

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.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> 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.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Anete Lallo.

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> 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.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Anete Lallo  
Universidade Paulista – UNIP

\_\_\_\_\_- \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ivana Barbosa Suffredini  
Universidade Paulista – UNIP

\_\_\_\_\_- \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_  
Prof. Dr. José Guilherme Xavier  
Universidade Paulista – UNIP

\_\_\_\_\_- \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Isabel de Fátima Correia Batista  
Instituto Butantan

\_\_\_\_\_- \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> 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. Darcy 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 carapatos subdivididas em três famílias: Argasidae, Ixodidae e Nuttalliellidae (NAVA et al., 2009). Cerca de 80% dos carapatos descritos pertencem à família Ixodidae e dentre estes encontram-se carapatos 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 carapatos 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 carapatos 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 carapatos 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 carapato 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 carapato 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 carapatos 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 carapato 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 carapatos, 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 fandeiras, já os escorpiões retém os ovos dentro do corpo materno (vivíparos e ovovivíparos), os ácaros ovipodem 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 carapatos 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 carapatos, 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 médica 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 carapato. *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. *Athropod 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. Boophiline, 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.

1 **Periódico para submissão: Ticks and Tick-Borne Diseases ISSN:**  
2 **1877 – 959X**

3  
4 **Características estruturais do órgão de Gené de *Amblyomma sculptum* Berlese, 1888**  
5 **(Acari: Ixodidae) no primeiro dia de oviposição e sua participação na composição**  
6 **lipídica da cera dos ovos**

7  
8 **Structural characteristics of Gené's organ in *Amblyomma sculptum* Berlese, 1888 (Acari:**  
9 **Ixodidae) on the first day of oviposition and its participation in the lipid composition of**  
10 **egg wax**

11  
12 Marcelo Francisco dos Santos<sup>a,b</sup>, Maria Anete Lallo<sup>b</sup>, Isabele da Costa Angelo<sup>c</sup>, Magna

13 Aparecida Maltauro Soares<sup>a</sup>, Sayuri Miyamoto<sup>d</sup>, Alex Inague<sup>d</sup>, Darci Moraes Barros-Battesti<sup>e</sup>,  
14 Vânia Rita Pinheiro Bittencourt<sup>f</sup>, Diva Denelle Spadacci-Morena<sup>a\*</sup>

15 <sup>a</sup>Laboratório de Fisiopatologia, Instituto Butantan, São Paulo, Brasil

16 <sup>b</sup>Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental, Universidade  
17 Paulista, São Paulo, Brasil

18 <sup>c</sup>Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, Universidade Federal Rural do Rio de  
19 Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil

20 <sup>d</sup>Instituto de Química - Departamento de Bioquímica, Universidade de São Paulo, São Paulo,  
21 Brasil

22 <sup>e</sup>Departamento de Patologia Veterinária, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita  
23 Filho”, São Paulo, Brasil

24 <sup>f</sup>Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de  
25 Janeiro, Brasil

26 \* Autor correspondente

27 **Resumo**

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

39

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

42

43 **Abstract**

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

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

55

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

58

## 59 **Introdução**

60 Os carapatos são ectoparasitas de vertebrados, pertencentes ao filo Arthropoda, classe  
61 Aracnida, ordem Acari e subordem Ixodida, constituindo três famílias: Argasidae (carapato  
62 mole), Ixodidae (carapato duro) e Nutallielidae (monotípica). No Brasil, estão presentes as  
63 duas primeiras as quais são as mais diversificadas em espécie e possuem uma enorme  
64 variedade de hospedeiros, incluindo o homem (Luz e Faccini 2013). Esses artrópodes causam  
65 espoliação determinada pelo repasto sanguíneo e lesões cutâneas graves, e, adicionalmente,  
66 são vetores de microrganismos como vírus, helmintos, protozoários e bactérias, tais como a  
67 espécie *Rickettsia rickettsii*, agente etiológico da febre maculosa brasileira (FMB) (Barros-  
68 Battesti et al., 2006). No Brasil, o gênero *Amblyomma* é o de maior importância médica, com  
69 espécies distribuídas nas diversas regiões do país (Dantas-Torres, 2009). Na região sudeste, a  
70 espécie que mais se destaca é o *Amblyomma sculptum* (carapato estrela), de ampla ocorrência  
71 em áreas periurbanas e rurais, atuando como reservatório e vetor da FMB (Navas et al., 2014).  
72 Os carapatos dessa espécie ovipõem em média 8 mil ovos com eclodibilidade de até 91%  
73 (Freitas et al., 2002). O que garante a alta viabilidade desses ovos é a cera produzida por uma  
74 estrutura, exclusiva dos carapatos, chamada órgão de Gené (OG) (Kakuda et al., 1992). O  
75 OG é encontrado somente nas fêmeas, estando ausente nos machos e nos estágios imaturos,  
76 do seu ciclo de vida (Arthur, 1953). Está localizado na região anterior do idiossoma dorsal,

77 entre a base do gnatossoma e o escudo, na cavidade camerostomal dos argasídeos e, nos  
78 ixodídeos, na emarginação (Booth et al., 1992; Schöl et al., 2001a; Barros-Battesti et al.,  
79 2006; Sonenshine e Roe, 2013). Durante o processo de oviposição, o OG everte e retrai  
80 inúmeras vezes com o objetivo de recobrir completamente cada ovo com a cera produzida por  
81 ele (Lees e Beament, 1948; Arthur, 1953; Kakuda et al., 1992; Seiberz e Gothe, 2000; Schöl  
82 et al., 2001a; Schöl et al., 2001b). Quando o OG é impedido de entrar em contato com os  
83 ovos, os mesmos não eclodem (Gené, 1848; Kakuda et al., 1992). A cera produzida tem a  
84 função de agrupar os ovos, impedindo a perda de água para o ambiente (Lees e  
85 Beament, 1948; Booth, 1989; 1992). Alguns estudos mostraram que a cera produzida pelo OG  
86 exibe propriedades antimicrobianas (Potterat et al., 1997; Arrieta et al., 2006; Lima-Netto et  
87 al., 2011; 2012; Yu et al., 2012; Zimmer et al., 2013a; 2013b).

