
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR)

**ESTUDO MORFOFISIOLÓGICO DOS OVÁRIOS E DO
CORPO GORDUROSO DO CARRAPATO-ESTRELA
Amblyomma cajennense FABRICIUS (1787) (ACARI:
IXODIDAE)**

SANDRA ELOISI DENARDI

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular)

Rio Claro
Estado de São Paulo – Brasil
Agosto - 2008

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR)

**ESTUDO MORFOFISIOLÓGICO DOS OVÁRIOS E DO
CORPO GORDUROSO DO CARRAPATO-ESTRELA
Amblyomma cajennense FABRICIUS (1787) (ACARI:
IXODIDAE)**

SANDRA ELOISI DENARDI

Orientadora: Profa. Dra. Maria Izabel Camargo-Mathias

Co-orientador: Prof. Dr. Gervásio Henrique Bechara

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular)

595.42 Denardi, Sandra Eloisi
D391e Estudo morfofisiológico dos ovários e do corpo
 gorduroso do carrapato-estrela *Amblyomma cajennense*
 Fabricius (1787) (Acari: Ixodidae) / Sandra Eloisi Denardi. –
 Rio Claro : [s.n.], 2008
 67 f. : il., figs., tabs.,

 Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
 Instituto de Biociências de Rio Claro
 Orientador: Maria Izabel Camargo Mathias
 Co-orientador: Gervásio Henrique Bechara

 1. Ácaro. 2. Vitelogênese. 3. Ultra-estrutura. 4.
 Morfologia. 5. Histoquímica. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI – Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP

Agradecimentos

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pelo apoio financeiro concedido, o qual possibilitou a realização deste trabalho.

A todos que direta ou indiretamente tornaram possível a realização deste trabalho, meu reconhecimento e minha gratidão.

A todos os docentes, técnicos e funcionários do Departamento de Biologia do Instituto de Biociências – UNESP – Rio Claro, pela disponibilidade dos laboratórios, equipamentos e materiais necessários.

Ao Prof. Dr. Gervásio Henrique Bechara pela disposição ao envio de carrapatos, sugestões e apoio.

Agradeço de modo muito especial, à Profa. Dra. Maria Izabel Camargo Mathias, a quem devo meu progresso científico, além da grande amizade nesses anos de convivência.

Aos meus pais, meus
amigos e a todos que fizeram parte
da minha história de vida.

Dedico

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	4
1. INTRODUÇÃO	7
1.1. <i>Amblyomma cajennense</i>	11
2. OBJETIVOS	15
3. MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1. Material.....	18
3.2. Métodos.....	18
3.2.1. Morfologia.....	19
3.2.2. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	19
3.2.3. Morfometria das Células do Corpo Gorduroso.....	19
3.2.4. Histologia.....	20
3.2.4.1. Inclusão em resina (Histoiresina).....	20
3.2.5. Histoquímica.....	20
3.2.5.1. Técnica do azul de bromofenol.....	20
3.2.5.2. Técnica do PAS/alcian blue.....	21
3.2.5.3. Técnica de von Kossa.....	21
3.2.5.4. Técnica do azul de Nilo.....	22
3.2.6. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	22
3.2.7. Citoquímica ultra-estrutural.....	23
3.2.7.1. Técnica da prata amoniacal.....	23
3.2.7.2. Detecção de carboidratos.....	24
3.2.7.3. Técnica do ósmio imidazol.....	24
3.2.8. Dosagem do teor protéico e eletroforese.....	25
3.2.8.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	26
4. RESULTADOS	27
Capítulo 1	30
Capítulo 2	33
Capítulo 3	37
5. DISCUSSÃO	40
6. CONCLUSÕES	54
7. REFERÊNCIAS	57

Resumo

RESUMO

Os ovários e o corpo gorduroso estão envolvidos na reprodução dos Arthropoda. A vitelogênese, que ocorre nos ovócitos dos Arthropoda em geral, incluindo os carrapatos, envolve a síntese endógena e a incorporação exógena de elementos que nutrirão o embrião. No presente estudo por meio da aplicação de técnicas de morfologia, morfometria, histoquímica, ultra-estrutura, citoquímica ultra-estrutural e eletroforese analisou-se o ovário e o corpo gorduroso de fêmeas semi-ingurgitadas de carrapatos *Amblyomma cajennense*. O ovário é do tipo panoístico (sem a presença de células nutridoras) com desenvolvimento assincrônico dos ovócitos, os quais foram classificados em 5 estágios. Os ovócitos estão presos à parede do ovário por meio do pedicelo celular que participa também do fornecimento de substâncias do vitelo para o interior do ovócito. O vitelo dos ovócitos de *A. cajennense* é de natureza glicolipoprotéica, onde o lipídio é depositado primeiramente, seguido das proteínas e finalmente dos carboidratos. Os lipídios nestes ovócitos teriam origem nas mitocôndrias (produção endógena) e nas células do pedicelo. As proteínas do vitelo estão presentes já nos ovócitos em estágios iniciais de desenvolvimento, onde se observa grande quantidade de retículo endoplasmático granular, confirmando um processo de auto síntese protéica. Outro sítio de produção de proteínas do vitelo em *A. cajennense* está nas células do pedicelo, permitindo inferir que o corpo gorduroso nesta espécie participa pouco ou

mesmo não participa do fornecimento de proteínas para os ovócitos. O carboidrato do vitelo é pouco encontrado nos ovócitos em estágios de menor desenvolvimento, sendo incorporado por aqueles em estágios finais de maturação, com origem ainda discutida. Neste estudo a terminologia do corpo gorduroso de carrapatos: central (localizado ao redor dos órgãos) e periférico (próximo à parede do corpo do animal) foi substituída por perivisceral e parietal, designando assim a real localização deste tecido nestes indivíduos. No corpo gorduroso de *A. cajennense* não foram observados nefrócitos e nenhum outro tipo celular associado e sim apenas dois tipos de trofócitos, os cúbicos (trC) e os arredondados (trR).

Abstract

ABSTRACT

The ovaries and the fat body are involved in the reproduction of Arthropoda. The vitellogenesis, which occurs in oocytes of Arthropoda in general, including ticks, involves the endogenous synthesis and exogenous uptake of compounds that will nourish the embryo. In the present study, the ovaries and fat bodies of partially engorged female ticks *Amblyomma cajennense* were examined using methods of morphology, morphometry, histochemistry, ultrastructure, ultrastructural cytochemistry, and electrophoresis. The ovary is panoistic (devoid of nurse cells) and oocytes develop asynchronously, which were classified in 5 stages. Oocytes are attached to the ovary wall by pedicel cells that also provide yolk constituents to the oocyte. The yolk of oocytes of *A. cajennense* consists of glycolipoproteins, in which lipids are deposited first, followed by proteins, and finally carbohydrates. Lipids in these oocytes probably originate in mitochondria (endogenous production) and pedicel cells. Yolk proteins are already present in oocytes in early developmental stages, in which large quantities of granular endoplasmic reticulum are observed, confirming a process of protein autosynthesis. Another site of yolk protein production in *A. cajennense* is the pedicel cells, indicating that the fat body in this species contributes little or even does not contribute with proteins for oocytes. Small quantities of yolk carbohydrates are found in less developed oocytes, in which uptake occurs in late maturation stages, and its origin is still debatable. In this study, the terminology of the fat body of ticks: central (located around organs) and peripheral (near the animal's body wall) was exchanged by perivisceral and parietal, thus

reflecting the actual location of this tissue in these animals. In the fat body of *A. cajennense*, nephrocytes or other associated cell types were not observed, rather only two types of trophocytes, cubic (trC) and round-shaped trophocytes (trR).

Introdução

1. INTRODUÇÃO

Os carrapatos são ectoparasitas de vertebrados e não apresentam divisões corporais, possuindo, portanto cabeça, tórax e abdômen fundidos (STORER; USINGER, 2000). Muitas espécies podem viver por longos períodos sem se alimentar e outras ainda podem ser resistentes à dessecação devido a presença de tegumento recoberto por cera (WALKER, 1994; RUPPERT e BARNES, 1996).

Durante seu ciclo biológico, os carrapatos podem passar longos períodos fora de seus hospedeiros, portanto, sem se alimentar, abrigados entre a vegetação e fendas no solo (WALKER, 1994). O fator principal que explica a habilidade dos carrapatos em sobreviver por longos períodos em jejum é a capacidade de absorver água do ar insaturado do meio ambiente e mantê-la em seu corpo (RUDOLPH e KNULLE, 1974; McMULLEN et al., 1976; NEEDHAM et al., 1990; NEEDHAM e TEEL, 1991; SIGAL et al., 1999).

Os carrapatos são artrópodos de pequeno ou médio porte (cerca de 3 cm de comprimento) cujo corpo é ovalado e achatado, geralmente apresentando rígido tegumento e podendo ter suas dimensões aumentadas durante o repasto sanguíneo no hospedeiro. Na região anterior do corpo, não se distingue a cabeça e sim, um conjunto de peças bucais quitinizadas, o qual é denominado de gnatossoma (REY, 1973).

Desta forma, apesar de não serem artrópodos com estruturas adaptadas para o vôo, os carrapatos concorrem com os insetos em diversidade de espécies e adaptações ambientais (SONENSHINE, 1991).

Os carrapatos estão distribuídos em três famílias: Ixodidae, Argasidae e Nuttalliellidae. Nos Ixodidae o corpo das espécies é recoberto por uma grande placa dorsal e quitinosa, também denominada de escudo, que pode ter a superfície ornamentada por manchas, depressões e esculturações (REY, 1973). Nos Argasidae essa placa rígida está ausente e as partes bucais encontram-se localizadas ventralmente (WALKER, 1994; WALL e SHEARER, 1997). Já a família Nuttalliellidae, menor do que as outras duas, abriga apenas uma espécie, com indivíduos que se alimentam rapidamente de seus hospedeiros, aumentando de tamanho em poucos minutos ou horas (SAUER et al., 2000).

Nos Ixodidae, a alimentação dura um tempo maior, variando de poucos dias a diversas semanas, período este em que eles concentram o sangue que consomem de seu hospedeiro e dele eliminam o excesso de água por transpiração corporal e/ou pelos restos fecais, podendo ainda eliminá-lo por meio de suas glândulas salivares. A voracidade dos carrapatos no consumo de sangue pode resultar em sérios danos para o seu hospedeiro, principalmente quando muitos indivíduos infestam um só animal (SONENSHINE, 1991).

Os carrapatos como são parasitas de vertebrados podem ter vários hospedeiros nos quais irão se alimentar. A localização de um hospedeiro por estes indivíduos é facilitada pela elevada eficiência de seu sistema sensorial que detecta odor, vibração, mudanças de temperatura, entre outros parâmetros (SONENSHINE, 1991).

Do ponto de vista médico e veterinário, os carrapatos além de provocarem lesões no hospedeiro, durante o processo de repasto sanguíneo também transmitem a eles agentes patogênicos. São, portanto, hematófagos e vetores de arboviroses, rickettsioses, espiroquetoses e de protozoários tanto para os animais domésticos e silvestres quanto para o homem (KAUFMAN, 1989). Essa relação de parasitismo, compromete o hospedeiro pela espoliação direta causada pelo hematofagismo, que além de tudo, promove a entrada destes microrganismos que poderão causar também infecções secundárias, como miíases cutâneas ou paralisia, consequência da ação

tóxica da saliva do parasita e desta forma, influenciando negativamente na produtividade, afetando a comercialização de produtos tais como a carne, o couro e o leite (WALL e SHEARER, 1997).

Depois de terem encontrado o hospedeiro e antes de iniciarem a alimentação, os carrapatos primeiramente caminham sobre a pele deste, tocando-a com a extremidade dos palpos maxilares, onde localizam-se estruturas sensoriais. Assim que é encontrado o ponto adequado, prendem-se firmemente e forçam o hipostômio contra a pele do mesmo. Esta estrutura possui fileiras de dentes quitinosos dirigidos para trás, que vai atuar como órgão de fixação ao animal durante todo o repasto sanguíneo. As mandíbulas também penetram na pele e com movimentos cortantes dilaceram-na (REY, 1991).

A digestão dos tecidos ao redor do canal de penetração, resultado da inserção do hipostômio causa ruptura dos capilares e vasos linfáticos do hospedeiro. Os carrapatos produzem saliva (glândulas salivares) e ao mesmo tempo sugam o sangue. A primeira é eliminada em grande volume no final do processo de ingurgitamento, causando o aumento da permeabilidade dos capilares do hospedeiro e, conseqüentemente, aumentando o fluxo de sangue para o carrapato (RIBEIRO, 1987; BALASHOV, 1972).

Segundo Harwood e James (1979), este extraordinário sucesso dos carrapatos dever-se-ia a certas características biológicas, dentre as quais destacar-se-iam: o hematofagismo em todas as fases do desenvolvimento; a fixação profunda do hipostômio nos hospedeiros, o que dificultaria sua remoção e facilitaria a sua dispersão, principalmente por aves e mamíferos; o ingurgitamento lento, com tempo para inoculação de patógenos; a adaptação a diferentes espécies de hospedeiros; a resistência à adversidade climática devido a grande esclerotinização do seu corpo e a longevidade nos mais diversos ambientes, propiciando tempo para multiplicação dos patógenos; a existência de poucos inimigos naturais.

Diversos métodos para um efetivo controle dos carrapatos têm sido estudados, porém, o mais eficaz ainda é o uso de acaricidas, método que ainda pode apresentar inconvenientes, primeiro, por ser dispendioso, devido ao custo elevado dos produtos químicos, instalações e mão-de-obra para a aplicação dos mesmos e depois, pelo acúmulo de resíduos na carne e no leite, contaminação ambiental, além

do desenvolvimento de resistência pelos carrapatos aos produtos utilizados (FREITAS et al., 2005).

Por outro lado e devido a estes problemas citados, os métodos não-químicos também têm sido investigados como formas de controle, incluindo o biológico onde se faz o rodízio de pastagens, no caso dos hospedeiros serem bovinos, dificultando assim a sobrevivência das fases de vida livre do parasita (FARIAS et al., 1986); seleção de raças de animais menos sensíveis ao carrapato, ou seja, cruzamento de raças susceptíveis (taurinos) com raças resistentes (zebuínos); utilização de predadores naturais como a garça vaqueira ou boiadeira, (GONZALES, 1975; ALVES-BRANCO et al., 1983), ou ainda utilização de outras espécies de parasitas, como bactérias *Escherichia coli*, *Cedecea lapagei* e *Enterobacter agglomerans* (BRUM, 1988) e fungos *Metarhizium anisopliae* as quais teriam o próprio carrapato como hospedeiro (ZHIOUA et al., 1997).

Além disso, o emprego de vacinas para controle de carrapatos tem chamado a atenção para a utilização de novas metodologias, incluindo as de biologia molecular e de imunologia que têm auxiliado na identificação de novos antígenos que poderiam gerar uma resposta imune no hospedeiro que o protegeria contra os parasitas (KELLY e COLLEY, 1988).

Os estudos mais recentes têm aberto perspectivas para o controle imunológico, por meio da identificação, isolamento e síntese de proteínas imunogênicas, a partir de tecidos e órgãos de carrapatos (ovários e intestino) e seu emprego em vacinas (TELLAM et al., 1992; WILLADSEN, 1997). Para tanto, torna-se fundamental conhecer os aspectos morfofisiológicos destes ectoparasitas, bem como aqueles que cercam a interação carrapato/hospedeiro.

1.1. Amblyomma cajennense

Dentro da família Ixodidae encontra-se o gênero *Amblyomma*, com indivíduos distribuídos por todo mundo, principalmente em regiões tropicais e subtropicais. No Brasil são encontradas cerca de 30 espécies, entre elas, *A. cajennense* (REY, 2001).

Segundo Flechtmann (1990), sobretudo nas zonas mais quentes, *A. cajennense* pode ser também encontrado em todos os seus estágios, parasitando aves domésticas (galinhas, perus) e silvestres (seriemas e outras), numerosos mamíferos (cavalo, boi, carneiro, cabra, cão, porco, porco-do-mato, veado, capivara, coelho, cotia, coati, tatu e tamanduá) e ainda segundo Bechara et al. (2000) e Campos Pereira et al. (2000), não sendo raro ser encontrado em animais de sangue frio (ofídios).

De acordo com trabalho realizado em animais silvestres, *A. cajennense* foi a espécie de carrapato mais encontrada parasitando o veado campeiro (*Blastocerus dichotomus*), cervo-do-Pantanal (*Mazama gouazoubira*), coati (*Nasua nasua*), tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*), capivara (*Hydrochaeris hydrochaeris*) e tatu-galinha (*Dasypus novemcinctus*). Bechara et al. (2002) estudando tamanduás-bandeira e tatus-galinha da região do Parque Nacional de Emas-GO, Brasil, encontraram *A. cajennense* e *A. nodosum* parasitando-os.

Adultos de *A. cajennense* são popularmente conhecidos por carrapato-estrela, carrapato de cavalo ou rodoleiro; suas ninfas por vermelhinhas e suas larvas por carrapatinhos ou micuins. São hematófagos obrigatórios necessitando de repastos em três hospedeiros sendo, portanto, trioxenos (FLECHTMANN, 1990).

As fêmeas dessa espécie, depois de fecundadas e ingurgitadas, portanto maduras, desprendem-se do hospedeiro e caem ao solo para ovipositar (em torno de 6 a 8 mil ovos) e depois morrem. Após o período de incubação dos ovos (30 dias à temperatura de 25°C), ocorre a eclosão das larvas, que sobem pelas gramíneas e arbustos e aí esperam a passagem dos hospedeiros. Depois de nele se fixarem e após sugarem o seu sangue por um período aproximado de 3 a 6 dias, desprendem-se e sofrem ecdise no solo (18 a 26 dias), transformando-se em ninfa, as quais fixar-se-ão em um novo hospedeiro e em 6 dias estarão ingurgitadas de sangue, onde no solo sofrerão nova ecdise (23 a 25 dias) e transformar-se-ão no indivíduo adulto (FLECHTMANN, 1990).

Muitas investigações vêm sendo realizadas com carrapatos, principalmente enfocando aspectos bioeconômicos, ecológicos, além de anatômicos, este último com vistas à taxonomia (HOOGSTRAAL, 1956; TILL, 1961). No que diz respeito à morfologia interna, os estudos são escassos limitando-se a espécies de ocorrência na África, Europa e Austrália (ROBINSON e DAVIDSON, 1913; DOUGLAS, 1943;

BALASHOV, 1972; SONENSHIE, 1991; NUNES et al., 2006a; OLIVEIRA et al., 2007a; RICARDO et al., 2007). Espécies de ocorrência no Brasil, como o carrapato-estrela *A. cajennense*, têm ainda sido pouco estudadas neste aspecto (DENARDI et al., 2004; 2006; SAITO et al., 2005; NUNES et al., 2005; 2006a; 2006b; OLIVEIRA et al., 2005a; 2005b; 2006; 2007a; 2007b; RICARDO et al., 2007).

Dentre os trabalhos disponíveis na literatura, destacam-se aqueles que demonstram que o sistema reprodutivo dos carrapatos, muito embora desempenhe função importante para estes animais, é ainda pouco conhecido sob o ponto de vista morfológico e histológico, quando se compara o número de espécies de carrapatos existente. Este sistema já foi descrito como sendo constituído por um ovário tubular do tipo panoístico, onde um grande número de ovócitos se desenvolveria e na maioria das espécies, assincronicamente (DENARDI et al., 2004; 2006; SAITO et al., 2005; NUNES et al., 2005; 2006a; 2006b; OLIVEIRA et al., 2005a; 2005b; 2006; 2007a; 2007b; RICARDO et al., 2007).

Histologicamente, o ovário de carrapatos possui a parede constituída de pequenas células cúbicas com núcleos arredondados ou achatados que delimitam um lúmen estreito. Externamente a esta parede encontram-se presos, por meio de um pedicelo também celular, ovócitos em diferentes estágios de desenvolvimento (RICARDO et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2005; SAITO et al., 2005; DENARDI et al., 2004; TILL, 1961).

Estudos com fêmeas de *A. triste* realizados por Ricardo et al. (2007), mostraram que as células do pedicelo além de prenderem os ovócitos à parede do ovário, também participariam do fornecimento de elementos que formariam o vitelo, provocando desta forma, o crescimento do ovócito. Nos ovários do tipo panoístico não existe a presença de células nutridoras, portanto, as células do pedicelo as substituiriam nesta função específica.

A vitelogênese, processo que ocorre nos ovócitos dos carrapatos, bem como nos dos Arthropoda em geral, envolve a síntese (endógena) e incorporação (exógena) de lipídios, carboidratos e proteínas, elementos que nutrirão o futuro embrião. O processo de síntese destes elementos, ao contrário do processo de incorporação exógena, ocorre no interior do próprio ovócito através de organelas especializadas como retículo endoplasmático, complexo de Golgi e mitocôndrias. A incorporação

destes elementos oriundos de fonte exógena envolve a produção dos mesmos por células outras que não aquelas que compõem o ovário, como por exemplo, as células do corpo gorduroso e do intestino, as quais secretam diretamente na hemolinfa que as transporta até o ovócito (ROSELL e COONS, 1992).

Dentre as proteínas que fazem parte do vitelo está a vitelogenina, composto glicolipofosfoprotéico que, ao passar por modificações como glicosilação (adição de sacarídeos), sulfatação (adição de grupos sulfato) e fosforilação (adição de grupos fosfato) passa a ser denominada de vitelina (ENGELMANN, 1990; WYATT, 1991). Segundo dados da literatura, nos carrapatos a vitelogenina também é sintetizada extra-ovarianamente: ou pelas células do corpo gorduroso ou ainda pelas células vitelogênicas descritas no intestino de alguns Ixodidae (COONS et al., 1982; ENGELMANN, 1990; WYATT, 1991).

No processo de reprodução dos Arthropoda em geral, a participação do corpo gorduroso tem sido relatada como de extrema importância. Ele é considerado também, um tecido de preenchimento, estando distribuído por todo o corpo do animal, apresentando-se, geralmente, sob duas formas: a camada parietal, adjacente ao integumento e a perivisceral, localizada ao redor dos órgãos. O corpo gorduroso nos Arthropoda em geral além de ser responsável pela síntese de vitelogenina, também armazena e metaboliza produtos tóxicos (CHAPMAN, 1998).

Segundo Coons et al. (1990), o corpo gorduroso nos carrapatos ao contrário daquele dos insetos, seria formado apenas por um tipo celular, os trofócitos. Eventualmente seria descrita a presença de uma outra célula, o nefrócito, encontrada junto aos cordões de trofócitos. Enócitos, células comuns no corpo gorduroso de insetos, não foram registrados em carrapatos.

Diante do exposto, fica claro que, embora o processo de reprodução seja um tema muito investigado nos invertebrados em geral, uma vez que visa a produção de novos indivíduos da espécie, faltam dados para as espécies de carrapatos, os quais trariam importantes informações para a compreensão da biologia destes animais. Assim, estudos morfofisiológicos, com Ixodidae, principalmente do sistema reprodutivo, se fazem necessários e poderiam inclusive auxiliar no desenvolvimento de medidas de controle destes parasitas, bem como das patologias por eles causadas.

Objetivos

2. OBJETIVOS

Devido a escassez de dados correlacionando a morfofisiologia do sistema reprodutivo e do corpo gorduroso de carrapatos em geral, o presente trabalho teve como objetivo estudar, por meio de técnicas de histologia, morfometria, histoquímica, microscopia eletrônica de varredura (MEV), microscopia eletrônica de transmissão (MET), citoquímica ultra-estrutural e eletroforese, os ovários e o corpo gorduroso de fêmeas de carrapatos *Amblyomma cajennense*:

- descrevendo a morfologia dos ovários, bem como estabelecendo a dinâmica da vitelogênese nestas fêmeas;
- a morfohistologia do corpo gorduroso destes indivíduos, estabelecendo os tipos celulares presentes no tecido, readequando e propondo nova terminologia para localizar este órgão no interior dos carrapatos e;
- investigar se o corpo gorduroso nos carrapatos, assim como ocorre nos insetos, atuaria no fornecimento de proteínas para compor o vitelo dos ovócitos.

Material e métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

Para a realização do presente estudo foram utilizadas 80 fêmeas semi-ingurgitadas da espécie *Amblyomma cajennense*, oriundas da Usina Porto Primavera no município de Rosana/SP, que depois foram mantidas em colônias no Departamento de Patologia Veterinária, da FCAV – UNESP, campus de Jaboticabal em condições controladas em estufa B.O.D. (temperatura de 28°C, umidade de 80% e fotoperíodo de 12 horas) e, gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Gervásio Henrique Bechara.

3.2. Métodos

Para a aplicação das técnicas de histologia, morfometria, histoquímica, eletroforese, microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de transmissão (MET) foram utilizados equipamentos disponíveis nas dependências dos Laboratórios de Histologia, de Biologia Molecular e de Microscopia Eletrônica do Departamento de Biologia, IB - UNESP - Rio Claro, SP.

3.2.1. Morfologia

Para a observação da morfologia os indivíduos foram anestesiados e dissecados em placas de Petri contendo solução fisiológica para insetos (7.5g de NaCl + 2.38g de Na₂HPO₄ + 2.72g de KH₂PO₄ + 1000 mL de água destilada). Após a remoção do ovário e do corpo gorduroso e após a realização da histologia, foram confeccionados esquemas dos mesmos, com auxílio de câmara clara acoplada a microscópio ZEISS.

3.2.2. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Oito fêmeas foram dissecadas e os ovários e o corpo gorduroso foram retirados e fixados em mistura de Karnovsky, desidratados em série alcóolica de 70 a 100%, além de dois banhos de acetona PA durante 15 minutos cada. Após a dessecação em ponto crítico, o material foi colado com fita adesiva dupla face em suportes de alumínio.

Procedeu-se a metalização com ouro em “Sputtering” e na seqüência o material foi examinado e fotografado em microscópio eletrônico de varredura PHILLIPS SEM 505.

3.2.3. Morfometria das Células do Corpo Gorduroso

Para a análise morfométrica foram utilizadas 20 lâminas contendo secções histológicas medianas do corpo gorduroso, coradas com hematoxilina e eosina (HE) e obtidas a partir de 20 fêmeas semi-ingurgitadas. Foram tomadas medidas das áreas celulares e nucleares dos trofócitos em microscópio LMDB Leica.

Foram medidas 10 células em cada lâmina, totalizando 200 trofócitos, sendo eles 100 cúbicos (trC) e 100 arredondados (trR).

Os dados obtidos foram plotados no programa Statistica, sendo que para a avaliação da ocorrência, ou não, de diferenças significativas entre os valores obtidos para as áreas celulares e nucleares foi utilizado o teste Anova Tukey com grau de significância ($p < 0,05$) (SIEGEL e CASTELLAN, 1988).

3.2.4. Histologia (JUNQUEIRA e JUNQUEIRA, 1983)

3.2.4.1. Inclusão em resina (Historesina)

Os ovários e o corpo gorduroso foram retirados em solução fisiológica para insetos e fixados em solução contendo paraformaldeído 4% em tampão fosfato de Na (0.1 M pH 7.4) durante duas horas. A seguir, o material foi desidratado em soluções crescentes de etanol a 70, 80, 90 e 95% durante 10 minutos cada banho. Logo após, o material foi transferido para resina durante 24 horas, em geladeira. Finalmente, foi transferido para moldes plásticos, previamente preenchidos com resina mais catalisador. Depois de polimerizados, os blocos foram seccionados com auxílio de micrótomo Leica RM 2145, hidratados e as secções recolhidas em lâminas de vidro.

Depois de secas, as lâminas foram coradas com HE, cobertas com bálsamo do Canadá e lamínula conforme rotina histológica, para posterior observação e documentação fotográfica em fotomicroscópio ZEISS.

3.2.5. Histoquímica

Para a aplicação das técnicas histoquímicas, 20 fêmeas foram dissecadas em placas de Petri contendo solução fisiológica (7.5g de NaCl + 2.38g de Na₂HPO₄ + 2.72g de KH₂PO₄ + 1000 mL de água destilada) com auxílio de estereomicroscópio ZEISS. Os ovários e o corpo gorduroso foram colocados nos respectivos fixadores indicados para a aplicação de cada técnica específica.

