

UNIVERSIDADE PAULISTA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM PATOLOGIA
AMBIENTAL E EXPERIMENTAL

CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS DO ÓRGÃO DE GENÉ
DE *Amblyomma sculptum* Berlese, 1888 (Acari: Ixodidae) NO
PRIMEIRO DIA DE OVIPOSIÇÃO E SUA PARTICIPAÇÃO
NA COMPOSIÇÃO LIPÍDICA DA CERA DOS OVOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para a obtenção do título de Doutor em Patologia Ambiental e Experimental.

MARCELO FRANCISCO DOS SANTOS

SÃO PAULO

2020

UNIVERSIDADE PAULISTA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM PATOLOGIA
AMBIENTAL E EXPERIMENTAL

CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS DO ÓRGÃO DE GENÉ
DE *Amblyomma sculptum* Berlese, 1888 (Acari: Ixodidae)
NO PRIMEIRO DIA DE OVIPOSIÇÃO E SUA PARTICIPAÇÃO
NA COMPOSIÇÃO LIPÍDICA DA CERA DOS OVOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para a obtenção do título de Doutor em Patologia Ambiental e Experimental.

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

MARCELO FRANCISCO DOS SANTOS

SÃO PAULO

2020

Santos, Marcelo Francisco dos.

Características estruturais do órgão de Gené de *Amblyomma sculptum* Berlese, 1888 (Acari: Ixodidae) no primeiro dia de oviposição e sua participação na composição lipídica da cera dos ovos / Marcelo Francisco dos Santos. - 2020. 43 f. : il. color. + CD-ROM.

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista, São Paulo, 2020.

Área de concentração: Patologia das Enfermidades Infecciosa e Parasitária.

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

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

1. Ixodideo. 2. *Amblyomma sculptum*. 3. Órgão de Gené. 4. Primeiro dia de oviposição. 5. Lipídios. 6. Cera do ovo. I. Lallo, Maria Anete (orientadora). II. Spadacci-Morna, Diva Denelle (coorientadora). III. Título.

MARCELO FRANCISCO DOS SANTOS

**CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS DO ÓRGÃO DE GENÉ
DE *Amblyomma sculptum* Berlese, 1888 (Acari: Ixodidae) NO
PRIMEIRO DIA DE OVIPOSIÇÃO E SUA PARTICIPAÇÃO
NA COMPOSIÇÃO LIPÍDICA DA CERA DOS OVOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para a obtenção do título de Doutor em Patologia Ambiental e Experimental.

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

_____/____/____
Prof.^a Dr.^a Maria Anete Lallo
Universidade Paulista – UNIP

_____/____/____
Prof.^a Dr.^a Ivana Barbosa Suffredini
Universidade Paulista – UNIP

_____/____/____
Prof. Dr. José Guilherme Xavier
Universidade Paulista – UNIP

_____/____/____
Prof.^a Dr.^a Isabel de Fátima Correia Batista
Instituto Butantan

_____/____/____
Prof.^a Dr.^a Diva Denelle Spadacci morena
Instituto Butantan

AGRADECIMENTOS

Agradeço às Dras. Diva Denelle Spadacci-Morena e a Maria Anete Lallo pelas orientações prestadas na elaboração e execução dessa tese.

As colegas de laboratório, Magna Aparecida Maltauro Soares e Edna Aparecida Caretti 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.

INTRODUÇÃO

São descritas aproximadamente 900 espécies de carrapatos subdivididas em três famílias: Argasidae, Ixodidae e Nuttalliellidae (NAVA et al., 2009). Cerca de 80% dos carrapatos descritos pertencem à família Ixodidae e dentre estes encontram-se carrapatos do gênero *Amblyomma*, representado por 135 espécies distribuídas mundialmente (GUGLIELMONE et al., 2014). A espécie *Amblyomma cajennense*, após reavaliação de sua morfologia, biologia e variabilidade genética, foi reclassificado como um complexo de seis espécies que se distribuem geograficamente do sul dos Estados Unidos até América do Sul (NAVA et al., 2014). Entre as espécies do complexo *A. cajennense*, encontra-se o *Amblyomma sculptum* que podem ser encontrados nas regiões Sudeste, Centro-Oeste, Sul e Nordeste do Brasil (NAVA et al., 2014). Essa espécie tem como principais hospedeiros o cavalo, a anta e a capivara, mas também pode parasitar o homem, sendo o principal vetor da bactéria *Rickettsia rickettsii*, agente causador da Febre Maculosa Brasileira (LABRUNA, 2009). Podem ainda transmitir bactérias espiroquetas do gênero *Borrelia*, responsável por provocar a borreliose em humanos, similar à Doença de Lyme na América do Norte (BARROS-BATTESTI et al., 2006).

Processo de alimentação em *A. sculptum*

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), um para cada fase de vida (larva, ninfa e adulto) (BARROS-BATTESTI et al., 2006). 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 (SONENSHINE; ROE, 2013). 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 alta massa molecular pela saliva; além da depreciação do couro e predisposição à miíases e abscessos (SONENSHINE; ROE, 2013; MASSARD, 2004).

Oviposição e órgão de Gené

O processo de oviposição em *Dermacentor reticulatus* (SIEBERZ; GOTHE, 2000) e *Argas walkerae* (EDELMANN; GOTHE, 2000) foi descrito detalhadamente e envolve os eventos descritos a seguir. O gnatossoma se movimenta para a região ventral do carrapato ficando, dessa forma, bem em frente à abertura vaginal. Posteriormente, o órgão de Gené (OG) everte, passando por cima do gnatossoma e se aproxima do ovo. A aproximação do ovo em direção ao OG é facilitada pela vagina que, nesse momento, se encontra prolapsada. Em seguida, a vagina retrai e o ovo, por sua vez, toca o OG que o envolve com a cera. Finalmente, com a ajuda dos pedipalpos, o ovo é levado para o dorso da fêmea.

O primeiro relato sobre oviposição em carrapatos, GENÉ (1848) observou que, quando esse órgão era perfurado com uma agulha, os ovos murchavam rapidamente. Os ovos que são impedidos de entrar em contato com o OG são inviáveis (KAKUDA et al., 1992). Após o repasto sanguíneo e queda do hospedeiro, o OG é submetido a um rápido crescimento, passando de sua forma inativa para o estágio secretório durante a fase de pré-oviposição, quando a cera é produzida (SANTOS et al., 2018). O desenvolvimento é completado muito próximo à postura dos ovos, estando em sincronia com o desenvolvimento ovariano (LEES; BEAMENT, 1948). O OG quando pleno é constituído de um corpo, um par de cornos, um par de glândulas craniais, um par de glândula caudal e feixes de músculos retratores (SANTOS et al., 2018; SCHOL et al., 2001).

A secreção do Órgão de Gené

Os artrópodes estão entre os primeiros animais terrestres e seu exoesqueleto os preparou para a vida fora da água (ZEH et al., 1989). No entanto, precisaram desenvolver estratégias para colocar seus ovos em terra seca, sem os mesmos sofrerem perda de água para o ambiente. Cada grupo de artrópodes desenvolveu uma forma diferente de proteção de seus

ovos. Nos ovos de insetos está presente uma membrana chamada serosa que envolve completamente o embrião (MACHIDA; ANDO, 1998; ROTH, 2004; MACHIDA, 2006; JACOBS et al., 2013), aranhas embrulham seus ovos em seda produzida pelas fiandeiras, já os escorpiões retêm os ovos dentro do corpo materno (vivíparos e ovovivíparos), os ácaros ovipoem os ovos com uma cera produzida por uma glândula que está anexa ao ovário, ou após sua morte, seu corpo é usado como uma cápsula protetora e, finalmente, os carrapatos depositam uma elaborada cera sobre os ovos produzida pelo OG (LEES; BEAMENT, 1948; BEAMENT, 1951; ARTHUR, 1953; ZEH et al., 1989; WINTALIŃSKI, 1993; KAKUDA et al., 1992; BOOTH, 1989; 1992; SEIBERZ; GOTHE, 2000; GRIMALDI; ANGEL, 2005). Estudos mostraram que a cera produzida pelo OG atua diretamente sobre a viabilidade dos embriões de carrapatos, pois sua propriedade viscosa tem a capacidade de agrupar os ovos reduzindo a perda de água (LEES; BEAMENT, 1948; BOOTH, 1989; 1992) e por suas propriedades antimicrobianas impedem que os ovos sejam destruídos por microrganismo (POTTERAT et al., 1997; ARRIETA et al., 2006; LIMA-NETTO et al., 2011, 2012; YU et al., 2012; ZIMMER et al., 2013a, b). A cera é constituída principalmente de colesterol esterificado, colesterol e ácidos de cadeia longa (YU et al., 2012; BOOTH, 1992). A literatura atual não deixa claro se existem outras estruturas, além do OG, envolvidas na produção da cera. Estudos mais detalhados acerca do OG, sua secreção e a cera da superfície dos ovos precisam ser realizados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARRIETA, M. C.; LESKIN, B. K.; KAUFMAN, W. R. Antimicrobial activity in the egg wax of the African cattle tick *Amblyomma hebraeum* (Acari: Ixodidae). *Exp. Appl. Acarol.* v. 39, p. 297-313, 2006.
- ARTHUR, D. R. The morphology of the British Prostriata with particular reference to *Ixodes hexagonus*. *Parasitology.* v.42, p.161-185, 1953.
- BALASHOV, Y. S. Blood-sucking ticks (Ixodoidea) vectors of diseases of man and animals. Nauka, Leningrad. English Translation: Miscellaneous publications of the entomological Society of America. v. 8, p. 161-376, 1972.
- BARROS-BATTESTI, D. M.; ARZUA, M.; BECHARA, G. H. Carrapatos de importância médico veterinária da Região Neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécie. 1ed. São Paulo: Vox/ICTTD - 3/ Instituto Butantan, 2006.
- BEAMENT, J. W. L. The structure and formation of the egg of the fruit tree spider mite, *Metatetranychus ulmi* Koch. *Ann. Appl. Biol.* v. 38, p. 1-24, 1951.

BOOTH, T. F. Observation on the composition and biosynthesis of egg wax lipids in the cattle tick, *Boophilus microplus*. Exp. Appl. Acarol. v.14, p.137-149, 1992.

BOOTH, T. F. Wax lipid secretion and ultrastructural development in the egg-waxing (Gené's) organ in ixodid ticks. Tissue Cell. v.21, p. 113-122, 1989.

EDELMANN, B.; GOTHE, R. The mechanism of oviposition in *Argas (Persicargas) walkerae* (Acari: Argasidae). Exp. Appl. Acarol. V. 24, p. 927-940, 2000.

GENÉ, G. Memoria per servire alla storia naturale degli issodi. Mem. Rea. Acad. Sci. Torino. v.9, p. 751-786, 1848.

GRIMALDI, D. A.; ENGEL, M. S. Evolution of the insects. New York: Cambridge University Press. 2005.

GUGLIELMONE, A. A.; NAVA, S. Names for Ixodidae (Acari: Ixodoidea): valid, synonyms, incertae sedis, nomina dubia, nomina nuda, lapsus, incorrect and suppressed names- with notes on confusions and misidentifications. Zootaxa. p. 3767 -256, 2014.

JACOBS, C.G. C. et al. The extraembryonic serosa protects the insect egg against desiccation. Proc. R. Soc. B. v. 280, n. 1764, p. 20131082, 2013.

KAKUDA, H.; MÖRI, T.; SHIRAIISHI, S. Functional morphology of Gené's organ in *Haemaphysalis longicornis* (Acari: Ixodidae). Exp. Appl. Acarol. v. 16, p. 263-275, 1992.

