

UNIVERSIDADE PAULISTA – UNIP
PROGRAMA DE MESTRADO EM PATOLOGIA AMBIENTAL E
EXPERIMENTAL

MORFODIFERENCIAÇÃO DO ÓRGÃO DE GENÉ EM
CARRAPATOS FÊMEAS INGURGITADAS *Amblyomma*
***sculptum* Berlese, 1888 (ACARI: IXODIDAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para a obtenção do título de Mestre em Patologia Ambiental e Experimental, sob orientação da Professora Dra. Maria Anete Lallo.

MARCELO FRANCISCO DOS SANTOS

SÃO PAULO

2016

UNIVERSIDADE PAULISTA – UNIP
PROGRAMA DE MESTRADO EM PATOLOGIA AMBIENTAL E
EXPERIMENTAL

MORFODIFERENCIAÇÃO DO ÓRGÃO DE GENÉ EM
CARRAPATOS FÊMEAS INGURGITADAS *Amblyomma*
***sculptum* Berlese, 1888 (ACARI: IXODIDAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para a obtenção do título de Mestre em Patologia Ambiental e Experimental, sob orientação da Professora Dra. Maria Anete Lallo.

MARCELO FRANCISCO DOS SANTOS

SÃO PAULO

2016

Santos, Marcelo Francisco dos.

Morfodiferenciação do órgão de Gené em carrapatos fêmeas ingurgitadas *Amblyomma sculptum* Berlese, 1888 (Acari: Ixodidae) / Marcelo Francisco dos Santos. - 2016.

39f. : il. color. + CD-ROM.

Dissertação de Mestrado Apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista, São Paulo, 2016.

Área de Concentração: Biologia da Diferenciação e Transformação Celular: Modulação por Fatores Endógenos e Exógenos.

Orientadora: Prof.^a Dra. Maria Anete Lallo.

Coorientadora: Prof.^a Dra. Diva Denelle Spadacci-Morena.

1. Órgão de Gené. 2. Fêmea ingurgitada. 3. Morfohistoquímica.
4. Cera do ovo. I. Lallo, Maria Anete (orientadora). II. Spadacci-Morena, Diva Denelle (coorientadora) III. Título.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Dra. Diva Denelle Spadacci-Morena e a Dra. Maria Anete Lallo pelas orientações prestadas na elaboração e execução dessa dissertação.

As Colegas de laboratório, Magna Aparecida Maltauro Soares e Jéssica Codeceira pelo auxílio em todos esses anos de trabalho.

À Dra. Darci Moraes Barros-Battesti pelo apoio e colaboração na produção desse trabalho.

Ao Programa de suporte à Pós-Graduação de Instituição de Ensino Particular (PROSUP) da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa de estudo.

Revisão da literatura

Carrapatos são ectoparasitas de vertebrados terrestre, pertencentes ao filo Arthropoda, classe Aracnida, ordem Acari e subordem Ixodida que compreende três famílias: Argasidae, Ixodidae e Nuttallielidae. No Brasil estão presentes as duas primeiras famílias, totalizando 70 espécies (Labruna et al, 2016).

Processo de alimentação dos carrapatos Ixodidae

Os carrapatos podem permanecer na pele do hospedeiro por dias, ou mesmo semanas, onde secretam saliva que impede a coagulação sanguínea e as reações de defesa do organismo no local da fixação. Os carrapatos se alimentam por sucção, alternada com a eliminação de saliva, sendo que o maior volume de saliva é secretado no final do processo de ingurgitamento (Balashov, 1972). A saliva possui substâncias vasoativas que induzem a vasodilatação local, facilitando a ingestão de sangue, que é seu principal alimento (hematofagia). Entretanto, os carrapatos também se alimentam de restos tissulares e linfa presentes na pele do hospedeiro. Isto se dá pela alta especialização destes artrópodes ao parasitismo, pois possuem peças bucais adaptadas que perfuram e penetram na pele, a fim de obter o alimento (Sucen, 2006). O aparelho bucal do carrapato penetra profundamente na pele do hospedeiro, permanecendo fixado através do hipostômio e pela solidificação da secreção da saliva. Ao provocar a laceração dos tecidos e vasos sanguíneos, o carrapato ingere sangue e outros líquidos tissulares do hospedeiro e regurgita grandes volumes de saliva, principal via de inoculação de patógenos. No processo de alimentação, os carrapatos causam: ação traumática pela dilaceração de células e tecidos; ação mecânica pela compressão de células; espoliação direta pelo hematofagismo; ação tóxica pela inoculação de

substâncias de alto peso molecular pela saliva; além da depreciação do couro e predisposição à miíases e abscessos (Massard, 2004).

Doenças transmitidas por carrapatos

Os carrapatos constituem o segundo grupo de vetores de maior importância para a transmissão de doenças infecciosas para animais e humanos, ficando atrás apenas dos culicídeos. Entre os microrganismos transmitidos, incluem-se vírus, helmintos, protozoários e bactérias. Entre as bactérias, a principal é a espécie *Rickettsia rickettsii*, agente etiológico da febre maculosa brasileira-FMB (Sucen, 2006).

O gênero *Rickettsia* compreende bactérias intracelulares obrigatórias, muitas das quais causam doenças zoonóticas em todos os continentes habitados por seres humanos no mundo. Devido à sua sobrevivência estritamente intracelular dentro das células hospedeiras, *Rickettsia* é classicamente transmitida aos seres humanos por vetores artrópodes (Labruna et al., 2004). A doença no homem pode ser aguda, febril e do tipo exantematosa ou com sintomas não aparentes, mimetizando o estado gripal. A ocorrência de lesões cutâneas deve-se à colonização do endotélio dos pequenos vasos pela *R.rickettsii*, formando trombos, hemorragias, infiltração perivascular e necrose focal. Com a extensa lesão endotelial, instala-se um estado procoagulante, com ativação da cascata da coagulação, liberação de trombina, aumento da agregação plaquetária e aumento dos fatores antifibrinolíticos (Del Fiol et al., 2010). O quadro clínico do paciente agrava-se com a trombose de pequenos vasos do coração, rins, pulmões e cérebro. Tem sido registrada lesões no miocárdio, pele e tecido cerebral. O período de incubação varia de 3 a 14 dias e o início é súbito, com febre, dor de cabeça, prostração, mialgias e confusão mental. A presença de exantema máculo- papular pode ser

observada a partir do terceiro ou quarto dia, iniciando nas extremidades do corpo, punho, tornozelo, irradiando-se para tronco, pescoço e face. A doença evolui para a gravidade em 2 a 3 semanas, com aparecimento de necrose nas áreas de sufusões hemorrágicas, em decorrência da vasculite generalizada. A taxa de mortalidade no Brasil é de 20 a 30%, ainda muito alta, quando comparada a de outros países. Esse alto índice de mortalidade tem estreita relação com a dificuldade em fazer o diagnóstico e estabelecer a terapia apropriada (Massard, 2004; Del Fiol et al 2010).

Outra enfermidade com extrema gravidade transmitida por carrapatos do gênero *Ixodes* é doença de Lyme. A doença de Lyme é causada por bactérias espiroquetas da espécie *Borrelia burgdoferi* sensu lato (Steere, 2001). A doença de Lyme propriamente dita não foi encontrada no Brasil ou mesmo no hemisfério sul, mas, indiscutivelmente, manifestações clínicas muito semelhantes, causadas por outras borrelíias, devam ser mais comuns do que se tem identificado. Os casos descritos no Brasil como doença de Lyme tiveram diagnóstico clínico e sorológico apenas sendo considerados como Lyme-símile (Sucen, 2002; Yoshinari et al, 1992). No homem, apresenta-se como uma doença multisistêmica e multifásica, podendo afetar vários órgãos e sistemas tais como a pele, sistema nervoso, articulações e o coração. Devido à diversidade dos sintomas clínicos, muitas vezes é considerada no diagnóstico diferencial de outras doenças como esclerose múltipla, sífilis, etc. (Núncio e Carvalho, 2014).

Em animais, existem doenças causadas por protozoários que usam os carrapatos como vetores, tais como a babesiose. A primeira ocorre em animais domésticos e silvestres, em áreas tropicais e subtropicais do mundo, enquanto que a segunda ocorre de forma endêmica em muitas regiões do neotrópico. A babesiose bovina constitui um dos principais fatores limitantes para o melhoramento da produtividade da

bovinocultura no mundo. O sucesso no tratamento da babesiose com medicamentos efetivos depende do diagnóstico rápido da doença (Bazan et al., 2008).

