

---

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

---

**HISTOPATOLOGIA E ULTRAESTRUTURA DO INTESTINO DE FÊMEAS  
ADULTAS DO CARRAPATO-ESTRELA *Amblyomma cajennense* FABRICIUS,  
1787 (ACARI: IXODIDAE) DURANTE ALIMENTAÇÃO EM COELHOS PRÉ-  
SENSIBILIZADOS.**

**Débora Caperucci**

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  
Julho - 2010

---

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

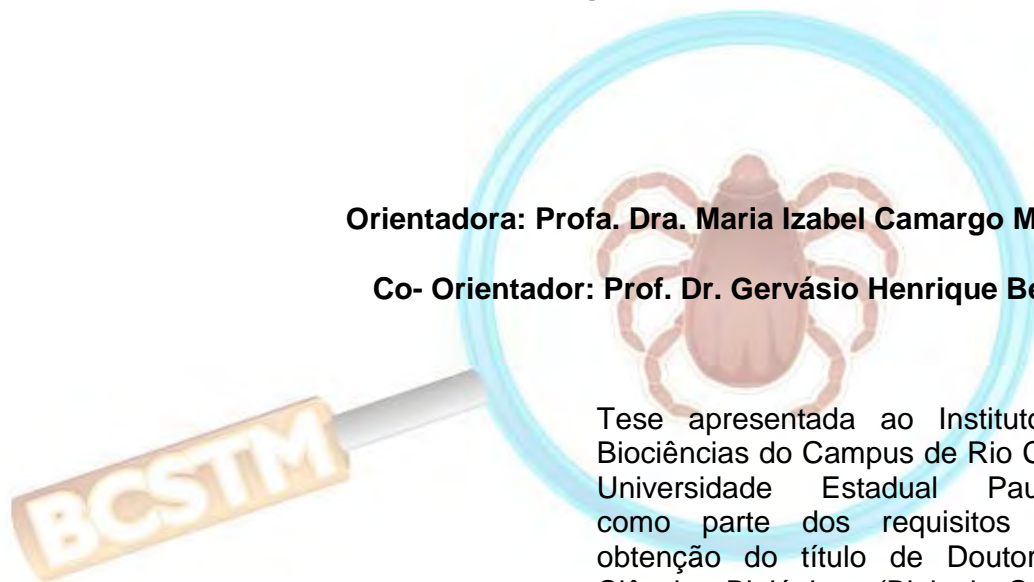
---

HISTOPATOLOGIA E ULTRAESTRUTURA DO INTESTINO DE  
FÊMEAS ADULTAS DO CARRAPATO-ESTRELA *Amblyomma*  
*cajennense* FABRICIUS, 1787 (ACARI: IXODIDAE) DURANTE  
ALIMENTAÇÃO EM COELHO PRÉ-SENSIBILIZADOS.

**Débora Caperucci**

**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).

## Sumário


RESUMO.....	2
ABSTRACT.....	6
1. INTRODUÇÃO.....	10
2. OBJETIVOS.....	21
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
3.1. Material.....	24
3.2. Hospedeiros.....	24
3.2.1. Carrapatos.....	24
3.2.2. Confeção de câmaras de alimentação.....	25
3.2.3. Fixação das câmaras de alimentação nos hospedeiros.....	25
3.2.4. Liberação dos casais de <i>Amblyomma cajennense</i> nas câmaras de alimentação.....	26
3.3. Métodos.....	27
3.3.1. Morfologia.....	27
3.3.2. Análises morfológicas.....	27
3.3.3. Histologia.....	27
3.3.3.1. Inclusão em resina (Historesina).....	27
3.3.4. Histoquímica.....	28
3.3.4.1. Técnica do azul de bromofenol.....	28
3.3.4.2. Técnica do PAS/ alcian blue.....	29
3.3.4.3. Técnica de von Kossa.....	29
3.3.5. Microscopia Eletrônica.....	30
3.3.5.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	30

3.3.5.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	31
3.3.6. Citoquímica Ultraestrutural.....	32
3.3.6.1. Detecção de proteínas.....	32
3.3.6.2. Detecção de açúcares totais.....	33
RESULTADOS.....	34
CAPÍTULO 1.....	37
CAPÍTULO 2.....	40
CAPÍTULO 3.....	44
CAPÍTULO 4.....	85
DISCUSSÃO GERAL.....	140
CONCLUSÕES.....	157
REFERÊNCIAS.....	161

*“omnia possum no OE qui me confortat”*

*Philippians 4:13*

## *Agradecimentos*

*Agradecimento especial à  (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), pelo apoio financeiro concedido, o qual possibilitou a realização deste trabalho (Processo nº 05/57707-2).*

*À Deus, pela oportunidade de finalizar mais uma etapa em meu caminho. Pelas inúmeras vezes que segurou em minha mão, me levantou, guiou e fortaleceu. Por suas bênçãos, pelo cuidado, proteção em todos os momentos.*

*À minha orientadora e amiga, Bel, a quem devo meu progresso científico e aprendizado, de quem vou guardar os ensinamentos pelo resto da vida. Você conquistou minha estima, respeito e admiração. Agradeço de forma muito especial por me orientar e lutar comigo para conseguirmos realizar esse trabalho.*

*Agradeço também de modo muito especial ao Prof. Dr. Gervásio Henrique Bechara, pela sua co-orientação, sabedoria, incentivo e exemplo de trabalho.*

*Ao meu marido Júnior pela compreensão e apoio nos momentos difíceis, por compartilhar comigo os momentos de alegria e realizações e, acima de tudo, pelo seu amor que me faz mais feliz a cada dia. Eu te amo!*

*À minha filha Ana Clara que é o grande amor da minha vida, pela compreensão nos momentos em que a mamãe precisava sair, com o coração muitas vezes “apertado”, por ter que deixá-la chorando, para concluir esse trabalho.*

*À minha mãe Maria Antonia, que sempre esteve ao meu lado, que amparou e sustentou financeiramente a minha graduação, e que me ensinou a lutar por todos os meus sonhos. Meu eterno obrigado!!!*

*À minha avó Carmem pelas suas orações e por todos os dias me dizer “Vai com Deus, Deus te abençoe” me fez sentir sempre mais protegida.*

*Ao meu irmão Dr. André Luiz Caperucci e minha cunhada Jú que estiveram sempre ao meu lado, pelo apoio e carinho durante todos estes anos.*

*Ao meu pai José Augusto Caperucci, que mesmo longe, tenho certeza que sempre torcerá pelo meu sucesso.*

*Aos meus sogros, Carlos e Lucilene Gracias por me apoiarem e incentivarem a continuar sempre, todo o meu carinho, e por cuidarem com tanto amor e afeto do meu bem mais precioso...Minha filha.*

*À Célia, uma pessoa especial e minha ajudante nas tarefas domésticas, obrigada pelo cuidado com a minha casa e especialmente pelo cuidado com a minha pequena Ana Clara.*

*À todos os docentes do Departamento de Biologia da UNESP de Rio Claro por estarem sempre dispostos ao esclarecimento de dúvidas e pelo carinho que sempre me transmitiram.*

*Aos técnicos de laboratório Antonio Teruyoshi Yabuki, Gerson Mello Souza, Mônica Iamonte pelos serviços técnicos prestados, além da grande amizade construída durante todos estes anos.*

*À secretária Lucila de Lourdes Segalla Franco pela atenção e ajuda dispensada e, em especial, à desenhista Cristiane Marcia Miléo, pelo auxílio na confecção de imagens, pela sua disposição e acima de tudo pela sua amizade.*

*À todos os funcionários do Departamento de Biologia, Seção de Pós-Graduação e Biblioteca pela ajuda concedida.*

*À todos os meus amigos de pós-graduação e de orientação, companheiros de todas as horas, pela grande amizade construída durante todos estes anos, Alex, André, Pablo, Érika, Patrícia, Gislaine, Andréa, Paulinha, Tamires, Bruno, e, em especial, às queridas amigas, Sandra, Gabby e Nat, pela confiança, dedicação e atenção, pelo companheirismo e*

*carinho, por dividirem comigo suas alegrias e tristezas e por saberem dar o verdadeiro significado à palavra amizade!!!.*

*À duas pessoas que me ajudaram nas análises e confecções de pranchas quando me encontrei perdida no início do Doutorado .....Karim Cristina Scopinho Furquim e Pablo Henrique Nunes.*

*E à todas as pessoas e familiares que passaram em meu caminho nestes anos, que deixaram muitos ensinamentos e àquelas que passaram rápido, mas que não deixaram de ser importantes. Meu muito obrigado!*



*Resumo*

---

## RESUMO

Este estudo trouxe a análise morfológica, histológica, ultraestrutural e citoquímica do intestino médio de fêmeas de *Amblyomma cajennense* e mostrou que esse órgão passa, por grandes modificações à medida que o processo de alimentação progride, tornando-se acentuadas nos indivíduos reinfestados. Do intestino médio de *A. cajennense*, partem dois pares de divertículos que se ramificam totalizando 8 ramos. Naquelas em jejum a porção anterior do intestino médio é enrugada devido à forte musculatura. Em algumas regiões do intestino médio, estruturas, descritas pela primeira vez, foram denominadas de nódulos, resultado dos espaços presentes entre as fibras musculares ao redor do intestino. À medida que progridem as infestações a superfície dos divertículos em jejum, semi e ingurgitados de 1<sup>a</sup> e 2<sup>a</sup> infestações enruga-se extremamente estando nas semi de 3<sup>a</sup> infestação menos enrugada e ingurgitadas de 3<sup>a</sup> infestação mais lisa. A histologia do intestino médio em jejum mostrou a presença de epitélio pseudo-estratificado com células: **generativas** e

**digestivas.** Nas semi e ingurgitadas de 1ª infestação e semi de 2ª infestação o epitélio sofre estratificação. Nas semi de 2ª infestação observou-se no epitélio a presença do terceiro tipo celular: a **secretora**. Nas ingurgitadas de 2ª infestação e nas semi e ingurgitadas de 3ª infestação o epitélio se desorganizou. No lúmen do intestino das semi submetidas à 1ª infestação, observou-se esferas membranosas; com estruturas fortemente coradas no interior. Outras com seu interior preenchido apenas por restos de citoplasma. A desorganização no epitélio intestinal de fêmeas fixadas em hospedeiros reinfestados sugeriu que os anticorpos liberados pelo hospedeiro contra o intestino dos carrapatos tenham agido nestes. A histoquímica detectou pouca proteína no epitélio intestinal daquelas em jejum, ao contrário daquelas de 1ª infestação semi e ingurgitadas e de 2ª semi, que tiveram o epitélio fortemente corado. Nas ingurgitadas de 2ª infestação e semi e ingurgitadas de 3ª o epitélio desorganizado esteve fortemente, e aquelas semi ingurgitadas e submetidas à 3ª infestação apresentaram-no fracamente corado. As células generativas e digestivas foram observadas em todas as fases de alimentação e de reinfestação, porém as secretoras somente naquelas semi de 2º infestação. Nas fêmeas em jejum houve produção de polissacarídeos, assim como naquelas semi de 1ª infestação. Nas ingurgitadas de 1ª infestação houve produção de polissacarídeos ácidos e neutros e naquelas semi de 2ª infestação houve produção somente de polissacarídeos ácidos. A técnica de von Kossa mostrou o epitélio em jejum fracamente reativo porém fortemente positivo naquelas semi e ingurgitadas de 1ª, 2ª e 3ª infestações, indicando que o mesmo epitélio estaria envolvido no transporte de esferocristais. Ultraestruturalmente o citoplasma das células digestivas de todas fêmeas analisadas apresentam regiões íntegras e outras desorganizadas. Gotas lipídicas e grânulos protéicos foram

observados em todas as fases estudadas, exceto nos indivíduos em jejum reveladas pela citoquímica ultraestrutural. Vacuolização ocorreu nas células digestivas das semi e ingurgitadas de 2ª infestação e ingurgitadas de 3ª, provável sintoma da ação dos anticorpos do hospedeiro. Nas células digestivas de carrapatos *A. cajennense* ingurgitados e submetidos à 1ª e 2ª infestações foram observados corpos eletrondensos que sugeriram ser endosimbiontes.

*Abstract*

---

**ABSTRACT**

This study showed the morphological, histological, ultrastructural and cytochemical analysis of the medium intestine of *Amblyomma cajennense* females since this organ goes through significant modifications as the feeding process progresses and these modifications are stronger in reinfested individuals. Two pairs of diverticulum emerge from *A. cajennense* medium intestine and are divided in eight branches. In the unfed females ones the anterior portion of the medium intestine is wrinkled due to the strong musculature. In some regions of the medium intestine, structures which were described for the first time were called nodules, resulting from the spaces between the muscular fibers around the intestine. As the infestations progress the surface of unfed, semi and engorged females diverticulum are extremely wrinkled, being smooth in the semi of 3rd infestation and smoother in engorged of 3rd infestation. The histology of the unfed medium intestine showed the presence of

a pseudostratified epithelium with **generative** and **digestive** cells. In semi and engorged of 1st infestation and semi of 2nd infestation the epithelium suffered stratification. In semi of 2nd infestation the presence of a third cellular type was observed: the **secretory** one. In engorged of 2nd infestation and in semi and engorged of 3rd infestation the epithelium was disorganized. In semi submitted to 1st infestation the intestine lumen presented membranous spheres, with strongly stained structures. Others were filled by rests of cytoplasm. The disorganization of the intestinal epithelium of females fixed in reinfested hosts suggested that the antibodies released by the host against the ticks' intestine had acted on them. Histochemistry revealed little protein in the intestinal epithelium in the unfed ones, unlike those of first infestation semi and engorged and of second semi, which had the epithelium strongly stained. In engorged of 2nd infestation and semi and engorged of 3rd the epithelium was strongly disorganized and the ones semi engorged of 3rd infestation presented weakly stained epithelium. Generative and digestive cells were observed in all the feeding and reinfestation phases, however, secretory cells were observed only in semi of 2nd infestation. In fasting females there was production of polysaccharides as well as in those semi of 1st infestation. In engorged of 1st infestation there was the production of acid and neutral polysaccharides and in semi of 2nd infestation there was the production of acid polysaccharides only. Von Kossa technique showed the unfed epithelium weakly reactive but strongly positive in those semi and engorged of 1st, 2nd and 3rd infestations, indicating that the epithelium would be involved in the spherocrystals transport. Ultrastructurally, the cytoplasm of digestive cells of all the analyzed females presented integral and disorganized regions. Lipid drops and

protein granules were observed in all the studied phases (through ultrastructural cytochemistry), except in the unfed individuals. Vacuolization occurred in the digestive cells of the semi engorged and engorged of 2nd infestation and engorged of 3rd, probable symptom of the reaction of the host's antibodies. Digestive cells of engorged *A. cajennense* ticks submitted to 1st and 2nd infestations presented electrodense bodies, suggesting they were endosymbiont organisms.