LABRUNA, M. B. Ecology of Rickettsia in South America. Rickettsiology and Rickettsial Diseases-Fifth International Conference: Ann NY. Acad. Sci. v. 1166, p.156-66, 2009.

LEES, A. D.; BEAMENT, J. W. L. An organ waxing in ticks. Q. J. Microsc. Sci. v. 97, p. 291-332, 1948.

LEITE, M. C. et al. A febre que vem do carrapato. Vetorial - Vetores e pragas. v. 22, p. 80-3, 1998.

LIMA-NETTO, S. et al. An interesting antimicrobial activity of egg wax from *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). Syst. Appl. Acarol.; v.16, p. 3-6, 2011.

LIMA-NETTO, S. et al. Antiviral effect of the egg wax of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). Citotechnology. v. 64 (5), p. 601-606, 2012.

MACHIDA, R. Evidence from embryology for reconstructing the relationships of hexapod basal clades. Arthropod syst. Phylogeny. v. 64, p. 95 – 104, 2006.

MACHIDA, R.; ANDO, H. Evolutionary chances in developmental potentials of the embryo proper and embryonic membranes along with the derivative structures in atelocerata, with special reference to hexapoda (Arthropoda). Proc. Arthropod Embryol. Soc. Jpn. v. 33, p.1-13,1998.

MASSARD, C. L.; FONSECA, A. H. Carrapatos e doenças transmitidas comuns ao homem e aos animais. A Hora Veterinária. v.135 (1), p. 15-23, 2004.

NAVA, S. et al. 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 Tick. Dis. v.5, p.252–76, 2014.

NAVA, S.; GUGLIELMONE, A. A.; MANGOLD, A. J. An overview of systematics and evolution of ticks. Front. Biosci.v.14, p. 2857-2877, 2009.

POTTERAT, O. et al. Boophilin, an antimicrobial sterol amide from the cattle tick *Boophilus microplus*. Helv. Chim. Acta. v. 80, p. 2066 – 2072, 1997.

ROTH, S. Gastrulation: from cells to embryos. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2004.

SANTOS, M. F. et al. Morphodifferentiation of Gené's organ in engorged *Amblyomma sculptum* Berlese, 1888 female ticks (Acari: Ixodidae). Ticks Tick. Dis. v.9, p. 519-525, 2018.

SCHÖL, H. et al. Morphology and structural organization of Gene's organ in *Dermacentor reticulatus* (Acari: Ixodidae). Exp. Appl. Acarol. v.25, p.327-352, 2001.

SIEBERTZ, J. E.; GOTHE, R. Modus operandi of oviposition in *Dermacentor reticulatus* (Acari: Ixodidae). Exp. Appl. Acarol. v. 24, p. 63-76, 2000.

SONENSHIN, D. E.; ROE, R. M. Biology of ticks. 2ed. New York: Oxford University press, 2013.

WITALIŃSKI, W. Egg shells in mites: vitelline envelope and chorion in Acaridida (Acari). Exp. Appl. Acarol. v. 17, p. 321 – 344,1993.

YU, Z. et al. Antimicrobial activity in the egg wax of the tick *Amblyomma hebraeum* (Acari: Ixodidae) is associated with free fatty acids C16:1 and C18:2. Exp. Appl. Acarol. v. 58, p.453 - 470, 2012.

ZEH, D. W.; Zeh, J. A.; Smith, R. L. Ovipositors, Amnions and eggshell architecture in the diversification of terrestrial arthropods. Q. Rev. Biol. v. 64, p. 147 – 168, 1989.

ZIMMER, K. R. et al. A steroidal molecule present in the egg wax of the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* inhibits bacterial biofilms. Environ. Microbiol. v.15, p. 2008-2018, 2013a.

ZIMMER, K. R. et al. Egg wax from the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* inhibits *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. Ticks Tick. Dis. v.4, p.366-376, 2013b.

Periódico para submissão: Ticks and Tick-Borne Diseases ISSN: 1877 – 959X

Características estruturais do órgão de Gené de *Amblyomma sculptum* Berlese, 1888 (Acari: Ixodidae) no primeiro dia de oviposição e sua participação na composição lipídica da cera dos ovos

Structural characteristics of Gené's organ in *Amblyomma sculptum* Berlese, 1888 (Acari: Ixodidae) on the first day of oviposition and its participation in the lipid composition of egg wax

Marcelo Francisco dos Santos^{a,b}, Maria Anete Lallo^b, Isabele da Costa Angelo^c, Magna Aparecida Maltauro Soares^a, Sayuri Miyamoto^d, Alex Inague^d, Darci Moraes Barros-Battesti^e, Vânia Rita Pinheiro Bittencourt^f, 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

^cDepartamento de Epidemiologia e Saúde Pública, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil

^dInstituto de Química - Departamento de Bioquímica, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

^eDepartamento de Patologia Veterinária, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, São Paulo, Brasil

^fDepartamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil

* Autor correspondente

Resumo

O órgão de Gené (OG) secreta uma cera sobre os ovos que reduz a perda de água e possui propriedades antimicrobianas. Neste estudo, foi descrita a morfologia do OG de *A. sculptum* no 1º dia de oviposição (dovip) bem como foram identificados os lipídios neutros encontrados no órgão e na cera. Os resultados morfológicos mostraram que no 1º dovip as células glandulares do OG sintetizam proteínas. Por outro lado, pontualmente, foram notadas células glandulares necróticas e mitocôndrias, com sinais iniciais de degeneração, confirmando o início da senescência dessas células. As análises dos lipídios neutros mostraram que as glândulas craniais e caudais possuem perfis idênticos indicando, dessa forma, que a individualização entre elas é simplesmente anatômica. Ainda, os lipídios encontrados nas glândulas craniais e caudais foram os mesmos encontrados na cera mostrando que o OG possui uma função importante na síntese final da fração lipídica da cera do ovo.

Palavras-chave: Ixodideo. *Amblyomma sculptum*. Órgão de Gené. Primeiro dia de oviposição. Lipídios. Cera do ovo.

Abstract

The Gené's organ (GO) secretes a waxy substance on eggs that reduces water loss and has antimicrobial properties. The current study evaluated morphological and histochemical aspects of GO in *Amblyomma sculptum* on the 1st day of oviposition (dovip), as well as the neutral lipids found in the organ and wax. The morphological results showed that the glandular cells of the GO synthesize proteins. On the other hand, punctually, necrotic glandular cells and mitochondria were noted, with initial signs of degeneration, confirming the beginning of senescence of these cells. The analysis of the neutral lipids showed that the cranial and caudal glands have identical profiles, thus indicating that the individualization

between them is simply anatomical. Still, the lipids found in the cranial and caudal glands were the same found in the wax showing that OG has an important function in the final synthesis of egg wax.

Key Words: Ixodideo. *Amblyomma sculptum*. Gené's organ. First day of oviposition. Lipid. Egg wax

Introdução

Os carrapatos são ectoparasitas de vertebrados, pertencentes ao filo Arthropoda, classe Aracnida, ordem Acari e subordem Ixodida, constituindo três famílias: Argasidae (carrapato mole), Ixodidae (carrapato duro) e Nuttallielidae (monotípica). No Brasil, estão presentes as duas primeiras as quais são as mais diversificadas em espécie e possuem uma enorme variedade de hospedeiros, incluindo o homem (Luz e Faccini 2013). Esses artrópodes causam espoliação determinada pelo repasto sanguíneo e lesões cutâneas graves, e, adicionalmente, são vetores de microrganismos como vírus, helmintos, protozoários e bactérias, tais como a espécie *Rickettsia rickettsii*, agente etiológico da febre maculosa brasileira (FMB) (Barros-Battesti et al., 2006). No Brasil, o gênero *Amblyomma* é o de maior importância médica, com espécies distribuídas nas diversas regiões do país (Dantas-Torres, 2009). Na região sudeste, a espécie que mais se destaca é o *Amblyomma sculptum* (carrapato estrela), de ampla ocorrência em áreas periurbanas e rurais, atuando como reservatório e vetor da FMB (Navas et al., 2014). Os carrapatos dessa espécie ovipõem em média 8 mil ovos com eclodibilidade de até 91% (Freitas et al., 2002). O que garante a alta viabilidade desses ovos é a cera produzida por uma estrutura, exclusiva dos carrapatos, chamada órgão de Gené (OG) (Kakuda et al., 1992). O OG é encontrado somente nas fêmeas, estando ausente nos machos e nos estágios imaturos, do seu ciclo de vida (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; Schöl et al., 2001a; Barros-Battesti et al., 2006; Sonenshine e Roe, 2013). Durante o processo de oviposição, o OG everte e retrai inúmeras vezes com o objetivo de recobrir completamente cada ovo com a cera produzida por ele (Lees e Beament, 1948; Arthur, 1953; Kakuda et al., 1992; Seiberz e Gothe, 2000; Schöl et al., 2001a; Schöl et al., 2001b). Quando o OG é impedido de entrar em contato com os ovos, os mesmos não eclodem (Gené, 1848; Kakuda et al., 1992). A cera produzida tem a função de agrupar os ovos, impedindo a perda de água para o ambiente (Lees e Beament, 1948; Booth, 1989; 1992). Alguns estudos mostraram que a cera produzida pelo OG exibe propriedades antimicrobianas (Potterat et al., 1997; Arrieta et al., 2006; Lima-Netto et al., 2011; 2012; Yu et al., 2012; Zimmer et al., 2013a; 2013b).

Basicamente, o OG de fêmeas ingurgitadas é constituído de um corpo, um par de cornos, um par de glândulas craniais, um par de glândulas caudais e feixes de músculos retratores (Schöl et al., 2001a; Santos et al., 2018). A morfologia do OG foi descrita em diferentes fases do ciclo de vida em *Haemaphysalis longicornis* (Kakuda et al., 1992; 1995), *Demacentor reticulatus* (Schöl et al., 2001a), *Argas walkerae* (Schöl et al., 2001b), *Ornithodoros moubata* e *Ixodes ricinus* (Linnaeus) (Lees e Beament, 1948), *Boophilus microplus* (Booth et al., 1984; Booth 1989; 1992), *Rhipicephalus appendiculatus* (Booth, 1989), *Hyalomma dromedarii* (El Shoura, 1987), *Ornithodoros erraticus* (El Shoura, 1988). Recentemente, foi descrita a morfologia do OG de *A. sculptum*, demonstrando que o mesmo sofre a maior parte do seu desenvolvimento na pré-oviposição, entre 0 hora e o 7º dia de queda do hospedeiro, indicando o processo de maturação para a capacitação do órgão à sua função no processo de oviposição (Santos et al., 2018). Contudo, não existem estudos descrevendo a estrutura do OG de *A. sculptum* em oviposição. Estudo recente envolvendo proteômica e transcriptoma indicou que as células que constituem as glândulas do OG *R.*

microplus em oviposição estão equipadas com uma maquinaria para síntese, alongamento e oxidação de ácidos graxos, além de possuir outra para modificação de lipídios (Xavier et al., 2019). Diante do exposto, observamos lacunas de conhecimento que não permitam entender a dinâmica de desenvolvimento do OG e suas características funcionais relacionadas à produção da cera, substância fundamental para a viabilidade dos ovos e, portanto, para a perpetuação da espécie. Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo descrever a morfologia do OG no 1º dia de oviposição (1º dovip), sendo o estudo histoquímico realizado para identificar a natureza química dos constituintes celulares que compõem esse órgão na fase de oviposição. Adicionalmente, foram identificados por cromatografia, os lipídios neutros presentes no OG de carrapatos no 1º dovip e na cera dos ovos ao final da oviposição.