Ciclo de vida do *Amblyomma sculptum* Berlese, 1888 e órgão de Gené

Os carrapatos pertencentes à espécie *A. sculptum* são trioxeno, ou seja, necessitam de três hospedeiros para completar seu ciclo de vida (Leite et al., 1998). A primeira fase inicia-se com a queda de uma fêmea ingurgitada, teleógina, que busca esconderijo no solo para iniciar um novo ciclo de vida. No solo, após cerca de 7 a 12 dias, inicia-se a postura, com duração média de 25 dias, e aproximadamente 8.000 ovos são incubados por um período variável de 30 a 35 dias. Eclodem desta postura aproximadamente 99% de larvas viáveis, que permanecem em jejum por um período de até seis meses, até o encontro do primeiro hospedeiro. A busca pelo hospedeiro se faz em função das condições ambientais diárias e ocorrência de estímulos tais como vibrações do solo e eliminação de gás carbônico pelos hospedeiros. Nestes, as larvas iniciam um repasto de linfa ou sangue e tecidos digeridos; essa fase alimentar tem duração de cerca de cinco dias, quando se desprendem do hospedeiro e buscam abrigo no solo para realizar uma muda para o estado ninfal, que ocorre em um período médio de 25 dias. Neste estágio, a ninfa pode aguardar em jejum por um período estimado de até um ano.

Encontrando o segundo hospedeiro, esta ninfa se fixa em sua pele e inicia um período de alimentação de, aproximadamente, 5 a 7 dias. Quando completamente ingurgitada, se solta e cai ao chão para realizar a segunda muda, no solo, em um nicho protegido (Serra-Freire e Cunha, 1987; Serra-Freire, 1993). Após aproximadamente 25 dias, emergem machos e fêmeas jovens que, dentro de sete dias, encontram-se aptos a realizarem seu terceiro estágio parasitário. Neste ambiente, podem permanecer em

jejum por um período de até 24 meses, aguardando o hospedeiro e demonstrando enorme resistência física aos fatores ambientais. Encontrando o hospedeiro, machos e fêmeas fixam-se, fazem um repasse tissular e sanguíneo, cruzam-se, iniciando, assim um novo ciclo. Esse ciclo biológico completo ocorre dos meses de outubro a março e caracteriza a ocorrência de apenas uma geração anual, nessa espécie (Labruna et al., 2002).

Ainda a respeito da reprodução em carrapatos, a oviposição é similar em carrapatos Ixodidae e Argasidae e envolve um sistema especializado não encontrado em outros Artrópodes, o órgão de Gené, o qual produz uma camada de cera que é depositada sobre a superfície dos ovos, no momento da oviposição (Schöl, 2001).

Em um dos primeiros relatos sobre oviposição em carrapatos, Gené (1848) observou que, quando esse órgão era perfurado com uma agulha, os ovos que a fêmea depositava murchavam rapidamente. Durante o ingurgitamento, o órgão de Gené cresce rapidamente, ocorrendo o desenvolvimento da sua forma inativa para o estágio secretório da cera ativo. O desenvolvimento é completado logo antes da postura dos ovos, estando em sincronia com o desenvolvimento ovariano (Lees e beatment, 1948).

Recentemente, Lima-Netto et al. (2012) mostraram que a cera produzida pelo órgão de Gené do *A. cajennense* (hoje considerado *A. sculptum*) é capaz de inibir a replicação de vírus, tais como o da gripe e o picornavírus, sugerindo que a mesma pode ser uma importante fonte de obtenção de produtos com atividade antiviral e antimicrobiana.

O órgão de Gené é uma estrutura em forma de saco que se expande somente durante a oviposição. Localiza-se na região anterior do idiossoma dorsal das fêmeas, entre a base do gnatossoma (aparelho bucal) e o escudo, na cavidade camerostomal dos

argasídeos ou na emarginação dos ixodídeos. Esta estrutura é ligada a glândulas cerosas, cuja secreção tem a função de lubrificar os ovos durante a oviposição, para mantê-los agrupados e para evitar a dessecação (Booth et al., 1992). As microscopias eletrônicas de transmissão e a de varredura revelaram que o órgão de Gené consiste de um saco duplo composto por um epitélio externo e um saco cuticular interno (Schöl et al., 2001). Além de impedir a dessecação dos ovos, em condições de baixa umidade, a camada de cera sobre a cutícula do ovo atua como uma barreira contra o ataque de microorganismo e permite que os ovos fiquem agrupados, e, alguns componentes (Booth, 1992). O ovo é “abraçado” pelas projeções do órgão de Gené e o vestíbulo vaginal é retraído simultaneamente. Após a retração do ovipositor, os palpos são posicionados quase paralelos uns aos outros e realizam movimentos circulares, enquanto o ovo é ligeiramente virado. O órgão de Gené, com o ovo aderido à sua superfície, rapidamente retrai e protraí diversas vezes, sendo seguido de movimentos ativos dos palpos. Em seguida, as projeções são invaginadas, ocorrendo a lenta retração do órgão de Gené. Finalmente, o órgão é retraído completamente, ficando o ovo aderido sobre a face dorsal do hipostômio. O órgão de Gené é evertido pela pressão hidrostática da hemolinfa e é recolhido por músculos (El Shoura, 1987). Com o retorno do gnatossoma a sua posição natural, o ovo tende a localizar-se sobre a face dorso-anterior do carrapato. Esses movimentos fazem com que toda a superfície de cada ovo seja completamente revestida pela secreção (Sieberz e Gothe, 2000). O estudo ultraestrutural do órgão de Gené em *Rhipicephalus microplus* revelou que três tipos de glândulas dermais podem estar envolvidas na síntese da cera do ovo: glândulas tubulares, glândulas lobulares e glândulas acessórias acinares. Essas glândulas produzem a cera de maneira coletiva (Booth, 1992). Apesar da estrutura do órgão de Gené ter sido descrita há mais de um

século, o conhecimento da sua morfologia bem como da sua função ainda são pouco estabelecidos.

Referências bibliográficas

Balashov, Y.S., 1972. Blood-sucking ticks (Ixodoidea) vectors of diseases of man and animals. Nauka, Leningrad. English Translation: Miscellaneous publications of the entomological Society of America. 8, 161-376.

Bazan, C.T., Camargo, G.O.A., Santos, M.A., Neves, M.F., 2008. Babesiose bovina. Revista Científica de Medicina Veterinária. 6, 11.

Booth, T. F., 1992. Observation on the composition and biosynthesis of egg wax lipids in the cattle tick, *Boophilus microplus*. Experimental e Applied Acarology.14,137.

Del Fiol, F.S., Junqueira, F.M., Rocha, M.C.P., Toletto, M.I., Barberato, F.S., 2010. A febre maculosa no Brasil. Rev Panam Saúde Pública. 27, 6, 461-466.

El Shoura, S. M., 1987. Fine structure of the Gene's organ in the camel tick *Hyalomma dromedarrii* (Ixodoidea: Ixodidae). Journal of Morphology.193, 1, 91- 98.

Flechtmann, C.H.W., 1990. Ácaros de importância médico-veterinária. 3. ed. São Paulo: Nobel, 192 p.

Fundação Nacional da Saúde. Doença de Lyme., 1990. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina tropical. 23, 3, 177-180.

Gené, G., 1848. Alla storianaturale de gliissodi. Mem. Rea Acad. Sci.Torino. 9, 751-786.