# *Introdução Geral*

---

## **1. INTRODUÇÃO GERAL**

A subclasse Acari da classe Arachnida onde se encontram os ácaros e os carrapatos (RUPPERT; BARNES, 1996), é formada por um grupo de indivíduos que variam de pequenos a microscópios, apresentando corpo não segmentado com cabeça, tórax e abdômen fundidos (STORER; USINGER, 2005; RUPPERT; BARNES, 1996). Segundo Sonenshine (1991), apesar de não terem nenhuma adaptação para o voo, estes indivíduos concorrem com os insetos tanto em diversidade de espécies como nas adaptações ao ambiente.

Os carrapatos estão distribuídos em três famílias: Ixodidae, Argasidae e Nuttalliellidae. O corpo dos Ixodidae é recoberto por uma placa dorsal quitinosa, também denominada de escudo, que pode ter a superfície ornamentada por manchas, depressões e esculpturações (REY, 1973). Nos Argasidae essa placa rígida está ausente e as partes bucais estão localizadas ventralmente (WALKER, 1997; WALL; SHEARER,

1997). A terceira, a Nuttalliellidae é menor do que as outras duas e abriga apenas uma espécie (SAUER et al, 2000).

Dentro da família Ixodidae encontra-se o gênero *Amblyomma*, com indivíduos distribuídos por todo mundo, principalmente em regiões tropicais e subtropicais. Cerca de 30 espécies são encontradas no Brasil, entre elas, o *A. cajennense* (REY, 2001) e o *A. brasiliense* (ARAGÃO, 1908), embora esta última seja encontrada com mais frequência na Argentina e no Paraguai (ARAGÃO, 1936).

Durante o ciclo de alimentação os carrapatos ixodídeos, passam por duas fases principais: a) a primeira fase ou de crescimento, onde ele ingere pequena quantidade de sangue, que é digerido rapidamente e é quando os órgãos crescem e se desenvolvem e b) a segunda ou de expansão, onde ele ocorre a maior ingestão de sangue (BALASHOV, 1967).

Dentro do gênero *Amblyomma* encontra-se a espécie *A. cajennense* onde os adultos são popularmente conhecidos como carrapato-estrela, carrapato de cavalo ou rodoleiro, as larvas por carrapatinhos ou micuins, e as ninfas por vermelhinhos. O macho da espécie *A. cajennense* apresenta escudo ornamentado e recobrimo a maior parte do corpo, sulco marginal completo e numerosas pontuações distribuídas uniformemente, à exceção das áreas de cor escura. Na fêmea, o escudo também é ornamentado, com áreas claras entremeadas por tons marrons-avermelhados, e manchas ou bandas escuras (GUGLIELMONE et al., 2006).

O corpo dos carrapatos não é completamente esclerotizado e por isso é capaz de grande expansão quando estes estão no estágio ingurgitado (repletos de sangue) o que promove um aumento de cerca de 100 vezes o seu tamanho original (jejum)

(KAUFMAN, 2007). Podem ser observados pêlos ou cerdas distribuídos na superfície do corpo (RUPPERT; BARNES, 1996).

Os carrapatos *A. cajennense* são hematófagos obrigatórios e realizam o repasto em três hospedeiros, para que possam assim completar seu ciclo de vida sendo, portanto, classificados como indivíduos trioxenos (FLECHTMANN, 1990). Sua importância econômica e sanitária é amplamente conhecida, visto que os mesmos causam sérios danos, aos seus hospedeiros (bovinos, equinos e caninos). Estes carrapatos têm também grande importância na Saúde Pública, por serem vetores da *Rickettsia rickettsi*, agente etiológico de patologias que afetam o homem como a febre maculosa, também conhecida como febre das Montanhas Rochosas, febre do carrapato, febre negra ou doença azul, além de transmitirem outros microorganismos. A relação de parasitismo carrapato/hospedeiro compromete este último pela espoliação direta causada pelo hematofagismo, uma vez que permite a entrada de microorganismos que poderão também causar infecções ditas secundárias, como miíases cutâneas e paralisia, reações que são consequência da ação tóxica da saliva do parasita e que no final do processo afetam a comercialização dos produtos derivados do hospedeiro (WALL; SHEARER, 1997).

As fêmeas da espécie *A. cajennense*, após ingurgitadas e fecundadas, desprendem-se voluntariamente do hospedeiro e caem no solo para ovipositarem (em torno de 6 à 8 mil ovos) antes de finalmente morrerem. Após a incubação dos ovos depositados no solo (30 dias à temperatura de 25°C), ocorre a eclosão das larvas hexápodes, que sobem pelas gramíneas e arbustos e aí esperam a passagem dos hospedeiros. Depois de os encontrarem, de se fixarem e de sugarem o seu sangue por um período de 3 à 6 dias, desprendem-se, vão para o solo novamente para aí sofrerem

ecdise (18 a 26 dias), transformando-se em ninfa octópode, que novamente fixa-se em um hospedeiro em 6 dias ingurgita, desprende-se, cai no solo, sofre nova ecdise (23 a 25 dias), transformando-se finalmente no adulto (FLECHTMANN, 1990).

Nas condições naturais da região Sudeste do Brasil, as larvas de *A. cajennense* que eclodem nos meses de novembro a março (época de maior atividade do estágio adulto) permanecem no solo, e ficam sob o capim, até o mês de abril, quando então em aglomerados contendo centenas de indivíduos sobem pelas folhas para encontrarem seus hospedeiros. Este comportamento foi denominado de “diapausa comportamental”, e foi considerado o principal fator primário regulador do ciclo biológico de *A. cajennense* em condições naturais (BELOZEROV, 1982; CABRERA, 2008).

O processo de diapausa ainda promove ao indivíduo duas distintas vantagens: a) sincroniza o seu ciclo de vida com as estações do ano que são favoráveis ao seu desenvolvimento; b) aumenta a resistência dos indivíduos quando em condições desfavoráveis, como por exemplo: extremos de temperatura ou em carência de alimento (BELOZEROV, 1982; CABRERA, 2008).

A habilidade dos carrapatos em sobreviver por longos períodos em jejum pode ser também explicada pela capacidade destes de absorverem água do ar insaturado do ambiente e mantê-la em seu corpo (RUDOLPH; KNULLE, 1974; MCMULLEN et al., 1976; NEEDHAM; TEEL, 1991).

Quanto ao alimento ingerido pelos carrapatos Ixodidae, ele é muito variado durante a primeira fase de alimentação e compreende uma mistura de: a) componentes resultantes dos processos de inflamação dos tecido do hospedeiro, b) numerosos leucócitos c) linfa e hemácias encontrados no lúmen do seu intestino médio.

Durante as primeiras 12-24 horas após a fixação no hospedeiro (primeira fase) mudanças começam a ser observadas no epitélio do intestino médio dos carrapatos, tais como a proliferação e diferenciação das células generativas (SONENSHINE, 1991).

Os carrapatos adultos estão assim aptos a iniciar a alimentação o que ocorre logo após a esclerotização da sua cutícula, processo este que lhes atribui maior resistência aos fatores ambientais. No entanto, eles podem jejuar por vários meses antes de encontrarem o hospedeiro ideal (BALASHOV, 1972).

Enquanto encontram-se em processo de alimentação as fêmeas são fertilizadas pelos machos. Esse período dura cerca de 7 dias (depois da fixação) e os machos podem permanecer sobre o hospedeiro durante semanas acasalando várias vezes com várias fêmeas (COONS et al., 1986).

Em condições de laboratório, onde as fases de vida livre do carrapato podem ser expostas a temperaturas mais altas (ex. 27°C), as larvas não passam pelo processo de “diapausa comportamental”, e o ciclo biológico completo de *A. cajennense* é acelerado podendo ser completado em menos de quatro meses (COONS, 1986; HARRISON & FOELIX, 1999). Em condições naturais seu ciclo levaria cerca de um ano, onde os três estágios parasitários seriam marcadamente distribuídos ao longo dele (LEWIS et al., 1986; HARRISON & FOELIX, 1999; BALASHOV, 1972).

De forma geral, estudos focando a morfologia de carrapatos, principalmente a interna, além de serem escassos, limitam-se a espécies de ocorrência na África, Europa e Austrália. Espécies de maior ocorrência no Brasil, como *A. cajennense*, têm sido nesse aspecto ainda pouco estudadas. Os últimos trabalhos sobre morfologia interna de carrapatos em geral, foram os desenvolvidos por pesquisadores do BCSTM (Brazilian Central of Studies on Ticks Morphology) por Caperucci et al (2009, 2010); Denardi et

al (2004); Denardi et al (2006); Denardi et al (2007); Nunes et al (2005); Nunes et al (2006a); Nunes et al (2006b); Nunes et al (2010); Oliveira et al (2005a); Oliveira et al (2005b); Oliveira et al (2006); Oliveira et al (2007a); Oliveira et al (2007b); Ricardo et al (2007); Saito et al (2004).

O sistema digestório dos carrapatos está envolvido na digestão de somente um tipo de alimento, o sangue. Outras funções dele incluiriam o armazenamento de alimento devido à ausência de enzimas digestivas extracelulares (GRANDJEAN, 1983), de água, bem como da regulação dos íons e da excreção. O sistema digestório dos carrapatos também tem sido descrito como sendo um reservatório onde patógenos podem se desenvolver (GUSHCHINA et al., 1984; KOCAN et al., 1987; HIGUCHI, 1987).

Morfo-histologicamente o sistema digestório dos carrapatos está dividido em três regiões: intestino anterior (estomodeu), médio (mesenteron), e posterior (proctodeu) e a maioria dos estudos, especificamente com o intestino médio tratam das mudanças histológicas das células epiteliais durante a ingestão/digestão do sangue (HUGHES, 1954; TILL, 1961; CHINERY, 1964; BALASHOV, 1972; RAIKHEL, 1975a; COONS et al., 1982; TARNOWSKI and COONS, 1989).

O processo de digestão nas fêmeas de carrapatos ocorre em três fases distintas: (1) primeira fase: digestão contínua, consequência do lento ingurgitamento; (2) digestão reduzida: observada em fêmeas acasaladas durante o período de rápido ingurgitamento; (3) segunda fase da digestão contínua: observada nos períodos de: pós-alimentação, de pré-oviposição e de oviposição (SONENSHINE, 1991).

O intestino médio de carrapatos em jejum consiste de um epitélio pseudo-estratificado apoiado numa membrana basal e envolto externamente por camadas de músculos distribuídos circular e longitudinalmente (SONENSHINE, 1991).

A maioria dos autores tem descrito que o epitélio do intestino médio é composto basicamente por dois tipos de células: as generativas e as digestivas que respondem diferentemente aos estados fisiológicos dos carrapatos, podendo ser encontradas em diferentes estágios de atividade. As células digestivas têm origem à partir das generativas, que se diferenciam durante o período de alimentação (SONENSHINE, 1991).

Porém outros autores descrevem ainda a presença de outros tipos de células neste epitélio: a) as de reposição, b) as digestivas, c) as secretoras, d) as indiferenciadas e) as endócrinas e f) as vitelogênicas e, ainda segundo eles, todos estes tipos, com exceção das vitelogênicas, foram caracterizados somente pela sua morfologia (COONS et al., 1986).

Como funções das células digestivas do intestino médio tem sido descritas: a) a de absorção de componentes, especialmente de hemoglobina, por meio de receptores mediados e b) a realização da endo e da fagocitose das fases fluídas do sangue. Durante a digestão ocorrem também processos de formação e de excreção dos resíduos digestivos, pelas células digestivas (SONENSHINE, 1991).

No entanto, embora o assunto seja polêmico os autores estudiosos do assunto concordaram no aspecto de que o domínio apical das células digestivas teria microvilos, que elas se manteriam unidas por junções celulares especializadas e que ainda o domínio basal das mesmas, teria sua membrana plasmática com invaginações formando



um extenso labirinto membranoso que abrigaria inúmeras mitocôndrias (SONENSHINE, 1991).

A ingestão de células sanguíneas, macromoléculas e material líquido por endocitose nos carrapatos é considerada uma forma primitiva de alimentação, sendo rara nos artrópodes, e sendo comum apenas em carrapatos e em alguns hemípteros triatomíneos (GRANDJEAN, 1983).

Ultraestruturalmente as células do intestino médio dos carrapatos são muito complexas, refletindo assim nas suas atividades multifuncionais. Além das principais funções digestivas, as células do intestino médio servem também como um depósito de reservas nutricionais representado pela presença de inclusões intracelulares, resultado da digestão da hemoglobina do sangue do hospedeiro, bem como local armazenador de lipídeos e de carboidratos (BALASHOV, 1967; DIEHL, 1970; GRANDJEAN and AESCHLIMANN, 1973).

As células generativas do intestino médio, nos carrapatos estão presentes em número significativo durante todas as fases do ciclo digestivo. Nestas células os microvilos apicais e as reentrâncias basais estão ausentes e o alargamento do núcleo, desespiralização da cromatina, e a grande expansão do nucléolo, são estruturas que refletem o alto potencial de diferenciação destas células (SONENSHINE, 1991).

Segundo alguns estudiosos o resultado da diferenciação das células generativas seria a primeira geração composta principalmente pelas chamadas células secretoras, as quais seriam as mais abundantes durante a primeira fase do período de crescimento do indivíduo (SONENSHINE, 1991). Depois disso, elas passariam a apresentar grandes quantidades de retículo endoplasmático rugoso, regiões de Golgi, e próxima a sua membrana citoplasmática apical seriam observadas vesículas contendo material a ser

secretado. No entanto, sob essa perspectiva Coons et al. (1986) em seus estudos não encontraram células no intestino médio em adultos de *Dermacentor variabilis* as quais pudessem ser descritas como secretoras, nem, segundo eles, haveria disponível na literatura informações que apoiassem a existência das mesmas, assunto este que tem sido controverso até o momento. Outras informações ainda vem complementar que em adultos jovens de carrapatos *A. americanum* em jejum, as células secretoras do epitélio do intestino médio existiriam e conteriam grandes quantidades de ferro, sob a forma de inclusões, localizadas principalmente no seu domínio apical. Além disso, no seu domínio basal seriam observadas numerosas gotas lipídicas (JAWORSKI et al., 1983; WILLIAMS et al., 1985).