3.2.5.1. Técnica do azul de bromofenol para detecção de proteínas totais, segundo Pearse (1985)

Os ovários e o corpo gorduroso de 20 fêmeas foram fixados em paraformaldeído 4% e NaCl 0.9% em tampão fosfato 10% (0.1M – pH 7.4) por 24 horas. Depois de seccionado com 4µm de espessura, o material foi recolhido em lâminas de vidro e corado com solução de azul de bromofenol durante 2 horas à

temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram banhadas em solução aquosa de ácido acético 0.5%, durante 5 minutos. Logo após foram passadas no álcool butílico terciário por 5 minutos. Em seguida secas, diafanizadas em xilol e montadas em Bálsamo do Canadá para posterior observação e documentação fotográfica em fotomicroscópio ZEISS.

3.2.5.2. Técnica do PAS/ alcian blue para detecção de polissacarídeos com grupamentos 1-2 glicol e polissacarídeos ácidos, segundo Junqueira e Junqueira (1983)

Os ovários e o corpo gorduroso de 20 fêmeas foram fixados em mistura aquosa de Bouin por 6 horas. As secções obtidas com 4 μ m de espessura foram coradas com alcian blue, pH 2.5 durante 30 minutos, e em seguida, lavadas em água destilada e passadas em ácido periódico 1% durante 5 minutos. Posteriormente, as secções foram submetidas ao reativo de Schiff por 30 minutos e lavadas em água corrente durante 10 minutos.

A seguir, foram contracoradas com hematoxilina durante 2 minutos para evidenciação do núcleo e em seguida lavadas em água corrente. Posteriormente, foram secas, diafanizadas em xilol e montadas em Bálsamo do Canadá para posterior observação e documentação fotográfica em fotomicroscópio ZEISS.

3.2.5.3. Técnica de von Kossa para detecção de cálcio, segundo Junqueira e Junqueira (1983)

Os ovários de 20 fêmeas foram fixados em paraformaldeído 4% por aproximadamente 24 horas. As lâminas contendo as secções obtidas com 4 μ m de espessura foram imersas em nitrato de prata por 20 minutos e em seguida lavadas em água. Logo após, as lâminas contendo as secções foram transferidas para cubeta contendo revelador D-72. Posteriormente, foram imersas em tiosulfato de sódio a

2.5% por 5 minutos. Em seguida, foram diafanizadas em xilol e montadas em Bálsamo do Canadá para posterior observação e documentação fotográfica em fotomicroscópio ZEISS.

3.2.5.4. Técnica do azul de Nilo para detecção de lipídios ácidos, segundo Lison (1960)

Os ovários de 20 fêmeas foram fixados em formol cálcio por 24 horas. As lâminas contendo as secções obtidas com 4 μ m de espessura foram coradas com azul de Nilo durante 5 minutos. Em seguida, foram lavadas em água corrente. Posteriormente foram passadas em solução de ácido acético 1% por 1 minuto. Realizou-se a contracoloração com hematoxilina por 2 minutos com a finalidade de evidenciar os núcleos. Depois de secas, as lâminas foram montadas com glicerina gélida e recobertas com lamínula para posterior observação e documentação fotográfica em fotomicroscópio ZEISS.

3.2.6. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Os ovários e o corpo gorduroso de 10 fêmeas foram retirados em glutaraldeído 0.5% e fixados em glutaraldeído a 3%, em tampão cacodilato de sódio 0.1M por 2 horas. Após a fixação o material foi lavado duas vezes em tampão cacodilato 0.1M por 15 minutos. Em seguida foi pós-fixado em tetróxido de ósmio a 1% em tampão cacodilato (0.1M, pH 7.2) por duas horas. O material então foi lavado por duas vezes em tampão cacodilato 0.1M por 15 minutos e passado em solução de álcool 10 % por 15 minutos.

A contrastação foi realizada com acetato de uranila a 2% em etanol a 10% durante 12 horas. O material foi desidratado em série crescente de acetona (50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%), 5 minutos em cada uma e finalmente em acetona 100%, duas vezes por 5 minutos cada.

Depois de desidratado, o material foi incluído em resina Epon Araldite e colocado em estufa a 60°C por 24 horas. Depois de polimerizados, os blocos foram seccionados em ultramicrótomo Sorvall-Porter Blum MT2-B. Os cortes semifinos foram corados com Azur II (1%) e Azul de Metileno (1%). As secções ultrafinas foram obtidas e coletadas em grades de cobre, contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo, durante 45 e 10 minutos, respectivamente. O material foi analisado e fotografado ao microscópio eletrônico de transmissão PHILLIPS CM 100.

3.2.7. Citoquímica ultra-estrutural

3.2.7.1. Técnica da prata amoniacal para detecção de proteínas básicas, segundo MacRae e Meetz (1970)

Dez fêmeas foram dissecadas e o corpo gorduroso das mesmas foi retirado e fixado em glutaraldeído 3% em tampão cacodilato de sódio 0.1M (pH 7.2) durante 2 horas e lavado durante 10 minutos em tampão cacodilato de sódio 0.1M (pH 7.2). A seguir, o material foi lavado em água destilada por 20 minutos e incubado em solução de prata amoniacal, durante 5 minutos à temperatura ambiente e sem agitação. O material foi lavado novamente em água destilada durante 20 minutos e incubado à temperatura ambiente em solução de formaldeído 3% durante 5 minutos, posteriormente, foi lavado em água destilada por 20 minutos e em tampão cacodilato de sódio 0.1M (pH 7.2) durante 10 minutos.

A pós-fixação foi realizada em tetróxido de ósmio a 1% em tampão cacodilato de sódio 0.1M (pH 7.2) à temperatura ambiente durante 2 horas, no escuro. Finalmente, o material foi lavado no mesmo tampão durante 10 minutos, desidratado em séries crescentes de acetona 50, 70, 90 e 95% e 100% duas vezes, com duração de 5 minutos cada. Logo após, o material foi colocado em mistura de acetona e resina na proporção de 1:1 durante 12 horas. Após, procedeu-se à inclusão em resina pura com catalisador para polimerização em estufa à 60°C por 24 horas.

Posteriormente, os blocos foram seccionados em ultramicrotomo Sorvall–Porter Blum MT2-B. Os cortes semifinos foram corados com Azur II (1%) e Azul de Metileno (1%), os ultrafinos foram coletados em grades de cobre e não passaram por contrastação, sendo diretamente observados e fotografados em microscópio eletrônico de transmissão PHILLIPS CM 100.

3.2.7.2. Detecção de carboidratos pelo método de Thiery (1967)

O corpo gorduroso foi preparado seguindo-se parcialmente a rotina para microscopia eletrônica de transmissão. Após a ultramicrotomia, as secções foram recolhidas em grades de ouro, que flutuaram em ácido periódico a 1%, durante 15 minutos. A incubação foi realizada em tiosemicarbazida 1%, em ácido acético a 10%, durante 24 horas. Lavagens sucessivas em ácido acético 10%, 5% e 2% foram realizadas, durante 10 minutos cada. Após 3 lavagens de 10 minutos cada, em água destilada, as grades contendo o material foram transferidas para solução de proteinato de prata 1% por 30 minutos, no escuro, à temperatura ambiente. Por fim, o material sem contrastação passou por lavagem em água destilada, foi observado e fotografado em microscópio eletrônico de transmissão PHILLIPS CM 100.

3.2.7.3. Técnica do ósmio imidazol para detecção de lipídios insaturados, segundo Argermüller e Fahimi (1982)

Dez fêmeas foram dissecadas e o corpo gorduroso das mesmas foi fixado em glutaraldeído 3% em tampão cacodilato de sódio 0.1M (pH 7.2) durante 2 horas. O material foi lavado duas vezes no mesmo tampão por 15 minutos cada. A pós-fixação foi realizada em tetróxido de ósmio 2% em tampão imidazol 0.1M (pH 7.5), durante 30 minutos à temperatura ambiente e no escuro. Ao término desse período de incubação, o material foi lavado em tampão imidazol 0.1M (pH 7.5) por 15 minutos, seguido de duas lavagens em PBS durante 15 minutos cada. A desidratação foi realizada em séries crescentes de acetona 50, 70, 90 e 95% e 100% duas vezes, com

duração de 5 minutos cada. Logo após, o material permaneceu em mistura de acetona e resina na proporção de 1:1 por 12 horas. O material foi incluído em resina pura com catalisador para polimerização em estufa à 60°C por 24 horas.

Posteriormente, os blocos foram seccionados em ultramicrotomo Sorvall–Porter Blum MT2-B, as secções semifinas foram coradas com Azur II (1%) e Azul de Metileno (1%) e as ultrafinas, coletadas em grades de cobre, não foram contrastadas, sendo, a seguir, observadas e fotografadas em microscópio eletrônico de transmissão PHILLIPS CM 100.

3.2.8. Dosagem do teor protéico e eletroforese

Para a dosagem do teor protéico total, 10 fêmeas foram dissecadas em solução fisiológica e o corpo gorduroso foi processado segundo o método de Bradford modificado (SEDMAN; GROSSBERG, 1977). O corpo gorduroso foi transferido para diferentes ependorffs, onde foi macerado com auxílio de bastão de vidro em água destilada e, centrifugado sob refrigeração, em centrífuga para ependorff, modelo 5415C, por 5 minutos em 9.880 rcf.

Do material sobrenadante transferido para os ependorffs, foi retirada uma amostra de 5µL de cada, à qual foi misturado 1.5 mL do reagente Coomassie Blue. Após a homogeneização do material, foi efetuada a leitura em espectrofotômetro INCIBRAS, modelo MF 200UV–VIS, no comprimento de onda de 595 nm, cujo resultado de absorvância foi transferido para a fórmula abaixo, para determinação da concentração da amostra.

$$C = \Delta \times f / v$$

onde:

C = concentração (µg/ µL)

Δ = absorvância (resultado da leitura)

f = fator de correção

v = volume da amostra (µL)

3.2.8.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), segundo Hames e Rickwood (1981)

O extrato obtido a partir do corpo gorduroso foi analisado por eletroforese em gel de gradiente (5 a 20%) em poliacrilamida em presença de duodecil sulfato de sódio (SDS). O gel de tamanho 15.5 cm x 1.5 cm x 1.5 mm foi preparado utilizando-se como catalisador o persulfato de amônia a 0,035%. A quantidade de proteína total aplicada nos canais do gel foi aproximadamente 35 µg, sendo utilizados como padrão a MBP-β-galactosidase (PM = 175000), MPB-paramiosina (PM = 83000), desidrogenase glutâmica (PM = 62000), aldolase (PM = 47500), triosefosfato isomerase (PM = 32500), β-lactoglobulina A (PM = 25000), lisozima (PM = 16500) e aprotinina (PM = 6500).

O gel foi submetido a uma corrente de 50mA e voltagem de 150V durante a corrida. A seguir, as proteínas foram coradas com Coomassie Brilliant Blue R-250 1% em mistura de metanol, ácido acético e água na proporção de 10:2:10 e descoradas com a mesma solução sem a presença do corante.

Resultados

4. RESULTADOS

Os resultados estão sendo apresentados como artigos (publicados, no prelo ou submetidos), contemplando cada um deles diferentes aspectos focalizados no presente estudo, com a finalidade de atingir os objetivos propostos.

Cada artigo foi denominado de capítulo, ficando a tese constituída de um corpo único que mostrou de maneira abrangente as características morfofisiológicas dos ovários e do corpo gorduroso de fêmeas semi-ingurgitadas de carrapatos *Amblyomma cajennense*.

Capítulo 1: DENARDI, S. E; Bechara, G. H.; Oliveira, P. R.; Nunes, E. T.; Saito, K. C.; Camargo Mathias, M. I.; Morphological characterization of the ovary and vitellogenesis dynamics in the tick *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 125, p. 379-395. 2004.

Capítulo 2: DENARDI, S. E; Bechara, G. H.; Camargo Mathias, M. I. New morphological data on fat bodies of semi-engorged females of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). **Micron**, New York, 2008. Doi: 10.1016/j.micron.2007.12.002. no prelo.

Capítulo 3: DENARDI, S. E; Bechara, G. H.; Camargo Mathias, M. I. Fat body cells of *Amblyomma cajennense* partially engorged females (Acari: Ixodidae) and their role on vitellogenesis process. Artigo submetido.

Capítulo 1

**Morphological characterization of the ovary and
vitellogenesis dynamics in the tick *Amblyomma
cajennense* (Acari: Ixodidae)**

Sandra Eloisi Denardi¹, Gervásio Henrique Bechara², Patrícia Rosa de Oliveira¹,
Érika Takagi Nunes¹, Kelly Cristina Saito¹, Maria Izabel Camargo-Mathias¹ *

¹ Departamento de Biologia – I.B. – Universidade Estadual Paulista Júlio de
Mesquita Filho, UNESP, Av. 24A, nº 1515 – Cx. Postal 199, CEP: 13506-900 – Rio
Claro - SP- Brasil

² Departamento de Patologia Veterinária – FCAV – UNESP, Via de Acesso Prof.
Paulo Castellane, s/n - CEP: 14884-900 - Jaboticabal – SP – Brasil

* corresponding author: Tel: +55 19 3526 4135

E-mail: micm@rc.unesp.br

Resumo

O presente estudo traz a morfologia interna do sistema reprodutor feminino do carrapato-estrela *Amblyomma cajennense*, representado pelo ovário panoístico que não apresenta células nutridoras e, constituído por um tubo único onde um grande número de ovócitos se desenvolve assincronicamente, bem como os processos de deposição do vitelo nos ovócitos. Os ovócitos foram classificados em cinco estágios, (I a V), de acordo com: aparência citoplasmática, visualização da vesícula germinal, presença de grânulos de vitelo e presença do cório. O estudo da dinâmica da vitelogênese sugere que os elementos vitelínicos são depositados no ovócito segundo uma seqüência preferencial, na qual os lipídios são os primeiros a aparecer, seguido das proteínas e finalmente dos carboidratos. Desta forma, estes três elementos constituintes do vitelo de carrapatos *A. cajennense* podem ser encontrados na forma livre no citoplasma ou ligados quimicamente a outros elementos formando complexos.

Palavras-chave: *Amblyomma cajennense*, ovócitos, carrapatos, histologia, histoquímica, ultra-estrutura e vitelogênese.



Morphological characterization of the ovary and vitellogenesis dynamics in the tick *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae)

Sandra Eloisi Denardi^a, Gervásio Henrique Bechara^b,
Patrícia Rosa de Oliveira^a, Érika Takagi Nunes^a,
Kelly Cristina Saito^a, Maria Izabel Camargo Mathias^{a,*}

^aDepartamento de Biologia—I.B.—Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho,
UNESP, Av. 24A n° 1515- Cx. Postal 199 CEP, 13506-900 Rio Claro, SP, Brazil

^bDepartamento de Patologia Veterinária, FCAV, UNESP, Via de acesso Prof. Paulo Castellane,
s/n CEP, 14884-900 Jaboticabal, SP, Brazil

Received 4 July 2004; accepted 26 July 2004

Abstract

In this work we describe the internal morphology of the female reproductive system of the cayenne tick *Amblyomma cajennense*. This system is represented by a panoistic ovary, which lacks nurse cells in the germarium. This ovary consists of a single tube, in which a large number of oocytes develop asynchronously, thus accompanying the processes of yolk deposition in the oocytes. The oocytes were classified into stages that varied from I to V, according to: cytoplasm appearance, presence of the germ vesicle, presence of yolk granules, and presence of chorion. The study of vitellogenesis dynamics suggest that the yolk elements are deposited in the oocyte following a preferential sequence, in which the lipids are the first to appear, followed by proteins and finally by the carbohydrates. In this way the yolk of *A. cajennense* ticks have these three elements that may be free in the cytoplasm or chemically bounded forming glycoprotein or lipoprotein complexes.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: *Amblyomma cajennense*; Oocytes; Tick; Histology; Histochemistry; Ultrastructure-vitellogenesis

* Corresponding author. Tel.: +55 19 3526 4135.

E-mail address: micm@rc.unesp.br (M.I. Camargo Mathias).

1. Introduction

There are numerous studies concerning several aspects of ticks, such as bioeconomy, ecology, and external anatomy, aimed at obtaining a better taxonomy of this complex group (Hoogstraal, 1956; Till, 1961). Nevertheless, works regarding internal morphology and anatomy of tick are limited (Robinson and Davidson, 1913; Sonenshine, 1991). According to Fletthmann (1990), the tick *Amblyomma cajennense* is found in all its developmental stages on wild and domesticated birds, as well as on numerous mammals and reptiles. In Brazil *A. cajennense* and other ixodid tick species have been collected and identified from wild animals of the Pantanal region (Bechara et al., 2000; Campos Pereira et al., 2000) and Ema's National Park (Bechara et al., 2002), as part of a comprehensive study to determine established and emerging tick-host relationships and related pathological aspects. The major damage caused by this species relates to its feeding habits, since they are hematophagous and their attack causes direct economic losses in the production of meat, dairy products, and leather (Arthur, 1960; Furlong et al., 1996). In addition, it is a vector of important pathogens for public and animal health (Guimarães et al., 1998). For instance, *A. cajennense* is considered the main vector of the pathogen responsible for the Rocky Mountain spotted fever, *Rickettsia rickettsii*, in South America (Lemos et al., 1997). Studies conducted on the internal morphology of ticks are limited to species that occur in Africa, Europe, or Australia. Species that occur mainly in Brazil, such as *A. cajennense*, have been poorly studied in relation to the morphology of the female reproductive tract.

Therefore, this study presents information on the internal morphology of the ovaries of *A. cajennense*, as well as the classification of the oocytes at different developmental stages, while establishing a direct relationship between these stages and the dynamics of yolk deposition in female ticks.

2. Materials and methods

Mated and engorged female ticks of *A. cajennense* were collected from tick colonies maintained in controlled conditions – 28 °C, 80% RH and 12:12 (L:D) photoperiod – at the Department of Animal Pathology, Veterinary College, UNESP, Jaboticabal, SP, Brazil. Equipment utilized in this study was obtained from the Histology and Electron Microscopy Laboratories of the Biology Department at the Bioscience Institute, UNESP, Rio Claro, SP, Brazil.

Individuals were maintained in the refrigerator during 10 min for thermal shock anesthesia and then dissected in saline solution.

Ten ticks were anesthetized; the ovaries were removed and schematically drawn with the aid of a camera lucida coupled to a Zeiss stereomicroscope.

For the SEM observation, the ovaries of 20 females were removed, fixed in Karnovsky for 24 h, and dehydrated in a graded 70–100% ethanol and acetone series. The material was processed by critical point drying, sputtered with gold, and examined and photographed under a SEM Phillips 505.

For the histological and histochemical observations, 20 ovaries were fixed in 4% paraformaldehyde. The material was then dehydrated in ethanol, embedded in JB4 resin during 24 h at 4 °C, and then transferred to plastic moulds previously filled with resin containing a catalyzer. After resin polymerization, the material was sectioned using a Sorvall JB4 microtome (Bio Rad) and stained with hematoxiline and eosin, following routine histological procedures.

Histochemical tests were applied in ovaries to detect the presence of the following compounds: proteins (using Bromophenol Blue as proposed by Pearse (1985)); lipids (using Nile Blue as proposed by Lison (1960)); polysaccharides (simultaneous staining with PAS/Alcian Blue, according to Junqueira and Junqueira (1983)); and calcium (following the Von Kossa technique as proposed by Junqueira and Junqueira (1983)).

For the TEM observation, twelve ticks were fixed in 3% glutaraldehyde, postfixed in 1% OsO₄, and embedded in Epon Araldite. Ultrathin sections were contrasted with uranyl acetate and lead citrate. The material was then included in pure Epon resin and polymerized at 60 °C for 72 h. Afterwards, screens containing ultrathin sections of the material were observed and photographed in a TEM Phillips MC 100.

3. Results

3.1. Ultramorphology

The SEM revealed that the ovary of *A. cajennense* consists of a single laterodorsal tube, in which a large number of oocytes develop simultaneously, but asynchronously. The oocytes were distributed in the ovary such that the oocytes on the initial stages of development (stages I, II) were found at the distal region (Fig. 1A). Oocytes having late developmental characteristics, such as an increase in size, and oocytes in the last stages of yolk deposition, were found at the median and proximal regions of the ovary (Fig. 1A, C). The more mature oocytes were of brownish coloration when compared to the whitish oocytes of the first developmental stages, meaning that the process of chorion deposition was completed in the more mature oocytes. The external surface of the more developed oocytes was completely covered by micropores, which have the function of oxygenating the internal structures of the future egg (Fig. 1B).

3.2. Histology

Histologically, the ovary of *A. cajennense* was classified as panoistic, since it lacked nurse cells in the germarium; thus, all the cells present in the cyst originated oocytes. A wall of epithelial cells, which show varying morphologies from cubic to scaly, formed the ovary. These cells are small with rounded nuclei in which two nucleoli are frequently observed (Fig. 1C). The oocytes at the initial developmental stages were fixed to the ovarian wall by a pedicel of cells originated from the same ovarian wall (Fig. 1C). The lumen ran longitudinally through the entire ovary (Fig. 1C). The ampoule is defined as the proximal region of the ovary in which the oviducts open; the oviducts are prolongations of the ovary.

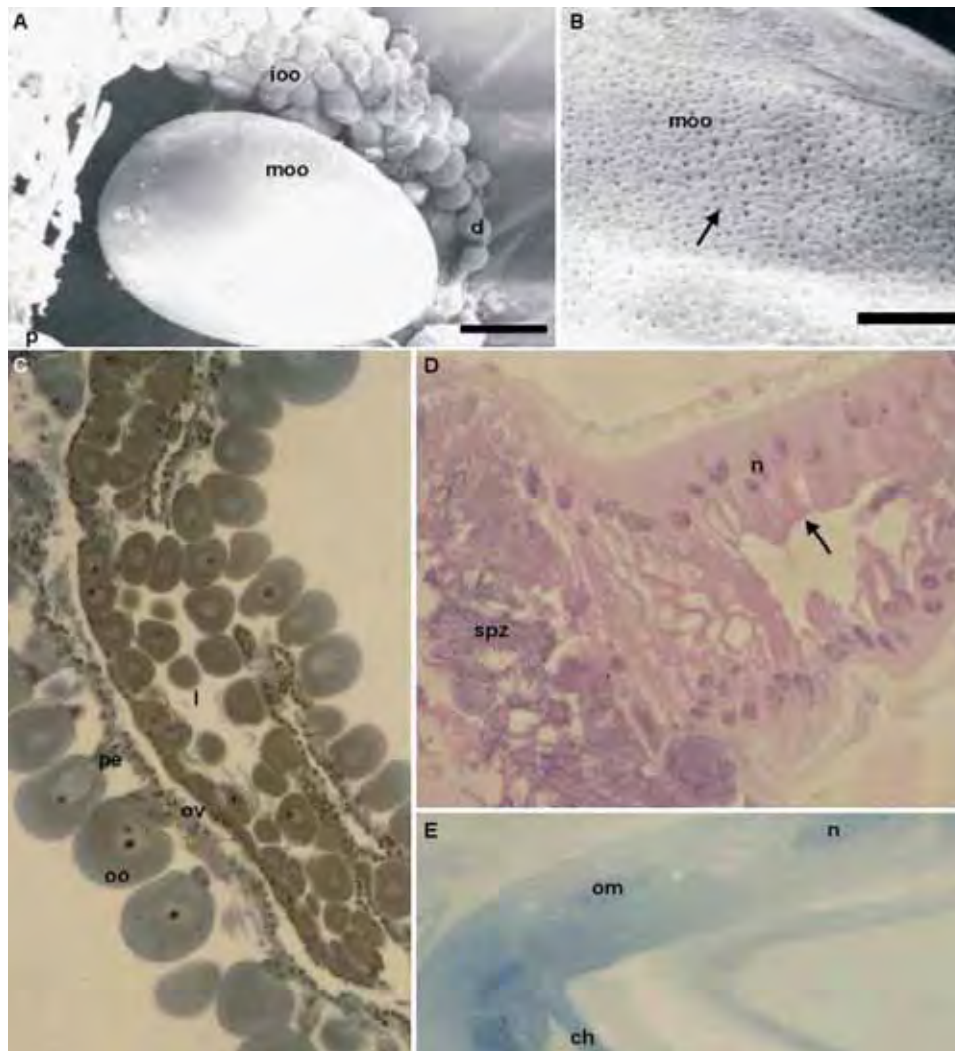


Fig. 1. (A, B) Scanning electron microscopy (SEM) of *A. cajennense* ovary showing immature (ioo) and mature (moo) oocytes: d = distal portion; p = proximal portion. Bar A = 0.1 mm. (B) SEM of external surface of mature oocyte (moo) showing the pore structure (arrow). Bar = 0.01 mm. (C) Longitudinal section of ovary (ov) stained by Bromophenol Blue: oo = oocyte; pe = pedicel, l = lumen. Magnification = 130 \times . (D, E) Histological section of proximal portion of ovaries: spz = spermatozoa; n = nuclei of ovary epithelium (om); arrow = brush border; ch = chorion of oocyte. Magnification D = 200 \times . Magnification E = 500 \times .

This region consisted of a simple epithelium of cylindrical cells with oval nuclei, which were positioned at the basal region. This epithelium appeared supported by a cubic epithelium (Fig. 1D, E). A large amount of elongated spermatozooids was observed inside the ampoule; the spermatozooids presented a slight dilatation at the region of the nucleus (head), similar to most animals (Fig. 1D).

4. Classification of the oocytes

Based on the large degree of morphological variation observed in the oocytes of *A. cajennense*, a classification system was designed according to Balashov (1983) and modified by us in order to describe the developmental sequence that the oocytes undergo during the process of vitellogenesis (Fig. 2).

The oocytes were classified into stages that varied from I to V, according to:

- (a) cytoplasm appearance;
- (b) presence of the germ vesicle;
- (c) presence of yolk granules;
- (d) presence of chorion.

Stage I or initial oocyte: Oocytes with small size and morphology varying from rounded to elliptical; cytoplasm with germ vesicle representing the nucleus of the oocyte and in which one or two nucleoli can be observed. The cytoplasm appears completely homogeneous and, under the light microscope, there is no evidence of large yolk granules. The plasma membrane appears thin (Fig. 2). The oocytes in stage I are fixed to the ovary by a pedicel (Fig. 1C).

Stage II: The oocytes are still fixed to the ovary by the pedicel, however, the plasma membrane is thicker than in the previous stage. The germ vesicle is still observed. The

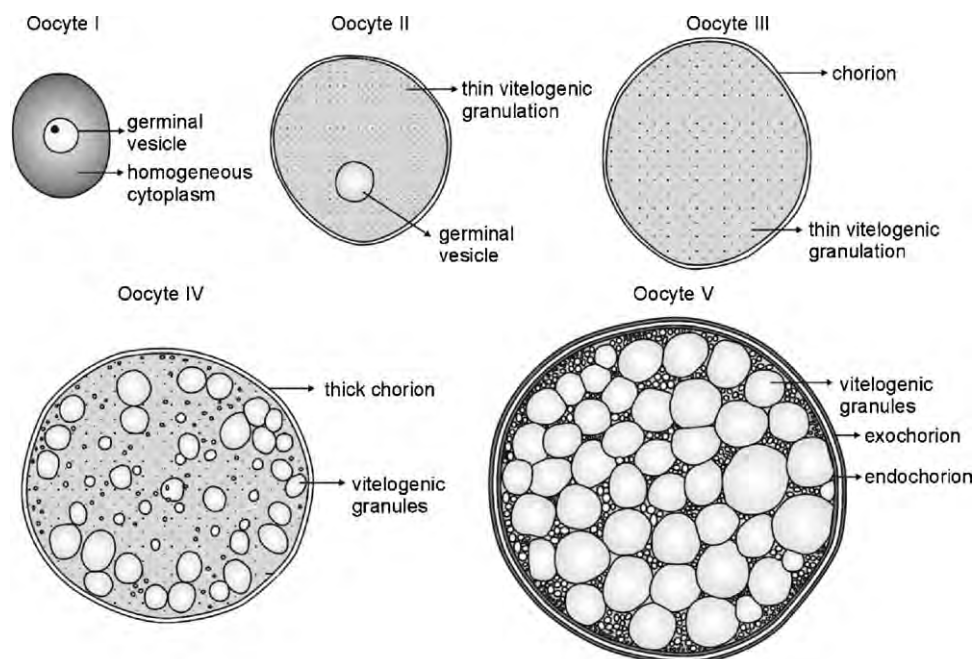


Fig. 2. Development of oocytes in *A. cajennense* tick ovaries.