88 Basicamente, o OG de fêmeas ingurgitadas é constituído de um corpo, um par de  
89 cornos, um par de glândulas craniais, um par de glândulas caudais e feixes de músculos  
90 retratores (Schöl et al., 2001a; Santos et al., 2018). A morfologia do OG foi descrita em  
91 diferentes fases do ciclo de vida em *Haemaphysalis longicornis* (Kakuda et al., 1992; 1995),  
92 *Demacentor reticulatus* (Schöl et al., 2001a), *Argas walkerae* (Schöl et al., 2001b),  
93 *Ornithodoros moubata* e *Ixodes ricinus* (Linnaeus) (Lees e Beament, 1948), *Boophilus*  
94 *microplus* (Booth et al., 1984; Booth 1989; 1992), *Rhipicephalus appendiculatus* (Booth,  
95 1989), *Hyalomma dromedarii* (El Shoura, 1987), *Ornithodoros erraticus* (El Shoura, 1988).  
96 Recentemente, foi descrita a morfologia do OG de *A. sculptum*, demonstrando que o mesmo  
97 sofre a maior parte do seu desenvolvimento na pré-oviposição, entre 0 hora e o 7º dia de  
98 queda do hospedeiro, indicando o processo de maturação para a capacitação do órgão à sua  
99 função no processo de oviposição (Santos et al., 2018). Contudo, não existem estudos  
100 descrevendo a estrutura do OG de *A. sculptum* em oviposição. Estudo recente envolvendo  
101 proteômica e transcriptoma indicou que as células que constituem as glândulas do OG *R.*

102 *microplus* em oviposição estão equipadas com uma maquinaria para síntese, alongamento e  
103 oxidação de ácidos graxos, além de possuir outra para modificação de lipídios (Xavier et al.,  
104 2019). Diante do exposto, observamos lacunas de conhecimento que não permitam entender a  
105 dinâmica de desenvolvimento do OG e suas características funcionais relacionadas à produção  
106 da cera, substância fundamental para a viabilidade dos ovos e, portanto, para a perpetuação da  
107 espécie. Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo descrever a morfologia do OG  
108 no 1º dia de oviposição (1º dovip), sendo o estudo histoquímico realizado para identificar a  
109 natureza química dos constituintes celulares que compõem esse órgão na fase de oviposição.  
110 Adicionalmente, foram identificados por cromatografia, os lipídios neutros presentes no OG  
111 de carapatos no 1º dovip e na cera dos ovos ao final da oviposição.

112

## 113 **Material e métodos**

### 114 **1- Animais**

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

122

### 123 **2- Delineamento experimental**

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

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

131

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

133 Os carapatos, no primeiro dia de oviposição, foram dissecados sob microscópio  
134 estereoscópico, sendo removida a superfície ventral do corpo (idiossoma) para a exposição do  
135 órgão. Esse procedimento foi realizado com o carapato imerso em solução contendo (NaCl  
136 7.5g/L, Na<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub> 2.38g/L e KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub> 2.72g/L).

137 O OG foi fixado em solução de Karnowsky (1965), por aproximadamente 3h, à  
138 temperatura ambiente. Em seguida, foi pós-fixado em solução aquosa de tetróxido de ósmio a  
139 1%, por 1h a temperatura ambiente, e desidratado em concentrações crescentes de álcool  
140 etílico (30% a 70%). Para esse estudo, Foram utilizados 2 carapatos. O material foi  
141 examinado e fotografado no estereomicroscópio Leica M205 A.

142

143 ***4- Processamento do órgão de Gené para exame ao microscópio de luz***

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

149 Testes histoquímicos foram realizados para detectar proteínas totais (Azul de  
150 Bromofenol - Pearse, 1985), polissacarídeos neutros (PAS - Junqueira e Junqueira, 1983) e  
151 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

159      **5- Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) do órgão de Gené**

160      O OG de carrapatos no 1º diovip 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

169      **6- Análise dos lipídios neutros**

170      **6.1- Órgão de Gené**

171      O OG de carrapatos no 1º diovip 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.

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

180

181 **7 - Extração de lipídios**

182 A extração dos lipídios foi realizada com clorofórmio: metanol: água (1: 2: 0,8) (v/v/v)  
183 de acordo com o método descrito por Bligh e Dyer (1959). Os lipídios extraídos foram  
184 armazenados a -20° C, para posterior análise. Foram utilizados 10 glândulas craniais (GCr),  
185 10 glândulas caudais (GCa), 5 corpos (C) e 100 mg de massa de ovos. Esse ensaio foi  
186 realizado em quadruplicata, em um único momento.