No processo de parasitismo os carrapatos, a partir do momento que entram em contato com os hospedeiros na primoinfestaç o, estimulam o sistema imune destes últimos, o que provoca altera es histológicas no trato digestório dos ectoparasitas, devido às a es conjuntas das respostas inflamatórias primária imunes humorais e celulares do hospedeiro (BECHARA, informa o pessoal).

Adicionalmente, sabe-se que animais que desenvolvem resistência aos carrapatos tornam-se menos susceptíveis às doenças infecciosas por estes veiculadas (WIKEL et al., 1997; RODRIGUEZ et al., 1995) e a utiliza o apenas de animais com resistência natural a carrapatos impede, por outro lado o aproveitamento comercial das características genéticas de produ o desejáveis de raças susceptíveis ao carrapato.

Desta forma, a busca por formas alternativas de se induzir ou aumentar a imunidade adquirida por hospedeiros de carrapatos com o uso de vacinas tem aumentado (WILLADSEN; KEMP, 1999), visto que as vacinas contra carrapatos agiriam de várias formas: a) diminuindo as infesta es e b) auxiliando no controle da

transmissão de bioagentes por esses artrópodes (RODRIGUEZ et al., 1995). No estado da arte desse tema dois conjuntos de conhecimentos são importantes para permitir o desenvolvimento de vacinas eficazes: o primeiro se refere ao conhecimento do mecanismo imune adquirido de hospedeiros e que seja eficaz contra carrapatos; o segundo diz respeito à caracterização dos mecanismos de evasão do carrapato frente aos componentes reativos do hospedeiro. No caso dos carrapatos, a saliva e o intestino seriam, indubitavelmente, as principais fontes de origem desses mecanismos de evasão (RIBEIRO, 1990).

A esse respeito, cabe salientar que para o desenvolvimento de vacinas anticarrapato para o controle imunológico, não é suficiente apenas o conhecimento da biologia do ácaro, da relação parasito-hospedeiro e dos mecanismos de resistência ao carrapato. Pesquisas sobre aspectos morfo-funcionais de tecidos e de órgãos isolados de carrapatos são cruciais para a descoberta de sítios produtores de potenciais antígenos para a produção de vacinas contra esse flagelo da pecuária nacional (WILLADSEN et al., 1999).

Na ausência de controle eficaz, economicamente são perdidos animais de produção para as doenças transmitidas por carrapatos. Acrescem-se ainda, os custos elevados dos tratamentos. Na opção pelo controle, são elevados os custos dos acaricidas, os quais são constantemente onerados com o desenvolvimento de novas fórmulas químicas necessárias, em virtude do surgimento de linhagens de carrapatos resistentes (SOLL, 1997).

## *Objetivos*

---

## 2. OBJETIVOS

Diante das informações expostas e devido às diferenças morfológicas encontradas no intestino médio de fêmeas de carrapatos da espécie *Amblyomma cajennense* em vários estágios de alimentação, o presente trabalho teve como objetivos principais:

a) analisar as alterações microscópicas que ocorrem no intestino médio de fêmeas de carrapatos *A. cajennense* em jejum, durante a alimentação e ingurgitadas em coelhos;

b) comparar as alterações celulares e tissulares que ocorrem no epitélio do intestino médio destas fêmeas em fase de alimentação e de ingurgitamento em coelhos pré-sensibilizados, aquelas obtidas a partir de coelhos primoinfectados.

c) Detectar histoquímicamente nos tecidos e células do intestino médio, através da aplicação de técnicas específicas, a presença de proteínas, carboidratos e cálcio;

d) Investigar a organização estrutural das células do intestino médio por meio das técnicas ultraestruturais de rotina, bem como detectando elementos específicos como proteínas e glicoconjugados por meio da citoquímica ultraestrutural.

## *Material e Métodos*

---



### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Material**

#### **3.2. Hospedeiros**

Neste trabalho foram utilizadas 150 coelhas com 6 meses de idade e pesando aproximadamente 1.5Kg provenientes do Biotério Central da UNESP, campus de Jaboticabal, S.P, Brasil, as quais foram, durante o experimento, mantidas em gaiolas de contenção e alimentadas com ração apropriada e água *ad libitum*.

##### **3.2.1. Carrapatos**

Cinquenta fêmeas adultas de carrapatos *Amblyomma cajennense*, em jejum, semi-ingurgitadas e ingurgitadas, foram cedidas pelo Prof. Dr. Gervásio Henrique





Bechara do Departamento de Patologia Veterinária da UNESP *campus* de Jaboticabal (SP). Para obtenção das fêmeas, objeto deste estudo, 50 machos também foram utilizados com o propósito de fecundar as matrizes, estes obtidos a partir de colônia mantida em laboratório em condições controladas em estufa BOD (29°C, 80% de umidade e fotoperíodo de 12 horas).

A liberação das fêmeas e dos machos em jejum nos hospedeiros deu-se na sala do Biotério alocada na UNESP- Rio Claro- S.P., por meio dos seguintes procedimentos:

### **3.2.2. Confeção da Câmara de Alimentação (BECHARA et al, 1995)**

Um círculo de borracha fina de 9 cm de diâmetro foi cortado e revestido com tecido de algodão, que ficou em contato com a pele do hospedeiro. Em seguida, um círculo de 3.5 cm de diâmetro foi retirado do centro daquele círculo para fixação em sua borda, com cola plástica, de um tubo plástico de 2 cm de altura, reforçado externamente com esparadrapo. Esse tubo plástico recebeu uma tampa com três furos revestida internamente com tela de nylon fino, para que os carrapatos tivessem suprimento de ar e não escapassem pelos orifícios.

### **3.2.3. Fixação da Câmara de Alimentação no Hospedeiro (BECHARA et al, 1995)**



Parte da área da região dorsal das coelhas foi tosada e recebeu uma camada da cola especial e atóxica para fixação da câmara de alimentação, em sua região revestida com tecido de algodão, que recebeu também uma camada da mesma cola. A câmara de alimentação foi fixada na pele e foi reforçada com esparadrapo, que cobriu parte da câmara e parte da região tosada.

Depois de fixada, a câmara permaneceu 24 horas destampada para eliminar o odor da cola, e apenas no dia seguinte realizou-se a liberação dos carrapatos em seu interior.

#### **3.2.4. Liberação dos Casais de *Amblyomma cajennense* na Câmara de Alimentação (BECHARA et al, 1995)**

Decorridas 24 horas da fixação da câmara nos hospedeiros, 10 indivíduos (cinco casais), foram colocados no interior de cada câmara, totalizando 750 casais (1.500 fêmeas e 1.500 machos).

A primeira observação desse microambiente foi realizada aproximadamente 8 horas após a liberação dos casais (tempo necessário para estes se acomodarem), e a partir daí de 3 em 3 horas com o intuito de acompanhar a fixação destes na pele das coelhas. De modo geral, as fêmeas, após algumas tentativas sem sucesso, se fixaram, e não se desprenderam mais até o final da alimentação, enquanto que os machos se fixavam, permaneciam se alimentando por aproximadamente 2 horas e se desprendiam, repetindo este comportamento muitas vezes, além de nos intervalos da alimentação copularem com as fêmeas.



Após 6 dias de fixação das fêmeas, algumas foram retiradas com o auxílio de pinça, para dissecação e processamento laboratorial. Por volta de 8 à 10 dias as fêmeas que ainda permaneceram se alimentando ingurgitaram e se desprenderam voluntariamente das coelhas hospedeiras. Foram realizadas três infestações em cada hospedeiro com intervalos de 30 dias.

No laboratório de Histologia do Departamento de Biologia da UNESP *campus* de Rio Claro, SP, Brasil, os carrapatos em jejum, em alimentação e alimentados foram colocados em freezer por alguns minutos para anestesia por choque térmico e, então, tiveram os intestinos retirados em solução tamponada de salina-PBS (7.5 g de NaCl + 2.38 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 2.72 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 1000 mL de água destilada) para porterior fixação e aplicação das diferentes técnicas.

### **3.3. MÉTODOS**

#### **3.3.1. Morfologia**

Para a confecção de esquemas dos intestinos dos carrapatos foram utilizadas lâminas contendo secções histológicas medianas, coradas com hematoxilina e eosina e observadas em microscópio Leica com câmara clara acoplada.

#### **3.3.2. Análises Morfológicas**

#### **3.3.3. Histologia (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983)**

##### **3.3.3.1 Inclusão em Resina (Historesina)**



Para realização da histologia foi utilizada a técnica de inclusão em historesina. Os intestinos foram retirados em solução fisiológica tamponada e fixados em solução contendo paraformaldeído 4% em tampão fosfato de Na (0.1 M pH 7.4) durante duas horas em geladeira. A seguir, o material foi desidratado em soluções crescentes de etanol a 70, 80, 90 e 95% durante 15 minutos cada banho. Logo após, foi transferido para solução de resina JB4 Polaron Instruments/ Bio Rad, durante 24 horas, em geladeira.

Posteriormente, o material foi transferido para moldes plásticos previamente preenchidos com resina contendo catalisador para a polimerização. Os moldes foram selados com suportes de madeira para posterior microtomia. Depois de polimerizados, os blocos foram seccionados com auxílio de micrótomo Sorval JB4/ Bio Rad. Os cortes com 3  $\mu$ m de espessura foram hidratados e recolhidos em lâminas de vidro que depois de secas foram coradas com hematoxilina e eosina (HE), conforme rotina histológica, para posterior observação e documentação fotográfica em fotomicroscópio MOTIC BA 300.

### **3.3.4. Histoquímica**

Para os estudos histoquímicos do intestino médio das fêmeas de *A. cajennense*, o material após dissecação, foi fixado nos diferentes fixadores, de acordo com cada técnica histoquímica aplicada.

#### **3.3.4.1. Técnica do Azul de Bromofenol para Detecção de Proteínas Totais (PEARSE, 1985)**



Os intestinos foram fixados em paraformaldeído 4% e NaCl 0.9% em tampão fosfato 10% (0.1M – pH 7.4) por 24 horas. Os cortes foram recolhidos em lâminas de vidro e corados com solução de Azul de Bromofenol à temperatura ambiente durante 2 horas, sendo em seguida banhados em solução aquosa de ácido acético 0.5%, durante 5 minutos. Logo após, as lâminas foram passadas no álcool butílico terciário por 5 minutos. Em seguida, foram secas, diafanizadas em xilol e montadas em Bálsamo do Canadá.

#### **3.3.4.2. Técnica do PAS/ Alcian Blue para Detecção de Polissacarídeos com Grupamentos 1-2 glicol e Polissacarídeos Ácidos (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983)**

Os intestinos foram fixados em Bouin aquoso por 6 horas. As secções 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 lâminas contendo as secções foram colocadas no reativo de Schiff por 30 minutos e lavadas em água corrente durante 10 minutos. A seguir, foram contra coradas com hematoxilina durante 2 minutos e lavadas em água corrente. Posteriormente, foram secas, diafanizadas em xilol e montadas em Bálsamo do Canadá.

#### **3.3.4.3. Técnica de von Kossa para Detecção de Cálcio (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA 1983)**



Os intestinos de 20 fêmeas foram fixados em paraformaldeído 4% por aproximadamente 24 horas. As lâminas contendo as secções obtidas com 3 $\mu$ 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 fotográfico Kodak D-72. Posteriormente, foram imersas em tiosulfato de sódio a 2.5% por 5 minutos e em seguida, foram diafanizadas em xilol e montadas em Bálsamo do Canadá para posterior observação e documentação fotográfica em fotomicroscópio ZEISS.

### **3.3.5. MICROSCOPIA ELETRÔNICA**

#### **3.3.5.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV):**

Os espécimens foram dissecados e os intestinos retirados e fixados em solução de Karnovsky (paraformaldeído 2% e glutaraldeído 2.5 % em tampão Sorensen 0.1M) durante 24 horas sendo logo depois lavados em água destilada.

Em seguida, os intestinos foram desidratados em soluções crescentes de acetona ( 70%, 90% e 95%), e finalmente acetona pura, cada banho com duração de 10 minutos. Logo após, o material foi processado em “Criptical Point Drying”, para completar a desidratação. Terminada esta etapa, o material foi colado em suportes de alumínio (stubs) com auxílio de fita adesiva dupla face, metalizado com ouro através de “Sputtering”, examinado e fotografado em microscópio eletrônico de varredura PHILIPS SEM 505.



### 3.3.5.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Os intestinos foram retirados em glutaraldeído 0.5% e fixados em glutaraldeído a 2.5%, 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. A pós-fixação foi realizada em tetróxido de ósmio a 1% em tampão cacodilato (0.1M pH: 7.2) durante duas horas, à temperatura ambiente, no escuro. Posteriormente, o material passou por mais duas lavagens em tampão cacodilato 0.1M por 15 minutos e foi finalmente passado em solução de álcool 10% por 15 minutos.

A contrastação deu-se em 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%) por 5 minutos em cada uma e finalmente 100%, duas vezes por 5 minutos.

Depois de desidratado, o material foi incluído em resina Epon Araldite em estufa a 60°C por 24 a 48 horas. Depois de polimerizados, os blocos foram seccionados em ultramicrótomo. Os cortes foram coletados em grades de cobre e contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo durante 45 e 10 minutos, respectivamente. As grades foram fotografadas em microscópio eletrônico de transmissão PHILIPS 100 TEM para posterior análise.



### 3.3.6. CITOQUÍMICA ULTRAESTRUTURAL

Testes citoquímicos foram aplicados para detectar em nível ultraestrutural a presença de proteínas básicas (MacRAE; MEETZ, 1970) e açúcares totais (THIÉRY, 1967).

#### 3.3.6.1. Detecção de Proteínas Básicas pelo Método da Prata Amoniacal (MacRAE; MEETZ, 1970)

Os intestinos das fêmeas de *A. cajennense* foram fixados em glutaraldeído 2.5%, lavados em água destilada, incubados durante 5 minutos à temperatura ambiente em solução de prata amoniacal (solução de nitrato de prata a 10% adicionada a uma solução concentrada de hidróxido de amônia). A seguir procedeu-se uma lavagem em água destilada e logo após os mesmos foram incubados em solução de formaldeído a 3%, durante 5 minutos, onde o material adquiriu a cor marrom.