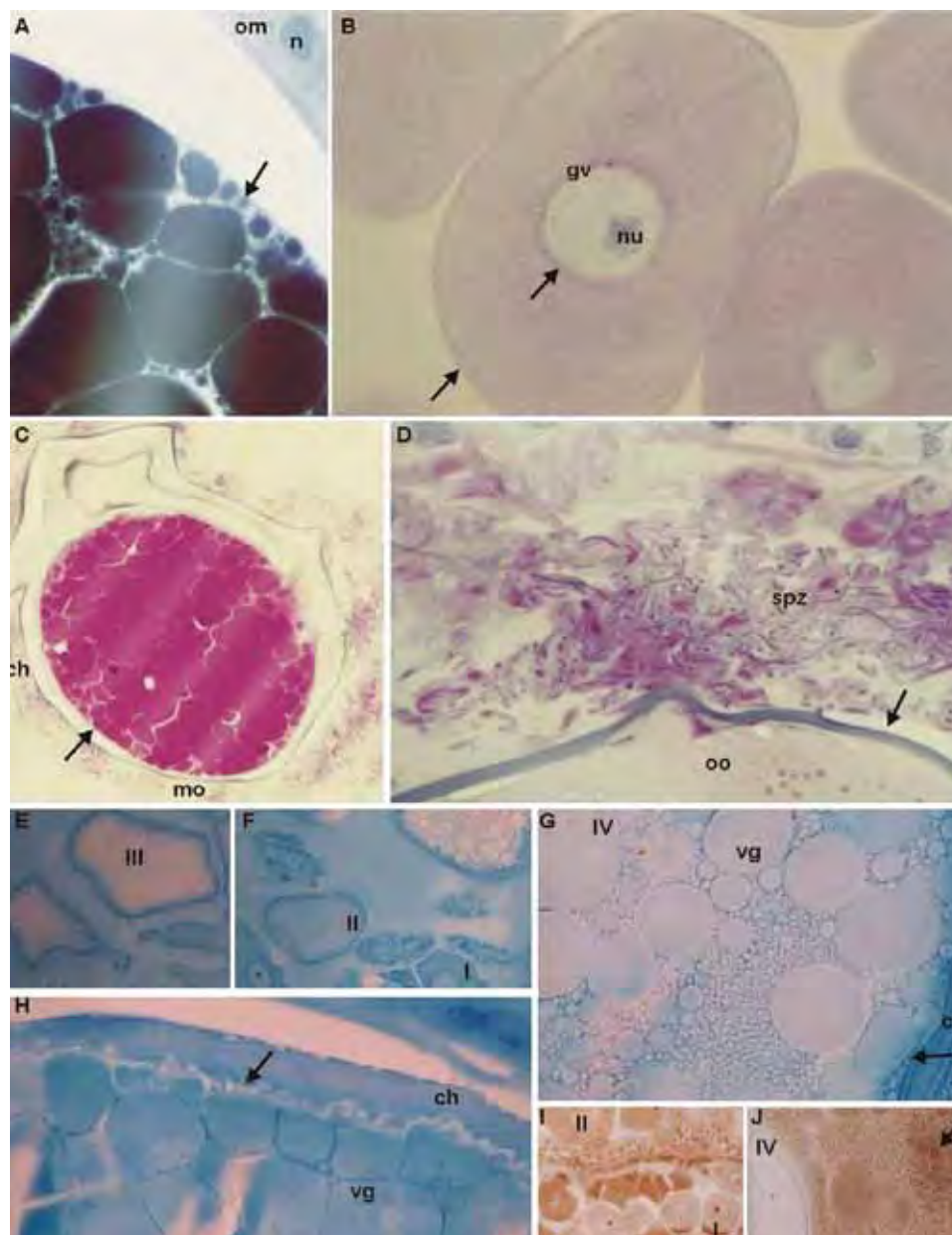


Fig. 3. Histological sections of *A. cajennense* ovary stained by Bromophenol Blue (A) for protein detection. PAS/ Alcian Blue (B–D) for polysaccharid detection; Nile Blue (E–H) for lipid detection and Von Kossa (I, J) for calcium detection. (A) Oocyte V inside the ovary (om); n = nuclei of ovary cell, arrow = small proteic granule. Magnification = 500 \times . (B) Immature oocytes (I, II): gv = germinal vesicle with nucleoli (nu). Magnification = 500 \times . (C) Oocyte V inside the ovary (mo): arrow = vitelogenic granule; ch = chorion. Magnification = 85 \times . (D) Proximal portion of ovary and an oocyte (oo) with thick chorion (arrow), spz = spermatozoa. Magnification = 500 \times . (E–H)

oocytes in stage II are twice as large as in stage I and their morphology is rounded. The cytoplasm appears with a fine granulation (Fig. 2), which signifies the beginning of the production or incorporation of yolk (Fig. 2).

Stage III: In this stage the germ vesicle is not easily discerned. Under the light microscope, a fine yolk granulation is observed dispersed throughout the cytoplasm. The plasma membrane appears thick, showing the characteristics of a chorion. The oocytes in stage III are larger when compared to the previous stages and were denominated as intermediate oocytes (Fig. 2).

Stage IV: Oocytes with the cytoplasm completely with yolk granules of various sizes, in which the largest granules appear preferentially located at the periphery, while the central region is filled with smaller granules. The chorion is almost completely deposited and the germ vesicle is no longer visible (Fig. 2).

Stage V: Oocyte at the maximum developmental stage, showing large and dense yolk granules that fill the whole cytoplasm. The periphery shows a fine yolk granulation, which probably resulted from the exogenous incorporation of yolk. The germ vesicle is no longer visible. The chorion is very thick; under the transmission electron microscope it is possible to evidence two distinct layers: an external layer in contact with the epithelial cells of the ovarian wall (exochorion), and an internal layer in contact with the vitelline layer of the oocyte (endochorion) (Figs. 2 and 6C). These oocytes were denominated mature or vitellogenic oocytes and they lack a pedicel because it was pushed into the ovarian lumen (Fig. 2).

5. Histochemistry

5.1. Bromophenol Blue technique – detection of proteins

All the oocytes in the ovary, including those inside the ovarian lumen (IV and V), reacted positively to this test (Figs. 1C and 3A).

The oocytes in the stages I–III reacted strongly positive (Fig. 1C), showing a strongly stained cytoplasm, thus indicating the presence of protein elements at the early stages.

The germ vesicle appeared clearer than the cytoplasm, although the nuclear envelope appeared strongly stained.

The oocytes located at the median region of the ovary and those in the more advanced developmental stages, located next to the region of the ampoule (Fig. 3A), showed a strongly stained yolk granulation indicative of a high protein content. The chorion reacted strongly positive to this test, thus confirming its proteic nature. The ovarian cells that envelop the oocytes in this region presented a weakly positive cytoplasm with an evident nucleus (Fig. 3A).

The region of the ampoule reacted weakly positive to this test.

Oocytes I–V: ch = chorion; vg = vitellogenic granules; arrow = vitellogenic granules. Nile Blue negative. Magnification E = 200×. Magnification F = 200×. Magnification G, H = 500×. (I, J) Oocytes I–IV, with calcium spheres (arrow). Magnification I = 200×. Magnification J = 500×.

5.2. PAS/Alcian Blue – detection of polysaccharides

The cytoplasm of the less developed oocytes reacted weakly positive to this test; however, an accumulation of polysaccharides was observed as a fine granulation surrounding the germ vesicle. This accumulation of polysaccharides is known as “nuage”. The plasma membrane also appeared strongly stained (Fig. 3B).

The oocytes in the stages IV and V presented strongly stained yolk granules. These granules displayed varying sizes and were distributed thus: the larger granules occupied the central region of the oocyte (Fig. 3C) while the smaller granules were located at the periphery (Fig. 3C).

At the region next to the ampoule, in which a large amount of spermatozooids were observed, the cells appeared scaly and weakly positive, showing a flattened nucleus (Fig. 3C, D).

The chorion reacted positively to this test (Fig. 3C).

The spermatozooids also exhibited a positive reaction to this test (Fig. 3D).

5.3. Nile blue – detection of acid lipids

The amount of lipids detected in the cytoplasm of the oocytes varied according to the developmental stage. Oocytes in the stage I exhibited a cytoplasm that reacted strongly positive to this test with the germ vesicle appearing clearer than the rest of the cytoplasm; however, the nuclear envelope was strongly stained, thus indicating the presence of acids lipids, which is a common constituent of biological membranes (Fig. 3F).

Oocytes in stage II also reacted positively and a fine yolk granulation dispersed throughout the cytoplasm was observed. The germ vesicle was observed with the application of this test (Fig. 3F).

Stage III oocytes exhibited few and small yolk granules dispersed in the cytoplasm. These granules did not react to this test and numerous small positive granules were observed at the periphery (Fig. 3E). The enveloping membrane, which already showed characteristics of a chorion, reacted positively to this test.

The oocytes in stage IV contained a large amount of yolk granules that reacted negatively to the test, with the largest granules appearing at the periphery of the oocyte, while the smaller granules concentrated at the central region. Large granules were rarely observed occupying the central region of the oocyte (Fig. 3G, H). The chorion showed a positive reaction to the test (Fig. 3H).

Oocytes in stage V showed their cytoplasm completely filled by dense yolk granules that exhibited a positive reaction to the test (Fig. 3H). We observed stage V oocytes inside the ampoule. The ampoule generally reacted weakly positive to this test, except at the region of the epithelium, which demonstrated a great affinity to the dye.

The spermatozooids and cell nuclei appeared stained due to the use of a counter stain with hematoxilin.

5.4. The Von Kossa stain – calcium detection

This test revealed that the mineral calcium was present in the oocytes at all developmental stages, especially at stages IV and V, in which the cytoplasm showed a large

amount of calcium spheres, in addition to the yolk granules, and the chorion was already deposited (Fig. 3I, J).

6. Ultrastructure

Ultrastructural analysis showed that oocytes in developmental stages I and II actually possessed a more homogeneous cytoplasm, i.e. with the presence of few organelles and in which the vitellogenesis has not yet started (Fig. 4A). In these oocytes, the germ vesicle occupied more than half of the cytoplasm, with its contents being of low electron-density, homogeneous, and enveloped by a membrane (Fig. 4A). We frequently observed prominent and electron-dense nucleoli. A fine and electron-dense granulation was observed surrounding the germ vesicle in stage II oocytes. This granulation became coarser and with larger granules as the oocyte matured (Fig. 4B).

The most frequently observed cytoplasmic organelles were the mitochondria, which showed varying morphologies and a relatively small size in the less developed oocytes in stage I (Fig. 4C). The oocytes in the initial developmental stages (stages I, II and III) were fixed to the ovary by a pedicel formed by cells with shapes varying from rounded to oval and with their nuclei occupying most of the cell, leaving only a thin layer of cytoplasm around the nucleus (Fig. 4A). We also observed the presence of a few mitochondria and small vacuoles. These cells were also laying on a basal lamina (similar to the one that envelops the oocyte), which at some regions showed a considerable increase in thickness (Fig. 6A). The contact between the oocyte and the pedicel cell was accomplished through infoldings of both plasma membranes (Fig. 6B). The presence of Golgi complexes liberating secretion vesicles was frequently observed (Fig. 4C) in the oocytes of all stages. A large amount of ribosomes and polysomes filled the cytoplasm of the oocytes, as well as lamellar rough endoplasmic reticulum.

The occurrence of mitochondria was considerably increased in oocytes at the more advanced developmental stages; some of these organelles had a thinner central region when compared to the extremities, thus rendering a halter shape to their structure during the stage III (Figs. 4D, 5A, 5D and 6E).

The plasma membrane that surrounded all the oocytes was observed laying on a thick basal lamina, which could be differentiated into two regions: (a) a thicker region in direct contact with the plasma membrane of the oocyte; (b) a thinner, more external region (Fig. 4D). The strong positive reaction that the plasma membrane exhibited to the PAS histochemical test, which indicated a large amount of polysaccharides, was in fact indicating the constitution of the basal lamina and not of the plasma membrane. The plasma membrane of the oocyte, independently of its developmental stage, frequently showed several infoldings extending towards the basal lamina. As the oocyte developed, these infoldings increased in number and size. These infoldings corresponded to the beginning of vitellogenesis, indicating the need for a higher uptake of elements from the haemolymph. At the end of vitellogenesis (stage V), these infoldings were apparently involved in the deposition of the chorion (Figs. 4D and 5B).

The oocytes in stage III, also known as intermediary oocytes, possessed a cytoplasm filled with secretion granules; however, at this stage these granules were still small and

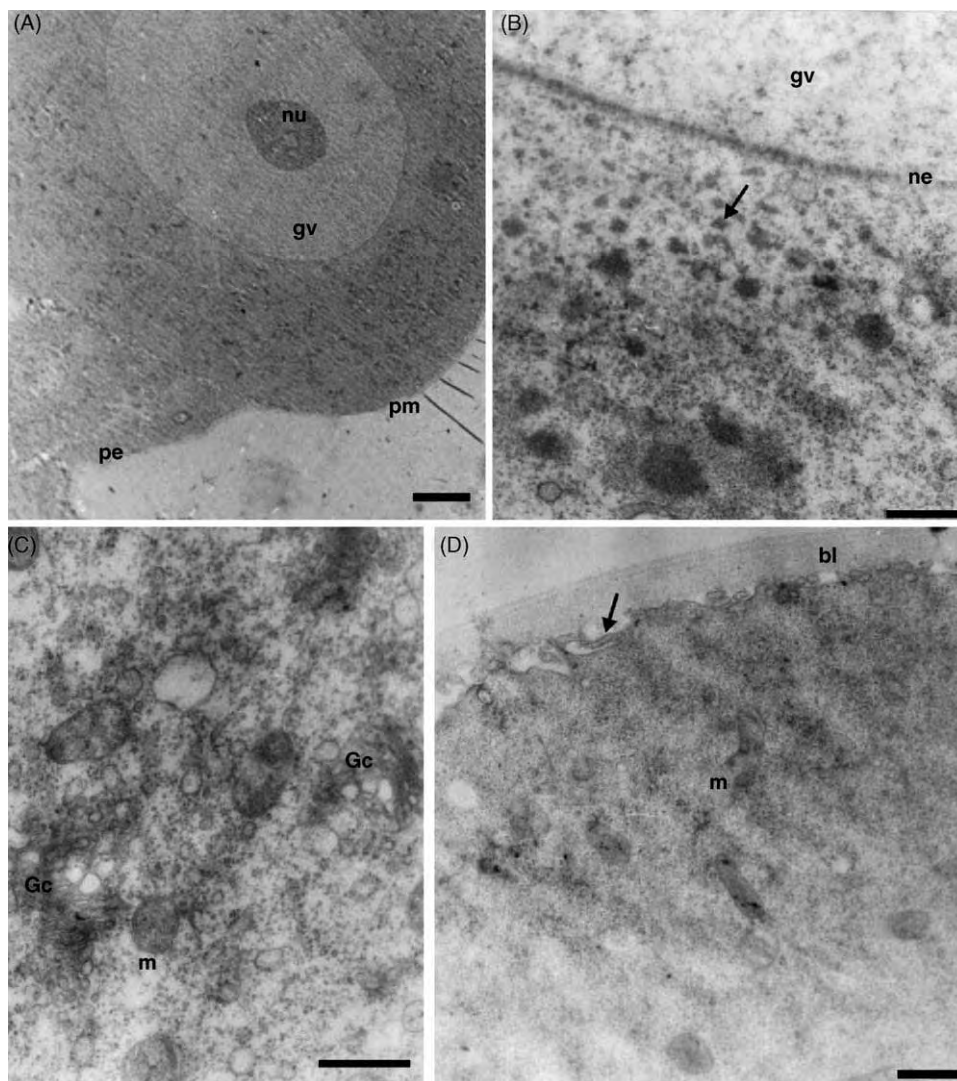


Fig. 4. Transmission electron microscopy (TEM) of *A. cajennense* oocytes in several phases of development. (A) General view of oocyte I: nu = nucleoli; gv = germinal vesicle; pm = plasmic membrane; pe = pedicel. Bar = 10 μ m. (B) Oocyte II: detail of germinal vesicle (gv); ne = nuclear envelope; arrow = nuage. Bar = 1 μ m. (C, D) Detail of cytoplasm in oocytes I (C) and III (D): Gc = Golgi complex; m = mitochondria; bl = basal lamina; arrow = plasmic membrane invagination. Bar = 1 μ m.

possessed varying morphologies (Figs. 4D and 5B). At the peripheral region of these oocytes we observed small secretion vesicles, which were probably incorporated from the haemolymph, since this would be the most important exogenous source of vitellogenic proteins (Fig. 5A, B). A few larger granules were also observed (Fig. 5B).

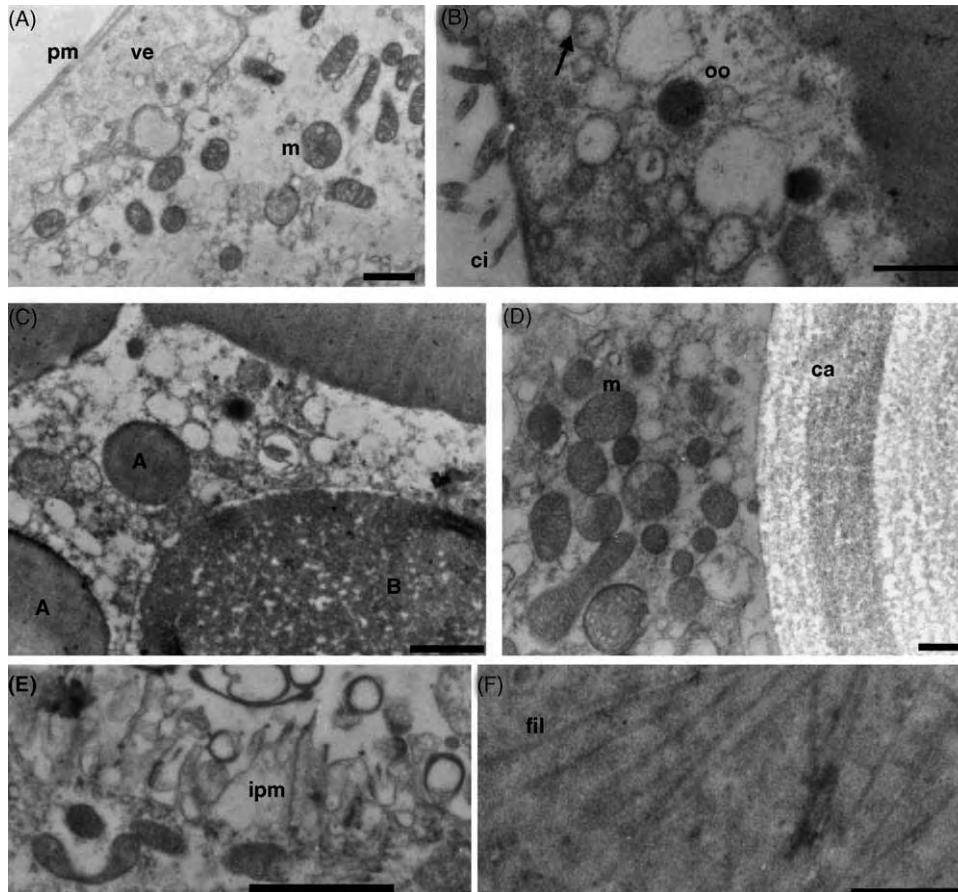


Fig. 5. TEM of *A. cajennense* oocytes in several phases of development. (A) Oocyte III. Periferic region: pm = plasmic membrane; ve = exocytic vesicle; m = mitochondria. Bar = 2 μ m. (B) Detail of chorial deposition process in oocyte III: ci = endochorion; arrow = secretion vesicle produced by oocyte to be incorporated by the chorion. Bar = 1 μ m. (C) Detail of oocyte V: central region; A = alfa vitelogenic spheres; B = beta vitelogenic spheres. Bar = 1 μ m. (D) Details of calcium sphere (ca) associated with mitochondria (m). Bar = 1 μ m. (E) Membrane invagination (ipm) evolving calcium spheres formation. (F) Microfilaments (fil) near the calcium spheres. Bar = 3 μ m.

The most frequent organelles were the mitochondria, which showed varying sizes and morphologies. The number of crests and the density of the matrix were also variable. We observed rounded mitochondria, some more elongated, and some showed a thinner middle region, thus presenting a halter shape and located very close to the secretion granules or to the autophagosomes in the stage III (Fig. 6E).

Another frequently found organelle was the round-shaped peroxisome, enveloped by a membrane. Inside the peroxisomes, a fine granulation of medium electron-dispersion was observed. A nucleoid was observed at the center of this organelle in the stage III (Fig. 6F).

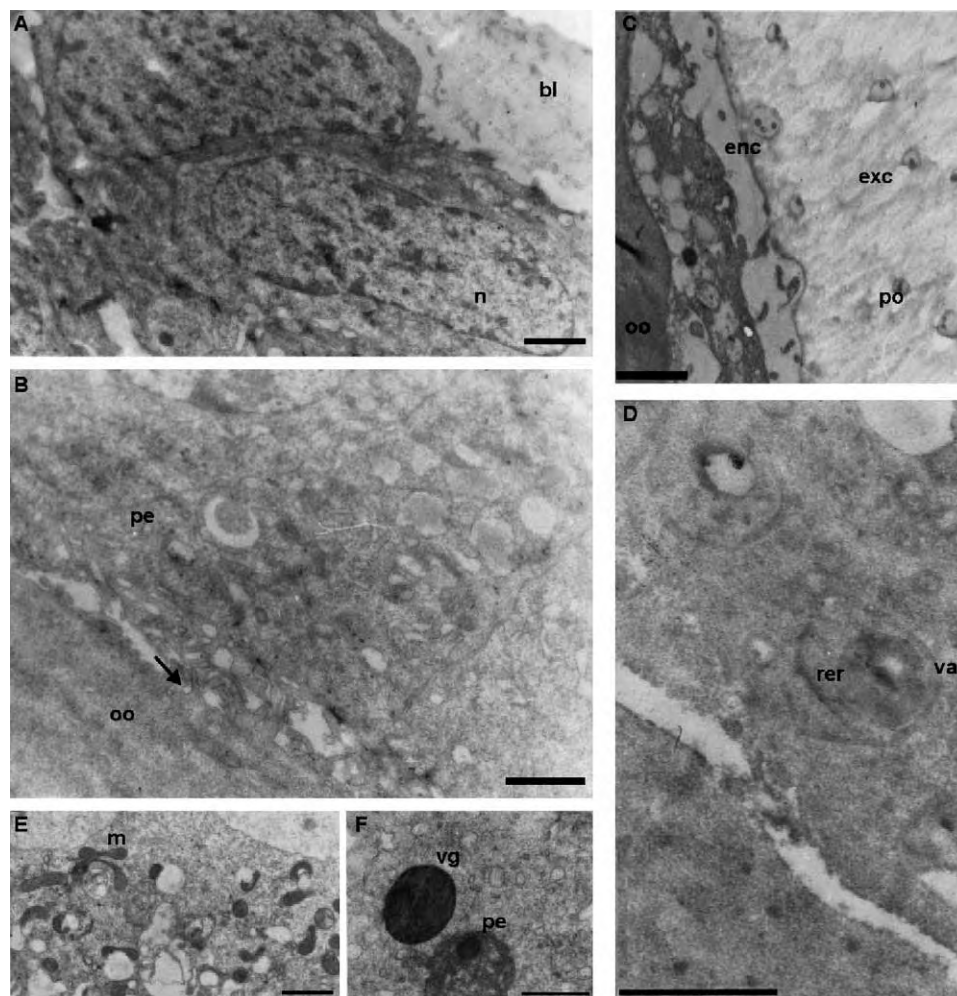


Fig. 6. TEM of several regions of ovary and oocytes of *A. cajennense*. (A) Detail of pedicel cells: n = nuclei; bl = basal lamina. Bar = 2 μ m. (B) Detail of contact between oocyte (oo) and pedicel cell (pe) arrow = membrane invagination making the contact. Bar = 2 μ m. (C) Oocyte V showing the chorion sheaths: enc = endochorion; exc = exochorion; po = pores in exochorion sheath. Bar = 1 μ m. (D) Oocyte in reabsorption process (oosorption): rer = rough endoplasmic reticulum inside the autofagic vacuole (va). Bar = 3 μ m. (E, F) Detail of central region of oocyte III showing the mitochondria (m), vitelogenic granule (vg) and peroxisome (pe) presence. Bar E = 2 μ m. Bar F = 1 μ m.

The oocytes in the stages IV and V contained a large amount of protein granules of varied sizes and electron-densities at their central region (Fig. 5C). The smaller protein spheres probably undergo a fusion process, thus resulting in larger spheres at various locations inside the cytoplasm (Fig. 5B). The central region of the cytoplasm possessed a large amount of Golgi complexes that liberated secretion vesicles, showing an active participation in cellular metabolism. We also observed lamellar rough endoplasmic

reticulum, which indicated that during stages IV and V the oocyte itself was still involved in protein synthesis. A large amount of mitochondria of varying morphologies were also observed during these stages, concentrated mainly at the central region of the oocyte. The ultrastructural details revealed that the proteic yolk spheres possessed different arrangements of material inside them (stage V). The protein spheres of the oocytes in stage V were denominated Alfa and Beta. The Alfa spheres appeared extremely homogeneous and electron-dense, although they varied greatly in size (Fig. 5C). The Beta spheres displayed a sponge appearance, were less electron-dense and larger than the Alfa spheres (Fig. 5C). Almost no free lipids were observed in the cytoplasm, thus confirming the results obtained by the histochemical analysis.

Calcium spheres were also observed frequently in the cytoplasm of the oocytes, mainly in the oocytes of the stage V. These spheres were contained inside a vacuole, surrounded by a membrane, and in which concentric layers of inorganic matter were disposed in a lamellar arrangement, interlaying more and less electron-dense layers (Fig. 5D). Numerous mitochondria of varying shapes and sizes were observed intimately associated with these structures. At the region of the cytoplasm in which the calcium structures appeared to be forming, we observed that the vacuole membrane that would eventually envelope these structures possessed numerous infoldings and liberated an electron-dense material inside the organelle (Fig. 5E). In the cytoplasm of the oocytes in stage V we observed a large quantity of microfilaments that were more frequently present at the central region near the calcium structures (Fig. 5F). The ultrastructural data allowed us to note that two distinct layers constituted the chorion of oocytes in stage V: an external layer (exochorion) and an internal layer (endochorion) that were in direct contact with the oocyte (Fig. 6C). The membrane of the oocyte liberated materials that were incorporated into the chorion, via exocytosis vesicles of electron-dense appearance. The external layer of the chorion (exochorion) appeared intersected by a large quantity of micropores (Fig. 6C). We observed a few oocytes of irregular shape that showed strong indications of structures in the process of degeneration or reabsorption within the cytoplasm, such as the presence of autophagosomes and myelinic bodies. Inside these oocytes we found pieces of degenerating endoplasmic reticulum within the vacuoles (Fig. 6D). These vacuoles would be responsible for the breakdown of cytoplasmic elements to be reabsorbed by the tick.

7. Discussion

The first morphological studies of the female reproductive organ of the tick *A. cajennense* were performed by Said El (1992), who reported that this organ consisted of a tubular ovary that ended in two oviducts and which contained oocytes from the initial to the more advanced developmental stages, ready to be oviposited. Furthermore, the diameter of the ovary suffered a progressive increase in size from the distal to the proximal region, forming in the latter a structure with the shape of an ampoule, which is corroborated by the data obtained in our study.

