffers. 2024. Disponível em: <https://www.thermofisher.in/chemicals/en/chemical-categories/life-science/guanidium-thiocyanate-lysis-buffers.html>. Acesso em: 11 mar. 2024.
220. THORNER, A. R.; WALKER, D. H.; PETRI Jr., W. A. Rocky Mountain Spotted Fever. *Clinical Infectious Diseases*, v. 27, n. 6, p. 1353-1359, 1998.
221. TOOMEY, M. E.; PANARAM, K.; FAST, E. M.; BEATTY, C.; FRYDMAN, H. M. Evolutionarily conserved *Wolbachia* -encoded factors control pattern of stem-cell niche tropism in *Drosophila* ovaries and favor infection. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, v. 110, n. 26, p. 10788-10793, 2013. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1301524110>

222. UTARINI, A. et al. Efficacy of Wolbachia-Infected Mosquito Deployments for the Control of Dengue. *New England Journal Of Medicine*, v. 384, n. 23, p. 2177-2186, 2021. <http://dx.doi.org/10.1056/nejmoa2030243>
223. VALE, L. et al. Binary combinations of thymol, carvacrol and eugenol for *Amblyomma sculptum* control: evaluation of in vitro synergism and effectiveness under semi-field conditions. *Ticks And Tick-Borne Diseases*, v. 12, n. 6, p. 101816-0, 2021. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2021.101816>
224. van OVERBEEK, L.; GASSNER, F.; PLAS, C.n L. van D.; KASTELEIN, P.; ROCHA, U. N.; TAKKEN, W. Diversity of *Ixodes ricinus* tick-associated bacterial communities from different forests. *Fems Microbiology Ecology*, v. 66, n. 1, p. 72-84, 2008. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00468.x>
225. VECCHI, M. O. M.; RAMOS, R. A. N.; BITENCOURTH, K.; VECCHI, M. B.; ALVES, M. A. S. First record of the parasitoid wasp *Ixodiphagus hookeri* (Hymenoptera: encyrtidae) infesting the tick *Amblyomma nodosum* (Acari: Ixodidae). *Parasitology Research*, v. 122, n. 5, p. 1255-1259, 2023. <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-023-07813-7>
226. WANG, Y.; MAO, L.; SUN, Y.; WANG, Z.; ZHANG, J.; ZHANG, J.; PENG, Y.; XIA, L. A Novel *Francisella*-Like Endosymbiont in *Haemaphysalis longicornis* and *Hyalomma asiaticum*, China. *Vector-Borne And Zoonotic Diseases*, [S.L.], v. 18, n. 12, p. 669-676, dez. 2018. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/vbz.2017.2252>.
227. WANG, Z.; SU, X. M.; WEN, J.; JIANG, L. Y.; QIAO, G. X. Widespread infection and diverse infection patterns of Wolbachia in Chinese aphids. *Insect Science*, v. 21, n. 3, p. 313-325, 2014. <http://dx.doi.org/10.1111/1744-7917.12102>
228. WEINERT, L. A.; ARAUJO-JNR, E. V.; AHMED, M. Z.; WELCH, J. J. The incidence of bacterial endosymbionts in terrestrial arthropods. *Proceedings Of The Royal Society B: Biological Sciences*, v. 282, n. 1807, p. 20150249, 2015. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2015.0249>
229. WEINERT, L. A.; ARAUJO-JNR, E. V.; AHMED, M. Z.; WELCH, J. J. The incidence of bacterial endosymbionts in terrestrial arthropods. *Proceedings Of The Royal Society B: Biological Sciences*, v. 282, n. 1807, p. 20150249, 2015. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2015.0249>
230. WERREN, J. H.; BALDO, L.; CLARK, M. E. Wolbachia: master manipulators of invertebrate biology. *Nature Reviews Microbiology*, v. 6, n. 10, p. 741-751, 2008. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1969>