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, 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. Procedeu-se então a inclusão em resina pura com catalisador para polimerização em estufa à 60°C por 24 horas.

Posteriormente, 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%), os ultrafinos foram coletados em grades de cobre e não passaram por contrastação, sendo diretamente observados e fotografados em microscópio eletrônico de transmissão PHILIPS CM 100.

### **3.3.6.2. Detecção de Açúcares Totais pelo Método de Thiery (1967)**

Os intestinos das fêmeas de *A. cajennense* foram preparados segundo rotina para microscopia eletrônica de transmissão. Após a ultramicrotomia, o material foi recolhido em grades de ouro, as quais flutuaram em ácido periódico a 1%, durante 15 a 20 minutos. Em seguida, foi incubado em tiosemicarbazina 1%, em ácido acético a 10%, durante 24 horas. Lavagens sucessivas em ácido acético 10%, 5% e 2% foram feitas, 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% durante 30 minutos, no escuro, à temperatura ambiente. Por fim, o material sem contrastação passou por lavagem em água destilada e foi observado e fotografado em microscópio eletrônico de transmissão PHILIPS CM 100.

*Resultados*

---



#### 4. RESULTADOS

Os resultados obtidos no presente estudo estão apresentados na forma de artigos, os quais foram submetidos e/ou já publicados em periódicos especializados na área:

**Capítulo 1:** “Histopathology and ultrastructure features of the midgut of adult females of the tick *Amblyomma cajennense* Fabricius, 1787 (Acari: Ixodidae) in various feeding stages and submitted to three infestations”. Publicado no periódico *Ultrastructural Pathology.*, v. 33, p. 249-259, 2009.

**Capítulo 2:** “Ultrastructure features of the midgut of the female adult *Amblyomma cajennense* ticks Fabricius, 1787 (Acari: Ixodidae) in several feedings stages and subjected to three infestations”. Publicado no periodic *Micron* (2010) doi:10.1016/j.micron.2010.05.015.



**Capítulo 3:** Detecção ultraestrutural de proteínas e de açúcares totais no intestino médio de fêmeas de *Amblyomma cajennense* Fabricius, 1787 (Acari: Ixodidae) em diversos estágios de alimentação e submetidas à várias infestações. Em fase de preparação para submissão.

**Capítulo 4:** Estudo histoquímico para detecção de proteínas, carboidratos e cálcio no intestino médio de fêmeas de carrapatos *Amblyomma cajennense* Fabricius, 1787 (Acari: Ixodidae), em vários estágios de alimentação e submetidos à três infestações. Em fase de preparação para submissão.

# *Capítulo 1*

---



**“Histopathology and ultrastructure features of the midgut of adult females of the tick *Amblyomma cajennense* Fabricius, 1787 (Acari: Ixodidae) in various feeding stages and submitted to three infestations”.**

Débora Caperucci <sup>1</sup>, Gervásio Henrique Bechara <sup>2</sup> and Maria Izabel Camargo Mathias <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Biociências, Departamento de Biologia, UNESP, Universidade Estadual Paulista, Avenida 24A, nº 1515, Rio Claro, S.P, Brazil, 13506-900, C. P. 0199.

<sup>2</sup> Departamento de Patologia Veterinária, FCAV, UNESP, Universidade Estadual Paulista, Via de Acesso Prof. Paulo Castellane, s/n, Jaboticabal, S.P, Brazil, 14884-900.

Artigo publicado no periódico: *Ultrastructural Pathology*, v. 33, p. 249-259, 2009.

## RESUMO

O tubo digestório do carrapato *Amblyomma cajennense*, assim como em outras espécies, também encontra-se dividido em: intestino anterior, médio e posterior e é o órgão responsável pela digestão do sangue ingerido durante o repasto no hospedeiro. No presente estudo morfo-histológico analisou-se o intestino médio de fêmeas submetidas ao jejum, ao semi e ao ingurgitamento completo em coelho hospedeiro, o qual foi submetido a três infestações. Em *A. cajennense*, o tubo digestório é longo e estreito e do intestino médio partem dois pares de divertículos que se ramificam e terminam em fundo cego. Nas fêmeas em jejum a porção anterior do intestino médio é enrugada deixando aparente a forte musculatura. Em algumas regiões do intestino médio observa-se estruturas, que são aqui descritas pela primeira vez em carrapatos, e são denominadas de nódulos, variando de arredondados a ovalados. À medida que progredem as infestações a superfície dos divertículos dos indivíduos em jejum, semi e ingurgitados de 1<sup>a</sup> e 2<sup>a</sup> infestações apresenta-se extremamente enrugada, naqueles semi ingurgitados de 3<sup>a</sup> infestação ao contrário, apresenta-se menos enrugada e naqueles ingurgitados mais lisa. A histologia do intestino médio de fêmeas em jejum mostrou a presença de um epitélio pseudo-estratificado, onde foram encontrados dois tipos de células: as **digestivas** e as **generativas**. Nas fêmeas semi ingurgitadas e ingurgitadas de 1<sup>a</sup> infestação e nas semi ingurgitadas de 2<sup>a</sup> infestação o epitélio modificou-se e apresentou estratificação. Nas fêmeas semi ingurgitadas de 2<sup>a</sup> infestação observou-se no epitélio a presença de um terceiro tipo celular: as **células secretoras**. Nas ingurgitadas de 2<sup>a</sup> infestação e nas semi ingurgitadas e ingurgitadas de 3<sup>a</sup> infestação o epitélio se encontrou totalmente

desorganizado. No lúmen do intestino médio destas fêmeas observou-se muitas esferas arredondadas de diversos tamanhos; algumas delas com estruturas fortemente coradas no seu interior sugerindo ser porções nucleares, outras, no entanto, com interior apenas preenchido por restos de citoplasma vacuolizado. Nas fêmeas ingurgitadas de 3ª infestação a membrana basal foi observada desorganizada e com invaginações na direção do epitélio. Este estudo mostrou que o epitélio intestinal sofre muitas alterações morfológicas durante o processo de alimentação dos carrapatos, submetidos a condição de reinfestação. Isso provavelmente deva-se a resposta imunológica do hospedeiro que devolve ao parasita anticorpos e adquire assim resistência aos seus produtos secretados. Os dados deste estudo mostraram também que à medida que se sucedem às infestações no mesmo hospedeiro, e este fica mais resistente, acarreta para as fêmeas dos carrapatos a necessidade de um número maior de dias para completar seu ciclo de alimentação, que em *A. cajennense* foi de 25 dias, visto que o epitélio intestinal sofre grandes alterações.

**Palavras-Chave:** *Amblyomma cajennense*; carrapatos; intestino médio; SEM; morfo-histologia; reinfestação.



# Histopathology and Ultrastructure Features of the Midgut of Adult Females of the Tick *Amblyomma cajennense* Fabricius, 1787 (Acari: Ixodidae) in Various Feeding Stages and Submitted to Three Infestations

Débora Caperucci, Biologist and  
Maria Izabel Camargo Mathias, Professor Adjunto  
Instituto de Biociências, UNESP, Universidade  
Estadual Paulista, Rio Claro, Brazil

Gervásio Henrique Bechara, Professor Titular  
Departamento de Patologia Veterinária, FCAV,  
UNESP, Universidade Estadual Paulista,  
Jaboticabal, Brazil

## ABSTRACT

The digestive tube of the tick *Amblyomma cajennense* is responsible for the digestion during feeding on the host. This study analyzed the midgut of unfed, partially engorged, and fully engorged fed females as well as three infestations in rabbits. In *A. cajennense*, the digestive tube is long and from the midgut, two pairs of diverticula ramify and lead to a blind end. In some midgut regions were observed for the first time in ticks, structures termed here “nodules.” The midgut of unfed females possesses a pseudostratified epithelium composed of digestive and generative cells. In partially engorged and engorged females at 1st infestation and partially engorged at 2nd infestation, the epithelium becomes stratified. In partially engorged females at 2nd infestation, the epithelium exhibits a third cell type: secretory cell. So the intestinal epithelium undergoes several changes during the feeding process in ticks at subsequent infestations. As infestations progress in the same host, the latter becomes more resistant and female ticks require more days to complete their feeding cycle, which in *A. cajennense* is 25 days.

**Keywords:** *Amblyomma cajennense*, midgut, morpho-histology, reinfestation, SEM, ticks

The cayenne tick *Amblyomma cajennense* is of great economic and sanitary importance as it causes serious damage in cattle, horses, and dogs, as well as a concern in public health as the vector of *Rickettsia rickettsi*, the causative agent of the spotted fever. This species is obligate hematophagous and requires feeding in three hosts [1]. Morpho-histologically, the digestive system of

ticks exhibits three divisions: foregut (stomodeum), midgut (mesenteron), and hindgut (proctodeum). The foregut and hindgut are of ectodermic origin, while the midgut arises from the endoderm [2]. Histologically, the midgut consists of an epithelium that lies on the basal membrane surrounded by layers of circular and longitudinal muscles [3].

Received 3 April 2009; accepted 30 August 2009

Address correspondence to Maria Izabel Camargo Mathias, Instituto de Biociências, Departamento de Biologia, UNESP, Universidade Estadual Paulista, Avenida 24A, no. 1515, Rio Claro, S.P., 13506-900, C. P. 0199, Brazil. E-mail: micm@rc.unesp.br

This research has been supported by FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) Grant no 05/57707-2. The authors thank Cristiane Marcia Milléo, Gerson Mello Souza, and Ronaldo Del Vecchio for technical support. Part of this work has been facilitated through the International Consortium on Ticks and Tick-borne Diseases (ICTTD-3) Coordination Action financed by the INCO Program of the European Commission Project No 510561.

## D. Caperucci et al.

The midgut is responsible for the digestion of all the blood ingested during the feeding on the host. The digestion in ticks is a very slow intracellular process [4–6]. The digestion of blood cells, macromolecules, and fluids that occurs by endocytosis is considered very primitive, and rare in arthropods, observed only in ticks and some hemipterans [7]. The midgut of ticks consists of a central ventriculus (stomach), several diverticula or ceca that extend toward the three planes of the body, almost filling the entire cavity, in addition to a narrow and long “tube” through which nondigested residues are passed to the hindgut [3].

According to some authors, the midgut epithelium consists of two basic cell types: undifferentiated or generative, and digestive cells that respond differently to the physiological conditions of ticks and can be found in different stages of activity. Digestive cells originate from generative ones, which differentiate during the feeding period [3]. Other authors, however, consider six types of cells in the midgut of ticks: (1) regenerative, (2) digestive, (3) secretory, (4) undifferentiated, (5) endocrine, and (6) vitellogenic. All types, except vitellogenic ones, are characterized only by their morphology. Generative cells are undifferentiated cells that can originate other cell types and are located near the basal membrane [6].

It is worth pointing out that for the development of anti-tick vaccines for immunological control, knowledge of the biology of the tick, of the host–parasite interaction, and mechanisms of resistance to the tick is not enough. Research on morpho-functional aspects of tissues and isolated organs are crucial to find potential antigen-producing sites for the production of vaccine against this plague that afflicts the Brazilian livestock.

In the absence of an efficient control, tick-borne diseases cause economic losses in terms of productive animals, as well as high costs of treatments and significant decrease in milk production, meat, wool, and depreciation of leather of infested animals. When control is practiced, costs of acaricides are high and the development of new chemicals due to acaricide resistance is required [8]. Thus, the present study aimed at describing the morphological changes undergone in the midgut of *Amblyomma cajennense* females ticks in different feeding conditions—unfed, partially engorged, and engorged infesting rabbits—to examine the cellular changes undergone at the midgut, comparing individuals fed at first, second, and third infestations.

## MATERIAL AND METHODS

For this study, adult females of *Amblyomma cajennense* were examined in the following conditions: unfed, semi-engorged, and engorged. Specimens were provided by

Gervásio Henrique Bechara of the Department of Veterinary Pathology of UNESP Jaboticabal campus (São Paulo State) from a colony maintained in laboratory under controlled conditions in a BOD incubator (29°C, 80% humidity, and 12:12-h light/dark cycle). A group of unfed females was allowed to feed on the host (rabbit).

Part of the dorsal region of the host was shaved and special nontoxic glue (Britannia Adhesives-Unit 4, UK) was applied to attach a feeding chamber, as described by Bechara et al. [9]. Specimens (5 couples) were placed in the feeding chamber upon completion of 24 h after the attachment. In general, female ticks, after a few tries, attached to the host and did not detach until the end of feeding, while males attached, fed for a short period of time and detached, repeating this behavior several times to continue mating with females. After 6 days of attachment, some females were removed with tweezers. Between days 8 and 10 of feeding, the females that remained feeding were fully engorged and voluntarily detached from the host. A total of three infestations at 30-day intervals was conducted.

At the laboratories of the Department of Biology of UNESP, Rio Claro campus, unfed, partially engorged, and engorged ticks were anesthetized by thermal shock in a freezer for a few minutes. Intestines were removed in buffered saline solution (PBS, 7.5 g of NaCl + 2.38 g of Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 2.72 g of KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 1000 mL of distilled water), fixed, and prepared for the following techniques.

## Morphology

To produce schematic diagrams, glass slides with histological sections of the midgut of *A. cajennense* females stained with hematoxylin and eosin were observed under a Leica microscope with camera lucida.

## Scanning Electron Microscope (SEM)

Specimens were dissected and the intestines were removed and fixed with Karnovsky's solution (paraformaldehyde 2% and glutaraldehyde 2.5% in 0.1 M Sorensen buffer) for 24 h. The material was then rinsed with distilled water and dehydrated in a graded series of acetone (70, 90, 95, and 100%), in baths of 10 min each. Following critical point drying to complete dehydration, the material was glued in stubs with the aid of double-face adhesive tape, sputtered with gold, and examined and photographed with a scanning electron microscope PHILIPS SEM 505.

## Histology

The intestines were removed in buffered physiological solution and fixed in solution of 4% paraformaldehyde

in phosphate buffer of Na (0.1 M, pH 7.4) during 2 h in the refrigerator. Upon completion of this time the material was dehydrated in a graded series of ethanol 70, 80, 90, and 95% in baths of 15 min each, and transferred to a solution of resin JB4 Polaron Instruments/Bio Rad, for 24 h in the refrigerator. Samples were transferred to plastic molds previously filed with resin containing a catalyzer for polymerization. After polymerization, blocks were sectioned with a Sorvall JB4/Bio Rad microtome at 6  $\mu$ m of thickness and transferred to glass slides. After drying, slides were stained with hematoxylin and eosin (HE), following histological routines for later examination and documentation.