- Labruna, M.B., Kasai, N., Ferreira, F., Faccini, J.L., Gennari, S.M., 2002. Seasonal dynamics of ticks (Acari: Ixodidae) on horses in the State of São Paulo, Brazil. *Vet Parasitol.* 105, 1, 65-77.
- Labruna, M.B., Whitworth, T., Horta, M.C., Bouyer, D.H., McBride, J.W., Pinter, A., Popov, V., Gennari, S.M., Walker, D.H., 2004. *Rickettsia* species infecting *Amblyomma cooperi* ticks from an area in the State of São Paulo, where Brazilian spotted fever is endemic. *J Clin Microbiol.* 42, 1, 90-8.
- Labruna, M.B., Nava.S., Marcili, A., Barbieri. A.R. M., Nunes. P. H., Horta. M.C., Venzal. J. M., 2016. A new argasid tick species (Acari: Argasidae) associated with the rock cavy, *Kerodon rupestris* Wied-Neuwied (Rodentia: Caviidae), in a semiarid region of Brazil. *Parasites & Vectors.* 9, 511.
- Lees, A, D., Beament, J. W. L., 1948. An organ waxing in ticks. *QJMS.* 7, 291-332.
- Leite, M.C., Oliveira, P.R., Lopes, C.M., Freitas, M.V., 1998. A febre que vem do carrapato. *Vetorial- Vetores e pragas.* 22, 5, 80-3.
- Lima-Netto, S., Pinheiro, A., Nakano, E., Zucatelli, R.M., Barros-Battesti, D.M., Mendonça, R.Z., 2012. Antiviral effect of the egg wax of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). *Citotechnology.* 64, 5, 601-6.
- Massard, C.L., Fonseca, A.H., 2004. Carrapatos e doenças transmitidas comuns ao homem e aos animais. *A Hora Veterinária.* 135, 1, 15-23.
- Núncio, M.S., Alves, M.J., 2014. Doenças associadas a artrópodes vetores e roedores. Lisboa, Portugal: Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. 184 p.

- Schöl, H., Sieberz, J. E., Göbel, E., Gothe, R., 2001. Morphology and structural organization of Genes' organ in *Dermacentor reticulatus* (Acari: Ixodidae). *Experimental and applied Acarology*. 25, 327-352.
- Serra-Freire, N.M., Fulong, J., 1993. Comportamento de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) e *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) em infestações simultâneas em bovinos. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 2, 2, 99-104.
- Serra-Freire, N.M., Cunha, D.W., 1987. *Amblyomma cajennense*: Comportamento de ninfas e adultos como parasitos de bovinos. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 9, 5, 100-103.
- Steere, A.C., 2001. Lyme disease. *N Engl J Med*. 345, 115-25.
- Siebertz, J., Gothe, R., 2000. Modus operandi of oviposition in *Dermacentor reticulatus* (Acari: Ixodidae). *Experimental and Applied Acarology*. 24, 63-76.
- SUCEN- Superintendência de Controle de Endemias. Suplemento Especial do Boletim Epidemiológico Paulista. São Paulo: SUCEN, 2006. 60p.
- Yoshinari, N.H., Barros, P.J.L., Cruz, F.C.I., Oyafuso, L.K., Mendonça, M., Baggio, D., 1992. Clínica e sorologia da doença de Lyme no Brasil. *Revista Bras Reumatol*. 32, 57.

Morfodiferenciação do órgão de Gené em carrapatos fêmeas ingurgitadas

***Amblyomma sculptum* Berlese, 1888 (Acari: Ixodidae)**

Morphodifferentiation of the Gené's organ in female engorged *Amblyomma sculptum* Berlese, 1888

(Acari: Ixodidae) ticks

Marcelo Francisco dos Santos^{a,b}, Magna Aparecida Maltauro Soares^a, Maria Anete

Lallo^b, Darci Moraes Barros-Battesti^c, Solange de Lima-Netto^c, Diva Denelle Spadacci-

Morena^{a*}

^aLaboratório de Fisiopatologia, Instituto Butantan, São Paulo, Brasil

^bPrograma de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental, Universidade Paulista, São Paulo, Brasil

^cLaboratório de Parasitologia, Instituto Butantan, São Paulo, Brasil

* Autor correspondente

Resumo

Carrapatos fêmeas possuem um órgão, denominado órgão de Gené (OG), que tem participação essencial na oviposição e, conseqüentemente, no sucesso da reprodução desses animais. Apesar da estrutura do OG ter sido descrita há mais de um século e meio, a descrição da sua morfologia, bem como da sua função, no decorrer do processo reprodutivo, ainda é pouco conhecida. O presente estudo descreveu a morfohistoquímica do OG de *A. sculptum* ingurgitados, no intervalo entre o desprendimento do hospedeiro, após a alimentação, até próximo da oviposição. Os resultados mostraram que o OG nessa espécie é constituído por 2 pares de glândulas e que as células glandulares que as compõem estão unidas, lateralmente, por um sistema imbricado de membranas que se interdigitam e por complexos juncionais que, gradativamente vão desaparecendo, à medida que o animal está próximo da oviposição. Os resultados histoquímicos mostraram que as inclusões lipídicas aumentaram, no

decorrer do processo de desenvolvimento do OG. Contrariamente, a quantidade de glicogênio foi gradativamente diminuindo e, na fase que antecedeu a oviposição, estava restrita a poucas células glandulares. Já as proteínas foram evidenciadas somente na fase que antecedeu a oviposição. Diante desses fatos, podemos afirmar que o glicogênio foi utilizado para o metabolismo interno da célula enquanto que os lipídeos e proteínas, provavelmente, foram usados para compor a cera produzida pelo OG. A morfologia ultraestrutural dessas células mostrou que as mesmas possuíam baixa atividade sintética, sugerindo que os precursores da secreção são oriundos da hemolinfa, sendo as células glandulares apenas um local para a organização do produto final.

Abstract

Female ticks possess an organ, Gené's organ (GO), which has an essential involvement in the oviposition and consequently the reproductive success of these animals. Despite the structure of GO has been described more than a century and a half, the description of its morphology and its function in the course of the whole reproductive process is still unknown. This study described the morphohistochemistry of the GO in the tick *A. sculptum* after feeding, from the detachment of the host until near of the onset of oviposition. The results showed that the GO in this specie consists of two pairs of glands, cranial and caudal pairs. The glandular cells that compose the glands are joined together laterally by an imbricated system of membranes which interdigitate themselves and where junctional complexes are also observed. These characteristics of the membranes are disappearing as the animal is near the oviposition. The histochemical results showed that the lipid inclusions increased, during the development of GO. Contrary, the glycogen gradually decreased, and at the stage preceding the oviposition, it was restricted to a few glandular cells. Proteins were observed only near the onset of

oviposition. Based on these histochemistry results, we concluded that glycogen was used for internal metabolism of the cell while the lipids and proteins are probably used to compose the wax of the GO. The ultrastructural morphology of the glandular cells showed that they had low synthetic activity, suggesting that secretion precursors are from the hemolymph, and the cells are only a place for the organization of the final product.

Palavras-chave : Ixodideo. *Amblyomma sculptum*. Órgão de Gené. Fêmea ingurgitada. Morfohistoquímica. Cera do ovo

Key words: Ixodideo. *Amblyomma sculptum*. Gené's organ. Engorged female. Morphology. Histochemistry. Egg wax

Introdução

O órgão de Gené (OG) é observado somente nas fêmeas de carrapatos, estando ausente nos machos e nos estágios imaturos desses animais, ou mesmo em outros grupos de acarídeos (Arthur, 1953). Trata-se de uma estrutura especializada na produção de cera que se deposita sobre a superfície dos ovos, durante a oviposição (Lees e Beatment, 1948; Arthur, 1953). Está localizado na região anterior do idiossoma dorsal, entre a base do gnatossoma e o escudo, na cavidade camerostomal dos argasídeos e, nos ixodídeos, na emarginação (Booth et al., 1992). Em fêmeas em jejum, o Gené é constituído por um saco cuticular ligado lateralmente por dois cornos (Schöl et al., 2001a).

Na maioria dos ixodídeos, a gametogênese e a cópula ocorrem quando os carrapatos estão se alimentando no hospedeiro. Nesse momento, ocorrem alterações

fisiológicas expressivas nas fêmeas, tais como, o rápido ingurgitamento, síntese dos elementos vitelogênicos para a maturação dos oócitos, expansão da vagina para facilitar a passagem dos ovos, entre outras (Sonenshine e Roe, 2013). O OG, por sua vez, cresce rapidamente, estando em sincronia com o desenvolvimento ovariano (Lees e Beament, 1948).