The results obtained in this study allowed us to compare some characteristics of the oogenesis in this tick to that of other animals, mainly of insects and diplopods. The latter present an oogenesis having characteristics that are very similar to those of *A. cajennense*.

Functional units known as ovarioles frequently constitute the ovaries. In these structures, it is possible to distinguish typical regions such as the vitellarium, located at the proximal region, and the germarium, located more distally. At the vitellarium, the yolk is deposited in the oocytes.

Results revealed that the ovary of the tick *A. cajennense* is of the panoistic type, which also occurs in some insects and in diplopods. This type of ovary is characterized by the presence of oocytes throughout the ovary and by the absence of nurse cells (Chapman, 1998). In this type of ovary, all cells present at the cyst will originate oocytes. To our knowledge, this is the first report of this type of ovary in ticks as part of an expanded literature review. According to Chapman (1998), in panoistic ovaries the difference between the germarium and the vitellarium is only established at the beginning of oocyte maturation (vitellogenesis). Generally, panoistic ovaries consist of numerous and short ovarioles, perpendicularly throughout two lateral oviducts, which fuse above the alimentary duct to form a continuous and folded ovary with the shape of a horseshoe. In *A. cajennense* we found a single ovary with the shape of an elongated structure that coils inside the body.

We observed that the oocytes present in the ovary of *A. cajennense* are positioned such that the less developed ones are located at the distal region, while the ones in more advanced developmental stages are found at the proximal region. The presence of oocytes of different maturation stages characterizes an asynchrony in their development, indicating that the process of yolk deposition (vitellogenesis) occurs at different times in the oocytes, thus rendering them capable of being fecundated at different times.

At the proximal portion of the ovary we observed a more dilated region, which is denominated as the ampoule. We verified that this region consisted of a cylindrical epithelium with typical secretory characteristics and with a probable specialization of the free surface of the apical membrane in the shape of microvilli. The spermatozooids remained stored from the time of copulation until the moment of egg fecundation. The eggs need ideal conditions (oxygenation, pH) to be viable for the process of fecundation.

The asynchronous development of the oocytes resulted in a difference in their size. We suggested a developmental sequence, suggested by Balashov (1983) and modified in the present work, which we believe that the oocytes undergo in *A. cajennense*. We have thus classified the oocyte development of this tick into five stages based mainly on the observation of histological sections:

- The oocytes in stage I were characterized by being smaller and because the germ vesicle and a homogeneous cytoplasm could be observed.
- A broadening of the cytoplasmic envelope and the presence of a fine cytoplasmic granulation characterized the oocytes in stage II. The germ vesicle could still be observed at this stage.
- The oocytes in stage III could be distinguished by the thick plasma membrane, displaying chorion characteristics, and the presence of a fine cytoplasmic granulation.
- The oocytes in stage IV were differentiated by the deposition of the chorion and the appearance of yolk granules of varying sizes in the cytoplasm. The germ vesicle was no longer visible.
- The oocytes in stage V were characterized by the presence of large and dense yolk granules. Two layers could be distinguished in the chorion: the exo and endochorion. It

was no longer possible to observe the germ vesicle due to the large amount of cytoplasmic granules.

In *A. cajennense* we observed that the oocytes in the initial developmental stages were fixed to the ovarian wall through a small pedicel consisting of oval cells with rounded nuclei. Nevertheless, the cells of the pedicel in direct contact with the oocyte showed a specialization of the plasma membrane in the shape of infoldings that interdigitate with the plasma membrane of the oocyte at that point. This observation might suggest that these cells, in addition to fixing the oocyte to the ovarian wall, might also be providing some sort of material that would contribute to the development of the oocytes. This hypothesis was supported by the fact that no nurse cells were found in this type of ovary.

In *A. cajennense* it appeared that the synthesis and/or incorporation of the proteins that constituted the yolk probably commenced in the oocytes at the initial developmental stages, since they reacted strongly positive to the Bromophenol Blue histochemical test.

Ramamurty (1968) noted that proteins and carbohydrates generally composed the yolk in the oocytes of insects and may have appeared in free form or chemically bonded to other elements. The author suggested that these components were deposited in the oocyte following a preferential sequence, in which the lipids were the first to appear, followed by proteins, and, finally, by the carbohydrates. The results obtained in the present study confirmed these observations in relation to the deposition of lipids, since this element was found in large quantities in oocytes in the stages I and II of *A. cajennense*.

Camargo-Mathias (1993) who studied vitellogenesis in the ant *Neoponera villosa*, discussed the origin of the lipids in the oocytes of this insect. However, other studies reported that mitochondria could be a probable site of origin for these compounds (Bonhag, 1968; Ranade, 1933; Wigglesworth, 1971). These authors, studying different insects, confirmed that a majority of the lipids present in oocytes is obtained through processes that occurred in this organelle. Ranade (1933) suggested that mitochondria might be transformed into lipid bodies of the yolk. Boissan (1970) concluded that at least part of the lipid material originated from the breakage and destruction of mitochondrial crests. In oocytes of *A. cajennense*, the synthesis and/or specific incorporation of yolk lipids probably commenced in the oocytes at the initial developmental stages (I–III), based on results of our study which showed that these oocytes possessed a cytoplasm filled with mitochondria and reacted strongly positive to the Nile Blue stain, thus confirming the presence of lipids.

Results of this study indicated that the less developed oocytes of *A. cajennense* possessed a moderate amount of polysaccharides, with the higher concentration of this element located around the germ vesicle in the shape of a fine granulation that was easily observed by electron microscopy. In general, this type of granulation is frequently described as “nuage” in the oocytes of insects. However, these findings do not agree with the results reported by Balashov (1983), who stated that the oocytes of ticks in general would have a yolk composed only by lipids and proteins.

Generally, the literature reports the acquisition of histochemical data from oocytes of different developmental stages of ixodids in general. These data indicate that lipids,

proteins and polysaccharides, which may appear free or chemically bound to other elements, generally compose the yolk. In *A. cajennense*, the final yolk that constitutes the oocytes also possessed these three components (Balashov, 1983; Sonenshine, 1991).

The presence of a large quantity of rough endoplasmic reticulum (as well as mitochondria) in the cytoplasm of oocytes in initial developmental stages might suggest that an intense protein synthesis is already underway at these stages, probably providing protein elements and lipids to the oocyte at the beginning of development. Therefore, there would be a process of protein auto-synthesis in the oocytes of stages I and II, which would characterize an endogenous production of yolk. This first yolk would have a lipoproteic origin, since these oocytes reacted positively to the histochemical tests for the detection of lipids and proteins. This type of process occurs frequently in insects and has been reported in ants (Camargo-Mathias, 1993).

The exogenous production of the yolk proteins would occur at a different moment during oocyte development at extra-ovarian sites that would use the haemolymph as means of transportation. For insects in general, as well as other arthropods, the main production center of exogenous proteins that would be incorporated into the yolk is the fat body. Nevertheless, for ticks this has not yet been confirmed and, according to Sonenshine (1991), the primary site of vitellogenin synthesis would be the fat body, a finding supported by observing the intense immunofluorescence of the insect fat body when this organ is incubated with anti-vitellogenin antibody. Our results suggest that in addition to an endogenous production of proteins, the cells of the pedicel of *A. cajennense* ovaries are also involved in providing proteins for the development of the oocyte. Thus, the cells of the pedicel appeared to play a role similar to that of the nurse cells in meroistic ovaries.

Acknowledgments

This research has been supported by FAPESP (Process No. 01/08866-0). The authors thank Antonio Teruyoshi Yabuki, Gerson Mello Souza, Cristiane Marcia Mileo and Monika Iamonte for their technical support.

References

- Arthur, D.R., 1960. Ticks: A Monograph of the Ixodoidea: On the Genera Dermacentor, Anocentor, Cosmiomma, *Boophilus* e *Margaporus*, Cambridge University Press, London.
- Balashov, Yu.S., 1983. de Alexander, T., Raikhel, S. (Eds.), An Atlas of Ixodid Tick Ultrastructure. Entomological Society of América, 289 pp. (Special Publication).
- Bechara, G.H., Szabó, M.P.J., Duarte, J.M.B., Matushima, E.R., Campos Pereira, M., Rechav, Y., Keirans, J.E., Fielden, L.J., 2000. Ticks associated with wild animals in the Nhecolandia Pantanal, Brazil. *Ann. NY Acad. Sci.* 916, 289–297.
- Bechara, G.H., Szabó, M.P.J., Almeida Filho, W.V., Bechara, J.N., Pereira, R.J.G., Garcia, J.F., Campos Pereira, M., 2002. Ticks associated with armadillo (*Euphractus sexcinctus*) and anteater (*Myrmecophaga tridactyla*) of Emas National Park state of Goias, Brazil. *Ann. NY Acad. Sci.* 969, 290–293.
- Boissan, L., 1970. Gametogene se au cours du development pos embryonarire et biologie de la reproduction chez *Hysterochelifer meridianus* (L. Lock) Arachnidaes: Pseudoscorpion. Doctorat These. Faacultat de Sc. De Montpellier, France.

- Bonhag, P.F., 1968. Ovarian structure and vitellogenesis in insects. *Ann. Rev. Entomol.* 3, 137–160.
- Camargo-Mathias, M.I., 1993. Histoquímica e ultra-estrutura dos ovários de operárias e rainhas de formigas *Neoponera villosa* (Hymenoptera: Ponerinae), 156f. Dissertação (Doutorado em Zoologia), Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.
- Campos Pereira, M., Szabó, M.P.J., Bechara, G.H., Matushima, E.R., Duarte, J.M.B., Rechav, Y., Fielden, L.J., Keirans, J.E., 2000. Ticks (Acari: Ixodidae) associated with wild animals in the Pantanal region of Brazil. *J. Med. Entomol.* 37, 979–983.
- Chapman, F.R., 1998. *The Insects: Structure and Function*, 4th ed. Melbourne, 770 pp.
- Fletchthmann, C.H.W., 1990. Ácaros de importância médico-veterinária, Nobel, São Paulo.
- Furlong, J., Deresz, F., Matos, L.L., Balbi, M.V., 1996. The effect of cattle tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) infestation on milk yield and feed intake of Holstein X Zebu crossbreed cows. Congresso Panamericano de Ciências Veterinárias, vol. 15, Campo Grande, Anais., pp. 340.
- Guimarães, A.M., Lima, J.D., Ribeiro, M.F., Camargos, E.R., Bozzi, I.A., 1998. Ultrastructure of sporogony in *Babesia equi* in salivary glands of adult females *Boophilus microplus* ticks. *Parasitol. Res.* 84, 69–74.
- Hoogstraal, H., 1956. African Ixodoidea I. Ticks of the Sudan, Res. Rep. U.S. Naval Med. Res. Unit, Cairo.
- Junqueira, L.C.U., Junqueira, L.M.M.S., 1983. Técnicas básicas de citologia e histologia, USP, São Paulo.
- Lemos, E.R.S., Machado, R.D., Pires, F.D., Machado, S.L., Costa, L.M., Coura, J.R., 1997. *Rickettsiae*-Infected Ticks in an Endemic Area of Spotted Fever in the State of Minas Gerais, Brazil, Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.
- Lison, L., 1960. *Histochimie et Cytochimie Animales*, Gauthier-Villars, Éditeur, Paris.
- Pearse, A.G.E., 1985. *Histochemistry. Theoretical and Applied*, 4th ed. J&A Churchill, London.
- Ramamurthy, P.S., 1968. Origin and distribution of glycogen during vitellogenesis of the scorpion fly *Panorpa communis*. *J. Insect. Physiol.* 14, 1325–1330.
- Ranade, V., 1933. On the cytoplasmic inclusions in the oogenesis of *Periplaneta americana*. *Linn. Allahad. Univ. J. Ind. Sci.* 9, 85–121.
- Robinson, L.E., Davidson, J., 1913. The anatomy of *Argas persicus* (Oken, 1818). Part 1. *Parasitology* 6, 20–48.
- Said El, A., 1992. A contribution to the anatomy and histology of the female reproductive system of *Amblyomma cajennense* (Acarina: Ixodidae). *J. Egyptian Soc. Parasitol.* 22, 391–400.
- Sonenshine, D.E., 1991. *Biology of the ticks*, Oxford University Press, New York, p. 280–304.
- Till, W.M., 1961. A contribution to the anatomy and histology of the brown ear tick *Rhipicephalus appendiculatus* Neumann. *Mem. Entomol. Soc. Southern Africa* 6, 1–124.
- Wigglesworth, V.B., 1971. Bound lipid in the tissues of mammal and insect: a new histochemical method. *J. Cell Sci.* 8, 709–725.

Capítulo 2

New morphological data on fat bodies of partially engorged females of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae)

Sandra Eloisi Denardi¹, Gervásio Henrique Bechara², Maria Izabel Camargo-Mathias^{1, *}

¹ Departamento de Biologia – I.B. – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Av. 24A, nº 1515 – Cx. Postal 199, CEP: 13506-900 – Rio Claro - SP- Brasil

² Departamento de Patologia Veterinária – FCAV – UNESP, Via de Acesso Prof. Paulo Castellane, s/n - CEP: 14884-900 - Jaboticabal – SP – Brasil

* corresponding author: Tel: +55 19 3526 4135

E-mail: micm@rc.unesp.br

Resumo

O estudo ultramorfológico, histológico e ultra-estrutural do corpo gorduroso de fêmeas semi-ingurgitadas de *Amblyomma cajennense* revelou que este tecido é difuso e consiste de cordões celulares que envolvem os troncos traqueais. O estudo morfométrico mostrou que as áreas celulares e nucleares dos trofócitos arredondados são superiores quando comparadas as dos trofócitos cúbicos, mostrando que os trofócitos arredondados, apoiados nos cordões celulares, possuem maior área de contato com a hemolinfa. Nas fêmeas desta espécie o corpo gorduroso é encontrado logo abaixo do integumento e também ao redor dos órgãos e é composto por dois tipos de células que embora tenham forma e localização diferentes dentro do tecido, possuem a mesma histologia e aqui foram denominadas de trofócitos cúbicos quando dispostos sob a forma de cordões celulares, ocorrendo em maior número e trofócitos arredondados, quando apoiados nestes cordões, ocorrendo em menor número. A histologia demonstrou que ambos os tipos de trofócitos tem um núcleo e, além disso, exibem numerosos vacúolos de diferentes tamanhos e conteúdos. Ultraestruturalmente, as organelas encontradas com maior frequência foram o retículo endoplasmático rugoso dos tipos vesicular e lamelar e mitocôndrias com cristas tubulares, indicando que as mesmas estariam envolvidas com a síntese de lipídio. Não foi observado retículo endoplasmático liso. Os trofócitos cúbicos, dispostos em cordões, apesar de intimamente associados entre si não possuem membranas plasmáticas fundidas e sim, observa-se eventualmente a fusão das lâminas basais de duas células contíguas, a qual atuaria como barreira de permeabilidade seletiva. O presente trabalho vem também propor nova terminologia

para o corpo gorduroso de carrapatos, segundo sua localização: parietal, quando localizado logo abaixo do integumento e não periférico; e perivisceral quando localizado ao redor dos órgãos e não central como proposto por Obenchain e Oliver (1971), bem como para as células que o compõem, ou seja, trofócitos cúbicos quando dispostos sob a forma de cordões celulares e trofócitos arredondados quando apoiados nestes cordões, além de demonstrar que não foram observados nefrócitos em fêmeas semi-ingurgitadas de *A. cajennense*.

Palavras-chave: *Amblyomma cajennense*, corpo gorduroso, carrapatos, trofócitos cúbicos e arredondados.

New morphological data on fat bodies of semi-engorged females of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae)

Sandra Eloisi Denardi^{a,1}, Gervásio Henrique Bechara^b, Maria Izabel Camargo Mathias^{a,*}

^a Departamento de Biologia, I.B., UNESP, Av. 24 A, no. 1515, Cx. Postal 199, CEP 13506-900, Rio Claro, SP, Brazil

^b Departamento de Patologia Veterinária, FCAV-UNESP, Via de Acesso Prof. Paulo Castellane s/n, CEP 14884-900, Jaboticabal, SP, Brazil

Received 31 October 2007; received in revised form 5 December 2007; accepted 6 December 2007

Abstract

The present ultramorphological, histological and ultrastructural study on the fat body of semi-engorged females of *Amblyomma cajennense* revealed that this tissue is diffuse and consists of strands of cells surrounding the tracheal trunks. Morphometric analysis showed that the cellular and nuclear areas of round-shaped trophocytes are larger than those of cuboidal trophocytes, indicating that the arrangement of the former provides more contact area with the haemolymph. In this species, the fat body is found right underneath the integument and around organs. It consists of two cell types that despite distinct morphological characteristics and locations in the tissue, present the same histological features. In this study, these cells were termed cuboidal trophocytes when arranged as strands of cells and present in larger numbers, and round-shaped trophocytes when lying on these strands and observed in fewer numbers. Histological observations revealed that both types of trophocytes have one nucleus in their cytoplasm and also exhibit numerous vacuoles of different sizes and contents. Ultrastructural examination revealed that the organelles more frequently observed were the vesicular and lamellar rough endoplasmic reticulum, and mitochondria with tubular crests, indicating that they might be involved in lipid synthesis. Smooth endoplasmic reticulum was not observed. Cuboidal trophocytes arranged in strands, despite being closely associated, do not exhibit fused plasma membranes. Rather, the fusion of basal lamina of two neighboring cells is occasionally observed, acting as a selective permeability barrier. Here, a new terminology for tick fat body is proposed. It is based on fat body location (parietal, when located right underneath the integument instead of peripheral; and perivisceral, when located around organs instead of central) terminologies previously suggest by Obenchain and Oliver and for the cells constituting them, cuboidal trophocytes when arranged as strands, and round-shaped trophocytes when lying on these strands. Nephrocytes were not observed in semi-engorged females of *A. cajennense*.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: *Amblyomma cajennense*; Fat body; Ticks; Cuboidal and round-shaped trophocyte; Ixodidae

1. Introduction

Ticks have been widely acknowledged as of economic and sanitary importance, given the numerous species that have been described causing severe damages to their hosts, such as cattle, horses, and dogs. Among these species, the Cayenne tick *Amblyomma cajennense* is of particular relevance. According to Arthur (1960) and Furlong et al. (1996), the great damage caused by ticks is due to their haematophagus habits, especially

females, resulting in production losses for several elements, and thus reflecting in economic shortfalls.

Studies on the internal morphology of ticks are scarce and limited to some species. Species commonly found in Brazil, such as the Cayenne tick *A. cajennense*, still remain relatively little studied (Denardi et al., 2004, 2006; Saito et al., 2005; Nunes et al., 2005, 2006a,b; Oliveira et al., 2005a,b, 2006, 2007a,b; Ricardo et al., 2007).

The fat body in ticks is the organ that stores food reserves, metabolizes hormones and other essential messenger molecules, and detoxifies wastes or harmful compounds. It plays a vital role in reproduction, synthesizing and secreting vitellogenin during the reproductive phase of the animal's life (Sonenshine, 1991).

During the reproduction of most arthropods, the participation of the fat body has been reported as of extreme importance.

* Corresponding author. Tel.: +55 19 35264135.

E-mail address: micm@rc.unesp.br (M.I.C. Mathias).

¹ Tel.: +55 19 35264135.

In insects, the main cells constituting these tissues are trophocytes or adipocytes, of mesodermal origin; oenocytes, of ectodermal origin, as well as mycetocytes and urocytes. The terms nephrocytes in ticks cell that acts like intermediating in metabolism and protein manufacturing (Croosley, 1985) and trophocyte (adipocyte) are used for fat body in ticks and found in literature for the main fat body cells. The name adipocyte is improper since this cell is not a simple deposit of fat but have a much more complex metabolism and storage also protein and sugars (Kilby, 1963; Isac and Bownes, 1982). The oenocytes synthesizes hydrocarbon in earlier phases of the insect's development, delivered to the haemolymph and transported to the cells of the fat body (Young et al., 1999), the mycetocytes are cells which posses symbionts non-pathogenic microorganisms in the cytoplasm, the urocytes are cells specialized in urates accumulation (Paes de Oliveira and Cruz-Landim, 2003).

Fat body cells of ticks are especially abundant around large tracheal trunks in the so-called tracheal complex.

Trophocytes are cells that in addition to synthesizing lipids also store proteins and carbohydrates, mainly as glycogen. They also produce most of the proteins present in the haemolymph, including vitellogenin, a yolk protein precursor. Currently, the terms used to define these cells do not express their several roles, often compared to those of hepatocytes of vertebrates, which are very versatile cells that play endocrine and exocrine roles (Junqueira and Junqueira, 1983; Kilby, 1963).

In ticks in general, the fat body is classified in peripheral and central one, according to the regions in which they are located (Obenchain and Oliver, 1971).

In the tick *Dermacentor variabilis*, the fat body consists just of one basic cell type, the trophocyte. However, according to other authors, a distinct cell type, the nephrocyte, is often found attached to the fat body strands (Coons et al., 1990).

The trophocytes of ticks appear as cells, often clustered in two or three-cell thick chords. The nephrocytes when present typically appears oval or circular, and may be adjacent to trophocytes, attached at one edge (Sonenshine, 1991).

Unlike what was reported on insect studies, in ticks very few studies describe the fat body or its morphological and ultrastructural aspects. Thus, this study aimed at describing the fat body tissue of female ticks of *A. cajennense*, including the cell types that constitute them by using histological techniques, scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM). Also, it proposes a new terminology to designate this tissue based on the different locations where it is found in ticks.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Twenty semi-engorged females of the tick *A. cajennense* were obtained from colonies maintained under controlled conditions (28 °C, 80% humidity, and 12-h photoperiod) at the Veterinary Pathology Department of the FCAV–UNESP, Jaboticabal campus, SP, Brazil.

2.2. Methods

2.2.1. Morphology

Ticks were dissected in saline solution (NaCl 7.5 g/L, Na₂HPO₄ 2.38 g/L and KH₂PO₂ 2.72 g/L) and the fat body was removed.

2.2.2. Scanning Electron Microscopy (SEM)

For the SEM techniques, the fat body was fixed in Karnovsky solution, for 24 h and dehydrated in a graded 70–100% acetone series. The material was processed by critical point drying, sputtered with gold, and examined with a PHILLIPS 505 SEM.

3. Histology

For the histological techniques, the fat body was removed and fixed in 4% paraformaldehyde. The material was dehydrated in ethanol, embedded in JB4 resin during 24 h at 4 °C, and then transferred to plastic molds previously filled with resin containing a catalyzer. After resin polymerization, the material was sectioned using a Leica RM 2145 microtome and stained with hematoxylin and eosin, according to routine histological procedures.

3.1. Morphometry

For the morphometric analysis glass, slides with sections of the fat body of 20 semi-engorged females of *A. cajennense* were used and the cellular and nuclear areas of both trophocytes types were measured using a LMDB LEICA microscope. We utilized 20 slides with median histological sections stained with HE, and observed 200 trophocytes (100 cuboidal and 100 round-shaped trophocytes), 10 cells per slide.

The data obtained was plotted using the software STATISTICA and an ANOVA Tukey test, significance level 0.05, was performed to analyze if there were significant differences between cell types.

3.2. Transmission Electron Microscopy (TEM)

The material was fixed in 3% glutaraldehyde, postfixed in 1% OsO₄, and embedded in Epon Araldite. Ultrathin sections were contrasted with uranyl acetate and lead citrate.

The material was then included in pure resin Epon and polymerized by maintaining in a stove for 72 h at 60 °C.

The material were then observed and photographed in a PHILLIPS MC 100 TEM.

4. Results

4.1. Scanning Electron Microscopy (SEM)

The results obtained with SEM techniques revealed that the fat body of females of *A. cajennense* is a diffuse tissue located right underneath the cuticle, which in this study was termed parietal fat body, and when located around organs and mainly

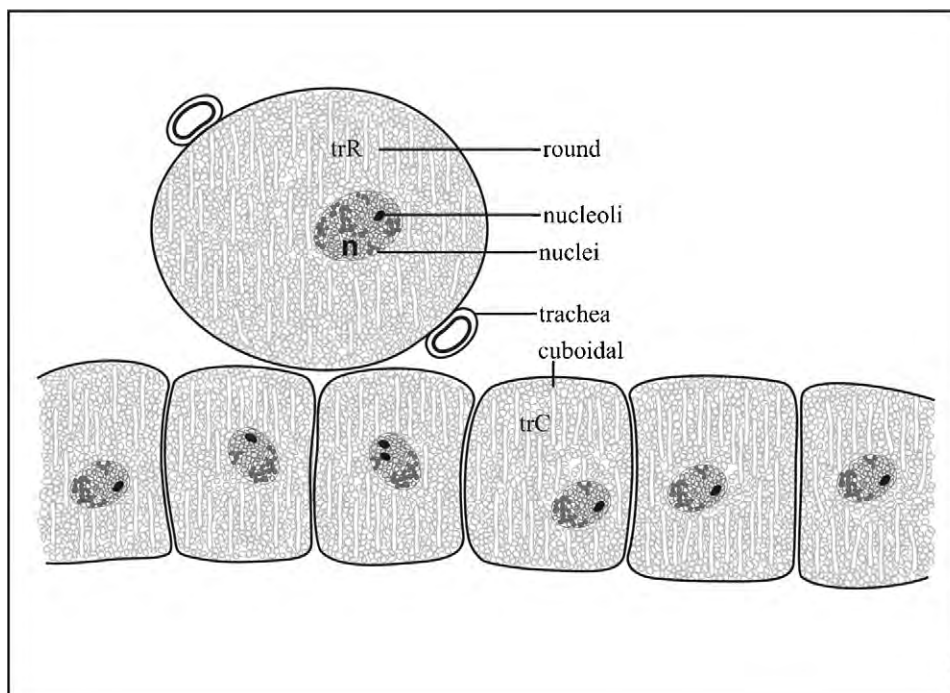


Fig. 1. Schematic representation of the fat body cells from semi-engorged females of the tick *Amblyomma cajennense*.

around tracheal trunks, referred here as perivisceral fat body. This tissue consists of strands of cuboidal cells, similar to a simple epithelium, as well as few round-shaped cells, which usually lie on these strands. In this study, these first cells were called cuboidal trophocytes (trC) and the second ones, as round-shaped trophocytes (trR), respectively (Figs. 1 and 2A–G).

Both types of trophocytes exhibit an irregular surface and are attached to one another by connective tissue (Fig. 2A, B, D, and F). Round-shaped trophocytes are found lying on strands of cuboidal trophocytes and are attached to them by projections (Fig. 2D, E, F, and G).

Cuboidal trophocytes are present in larger numbers and smaller in size than round-shaped ones.

4.2. Histology

Histological observations showed that fat body of females of *A. cajennense* possess trophocytes closely associated when membrane fusions were not observed between cuboidal trophocytes, or between cuboidal trophocytes and round-shaped ones, which lie on the strands (Fig. 3A–C).

In the cytoplasm of cuboidal trophocytes, numerous vacuoles of various sizes occupying most of the cell are present, exhibiting a lighter content than the cytoplasm. This suggests that the nature of the vacuole content is different from that of the remaining cytoplasm (Fig. 3B and C). The nuclei of these cells are round in shape and are often located in the central region of the cytoplasm with chromatin forming clumps (Fig. 3B). The nucleus of cuboidal trophocytes exhibits one or two nucleolus (Fig. 3B).

The cytoplasm of round-shaped trophocytes also presents vacuoles, however, these are larger than those of cuboidal trophocytes (Fig. 3D). Similarly to those observed in cuboidal cells, the nature of the content of these vacuoles is different from that of the cytoplasm. These cells exhibit only one round-shaped nucleus (Fig. 3B and C).

4.3. Morphometry

Morphometric analysis of fat body cells of *A. cajennense* revealed that the area of round-shaped trophocytes is larger than that of cuboidal ones. The data obtained show that cuboidal trophocytes present an average area between 74.77 and 206.85 μm^2 . For nuclei, the average varies between 32.8 and 79.54 μm^2 , clearly showing that round-shaped trophocytes are in fact larger than cuboidal ones, with average areas varying between 102.02 and 209.07 μm^2 , and their nuclei, 72.72 between 88.5 μm^2 (Tables 1 and 2).