187

188 **7.1 - Análises dos Lipídios**

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

199 Para análise dos ácidos graxos foi utilizada a técnica de cromatografia gasosa (CG).

200 Para tanto, estruturas de 5 carapatos, conforme já descrito anteriormente, foram colocadas em

201 criotubos contendo 250 $\mu$ L de tampão PBS 50mM (pH 7.0) e 100 $\mu$ M de desferroxamina e  
202 trituradas, utilizando-se bastão de vidro. Em seguida, o homogenato foi completado para  
203 500 $\mu$ L, com o mesmo tampão e estocado em freezer a -80°C, para posterior análise. No  
204 momento da análise, o homogenato (500 $\mu$ L) foi transferido para um tubo de vidro, onde foi  
205 adicionado 1,45 ml de metanol e 50 $\mu$ L de padrão interno (C13:0, 1,0mg / mL em metanol).  
206 As amostras foram analisadas no equipamento Trace 1310 - Gas Chromatograph.

207

## 208 **8 - Análise estatística**

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

212

## 213 **Resultados e Discussão**

214 O OG do *A. sculptum*, no 1º diovip, apresenta-se muito desenvolvido, consistindo de  
215 corpo (C) e glândulas tubulares, longas e ramificadas, que compõem os pares de glândulas  
216 craniais (GCr) e caudais (GCa) (Fig.1), corroborando com os resultados de Schöl et al.,  
217 (2001a), que se basearam na morfologia e organização estrutural do carapato *Dermacentor*  
218 *reticulatus* em oviposição para essa denominação anatômica.

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

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

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

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

251 gliconjugados estão intimamente ligados a gotas lipídicas (Fig. 2D). Proteínas totais,  
252 identificadas pelo azul de Bromofenol, estão difusamente distribuídas no citoplasma das  
253 células (Fig. 2E). Os cortes histológicos utilizados neste estudo mostram que algumas gotas  
254 lipídicas são fortemente osmiofílicas (Figs. 2D e 2E). Gotas lipídicas são positivas para Sudan  
255 black B e estão localizadas principalmente próximas da região apical (Fig. 2F). A análise  
256 histoquímica acima detectou grandes quantidades de glicogênio, proteínas e lipídios.  
257 Anteriormente, foi demonstrado que as quantidades dessas substâncias foram aumentando  
258 progressivamente nas glândulas do OG de *A. sculptum*, na pré-oviposição (Santos et al.,  
259 2018), corroborando com a hipótese de que o 1º dovip é a fase de grande concentração desses  
260 importantes componentes da cera do ovo. Xavier et al. (2019), demonstraram que as células  
261 do OG de carapato *R. microplus* no período de oviposição possuem maquinaria capacitada  
262 para síntese de proteínas, assim como para modificação e secreção de proteínas envolvidas no  
263 metabolismo lipídico. Ainda, afirmaram que o OG, na pré-oviposição, está focado na síntese  
264 enquanto que na oviposição está voltado para a secreção do produto final encontrado na cera  
265 do ovo. Dessa forma, a identificação proteica no citoplasma celular por técnica histoquímica  
266 aqui realizada corrobora os achados de Xavier et al. (2019).

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

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

283 Inclusões de glicogênio associadas a depósitos lipídicos ou livres no citoplasma, na  
284 forma de pequenos grânulos agregados e eletrondensos, são frequentemente notados no  
285 citosol (Fig. 3A). No OG, o estoque do glicogênio é proveniente da alimentação do carapato  
286 e provavelmente tem uma função importante na formação dos lipídios (Nelson e Cox, 2014).  
287 Assim, como nos demais eucariotos superiores, a glicose encontrada no citoplasma das  
288 células glandulares, devia sofrer várias reações dando origem ao acetil-CoA (Nelson e Cox,  
289 2014) que, através de uma série de reações enzimáticas iniciadas pela sua presença no citosol,  
290 promoveria a síntese “de novo” de ácidos graxos (Verlengia e Lima, 2002).

291 Em algumas áreas das glândulas tubulares ainda se observa a presença de  
292 interdigitações entre células vizinhas, entretanto, a perda de aderência entre essas células é  
293 notada com grande frequência, onde complexos juncionais não estão presentes (Figs. 3B e  
294 3C). O início da perda de aderência e, consequentemente a ausência de complexos juncionais,  
295 já foi observado nessas células, no final da pré-oviposição (Santos et al., 2018). Alguns  
296 estudos mostraram que em carapatos em oviposição as vilosidades das células glandulares se  
297 projetam em direção à lâmina basal e, dessa forma, fazem referência a criptas intercelulares  
298 que teriam a função de aumentar a superfície da membrana plasmática para facilitar a  
299 eliminação da secreção produzida pelas células (Kakuda et al., 1995; Booth, 1989; Schöl et  
300 al., 2001a).

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

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

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

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

326 (CHO), colesterol esterificado (CHOE), triacilglicerol (TG) e ácidos graxos (AG) (Figs. 5A e  
327 5B).

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

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

338 Com relação à glândula cranial, o CHOE é o que se apresenta em maior proporção,  
339 diferindo显著mente dos demais lipídios (CHOE x TG  $p=0,0321$ ; CHOE x AG  $p=$   
340 0.0028; CHOE x CHO  $p= 0.0323$ ). Já na glândula caudal, há diferença entre CHOE e AG ( $p=$   
341 0.0068) e entre CHOE e CHO ( $p=0,0284$ ).