A sequência de eventos desse órgão, durante a oviposição, foi detalhadamente documentada em *Ornithodoros moubata* e *Ixodes ricinus* (Lees e Beament, 1948), em *Ixodes hexagonus* (Arthur, 1953) e em *Dermacentor reticulatus* (Sieberz e Gothe, 2000). Resumidamente, durante a oviposição, o gnatossoma, se movimenta para a região ventral do animal ficando, dessa forma, bem em frente à abertura vaginal. Posteriormente, o órgão everte, passando por cima do gnatossoma e se aproxima do ovo. A aproximação do ovo em direção ao OG é facilitada pela vagina, que se encontra prolapsada. A seguir, ocorre a retração da vagina e o ovo, por sua vez, toca o OG, que o abraça com a ajuda dos cornos. Logo após, o órgão infla e desinfla várias vezes e, dessa forma, o ovo é envolvido por uma cera produzida por esse órgão. Em seguida, com a ajuda dos palpos, o ovo é levado para o dorso do animal. A cada postura de um ovo, o Gené everte, com o auxílio da pressão hidrostática da hemolinfa e é recolhido para dentro da cavidade do carrapato utilizando os músculos retratores, que estão ligados a esse órgão. Quando esse órgão é impedido de secretar essa substância sobre os ovos, a taxa de eclosão diminui notavelmente, mesmo em condições adequadas de temperatura e umidade (Kakuda et al., 1992).

Além de impedir a dessecação dos ovos (Lees e Beament, 1948), a cera produzida por esse órgão permite que os mesmos fiquem agrupados (Lees e Beament, 1948; Booth et al., 1985). Ainda, a camada de cera depositada sobre a casca do ovo atua

como uma barreira contra o ataque de microrganismos (Arrieta et al., 2006; Lima-Netto et al., 2011; 2012).

Apesar do OG ter sido descrito há mais de um século e meio e de existir vários estudos à cerca dele, tanto em argasídeos como ixodídeos, a grande maioria deles mostram esse órgão em animais em jejum ou em oviposição. Dessa forma, um estudo mostrando a sua cinética, incluindo as alterações morfohistoquímicas, que ocorrem nesse órgão durante todo o processo reprodutivo, é oportuno.

Durante muito tempo o carrapato *A. sculptum* Berlese foi erroneamente identificado como *Amblyomma cajennense* (Fabricius), considerado o mais importante vetor de *Rickettsia rickettsia* nas Américas. No entanto, recentemente, estudos morfológicos e moleculares em populações de *A. cajennense* na América do Sul, demonstraram que há um complexo de espécies sob essa taxonomia, que atualmente está dividida em 6 espécies (Beati et al., 2013). A espécie *A. cajennense* “sensu stricto” está distribuída em toda a região amazônica e no estado de Mato Grosso (Martins et al., 2016), enquanto *A. sculptum* ocorre nas zonas úmidas setentrionais da Argentina, áreas subjacentes da Bolívia e do Paraguai, e Centro-Oeste brasileiro (Nava et al., 2014).

Especificamente envolvendo o *A. sculptum*, até o momento, não há nenhum relato da descrição do OG. Assim, torna-se relevante o estudo mais aprofundado do mesmo, para que se entenda melhor a reprodução desses animais, buscando melhores formas do seu controle. Ainda, do ponto de vista taxonômico, o estudo do órgão pode contribuir para a identificação de espécies.

Embora o conhecimento do OG isoladamente não seja suficiente para o controle dos carrapatos, que representam um sério problema de saúde pública, o controle desses animais depende, com certeza, de um conhecimento da morfofisiologia do artrópode em questão que pode servir para racionalizar os procedimentos existentes ou para descobrir

os pontos fracos da espécie em questão. Portanto, o presente estudo teve como objetivo descrever a morfologia do OG de fêmeas ingurgitadas de *A. sculptum*, no intervalo entre o desprendimento do hospedeiro, após a alimentação, até próximo da oviposição. O estudo histoquímico do órgão também foi considerado, com o objetivo de identificar a natureza química dos constituintes celulares que compõem esse órgão.

Materiais e métodos

Carrapatos

Foram utilizados carrapatos fêmeas adultas (1ª geração) de *A. sculptum* obtidos de uma colônia mantida no Laboratório de Parasitologia do Instituto Butantan. Brevemente, a colônia foi iniciada utilizando-se fêmeas e machos coletados da vegetação com armadilha de CO₂ (Oliveira et al., 2000), no Parque Ecológico do Tietê (Núcleo Engenheiro Goulart, São Paulo, Brazil - 23° 49' de latitude Sul e 46° 52' de longitude Oeste). Coelhos (*Oryctolagus cuniculus*), da raça Branco Nova Zelândia, pesando aproximadamente 2kg, procedentes do Biotério Central do Instituto Butantan e certificados de que não foram usados anteriormente para infestações por carrapatos, foram utilizados como hospedeiros para obtenção de larvas, ninfas e adultos, de acordo com Neitz et al. (1971). Para manter os carrapatos em todas as suas fases biológicas (ovo, larva, ninfa e adulto) e em todos os períodos do estudo, foi utilizada uma estufa incubadora BOD com temperatura de 27°C, umidade em torno de 85%, e com fotoperíodo de 12/12hora. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética de Uso Animal do Instituto Butantan (CEUAIB 1279/14).

Delineamento Experimental

Carrapatos machos e fêmeas foram submetidos à infestação, realizada sempre no período da manhã. O coelho foi observado diariamente para o acompanhamento dos processos de fixação e ingurgitamento dos carrapatos.

Após essa fase inicial, o coelho foi examinado diariamente, às 8:00h, para a retirada dos carrapatos que se desprenderam do hospedeiro e que foram utilizados nos experimentos. Às 15:00h, o coelho era examinado novamente para a retirada de carrapatos soltos, que foram descartados. Assim, para cada tempo estudado, tivemos um tempo 0h de queda arbitrário, com uma variação de até 17h.

Para este estudo, o OG foi coletado nos seguintes tempos: 0h de queda, 5 dias após a queda e 7 dias após a queda. As coletas das fêmeas ingurgitadas acima citadas foram realizadas sempre no período da manhã (8:00h). À medida que os carrapatos, totalmente ingurgitados, se desprenderam do hospedeiro, foram colocados em placas de petri, devidamente identificadas, e em estufa incubadora BOD, até o momento de uso.

O OG de um grupo de carrapatos fêmeas em jejum também foi coletado. Foram utilizados 10 carrapatos por grupo.

Processamento do órgão de Gené para exame ao microscópio de luz

Os carrapatos foram dissecados sob microscópio estereoscópico, sendo removida a superfície dorsal do corpo (idiossoma) para a exposição do órgão. Esse procedimento foi realizado com o carrapato imerso em solução salina fisiológica para inseto. Após a retirada do órgão, parte do material foi fixado em álcool etílico 70% para posteriormente ser observado e fotografado sob lupa estereoscópica Leica, modelo M205 A, e programa de imagem Leica Application Suite versão 3.1.0. A outra parte foi fixada em solução de formol-cálcio por 12h, e em solução aquosa de tetróxido de ósmio

a 1%, por 15 min, para o estudo histológico. Para tanto, o material foi desidratado em série crescente de álcool etílico (70% a 100%) e incluído em historesina. Os cortes histológicos, com 3µm de espessura, foram corados pelo azul de metileno.

Testes histoquímicos foram realizados para detectar proteínas (Azul de Bromofenol - Pearse, 1985), polissacarídeos (PAS - Junqueira & Junqueira, 1983) e lipídeos (Sudan Black - Bayliss and Adams, 1972). Especificamente para a detecção de lipídeos, após a fixação, o órgão foi pós-fixado em solução aquosa de tetróxido de ósmio a 1%, por 1h e, então, incluído diretamente em historesina, sem ser submetido à desidratação.

Os cortes foram observados e fotografados em microscópio de luz DM LS (Leica), com captador de imagem DFC420 (Leica) e programa de imagem Leica Application Suite versão 3.1.0.

Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) do órgão de Gené

Após a remoção, o OG foi fixado em glutaraldeído a 2% em tampão cacodilato de sódio 0,1M (pH 7,2-7,4) por aproximadamente 18h, a 4°C. Em seguida, o material foi pós-fixado em tetróxido de ósmio a 1% em tampão cacodilato de sódio, por 1 h à temperatura ambiente. A seguir, foi desidratado em etanol, utilizando-se concentrações crescentes (30% a 100%), e, posteriormente, transferido para óxido de propileno e embebido em resina Epon. Os cortes ultrafinos foram contrastados em solução aquosa de acetato de uranila saturada e em citrato de chumbo e examinados no microscópio eletrônico LEO EM 906E, a 80kV.