4.4. Transmission Electron Microscopy (TEM)

Ultrastructural results obtained for the fat body of *A. cajennense* females corroborate those obtained using histological techniques, confirming that this tissue consists of only one cell type, the trophocytes, which exhibit heterogeneous cytoplasm, large numbers of several organelles, as well as granules of different contents. A large primarily round-shaped nucleus is observed, as well as one or two very electron-dense nucleoli. In cuboidal trophocytes, chromatin is more condensed, while in round-shaped trophocytes, it is uncondensed (Fig. 4A and B).

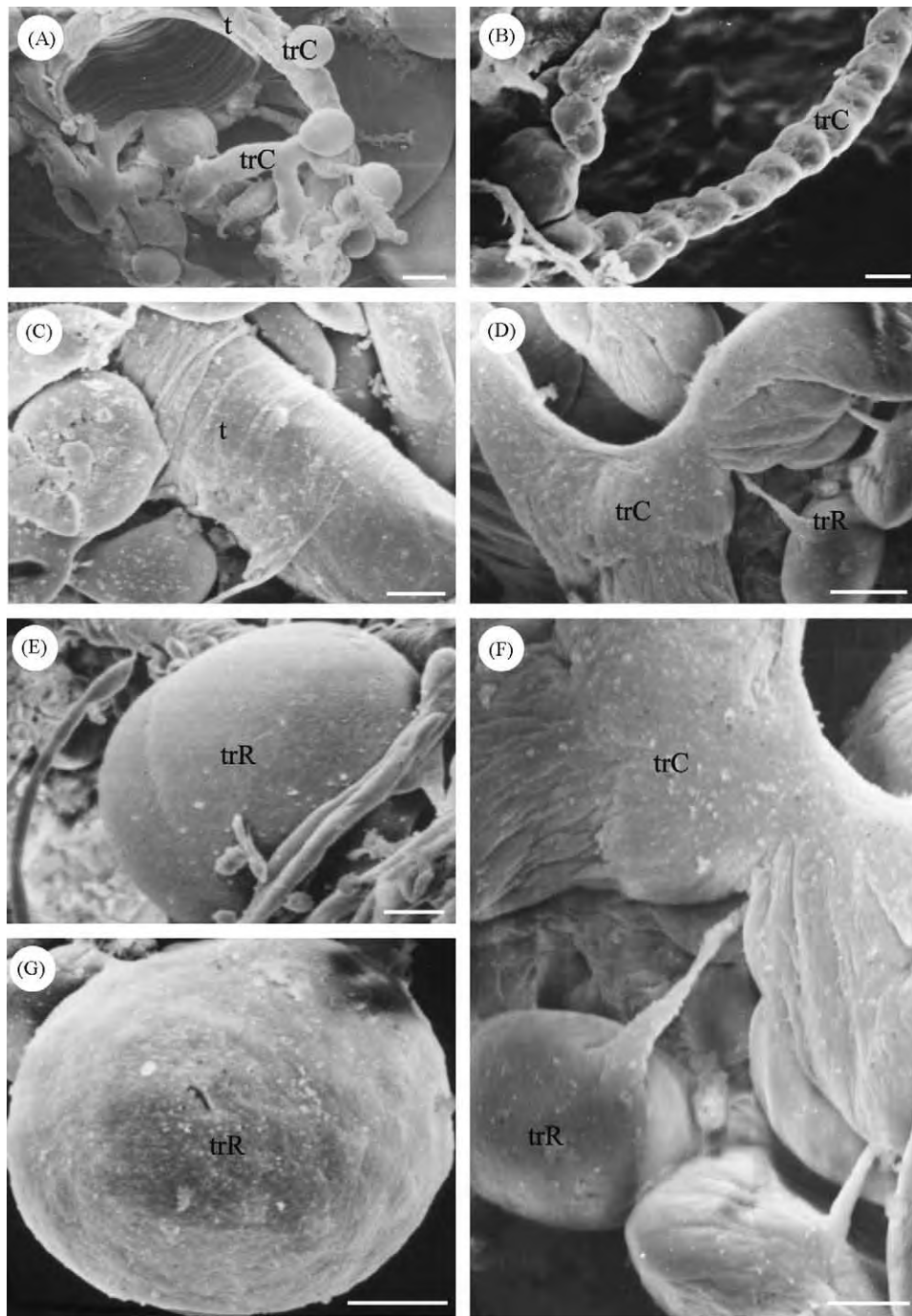


Fig. 2. (A–G) Scanning electron microscopy (SEM) of the fat body cells from semi-engorged females of the tick *Amblyomma cajennense* showing the cuboidal trophocyte (trC) and rounded trophocyte (trR); t = trachea. Bars A, C, D, and E = 2 μm ; bars B, F, and G = 10 μm .

Cuboidal trophocytes are structurally distinct from round ones due to the presence of more abundant rough endoplasmic reticulum, mainly the vesicular form, containing secretion (Fig. 4C, E, and F). Ribosomes attached to the membrane of the

reticulum, as well as large quantities of free polysomes, are observed in both cell types, characterizing the fine electron-dense granules present throughout the cytoplasm (Fig. 4C, D, and F).

Table 1
Average cellular area (μm^2) of cuboidal and round-shaped trophocytes of the fat body of *Amblyomma cajennense* females

Cellular area	Number of cells analyzed	Measurements between 70,000 and 100,00 μm^2	Measurements between 100,000 and 150,00 μm^2	Measurements between 150,000 and 200,00 μm^2	Measurements above 200,00 μm^2
Cuboidal trophocyte	100	16	56	18	10
Round-shaped trophocyte	100	0	42	32	26

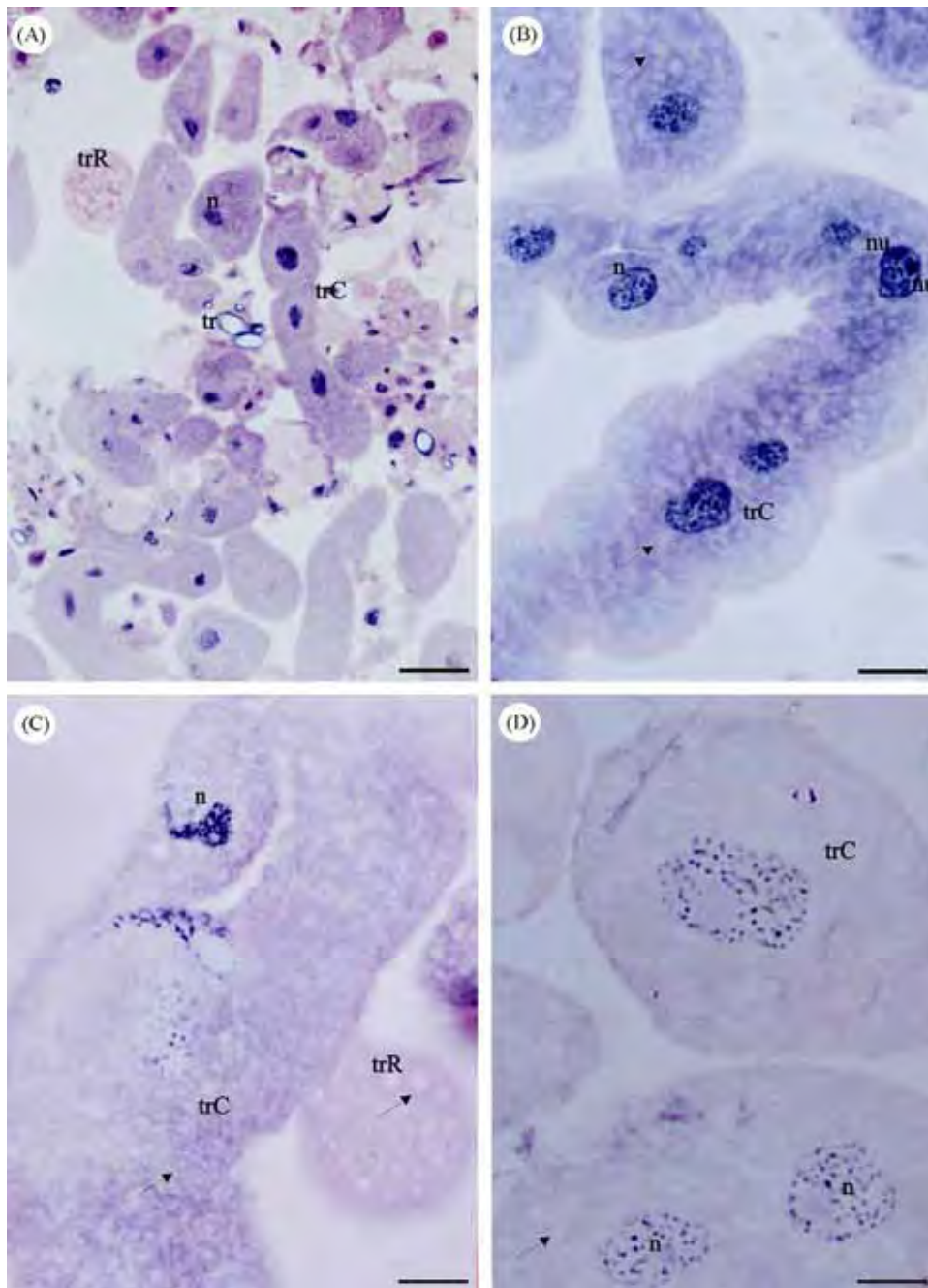


Fig. 3. (A–D) Histological sections of the fat body cells from semi-engorged females of the tick *Amblyomma cajennense* stained by hematoxylin and eosin; trC = cuboidal trophocyte; trR = rounded trophocyte; n = nuclei; arrow = vacuole; tr = tracheal trunks. Bars A, B, C, and D = 20 μm .

Another cytoplasmic organelle often observed are the mitochondria, which vary in shape and size, depending on their location in the cytoplasm. Some of them present a constriction in the central region and enlarged extremities resembling

halters (Fig. 4B). Others, however, exhibit shapes ranging from round to elongated (Fig. 4C and D). In general, mitochondrial crests exhibit two distinct shapes, sometimes resembling shelves, or tubules (Fig. 4C and D). Inside mitochondria,

Table 2

Average nuclear area (μm^2) of cuboidal and round-shaped trophocytes of fat body of *Amblyomma cajennense* females

Nuclear area cuboidal	Number of cells analyzed	Measurements between 30,000 and 50,00 μm^2	Measurements between 50,000 and 70,00 μm^2	Measurements between 70,000 and 80,00 μm^2	Measurements above 80,00 μm^2
Trophocyte	100	79	13	8	0
Round-shaped trophocyte	100	0	0	60	40

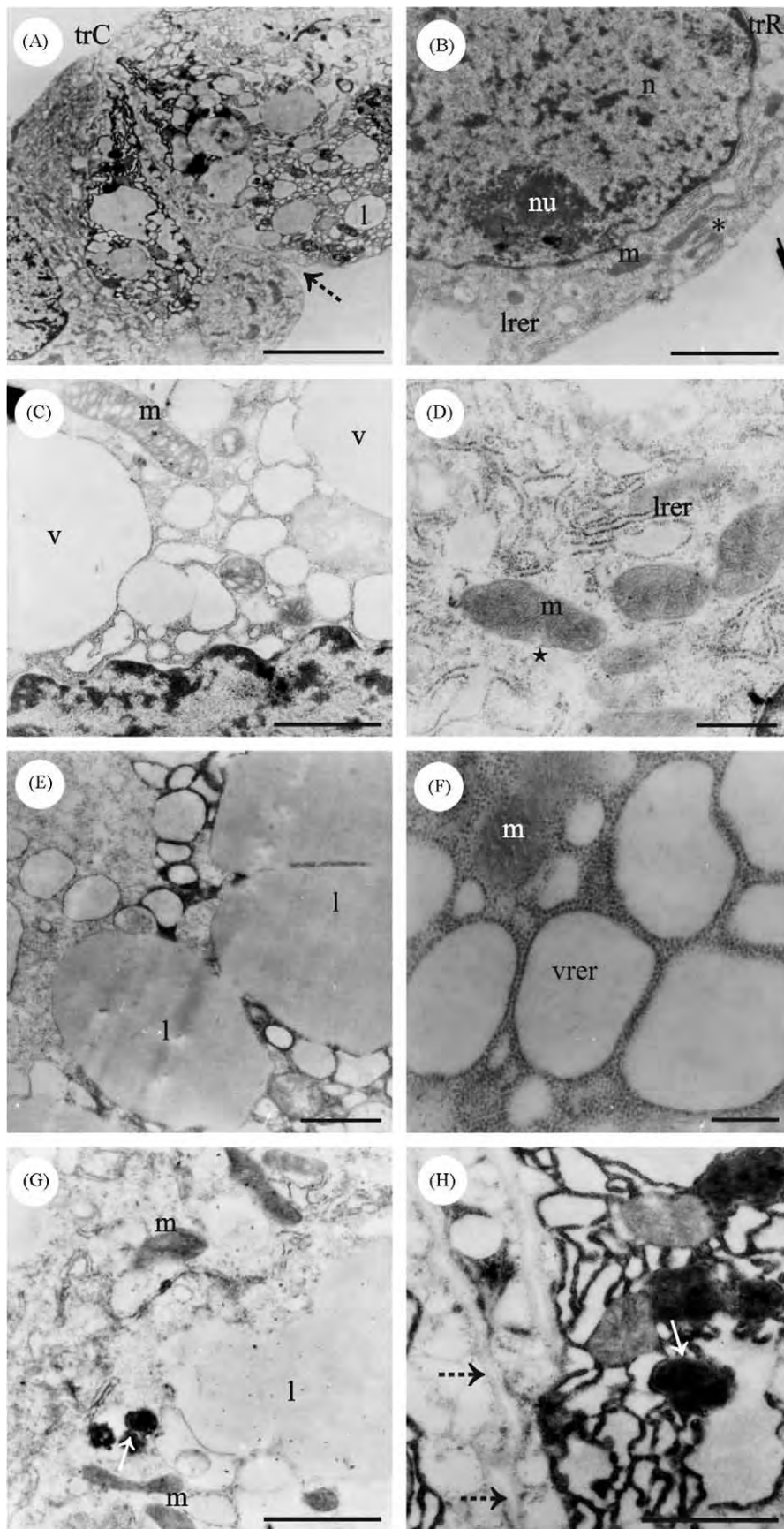


Fig. 4. (A–H) Transmission electron microscopy (TEM) of the fat body cells from semi-engorged females of the tick *Amblyomma cajennense* showing the cuboidal trophocyte (trC) and rounded trophocyte (trR); v = secretion vesicle; m = mitochondria; lrer = lamellar rough endoplasmic reticulum; l = lipid droplets;

electronlucent material, probably of lipidic nature, is observed (Fig. 4D).

In the central region of the cytoplasm of cuboidal trophocytes, some granules of various shapes, electron-densities and contents are observed (Fig. 4E and G).

Larger and more electronlucent spheres probably consist of lipids and result from the fusion of smaller ones (Fig. 4F and G). Smaller and very electrondense spheres are probably proteic in nature.

Although trophocytes are closely associated with one another, their ultrastructure revealed that the plasma membranes are not fused, only occasionally their basal laminae (Fig. 4A and H).

5. Discussion

The fat body of most arthropods is the organ that synthesizes and stores energy reserves, in addition to toxic residues harmful to the metabolism of the tick, to reproduction, specifically to the synthesis of vitellogenin.

Previous studies focusing on the fat body of ticks conducted by Obenchain and Oliver (1971) have shown that in adults, this tissue is located in the same regions in insects, being named peripheral and central fat body, when located near the body wall and around organs, respectively.

According to Gillot (1995) and Chapman (1998), in insects the fat body located right underneath the integument is referred as parietal fat body. When surrounding organs, such as ovaries and intestines, it is referred as perivisceral fat body. This is the terminology that we also propose for the fat body of ticks, since the terms peripheral and central do not represent the real location of this tissue in these animals.

In this study, were also observed the presence of two types of trophocytes in semi-engorged females of *A. cajennense*, which were designated cuboidal and round-shaped trophocytes, due to their morphohistological characteristics. Nephrocytes were not observed in *A. cajennense* ticks, as reported by other authors for other species (Tsvileneva, 1961; Crossley, 1972). Tsvileneva (1961, 1963) observed two cell types in ticks, distinguishable by the basophilia of their cytoplasm. Acidophilic cells are considered equivalent to trophocytes, while basophilic ones, to the nephrocytes of insects. Also, according to Tsvileneva (1961, 1965) and Balashov (1963), the cells termed nephrocytes might be analogue to oenocytes of insects. In this study, it was clear that only trophocytes were present, which were classified in two types based on morphology and arrangement.

The morphometric data obtained for the cells of the fat body of *A. cajennense* indicate that cuboidal trophocytes exhibit a cytoplasmic area significantly smaller than that of round-shaped ones. A possible explanation is that cuboidal trophocytes might be subjected to the pressure of adjacent cells, as a result of the strand arrangement. On the other hand, round-shaped trophocytes, which are isolated and lie on the

strands of cuboidal trophocytes, are probably not subjected to this type of pressure and consequently may have a larger contact area with the haemolymph, making greater material changing areas in both ways possible (cell/haemolymph/cell).

In the case of *A. cajennense*, the large quantities of cytoplasmic vacuoles resulted in a hypertrophy of cuboidal and round-shaped trophocytes. Consequently, cuboidal cells compressed neighboring ones, altering their morphology. Since semi-engorged female ticks are also in an active reproductive period, the material observed in these cells might be produced for storage and later used in the process of vitellogenesis, during oocyte development.

The fat body has been extensively studied in insects in general and the deformation of cells as well as their nuclei has been described. Due to the large quantities of vacuoles stored in the cytoplasm, the shape of these cells might undergo changes, becoming star-shaped, half-moon-shaped, elongated or even filamentous (Cruz-Goiten, 1989; Gillot, 1995). In semi-engorged females of *A. cajennense*, however, we did not observe irregular-shaped nuclei, as cuboidal and round-shaped trophocytes exhibited one nucleus located in the central area.

The ultrastructural data revealed that the vesicular rough endoplasmic reticulum was observed in both cell types in larger quantities than lamellar rough endoplasmic reticulum. According to Han and Bordereau (1982), the presence of these two forms of rough endoplasmic reticulum in the same cells might indicate distinct functions, in which the vesicular form would be more active and the lamellar one, the less active one. However, it is known that ribosomes only attach to endoplasmic reticulum membranes when the latter is active during the process of protein synthesis.

These results suggests that the fat body cells of *A. cajennense* females might actively synthesize proteins that would be stored inside these cells and/or released directly in the haemolymph. These data contradict those obtained by Coons and Alberti (1999) that reported that proteins were not stored in cytoplasmic granules of trophocytes of other tick species.

In addition to proteins, the ultrastructural analysis revealed the presence of lipids in the cytoplasm of both types of trophocytes and the absence of smooth endoplasmic reticulum. On the other hand, mitochondria with tubular crests were observed, indicating that these cells might be actively involved in lipid synthesis, as already reported in salivary gland cells of this same tick species by Denardi et al. (2006).

According to Camargo-Mathias (1993), mitochondria are one of the sources for lipids in the oocytes of the ant *Neoponera villosa*, confirming earlier observations (Bonhag, 1958). Ranade (1933) suggested that mitochondria may be transformed into lipid yolk bodies and that the lipid material may come from the destruction of the mitochondrial crests.

Regarding the arrangement of trophocytes, despite being closely associated, their ultrastructure revealed that there is no fusion of plasma membranes, only occasional fusion of basal

laminae of neighboring cuboidal trophocytes in some cell/cell contact areas. These fused laminae might act as a selective permeability barrier, controlling the transport of material in both directions (intra and extracellular). The plasma membranes and cytoplasm of these cells, however, remained individualized.

In the regions where fusion of basal laminae was not observed, the transport of material from the haemolymph into these cells may be facilitated compared to regions where basal laminae are fused.

Thus, the results obtained in this study revealed that semi-engorged females of the tick *A. cajennense* exhibit two types of trophocytes here, termed cuboidal and round-shaped, located near the intestines and ovaries, as well as the integument; from which we propose the terms parietal and perivisceral that better represent their location in this tissue inside the tick's body. This indicates that these cells in fact participate in the process of vitellogenesis, providing lipids and proteins for the oocyte. Nephrocytes associated to the fat body were not observed in this species.

Acknowledgments

This research has been supported by CAPES and FAPESP (grant no. 02/10149-7). The authors thank Antonio Teruyoshi Yabuki, Monika Iamonte, and Cristiane Marcia Mileo for their technical support. Part of this work has been facilitated through the International Consortium of Ticks and Tick-borne Diseases (ICTTD-2) supported by the INCO-DEV Program of the European Union under contract number ICA4-CT-2000-300069.

References

- Arthur, D.R., 1960. Ticks: a Monograph of the Ixodoidea: on the Genera *Dermacentor*, *Anocentor*, *Cosmiomma*, *Boophilus* and *Margaporus*. Cambridge University Press, London.
- Balashov, Y.S., 1963. Anatomic-histological peculiarities of molting of *Hyalomma asiaticum* ticks (Acarina, Ixodoidea). *Zool. Zhurnal* 42, 345–358.
- Bonhag, P.F., 1958. Ovarian structure and vitellogenesis in insects. *Annu. Rev. Entomol.* 3, 137–160.
- Camargo-Mathias, M.I., 1993. Histoquímica e ultra-estrutura dos ovários de operárias e rainhas de formigas *Neoponera villosa* (Hymenoptera: Ponerinae). Dissertation, Universidade Estadual Paulista.
- Chapman, R.F., 1998. *The Insects: Structure and Function*. University Press, Cambridge.
- Coons, L.B., Alberti, G., 1999. The Acari ticks. In: Harrison, F.W., Foelix, R. (Eds.), *Microscopic Anatomy of Invertebrates. Chelicerate. Arthropoda*, v. 8B. Wiley-Liss, New York, pp. 267–514.
- Coons, L.B., Lamoreaux, W.J., Rosell-Davis, R., Starr-Apires, L., 1990. Fine structure of the fat body and nephrocytes in the stages of *Dermacentor variabilis*. *Exp. Appl. Acarology* 8, 125–142.
- Croosley, A.C., 1985. Nephrocytes and pericardial cells. In: Kerkut, G.A., Gilbert, L.I. (Eds.), *Comprehensive Insect Physiology Biochemistry and Pharmacology*. Pergamon Press, New York, pp. 487–515.
- Crossley, A.C., 1972. The ultrastructure and function of pericardial cells and other nephrocytes in an insect: *Calliphora erythrocephala*. *Tissue Cell* 4, 529–560.
- Cruz-Goiten, M.R.C., 1989. Estudos morfológicos e morfométricos do corpo gorduroso e oenócitos de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae) durante o desenvolvimento larval. Dissertation, Universidade Estadual Paulista.
- Denardi, S.E., Camargo-Mathias, M.I., Bechara, G.H., 2004. Morphological characterization of the ovary and vitellogenesis dynamics in the tick *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). *Vet. Parasitol.* 125, 379–395.
- Denardi, S.E., Camargo-Mathias, M.I., Bechara, G.H., 2006. *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae): salivary gland cells of partially engorged females ticks and the production of lipid by their mitochondria. *Exp. Parasitol.* 113, 30–35.
- Furlong, J., Deresz, F., Matos, L.L., Balbi, M.V., 1996. The effect of cattle tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) infestation on milk yield and feed intake of Holstein x Zebu crossbreed cows. In: *Anais do Congresso Panamericano de Ciências Veterinárias, Campo Grande*.
- Gillot, C., 1995. *Entomology*. Plenum Press, New York.
- Han, S.I., Bordereau, C., 1982. Origin and formation of the royal fat body of higher termite queens. *J. Morphol.* 173, 17–28.
- Isac, P.G., Bownes, M., 1982. Ovarian and fat-body vitellogenin synthesis in *Drosophila melanogaster*. *Eur. J. Biochem.* 123, 527–534.
- Junqueira, L.C.U., Junqueira, L.M.M.S., 1983. *Técnicas Básicas de Citologia e Histologia*. Guanabara Koogan, Santos.
- Kilby, B.H., 1963. The biochemistry of the insect fat body. *Arch. Insect Physiol.* 1, 111–174.
- Nunes, E.T., Bechara, G.H., Saito, K.C., Denardi, S.E., Oliveira, P.R., Camargo-Mathias, M.I., 2005. Morphological, histological, and ultrastructural characterization of degenerating salivary gland in females of the cattle-tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini 1887) (Acari: Ixodidae). *Micron* 36, 437–447.
- Nunes, E.T., Camargo-Mathias, M.I., Bechara, G.H., 2006a. Structural and cytochemical changes in the salivary glands of the *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini 1887) (Acari: Ixodidae) tick female during feeding. *Vet. Parasitol.* 140, 114–123.
- Nunes, E.T., Camargo-Mathias, M.I., Bechara, G.H., 2006b. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini 1887) (Acari: Ixodidae): Acid phosphatase and ATPase activity localization in salivary glands of females during the feeding period. *Exp. Parasitol.* 114, 109–117.
- Obenchain, F.D., Oliver Jr., J.H., 1971. A qualitative analysis of the form, function and interrelationships of fat body and associated tissues in adult ticks. *J. Exp. Biol.* 186, 217–236.
- Oliveira, P.R., Bechara, G.H., Denardi, S.E., Nunes, E.T., Camargo-Mathias, M.I., 2005a. Morphological characterization of the ovary and oocytes vitellogenesis in the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille 1806) (Acari: Ixodidae). *Exp. Parasitol.* 110, 146–156.
- Oliveira, P.R., Bechara, G.H., Denardi, S.E., Nunes, E.T., Szabó, M.P.J., Camargo-Mathias, M.I., 2005b. Comparison of the external morphology of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille 1806) (Acari: Ixodidae) ticks from Brazil and Argentina. *Vet. Parasitol.* 129, 139–147.
- Oliveira, P.R., Camargo-Mathias, M.I., Bechara, G.H., 2006. *Amblyomma triste* (Koch 1844) (Acari: Ixodidae): morphological description of the ovary and of the vitellogenesis. *Exp. Parasitol.* 113, 179–185.
- Oliveira, P.R., Camargo-Mathias, M.I., Bechara, G.H., 2007a. Vitellogenesis in the tick *Amblyomma triste* (Koch 1844) (Acari: Ixodidae). Role for pedicel cells. *Vet. Parasitol.* 143, 134–139.
- Oliveira, P.R., Bechara, G.H., Camargo-Mathias, M.I., 2007b. *Amblyomma triste* (Koch 1844) (Acari: Ixodidae) ovaries: an ultrastructural analysis. *Exp. Parasitol.* 116, 407–413.
- Paes de Oliveira, W.T., Cruz-Landim, C., 2003. Morphology and function of insect fat body cells: a review. *Biociências* 11, 195–205.
- Ranade, V., 1933. On the Cytoplasmic Inclusions in the Oogenesis of *Periplaneta americana* Linn, vol. 9. University Science Bulletin, Allahad, pp. 85–121.
- Ricardo, A.J., Oliveira, P.R., Bechara, G.H., Camargo-Mathias, M.I., 2007. Ultrastructural detection of protein, lipids and carbohydrates in oocytes of *Amblyomma triste* (Koch 1844) (Acari: Ixodidae) during the vitellogenesis process. *Tissue Cell* 39, 203–215.
- Saito, K.C., Bechara, G.H., Nunes, E.T., Oliveira, P.R., Denardi, S.E., Camargo-Mathias, M.I., 2005. Morphological, histological, and ultrastructural studies of the ovary of the cattle-tick *Boophilus microplus* (Canestrini 1887) (Acari: Ixodidae). *Vet. Parasitol.* 129, 299–311.
- Sonenshine, D.E., 1991. *Biology of Ticks*. Oxford University Press, New York.