Material e métodos

1- Animais

Espécimes de *A. sculptum* adultos, coletados no Parque Ecológico do Tietê, foram utilizados para estabelecer uma colônia. Resumidamente, os carrapatos machos (n= 10) e fêmeas (n= 20) foram infestados em coelhos de acordo com método de Neitz et al. (1971) e os adultos provenientes dessa infestação foram mantidos em incubadora com demanda bioquímica de oxigênio - BOD (27 °C, 85% umidade relativa e fotoperíodo de 12/12 h) até o momento do experimento. Todos os procedimentos realizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB 1279/14).

2- Delineamento experimental

Carrapatos machos e fêmeas provenientes da colônia foram infestados em coelhos no período da manhã. Os coelhos foram examinados diariamente, às 8:00h, e as fêmeas que se desprenderam do hospedeiro foram colocadas em placas de Petri, devidamente identificadas, e

mantidas em BOD. Os carrapatos foram divididos em dois grupos: um grupo foi mantido até o primeiro dia de oviposição (1º dovip), para o estudo das características morfológica e bioquímica do OG, e o segundo, até o final da oviposição, para coleta dos ovos e posterior análise bioquímica da cera.

3. Processamento para a retirada do órgão de Gené e exame ao estereomicroscópio

Os carrapatos, no primeiro dia de oviposição, foram dissecados sob microscópio estereoscópico, sendo removida a superfície ventral do corpo (idiossoma) para a exposição do órgão. Esse procedimento foi realizado com o carrapato imerso em solução contendo (NaCl 7.5g/L, Na₂ HPO₄ 2.38g/L e KH₂ PO₄ 2.72g/L).

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 70%). Para esse estudo, Foram utilizados 2 carrapatos. O material foi examinado e fotografado no estereomicroscópio Leica M205 A.

4- Processamento do órgão de Gené para exame ao microscópio de luz

Após a retirada do OG, o mesmo foi fixado em solução de formol-cálcio por 12h. Algumas amostras foram pós fixadas em solução aquosa de tetróxido de ósmio a 1%, por 15 min. Em seguida, o material foi desidratado em série crescente de álcool etílico (70% a 100%) e incluído em historesina (Leica). Os cortes, com 3µm de espessura, foram corados pelo azul de Metileno ou pela Hematoxilina e Eosina (HE).

Testes histoquímicos foram realizados para detectar proteínas totais (Azul de Bromofenol - Pearse, 1985), polissacarídeos neutros (PAS - Junqueira e Junqueira, 1983) e lipídios (Sudan Black-Bayliss e Adams, 1972). Para a detecção de lipídios, após a fixação, o

152 órgão foi pós-fixado em solução aquosa de tetróxido de ósmio a 1%, por 1h e, então, incluído
153 diretamente em historesina, sem ser submetido à desidratação (Hernandez-Blazquez et al.,
154 2006).

155 Os cortes foram observados e fotografados em microscópio de luz DM LS (Leica),
156 com captador de imagem DFC 420 (Leica) e programa de imagem Leica Application Suite
157 versão 3.1.0. Para cada técnica foi utilizado um grupo de 10 carrapatos.

158 **5- Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) do órgão de Gené**

160 O OG de carrapatos no 1º dovip foi fixado em glutaraldeído a 2% em tampão
161 cacodilato 0,1M (pH 7,2-7,4) por aproximadamente 18h a 4°C, e pós-fixado em tetróxido de
162 ósmio a 1% em tampão cacodilato de sódio, por 1 h. A seguir, foi desidratado em etanol,
163 utilizando-se concentrações crescentes (30% a 100%), e, posteriormente, transferido para
164 óxido de propileno e embebido em resina EMBed-812. Os cortes ultrafinos foram
165 contrastados em solução aquosa de acetato de uranila saturada e em citrato de chumbo e
166 examinados no microscópio eletrônico LEO EM 906E, a 80kV. Foi utilizado um grupo de 5
167 carrapatos.

168 **6- Análise dos lipídios neutros**

169 **6.1- Órgão de Gené**

171 O OG de carrapatos no 1º dovip foi seccionado em glândulas craniais (GCr), glândulas
172 caudais (GCa) e corpo (C). As amostras foram colocadas em criotubos, devidamente
173 identificados, contendo salina (NaCl 1,5M, EDTA 50nM) e mantidos no gelo durante toda a
174 coleta. O material foi mantido a -20°C, até o momento de uso. Para essa análise foram
175 utilizadas 40 GCr, 40 GCa e 20 C.

Para análise da cera foi utilizada uma massa de 100 mg de ovos coletada no final da oviposição, de 4 fêmeas. Para a extração da cera, empregou-se uma mistura de clorofórmio/metanol (2:1, v/v), de acordo com Arietta et al. (2006). O material obtido foi estocado a -20 °C, para posterior análise.

7 - Extração de lipídios

A extração dos lipídios foi realizada com clorofórmio: metanol: água (1: 2: 0,8) (v/v/v) de acordo com o método descrito por Bligh e Dyer (1959). Os lipídios extraídos foram armazenados a -20° C, para posterior análise. Foram utilizados 10 glândulas craniais (GCr), 10 glândulas caudais (GCa), 5 corpos (C) e 100 mg de massa de ovos. Esse ensaio foi realizado em quadruplicata, em um único momento.

7.1 - Análises dos Lipídios

Os lipídios neutros extraídos das amostras das diferentes estruturas do órgão de Gené (GCr, GCa e C) e da cera foram analisados por cromatografia em camada delgada unidimensional (TLC). As amostras foram reconstituídas em 30 µL de clorofórmio e aplicadas sobre a placa de sílica. A placa foi transferida para uma cuba de vidro contendo hexano: éter: ácido acético (60: 40: 1 v/v/v) como solvente (Kawooya e Law, 1988). Após a evaporação dos solventes, a placa foi imersa em solução de Cherring constituída de sulfato de cobre 10% (v/v) e ácido fosfórico 8% (v/v) e queimada em forno Pasteur a 170°C por 5-10 min (Ruiz e Ochoa, 1997). Os spots foram submetidos à análise de densitometria através do programa Image Master Total Lab versão 1.11 (GE Healthcare® - Brazil Life Sciences, São Paulo, SP, Brazil). Os experimentos foram feitos em quadruplicata.

Para análise dos ácidos graxos foi utilizada a técnica de cromatografia gasosa (CG). Para tanto, estruturas de 5 carrapatos, conforme já descrito anteriormente, foram colocadas em

criotubos contendo 250µL de tampão PBS 50mM (pH 7.0) e 100µM de desferroxamina e trituradas, utilizando-se bastão de vidro. Em seguida, o homogenato foi completado para 500µL, com o mesmo tampão e estocado em freezer a -80°C, para posterior análise. No momento da análise, o homogenato (500µL) foi transferido para um tubo de vidro, onde foi adicionado 1,45 ml de metanol e 50µL de padrão interno (C13:0, 1,0mg / mL em metanol). As amostras foram analisadas no equipamento Trace 1310 - Gas Chromatograph.

8 - Análise estatística

Para análise dos dados referentes às quantidades de lipídios neutros encontrados através da técnica de TLC, foi realizado o teste Kruskal Wallis seguido do Student-Newman-Keuls. Em todos os casos, o nível de significância adotado foi p menor que 0,05 ($p < 0,05$).

Resultados e Discussão

O OG do *A. sculptum*, no 1º dovip, apresenta-se muito desenvolvido, consistindo de corpo (C) e glândulas tubulares, longas e ramificadas, que compõem os pares de glândulas craniais (GCr) e caudais (GCa) (Fig.1), corroborando com os resultados de Schöl et al., (2001a), que se basearam na morfologia e organização estrutural do carrapato *Dermacentor reticulatus* em oviposição para essa denominação anatômica.

Ductos principais calibrosos estão presentes e ligam as GCr e GCa ao corpo (C) do órgão (Fig. 1). Inúmeros músculos retratores (Fig. 1), ancorados na região dos cornos e responsáveis pela retração do OG durante a oviposição, também são observados (Sieberz e Gothe, 2000; Booth et al., 1985).

As figuras 2, 3 e 4 mostram a morfologia do OG ao microscópio de luz e eletrônico de transmissão. As glândulas são constituídas por células epiteliais palissadas, cilíndricas, e apresentam citoplasma basófilo. Os núcleos são elípticos, com cromatina frouxa ocupando a

maior parte do núcleo (Figs. 2A e 2 B). Frequentemente também são notados 1 ou 2 nucléolos (Figs. 2A e 2B). Gotas lipídicas típicas são observadas por todo o citoplasma (Figs. 2A e 2B). A luz das glândulas está completamente preenchida por substância amorfa e restos de células destacados do epitélio glandular (Fig. 2B). Santos et al., (2018) estudando carrapatos *A. sculptum* ingurgitados, no 7º dia de queda, isto é, no período de pré-oviposição, também encontraram células glandulares que estavam se destacando das glândulas que compunham o OG. Entretanto, neste estudo, diferentemente do que foi observado na pré-oviposição, em alguns pontos de algumas glândulas tubulares, são observados grupos de células que perderam a sua forma original, têm suas membranas rompidas e, dessa forma, os limites entre as células são indistinguíveis. Nessas regiões, um produto floculento em grande quantidade pode ser observado. Ainda, os núcleos se apresentam picnótico (Fig. 2C). Apesar dessa desagregação drástica, essas células ainda estão ligadas a glândula tubular, não havendo, portanto, interrupção na continuidade do epitélio (Fig. 2C). As alterações morfológicas aqui apresentadas (agregação da cromatina e aumento do volume celular, com perda da integridade e consequente ruptura da membrana celular) são características de células necróticas, entretanto, estudos mais aprofundados, utilizando marcadores específicos para cada tipo de morte celular, deverão ser realizados. Os ácidos graxos em concentrações fisiológicas podem disparar a morte celular por apoptose, enquanto que em concentrações suprafisiológicas causam necrose (Curi e Pompéia, 2002). Sabe-se que o comprometimento no metabolismo dos ácidos graxos pode provocar danos celulares. Neste caso, as células acometidas acumulam lipídios nos vacúolos citoplasmáticos, originando a metamorfose gordurosa, de ocorrência particularmente comum em células com papéis centrais no metabolismo dos ácidos graxos, especialmente hepatócitos (Stevens e Lowe, 2002).

As células glandulares são fortemente positivas para o PAS, principalmente na sua região basal (Fig. 2D), onde a reação forma um verdadeiro cinturão. Na região apical, os

gliconjugados estão intimamente ligados a gotas lipídicas (Fig. 2D). Proteínas totais, identificadas pelo azul de Bromofenol, estão difusamente distribuídas no citoplasma das células (Fig. 2E). Os cortes histológicos utilizados neste estudo mostram que algumas gotas lipídicas são fortemente osmiofílicas (Figs. 2D e 2E). Gotas lipídicas são positivas para Sudan black B e estão localizadas principalmente próximas da região apical (Fig. 2F). A análise histoquímica acima detectou grandes quantidades de glicogênio, proteínas e lipídios. Anteriormente, foi demonstrado que as quantidades dessas substâncias foram aumentando progressivamente nas glândulas do OG de *A. sculptum*, na pré-oviposição (Santos et al., 2018), corroborando com a hipótese de que o 1º dovip é a fase de grande concentração desses importantes componentes da cera do ovo. Xavier et al. (2019), demonstraram que as células do OG de carrapato *R. microplus* no período de oviposição possuem maquinaria capacitada para síntese de proteínas, assim como para modificação e secreção de proteínas envolvidas no metabolismo lipídico. Ainda, afirmaram que o OG, na pré-oviposição, está focado na síntese enquanto que na oviposição está voltado para a secreção do produto final encontrado na cera do ovo. Dessa forma, a identificação proteica no citoplasma celular por técnica histoquímica aqui realizada corrobora os achados de Xavier et al. (2019).