## RESULTS

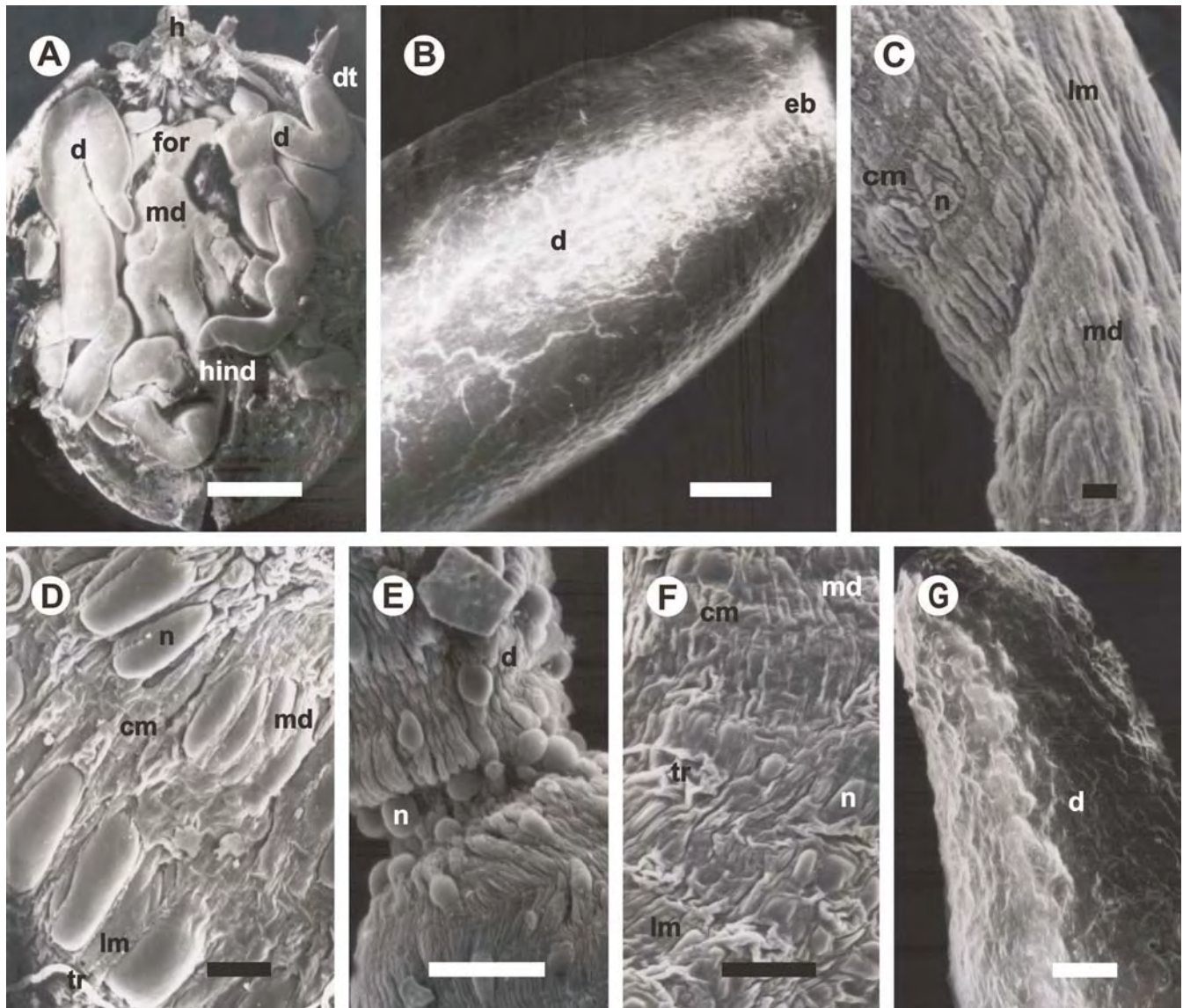
The ultramorphological results revealed that the digestive tube of *Amblyomma cajennense* females consists of three distinct regions: foregut, midgut, and hindgut. It is a long and narrow tube with two pairs of diverticula that arise from the midgut, ramify, and expand laterally in different directions, forming infoldings to fit inside the animal's body (Figure 1A). All diverticula are blind ended (Figure 1B). In this study, the midgut of females were analyzed morphologically in the following feeding conditions—unfed, partially engorged, and fully engorged—and at three infestations. In unfed females, the surface of the anterior portion of the midgut is wrinkled due to the presence of strong circular and longitudinal muscles (Figure 1C). In some regions of the midgut, round to oval-shaped structures termed nodules are observed, as first reported and named by Caetano et al. [10] in insects. Nodules are more abundant in the anterior portion of the midgut (Figure 1D).

Regarding diverticula, as infestations progress, a few differences are observed on their surface. In unfed females and partially engorged and engorged females at 1st and 2nd infestations (Figure 1E-G), diverticula are extremely wrinkled with clearly visible strong muscles. In partially engorged females at 3rd infestation, the surface of diverticula is less wrinkled, and in engorged females, the surface of diverticula is smoother. In partially engorged and engorged females at 1st infestation, nodules are located mainly in the anterior portion of the midgut, as also observed in unfed females. In partially engorged females at 1st infestation, nodules are larger and dilated, probably due to a larger amount of food present in the gut. In partially engorged females at 2nd infestation, nodules become more evident and dilated (Figure 1D) and in engorged females at 2nd infestation, the aspect of the nodules completely changes, becoming extremely wrinkled (Figure 1H). In partially engorged females at 3rd infestation, the aspect of nodules still is wrinkled,

similar to those of engorged females at 2nd infestation, and in engorged females at 3rd infestation, nodules are completely wrinkled (Figure 1I). The surface of the anterior and posterior portions of the midgut of partially engorged individuals is smooth with muscle fibers oriented in several directions surrounding the entire structure. In engorged individuals at 1st and 2nd infestations and partially engorged ones at 3rd infestations, the surface is wrinkled due to the presence of a circular and longitudinal muscles. Some regions of the surface of the midgut of engorged females at 3rd infestation are less wrinkled compared to those of previous stages. In the lumen of the median portion of the midgut, some blood elements (erythrocytes) from the host are observed (Figure 1K). Ramifications of tracheoles are observed reaching the surface of the entire gut (Figure 1J), as well as diverticula. To better compare the results obtained in different feeding conditions and successive infestations, ultramorphological data are summarized in Table 1.

The histological results revealed that the midgut of unfed females is lined by a pseudostratified epithelium (Figure 3A, B), with cells possessing round or oval nuclei in different positions. In this stage, two cell types are observed: digestive cells, which are larger, prismatic, with large amounts of vacuoles not stained by hematoxylin and eosin; and generative or undifferentiated cells, which are smaller, cubic, with round nuclei and highly vacuolated cytoplasm (Figures 2A, 3A).

In partially engorged individuals at 1st infestation, the epithelium is stratified with nuclei, usually spherical, and cytoplasm is less vacuolated than that of unfed individuals. More vacuoles are observed in the apical area of digestive cells. In the lumen, large spheres with smooth surface containing vacuoles not stained with hematoxylin or eosin are present as well as round structures strongly stained with hematoxylin, suggesting remnants of cell nuclei. Muscle layers with flat nuclei are observed (Figure 3C). In engorged females at 1st infestation, the epithelium is stratified with cells ranging from cubic to cylindrical. The latter are positioned near the lumen and exhibit spherical to oval nuclei with condensed heterochromatin. Cells of basal layers (probably undifferentiated) possess intensely hematoxylin-stained cytoplasm and some weakly stained vacuoles. Cells of the layers closer to the lumen exhibit cytoplasm highly vacuolated and weakly stained with the dyes tested. In the apical region of cells of the layer closer to the lumen, probably digestive cells, more vacuoles are observed. Some cells seem to be still releasing vesicles that detach from the epithelium toward the lumen, as round spheres of various sizes. In addition, some of latter are strongly stained, suggesting nuclear remnants. Others, however, contain only material resembling remnants of



**Figure 1.** Scanning electron microscopy (SEM) of the midgut of females of the tick *A. cajennense*. (A) Overview of the digestive tube (dt), note hipostome (h) with diverticulum (d), arising from the midgut (md), foregut (for), and hindgut (hind). Bar: 20  $\mu$ m. (B) Detail of the final portion of the diverticulum (d) of engorged female at 3rd infestation showing blind end (eb). Bar: 15  $\mu$ m. (C) Wrinkled surface of the anterior portion of the midgut (md) of unfed females. Note strong longitudinal (lm) and circular (cm) muscles, and nodules (n). Bar: 10  $\mu$ m. (D) Detail of nodules (n) on the surface of the midgut (md) of partially engorged females at 2nd infestation. Note ramifications of tracheoles (tr). lm, longitudinal muscle; cm, circular muscle. Bar: 10  $\mu$ m. (E) Surface of the diverticulum (d) of partially engorged females at 3rd infestation. Nodules (n) are present. Bar: 10  $\mu$ m. (F) Surface of the midgut (md) of semi-engorged females at 2nd infestation with longitudinal (lm) and circular (cm) muscles. Ramifications of tracheoles (tr) are observed reaching the surface of the gut (md). Presence of nodules (n). Bar: 10  $\mu$ m. (G) Overview of the surface of the diverticulum (d) of engorged females of at 2nd infestation. Bar: 10  $\mu$ m. (H) Anterior portion of the midgut (md) of engorged females at 2nd infestation with wrinkled surface with more (sw), due longitudinal (lm) and circular (cm) muscle layers, and presence of nodules (n). Bar: 30  $\mu$ m. (I) Surface of the anterior portion of the midgut (md) of engorged females at 3rd infestation showing muscle layers (lm, cm) and nodules (n) completely wrinkled. Bar: 10  $\mu$ m. (J) Overview of the wrinkled surface (sw) of the midgut (md) of engorged females at 1st infestation showing muscles (lm, cm), nodules (n), and tracheoles (tr) on its surface. Bar = 20  $\mu$ m. (K) Lumen of the midgut (md) of partially engorged females at 1st infestation, containing erythrocytes (h) from the host's blood, (tr) ramifications of tracheoles on the outer surface. Bar = 20  $\mu$ m.

vacuolated cytoplasm. Muscle layers are thick with intensely hematoxylin stained fibers and nuclei. The peritrophic membrane is located above the epithelium (Figures 2B, 3D, E).

In partially engorged individuals at 2nd infestation, the epithelium is stratified (Figure 3F). For the first time in this species, a third cell type, the secretory cell, is observed in these individuals. These are round to

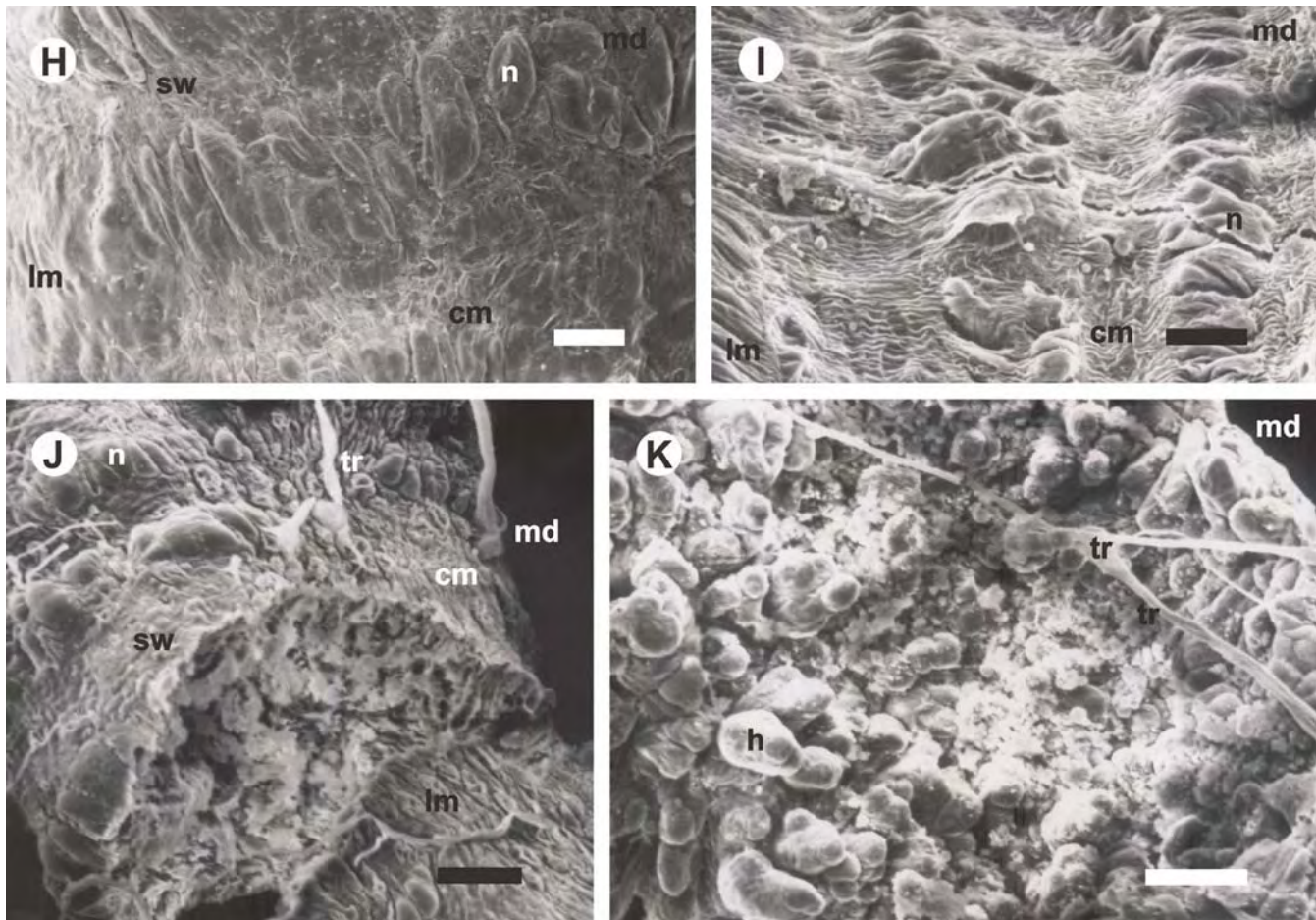


Figure 1. Continued.

elliptical cells located always between digestive cells (Figure 3G). In engorged females at 2nd infestation, the epithelium is completely disorganized and cells no longer form layers. Most nuclei are round with granular chromatin. In the lumen of the midgut of these individuals several spheres of various sizes are observed. The basal membrane is thick with invaginations. The muscle layer that supports this epithelium is thin (Figures 2C, 3H). In partially engorged females at 3rd infestation, the epithelium is disorganized; nuclei are evident, still round with condensed heterochromatin and vacuolated cytoplasm. The muscle layer exhibits strongly stained nuclei (Figure 3I). In engorged females at 3rd infestation, the epithelium does not form layers and is disorganized, some nuclei possess granular chromatin, and the cytoplasm of cells are still intact, containing many weakly stained vacuoles. In the lumen, intensely hematoxylin-stained spheres of various sizes are present. The basal membrane is completely disorganized with invaginations toward the epithelium. Muscle layers are clearly visible (Figures 2D, 3J, K).