- Tsvileneva, V.A., 1961. Comparative histology of the blood and connective tissue formed elements of haemolymph in ixodid ticks. *Arkh. Anat. Gistol. Embriol.* 40, 91–100.
- Tsvileneva, V.A., 1963. On the morphology of the connective tissue of ixodid ticks. *Dokl. Akad. Nauk Tadzhikskoi SSR* 24, 171–177.
- Tsvileneva, V.A., 1965. The nervous structure of the ixodid synganglion (Acarina: Ixodoidea). *Entomol. Rev.* 44, 135–142.
- Young, H.P., Bachmann, J.A.S., Sevala, V., Schal, C., 1999. Site of synthesis, tissue distribution, and lipophorin transport of hydrocarbons in *Blattella germanica* (L.) nymphs. *J. Insect Physiol.* 45, 305–315.

Capítulo 3

Fat body cells of *Amblyomma cajennense* partially engorged females (Acari: Ixodidae) and their role on vitellogenesis process.

Sandra Eloisi Denardi¹, Gervásio Henrique Bechara², Maria Izabel Camargo-Mathias¹, *

¹ Departamento de Biologia – I.B. – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Av. 24A, nº 1515 – Cx. Postal 199, CEP: 13506-900 – Rio Claro - SP- Brasil

² Departamento de Patologia Veterinária – FCAV – UNESP, Via de Acesso Prof. Paulo Castellane, s/n - CEP: 14884-900 - Jaboticabal – SP – Brasil

* corresponding author: Tel: +55 19 3526 4135

E-mail: micm@rc.unesp.br

Resumo

No processo de reprodução dos Arthropoda, a síntese e incorporação de lipídios, proteínas e carboidratos pelos ovócitos é denominada de vitelogênese. Esses elementos que irão compor o vitelo podem ser sintetizados endógenamente pelo próprio ovário e/ou exógenamente pelas células do corpo gorduroso do pedicelo e do intestino. Sendo assim, este trabalho analisou em nível citoquímico ultra-estrutural os dois tipos de trofócitos que constituem o corpo gorduroso de fêmeas de carrapatos *Amblyomma cajennense*, mostrando neles a presença de lipídios, proteínas e carboidratos. Lipídios foram detectados em maiores quantidades que as proteínas e carboidratos, os quais são pouco produzidos pelas células do corpo gorduroso, sugerindo que o papel do corpo gorduroso em carrapatos esteja relacionado ao estoque de lipídios e carboidratos afim de converter em energia ou ainda serem usados na estrutura celular. A técnica de eletroforese aplicada no corpo gorduroso mostrou marcação de massa molecular protéica correspondente a 98 kDa. Entretanto, proteínas vitelogênicas de espécies carrapatos em geral, possuem massa entre 300 e 600 kDa, sugerindo que em carrapatos *A. cajennense*, o corpo gorduroso não é o órgão responsável pela síntese de proteínas do vitelo, papel este, provavelmente, desempenhado pelas células do pedicelo.

Palavras-chave: *Amblyomma cajennense*, corpo gorduroso, ovário, carrapatos.

**Title: Fat body cells of *Amblyomma cajennense* partially engorged females
(Acari: Ixodidae) and their role on vitellogenesis process.**

Authors: Sandra Eloisi Denardi¹, Gervásio Henrique Bechara² & *Maria Izabel Camargo Mathias³.

Address: 1. 3. Departamento de Biologia – I.B. – UNESP, Av. 24 A, nº 1515 – Phone: 55 19 35264135 – Cx. Postal 199 – CEP: 13506-900 – Rio Claro – SP – Brazil.

2. Departamento de Patologia Veterinária – FCAV – UNESP, Via de Acesso Prof. Paulo Castellane, s/n - CEP: 14884-900 - Jaboticabal – SP – Brazil.

* Correspondence and reprints

Tel.: (55) 3526 4151; fax: (55) 3526 4136

e-mail: micm@rc.unesp.br

Abstract

During the process of Arthropoda reproduction, the synthesis and uptake of proteins, carbohydrates, and lipids by oocytes is termed vitellogenesis. These compounds that will make up the yolk may be in ticks endogenously synthesized by the oocytes and/or exogenously produced by the fat body and pedicel cells. This study examined the fat body of *Amblyomma cajennense* ticks at the cytochemical ultrastructural level to demonstrate the presence of lipids, proteins and carbohydrates in trophocytes. The lipids were detected in higher quantity than proteins and carbohydrates in the fat body cells, suggesting that the role of the fat body in tick is stored lipids and carbohydrates to convert them in energy, or still they could be used with cell structural purpose. The electrophoresis technique applied at *A. cajennense* fat body demonstrated specifically the molecular mass of proteins: about 98 KDa. By the other hands, the fat body is not the organ responsible for the synthesis of the yolk protein, role probably performed by the pedicel cells.

Keywords: *Amblyomma cajennense*, fat body, ovary, tick, vitellogenesis

1. Introduction

Ticks have been widely acknowledged as of economic and sanitary importance, given the numerous species that have been described causing severe damages to their hosts, such as cattle, horses, and dogs. Among these species, the cayenne tick *Amblyomma cajennense* is of particular relevance. Few studies have examined the internal morphology of ticks and are generally limited to species found in Africa, Europe, and Australia. Species occurring in Brazil, such as the cayenne tick *A. cajennense*, still remain little studied regarding this aspect (DENARDI et al., 2004; 2006; SAITO et al., 2005; NUNES et al., 2005; 2006a; 2006b; OLIVEIRA et al., 2005a; 2005b; 2006; 2007a; 2007b; RICARDO et al., 2007).

Currently, the literature on the reproductive biology of ticks have been greatly increased by the work of a group of Brazilian researchers (DENARDI et al., 2004; 2006; 2008; SAITO et al., 2005; NUNES et al., 2005; 2006a; 2006b; OLIVEIRA et al., 2005a; 2005b; 2006; 2007a; 2007b; RICARDO et al., 2007). However, many other questions remain unanswered.

During the process of reproduction in Arthropoda, the synthesis and uptake of proteins, carbohydrates, and lipids by oocytes is termed vitellogenesis. These compounds that will later make up the yolk may be endogenously synthesized by oocytes and/or exogenously produced by cells of the intestine, fat body or pedicel to be then transported, sometimes via hemolymph into oocytes by endocytosis (RICARDO et al., 2007).

Vitellogenin is one of the proteins that make up the yolk of oocytes of Arthropoda, and is composed of glicophosphoproteins that after undergoing changes, such as glycosylation (addition of saccharides), sulfating (addition of a sulphate

group), and phosphorylation (addition of a phosphate group), is termed vitellin (WYATT, 1980; ENGELMANN, 1990).

Regarding the origin of vitellogenin in ticks as well as in insects, studies have pointed out to the fat body cells, which also play an important role in storing reserve materials as well as are involved in the intermediary metabolism (SONENSHINE, 1991). Recent studies have reported the participation of pedicel cells, structures that attach the oocytes to the ovary wall, providing proteins to oocytes of *A. triste* (RICARDO et al. 2007).

The fat body of ticks has been previously studied by Obenchain; Oliver (1971) in several species of ticks where it was termed peripheral and central fat body, based on its location: right underneath the integument (peripheral) or surrounding organs (central). However, Denardi et al. in 2008 examined the fat bodies of *A. cajennense* females and suggested another terminology to describe the location of this tissue: **parietal** fat body replacing the term peripheral and **perivisceral** replacing the term central, as these authors considered that these new terms would better describe the location of the fat body inside the animal's body. This terminology has been also adopted for insects, other animals of the group Arthropoda.

In this same study, only trophocytes were observed in the fat body of *A. cajennense* ticks, but in two types: cuboidal trophocytes (trC) when arranged as cell cords and in large numbers, and round-shaped trophocytes (trR) when cells lay on these cords and in small numbers (DENARDI et al., 2008).

Thus, this study aimed to analyze at a cytochemical and ultrastructural level, the two types of trophocytes present in the fat body of female ticks of *A. cajennense*, seeking to shed light to possibility of these cells to synthesize and store lipids,

proteins, and carbohydrates as well as to verify if they produce vitellogenin and if this protein originated from the fat body contributes to the development of oocytes. These data would be a contribution for a better understanding of the process of vitellogenesis in these animals and consequently clarify some aspects of their reproductive biology.

2. Materials and Methods

Twenty partially engorged females of *Amblyomma cajennense* were obtained from colonies maintained under controlled conditions (28°C, 80% humidity, and 12-hour photoperiod) at the Veterinary Pathology Department of the FCAV – UNESP, Jaboticabal campus, SP, Brazil.

2.1. Unsaturated Lipid Detection - (ARGERMÜLLER; DE FAHIMI, 1982, apud HADDAD et al., 1998).

After the tick dissection in physiological solution (7.5g NaCl + 2.38g Na₂HPO₄ + 2.72g KH₂PO₄ + 1000mL H₂O) the fat body was fixed in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.2), for 2 hours. The material was then washed once in the same buffer and in 0.1 M imidazole buffer (pH 7.5), for 15 minutes each. The material was post-fixed in 2% osmium tetroxide in 0.1 M imidazole buffer (pH 7.5), for 30 minutes in the dark. Afterwards, the material was washed once in buffer, followed by acetone dehydration and then include in Epon resin.

2.2. Basic Protein Detection (MAcRAE; MEETZ, 1970, apud HADDAD et al., 1998)

The fat body was fixed in 2.5% glutaraldehyde 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.2), for 2 hours, washed in distilled water, incubated in ammonium silver solution (10% silver nitrate added to a concentrated solution of ammonium hydroxide), for 5 minutes at room temperature. Next, the material was washed in distilled water and incubated in 3% formaldehyde for 5 minutes, in which the material acquired a brown staining. Afterwards, the material was washed in distilled water and incubated in 3% formaldehyde for 5 minutes, washed again in distilled water and post-fixed according to transmission electron microscopy (TEM) routine procedures.

2.3. Carbohydrate Detection (THIERY, 1967, apud HADDAD et al., 1998).

The material was prepared following the routine for TEM and the ultrathin sections were placed on gold meshes, letting the sections float on 1% periodic acid for 15 minutes. This treatment was followed by successive baths in acetic acid at concentrations: 10%, 5% and 2%, for 10 minutes each. After three 10-minute washes in distilled water, the meshes were transferred to a solution of 1% silver proteinate for 30 minutes in the dark at room temperature. Finally, the material was washed once in distilled water and observed through the transmission electron microscope PHILLIPS CM 100, without contrasting the material.

2.4. Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

After removed the *A. cajennense* fat body cells were transferred to an Eppendorf, macerated with distilled water and centrifuged under refrigeration with

an Eppendorf 5415C Centrifuge for 5 min at 11.000rpm. The total protein of this extract was determined according to the modified Bradford method (SEDMAK; GROOSBERG, 1977) and analyzed by 5-20% SDS-PAGE (15.5 cm x 1.5 x 1.5 mm) in Tris-HCl, pH: 6.8 (HAMES; RICKWOOD, 1981). After the electrophoretic run, proteins were visualized with Coomassie Blue staining and then photographed with a Cyber-shot DSC T 32 Sony Digital Camera.

3. Results

3.1. Unsaturated Lipids

The basal lamina of parietal and perivisceral trophocytes of *A. cajennense* females is negative for unsaturated lipids (Figs. 1J, K, L). However, in the cytoplasm of these trophocytes, lipids are present as electrondense granules of various sizes and shapes (Figs. 1A-T). Some smaller granules seem to be forming complexes with other elements (Figs. 1C, E).

Also, smaller lipid droplets are observed in the cytoplasm of these cells undergoing fusion and forming larger droplets that can be spherical as well as other shapes (Figs. 1E, F, T). Other droplets exhibit boundaries more electrondense than their interior, suggesting the formation of other complexes with compounds of other nature (Figs. 1J, K, M, N, O, S, T).

In the cytoplasm of parietal and perivisceral trophocytes, spherical mitochondria are present containing lipid materials (Figs. 1G, H, I). Other organelles frequently observed are Golgi complexes and cisternae of vesicular rough endoplasmic reticulum (Figs. 1G, H, I, N, O).

When two adjacent cuboidal trophocytes are observed, they are associated only by the fusion of their basal lamina, but not by their plasma membranes (Fig. 1J).

3.2. Basic Protein

The basal lamina of parietal and perivisceral trophocytes is negative for basic proteins (Figs. 2A, B). They are observed throughout the cytoplasm as strongly electron-dense and small granules with various shapes, smaller than lipid granules (Figs. 2A, B). However, in some areas, mainly in peripheral regions of cells, granules are more condensed and strongly electron-dense (Figs. 2A, B).

3.3. Carbohydrates

The cytochemical test used here revealed that in these cells carbohydrates are present as fine granules evenly distributed throughout the cytoplasm. In the central portion of cells, however, regions devoid of carbohydrates are observed (Fig. 2C).

3.4. Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

The electrophoretical protein quantification method carried out for fat body of *A. cajennense* tick detected the presence of 98 kDa weight protein (Fig. 3).

4. Discussion

Regarding the origin of the yolk granule in Arthropoda vitellogenesis, several studies have suggested that it might be produced and obtained by: a) transport of material produced by cells of the nurse chamber to the oocyte (in merostomatid

ovaries); b) transport of material produced by cells of the follicular epithelium to the oocyte (when present); c) synthesis of yolk by the oocyte (endogenous production); and d) sources other than the ovary, mainly the fat body. In ticks, however, the first two possibilities are excluded, since the ovaries are panoistic, devoid of nurse cells as well as the follicular ones (DENARDI et al. 2004).

Studies performed by Balashov (1983) on ticks have reported that the material from the hemolymph that is incorporated by the oocytes might originate in intestinal cells and, according to Sonenshine (1991), in fat body cells. However, more recent studies have demonstrated the participation of pedicel cells during the vitellogenesis of ticks in the synthesis and transport of substances to the interior of the oocyte, in addition to the endogenous production, that is performed by the oocyte itself (DENARDI et al. 2004; RICARDO et al., 2007).

Ramamurty in 1968, studying the vitellogenesis of insects and Denardi et al. (2004) studying ticks, showed that in both Arthropoda, yolk is composed basically of glycolipoproteins being the macromolecules deposited in the following sequence: first lipids, then proteins, and finally carbohydrates; all can be found as free form or chemically linked to other compounds, contradicting Balashov (1983), who had reported that the tick yolk would be composed probably of proteins and lipids. This was refuted first by Denardi et al (2004) and later by Oliveira et al. (2005) that demonstrated the presence of these three compounds in oocytes of *A. cajennense* and *Rhipicephalus sanguineus* respectively.

The present cytochemical and ultrastructural study showed the large presence of lipids in the fat body cells; mainly lipids in the mitochondria of parietal as well as perivisceral trophocytes, indicating that these organelles might be involved

in the production of this compound and/or might be using it as a source of energy as well in oxidative processes, as already reported for the salivary gland cells of this same species (DENARDI et al. 2006).

Ranade in 1933 observed that mitochondria became fat bodies of yolk and later Boissin (1970) suggested that lipids of oocytes of *Hysterochelifer meridianus* were the result from the breakdown of mitochondrial cristae. According to Caperucci; Camargo-Mathias (2006), mitochondria really might be one of the sources of lipids for oocytes of the ant *Neoponera villosa*, confirming observations by Bonhag (1958). In the present study, our findings demonstrated that mitochondria play an important role in the production of lipids of trophocytes of *A. cajennense*. Also, the smooth endoplasmic reticulum, the main organelle responsible for the synthesis of lipids in the cells, was not often observed.

Proteins were too detected in the fat body cells of *A. cajennense* ticks, but his mark in trophocytes was smaller than that observed for the lipids. They might actively be synthesized and stored when needed inside trophocytes and could have a structural role inside the cell, maintaining the metabolism or by other hand being exported and transported to the hemolymph to be later used in other sites.

Denardi et al. in 2004, examining the ultrastructure of the ovaries of *A. cajennense* ticks, demonstrated the presence of an entire apparatus for protein synthesis (rough endoplasmic reticulum, Golgi complex, and mitochondria) in oocytes already in early developmental stages (I e II), indicating that majority of its proteins would be continuously produced by these cells confirming the endogenous production of yolk protein.

Other studies, however, such as those performed by Coons et al. (1986a, b) that examined the fat body of ticks *Dermacentor variabilis*, suggested that during the period of feeding, a differentiation of another cell type containing all structures needed for the synthesis of export proteins may occur. This cell was termed “vitellogenic cell” and showed ultrastructural characteristics very similar of those of trophocytes of the fat body, but present in the intestine, not only in *D. variabilis* as well as in other ixodid ticks (AGBEDE; KEMP, 1987; COONS et al., 1982; 1986a, b; 1989a, b; TARNOWSKI; COONS, 1989).

In the present study, the results obtained by the structural and molecular technique of the fat body cells showed that this tissue: a) do not produce or b) produce small quantities of the protein, which will constitutes the yolk of *A. cajennense* oocytes. According our finding the protein present in the fat body cells has molecular mass of 98 kDa and the protein vitellogenin present in yolk of ticks in general weight about 300 to 600 kDa (SONENSHINE, 1991) suggesting that this role in ticks might be played by pedicel cells, as already demonstrated by Ricardo et al. (2007) in *A. triste*.

Another fact that clearly showed that the fat body does not provide proteins for the yolk of oocytes of *A. cajennense* is that in ticks females whose oocytes are in maturation process, this tissue is little developed, unlike.

According to the literature, polysaccharides are frequently found in the fat body cells of some Arthropoda, such as in insects (CRUZ-LANDIM, 1985; CONTE, 1994), and as observed in trophocytes of partially engorged *A. cajennense* females. However, the cytochemical test demonstrated that the concentration of this element occurs only in some regions of the cell, suggesting that the material soon after being

synthesized is released to the hemolymph and only small amounts remaining stored in the cell.

According to Ricardo et al. (2007), polysaccharides in oocytes of *A. triste* originate too in the pedicel cells that might produce carbohydrates and/or still act as a path for the uptake of this compound circulating in the hemolymph, which would then be transported to oocytes.

The results of the present study, however, are still not conclusive to demonstrate the participation of the fat body cells in providing polysaccharides that will make up the yolk of *A. cajennense* ticks.

Acknowledgments

We thanks CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) for financial support. Part of this work has been facilitated through the International Consortium on Ticks and Ticks and Tick-borne Diseases (ICTTD-3) Coordination Action financed by the INCO Program of the European Commission Project nº 510561.

References

Agbede, R.I.S., Kemp, D.H., 1987. Ultrastructure of secretory cells in the gut of the cattle-tick *Boophilus microplus*. International Journal for Parasitology 17, 1089-1098.

Balashov, Yu.S., 1983. An Atlas of Ixodid Tick Ultrastructure. In: Raikhel, A.S., Hoogstral, I.L. (Ed.), Entomological Society of America (Special Publication), Lanham.

Boissin, L., 1970. Gamétogenèse au cours du développement pos embryonnaire et biologie de la reproduction chez *Hysterochelifer meridianus* (L. Lock) Arachnidae: Pseudoscorpion, Doctorat These ès Facultat de Sc. De Montpellier, France, 1970.

Bonhag, P.F., 1958. Ovarian structure and vitellogenesis in insects. Annual Review of Entomology 3, 137-160.

Bradford, M.M., 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Analytical Biochemistry 72, 248-254.

Caperucci, D., Camargo-Mathias, M.I., 2006. Lipids in oocytes of ants *Neoponera villosa* (Hymenoptera: Ponerinae). Sociobiology 47, 531- 541.

Conte, H., 1994. Morfologia do corpo gorduroso em larvas de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera; Pyralidae) não parasitadas pelo *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae), Doctoral Thesis of UNESP, Rio Claro, Brasil.

Coons, L.B., Tarnowski, B., Ourth, D., 1982. *Rhipicepalus sanguineus*: Localization of vitellogenin synthesis by immunological methods and electron microscopy. *Experimental Parasitology* 59, 331-339.

Coons, L.B., Rosell-Davis, R., Tarnowski, B.I., 1986a. Blood meal ingestion in ticks. In: Sauer, J.R., Hair, A.J. (Ed.), *Morphology, Physiology and Behavioral Biology of Ticks*, Chichester, Ellis Horwood, pp. 248- 279.

Coons, L.B., Lamoreaux, W.J., Rosell-Davis, R., Starr-Spires, L., 1986b. Ultrastructure of fat body trophocytes in the life stages of *Dermacentor variabilis*. *Proc. EMSA* 44, 314-315.

Coons, L.B., Lamoreaux, W.J., Rosell-Davis, R., Tarnowski, B.I., 1989a. The onset of vitellogenin production and vitellogenesis and their relationship to changes in the midgut epithelium and oocytes in the tick *Dermacentor variabilis*. *Experimental and Applied Acarology* 6, 291-305.

Coons, L.B., Lamoreaux, W.J., Rosell-Davis, R., Starr-Spires, L., 1989b. Fine structure of fat body trophocytes and nephrocytes in the life stages of *Dermacentor variabilis*. *Experimental and Applied Acarology* 7, 125-142.

Cruz-Landim, C., 1985. Histological and Cytological Studies on the Fat Body of the Queen Honeybee Abdomen During the Active Oviposition Phase, *Revista Brasileira de Biologia* 45, 221-232.

Denardi, S.E, Bechara, G. H.; Oliveira, P. R.; Nunes, E. T.; Saito, K. C.; Camargo Mathias, M. I., 2004. Morphological characterization of the ovary and vitellogenesis dynamics in the tick *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology* 125, 379-395.

Denardi, S.E, Camargo-Mathias, M.I., Bechara, G.H., 2006. *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae): Salivary gland cells of partially engorged females ticks and the production of lipid by their mitochondria. *Experimental Parasitology* 113, 30-35.

Denardi, S.E., Bechara, G.H., Camargo-Mathias, M.I., 2008. New morphological data on fat bodies of semi-engorged females of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). *Micron* doi:10.1016/j.micron.2007.12.002.

Engelmann F., 1990. Hormonal control of arthropod reproduction. *Progress in Clinical and Biological Research*, 357-364.

Haddad, A., Sesso, A., Attias, M., Farina, M., Meirelles, M.N., Silveira, M., Benchimol, M., Soares, M.J., Barth, O.M., Machado, R.D., Souto-Pradrón, T., Souza, W., 1998. Técnicas Básicas de Microscopia Eletrônica Aplicada às Ciências Biológicas. Citoquímica. In: Souza, Wanderley (Org), São Paulo, pp. 66-73.

Hames, B.D., Rickwood, D., 1981. Gel electrophoresis of proteins: a practical approach. IRL Press, Oxford, pp. 1 – 81.

Nunes, E.T., Bechara, G.H., Saito, K.C., Denardi, S.E., Oliveira, P.R., Camargo-Mathias, M.I., 2005. Morphological, histological, and ultrastructural characterization of degenerating salivary gland in females of the cattle-tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). *Micron* 36,437-447.

Nunes, E.T., Camargo-Mathias, M.I., Bechara, G.H., 2006a. Structural and cytochemical changes in the salivary glands of the *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) tick female during feeding. *Veterinary Parasitology* 140, 114-123.

Nunes, E.T., Camargo-Mathias, M.I., Bechara, G.H., 2006b. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae): Acid phosphatase and ATPase activity localization in salivary glands of females during the feeding period, *Experimental Parasitology* 114, 109-117.

Obenchain, F.D., Oliver Jr., J.H., 1971. A qualitative analysis of the form, function and interrelationships of fat body and associated tissues in adult ticks. *Journal of Experimental Biology* 186, 217-236.

Oliveira, P.R., Bechara, G.H., Denardi, S.E., Nunes, E.T., Camargo-Mathias, M.I., 2005a. Morphological characterization of the ovary and oocytes vitellogenesis in the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). *Experimental Parasitology* 110, 146-156.

Oliveira, P.R., Bechara, G.H., Denardi, S.E., Nunes, E.T., Szabó, M.P.J., Camargo-Mathias, M.I., 2005b. Comparasion of the external morphology of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) ticks from Brazil and Argentina. *Veterinary Parasitology* 129, 139-147.

Oliveira, P.R., Camargo-Mathias, M.I., Bechara, G.H., 2006. *Amblyomma triste* (Koch, 1844) (Acari: Ixodidae): Morphological description of the ovary and of the vitellogenesis. *Experimental Parasitology* 113, 179-185.

Oliveira, P.R., Camargo-Mathias, M.I., Bechara, G.H., 2007a. Vitellogenesis in the tick *Amblyomma triste* (Koch, 1844) (Acari: Ixodidae). Role for pedicel cells. *Veterianry Parasitology* 143, 134-139.

Oliveira, P.R., Bechara, G.H., Camargo-Mathias, M.I., 2007b. *Amblyomma triste* (Koch, 1844) (Acari: Ixodidae) Ovaries: An ultrastrucutural analysis. *Experimental Parasitology* 116, 407-413.

Ramamurty, P.S., 1968. Origin and distribution of glycogen during vitellogenesis of the scorpion fly *Panorpa communis*. *Journal of Insect Physiology* 14, 1325-1330.

Ranade, V., 1933. On the cytoplasmic inclusions in the oogenesis of *Periplaneta Americana*. *Linn. Allahad. University Science Bulletin* 9, 85-121.

Ricardo, A.J., Oliveira, P.R., Bechara, G.H., Camargo-Mathias, M.I., 2007. Ultrastructural detection of protein, lipids and carbhohydrates in oocytes of

Amblyomma triste (Koch, 1844) (Acari: Ixodidae) during the vitellogenesis process. *Tissue and Cell* 39, 203-215.

Saito, K.C., Bechara, G. H., Nunes, E.T., Oliveira, P.R., Denardi, S.E., Camargo-Mathias, M.I., 2005. Morphological, histological, and ultrastructural studies of the ovary of the cattle-tick *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology* 129, 299-311.

Sedmak, J.J.; Grossberg, S.E., 1977. A rapid sensitive and versatile assay for protein using Coomassie Brilliant Blue G-250. *Analytical Biochemistry* 78, 544 - 552.

Sonenshine, D.E., 1991. *Biology of Ticks*. Oxford University Press, New York.

Tarnowsky, B.I., Coons, L.B., 1989. Ultrastructure of the midgut and blood meal digestion in the adult tick *Dermacentor variabilis*. *Experimental and Applied Acarology* 6, 263-289.

Wyatt, G.R., 1980. The fat body as a protein factory. In: Locke, M., Smith D.S., *Insect biology in the future*. Academic Press, New York, pp. 201-225.

LEGENDS

Figure 1 **A-T**: Transmission electron microscopy of *Amblyomma cajennense* fat body cells in partially engorged females submitted to the cytochemical ultrastructural test for lipids detection.

g: granules fusion; m: mitochondria; *: contact between two cubical trophocyte at the basal lamina level; gr: electrondense lipids granules; vrer: vesicular rough endoplasmic reticulum; cp: cell periphery; cG: Golgi complex; n: nucleus.