As mitocôndrias exibem tamanhos variados e com forma esférica ou alongada. As cristas são transversais ao seu maior eixo e estão mergulhadas em uma matriz com densidade eletrônica ligeiramente maior que a da matriz citoplasmática (Fig. 3A). Gotas lipídicas de diversos tamanhos, de conteúdo homogêneo e pouco eletrondensas, são observadas no citoplasma das células glandulares (Fig. 3A). Essas células também exibem microtúbulos, poliribossomos e retículo endoplasmático rugoso pouco desenvolvido, todos distribuídos difusamente pelo citoplasma (Fig. 3A). Essas características acima descritas também foram observadas em outros ixodídeos em oviposição, tais como, *Dermacentor reticulatus* (Schöl et al., 2001a), *Hyalomma dromedarii* (El Shoura, 1987), *R. microplus* e *R. appendiculatus*

(Booth, 1989), *Haemophysalis longicornis* (Kakuda et al., 1995) assim como no argasídeo *Argas walkerae* (Schöl et al., 2001b). Áreas eletrônicas, de tamanhos variados e distribuídas no citoplasma, principalmente próxima à região basal, podem ser notadas em todas as células que compõem as glândulas (Fig. 3A). Essas áreas são extensas e dão origem a gotas típicas de lipídio (Santos et al., 2018). Interessantemente, no 1º dovip nota-se uma redução dessas áreas possivelmente porque grande parte desse depósito lipídico está sendo utilizado para a produção de lipídios mais complexos.

Inclusões de glicogênio associadas a depósitos lipídicos ou livres no citoplasma, na forma de pequenos grânulos agregados e eletrondensos, são frequentemente notados no citosol (Fig. 3A). No OG, o estoque do glicogênio é proveniente da alimentação do carrapato e provavelmente tem uma função importante na formação dos lipídios (Nelson e Cox, 2014). Assim, como nos demais eucariotos superiores, a glicose encontrada no citoplasma das células glandulares, deve sofrer várias reações dando origem ao acetil-CoA (Nelson e Cox, 2014) que, através de uma série de reações enzimáticas iniciadas pela sua presença no citosol, promoveria a síntese “de novo” de ácidos graxos (Verlengia e Lima, 2002).

Em algumas áreas das glândulas tubulares ainda se observa a presença de interdigitações entre células vizinhas, entretanto, a perda de aderência entre essas células é notada com grande frequência, onde complexos juncionais não estão presentes (Figs. 3B e 3C). O início da perda de aderência e, consequentemente a ausência de complexos juncionais, já foi observado nessas células, no final da pré-oviposição (Santos et al., 2018). Alguns estudos mostraram que em carrapatos em oviposição as vilosidades das células glandulares se projetam em direção à lâmina basal e, dessa forma, fazem referência a criptas intercelulares que teriam a função de aumentar a superfície da membrana plasmática para facilitar a eliminação da secreção produzida pelas células (Kakuda et al., 1995; Booth, 1989; Schöl et al., 2001a).

Debris celulares são encontrados frequentemente na luz dessas glândulas (Fig. 3C) e devem estar associados com a etapa pela qual essas células estão nesse momento, isto é, início da degeneração do tecido. No final da pré-oviposição, isto é, no 7º dia de queda do hospedeiro, debris celulares também foram observados na luz das glândulas do *A. sculptum* (Santos et al., 2018). A existência de restos celulares na luz das glândulas está relacionada com a presença de células necróticas descritas acima.

Mitocôndrias edemaciadas, contendo vacúolos separando os conjuntos normalmente regulares das cristas, também são observadas nas células glandulares (Figs. 4A, 4B e 4C). Ainda, o desenvolvimento de agregados eletrondensos no estroma mitocondrial, semelhante a lamelas concêntricas, são frequentemente notados (Fig. 4C). A morfologia da mitocôndria é dinâmica e muito sensível às alterações metabólicas (Benard et al., 2007). A tumefação das mitocôndrias é a primeira alteração microscópica em células que sofreram algum tipo de injúria. De acordo com a classificação feita por Stevens e Lowe (2002), as características morfológicas acima citadas mostram que essas mitocôndrias estão na fase de tumefação de alta amplitude, onde as alterações são irreversíveis e a mitocôndria é permanentemente danificada.

Embora as fêmeas de carrapatos *A. sculptum* possam ficar 30 dias em oviposição (Freitas et al., 2002), no 1º dovip as células glandulares que constituem o OG já apresentam sinais de morte. Especificamente na colônia de *A. sculptum* mantida em nosso laboratório, por volta do 14º dovip, nota-se, claramente que o processo de expansão e retração do OG é interrompido, apesar da fêmea continuar a postura (dados não publicados). O OG fica permanentemente evertido o que leva a crer que ocorreu um processo de exaustão, mesmo antes do final da oviposição.

Dentro da diversidade de lipídios neutros, mostrados através da TLC no OG e na cera encontrada na superfície dos ovos, foram identificadas as seguintes classes: colesterol livre

(CHO), colesterol esterificado (CHOE), triacilglicerol (TG) e ácidos graxos (AG) (Figs. 5A e 5B).

Foi feita uma análise comparativa da quantidade dos diferentes lipídios dentro das estruturas que compõem o OG (Tabela 1, letras minúsculas). Nessa análise foi observada que entre as glândulas craniais e caudais as quantidades de CHO são semelhantes ($p= 0,5529$) (Tabela 1, letras maiúsculas), entretanto, houve diferença entre as glândulas (GCr e GCa) e o corpo (C) ($p= 0,0130$ e $p= 0,0454$, respectivamente) (Tabela 1).

Ademais, foi realizada uma análise dos diferentes tipos de lipídios dentro das estruturas que compõem o OG (vide Tabela 1, letras minúsculas). No corpo, nota-se maior proporção de CHOE, seguido de TG, AG e CHO, havendo diferença estatisticamente significativa entre CHOE e AG ($p= 0,0341$), entre CHOE e CHO ($p= 0,0010$) e entre o TG e CHO ($p= 0,0068$) (Tabela 1).

Com relação à glândula cranial, o CHOE é o que se apresenta em maior proporção, diferindo significativamente dos demais lipídios (CHOE x TG $p=0,0321$; CHOE x AG $p= 0,0028$; CHOE x CHO $p= 0,0323$). Já na glândula caudal, há diferença entre CHOE e AG ($p= 0,0068$) e entre CHOE e CHO ($p=0,0284$).

Embora o metabolismo de lipídios seja bastante conhecido nos mamíferos, em invertebrados essas informações são escassas. Em insetos, durante o processo de digestão, complexos lipídicos provenientes da alimentação são hidrolisados e transformados em lipídios mais simples, na luz do intestino, e, em seguida, absorvidos pelo epitélio intestinal (Canavoso et al., 2001). Nas células epiteliais do intestino, são produzidos lipídios mais complexos, tais como, fosfolipídios, diacilglicerol e triacilglicerol (Cavanoso e Wells, 2000; Turunen, 1993). Os lipídios, então, devem ser transferidos para a hemolinfa para serem distribuídos por todo o organismo. Especificamente em carrapatos, Kluck et al., (2018), utilizando ácido palmítico radiomarcado, observaram que, após 30 minutos da injeção, o mesmo já estava presente em

diferentes órgãos (intestino, ovários corpo gorduroso e órgão de Gené) e convertido em lipídios mais complexos.

Os invertebrados não são capazes de sintetizar o CHO sendo a dieta a única fonte desse lipídio (Clark e Block, 1959; Hobson, 1935). Em carrapatos, o CHO é muito importante, participando da síntese de ferormônios e com diversas funções na cutícula de algumas espécies (Cherry, 1976; Sobhhy et al., 1994). Entre as estruturas que compõem o OG, as GCr e GCa são as que mais se destacam na quantidade de CHO, com 19,69% e 16,12%, respectivamente, e, assim como nos demais invertebrados, é proveniente da hemolinfa.

Com relação ao CHOE, é o que se apresenta em maior quantidade no OG (C=38%; GCr= 32% e GCa= 28%). Possivelmente, o processamento do CHOE dentro das células glandulares é realizado a partir da enzima hidroxisteróide desidrogenase que foi encontrada no OG de *R. microplus* (Xavier et al., 2019) e que sabidamente é uma enzima envolvida na modificação ou processamento dos anéis estereoidais em mamíferos (Penning, 1997).

Em insetos, após a absorção pelas células do epitélio intestinal, os ácidos graxos são utilizados para a síntese de lipídios mais complexos e, na hemolinfa, são transportados por lipoforinas para todo o organismo, principalmente na forma de fosfolipídios e diacilgliceróis (Ryan e Van Der Horst, 2000; Soulages e Wells, 1994). Surpreendentemente no OG do *A. sculptum*, o TG é encontrado em grandes quantidades (C=32%; GCr= 15%; GCa= 22%) sugerindo que o mesmo poderia ser produzido no citoplasma das células glandulares a partir da reesterificação do diacilglicerol, oriundo da hemolinfa. Devido à sua inércia química, os TGs podem ser armazenados em grandes quantidades na célula, sem o risco de reações indesejáveis com outros constituintes celulares (Nelson e Cox, 2014). Ainda, em consequência do seu caráter hidrofóbico, o organismo que possui esse lipídio como combustível não precisa carregar o peso extra da água da hidratação (Nelson e Cox, 2014).

Outra importante função, que poderia ser atribuída aos TGs, seria o fato de sequestrar AGs presentes no citoplasma das células glandulares que são extremamente citotóxicos.

Embora os AG sejam sintetizados nas células glandulares (Xavier et al., 2019), os resultados aqui apresentados mostram que é o lipídio que menos aparece no OG (C=15%; GCr= 12%; Gca= 11%). Nós hipotenzamos que os AGs sejam usados para a produção de TG que, como visto acima, também é encontrado no OG. Ainda, podem ser utilizados para a *síntese de novo* do CHOE. Por último, os AGs precisam ser rapidamente eliminados do citoplasma, pois, em grande concentração, podem provocar o rompimento da membrana celular, se tornando tóxico para a célula, principalmente aqueles de cadeias longas (Pompéia e Curi, 2002).

Na cera observa-se maior quantidade de CHOE, estatisticamente significante, quando comparado com AG e CHO ($p= 0,0059$ e $p= 0,0040$, respectivamente) (Tabela 2). Através da TLC, na cera de outras espécies de carrapatos, o CHOE foi o que se apresentou em maior quantidade (*B. microplus* - Booth, 1992; *A. hebraeum* - Yu et al., 2012) corroborando assim os resultados apresentados neste estudo. O TG é a segunda classe de lipídios em maior quantidade, havendo diferença estatística quando comparado com AG e CHO ($p= 0,0093$ e $p= 0,0066$, respectivamente). Interessantemente, o TG foi detectado em pequenas quantidades na cera de *A. hebraeum* (Yu et al., 2012). Em alguns animais, o TG armazenado sob a pele serve tanto de estoque de energia como para isolamento contra baixas temperaturas (Nelson e Cox, 2014). Talvez o TG encontrado na cera do ovo do *A. sculptum* teria uma função termorreguladora, o que seria importante para a manutenção dos ovos até que ocorresse a eclosão.

Dentre os AGs identificados (Tabela 3 e Fig. 6), verifica-se que as GCr e GCa apresentam o mesmo perfil, sendo constituído por ácidos graxos de cadeia longa (C14:0-C24:0), tanto saturados como insaturados. O corpo apresenta 6 ácidos graxos diferentes, 5 dos

quais também estão presentes nas glândulas. A análise do OG de *R. microplus* em oviposição através da CG, também identificou AGs de cadeia longa, tanto saturados como insaturados (Booth,1992), corroborando, dessa forma, com os resultados aqui apresentados.