For better comparison of results obtained for the different feeding conditions and the successive infestations, histological data are summarized in Table 2.

## DISCUSSION

The present study reports the morphology of the midgut of females of the tick *Amblyomma cajennense* using scanning and light microscopy and describes the changes undergone during the feeding period, which become more pronounced with reinfestations. These ultramorphological studies on the digestive tube of females of this tick showed three distinct regions—foregut, midgut, and hindgut—as observed for other species of the family Ixodidae, such as in the genus *Haemaphysalis*, as well as of the family Argasidae, such as in the genus *Ornithodoros* [3]. Our findings also confirm those obtained by Harrison and Foelix [11], which demonstrated that the foregut is the upper portion of the digestive tube, located near the mouth (hypostome), followed by the midgut, and the hindgut, which is located near the rectal bulb and the rectum, where nondigested materials are passed to.

The data obtained on the midgut and the two pairs of diverticula confirm those by [12–14]. Ludwig and Alberti [12] reported the presence of diverticula arising from the midgut in the harvestmen *Phalangium opilio*, while [13] demonstrated that diverticula and their

Table 1. Summary of ultramorphological results of the midgut of females of the tick *Amblyomma cajennense*

		Feeding stages										
		Unfed			Partially engorged			Engorged				
		1st infestation	2nd infestation	3rd infestation	1st infestation	2nd infestation	3rd infestation	1st infestation	2nd infestation	3rd infestation		
Midgut	Surface	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
	Nodules	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
	Muscles	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
Diverticulum	Surface	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
	Nodules	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
	Muscles	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×

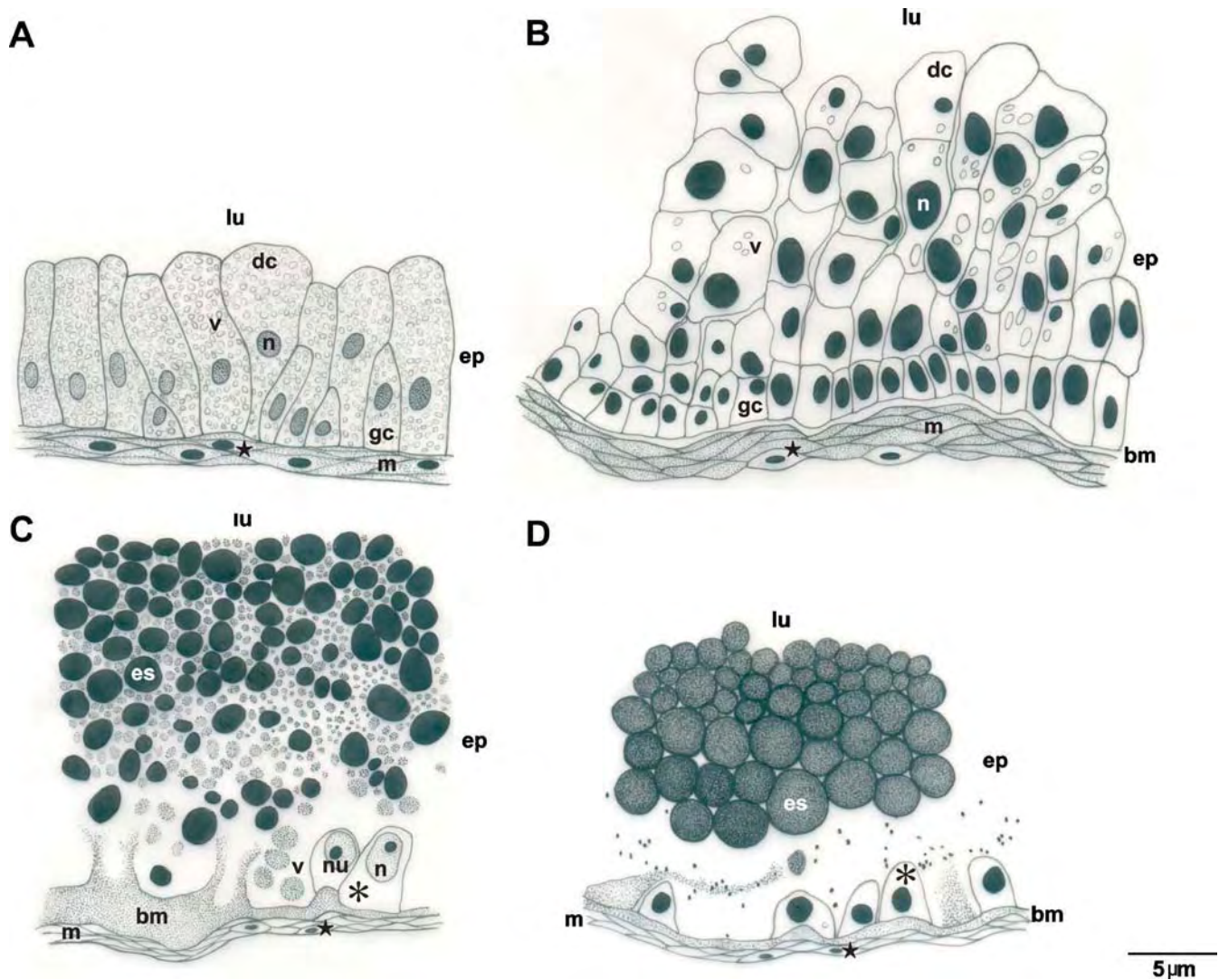
ramifications, when present, are blind ended. Harrison and Foelix [11] and Sauer and Hair [14] observed the same number of diverticula (2–4 pairs), in the tick *Dermacentor variabilis* and in insects of the order Orthoptera, respectively.

In the present study, 4 diverticula were observed branching in 2, in a total of 8 branches, which are not very long, unlike the reported in the literature for other species, with some of them with very long ramifications, such as *O. savignyi* and *O. moubata* [3, 5, 15]. In unfed *A. cajennense* females as well as those in different feeding conditions, the intestine is externally surrounded by strong muscles arranged in a longitudinal layer and outer circular one. These data confirm those obtained by Sonenshine [3] and by Caetano and Zara [16], who also observed a layer of strong muscles in *O. moubata* ticks and *Neoponera villosa* ants, respectively. These authors suggested that these muscles may play a role in involuntary peristaltic movements responsible for passing the food along the digestive tube. This role could be also played by the strong muscles surrounding the midgut of the female ticks examined in this study.

In this study, protuberances, called nodules here, are observed on the surface of the midgut, especially in the anterior portion and on diverticula. The presence of these structures was reported for the first time in the midgut of the dipterans *Anastrepha fraterculus* and *Ceratitis capitata*, and were termed as nodules by Caetano et al. [10]. Thus, our study describes and reports for the first time the presence of nodules in the gut of ticks, another group of Arthropoda, other than insects. Our data indicate that these nodules probably arise from filled spaces between circular and longitudinal muscle fibers around the intestine. Their aspect (more or less turgid) might be due to the amount of food in the gut.

Comparing the surface of the digestive tube of *A. cajennense* females in different feeding conditions and at different infestations, it is clear that the nodules observed on the surface of the gut undergo morphological changes, reflecting the amount of blood present in the digestive tube. Thus, in partially engorged and engorged females at 1st infestation and partially engorged females at 2nd infestation, nodules are larger and more dilated due to larger amounts of food. On the other hand, in engorged females at 2nd infestation and engorged females at 3rd infestation, the surface of the nodules is wrinkled, resulted from the small volume of blood in the digestive tube, probably due to the little ingestion of blood, as a consequence of the resistance acquired by the host due to successive infestations.

When analyzed histologically, changes in the midgut of *A. cajennense* females examined in the different conditions are also observed. In unfed females, the epithelium of the midgut is pseudostratified composed of two

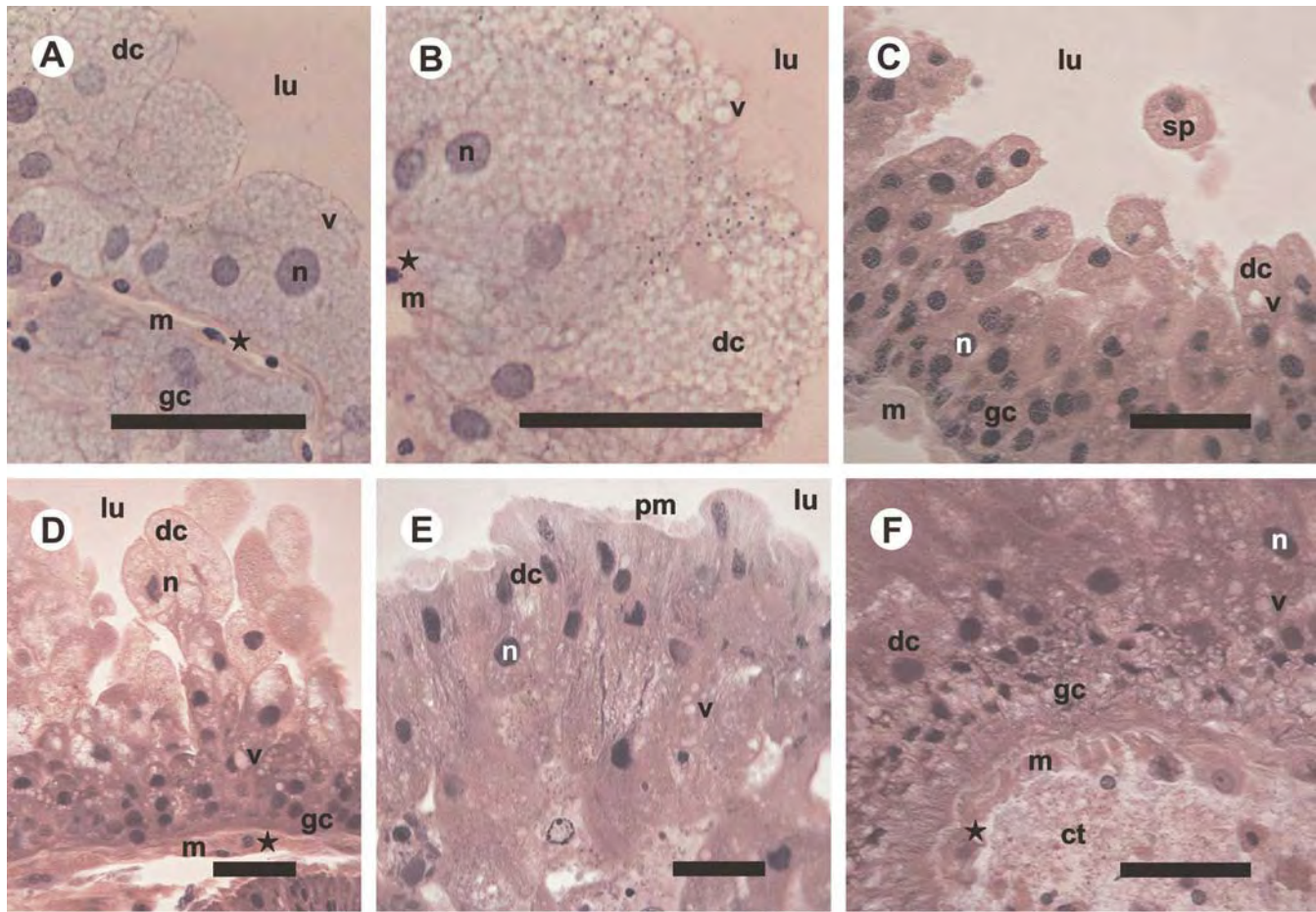


**Figure 2.** Schematic drawing of histological changes undergone by the midgut of females of the tick *A. cajennense* in three feeding conditions (unfed, partially engorged, and engorged). (A) Unfed females with pseudostratified epithelium (ep) comprising digestive cells (dc) and generative cells (gc) containing large amounts of cytoplasmic vacuoles (v). Muscle fibers (m) with their corresponding nuclei (★). n, nuclei of epithelial cells; lu, lumen. Bar: 5 µm. (B) Engorged female at 1st infestation. The epithelium (ep) is stratified with digestive cells (dc) and generative cells (gc). Only digestive cells (dc) exhibit vacuoles (v). lu, lumen; bm, basal membrane; m, muscle layer; ★, nucleus of muscle fiber. Bar: 5 µm. (C) Engorged female at 2nd infestation. The stratified epithelium (ep) becomes disorganized. Fragmented cells release in the lumen (lu) spheres (es) of various sizes. Some nuclei (n) possess nucleoli (nu) and are observed only in a few intact cells (\*). bm, basal membrane; m, muscle layer; ★, nucleus of muscle fiber; v, vacuoles. Bar: 5 µm. (D) Engorged female at 3rd infestation. The epithelium (ep) is completely disorganized. Large amounts of spheres (es) of various sizes are observed in the lumen (lu). The basal membrane (bm) exhibits invaginations due the complete disorganization. ★, nucleus of muscle fiber; m, muscle layer; \*, intact cells. Bar: 5 µm.

types of cells (generative and digestive), both with large quantities of vacuoles. These data confirm those obtained by Harrison and Foelix [11] and Sonenshine [3], in the ticks *D. andersoni* and *D. variabilis*.