Bars A-T: 0.25 μm

Figure 2 **A-B**: Transmission electron microscopy of *Amblyomma cajennense* fat body cells in partially engorged females submitted to the cytochemical ultrastructural test for proteins detection.

gr: protein granules in the peripheral region of the cell (pr)

Bar A: 0.5 μm ; Bar B: 0.25 μm

Figure 2**C**: Transmission electron microscopy of *Amblyomma cajennense* fat body cells in partially engorged females submitted to the cytochemical ultrastructural test for carboydrates detection.

arrow: fine granulation citoplasmic distributed homogeneously

Bar C: 0.25 μm

Figure 3: Electrophoretic pattern of total proteins obtained for *Amblyomma cajennense* fat body (FB); and molecular weight standard (S) and SDS-PAGE (gradient 5 a 20%)

Figure 1

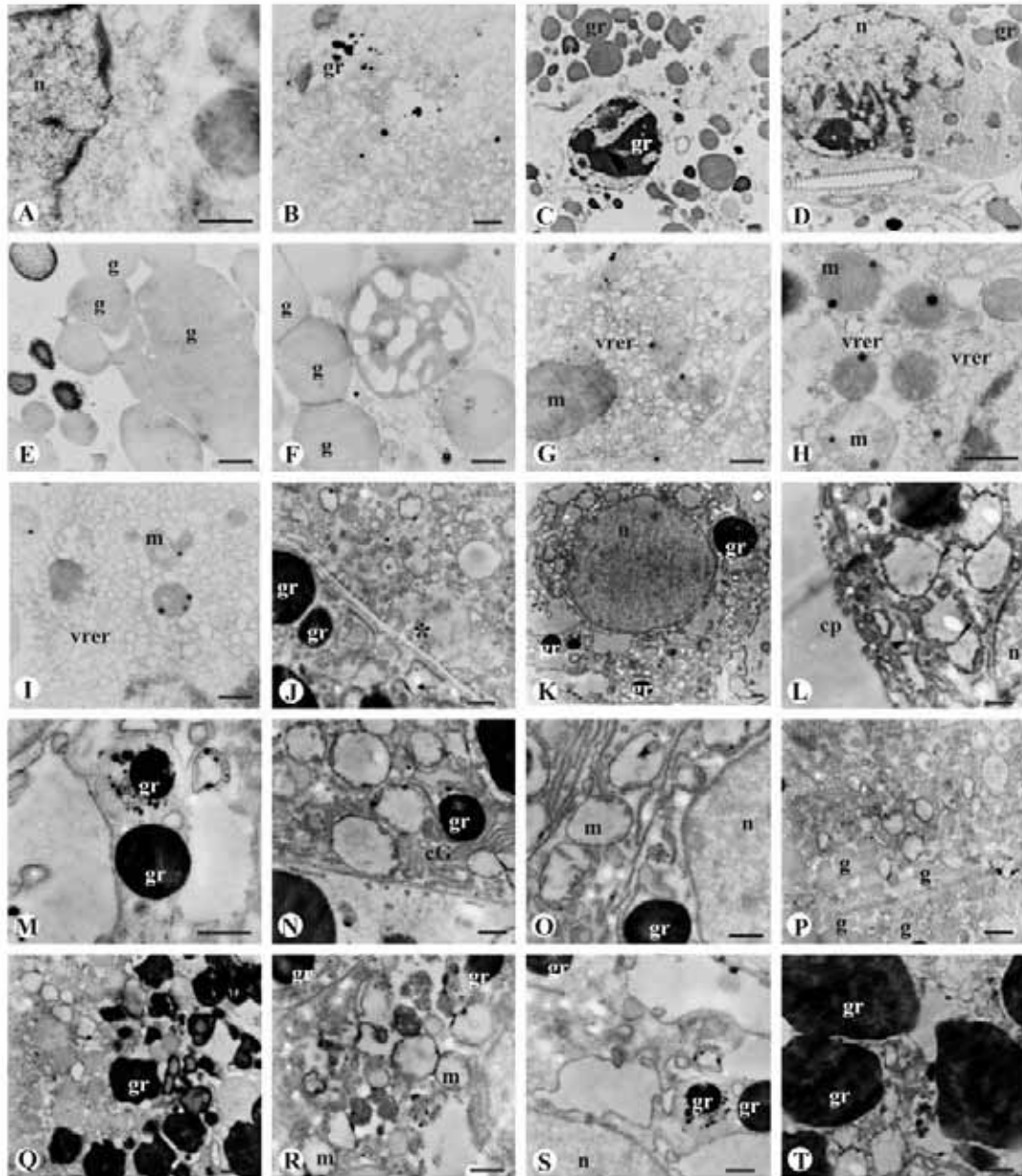


Figure 2

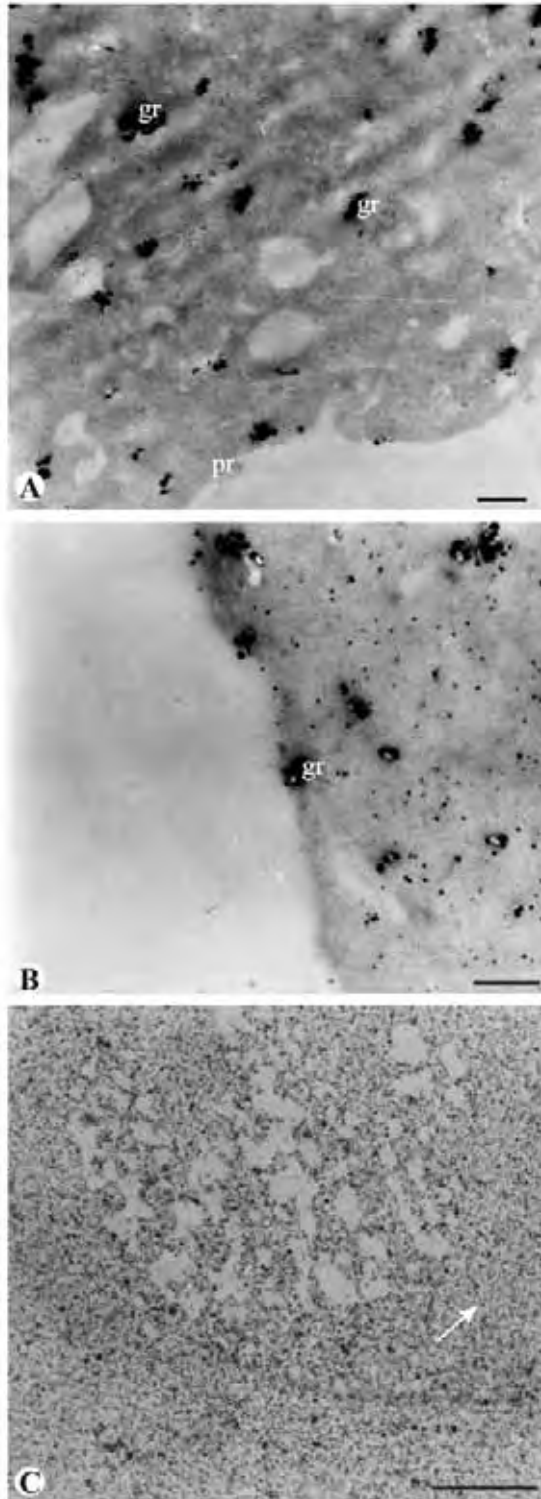
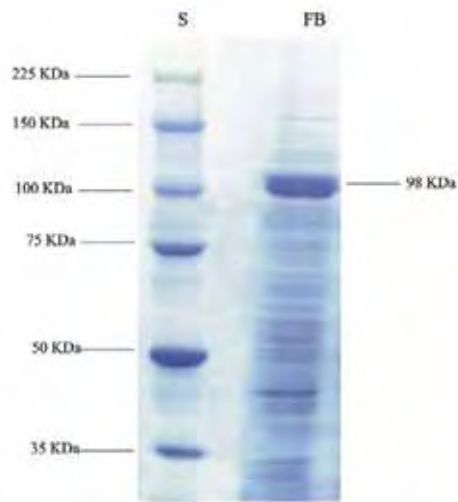


Figure 3



Discussão

5. DISCUSSÃO

Os estudos prévios que descreveram a morfologia do sistema reprodutor de carrapatos foram desenvolvidos por Sonenshine (1991) e mostraram-no como estrutura única e alongada que se enrolaria no interior da cavidade corpórea devido ao seu extenso comprimento.

Os dados que aqui são apresentados vêm pela primeira vez, no entanto, baseados nas informações obtidas por meio de estudos morfohistológicos em fêmeas de *Amblyomma cajennense*, classificar os ovários de carrapatos como sendo do tipo panoístico, o qual também ocorre em alguns insetos, segundo Chapman (1998), bem como nos diplópodos (FONTANETTI e STAURENGO DA CUNHA, 1993) e que é caracterizado principalmente pela presença única de células germinativas (as quais darão origem aos ovócitos), estando as células nutridoras, bem como ainda, no caso dos carrapatos, as células foliculares, totalmente ausentes.

Os ovários são freqüentemente compostos por unidades funcionais denominadas ovaríolos, os quais consistem de 3 regiões distintas: filamento terminal, germário e vitelário, sendo que alguns autores consideram ainda o pedicelo como a quarta região (CHAPMAN, 1998). Em insetos, os ovários são denominados de panoístico e meroístico e este último é subdividido ainda em politrófico e telotrófico. Além desta classificação, atualmente o tipo neopanoístico tem sido descrito na literatura como contendo ovócitos envolvidos pelas células foliculares e desprovidos de células nutridoras. Bilińsky (1993) postulou que os ovários neopanoísticos provavelmente teriam evoluído a partir dos meroísticos por uma perda secundária das

células nutridoras. Remanescentes da sua condição meroística poderiam ser vistos no germário dos neopanoísticos.

Os ovários panoísticos são descritos como possuindo células germinativas desenvolvendo-se, de modo que, cada folículo ovariano consista de um ovócito e uma camada de células foliculares (estas últimas ausentes nos carrapatos). Todos os tipos de RNAs acumulados no citoplasma do ovócito do ovário panoístico serão conseqüentemente sintetizados pela atividade transcricional nuclear (vesícula germinal) do próprio ovócito.

Os ovários meroísticos são caracterizados por possuírem as células germinativas diferenciando-se em ovócitos e em células nutridoras (BÜNNING, 1993).

O crescimento e desenvolvimento do folículo ovariano se dá no vitelário. Esse processo pode ser dividido em três fases: pré-vitelogênica: onde macromoléculas como rRNAs, mRNAs, proteínas e organelas são acumuladas no ovoplasma (BÜNNING, 1993, 1994; MATOVA e COOLEY, 2001); vitelogênica: quando o ovoplasma encontra-se repleto de esferas de vitelo, na forma de gotas de lipídio, grânulos de proteínas e de partículas de glicogênio e a última fase denominada de coriogênica: onde são formadas as membranas protetoras na superfície dos ovócitos (TWORZYDLO e BILIŃSKI, 2008).

O ovário de *A. cajennense* apresentou ovócitos em vários estágios de desenvolvimento, dispostos de forma que, os menos desenvolvidos encontraram-se localizados na região distal e os em estágio mais avançados na proximal. A presença destes ovócitos em diferentes estágios de maturação caracterizou uma assincronia no desenvolvimento dos mesmos, indicando que o processo de deposição do vitelo (vitelogênese) ocorreria em tempos diferentes nos diversos estágios, o que capacitaria os ovócitos para serem fecundados também em tempos diferentes. A assincronia observada no desenvolvimento dos ovócitos em *A. cajennense* provocou nestes, diferenças no seu tamanho.

No presente estudo, a partir de observações de secções histológicas sugeriu-se ainda uma seqüência de desenvolvimento, pela qual, passariam os ovócitos desta espécie de carrapatos, principalmente durante a vitelogênese, o que também permitiu classificá-los em cinco estágios:

- **Ovócito I:** caracterizado por ser o menor e onde a vesícula germinal e o citoplasma homogêneo foram observados;
- **Ovócito II:** caracterizado pelo espessamento da membrana plasmática e pela presença de fina granulação citoplasmática, além da vesícula germinal que ainda pôde ser observada;
- **Ovócito III:** caracterizado pela presença da membrana plasmática espessada e pelo início da deposição do cório. O citoplasma ainda apresentou fina granulação;
- **Ovócito IV:** caracterizou-se pela continuação do processo de deposição do cório e pela presença de grânulos de vitelo com diversos tamanhos, o que dificultou a observação da vesícula germinal;
- **Ovócito V:** caracterizado pela presença de grandes grânulos de vitelo, presença do exo e do endocório e onde a vesícula germinal também não pode mais ser observada.

Na porção proximal dos ovários de carrapatos existe uma região mais dilatada, a qual é denominada na literatura de “ampola” (SONENSHINE, 1991). Verificou-se que em *A. cajennense* essa região é histologicamente constituída por um epitélio simples e colunar, características de epitélio secretor, onde as células teriam especializações no seu domínio apical, sob a forma de microvilosidades e, portanto, secretando, bem como absorvendo substâncias que permitiriam a manutenção e a viabilidade dos espermatozóides, uma vez que nesta região, os mesmos ficariam armazenados desde a cópula até o momento da fecundação, necessitando de condições ideais (oxigenação, pH e nutrientes) neste microambiente.

Na espécie *A. cajennense*, assim como em outras de carrapatos, os ovócitos nos diferentes estágios de desenvolvimento encontraram-se presos à parede do ovário, por meio de um pedicelo constituído de várias células, preferencialmente com a forma cúbica. No entanto, as células do pedicelo que estariam em contato direto com o ovócito, apresentaram especialização de membrana sob a forma de invaginações que, neste ponto de contato se interdigitaram com aquelas da membrana do próprio ovócito. Isso poderia demonstrar que, essas células além de terem a função de prender o ovócito à parede do ovário, também estariam participando do fornecimento de elementos que contribuiriam para o crescimento do mesmo, uma vez que, nos ovários de carrapatos, tanto as células nutridoras quanto as foliculares estariam ausentes. Neste sentido, outros autores estudando a vitelogênese

de carrapatos demonstraram e confirmaram a participação das células do pedicelo, na síntese e transporte de substâncias para o interior do ovócito (TILL, 1961; OLIVEIRA et al., 2005; SAITO et al., 2005; RICARDO et al., 2007). Em *A. cajennense* a troca de material entre estas células (ovócito/ células do pedicelo), seria ainda facilitada, visto que, neste ponto de união, a lâmina basal dos dois tipos de células se interromperia, deixando o contato entre elas ainda mais íntimo.

Quando se enfocou o vitelo dos ovócitos de carrapatos *A. cajennense* este estudo mostrou que ele seria composto por lipídios, proteínas e carboidratos, corroborando dados obtidos por Ramamurty (1968) em insetos e, contrariando, no entanto, os de Balashov (1983) que em outras espécies de carrapatos verificou que este seria composto apenas por lipídios e proteínas.

Quanto a deposição dos elementos vitelogênicos, os resultados obtidos para os ovócitos de *A. cajennense* mostraram que os lipídios foram encontrados em grande quantidade já nos ovócitos I e II, onde se observou o citoplasma dos mesmos, fortemente positivos ao corante azul de nilo e, no nível ultra-estrutural repleto de mitocôndrias. A forte positividade ao corante veio então comprovar dessa maneira a presença destes elementos nestas células.

Segundo Camargo-Mathias (1993), que estudou a vitelogênese em formigas *Neoponera villosa*, o lipídio nos ovócitos desses insetos teria como fonte de origem as mitocôndrias. Alguns outros estudos anteriores abordando ainda a vitelogênese de insetos, também mostraram que as mitocôndrias deveriam ser um provável sítio de síntese (BONHAG, 1968; RANADE, 1933; WIGGLESWORTH, 1971). Ranade (1933) sugeriu que estas organelas se transformariam em corpos lipídicos do vitelo e Boissin (1970) estudando ovócitos de *Hysterochelifer meridianus*, concluiu ao observar nestes, numerosas mitocôndrias que, pelo menos em parte, o material lipídico seria oriundo da quebra e destruição de suas cristas. O lipídio do vitelo em *A. cajennense*, teria, portanto, confirmada uma origem endógena (a partir de mitocôndrias) e este processo de produção lipídica continuaria ocorrendo nos ovócitos em todos os estágios e não apenas naqueles em estágios iniciais de desenvolvimento.

Outros trabalhos abordando o sistema reprodutivo de carrapatos também se referiram a presença e a origem dos elementos vitelogênicos nos ovócitos, como por

exemplo, os realizados por Ricardo et al. (2007) em *A. triste*, que mostraram que o lipídio, além da produção endógena pelo próprio ovócito também poderia ser incorporado ao vitelo e, nesta última situação seria proveniente das células do pedicelo, como também observado no presente estudo em *A. cajennense*.

Outro tecido aqui analisado e que também tem por característica ser um local onde existe grande acúmulo de lipídios nos Arthropoda em geral, foi o corpo gorduroso, composto de células denominadas de trofócitos que em fêmeas de *A. cajennense* reagiram positivamente ao teste que detectou a presença deste elemento, por meio da aplicação de técnicas de citoquímica ultra-estrutural, as quais demonstraram a sua presença: a) próximos às mitocôndrias sob a forma de gotas lipídicas e/ou b) no interior delas, confirmando mais uma vez que estas organelas nestas células estariam envolvidas na sua produção e/ou produção e utilização como fonte de energia para seus próprios processos oxidativos. A presença de mitocôndrias envolvidas com a produção de lipídio já foi anteriormente relatada em carrapatos *A. cajennense* por Denardi et al. (2006) ao estudarem as diferentes células das glândulas salivares de fêmeas semi-ingurgitadas.

Sendo assim, além deste trabalho vir mais uma vez demonstrar a grande participação das mitocôndrias na produção do lipídio nos carrapatos, este agora encontrado nos trofócitos do corpo gorduroso de *A. cajennense*, demonstrou ainda a existência de pouca quantidade de retículo endoplasmático liso tanto nos trofócitos quanto nos ovócitos, importante organela responsável pela síntese de lipídios nas células de maneira geral. Desta forma, fica demonstrado que a obtenção dos lipídios necessários para a composição do vitelo nos carrapatos *A. cajennense* dar-se-ia principalmente pela produção endógena (via mitocôndrias do próprio ovócito) e se houvesse incorporação exógena, neste caso, os mesmos provavelmente seriam fornecidos pelas células do pedicelo, corroborando dados de Ricardo et al. (2007) para *A. triste* e, contrariando Coons et al. (1990) que descreveram a sua produção nas células do corpo gorduroso em *D. variabilis*. A existência de outros prováveis sítios de produção de lipídio que contribuiriam para o desenvolvimento dos ovócitos nos indivíduos desta espécie, não foi ainda investigada.

Quanto à presença e a origem das proteínas do vitelo nos ovócitos de carrapatos *A. cajennense*, o presente trabalho mostrou que a síntese e/ou

incorporação das mesmas, também já teria início nos ovócitos em estágios iniciais de desenvolvimento. Aqui ficou demonstrada a forte positividade dos ovócitos ao corante azul de bromofenol, o qual é específico para a detecção de proteínas. Além disso, a microscopia eletrônica de transmissão mostrou grande quantidade de retículo endoplasmático granular e a presença de Golgi responsáveis pela glicoproteína já no citoplasma de ovócitos I e II, confirmando aí a ocorrência de intensa síntese de proteínas. Ter-se-ia então, em ovócitos nos estágios I e II de *A. cajennense*, um processo de auto-síntese protéica, caracterizando neste primeiro momento a produção de proteínas provavelmente para uso estrutural, visto que, nos ovócitos neste estágio de desenvolvimento ainda não tinham sido observados grânulos de vitelo protéico no seu citoplasma. Os mesmos começariam a surgir em ovócitos no final do estágio II e início do III.

Exceto a produção pelo próprio ovócito, alguns locais extra-ovarianos têm sido apontados na literatura como sítios de origem das proteínas vitelogênicas nos Arthropoda.

No caso dos insetos, por exemplo, ter-se-ia as células do corpo gorduroso (trofócitos) como o principal centro produtor de proteínas que comporiam o vitelo, principalmente das proteínas denominadas vitelogeninas. No caso específico de carrapatos *A. cajennense*, os dados obtidos mostraram que as proteínas exógenas do vitelo do ovócito seriam oriundas principalmente das células do pedicelo, as quais desempenhariam desta forma papel semelhante àquele das células foliculares presentes principalmente nos ovários meroísticos. Estes dados aqui apresentados, no entanto, discordam daqueles obtidos por outros autores, em estudos anteriores com o corpo gorduroso de carrapatos de outras espécies, os quais demonstraram que as proteínas do vitelo viriam ou exclusivamente do corpo gorduroso em *Ornithodoros moubata* (CHINZEI e YANO, 1985) e/ou do intestino médio em *Dermacentor variabilis* (COONS et al., 1986a, b) e, ainda em algumas espécies teria sido sugerido que, por ocasião do final do período de alimentação das fêmeas, ocorreria concomitantemente a este processo, a diferenciação de um outro tipo de célula que possuiria as organelas necessárias para síntese de proteínas de exportação. Esta célula foi então denominada de “célula vitelogênica” e teria características ultra-estruturais muito semelhantes às dos trofócitos do corpo gorduroso, porém, estariam

localizadas no intestino (AGBEDE e KEMP, 1987; COONS et al., 1982; 1986a, b; 1989; TARNOWSKI e COONS, 1989). Este tipo de célula vitelogênica, não foi encontrado em machos da mesma espécie (COONS et al., 1982; 1986b) e em *A. cajennense* sua presença não foi investigada.

A vitelogenina, presente nos ovócitos dos Arthropoda é uma proteína de constituição glicolipofosfoprotéica que, ao passar por modificações como: glicosilação (adição de sacarídeos), sulfatação (adição de grupo sulfato) e fosforilação (adição de grupo fosfato) passa a ser chamada de vitelina (WYATT, 1980; ENGELMANN, 1990).

A síntese de vitelogenina já foi anteriormente estudada em algumas espécies de carrapatos incluindo *R. sanguineus* (ARAMAN, 1979; COONS et al., 1982), *O. moubata* (CHINZEI; YANO, 1985), *D. variabilis* (ROSELL e COONS, 1992), *H. dromedarii* (SCHRIEFER, 1991) e *O. parkeri* (TAYLOR et al., 1991).

No presente estudo, além dos dados morfohistológicos apresentados, foram aplicadas técnicas de dosagem de proteínas no corpo gorduroso de fêmeas de *A. cajennense* afim de se estabelecer o perfil protéico deste órgão e assim, poder inferir se o mesmo estaria envolvido com o fornecimento de proteínas que iriam compor o vitelo dos ovócitos desta espécie de carrapatos.

Os dados aqui apresentados, no entanto, demonstraram que as proteínas presentes no corpo gorduroso tem massa molecular de aproximadamente 98 kDa, valor este muito inferior àquele encontrado para as vitelogeninas de carrapatos, as quais tem massa molecular variando entre 300 a 600 kDa (CHINZEI et al., 1983; SULLIVAN et al., 1999; TAYLOR E CHINZEI, 2001).

No caso das fêmeas de *A. cajennense* a forte marcação no corpo gorduroso para proteínas com massa de 98 kDa, estaria mostrando que este tecido ou não participaria, ou participaria pouco no fornecimento de proteínas para os ovócitos, ficando portanto, a função de produção de proteínas do vitelo atribuídas às células do pedicelo, como também demonstrado por Ricardo et al. (2007) em *A. triste*.

Outro fato que deixou claro que o corpo gorduroso provavelmente não contribuiria com o fornecimento de proteínas para o vitelo de ovócitos de *A. cajennense* foi que este tecido, nas fêmeas semi-ingurgitadas e, portanto, em período de amadurecimento de seus ovócitos, estava pouco desenvolvido, ao contrário do que

acontece nos insetos e diplópodos, por exemplo, onde em fêmeas que estão em período de reprodução, a maior parte da cavidade do corpo, principalmente ao redor dos ovários, fica tomada por células do corpo gorduroso e estas por sua vez tem seu tamanho aumentado.

Quanto ao carboidrato, terceiro elemento encontrado na composição do vitelo de *A. cajennense*, estes foram pouco observados nos ovócitos pouco desenvolvidos (I, II e III), porém, quando presentes foram encontrados em maior concentração ao redor da vesícula germinal, sob a forma de fina granulação bem evidenciada pela microscopia eletrônica. Esse tipo de granulação foi freqüentemente descrita na literatura como “nuage” nos ovócitos dos insetos, tendo sido também observada em ovócitos de formigas *Neoponera villosa* (CAMARGO-MATHIAS, 1993).

Estudos com carrapatos *A. triste* realizados por Ricardo et al. (2007), abordando os carboidratos presentes nos ovócitos, demonstraram que estes teriam origem nas células do pedicelo que: a) ou poderiam estar produzindo-os e/ou b) poderiam estar servindo de receptor desse elemento que estaria circulante na hemolinfa e que, posteriormente seria transferido para o interior dos ovócitos, via membrana plasmática.

A literatura relata com freqüência que os carboidratos seriam também encontrados nas células do corpo gorduroso de alguns insetos (CRUZ-LANDIM, 1985; CONTE, 1994) o que foi também observado nas fêmeas de *A. cajennense* por meio da aplicação de teste citoquímico ultra-estrutural específico, muito embora, a concentração deste elemento e, portanto, a maior positividade tivesse ocorrido somente em algumas pequenas regiões dos trofócitos, sugerindo que os carboidratos, assim que sintetizados seriam na seqüência utilizados e, apenas poucas quantidades ficariam armazenadas na célula.

Os carboidratos têm sua origem muito discutida nos ovócitos de insetos. Anderson (1964) sugeriu que parte poderia ser derivada de um sítio extra-ovariano e que, poderiam formar complexos com as proteínas da hemolinfa antes destas serem incorporadas pelo ovócito. Por outro lado, Cone e Eschenberg (1966) consideraram também a possibilidade de que os carboidratos pudessem ser sintetizados dentro do próprio ovócito, formando um complexo com as proteínas incorporadas no seu córtex, sugerindo assim, um sítio ovariano.

Segundo Van Handel (1992) a incorporação do glicogênio teria início durante a coriogênese (deposição do cório) em ovários de mosquito *Culex quinquefasciatus*. No presente estudo ficou claro que a maior positividade para os carboidratos básicos é observada nos ovócitos em estágios mais avançados de desenvolvimento e grande parte deles deva ter origem exógena (provavelmente das células do pedicelo), uma vez que os testes histoquímicos demonstraram sua presença, primeiro no córtex dos ovócitos e depois formando complexos com os grânulos maiores no centro dos ovócitos. Em *A. cajennense*, por ocasião da finalização da deposição do cório, não se observa mais a presença de vesículas positivas ao PAS na região do córtex dos ovócitos, sinalizando que nesta fase o processo de incorporação de carboidratos já tenha terminado.

Desta forma, o presente estudo demonstrou que o vitelo que comporia os ovócitos de carrapatos *A. cajennense* seria constituído por três elementos (lipídios, proteínas e carboidratos) e, estes por sua vez se originariam das seguintes fontes: a) endógena, ou seja, produzido pelo próprio ovócito; b) das células do pedicelo que posteriormente os transfeririam para o ovócito e c) de fonte externa ao ovário (exógena), como o corpo gorduroso ou o intestino, os quais seriam transportados pela hemolinfa e depois capturados ou pelo próprio ovócito ou pelas células do pedicelo e delas seriam transferidos para o interior do ovócito.

Estes elementos, ainda seriam depositados segundo uma seqüência: 1) os lipídios, que além de serem o primeiro elemento produzido, sua síntese e/ou incorporação ocorreria nos ovócitos em todos os estágios de desenvolvimento; 2) as proteínas, as quais seriam detectadas em pouca quantidade em relação aos lipídios nos ovócitos I e II e a partir do III até o V seriam os elementos predominantes do vitelo; 3) os carboidratos básicos os quais foram detectados principalmente nos ovócitos IV e V. Embora estes elementos tenham sido detectados por testes específicos, não descarta-se que além da forma livre, os mesmos possam ser encontrados no citoplasma dos ovócitos também quimicamente ligados a outros elementos, formando complexos, tais como os glicolipídios e as glicoproteínas.

O corpo gorduroso como já anteriormente citado, foi outro tecido analisado no presente estudo, visto que a literatura tem registrado e confirmado sua participação nos processos vitelogênicos dos Arthropoda em geral. Alguns autores,

incluindo Obenchain e Oliver (1971), em estudos com o corpo gorduroso em diversas espécies de carrapatos, demonstraram que este tecido estaria localizado próximo à parede do corpo e/ou circundando alguns órgãos e o denominaram, respectivamente, em carrapatos, de corpo gorduroso periférico e de corpo gorduroso central.

Outros estudos, no entanto, desenvolvidos por Gillott (1995) e Chapman (1998) em corpo gorduroso de insetos, demonstraram a mesma localização no interior do corpo dos insetos, porém, estabeleceram que o corpo gorduroso localizado logo abaixo do integumento deveria ser chamado de corpo gorduroso parietal e aquele localizado ao redor dos órgãos como ovários e intestinos, por exemplo, de corpo gorduroso perivisceral.