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

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

353 Os invertebrados não são capazes de sintetizar o CHO sendo a dieta a única fonte  
354 desse lipídio (Clark e Block, 1959; Hobson, 1935). Em carapatos, o CHO é muito  
355 importante, participando da síntese de ferormônios e com diversas funções na cutícula de  
356 algumas espécies (Cherry, 1976; Sobbhy et al., 1994). Entre as estruturas que compõem o  
357 OG, as GCr e GCa são as que mais se destacam na quantidade de CHO, com 19,69% e  
358 16,12%, respectivamente, e, assim como nos demais invertebrados, é proveniente da  
359 hemolinfa.

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

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

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

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

386 Na cera observa-se maior quantidade de CHOE, estatisticamente significante, quando  
387 comparado com AG e CHO ( $p= 0,0059$  e  $p= 0,0040$ , respectivamente) (Tabela 2). Através da  
388 TLC, na cera de outras espécies de carrapatos, o CHOE foi o que se apresentou em maior  
389 quantidade (*B. microplus* - Booth, 1992; *A. hebraeum* - Yu et al., 2012) corroborando assim  
390 os resultados apresentados neste estudo. O TG é a segunda classe de lipídios em maior  
391 quantidade, havendo diferença estatística quando comparado com AG e CHO ( $p= 0,0093$  e  $p=$   
392  $0,0066$ , respectivamente). Interessantemente, o TG foi detectado em pequenas quantidades na  
393 cera de *A. hebraeum* (Yu et al., 2012). Em alguns animais, o TG armazenado sob a pele serve  
394 tanto de estoque de energia como para isolamento contra baixas temperaturas (Nelson e Cox,  
395 2014). Talvez o TG encontrado na cera do ovo do *A. sculptum* teria uma função  
396 termorreguladora, o que seria importante para a manutenção dos ovos até que ocorresse a  
397 eclosão.

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

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

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

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

420

## 421 **Referências**

422 Arrieta, M.C., Leskin, B.K., Kaufman, W.R., 2006. Antimicrobial activity in the egg wax of  
423 the African cattle tick *Amblyomma hebraeum* (Acari: Ixodidae). *Exp. Appl. Acarol.*  
424 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 médica 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 Cáceres, A.G., Guzman, C. C., Léon, 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 insects. 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 1° 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 (PavlovskyeIla) 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. Formaldehyde-Glutaraldehyde 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°ed. 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. 6º 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., Höltzel, A., Jung, G., Diehl, P. A., Petrini, O., 1997.  
538           Boophiline, 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 Sobbhy, 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

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

576 Yu, Z., Thomson, E. L. S., Liu, J., Dennis, J. J., Jacobs, R. L., Kaufman, W. R. 2012.  
577 Antimicrobial activity in the egg wax of the tick *Amblyomma hebraeum* (Acari:  
578 Ixodidae) is associated with free fatty acids C16:1 and C18:2. Exp. Appl. Acarol. 584,  
579 53 – 470.

580 Zimmer, K. R., Macedo, A. J., Giordani, R. B., Conceição, J. M., Nicastro, G. G., Boechat, A.  
581 L., Baldini, R. L., Abraham, W. R., Termignoni, C., 2013a. A steroid molecule  
582 presentin the egg wax of the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* inhibits  
583 bacterial biofilms. Environ. Microbiol. 15, 2008 - 2018.

584 Zimmer, K. R., Macedo, A. J., Nicastro, G. G., Baldini, R. L., Termignoni, C., 2013b. Egg  
585 wax from the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* inhibits *Pseudomonas*  
586 *aeruginosa* biofilm. Ticks Tick. Dis. 4, 366 - 376.

587

588 **Legendas das figuras**

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

592 **Figura 2.** Fotomicrografias de parte de glândulas tubulares do Órgão de Gené de *A. sculptum*,  
593 no 1º dia de oviposição. **A, B e C** - As células epiteliais colunares, com núcleos elípticos (N),  
594 se encontram desalinhadas e debris (D) são observados na luz das gl. (L). Gotas lipídicas  
595 típicas (Li) estão presentes por todo citoplasma. Em alguns pontos de algumas glândulas  
596 tubulares, são observados grupos de células com sinais claros de desorganização (\*).  
597 Hematoxilina e Eosina (Figs. A e B). Azul de Metileno (Fig. C). Barras: 30 µm, 30 µm, 100  
598 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  $\mu\text{m}$ . **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  $\mu\text{m}$ . **F** – Gotas lipídicas (escuras) são notadas principalmente  
603 na região apical. L – luz. N – núcleo. Sudan Black B. Barra: 30  $\mu\text{m}$ .

604 **Figura 3.** Eletrônicrografias 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  $\mu\text{m}$ . **B** – Células epiteliais mostrando que as interdigitações, nessa  
608 região, estão frouxas ou ausentes (\*). L- luz. N- núcleo. Barra: 5  $\mu\text{m}$ . **C** - Debris celulares (D)  
609 presentes na luz (L) da glândula. Barra: 5  $\mu\text{m}$ .

610 **Figura 4.** Eletrônicrografias 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  $\mu\text{m}$ , 1  $\mu\text{m}$ , 1  $\mu\text{m}$ ,  
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: 08/2014 - 06/2016	Nº de animais/espécie
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*.

<b>Cera dos ovos</b>	
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 ( $0.0066$ ); 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.