Com relação a cera do ovo, apesar de o AG se apresentar em menor quantidade, quando comparado aos outros lipídios neutros, alguns tipos de AGs possuem atividade antimicrobiana (Yu et al., 2012). Dessa forma, foi realizada também a técnica de CG para a cera, e os resultados estão apresentados na Tabela 3 e Fig. 6. O AG encontrado exclusivamente no corpo e na cera indica que esse lipídio poderia estar vindo da cutícula do carrapato, uma vez que o OG everte durante a oviposição, entrando em contato com essa área.

Em conclusão, os dados morfológicos aqui apresentados mostram que as células glandulares do OG estão em franca produção de proteínas, mostrada através da técnica para proteínas totais assim como pela presença de grande quantidade de polirribossomos no citoplasma. Nessa etapa, as proteínas são imprescindíveis para a síntese dos lipídios neutros. Por outro lado, pontualmente, foram notadas células glandulares necróticas e mitocôndrias com sinais iniciais de degeneração, confirmando o início da senescência dessas células. As análises dos lipídios neutros mostraram que as glândulas craniais e caudais possuem perfis idênticos, significando que a individualização entre elas é simplesmente anatômica. Ainda, os lipídios encontrados nas GCr e GCa são os mesmos encontrados na cera indicando que o OG possui uma função importante na síntese final da porção lipídica da cera do ovo.

Referências

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.

- 425 Arthur, D.R., 1953. The morphology of the British Prostriata with particular reference to
 426 *Ixodes hexagonus*. Parasitology 42,161-185.
- 427 Barros-Battesti, D. M., Famadas, K.M., Nieri-Bastos, F. A., Beati, L., 2006. Glossário de
 428 terminologias. In: Barros-Battesti D. M, Arzua M, Bechara G. H., Carrapatos de
 429 importância médico veterinária da Região Neotropical: um guia ilustrado para
 430 identificação de espécie. 1ed. São Paulo: Vox/ICTTD - 3/ Instituto Butantan. pp. 191-
 431 204.
- 432 Bayliss, H., Adams, C.W. M., 1972. Bromine Sudan Black (BSB). A general stain for tissue
 433 lipids including free cholesterol. Histochem. J. 4, 505.
- 434 Beati, L., Nava, S., Burkman, E. J., Barros-Battesti, D., Labruna, M. B., Guglielmone, A. A.,
 435 Càceres, A.G., Guzman, C. C., León, R., Durden, L.A., Faccini, J. L. H., 2013.
 436 *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae), the Cayenne tick:
 437 phylogeography and evidence for allopatric speciation. BMC Evol. Biol.13, 267.
- 438 Bernard, G., Bellance, N., James, D., Parrone, P., Feranandez, H., Letellier, T., Rossignol, R.,
 439 2007. Mitochondrial bioenergetics and structural network organization. J. Cell Sci.
 440 120, 838-848.
- 441 Bligh, E.G., Dyer, W.J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. J.
 442 Biochem. Physiol. 37, 911-917.
- 443 Booth, T. F., Beadle, D. J., Hart, R. J., 1985. An ultrastructure and physiological study of the
 444 retractor muscles of Gené's organ in the cattle ticks *Boophilus microplus* and
 445 *Amblyomma variegatum*. Exp. Appl. Acarol. 1, 165-177.
- 446 Booth, T. F., 1989. Wax lipid secretion and ultrastructural development in the egg-waxing
 447 (Gené's) organ in ixodid ticks. Tissue Cell 21, 113-122.
- 448 Booth, T. F., 1992. Observation on the composition and biosynthesis of egg wax lipids in the
 449 cattle tick, *Boophilus microplus*. Exp. Appl. Acarol.14,137.

- 450 Canavoso, L.E., Wells, M.A., 2000. Metabolic pathways for diacylglycerol biosynthesis and
 451 release in the midgut of larval *Mpanduca sexta*. Insect Biochem. Mol. Biol. 30, 1173–
 452 1180.
- 453 Canavoso, L.E., Jouni, Z.E., Karnas, K.J., Pennington, J.E., Wells, M.A., 2001. Fat
 454 metabolism in insects. Annu. Rev. Nutr. 21, 23-46.
- 455 Castedo, M., perfettini, J.L., Roumier, T., Andreau, K., Kroemer, G., 2004. Cell death by
 456 mitotic catastrophe: A molecular definition. Oncogene 23, 2825-837.
- 457 Cherry, L.M., 1976. Utilization of cholesterol by the cattle tick *Boophilus microplus*:
 458 cholesterol economy in the engorged female adult. Insect Biochem. Mol. Biol. 6, 587-
 459 594.
- 460 Clark, A. J., Block, K., 1959. The absence of sterol synthesis in insents. J.Biol. Chem. 234,
 461 2578 – 2582.
- 462 Curi, R., Pompéia, C., 2002. Efeitos citotóxicos dos ácidos graxos – Lipoapoptose. In: Curi, R.,
 463 Pompéia, C., Miyasaka, C. K., Procopio, J., Entendendo a gordura – Os ácidos graxos.
 464 1º ed. São Paulo: Manole. p. 321-343.
- 465 Dantas -Torres, F., 2009. Canine leishmaniosis in south America. Parasit. Vectors. 2 – 1.
- 466 Dimri,G.P., 2005. What has senescence got to do with cancer? Cancer Cell 7, 505-12.
- 467 El Shoura, S. M., 1987. Fine structure of the Gene's organ in the camel tick *Hyalomma*
 468 *dromedarrii* (Ixodoidea: Ixodidae). J. Morphol.193, 1, 91- 98.
- 469 El Shoura, S. M., 1988. Fine structure of the vagina, accessory glands, uterus, oviducts and
 470 Gene's organ in the unfed tick, *Ornithodoros (Pavlovskyella) erraticus* (Ixodoidea:
 471 Argasidae). Exp. Appl. Acarol. 4, 95-108.
- 472 Freitas, C. M. V., Leite, R. C., Lopes,C. M. L., Rodrigues, D., Paz, G. F., Oliveira, P. R.,
 473 2002. Lack of Parthenogenesis by *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). Mem.
 474 Inst. Oswaldo Cruz. 97(6), 843-846.

- 475 Formigli, L., Papucci, L., Tani, A., Schiavone, N., Tempestini, A., Orlandini, G. E.,
 476 Capaccioli, S., Orlandini, S. Z., 2000. Aponecrosis: Morphological and Biochemical
 477 Exploration of a Syncretic Process of Cell Death sharing Apoptosis and Necrosis. J.
 478 Cell. Physiol. 182, 41 – 49.
- 479 Gené, G., 1848. Memoria per servire alla storia naturale degli issodi. Mem. Rea. Acad. Sci.
 480 Torino. 9, 751 - 786.
- 481 Hernandez-Blazquez, F. J., Guerra, R. R., Foury, J. R., Bombonato, P.P., Cogliati, B., Cunha
 482 da Silva, J.R., 2006. Fat absorptive processes in the intestine of the Antarctic fish
 483 *Notothenia coriiceps* (Richardson, 1844). Polar Biol. 29, 831–836.
- 484 Hobson, R. P., 1935. CLVI on a fat soluble growth facto required by blow-fly larvae.
 485 Biochem. J. 29, 1292 – 1296.
- 486 Junqueira, L. C., Junqueira, L. M., 1983. In: Junqueira, L. C., Junqueira, L. M. Técnicas
 487 básicas de citologia e histologia. 1º ad. Santos, pp. 125 – 142.
- 488 Kakuda, H., Möri, T., Shiraishi, S., 1992. Functional morphology of Gené’s organ in
 489 *Haemaphysalis longicornis* (Acari: Ixodidae). Exp. Appl. Acarol. 16, 263-275.
- 490 Kakuda, H., Möri, T., Shiraishi, S., 1995. Effects of feeding and copulation on ultrastructural
 491 changes of the tubular glands of Gené’s organ in female *Haemaphysalis longicornis*
 492 (Acari: Ixodidae). J. Acarol. Soc. Jpn. 4(1),1-13.
- 493 Karnovsky, M.J., 1965. Formaldeyde-Glutaraldeyde fixative of high osmolarity for use in
 494 electron microscopy. J. Cell Biol. 27, 137a.
- 495 Kawooya, J. K., Law, J. H., 1988. Role of lipophorin in lipid transport to insect egg. J. Biol.
 496 Chem. 263, 8748-8753.
- 497 Kluck, G. E.G., Silva Cardoso, L., De Cicco, N.N.T., Lima, M.S., Folly, E., Atella, G.C.,
 498 2018. A new lipid carrier protein in the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. Ticks
 499 Tick. Dis. 9, 850 – 859.

- 500 Lees, A. D., Beament, J. W. L., 1948. An organ waxing in ticks. Q. J. Microsc. Sci. 7, 291-
501 332.
- 502 Lima-Netto, S., Mendonça, R. Z., Franzolin, M. R., Utescher, C. L., Orozco, S., Máximo-
503 Espindola, C., Labruna, M. B., Barros-Battesti, D. M., 2011. An interesting
504 antimicrobial activity of egg wax from *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae).
505 Syst. Appl. Acarol. 16, 3 -6.
- 506 Lima-Netto, S., Pinheiro, A., Nakano, E., Zucatelli, R. M., Barros-Battesti, D. M., Mendonça,
507 R. Z., 2012. Antiviral effect of the egg wax of *Amblyomma cajennense* (Acari:
508 Ixodidae). Citotechnology 64 (5), 601-6.
- 509 Luz, H.R., Faccini J.L.H., 2013. Ticks on Brazilian Birds: Overview. In: Luz H.R., Faccini
510 J.L.H., Birds: Evolution and Behavior, Breeding Strategies, Migration and Spread of
511 Disease. 1^oed. Nova York: Nova Publishers. pp. 98-125.
- 512 Martins, T.F., Barbieri, A. R. M., Costa, F. B., Terassini, F. A., Camargo, L. M. A., Peterka,
513 C. R. L., Pacheco, R. C., Dias, R. A., Nunes, P. H., Marcili, A., Scolfield, A., Campos,
514 A. K., Horta, M. C., Guilloux, A. G. A., Benatti, H. R., Ramirez, D. G., Barros-
515 Battesti, D.M., Labruna, M.B., 2016. Geographical distribution of *Amblyomma*
516 *cajennense* (sensu lato) ticks (Parasitiformes: Ixodidae) in Brazil, with description of
517 the nymph of *A. cajennense* (sensu stricto). Parasit. Vectors. 9, 186.
- 518 Mizumura, K., Maruoka, S., Shimizu, T., Gon, Y., 2018. Autophagy, selective autophagy, and
519 necroptosis in COPD. Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis. 13, 3165-3172.
- 520 Nava, S., Beati, L., Labruna, M. B., Cáceres, A. G., Mangold, A. J., Guglielmone, A. A.,
521 2014. Reassessment of the taxonomic status of *Amblyomma cajennense* (Fabricius,
522 1787) with the description of three new species, *Amblyomma tonelliae* n. sp.,
523 *Amblyomma interandinum* n. sp. And *Amblyomma patinoi* n. sp., and reinstatement of