231. WERREN, J.H. Biology of Wolbachia. *Annu. Rev. Entomol.*, v. 42, p. 587–609. 1997. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.42.1.587>
232. WIDMER, C. E.; AZEVEDO, F. C.C.; ALMEIDA, A. P.; FERREIRA, F.; LABRUNA, M. B. Tick-Borne Bacteria in Free-Living Jaguars (*Panthera onca*) in Pantanal, Brazil. *Vector-Borne And Zoonotic Diseases*, v. 11, n. 8, p. 1001-1005, 2011. <http://dx.doi.org/10.1089/vbz.2011.0619>
233. WIESINGER, A.; WENDERLEIN, J.; ULRICH, S.; HIERETH, S.; CHITIMIA-DOBLER, L.; STRAUBINGER, R. K. Revealing the Tick Microbiome: insights into midgut and salivary gland microbiota of female ixodes ricinus ticks. *International Journal Of Molecular Sciences*, [S.L.], v. 24, n. 2, p. 1100, 6 jan. 2023. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms24021100>.
234. WILLIAMS-NEWKIRK, A. J.; ROWE, L. A.; MIXSON-HAYDEN, T. R.; DASCH, G., A. Characterization of the Bacterial Communities of Life Stages of Free Living Lone Star Ticks (*Amblyomma americanum*). *Plos One*, v. 9, n. 7, p. e102130, 2014. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0102130>
235. WITTER, R.; MARTINS, T. F.; CAMPOS, A. K.; MELO, A. L.T.; CORRÊA, S. H.R.; MORGADO, T. O.; WOLF, R. W.; MAY-JÏNIOR, J. A.; SINKOC, A. L.; STRÛSSMANN, C. Rickettsial infection in ticks (Acari: ixodidae) of wild animals in midwestern brazil. *Ticks And Tick-Borne Diseases*, v. 7, n. 3, p. 415-423, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2015.12.019>
236. WU, M.; SUN, L. V.; VAMATHEVAN, J.; RIEGLER, M.; DEBOY, R.; BROWNLIE, J. C.; MCGRAW, E. A.; MARTIN, W.; ESSER, C.; AHMADINEJAD, N. Phylogenomics of the Reproductive Parasite *Wolbachia pipientis* wMel: a streamlined genome overrun by mobile genetic elements. *Plos Biology*, v. 2, n. 3, p. e69, 2004. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.0020069>
237. WU-CHUANG, A.; HODŹIĆ, A.; MATEOS-HERNÁNDEZ, L.; ESTRADA-PEÑA, A.; OBREGON, D.; CABEZAS-CRUZ, A. Current debates and advances in tick microbiome research. *Current Research In Parasitology & Vector-Borne Diseases*, [S.L.], v. 1, p. 100036, 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.crpvbd.2021.100036>.
238. YEN, C. L.; YEN, B. C. Water Surface Configuration in Channel Bends. *Journal Of The Hydraulics Division*, v. 97, n. 2, p. 303-321, 1971. <http://dx.doi.org/10.1061/jyceaj.0002872>

239. ZHANG, X.; NORRIS, D. E.; RASGON, J. L. Distribution and molecular characterization of Wolbachia endosymbionts and filarial nematodes in Maryland populations of the lone star tick (*Amblyomma americanum*). *Fems Microbiology Ecology*, v. 77, n. 1, p. 50-56, 2011. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01089.x>
240. ZHONG, Z.; WANG, K.; WANG, J.. Tick symbiosis. *Current Opinion In Insect Science*, [S.L.], v. 62, p. 101163, abr. 2024. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cois.2024.101163>.
241. ZUG, R.; HAMMERSTEIN, P. Bad guys turned nice? A critical assessment of Wolbachia mutualisms in arthropod hosts. *Biological Reviews*, v. 90, n. 1, p. 89-111, 2014. <http://dx.doi.org/10.1111/brv.12098>