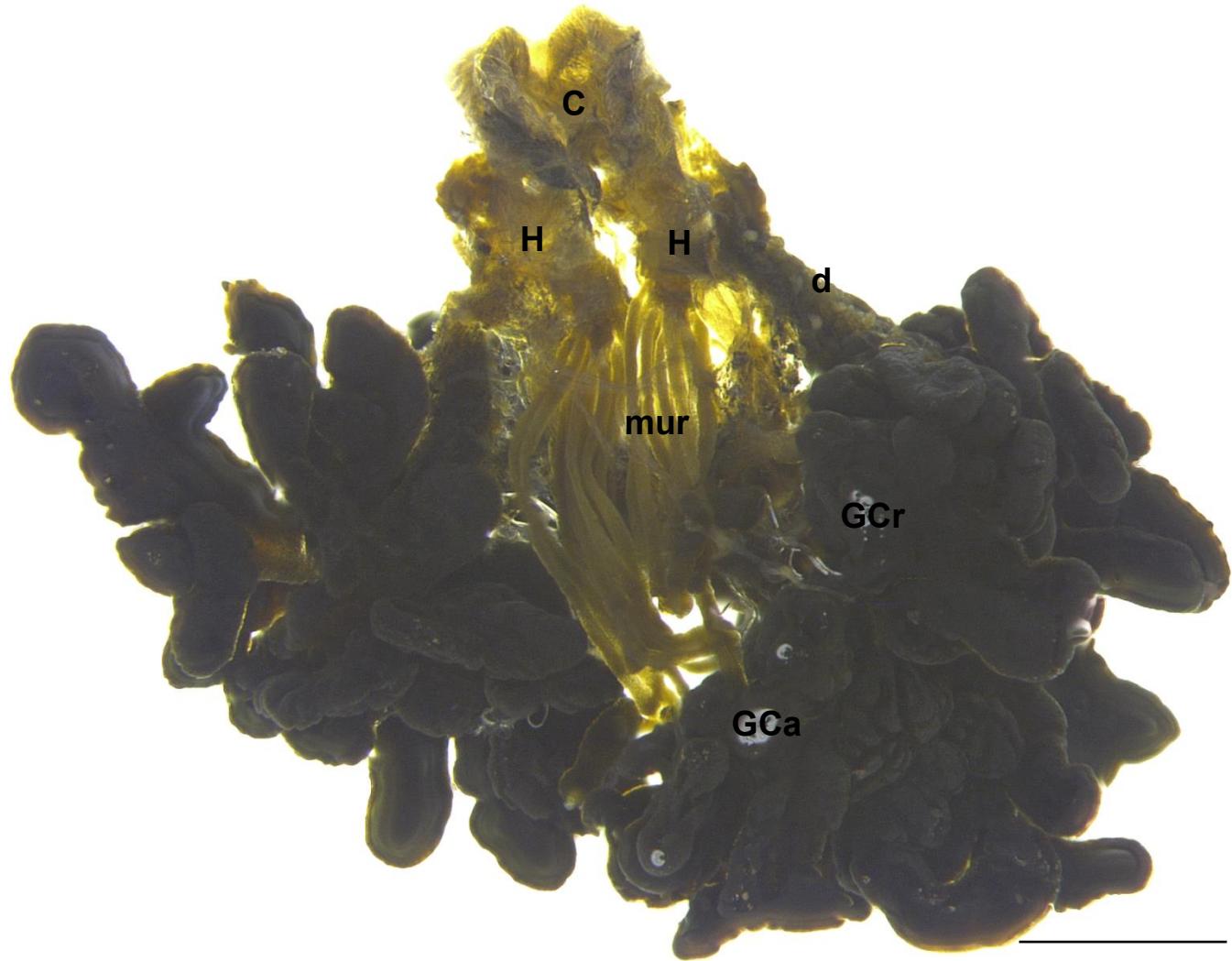
AG identificados	C	GCa	GCr	cera
C14:0				•
C14:1n-5	•	•	•	•
C15:0		•	•	
C16:0	•	•	•	•
C16:1n-7	•			•
C17:0		•	•	•
C17:1n-7		•	•	•
C18:0	•	•	•	•
C18:1n-9	•	•	•	•
C18:2n-6	•	•	•	•
C18:3n-6				•
C18:3n-3				•
C20:0		•	•	•
C20:4n-6				•
C21:0		•	•	
C22:0		•	•	
C22:2n-6		•	•	•
C22:6n-3		•	•	
C23:0		•	•	•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