- 524 *Amblyomma mixtum* Koch, 1844, and *Amblyomma sculptum* Berlese, 1888 (Ixodida:
525 Ixodidae). Ticks Tick. Dis. 5(3), 252-76.
- 526 Neitz, W.O., Boughton, F., Waltrs, H. S., 1971. Laboratory investigations on the life-cycle of
527 the Karoo paralysis tick *Ixodes rubincundus* (Neumann, 1904). Onderstepoort J. Vet.
528 Res. 38 (3), 215-224.
- 529 Nelson, D. L., Cox, M. M., 2014. Biossíntese de lipídeos. In: Nelson, D. L., Cox, M. M.,
530 Princípios de Bioquímica de Lehninger. 6° ed. São Paulo: Artmed. pp. 833 – 881.
- 531 Okada, H., Mak, T.W., 2004. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells.
532 Nat. Rev. Cancer 4, 592-603.
- 533 Pearse, A. G. E., 1985. Histochemistry. In: Theoretical and applied, v.2. Edinburgh: Churchill
534 Livingstone.
- 535 Penning, T. M., 1997. Molecular endocrinology of hydroxysteroid dehydrogenases. Endocr.
536 Rev. 18, 281–305.
- 537 Potterat, O., Hostettmann, K., Hölzel, A., Jung, G., Diehl, P. A., Petrini, O., 1997.
538 Boophilin, an antimicrobial sterol amide from the cattle tick *Boophilus microplus*.
539 Helv. Chim. Acta. 80, 2066 – 2072.
- 540 Ruiz, J.I., Ochoa, B., 1997. Quantification in the subnanomolar range of phospholipids and
541 neutral lipids by monodimensional thin-layer chromatography and image analysis. J.
542 Lipid Res. 38,1482–1489.
- 543 Ryan, R. O., Van Der Horst, D. J., 2000. Lipid transport biochemistry and its role in energy
544 production. Annu. Rev. Entomol. 45, 233 – 260.
- 545 Santos, M. F., Soares, M. A. M., Lallo, M. A., Barros-Battesti, D. M., Lima-Netto, S.,
546 Spadacci-Morena, D. D., 2018. Morphodifferentiation of Gené's organ in engorged
547 *Amblyomma sculptum* Berlese, 1888 female ticks (Acari: Ixodidae). Ticks Tick. Dis. 9,
548 519 – 525.

- 549 Schöl, H., Sieberz, J. E., Göbel, E., Gothe, R., 2001a. Morphology and structural organization
550 of Gene's organ in *Dermacentor reticulatus* (Acari: Ixodidae). Exp. Appl. Acarol. 25,
551 327-352.
- 552 Schöl, H., Sieberz, J. E., Göbel, E., Gothe, R., 2001b. Morphology and structural organization
553 of Gene's organ in *Argas walkerae*. Med. Vet. Entomol.15, 422-432.
- 554 Siebertz, J., Gothe, R., 2000. Modus operandi of oviposition in *Dermacentor reticulatus*
555 (Acari: Ixodidae). Exp. Appl. Acarol. 24, 63-76.
- 556 Sobbhay, H., Aggour, M. G., Sonenshine, D. E., Burridgr, M. J., 1994. Cholesterol esters on
557 the body surfaces of the camel tick, *Hyalomma dromedarii* (Koch, 1844) and the
558 brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1860). Exp. Appl. Acarol. 18,
559 265-280.
- 560 Sonenshine, D. E., Roe R. M., 2013. External and internal anatomy of ticks. In: Sonenshine,
561 D. E., Roe, R. M., *Biology of ticks*. V.1. 2° ed. New York: Oxford University press.
562 pp. 74 - 98.
- 563 Soulages, J.L., Wells, M.A., 1994. Lipophorin: the structure of an insect lipoprotein and its
564 role in lipid transport in insects. Adv. Protein Chem. 45, 371-415.
- 565 Stevens, A., Lowe, J., 2002. Dano e morte celular. In. Stevens, A., Lowe, J., Patologia. 1°ed.
566 São Paulo: Manole. pp. 23 – 35.
- 567 Turunen, S., 1993. Metabolic pathways in the midgut epithelium of *Pieris brassicae* during
568 carbohydrate an assimilation. Insect Biochem. Mol. Biol. 23-08.
- 569 Verlencia, R., Lima, T. M., 2002. Síntese de ácidos graxos. In: Curi, R., Pompéia, C.,
570 Miyasaka, C. K., Procopio, J., Entendendo a gordura – Os ácidos graxos. 1° ed. São
571 Paulo: Manole. pp. 121-135.
- 572 Xavier, M. A., Tirloni, L., Pinto, A. F. M., Diedrich, J. K., Yates III, J. R., Gonzales, S, Farber,
573 M., Vaz Junior, I. S., Termignoni, C., 2019. Tick Gené's organ engagement in lipid

metabolism revealed by a combined transcriptomic and proteomic approach. Ticks Tick. Dis. 10, 787 – 797.

- Yu, Z., Thomson, E. L. S., Liu, J., Dennis, J. J., Jacobs, R. L., Kaufman, W. R. 2012. Antimicrobial activity in the egg wax of the tick *Amblyomma hebraeum* (Acari: Ixodidae) is associated with free fatty acids C16:1 and C18:2. Exp. Appl. Acarol. 584, 53 – 470.
- Zimmer, K. R., Macedo, A. J., Giordani, R. B., Conceição, J. M., Nicastro, G. G., Boechat, A. L., Baldini, R. L., Abraham, W. R., Termignoni, C., 2013a. A steroidal molecule present in the egg wax of the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* inhibits bacterial biofilms. Environ. Microbiol. 15, 2008 - 2018.
- Zimmer, K. R., Macedo, A. J., Nicastro, G. G., Baldini, R. L., Termignoni, C., 2013b. Egg wax from the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* inhibits *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. Ticks Tick. Dis. 4, 366 - 376.

Legendas das figuras

Figura 1. Estereomicrografia do Órgão de Gené de *A. sculptum*, no 1º dia de oviposição. Corpo (C). Corno (H). Glândula cranial (GCr). Glândula caudal (GCa). Ducto principal (d). Músculos retratores (mur). Barra: 500µm.

Figura 2. Fotomicrografias de parte de glândulas tubulares do Órgão de Gené de *A. sculptum*, no 1º dia de oviposição. **A, B e C** - As células epiteliais colunares, com núcleos elípticos (N), se encontram desalinhadas e debris (D) são observados na luz das gl. (L). Gotas lipídicas típicas (Li) estão presentes por todo citoplasma. Em alguns pontos de algumas glândulas tubulares, são observados grupos de células com sinais claros de desorganização (*). Hematoxilina e Eosina (Figs. A e B). Azul de Metileno (Fig. C). Barras: 30 µm, 30 µm, 100 µm, respectivamente. **D** – Células PAS fortemente positivas, principalmente na região basal.

599 Na região apical, a reação está intimamente ligada a gotas lipídicas. L – luz. N – núcleo.
 600 Reação de Ácido Periódico de Schiff. Barra: 20 μm . **E** – Notar reação positiva por todo o
 601 citoplasma, com exceção das áreas onde lipídios estão presentes (seta). L – luz. Reação de
 602 Azul de Bromofenol. Barra: 30 μm . **F** – Gotas lipídicas (escuras) são notadas principalmente
 603 na região apical. L – luz. N – núcleo. Sudan Black B. Barra: 30 μm .

604 **Figura 3.** Eletronmicrografias de células epiteliais da glândula do OG. **A** - Mitocôndrias (mi),
 605 assim como gotas lipídicas (Li) são observadas por todo o citoplasma. Notar a presença de
 606 inclusões de glicogênio, associadas a depósitos lipídicos (DLi), na região basal. MB-
 607 membrana basal. Barra: 5 μm . **B** – Células epiteliais mostrando que as interdigitações, nessa
 608 região, estão frouxas ou ausentes (*). L- luz. N- núcleo. Barra: 5 μm . **C** - Debris celulares (D)
 609 presentes na luz (L) da glândula. Barra: 5 μm .

610 **Figura 4.** Eletronmicrografias de células epiteliais da glândula do OG. **A, B, e C** -
 611 Mitocôndrias (mi) com morfologia típica ao lado de outras edemaciadas (mid), com cristas
 612 não preservadas e agregados eletrondensos e concêntricos (setas). Barras: 2 μm , 1 μm , 1 μm ,
 613 respectivamente.

614 **Figura 5. A** - Cromatograma de uma placa de TLC mostrando colesterol esterificado
 615 (CHOE), triacilglicerol (TG), ácido graxo (AG) e colesterol (CHO). **B** - Gráfico mostrando as
 616 porcentagens dos lipídios neutros. Corpo (C). Glândula cranial (GCr). Glândula caudal (GCa).
 617 Cera dos ovos (cera).

618 **Figura 6.** Eletroferograma de perfis dos ácidos graxos. Glândulas caudais (GCa). glândulas
 619 craniais (GCr). Corpo (C). Cera dos ovos (cera). Padrão (PD)



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

Av. Dr. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 2627-9585 - Fax: (55) (011) 2627-9505
ceuaib@butantan.gov.br

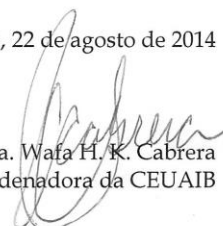
CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Análise histológica, histoquímica e ultraestrutural do órgão de Gené em diferentes etapas do processo reprodutivo do carrapato *Amblyomma sculptum* (Acari: Ixodidae)", **protocolo nº 1279/14**, sob a responsabilidade de Diva Denelle Spadacci Morena e Marcelo Francisco dos Santos – que envolve a criação e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica – está de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009 e de normas complementares, bem como está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 20/8/2014.

This is to certify that the proposal "Histological, histochemical and ultrastructural analysis of Gené's organ in different stages of the reproductive process of the tick *Amblyomma sculptum* (Acari: Ixodidae)", **protocol nº 1279/14**, under the responsibility of Diva Denelle Spadacci Morena and Marcelo Francisco dos Santos – which involves the breeding and/or use of animals belonging to phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings) – has been reviewed by the Institute Butantan Animal Care and Use Committee and approved in 8/20/2014. This proposal is in accordance with standards outlined by Brazilian laws for use of experimental animals, and with ethical principles adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation.

Vigência do Projeto:	Nº de animais/espécie
08/2014 - 06/2016	
Laboratório de Fisiopatologia	9 Coelhos 2000-3000g (Indiferente)

São Paulo, 22 de agosto de 2014


Dra. Wafa H. K. Cabrera
Coordenadora da CEUAIB

Tabelas

Tabela 1. Percentual de lipídeos neutros comparados na mesma estrutura (letras minúsculas), bem como o percentual comparado entre as diferentes estruturas (letras maiúsculas) do OG de *A. sculptum*.

OG	CHOE (%)	TG (%)	AG (%)	CHO (%)
C	38,44 ± 7,03aA	32,84 ± 10,18abA	15,26 ± 7,44bA	9,93 ± 6,06bA
GCa	28,75 ± 7,14aA	22,89 ± 13,71abA	11,73 ± 6,69bA	16,12 ± 5,27bBC
GCr	32,6 ± 6,80aA	15,3 ± 9,70bA	12,99 ± 3,30bA	19,69 ± 7,06bC

Letras minúsculas iguais na mesma linha não apresentam diferença significativa com teste de Kruskal Wallis seguido de Student-Newman-Keuls ($p > 0,05$).

Letras maiúsculas iguais na mesma coluna não apresentam diferença significativa com teste de Kruskal Wallis seguido de Student-Newman-Keuls ($p > 0,05$).

C= CHOE x TG ($p=0,5962$); CHOE x AG ($p= 0,0341$); CHOE x CHO ($p=0,0010$); TG x AG ($p=0,1120$); TG x CHO ($p=0,0068$); AG x CHO ($0,3334$).