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) do órgão de Gené

O OG foi fixado em solução de Karnowsky (1965), por aproximadamente 3h, à temperatura ambiente. Em seguida, foi pós-fixado em solução aquosa de tetróxido de ósmio a 1%, por 1h a temperatura ambiente, e desidratado em concentrações crescentes de álcool etílico (30% a 100%), seco ao ponto crítico de CO₂, metalizado com ouro e examinado e fotografado no Microscópio Eletrônico de Varredura FEI Quanta 250, a 10 kV.

Resultados e Discussão

As figs. 1A e 1C, mostram que existe uma notável diferença de tamanho entre o carrapato *A. sculptum* em jejum e aquele totalmente ingurgitado. De acordo com Kaufman (1989; 2007), após o ingurgitamento, algumas espécies podem chegar a pesar de 100 a 200 vezes o seu peso inicial. Ademais, durante a ingesta de sangue, alterações fisiológicas profundas ocorrem nessas fêmeas visando o sucesso reprodutivo (Sonenshine e Roe, 2013). Nesse sentido, especificamente com relação ao OG, além do aumento do seu tamanho, ocorrem alterações morfológicas notáveis com o objetivo precípuo de produzir uma substância cerosa com propriedades defensivas para os ovos, em face às condições adversas do meio ambiente onde esses ovos vão permanecer até o momento da eclosão. Em jejum, o OG do *A. Sculptum* era composto pelo corpo, que se abria na emarginação, e um par de corno, posterior, de cada lado (fig. 1B). Já nos animais que sofreram o repasto e se desprenderam espontaneamente do hospedeiro, a morfologia desse órgão era visivelmente diferente. Nesses animais, o órgão era composto por 4 cachos de glândulas tubulares, sendo que um par estava ligado ao corpo (glândulas craniais) e o outro, aos cornos (glândulas caudais) (fig. 1D). As glândulas craniais e as caudais estavam ligadas a essas regiões (corpo e cornos) por ductos

calibrosos, denominados ductos eferentes principais (fig. 1D). Morfologia semelhante a esta acima descrita foi observada em outros ixodídeos, tais como em *Dermacentor reticulatus* (Schöl et al, 2001a), *Haemaphysalis longicornis* (Kakuda et al, 1992; 1995), *Hyalomma dromedarii* (El Shoura, 1987) e *Boophilus microplus* (Booth et al., 1985; Booth, 1989) – atualmente, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Especificamente envolvendo os argasídeos, a morfologia desse órgão é diferente, sendo constituído por apenas um par de glândulas (*Argas walkerae* - Schöl et al, 2001b; *O. moubata* - Lees and Beatment, 1948), entretanto a função é a mesma, o que indica que essa estrutura tem grande importância no processo reprodutivo dos carrapatos em geral, mesmo pertencendo a diferentes famílias.

No animal em jejum, ao MEV, foram identificados o corpo e os cornos, constituintes do OG. Além disso, foi possível notar a presença de dois pares de pequenas protuberâncias localizados tanto no corpo como nos cornos do órgão. Trata-se de brotos epiteliais, aqui representados por um curto ducto ligado a uma estrutura, mais apical, semelhante a dedos curtos (figs. 2A, B, C). Estrutura semelhante foi descrita em *D. reticulatus* (Schöl et al., 2001a), *H. dromedarii* (El Shoura, 1987) e em *B. microplus* (Booth et al., 1985; Booth, 1989).

Em 0h de queda, esses brotos epiteliais se apresentaram desenvolvidos e deram origem a 4 conjuntos de glândulas, duas craniais e duas caudais, com morfologia tubular (figs. 2D, E, F) e que se ligavam ao órgão através dos ductos eferentes principais (fig. 2E). No 5º dia de queda, as glândulas se apresentaram mais desenvolvidas, em maior número e notou-se o início da ramificação das mesmas (figs. 2G, H, I). No 7º dia, as glândulas apresentaram maior quantidade de túbulos (figs 2J, K, L). Nessas duas últimas etapas, quando as glândulas foram observadas ventrodorsalmente, não foi possível visualizar o corpo do órgão. Dessa forma, foi necessário remover o escudo e

posicionar o OG de forma dorsoventral (figs. 2G, J), para a melhor observação do corpo. Além do desenvolvimento das glândulas, também houve um aumento gradual da área do corpo do OG (figs A, G, J), como já descrito para outros carrapatos (Schöl et al., 2001a; 2001b), com a finalidade de armazenar o produto secretado por essas glândulas.

Durante o processo de oviposição, o OG everte e retrai inúmeras vezes com o objetivo de revestir os ovos com a cera produzida. A eversão é realizada com o auxílio da pressão hidrostática da hemolinfa e a retração é realizada por músculos retratores, ligados por uma das suas extremidades ao OG e na outra, na parede dorsal do corpo do animal (Lees e Beament, 1948, Booth et al., 1985). No nosso estudo, observamos que grande quantidade de feixes de fibras musculares estavam presentes próximos ao OG, em todas as etapas analisadas (figs. 2A, D, G, J).

Histologicamente, o OG de fêmeas em jejum era uma estrutura saculiforme constituída por uma única camada de células epiteliais achatadas, mais externa, e uma cutícula, próxima da luz em direção à emarginação (fig. 3A). Na região do broto epitelial, o epitélio se apresentou cúbico (fig. 3B). Em 0h de queda, observou-se, nessa região, o início do desenvolvimento de glândulas constituídas por túbulos simples, contíguos ao corpo do OG (figs. 3C, D). As células glandulares presentes nesta região eram cúbicas, com núcleo central, contendo 1 ou 2 nucléolos proeminentes, indicando se tratar de células jovens. No citoplasma já podia ser visto algumas inclusões lipídicas que, devido à técnica empregada, foi observada somente sua imagem negativa (fig. 3D). No 5º dia de queda, as células constitutivas da parte secretória da glândula adquiriram aspecto colunar, com núcleo próximo da membrana basal, indicando início de polaridade dessas células (figs. 3E, F). Nesta etapa notou-se a presença de uma maior quantidade de inclusões lipídicas, com formas irregulares (depósito de lipídios), localizadas no polo basal da célula, o aparecimento de uma região mais clara entre as

paredes laterais das células epiteliais, e o início do aparecimento de uma substância amorfa, na luz da glândula (figs. 3E, F). No 7º dia de queda, as células glandulares se apresentavam mais altas que aquelas observadas no 5º dia. Comparando com as etapas anteriores, elas se apresentavam desalinhadas, isto é, em diferentes alturas, lembrando um epitélio pseudoestratificado (figs. 3G, H). No citoplasma dessas células, foi observada, no polo basal, uma grande área clara, provavelmente depósito lipídico, enquanto que no polo apical foram observadas inclusões lipídicas típicas (figs. 3F, H). Essa diferença na distribuição dos componentes citoplasmáticos, indica que essas células possam ter diferentes funções, característica das células que possuem polaridade. A luz das glândulas se apresentava completamente preenchida por uma substância amorfa e também por restos de células que se destacaram do epitélio glandular (fig. 3H). Comparando-se a luz da glândula, nos diferentes tempos estudados, ficou claro que houve um gradativo aumento do produto secretado por essas células (figs. 3D - H). Esse produto para os ductos eferentes principais de cada glândula que, por sua vez, se abrem na luz, entre o epitélio e o saco cuticular.

Nossos resultados ultraestruturais mostraram que ocorreu uma acentuada distensão da cutícula, em toda a extensão do OG. Assim, mais próximo das células epiteliais estava presente a endocutícula e mais próximo da luz do OG era observado a epicutícula (fig. 4A). Entre essas duas cutículas, no espaço intracuticular, foi possível observar a presença de um material floculento e relativamente eletrondenso que correspondia à secreção (figs. 4A, B). Esse processo coincidiu com o início da produção da secreção pelas glândulas (5º e 7º dias de queda). Na epicutícula foram encontrados conjuntos de canais, espaçadamente distribuídos, que atravessavam e alcançavam a luz do OG (fig. 4B), ficando claro que o transporte da secreção para a luz do órgão é realizado por esses canais. Esse complexo de anéis porosos foi denominado por Booth

(1989) e Schöl et al. (2001a) de “pits”. O acúmulo dessa secreção provocou também a distensão do corpo do órgão de Gené, como já referido anteriormente neste estudo (vide MEV).