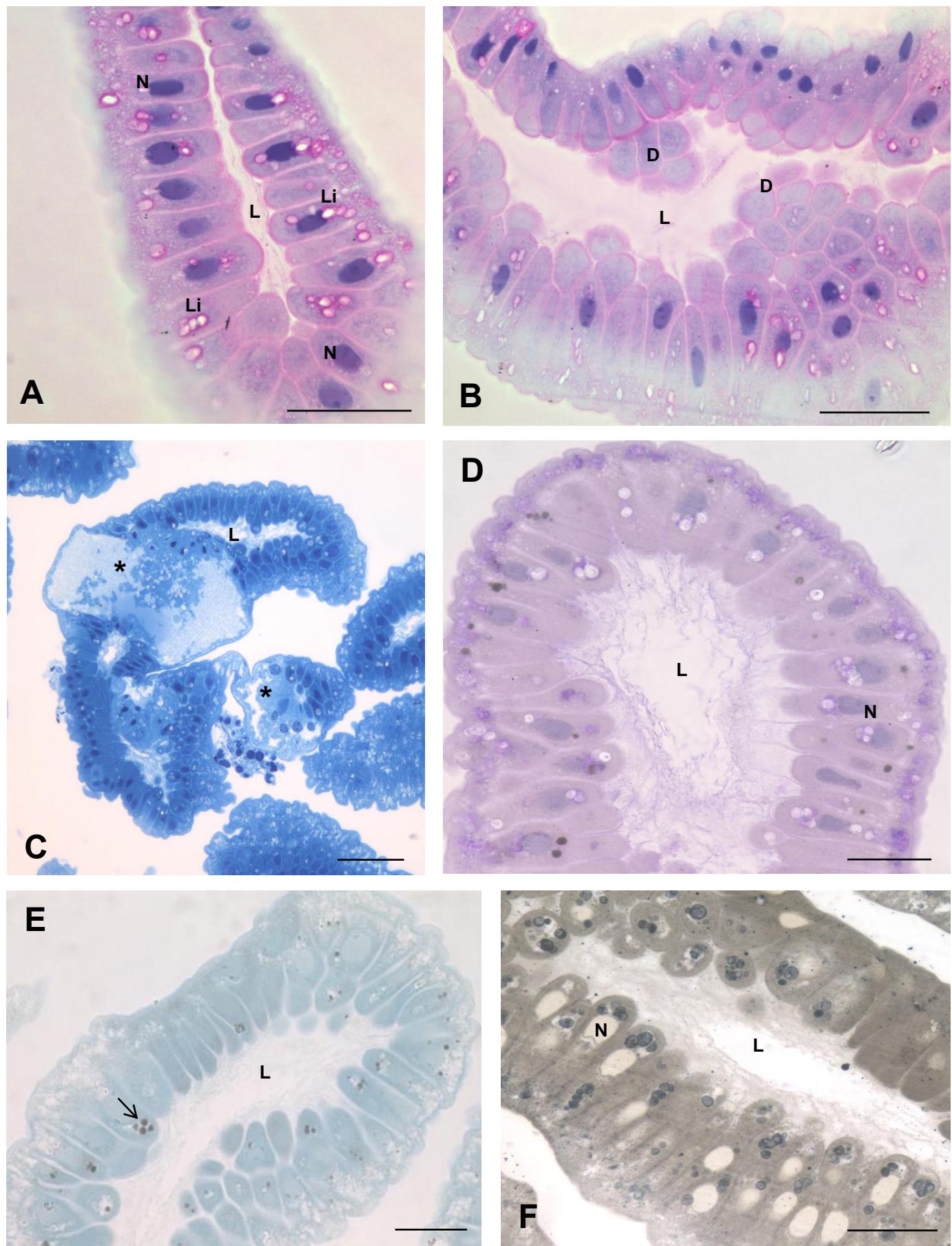
AG ácido graxo

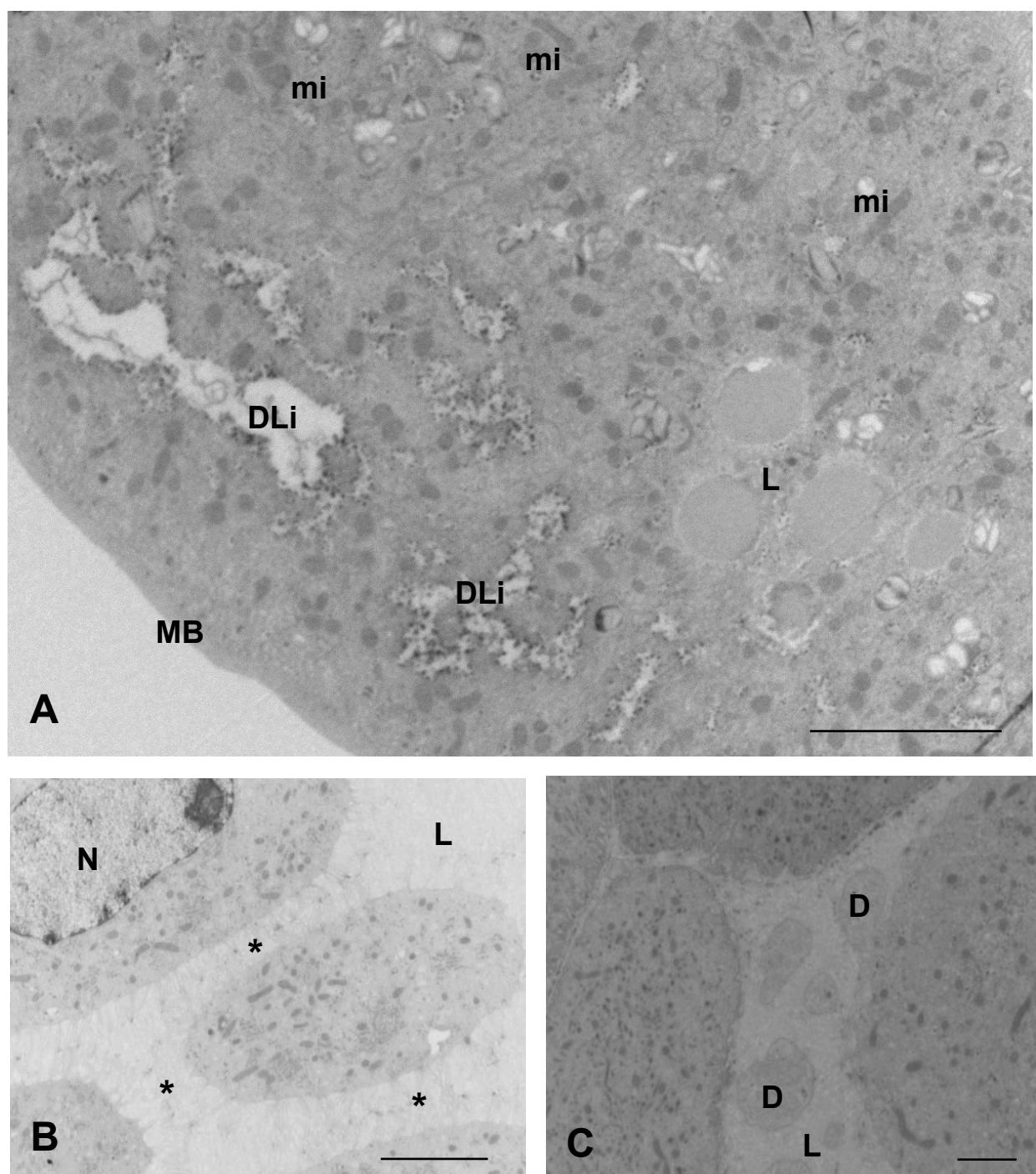
C corpo