GCa = CHOE e TG $p=0,2622$; TG e AG são diferentes ($p=0,1248$); TG e CHO são 0,2845; AG e 4 são iguais ($p=0,6767$); CHOE e AG são diferentes ($p=0,0068$); CHOE e CHO são diferentes ($p=0,0284$).

GCr= CHOE e TG são diferentes ($p=0,0321$); CHOE e AG são diferentes ($p=0,0028$); CHOE e CHO são diferentes ($p=0,0323$); TG e AG são iguais ($p=0,4531$); TG e CHO são iguais ($p=0,9223$); AG e CHO são iguais ($p=0,3739$).

CHOE= Não teve diferença significativa ($p=0,2576$).

TG= Não teve diferença significativa ($p=0,4773$).

AG= Não teve diferença significativa ($p=0,2705$).

CHO = C e GCa são diferentes ($p=0,0454$); C e GCr são diferentes ($p=0,0130$); GCa e GCr são iguais ($p=0,5529$).

Tabela 2. Percentual de lipídios neutros encontrados na cera dos ovos, ao final da oviposição, da espécie *A. sculptum*.

Cera dos ovos	
CHOE (%)	25,81 ± 12,50a
TG (%)	24,01 ± 4,74a
AG (%)	7,99 ± 4,29b
CHO (%)	9,28 ± 5,09b

Letras minúsculas iguais não apresentam diferença significativa com teste de Kruskal Wallis seguido de Student – Newman – Keuls ($p > 0.05$).

CERA

CHOE x AG ($p = 0.0059$); CHOE x CHO ($p = 0.0040$); TG e AG são diferentes ($p = 0.0093$); TG e CHO são diferentes ($p = 0.0066$); CHOE e TG são iguais ($p = 0.8785$); AG e CHO são iguais ($p = 1.0000$)

Tabela 3. Ácidos graxos do OG de *A. sculptum* identificados pela Cromatografia Gasosa.

AG identificados	C	GCa	GCr	cera
C14:0				•
C14:1n-5	•	•	•	•
C15:0		•	•	
C16:0	•	•	•	•
C16:1n-7	•			•
C17:0		•	•	•
C17:1n-7		•	•	•
C18:0	•	•	•	•
C18:1n-9	•	•	•	•
C18:2n-6	•	•	•	•
C18:3n-6				•
C18:3n-3				•
C20:0		•	•	•
C20:4n-6				•
C21:0		•	•	
C22:0		•	•	
C22:2n-6		•	•	•
C22:6n-3		•	•	
C23:0		•	•	•
C24:0		•	•	

AG ácido graxo

C corpo

GCa glândula caudal

GCr glândula cranial

Figura 1.

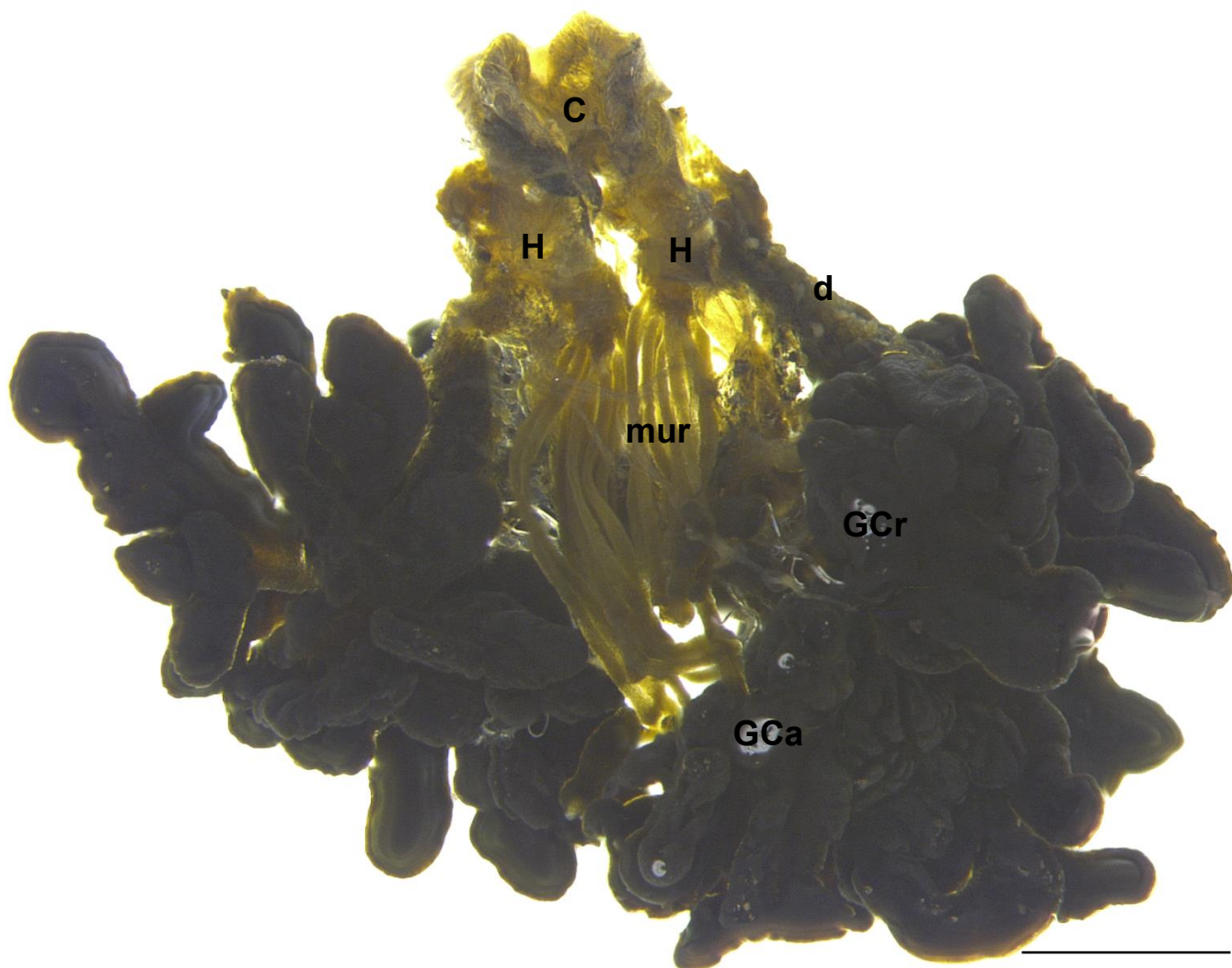


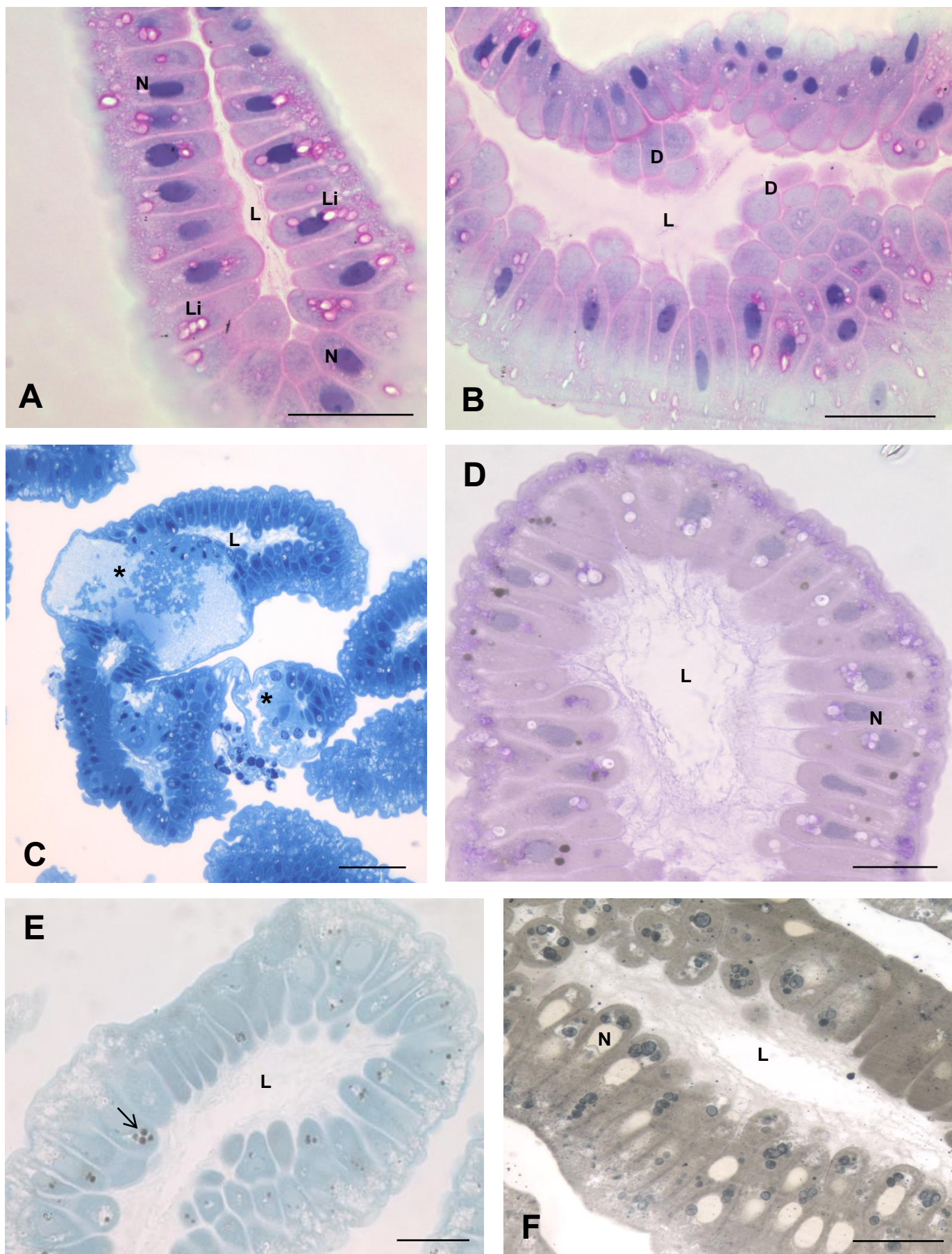
Figura 2.