A ultraestrutura das células glandulares mostrou que as membranas laterais de células vizinhas se apresentaram intensamente interdigitadas, onde complexos juncionais podiam ser observados (fig. 4C), e correspondiam às áreas claras observadas entre as células glandulares a partir do 5º dia de queda, referidas anteriormente neste estudo. No 7º dia de queda, a membrana plasmática lateral de células contíguas não se apresentavam tão unidas, estavam bastante desarranjadas e muitas células vizinhas já não faziam contatos entre si (fig. 4D). Os complexos juncionais também se apresentaram em menor número (fig. 4D). Possivelmente, esses complexos foram importantes para a comunicação inicial das células, isto é, para o transporte de substâncias entre as células vizinhas. Estudos mais detalhados desses complexos juncionais estão em andamento.

Ainda, a morfologia ultraestrutural dessas células mostrou que as mesmas possuíam baixa atividade sintética, como aquelas que constituem as glândulas sudoríparas de mamíferos, que secretam principalmente substâncias transportadas do sangue para a luz da glândula (Junqueira e Carneiro, 2008). O retículo endoplasmático rugoso foi observado em pequena quantidade, disperso no citoplasma, e o retículo liso não foi observado. As mitocôndrias eram alongadas e com cristas em prateleiras, e estavam dispersas no citoplasma. Foi comum observá-las no polo basal, próximas a membrana basal (figs. 4D - F). Talvez essas mitocôndrias estejam envolvidas no transporte de moléculas provenientes da hemolinfa. Para isso, essas moléculas deverão transpor a membrana basal aí existente (fig. 4E). Nessa região, foram observadas inúmeras invaginações da membrana plasmática basal, aqui denominadas labirinto

basal, ligadas à membrana basal por contatos focais, semelhantes a hemidesmosomos. O labirinto basal aumenta a superfície de contato das células glandulares com a membrana basal, o que facilitaria a entrada de moléculas da hemolinfa. A composição química da membrana basal presente no OG não é conhecida, mas, assim como para insetos (Locke, 1991), poderiam ser constituídas por moléculas eletricamente carregadas que contribuiriam para o papel seletivo por ela exercido na absorção de substâncias da hemolinfa pelas células epiteliais.

Nas datas onde as glândulas estavam em franca produção (5º e 7º dias), inclusões lipídicas eram vistas em maior quantidade. Na região basal, uma grande área eletrolucente, com aspecto lipídico, entremeada por material floculento foi observada (figs. 4E, F). Justaposto a esse depósito lipídico foram observadas inclusões lipídicas características, o que sugere que as mesmas foram formadas a partir desse depósito (figs. 4E, F). Todas as observações acima descritas sugerem que os precursores da secreção são oriundos da hemolinfa, o que já havia sido sugerido por Kakuda et al. (1995).

Neste trabalho, as características bioquímicas das células glandulares também foram estudadas, no decorrer do desenvolvimento do órgão, e os resultados mostraram que glicogênio foi encontrado na região dos brotos epiteliais dos animais em jejum (fig. 5A), na região de transição entre o epitélio de revestimento e o glandular, em 0h de queda (fig. 5B) e no citoplasma das células glandulares, no 5º dia de queda (fig. 5C). Especificamente no 5º dia, a reação foi mais intensa na região basal das células e, na porção apical, estava associada a inclusões lipídicas (fig. 5C). Essas áreas PAS positivas são consistentes com a presença de polissacarídeos. No 7º dia de queda, apenas umas poucas células apresentavam glicogênio (fig. 5D). Dentre todas as fases de desenvolvimento estudadas, a reação de Bromofenol foi positiva no citoplasma das

células glandulares, apenas no 7º dia de queda (fig. 5E). Esse resultado sugere uma atividade de síntese protéica mais tardia, próxima ao período de oviposição.

A identificação de substratos intracelulares relativos à produção e secreção da cera é fundamental para o entendimento da fisiologia do órgão de Gené. Como era esperado, nas fêmeas em jejum não foram evidenciadas inclusões lipídicas no órgão de Gené (dados não mostrados), entretanto, a presença dessas inclusões começou a ser observada no citoplasma das células glandulares a partir de 0 hora de queda e, marcadamente, nos períodos subsequentes (figs. 6A, B, C). Embora a natureza química da secreção produzida pelo OG ainda é desconhecida, nossos resultados histoquímicos mostraram que as inclusões lipídicas aumentaram no decorrer do processo de desenvolvimento do OG. Contrariamente, a quantidade de glicogênio foi gradativamente diminuindo e, no 7º dia, estava restrita a poucas células glandulares. Já as proteínas foram evidenciadas somente no 7º dia.

Diante dos resultados acima descritos, concluiu-se que o glicogênio foi utilizado para o metabolismo interno da célula enquanto que os lipídeos e proteínas, provavelmente, foram usados para compor a cera produzida pelo OG, pois esta fase é exatamente a que antecede a oviposição. Ainda, através dos estudos morfológicos, verificou-se que o desenvolvimento do OG de *A. sculptum*, se fez de maneira contínua e progressiva, até próximo da oviposição (7º de queda).

Referências bibliográficas

- Arrieta M.C., Leskin B.K., Kaufman, W.R., 2006. Antimicrobial activity in the egg wax of the African cattle tick *Amblyomma hebraeum* (Acari: Ixodidae). Exp Appl Acarol. 39, 297–313
- Arthur, D.R., 1953. The morphology of the British Prostriata with particular reference to *Ixodes hexagonus*. Parasitology. 42,161-185.
- Bayliss, H., Adams, C.W. M., 1972. Bromine Sudan Black (BSB). A general stain for tissue lipids including free cholesterol. Histomichemical Journal. 4, 505.
- Beati, L., Nava, S., Burkman, E. J., Barros-Battesti, D., Labruna, M. B., Guglielmone, A., A., Càceres, A.G., Guzman, C. C., León, R., Durden, L.A., Faccini, J. L. H., 2013. *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae), the Cayenne tick: phylogeography and evidence for allopatric speciation. BMC Evol. Biol.13, 267.
- Booth, T. F., Beadle, D. J., Hart, R. J., 1985. An ultrastructure and physiological study of the retractor muscles of Gené's organ in the cattle ticks *Boophilus microplus* and *Amblyomma variegatum*. Exp. Appl. Acarol. 1, 165-177.
- Booth, T. F., 1989. Wax lipid secretion and ultrastructural development in the egg-waxing (Gené's) organ in ixodid ticks. Tissue & Cell. 21, 113-122.
- Booth, T. F., 1992. Observation on the composition and biosynthesis of egg wax lipids in the cattle tick, *Boophilus microplus*. Experimental e Applied Acarology.14,137.
- El Shoura, S. M., 1987. Fine structure of the Gene's organ in the camel tick *Hyalomma dromedarrii* (Ixodoidea: Ixodidae). Journal of Morphology.193, 1, 91- 98.

- Junqueira, L. C., Carneiro, J., 2008. Histologia Básica. 11.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 524 p.
- Junqueira, L. C., Junqueira, L. M., 1983. Técnicas básicas de citologia e histologia. São Paulo: Santos.
- Kakuda, H., Möri, T., Shiraishi, S., 1992. Functional morphology of Gené's organ in *Haemaphysalis longicornis* (Acari: Ixodidae). Experimental & Applied Acarology. 16, 263-275.
- Kakuda, H., Möri, T., Shiraishi, S., 1995. Effects of feeding and copulation on ultrastructural changes of the tubular glands of Gené's organ in female *Haemaphysalis longicornis* (Acari: Ixodidae). Journal Acarol. Soc. Jpn. 4(1):1-13. May 25 4 (1), 1-13.
- Karnovsky, M.J., 1965. Formaldeyde-Glutaraldeyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. Journal Cell Biol. 27, 137a.
- Kaufman, W.R., 1989. Tick-host interaction: A synthesis of current concepts. Parasitology Today. 5(2), 47-56.
- Kaufman, W.R., 2007. Gluttony and sex in female ixodid ticks: How do they compare to other blood-sucking arthropods?. Journal Insect phys. 53, 264-273.
- Lees, A. D., Beament, J. W. L., 1948. An organ waxing in ticks. QJMS. 7, 291-332.
- Lima-Netto, S., Mendonça, R.Z., Franzolin, M.R., Utescher, C.L., Orozco, S., Máximo-Espindola, C., Labruna, M., Barros-Battesti, D.M., 2011. An interesting antimicrobial activity of egg wax from *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). Syst Appl Acarol. 16, 3–6.