Segundo observações realizadas no presente estudo, concorda-se que a terminologia utilizada para localizar o corpo gorduroso nos insetos seria a mais adequada também para designar a localização do corpo gorduroso de carrapatos. Assim, fica estabelecido, no presente estudo, que para carrapatos sejam utilizadas as mesmas denominações para a localização do corpo gorduroso que é utilizada para os insetos, isto é, **parietal** e **perivisceral**, substituindo as denominações **periférico** e **central**, visto que estes últimos termos não representariam de fato a real localização deste tecido nestes indivíduos (DENARDI et al., 2008).

O presente estudo mostrou, além disso, que o corpo gorduroso de *A. cajennense* é constituído por dois tipos de trofócitos. Estas células aqui foram denominadas de trofócito cúbico (trC) e trofócito arredondado (trR) devido às suas formas e histologia, sendo ambos os tipos encontrados tanto no corpo gorduroso parietal quanto no perivisceral.

As análises morfométricas destas células de *A. cajennense* mostraram que os trofócitos cúbicos possuem área citoplasmática significativamente inferior àquela dos arredondados. Uma provável explicação para este fato seria de que os trofócitos cúbicos estariam sofrendo pressão das células adjacentes (outros trofócitos), uma vez que, estariam arranjados na forma de cordões. Já os arredondados, os quais encontrar-se-iam isolados e localizados em cima dos cordões de trofócitos cúbicos, não estariam sujeitos a este tipo de pressão e, além disso, teriam conseqüentemente uma maior área de contato com a hemolinfa.

O estudo ultra-estrutural do corpo gorduroso mostrou que embora os trofócitos estejam intimamente associados entre si, não existe fusão de membrana plasmática, apenas, eventualmente a fusão das lâminas basais de trofócitos adjacentes em regiões onde existe o contato célula/célula. Essas lâminas basais fundidas poderiam estar atuando como uma barreira seletiva, mediando o tráfego de material em ambas as direções (intra e extracelular); as membranas plasmáticas e os citoplasmas dessas células permaneceram, contudo, individualizados.

Tsvileneva (1961; 1963), estudando o corpo gorduroso em outras espécies de carrapatos observou dois tipos de células, diferenciadas umas das outras pela basofilia de seu citoplasma. As acidófilas foram consideradas equivalentes aos trofócitos e as basófilas aos nefrócitos dos insetos. Ainda segundo Tsvileneva (1961; 1965) e Balashov (1963) as células denominadas de nefrócitos nos carrapatos, provavelmente seriam análogas aos enócitos dos insetos. Entretanto, os dados aqui obtidos para o corpo gorduroso de carrapatos *A. cajennense* permitiram estabelecer que não existem nefrócitos, nem células semelhantes aos enócitos dos insetos, a ele associadas e sim, apenas trofócitos.

Dados de Denardi et al.

-Ovário classificado como panoístico

-Vitelo de ovos de carrapatos glicolipoprotéico

-Lipídios do vitelo oriundos das mitocôndrias dos ovócitos e das células do pedicelo

-Proteínas do vitelo oriundas do próprio ovócito (retículo endoplasmático granular) e das células do pedicelo

-Carboidratos do vitelo oriundos das células do pedicelo e assim que produzidos ou captados (da hemolinfa) seriam liberados pelas células do pedicelo para o interior do ovócito

-Células do pedicelo com papel comprovado no fornecimento de elementos lipídicos, protéicos e polissacarídicos para o vitelo

-Seqüência de deposição dos elementos do vitelo: lipídio, proteína e carboidratos

-Mudança da denominação de **periférico** para **parietal** e de **central** para **perivisceral**

-Ausência de nefrócitos

-Presença de trofócitos cúbicos (trC) e de trofócitos arredondados (trR)

Dados da literatura

-Vitelo de ovos de carrapatos lipoprotéico (1)

-Lipídios do vitelo oriundos do corpo gorduroso (2)

-Proteínas do vitelo oriundas do intestino ou do corpo gorduroso (5)

-Células do pedicelo apenas com função de prender os ovócitos ao ovário (3)

-Corpo gorduroso denominado de **periférico** e **central**, segundo sua localização no corpo do animal (4)

-Presença de nefrócitos, além dos trofócitos no corpo gorduroso de carrapatos (7)

1 (BALASHOV, 1983)

2 (COONS et al., 1990)

3 (DIEHL, 1970)

4 (OBENCHAIN; OLIVER, 1971)

5 (ROSELL; COONS, 1992)

6 (SONENSHINE, 1991)

7 (TSVILENEVA, 1961, 1963; BALASHOV, 1963)

Conclusões

6. CONCLUSÕES

- A morfohistologia dos ovários das fêmeas de carrapatos *Amblyomma cajennense* permitiu classificá-los como panoístico, onde são encontrados ovócitos em 5 estágios de desenvolvimento;
- O vitelo dos ovócitos desta espécie de carrapatos é composto por lipídios, proteínas e carboidratos, ou seja, tem constituição glicolipoprotéica, discordando do que foi descrito anteriormente na literatura, que o caracterizou como lipoprotéico;
- O lipídio que faz parte do vitelo dos ovócitos de *A. cajennense* tem como origem as mitocôndrias e as células do pedicelo;
- A proteína encontrada no vitelo dos ovócitos de *A. cajennense* tem duas origens: endógena (sintetizada pelo próprio ovócito) e exógena, oriunda principalmente das células do pedicelo;
- A massa molecular das proteínas do corpo gorduroso de *A. cajennense* é de aproximadamente 98 kDa e a das vitelogeninas de diferentes espécies de carrapatos varia entre 300 e 600 kDa, mostrando que o corpo gorduroso de *A. cajennense* não contribui com o fornecimento de proteínas para o vitelo dos ovócitos, função esta desempenhada provavelmente pelas células do pedicelo;

- A hipótese anterior é corroborada com a pouca quantidade de corpo gorduroso presente nas fêmeas de *A. cajennense* em estágio de reprodução, ao contrário do observado em outros Arthropoda, como insetos, por exemplo;
- O carboidrato, elemento pouco encontrado no vitelo de *A. cajennense*, só foi detectado em ovócitos nos estágios finais de maturação, com provável origem exógena, com síntese nas células do pedicelo, ou sendo por elas transportados depois de captados da hemolinfa;
- Os elementos constituintes do vitelo de carrapatos (lipídios, proteínas e carboidratos) são nesta seqüência depositados: primeiramente os lipídios, seguido das proteínas e finalmente os carboidratos;
- Nova terminologia foi estabelecida para o corpo gorduroso de carrapatos, ou seja, **parietal** substituindo **periférico** e **perivisceral** substituindo **central**, para designar a real localização deste tecido nestes indivíduos;
- Fica estabelecido, que o corpo gorduroso de *A. cajennense* é constituído por trofócitos cúbicos (trC) e trofócitos arredondados (trR), e nele não existe nefrócitos e nenhum outro tipo celular associado.

Referências

7. REFERÊNCIAS

AGBEDE, R. I. S.; KEMP, D.H. Ultrastructure of secretory cells in the gut of the cattle-tick *Boophilus microplus*. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 17, p. 1089 - 1098, 1987.

ALVES-BRANCO, F. P.; ECHEVARRIA, F. A. M.; SIQUEIRA, A. S. Garça vaqueira *Egretta ibis* e o controle biológico do carrapato *Boophilus microplus*. **Comunicado Técnico da EMBRAPA**, Brasília, v. 1, p. 1 - 4, 1983.

ANDERSON, E. Oocyte differentiation and vitellogenesis in the cockroach *Periplaneta americana*. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 20, p. 131 - 135, 1964.

ARAMAN, S. F. Protein digestion and synthesis in ixodid females. In: RODRIGUEZ, J.G. (Ed.): **Recent Advances in Acarology**. I. Academic Press, 1979. p. 385 - 395.

ARGERMÜLLER, S.; FAHIMI, D. H. Imidazole-buffered osmium tetroxide: an excellent stain for visualization of lipids in transmission electron microscopy. **Histochemical Journal**, London, v.14, p. 823 - 825, 1982.

BALASHOV, Yu. S. Anatomico-histological peculiarities of molting of *Hyalomma asiaticum* ticks (Acarina, Ixodoidea). **Zoologicheskii Zhurnal**, Moskva, v.42, p. 345 - 358, 1963.

BALASHOV, Yu. S. A translation of blood-sucking ticks (Ixodidae) vectors of diseases of man and animals. **Miscellaneous Publications of the Entomological Society of America**, Lanham, v. 8, p. 159 - 376, 1972.

BALASHOV, Yu. S. The female reproductive system. In: Balashov, Y.S. (Ed.), **An atlas of ixodid tick ultrastructure**: Entomological Society of America. Russian, 1983. p. 98-128.

BECHARA, G. H.; SZABÓ, M. P. J.; DUARTE, J. M. B.; MATUSHIMA, E. R.; PEREIRA, M. C.; RECHAV, Y.; KEIRANS, J. E.; FIELDEN, L. J. Ticks associated

with wild animals in the Nhecolandia Pantanal, Brazil. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 916, p. 289 - 297, 2000.

BECHARA, G. H.; SZABÓ, M. P. J.; ALMEIDA FILHO, W. V.; BECHARA, J. N.; GARCIA, J. E.; PEREIRA, M. C. Ticks associated with armadillo *Euphractus sexcinctus* and anteater *Myrmecophaga tridactyla* of Emas National Park, state of Goiás, Brazil. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 969, p. 290 - 293, 2002.

BILÍŃSKI, S. M. Structure of ovaries and oogenesis in entognathans (Apterygota). **International Journal of Insect Morphology and Embryology**, Oxford, v. 22, p. 255 - 269, 1993.

BOISSIN, L. **Gamétogenèse au cours du développement pos embryonnaire et biologie de la reproduction chez *Hysterochelifer meridianus* (L. Lock) Arachnidae: Pseudoscorpion**. 1970. Doctorat Thèse - Facultat ès Sc. De Montpellier, France, 1970.

BONHAG, P. F. Ovarian structure and vitellogenesis in insects. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 3, p. 137 - 160, 1958.

BRUM, J. G. W. **Infecção em teleóginas de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) por *Cedecea lapagei* Grimont et al., 1981: etiopatogenia e sazonalidade**. 1988. 200p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1988.

BÜNNING, J. Germ cell cluster formation in insect ovaries. **International Journal of Insect Morphology and Embryology**, Oxford, v. 22, p. 237 - 253, 1993.

BÜNNING, J. (Ed.), **The Insect Ovary: Ultrastructure, Previtellogenic Growth and Evolution**. London: Chapman & Hall, 1994.

CAMARGO-MATHIAS, M. I., **Histoquímica e ultra-estrutura dos ovários de operárias e rainhas de formigas *Neoponera villosa* (Hymenoptera: Ponerinae)**. 1993. 156 f. Tese (Doutorado em Zoologia) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1993.

CAMPOS PEREIRA, M.; SZABÓ, M. P. J.; BECHARA, G. H.; MATUSHIMA, E. R.; DUARTE, J. M. B.; RECHEV, Y.; FIELDEN, L.; KEIRANS, J. E. Ticks (Acari: Ixodidae) associated with wild animals in the Pantanal region of Brazil. **Journal Medical Entomology**, Lanham, n. 6, v. 37, p. 979 - 983, 2000.

CHAPMAN, F. R. **The Insects: Structure and Function**. 4. ed. New York: Cambridge University, 1998. 770 p.

CHINZEI, Y; CHINO, H.; TAKAHASHI, K. Purification and properties of vitellogenin and vitellin from a tick, *Ornithodoros moubata*. **Journal of Comparative Physiology B.**, Berlin, v. 172, p. 13 - 21, 1983.

CHINZEI, Y.; YANO. Fat body is the site of vitellogenin synthesis in the soft tick, *Ornithodoros moubata*. **Journal of Comparative Physiology B.**, Berlin, v. 155, p. 671-678, 1985.

CONE, M. V., ESCHENBERG, K. M., Histochemical localization of acid phosphatase in the ovary of *Regis remigis say* (Hemiptera). **Journal of Experimental Zoology**, Hoboken, v. 161, p. 337 - 352, 1966.

CONTE, H. 1994. **Morfologia do corpo gorduroso em larvas de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera; Pyralidae) não parasitadas pelo *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae)**. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1994.

COONS, L. B., TARNOWSKI, B. I.; OURTH, D. *Rhipicephalus sanguineus*: Localization of vitellogenin synthesis by immunological methods and electron microscopy. **Experimental Parasitology**, San Diego, v. 59, p. 331 - 339, 1982.

COONS, L. B., ROSELL-DAVIS, R.; TARNOWSKI, B. I. Blood meal digestion in ticks. In: SAUER, J. R.; HAIR, A. J. (Ed.). **Morphology, Physiology and Behavioral Biology of Ticks**. Chichester: Ellis Horwood, p. 248 - 279. 1986a.

COONS, L. B.; LAMOREAUX, W., ROSELL-DAVIS, R.; STARR-SPIRES, L., Ultrastructure of fat body trophocytes in the life stage of *Dermacentor variabilis*. *Proc. EMSA*, v. 44, p. 314 - 315, 1986b.

COONS, L. B., LAMOREAUX, W. J., ROSELL-DAVIS, R.; TARNOWSKI, B.I. The onset of vitellogenin production and vitellogenesis and their relationship to changes in the midgut epithelium and oocytes in the tick *Dermacentor variabilis*. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 6, p. 291 – 305, 1989.

COONS, L. B., LAMOREAUX, W. J., ROSELL-DAVIS, R.; STARR-SPIRES, L. Fine structure of the fat body and nephrocytes in the life stages of *Dermacentor variabilis*. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 8, p. 125 – 142, 1990.

CRUZ-LANDIM, C. Modificações das células do corpo gorduroso de rainhas de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae). **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 37, p. 471 - 475, 1985.

DENARDI, S. E; BECHARA, G. H.; OLIVEIRA, P. R.; NUNES, E. T.; SAITO, K. C.; CAMARGO MATHIAS, M. I. Morphological characterization of the ovary and vitellogenesis dynamics in the tick *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 125, p. 379 - 395, 2004.

DENARDI, S. E.; CAMARGO-MATHIAS, M. I.; BECHARA, G. H. *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae): Salivary gland cells of partially engorged females ticks and the production of lipid by their mitochondria. **Experimental Parasitology**, San Diego, v. 113, p. 30 - 35, 2006.

- DENARDI, S. E., BECHARA, G. H., CAMARGO- MATHIAS, M. I. New morphological data on fat bodies of semi-engorged females of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). **Micron**, New York, 2008. Doi: 10.1016/j.micron.2007.12.002. No prelo.
- DIEHL, P. A. Zur Oogenese bei *Ornithodoros moubata* (Murray) (Ixodoidea: Argasidae) unter Besonderer Berücksichtigung der Vitellogenese, **Acta Tropica**, Basel, v. 27, p. 301 – 355, 1970.
- DOUGLAS, J. R. The internal anatomy of *Dermacentor andersoni* Stiles. **University of California Publications in Entomology**, Berkeley, v. 7, p. 207 - 272, 1943.
- ENGELMANN, F. Hormonal Control of Arthropod Reproduction. **Progress in Comparative Endocrinology**, New York, p. 357 - 364. 1990.
- FARIAS, N. A. R.; GONZALES, J. C.; SAIBRO, J. C. Antibiose e antixenose entre forrageiras em larvas de carrapato do boi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 21, p. 1313 - 1320, 1986.
- FLECHTMANN, C. H. W. **Ácaros de importância médico-veterinária**. São Paulo: Nobel, 1990. p 45 - 74.
- FREITAS, D. R. J.; POHL, P. C.; VAZ, I. S. Characterization of acaricide resistance in *Boophilus microplus*. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, n. 2, v. 33, p. 109 - 117, 2005.
- FONTANETTI, C. S.; STAURENGO DA CUNHA, M. A. Morfologia ovariana e desenvolvimento dos ovócitos de *Rhinocricus padbergi* Verhoeff (Diplopoda, Spirobolida, Rhinocricidae). **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 53, p. 7 - 12, 1993.
- GILLOT, C. **Entomology**. 2.ed. New York: Plenum Press, 1995. 798p.
- GONZALES, J. C. **O controle do carrapato bovino**. Porto Alegre: Sulina, 1975. 104p.
- HAMES, B. D.; RICKWOOD, D. **Gel electrophoresis of proteins: a practical approach**. Oxford: IRL Press, 1981. p. 1 – 81.
- HARWOOD, R. F.; JAMES, M. T. **Entomology in human and animal health**. 7. ed. New York: Macmillan Publishing Co., 1979. 548p.
- HOOGSTRAAL, H. **African Ixodoidea. I. Ticks of the Sudan**: with special reference to Equatoria Province and with preliminary reviews of the genera (*Boophilus*, *Margoporus*, and *Hyalomma*). Washington: Government Printing Office, 1956. 1101p.
- JUNQUEIRA, L. C. U.; JUNQUEIRA, L. M. M. S. **Técnicas Básicas de Citologia e Histologia**. São Paulo: Santos, 1983. 123 p.

KAUFMAN, W. R. Tick-host interaction: a synthesis of current concepts. **Parasitology Today**, Amsterdam, v. 5, p. 47 - 56, 1989.

KELLY, E. A. B.; COLLEY, D. G. In vivo effects of monoclonal anti-13t4 antibody on immune responsiveness of mice infected with *Shistosoma mansoni* – reduction of irradiated cercariae-induced resistance. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 140, p. 2737 - 2745, 1988.

LISON, L. **Histochimie et Cytochimie Animales**. Paris: Gauthier - Villars, 1960. 842 p.

MAcRAE, E. K.; MEETZ, G. D. Electron microscopy of ammoniacal silver reaction for histones in erythropoietic cells of chick. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 45, n. 3, p. 235 - 245, 1970.

MATOVA, N.; COOLEY, L. Comparative aspects of animal oogenesis. **Developmental Biology**, Berlin, v. 231, p. 291 - 320, 2001.

McMULLEN, H. L.; SAUER, J. R.; BURTON, R. L. Possible role in uptake of water vapour by ixodid tick salivary glands. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 22, p. 1281 - 1285, 1976.

NEEDHAM, G. R.; ROOSELL, R.; GREENWALD, L.; COONS, L. B. Ultrastructure of type I salivary gland acini in four species of ticks and the influence of hydration states on type I acini of *Amblyomma americanum*. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 10, p. 83 - 104, 1990.

NEEDHAM, G. R.; TEEL, P. D. Off host physiological ecology of Ixodid ticks. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 36, p. 659 - 681, 1991.

NUNES, E. T., BECHARA, G. H., SAITO, K. C., DENARDI, S. E., OLIVEIRA, P. R., CAMARGO-MATHIAS, M. I. Morphological, histological, and ultrastructural characterization of degenerating salivary gland in females of the cattle-tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae), **Micron**, New York, v. 36, p. 437 - 447, 2005.

NUNES, E. T.; CAMARGO-MATHIAS, M. I.; BECHARA, G. H. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae): Acid phosphatase and ATPase activity localization in salivary glands of females during the feeding period. **Experimental Parasitology**, San Diego, v. 114, p. 109 - 117, 2006a.

NUNES, E. T.; CAMARGO-MATHIAS, M. I.; BECHARA, G. H. Structural and cytochemical changes in the salivary glands of the *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) tick female during feeding. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 140, p. 114 - 123, 2006b.

OBENCHAIN, F. D.; OLIVER JR., J. H. A qualitative analysis of the form, function and interrelationships of fat body and associated tissues in adult ticks. **Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 186, p. 217 - 236, 1971.

OLIVEIRA, P. R., BECHARA, G. H., DENARDI, S. E., NUNES, E. T., CAMARGO-MATHIAS, M. I., Morphological characterization of the ovary and oocytes vitellogenesis in the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). **Experimental Parasitology**, San Diego, v. 110, p. 146 - 156, 2005a.

OLIVEIRA, P. R., BECHARA, G. H., DENARDI, S. E., NUNES, E. T., SZABÓ, M. P. J., CAMARGO-MATHIAS, M. Comparasion of the external morphology of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) ticks from Brazil and Argentina. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 129, p. 139 - 147, 2005b.

OLIVEIRA, P. R., CAMARGO-MATHIAS, M. I., BECHARA, G. H., *Amblyomma triste* (Koch, 1844) (Acari: Ixodidae): Morphological description of the ovary and of the vitellogenesis. **Experimental Parasitology**, San Diego, v. 113, p. 179 - 185, 2006.

OLIVEIRA, P. R., CAMARGO-MATHIAS, M. I., BECHARA, G. H., Vitellogenesis in the tick *Amblyomma triste* (Koch, 1844) (Acari: Ixodidae). Role for pedicel cells. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 143, p. 134 - 139, 2007a.

OLIVEIRA, P. R., BECHARA, G. H., CAMARGO-MATHIAS, M. I. *Amblyomma triste* (Koch, 1844) (Acari: Ixodidae) Ovaries: An ultrastructural analysis. **Experimental Parasitology**, San Diego, v. 116, p. 407 - 413, 2007b.

PEARSE, A. G. E. **Histochemistry**: Theoretical and Applied. 4. ed. London: Churchill, 1985. 530 p.

RAMAMURTY, P.S. Origin and distribution of glycogen during vitellogenesis of the scorpion fly *Panorpa communis*. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 14, p. 1325 - 1330, 1968.

RANADE, V. On the cytoplasmic inclusions in the oogenesis of *Periplaneta americana*. **Linn. Allahad. University Science Bulletin**, v. 9, p. 85 - 121, 1933.

REY, L. **Parasitologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1973. 695 p.

REY, L. **Parasitologia**. São Paulo: Guanabara Koogan. 1991. 731 p.

REY, L. Parasitos e Doenças Parasitárias do Homem nas Américas e na África. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p.752 - 759.

RIBEIRO, J. M. C. Role of saliva in blood-feeding by arthropods. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v.2, p. 463 - 478, 1987.

RICARDO, A. J.; OLIVEIRA, P. R.; BECHARA, G. H.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Ultrastructural detection of protein, lipids and carbohydrates in oocytes of

Amblyomma triste (Koch, 1844) (Acari: Ixodidae) during the vitellogenesis process. **Tissue and Cell**, Essex, v. 39, p. 203 - 215, 2007.

ROBINSON, L. E.; DAVIDSON, J. The anatomy of *Argas persicus* (Oken, 1818). Part 1. **Parasitology**, Cambridge, v.6, p. 20-48, 1913.

ROSELL, R.; COONS, L. B. The role of the fat body, midgut and ovary in vitellogenin production and vitellogenesis in the female tick *Dermacentor variabilis*, **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 22, p. 341 - 349, 1992.

RUDOLPH, D.; KNULLE, W. Site and mechanism of water vapour uptake from the atmosphere of ixodid ticks. **Nature**, London, v. 249, p. 84 - 85, 1974.

RUPPERT, E. E.; BARNES, D. R. **Zoologia dos Invertebrados**. 6. ed. São Paulo: Rocca, 1996. 1029 p.

SAITO, K. C.; BECHARA, G. H.; NUNES, E. T.; OLIVEIRA, P. R.; DENARDI, S. E.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Morphological, histological, and ultrastructural studies of the ovary of the cattle-tick *Boophilus microplus* (CANESTRINI, 1887) (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 129, p. 299 - 311, 2005.

SAUER, J. R.; ESSENBERG, R. C.; BOWMAN, A. S. Salivary glands in ixodid ticks: control and mechanism of secretion. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 46, p. 1069 - 1078, 2000.

SCHRIEFER, M. E. **Vitellogenesis in *Hyalomma dromedarii* (Acari: Ixodidae): A model for analysis of endocrine regulation in ixodid ticks**. 1991. 128 f. Ph.D. Dissertation - Old Dominion University, Norfolk, Virginia, 1991.

SEDMAK, J. J.; GROSSBERG, S. E. A rapid sensitive and versatile assay for protein using Coomassie Brilliant Blue G-250. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 78, p. 544 - 552, 1977.

SIEGEL, S; CASTELLAN Jr, N. J. **Nonparametrics statistics**. 2. ed. New York: Mc Graw-Hill Int., 1988. 399 p.

SIGAL, M. D.; YODER, J. A.; NEEDHAM, G. R. Palp-splaying behavior and a specific mouthpart site associated with active water vapor uptake in *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, Lanham, v. 36, p. 365 - 369, 1999.

SONENSHINE, D. E. The female reproductive system. In: SONENSHINE, D. E. (Org.). **Biology of ticks**. New York: Oxford University Press, 1991. p. 280 - 304.

STORER, T. I.; USINGER, R. L. **Zoologia Geral**. 6. ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 2000. 816 p.

SULLIVAN, C. D.; ROSELL, R. C., COONS, L. B. Partial characterization of vitellogenin from the ixodid *Dermacentor variabilis*: Preliminary results. In: ACAROLOGY, 9., 1999, Columbus. **Proceedings ...** Columbus: The Ohio Biological Survey, 1999. p. 477 – 480

TARNOWSKI, B. I.; COONS, L. B. Ultrastructure of the midgut and blood meal digestion in the adult tick *Dermacentor variabilis*. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 6, p. 263 - 289, 1989.

TAYLOR, D.M.; CHINZEI, Y.; MIURA, K.; ANDO, K. Vitellogenin synthesis, processing and hormonal regulation in the tick, *Ornithodoros parkeri* (Acari: Argasidae). **Insect Biochemistry**, London, v. 21, p. 723 - 733, 1991.

TAYLOR, D.; CHINZEI, Y. Vitellogenin and its synthesis in the soft ticks. In: ACAROLOGY, 10., **Proceedings ...** Canberra: Publishing Collingwood Australia, 2001. p. 622 - 627.

TELLAM, R. L.; SMITH, D.; KEMP, D. H. Vaccination against ticks. In: YONG, W. K. **Animal parasite control using biotechnology**. Boca Raton: CRC Press, 1992. p. 303 - 331.

THIERY, J. P. Mise em evidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie electronique. **Journal of Microscopical**, Oxford, v. 6, p. 987 - 18, 1967.

TILL, W. M. A contribution to the anatomy and histology of the brown ear tick *Rhipicephalus appendiculatus*. **Memoirs of Entomological Society of Southern Africa**, Pretoria, v. 6, p.1-124, 1961.

TSVILENEVA, V. A. Comparative histology of the blood and connective tissue. Formed elements of hemolymph in ixodid ticks. *Arkh. Anat. Gistol. Embriol.* v. 40, p. 91-100, 1961.

TSVILENEVA, V. A. On the morphology of the connective tissue of ixodid ticks. *Doklad Akad. Nauk. Tadzhik. USSR*, v. 24, p. 171 - 177, 1963.

TSVILENEVA, V. A. The nervous structure of the ixodid synganglion (Acarina: Ixodoidea). **Entomological Review**, Washington, v. 44, p. 135 - 142, 1965.

TWORZYDLO, W.; BILIŃSKI, S. M. Structure of ovaries and oogenesis in dermapterans. I. Origin and functioning of the ovarian follicles. **Arthropod Structure and Development**, Oxford, v. 37, p. 310 - 320, 2008.

VAN HANDEL, E. Postvitellogenic metabolism of the mosquito (*Culex quinquefasciatus*) ovary. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 38, p. 75 - 79, 1992.

WALKER, A. **The arthropods of humans and domestic animals**. A guide to preliminary identification. London: Chapman and Hall, 1994. 213 p.

WALL, R.; SHEARER, D. **Veterinary Entomology**. London: Chapman and Hall, 1997. 338 p.

WIGGLESWORTH, V. B. Bound lipid in the tissues of mammal and insect: a new histochemical method. **Journal of Cell Science**, London, v. 8, p. 709 - 725, p. 1971.

WILLADSEN, P. Novel vaccines for ectoparasites. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 71, p. 209 - 22, 1997.

WYATT, G. R. The fat body as a protein factory. In: LOCKE, M.; SMITH, D. S. **Insect biology in the future**. New York: Academic Press, 1980. p. 201 - 225.

WYATT, G. R. Gene regulation in insect reproduction. **Invertebrate Reproduction and Development**, Rehovot, v. 20, p.1 - 35, 1991.

ZHIOUA, E.; BROWNING, M.; JOHNSON, P. W.; GINSBERG, H. S.; LEBRUN, R. A. Pathogenicity of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) to *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 83, p. 815 - 818, 1997.