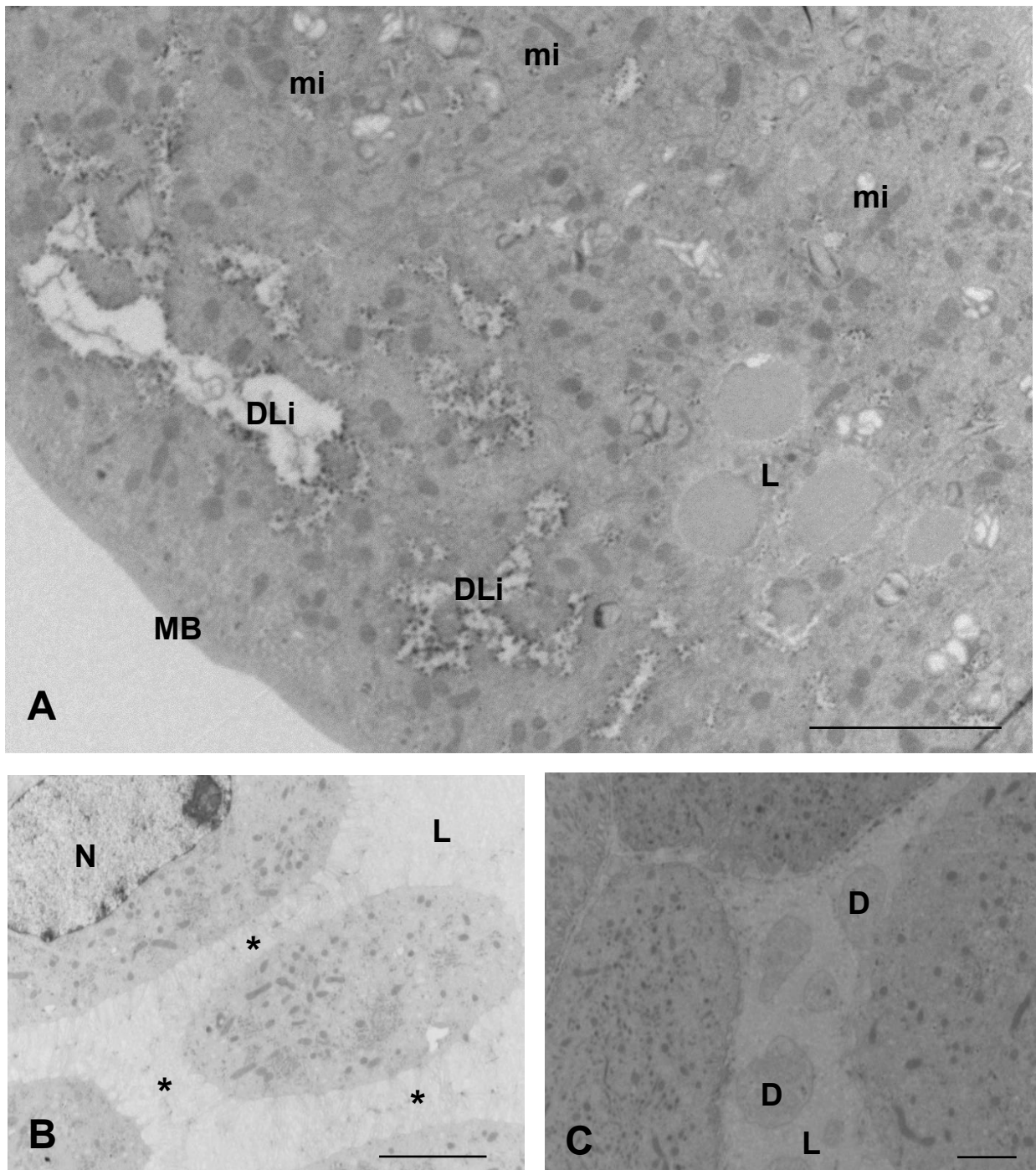
Figura 3.

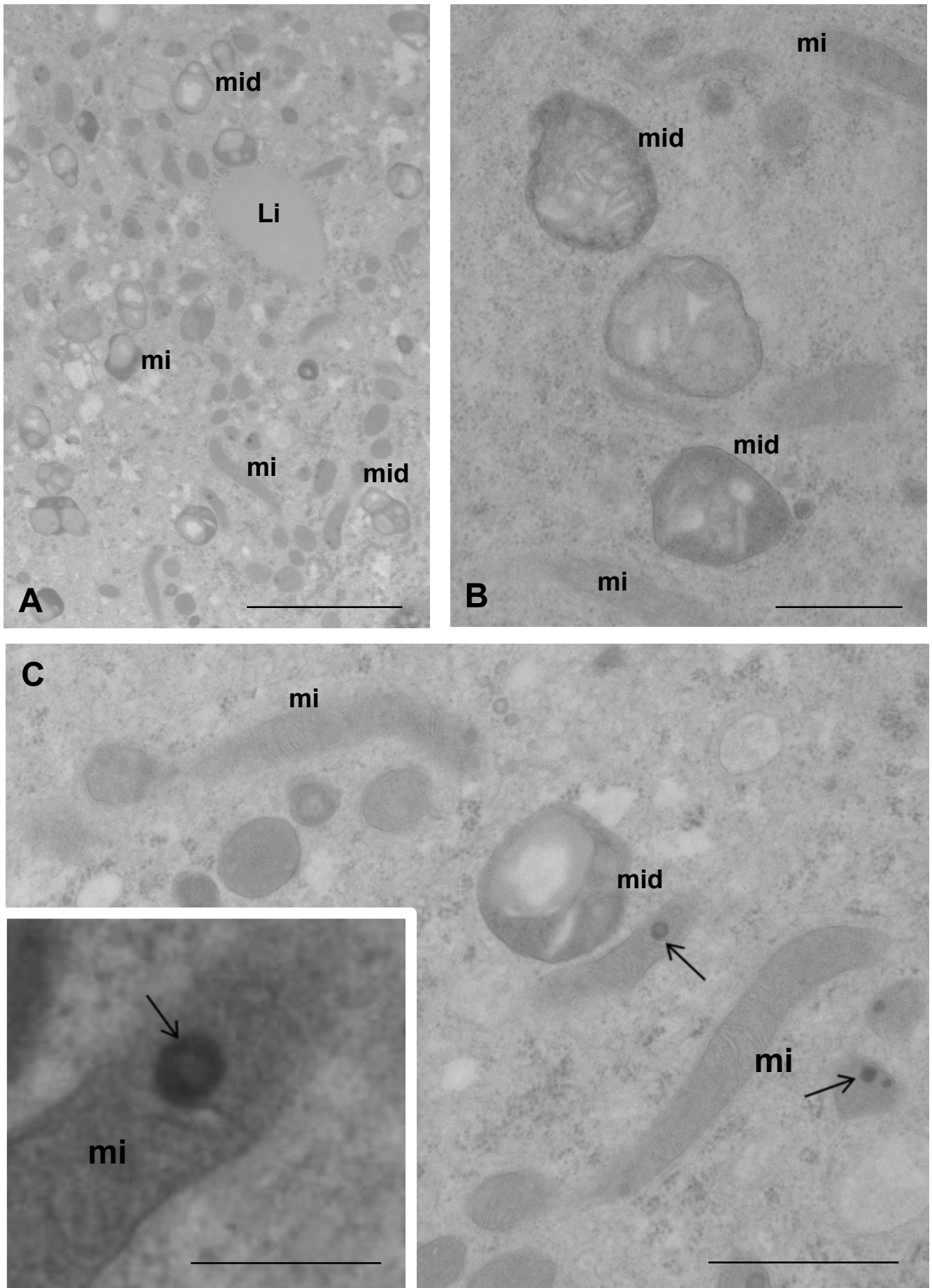
Figura 4.

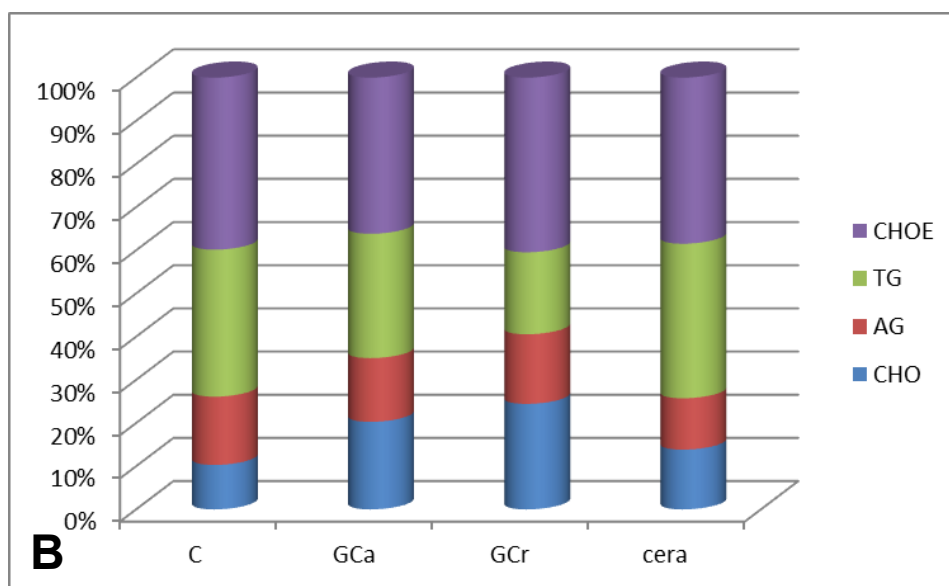
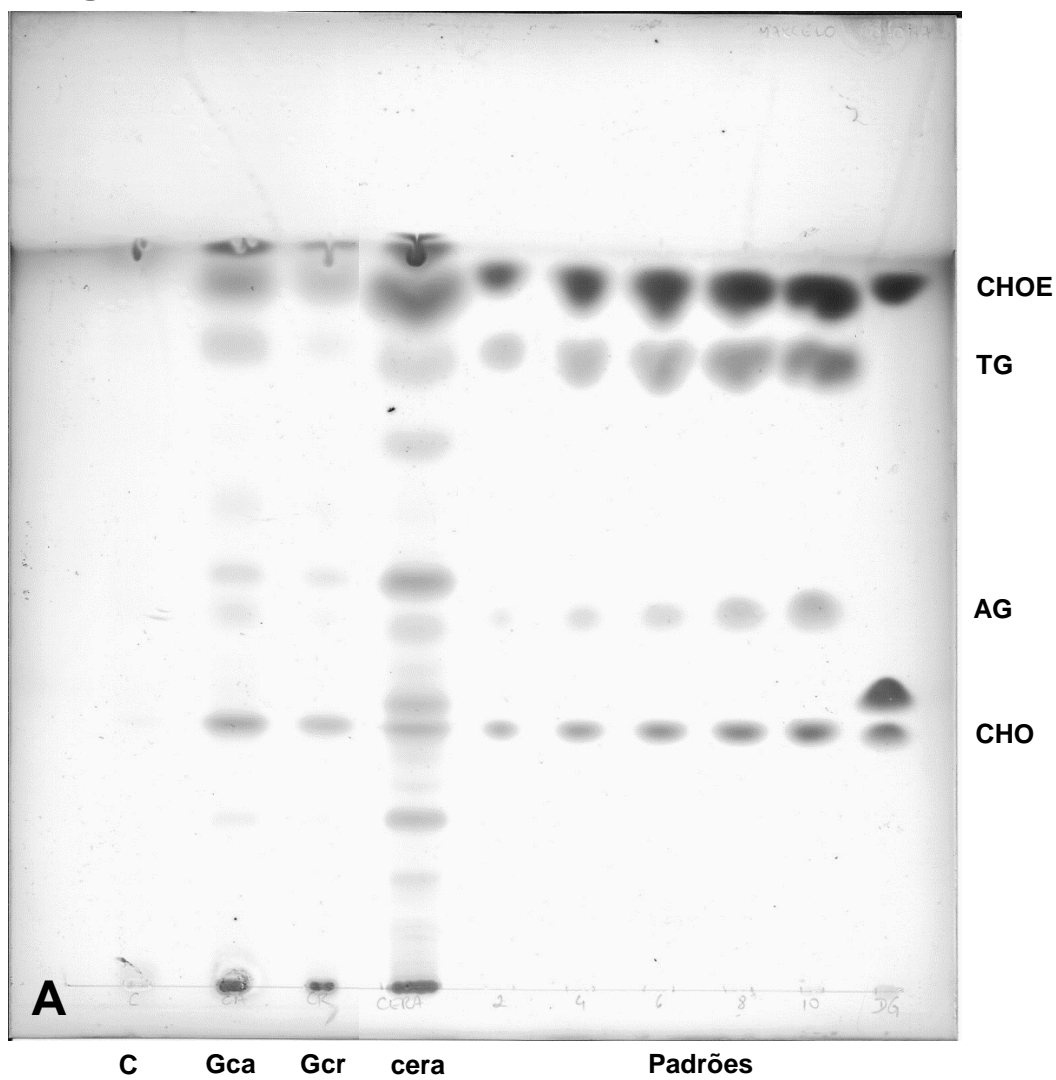
Figura 5.

Figura 6.