- Lima-Netto, S., Pinheiro, A., Nakano, E., Zucatelli, R.M., Barros-Battesti, D.M., Mendonça, R.Z., 2012. Antiviral effect of the egg wax of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). *Citotechnology*. 64, 5, 601-6.
- Locke, M., 1991. Insect epidermal cells, in: *Physiology of the insect epidermis* (K. Binnington and A. Retnakaran, eds.). CSIRO, Melbourne.
- Martins, T.F., Barbieri, A. R. M., Costa, F. B., Terassini, F. A., Camargo, L. M. A., Peterka, C. R. L., Pacheco, R. C., Dias, R. A., Nunes, P. H., Marcili, A., Scolfield, A., Campos, A. K., Horta, M. C., Guilloux, A. G. A., Benatti, H. R., Ramirez, D. G., Barros-Battesti, D.M., Labruna, M.B., 2016. Geographical distribution of *Amblyomma cajennense* (sensu lato) ticks (Parasitiformes: Ixodidae) in Brazil, with description of the nymph of *A. cajennense* (sensu stricto). *Parasites & Vectors*. 9, 186.
- Nava, S., Beati, L., Labruna, M. B., Cáceres, A. G., Mangold, A. J., Guglielmone, A. A., 2014. 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 Ticks Borne Dis*. 5(3), 252-76.
- Neitz, W, O., Boughton, F., Waltrs, H, S., 1971. Laboratory investigations on the life-cycle of the Karoo paralysis tick *Ixodes rubincundus* (Neumann, 1904). *Onderstepoort Journal Veterinary Research*. 38 (3), 215-224.
- Oliveira, P. R., Borges, L. M. F., Lopes, C. M. L., Leite, R. C., 2000. Population dynamics of the free-living stages of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) on pastures of Pedro Leopoldo, Minas Gerais State, Brazil. *Vet Parasitol*. 92 (4), 295-301.

Pearse, A.G.E., 1985. Histochemistry: Theoretical and applied , v.2. Edinburgh: Churchill Livingstone.

Schöl, H., Sieberz, J, E., Göbel, E., Gothe, R., 2001. Morphology and structural organization of Gene's organ in *Dermacentor reticulatus* (Acari: Ixodidae). Experimental and applied Acarology. 25, 327-352.

Schöl, H., Sieberz, J, E., Göbel, E., Gothe, R., 2001. Morphology and structural organization of Gene's organ in *Argas walkerae*. Medical and Veterinary Entomology.15, 422-432.

Siebertz, J., Gothe, R., 2000. Modus operandi of oviposition in *Dermacentor reticulatus* (Acari: Ixodidae). Experimental and Applied Acarology. 24, 63-76.

Sonenshine, D. E., Roe, R. M., 2013. Biology of ticks. V.1. Oxford University press. 540p.

Legendas das figuras

Fig. 1. Fotomicrografias. **A-** Visão dorsoventral de fêmea *A. sculptum* em jejum. **B-** Visão ventrodorsal do órgão de Gené de carrapato em jejum. Corpo do órgão (C). Cornos (*). Emarginação (Em). Músculos retratores (Mu). **C-** Visão dorsoventral de fêmea de *A. sculptum* ingurgitada. **D-** Visão ventrodorsal do órgão de Gené de carrapato ingurgitado. Ducto eferente principal (DP). Glândula cranial (GCr). Glândula caudal (GCa).

Fig. 2. Eletromicrografias. **A-** Visão dorsoventral do OG de animal em jejum. Corpo (C). Parte dos dois cornos posteriores (*). Músculos retratores (Mu). Emarginação (Em). Escudo (Es). **B-** Broto epitelial localizado nos cornos do OG (*). **C-** Broto

epitelial localizado no corpo do OG (*). **D, E e F** - Visão ventrodorsal do OG em 0 hora de queda. Glândulas craniais (GCr). Glândulas caudais (GCa). Escudo (Es). Músculo (Mu). Glândulas tubulares (G). Ducto eferente principal (DP). Glândulas tubulares (G). **G**- Visão dorsoventral do OG em 5° dia de queda. Corpo (C). Glândulas craniais (GCr). Glândulas caudais (GCa). Músculos (Mu). **H**- Visão ventrodorsal do OG. Glândulas craniais (GCr). Glândulas caudais (GCa). **I**- Detalhe da glândula. Glândulas (G). Músculos retratores (Mu). **J**- Visão dorsoventral do OG em 7° dia de queda. Corpo (C). Emarginação (Em). Cornos posteriores (*). Músculos (Mu). **K**- Visão ventrodorsal do OG em 7° dia de queda. Glândulas caudais (GCa). Glândulas craniais (GCr). Escudo (Es). **L**- Detalhe das glândulas ramificadas.

Fig. 3. Fotomicrografias. A, B - OG de animal em jejum. Corpo (C). Cornos (*). Células epiteliais (setas). Músculo retratores (Mu). Escudo (Es). Luz do OG (L). Broto epitelial localizado no corpo do OG (*). Cutícula (cc). Luz (L). Células epiteliais de revestimento (seta). **C, D** - OG de animal em 0h de queda. Corpo (C). Glândula tubular (G). Músculos retratores (Mu). Núcleo (N). Luz da glândula (L). Inclusões lipídicas (Li). **E, F** - OG de animal no 5° dia de queda. Glândulas tubulares (G). Luz da glândula (L). Músculos (Mu). Substância amorfa (S). Depósito de lipídios (DLi). **G, H** - OG de animal no 7° dia de queda. Luz da glândula (L). Depósito de lipídios (DLi). Azul de Metileno.

Fig. 4. Eletromicrografias. A- Membrana basal (Mb). Núcleo (N). Endocutícula (en). Espaço intracuticular (Eic). Epicutícula (ep). **B**- Epitélio de revestimento do corpo do OG (Ep). Espaço intracuticular (Eic). Pit (setas). Detalhe de um pit. **C**- Núcleo (N). Junções (J). Interdigitações (*). Inclusões lipídicas (Li). **D**- Inclusões lipídicas (Li).

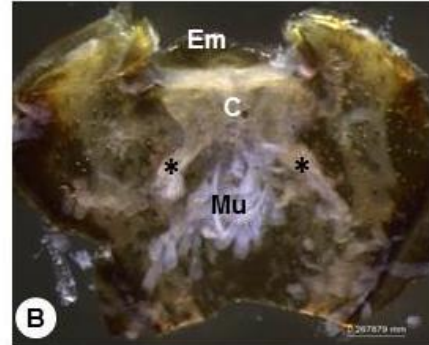
Núcleo (N). Interdigitações (*). **E-** Interdigitações (*). Mitocôndrias (M). Núcleo (N). Labirinto basal (Lba). Depósito de lipídios (DLi). **F-** Inclusões lipídicas (Li). Núcleo (N). Depósito de lipídios (DLi). Figs. 4A, B, D, E, F – 7º dia de queda do hospedeiro. Fig. 4C- 5º dia de queda do hospedeiro.

Fig. 5. Fotomicrografias. **A-** OG de animal em jejum. Corpo (C) Cornos (*). Músculo (Mu). Escudo (Es). Broto epitelial (br). **B-** OG de animal em 0 hora de queda. Região de transição de células pavimentosas para cúbicas (T). Corpo (C). **Inserto-** Detalhe da região de transição (*). **C-** OG de Animal no 5º dia de queda. Núcleo (N). Substância amorfa (S). **D-** Glândulas do OG de animal no 7º dia de queda. **E-** Luz da glândula (L). Núcleo (N). **A, B, C, D** (PAS). **E** (Azul de Bromofenol).

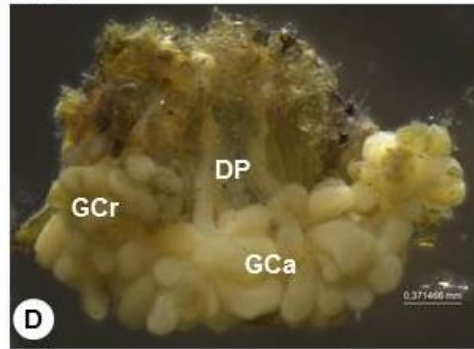
Fig. 6. Fotomicrografias. **A-** OG de animal em 0 hora de queda. Corpo (C). Transição (T). Luz da glândula (L). **Inserto:** Detalhe das inclusões lipídicas no citoplasma das células glandulares. **B-** Glândula do OG de animal no 5º dia de queda. Núcleo (N). Luz da glândula (L). **C-** Glândula do OG de animal de 7º dia de queda. Luz da glândula (L).