The digestive cells are, according to the literature, the main cells of the midgut epithelium, responsible for the production and secretion of digestive enzymes and for the absorption of water and digestive substances [11]. In addition, in unfed individuals these cells could be synthesizing elements probably used when the tick

begins feeding [11]. Generative cells were also reported by Cruz-Landim et al. [17] in *Melipona quadrifasciata* bees, equivalent to the stem cells, responsible for replacing other cell types of the epithelium, which undergo natural degeneration due to their activities and aging, thus renovating the epithelium through divisions and differentiation. These results confirm those by Caetano [18] and Ludwig and Alberti [12] in ants of the subfamily Myrmicinae and the harvestmen *Phalangium opilio*, respectively, in which the gut epithelium also consists of digestive and generative cells.



**Figure 3.** Histological sections of the midgut of females of the tick *A. cajennense*. (A) Unfed females exhibit pseudostratified epithelium with digestive (dc) and generative cells (gc), containing large amounts of cytoplasmic vacuoles (v) and round nuclei (n), lu, lumen; m, muscle layer; ★, nucleus of muscle fiber. Bar: 10  $\mu$ m. (B) Unfed female. Detail of digestive cells (dc) with large numbers of vacuoles (v). lu, lumen; m, muscle layer; ★, nucleus of muscle fiber; n, nucleus. Bar: 10  $\mu$ m. (C) Partially engorged female at 1st infestation. Detail of digestive (dc) and generative cells (gc) with large quantities of vacuoles (v). Note the presence of spheres (sp) in the lumen (lu) of the gut. n = nuclei of epithelial cells; m, muscle layer. Bar: 50  $\mu$ m. (D) Engorged female at 1st infestation. Stratified epithelium with digestive (dc) and generative cells (gc), both with large amounts of vacuoles (v). The muscle layer (m) is thick. lu, lumen; n, nucleus of epithelium; ★, nucleus of muscle fiber. Bar: 10  $\mu$ m. (E) Engorged female at 1st infestation. Detail of another region of midgut showing digestive (dc), with vacuolated cytoplasm (v) and nuclei (n) with condensed chromatin. Note the presence of peritrophic membrane (pm) between the epithelium and lumen (lu) of the gut. Bar: 10  $\mu$ m. (F) Partially engorged female at 2nd infestation. Stratified epithelium with digestive (dc) and generative cells (gc) with many vacuoles (v). Note the presence of connective tissue (ct) underneath muscle layer (m). n, nucleus; ★, nucleus of the muscle fiber. Bar: 50  $\mu$ m. (G) Partially engorged female at 2nd infestation. Detail of secretory cells (sc) with cytoplasmic granules (g). v = vacuole; dc = digestive cell; n = nucleus. Bar: 10  $\mu$ m. (H) Engorged female at 2nd infestation. Detail of the disorganized epithelium of the intestine with an intact cell (\*). Disorganized basal membrane (bm). v, vacuoles; dc, digestive cells; sp, spheres; n, nucleus; nu, nucleolus. Bar: 10  $\mu$ m. (I) Partially engorged female at 3rd infestation. Disorganized midgut epithelium with cell vacuoles (v). Some nuclei (n) are undergoing piknosis. The muscle layer (m) is relatively thick. pm, peritrophic membrane; ★, nucleus of the muscle layer. Bar: 50  $\mu$ m. (J, K) Engorged female at 3rd infestation. Disorganized epithelium with large amounts of vacuoles (v) and some piknotic nuclei (n). Detail of the lumen with many spheres (sp) of various sizes. bm, basal membrane; m, muscle layer. Bars: J = 10  $\mu$ m; K = 10  $\mu$ m.

On the other hand, [11], examining *O. moubata* and *D. variabilis* ticks, reported other cell types in addition to digestive and generative cells, such as vitellogenic and endocrine cells [11].

Unlike unfed females, in the midgut of partially engorged and engorged females of *A. cajennense* at 1st

infestation, a stratified epithelium is observed replacing the pseudostratified epithelium observed in the former. In this epithelium, digestive and generative cells are also observed. Specifically in engorged females at 1st infestation, the apical region of digestive cells is constricted, resulting in the release of spheres enclosed by membranes into the lumen of the gut with



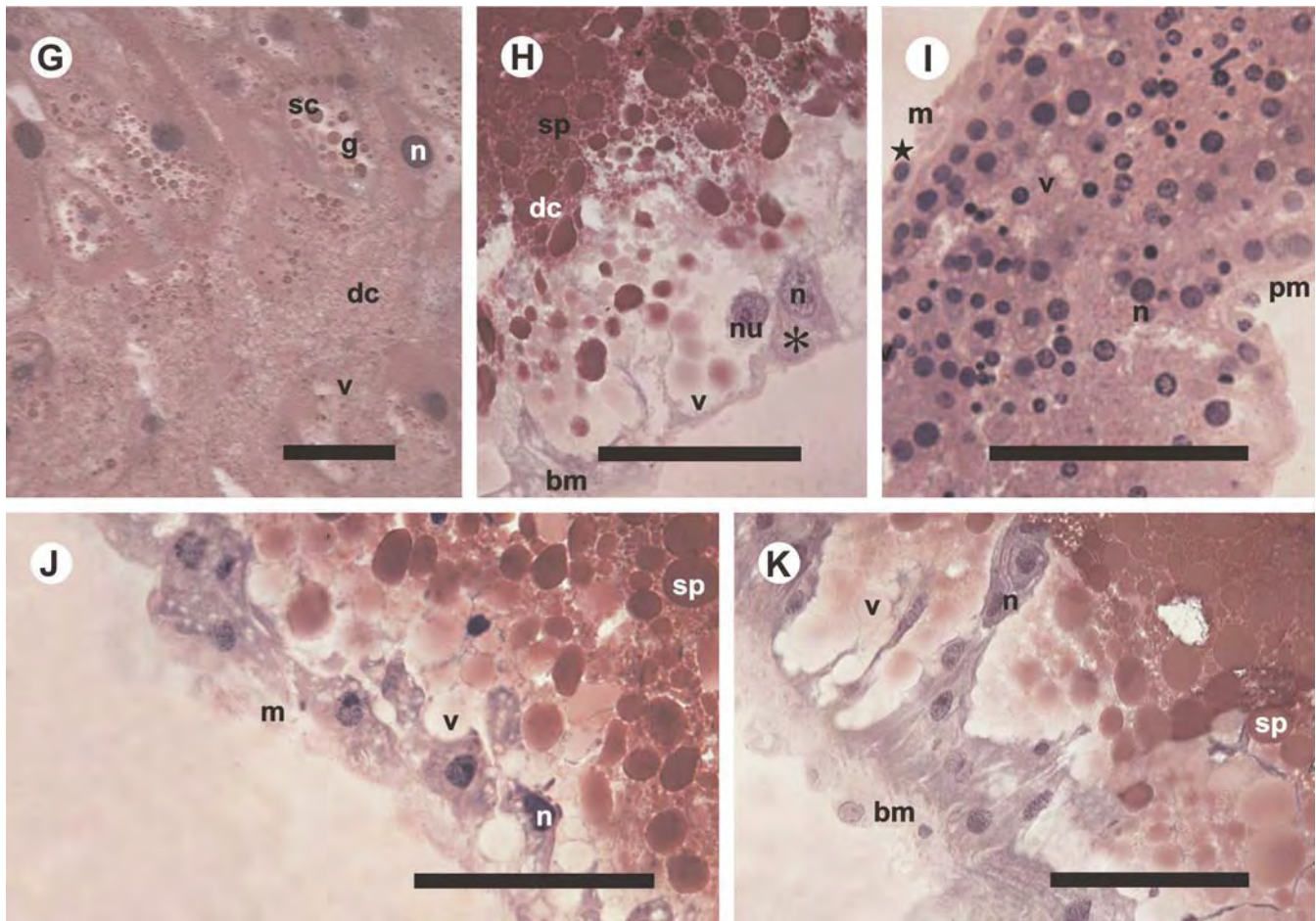


Figure 3. Continued.

small amounts of cytoplasm, characterizing an apocrine secretion, as observed by Caetano et al. [19]. These authors also suggested that spheres detach and migrate to the lumen of the gut, where different stages of lysis may be observed in the midgut of *Pachycondyla striata* ants.

The data obtained for partially engorged *A. cajennense* females at 2nd infestation revealed that the epithelium remains stratified, but a third cell type is observed: the secretory cell, rarer in the midgut epithelium than other cells types. Several studies have been conducted seeking to describe the morphology of these cells, as well as their role [11]. Harrison and Foelix [11] also observed the presence of secretory cells in the region near the lumen of the gut. According to these authors, these cells, when compared to generative and digestive cells of the midgut epithelium, exhibit a narrower basal portion and a wider apical portion. The latter frequently exhibits microvilli toward the lumen of the midgut. The cytoplasm possesses numerous secretion granules, which are released during or after a blood meal to aid the digestion of blood. Also according to these authors the secretory cells are more

similar among themselves when compared to digestive cells [11].

In engorged females of *A. cajennense* at 2nd infestation, the gut epithelium is completely disorganized and cells do not form layers. This has not been reported in the literature for other ticks. Also, in these females, the basal membrane exhibits invaginations, confirming the observations by Caetano et al. [19], who reported the presence of numerous invaginations in this membrane in the intestine of *P. striata* ants and associated this morphology with the absorption of substances of the hemolymph. A different role must be played by the invaginations of the basal membrane in the midgut of *A. cajennense* females, since the midgut suffered epithelial disorganization provided by host response.

In partially engorged and engorged females of *A. cajennense* at 3rd infestation, the epithelium is disorganized as well and has not been reported in the literature for other ticks. This disorganization might also due to the action of antibodies against the intestine of ticks that remained feeding on the host that has been subjected to many infestations. In all conditions

Table 2. Histological results of the midgut of females of the tick *Amblyomma cajennense*.

Structures		Feeding stages									
		Unfed			Partially engorged			Engorged			
		1st infestation	2nd infestation	3rd infestation	1st infestation	2nd infestation	3rd infestation	1st infestation	2nd infestation	3rd infestation	
Muscle around the intestine	Smooth Thick	× (Fig. 3A, B)	× (Fig. 3C)	× (Fig. 3F)	× (Fig. 3I)	× (Fig. 3D)	× (Fig. 3H)	× (Fig. 3J, K)	× (Fig. 3I)	× (Fig. 3H)	× (Fig. 3J, K)
Epithelium	Stratified	× (Fig. 3A, B)	× (Fig. 3C)	× (Fig. 3F)	× (Fig. 3I)	× (Fig. 3D)	× (Fig. 3H)	× (Fig. 3J, K)	× (Fig. 3I)	× (Fig. 3H)	× (Fig. 3J, K)
Cell cytoplasm	Pseudostratified	× (Fig. 3A, B)	× (Fig. 3C)	× (Fig. 3F, G)	× (Fig. 3I)	× (Fig. 3D, E)	× (Fig. 3H)	× (Fig. 3J, K)	× (Fig. 3I)	× (Fig. 3H)	× (Fig. 3J, K)
Cell nucleus	With Vacuoles	× (Fig. 3A, B)	× (Fig. 3C)	× (Fig. 3F, G)	× (Fig. 3I)	× (Fig. 3D, E)	× (Fig. 3H)	× (Fig. 3J, K)	× (Fig. 3I)	× (Fig. 3H)	× (Fig. 3J, K)
	With Granules	× (Fig. 3A, B)	× (Fig. 3C)	× (Fig. 3F, G)	× (Fig. 3I)	× (Fig. 3D, E)	× (Fig. 3H)	× (Fig. 3J, K)	× (Fig. 3I)	× (Fig. 3H)	× (Fig. 3J, K)
	Spherical Irregular	× (Fig. 3A, B)	× (Fig. 3C)	× (Fig. 3F, G)	× (Fig. 3I)	× (Fig. 3D, E)	× (Fig. 3H)	× (Fig. 3J, K)	× (Fig. 3I)	× (Fig. 3H)	× (Fig. 3J, K)
	Euclromatin	× (Fig. 3A, B)	× (Fig. 3C)	× (Fig. 3F, G)	× (Fig. 3I)	× (Fig. 3D, E)	× (Fig. 3H)	× (Fig. 3J, K)	× (Fig. 3I)	× (Fig. 3H)	× (Fig. 3J, K)
	Heterochromatin										
	Nucleolus			× (Fig. 3F)	× (Fig. 3I)	× (Fig. 3D, E)	× (Fig. 3H)	× (Fig. 3J, K)	× (Fig. 3I)	× (Fig. 3H)	× (Fig. 3J, K)

examined in our study, the muscle layers support the different types of epithelium. This is in agreement with the reported for most ixodid and argasid ticks, which also have muscle layers supporting the intestinal epithelium [3].

In this study, we observed that the intestinal epithelium undergoes several morphological changes during the feeding process, especially during reinfestation. This might be due to an immunological response of the host that releases antibodies to the parasite, which thus acquires resistance to the products secreted by the digestive tube and salivary glands of the tick. These data confirm those obtained by Kemp et al. [20] that demonstrated that 60% of *Boophilus microplus* females did not become fully engorged due to changes in the intestine, and were not able to produce eggs. The changes observed in the gut epithelium of the ticks examined in this study, fed as sequential infestations, confirm the data in the literature demonstrating that previously infested hosts produce antibodies against antigens from the tick intestine [21, 22]. The data obtained to the present study revealed that as tick infestations progress in the same host, the host becomes more resistant. *A. cajennense* female ticks, in turn, require more days to complete their feeding cycle (25 days), due to the major changes that occur in the gut epithelium.

**Declaration of Interest:** The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

## REFERENCES

- Flechlmann CHW. *Ácaros de Importância Médico-Veterinária*. São Paulo: Nobel; 1990.
- Aeschlimann A. Développement embryonnaire d' *Ornithodoros moubata* (Murray) et transmission transovarienne de *Borellia duttoni*. *Acta Trop*. 1958;15:15–64.
- Sonenshine DE. *Biology of Ticks, vol 1*. New York: Oxford University Press; 1991.
- Arthur DR. *Ticks: A Monograph of the Ixodoidea: On the Genera Dermacentor, Anocentor, Cosmiomma, Boophilus e Margaropus*. London: Cambridge University Press; 1960.
- Balashov YS. A translation of bloodsucking ticks (Ixodidae) vectors of diseases of man and animals. *Misc Publ Entomol Soc Am*. 1972;8:161–376.
- Grandjean O, Aeschlimann A. Contribution to the study of digestion in ticks: histology and fine structure of the midgut epithelium of *Ornithodoros moubata* Murray (Ixodoidea, Argasidae). *Acta Trop*. 1973;30:193–212.
- Grandjean O. Blood digestion in *Ornithodoros moubata* Murray sensu stricto Walton females (Ixodoidea: Argasidae) II. Modifications of midgut cells related to the digestive cycle and to the triggering action of mating. *Ann Parasitol Hum Comp*. 1983;58:493–514.
- Soll MD. The future of anthelmintic therapy from an industry perspective. In: Van Wyk JA, Van Schalkwyk PC, eds. *Workshop Held at International Conference of the WAAVP*. 16, Sun City, South Africa: Managing Anthelmintic Resistance in Endoparasites; 1997.