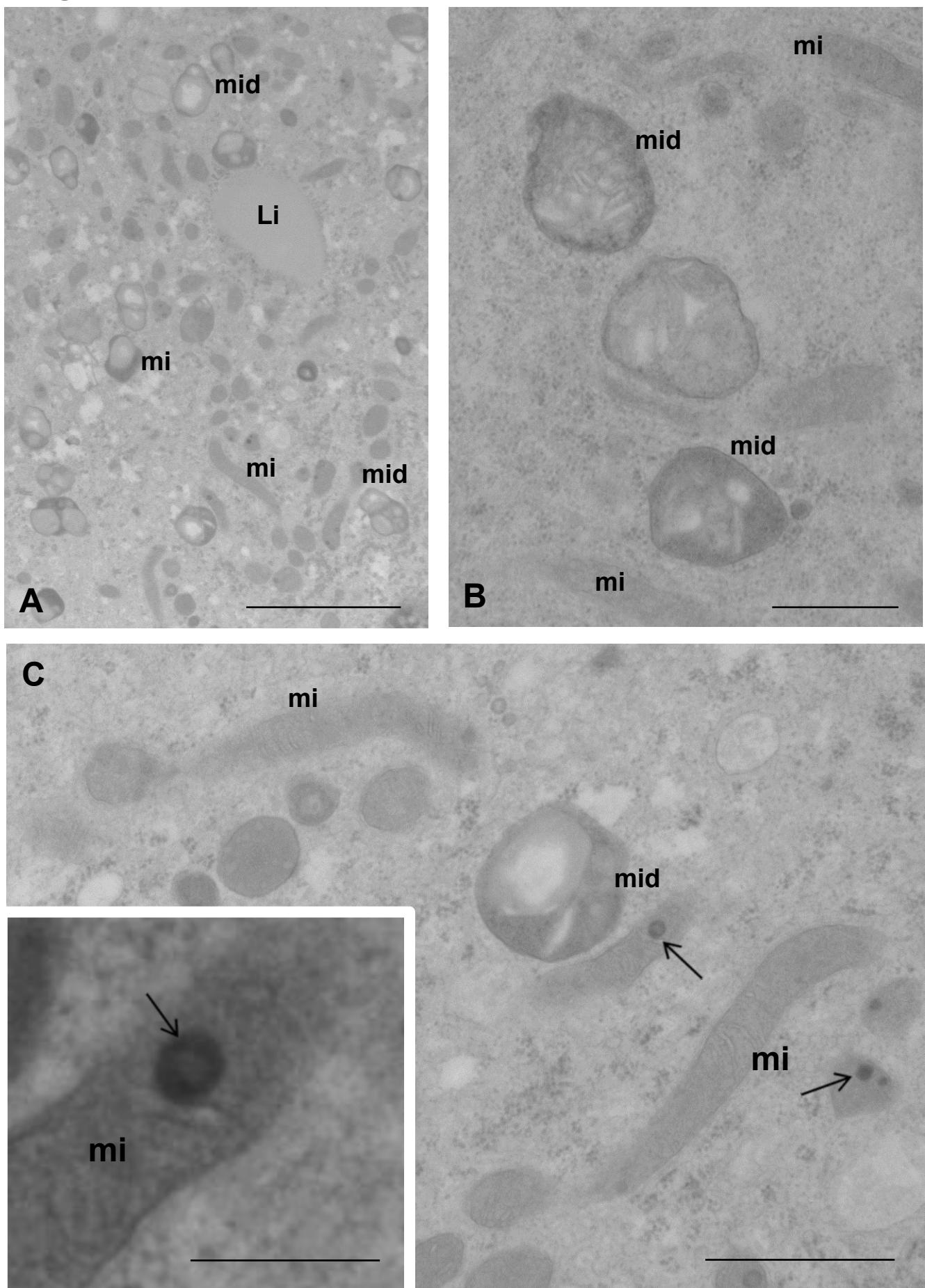
GCa glândula caudal

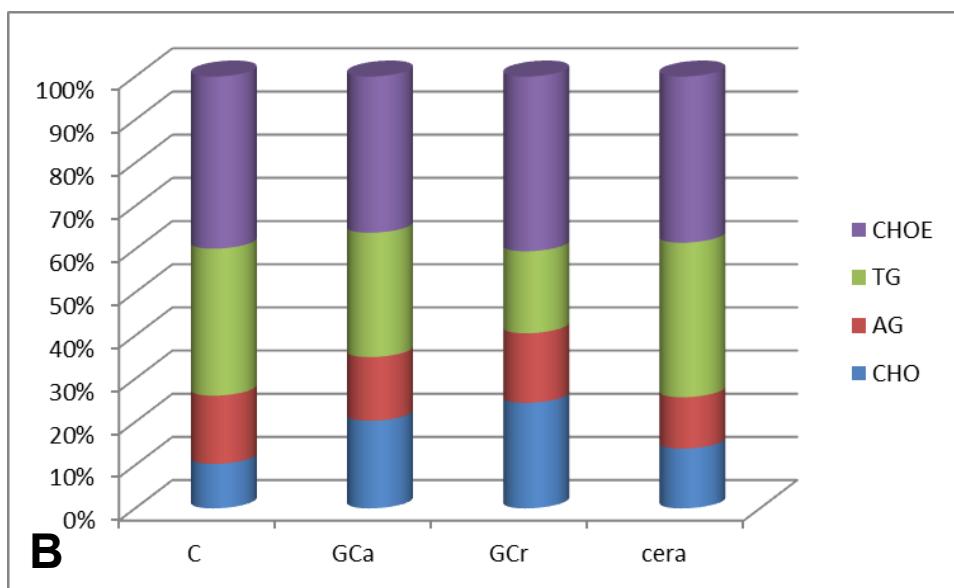
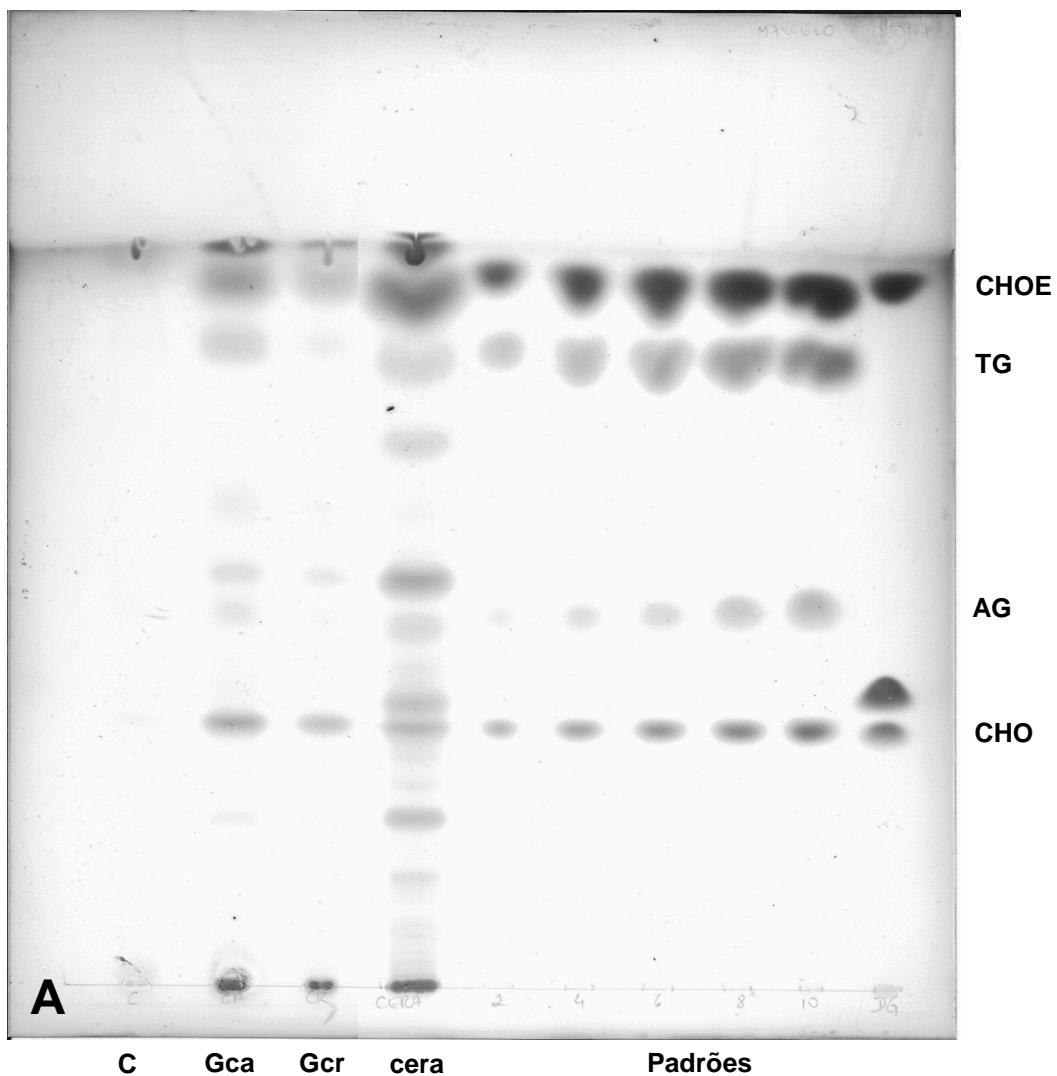
GCr glândula cranial

**Figura 1.**

**Figura 2.**

**Figura 3.**

**Figura 4.**

**Figura 5.**

**Figura 6.**