1.

Jejum

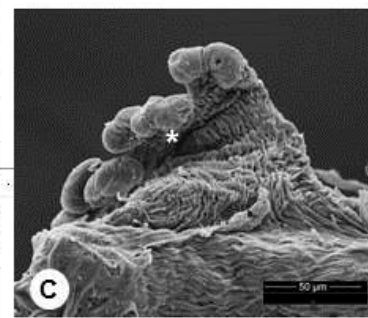
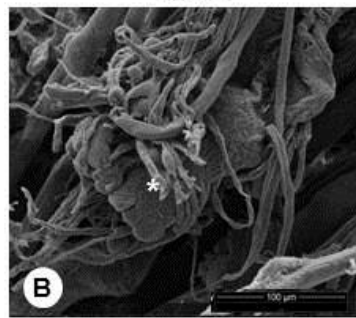
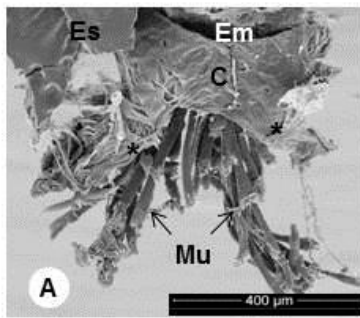


Ingurgitado

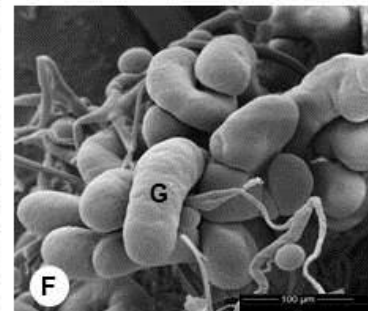
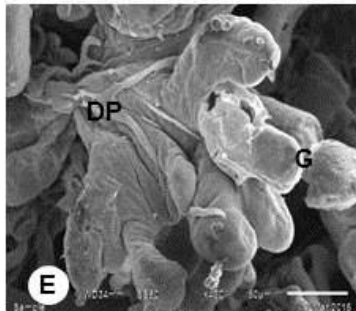
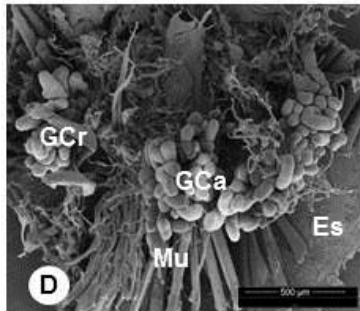


2.

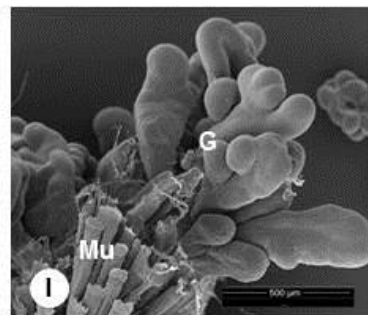
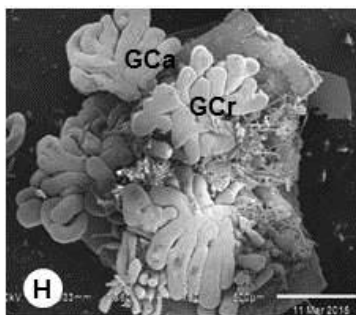
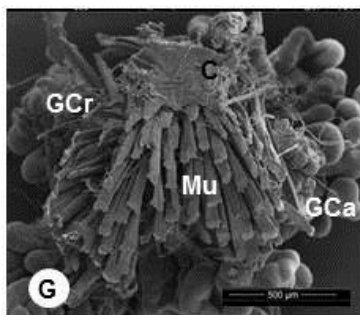
Jejum



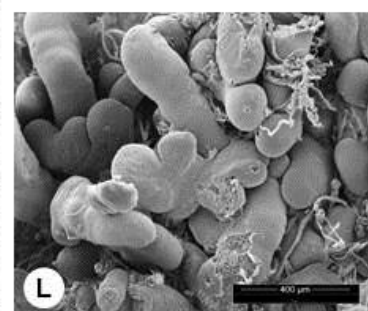
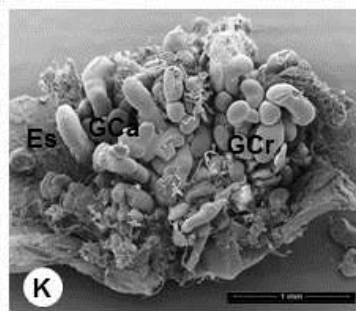
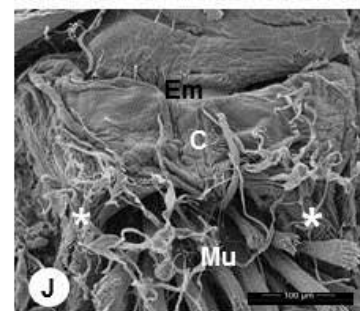
0 hora



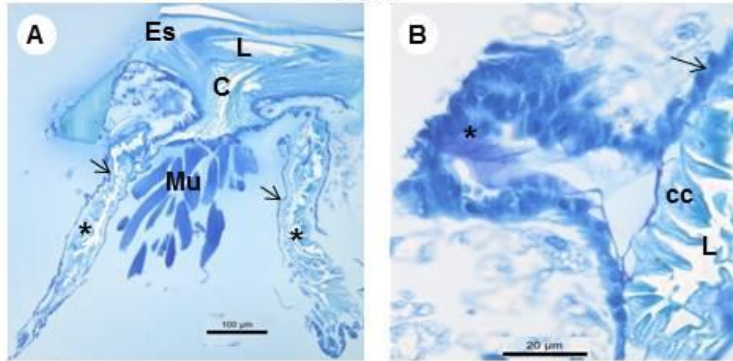
5° dia



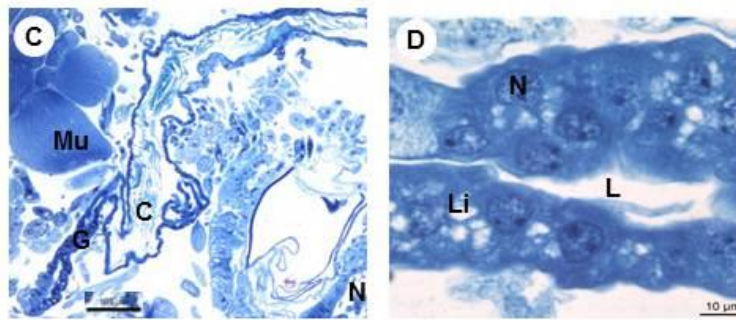
7° dia



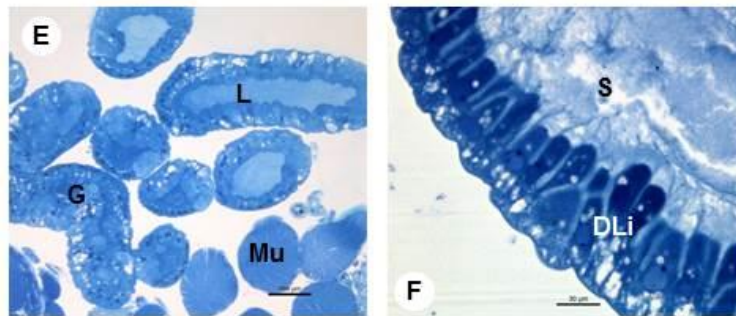
3. Jejum



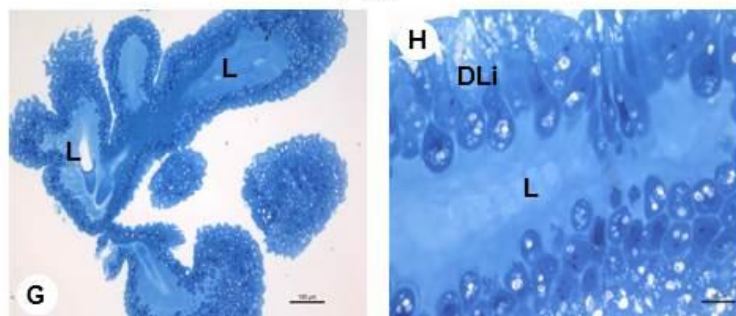
0 hora



5º dia



7º dia



4.