## Midgut Features of the Tick *Amblyomma cajennense*

9. Bechara GH, Szabó MPJ, Ferreira BR, Garcia MV. Rhipicephalus sanguineus tick in Brazil: feeding and reproductive aspects under laboratorial conditions. *Bras J Vet Parasitol.* 1995;4(2):61-66.
10. Caetano FH, Solferini VN, Britto FB, et al. Ultra morphology of the digestive system of *Anastrepha fraterculus* and *Ceratitis capitata* (Diptera Tephritidae). *Braz J Morphol Sci.* 2006;23:455-462.
11. Harrison WF, Foelix RF. *Microscopic Anatomy of Invertebrates, v. 8B: Chelicerata: Arthropoda.* New York: Wiley-Liss; 1999.
12. Ludwig M, Alberti G. Peculiar of arachnid midgut glands. *Acta Zool Fennica.* 1990;190:255-259.
13. Becker A, Peters W. The ultrastructure of the midgut and the formation of peritrophic membranes in a harvestman, *Phalangium opilio* (Chelicerata: Phalangida). *Zoomorphology.* 1985;105:326-332.
14. Sauer JR, Hair JA. *Morphology, Physiology, and Behavioral Biology of Ticks (Ellis Horwood series in acarology).* Stillwater, OK: Oklahoma State University; 1986.
15. Douglas JR. The internal anatomy of *Dermacentor andersoni* Stiles. *Univ Calif Publ Ent.* 1943;7:202-272.
16. Caetano FH, Zara FJ. Ultramorphology and histology of the foregut and midgut of *Pachycondyla (Neoponera) villosa* (Fabricius) larvae (Formicidae: Ponerinae). *J Hym Res.* 2001;10:251-260.
17. Cruz-Landim C, Silva de Moraes RL, Serrão JE. Ultrastructural aspects of epithelial renewal in the midgut of adult worker bees (Hymenoptera: Apidae). *J Comp Biol.* 1996;1:3-16.
18. Caetano FH. *Morfologia Comparada do Trato Digestivo de Formigas da Sub-família Myrmicinae (Hymenoptera: Formicidae).* São Paulo, Brazil: Dissertação (Mestrado em Zoologia)-Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo; 1977.
19. Caetano FH, Torres AH, Jr, Camargo-Mathias MI, Tomotake MEM. Apocrine secretion in the ant *Pachycondyla striata* ventriculus (Formicidae: Ponerinae). *Cytobios.* 1994;80:235-242.
20. Kemp DH, Agbede R, Johnston L, Gough JM. Immunization of cattle against *Boophilus microplus* using extracts derived from adult female ticks: feeding and survival of the parasite on vaccinated cattle. *Int J Parasitol.* 1986;16:115-120.
21. Shapiro SZ, Buscher G, Dobbelaere D. Acquired resistance to *Rhipicephalus appendiculatus* (Acarina: Ixodidae): identification of an antigen eliciting resistance in rabbits. *J Med Entomol.* 1987;24:147-154.
22. Brown SJ. Evidence for regurgitation by *Amblyomma americanum*. *Vet Parasitol.* 1988;28:335-342.

## *Capítulo 2*

---



**“Ultrastructure features of the midgut of the female adult  
*Amblyomma cajennense* ticks Fabricius, 1787 (Acari: Ixodidae) in  
several feedings stages and subjected to three infestations”.**

Débora Caperucci<sup>1</sup>, Gervásio Henrique Bechara<sup>2</sup> and Maria Izabel Camargo Mathias<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Biociências, Departamento de Biologia, UNESP, Universidade Estadual Paulista, Avenida 24A, nº 1515, Rio Claro, S.P, Brazil, 13506-900, C. P. 0199.

<sup>2</sup> Departamento de Patologia Veterinária, FCAV, UNESP, Universidade Estadual Paulista, Via de Acesso Prof. Paulo Castellane, s/n, Jaboticabal, S.P, Brazil, 14884-900.

Artigo publicado no periódico: Micron Referência: JM1520 – DOI Information 10.1016/j.micron.2010.05.015.



## RESUMO

O tubo digestório de *Amblyomma cajennense*, assim como o de outras espécies de carrapatos, encontra-se dividido em: intestino anterior, médio e posterior e é o órgão responsável pela digestão do sangue ingerido durante o repasto no hospedeiro. As regiões anterior e posterior são derivadas da ectoderme e a média da endoderme. No presente estudo ultraestrutural analisou-se o intestino médio de fêmeas submetidas ao jejum, ao semi e ao ingurgitamento completo em coelho hospedeiro, o qual foi submetido a três infestações, onde analisou-se as alterações que as células do epitélio sofreram. Os resultados mostraram que nas fêmeas em jejum a camada mais externa do intestino é composta por fibras musculares, assim como observado naqueles semi e ingurgitados de 1ª infestação e semi-ingurgitados de 2ª infestação. O citoplasma das células digestivas das fêmeas em jejum, naqueles semi e ingurgitados de 1ª, 2ª e 3ª infestações apresentou regiões íntegras (organelas preservadas) e outras desorganizadas. Grandes gotas lipídicas e grânulos protéicos foram observados no citoplasma das células do intestino em todas as fases estudadas. Nos indivíduos em jejum não foram observados esferocristais citoplasmáticos, somente naqueles semi e ingurgitados de 1ª e 2ª infestações. Intensa vacuolização foi observada nas células digestivas do intestino médio de *A. cajennense* semi e ingurgitados de 2ª infestação e naqueles ingurgitados de 3ª infestação. Os dados aqui obtidos mostraram que o intestino das fêmeas do carrapato *A. cajennense* passa, de fato por grandes modificações durante o período de alimentação, as quais se tornam mais acentuadas quando realizam-se reinfestações. Estas modificações



provavelmente devam-se a resposta imunológica do hospedeiro que devolve ao ectoparasita anticorpos e adquire assim resistência aos seus produtos secretados.

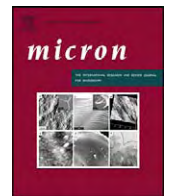
**Palavras-Chave:** *Amblyomma cajennense*; carrapatos; MET; reinfestação; resistência



Contents lists available at ScienceDirect

Micron

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/micron](http://www.elsevier.com/locate/micron)



Review

# Ultrastructure features of the midgut of the female adult *Amblyomma cajennense* ticks Fabricius, 1787 (Acari: Ixodidae) in several feeding stages and subjected to three infestations

Débora Caperucci<sup>a</sup>, Gervásio Henrique Bechara<sup>b</sup>, Maria Izabel Camargo Mathias<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, UNESP, Av. 24 A, No. 1515, Cx. Postal 199, CEP:13506-900, Rio Claro, SP, Brazil

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

ARTICLE INFO

Article history:  
Received 8 April 2010  
Received in revised form 27 May 2010  
Accepted 28 May 2010

Keywords:  
*Amblyomma cajennense*  
Ticks  
Midgut  
TEM  
Reinfestation  
Resistance  
Feeding process

ABSTRACT

The digestive tract of *Amblyomma cajennense*, as well as other species of ticks, is divided into the anterior, medium and posterior intestines and is the organ responsible for digestion of blood ingested during the meal on the host. The anterior and posterior regions are derived from the ectoderm and the medium one from the endoderm. In the present ultrastructural study, we analyzed the midgut of females in a semi- and fully engorged stages, on the rabbit host, which was subjected to three infestations, where were analyzed the changes that the epithelial cells went through. The results showed that during the feeding period the outermost layer the intestine is composed of muscle fibres, as observed in those semi-engorged and engorged ones in the 1st infestation and semi-engorged in the 2nd infestation. The cytoplasm of digestive cells of feeding females, and those of the semi-engorged and fully engorged in the 1st, 2nd and 3rd infestations showed some intact regions (preserved organelles) with others were disorganized. Large lipid droplets and protein granules were observed in the cytoplasm of the cells of the intestine in all phases of feeding process. Cytoplasmic spherocrystals were only observed in the semi-engorged and engorged females in the 1st and 2nd infestations. Intense vacuolation was observed in the digestive cells of the midgut of semi-engorged and engorged *A. cajennense* females in the 2nd infestation and those engorged in the 3rd infestation. The data showed that the gut of the females of the *A. cajennense* tick is actually going through big changes during the feeding period, which become more pronounced when reinfesting. These changes are probably due to the host immune response that returns antibodies to the ectoparasite and thus acquires resistance to their secreted products.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Contents

1. Introduction .....	00
2. Materials and methods .....	00
2.1. Transmission electronic microscopy .....	00
3. Results .....	00
4. Discussion.....	00
Acknowledgments.....	00
References .....	00

## 1. Introduction

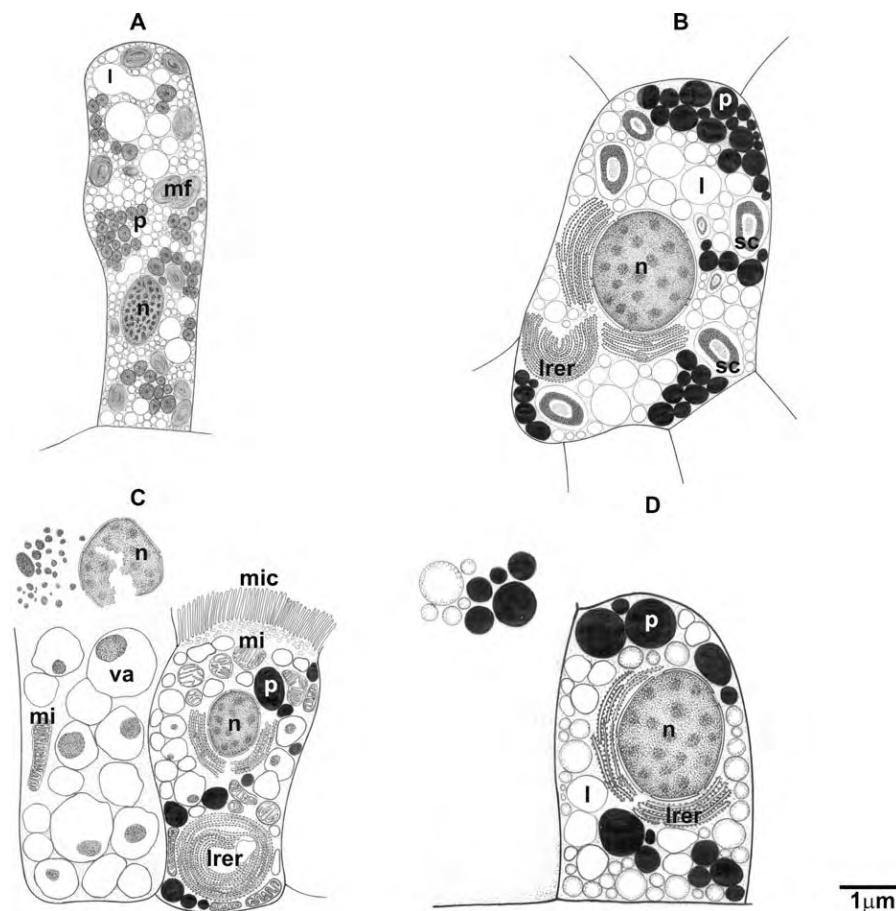
The star tick *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) has economic and health importance since it causes serious damage to cattle, horses and dogs, also interfering in public health as being a

vector of *Rickettsia rickettsi* (Ricketts, 1908), etiologic agent of spotted fever. This species is hematophagous and needs to feed from three hosts, and is therefore called the trioxene (Flechtmann, 1990).

Ultrastructurally, the cells of the midgut of Ixodidae ticks in general are complex, having different organelles and many cytoplasmic inclusions thus reflecting the multifunctional activities of the midgut. On top of digestion, the cells of the midgut also serve as storage of nutritional reserves represented by the intracellular inclusions, resulting from the digestion of the hemoglobin from

\* Corresponding author. Fax: +55 19 35340009.  
E-mail address: [micm@rc.unesp.br](mailto:micm@rc.unesp.br) (M.I. Camargo Mathias).





**Fig. 1.** Diagram showing the ultrastructural changes that the cells lining the midgut of female ticks of *Amblyomma cajennense* suffer when subjected to three stages of feeding (unfed, semi-engorged and engorged) and three different infestations at intervals of 30 days. (A) Intact epithelial cells of unfed female where the cytoplasm has large quantities of lipid droplets (l), peroxisomes (p), mielinic figures (mf) and basal nuclei (n) are observed. Bar: 1 µm. (B) Engorged female subjected to the 1st infestation. Note the presence of many lipid droplets (l) and large electrondense protein granules (p). Close to the nuclei (n) are large regions of lamellar rough endoplasmic reticulum (lrer). Spherocrystals (sc) are evident. Bar: 1 µm. (C) Engorged female subjected to the 2nd infestation. Observe the cytoplasm with large amounts of vacuoles (va) and cisternae of lamellar rough endoplasmic reticulum (lrer). In the area of the apical cells microvilli are observed (mic). There are intact cells and others that already present apical membranes ruptured and releasing their contents into the lumen, including nuclear debris. mi = mitochondria, p = granule protein, n = nucleus. Bar: 1 µm. (D) Engorged female subjected to the 3rd infestation. In most preserved cells the central cytoplasm of the basal portion presents electrondense protein granules (p) and electronlucent lipid droplets (l). The nuclei (n) presents the chromatin in the form of lumps. lrer = lamellar rough endoplasmic reticulum. Bar: 1 µm.

the blood of the host, and as a reservoir of lipids and carbohydrates (Balashov, 1967; Diehl, 1970; Grandjean and Aeschlimann, 1973).

It should be noted that for the development of anti-tick vaccines, not only a better understanding of the biology of the mite is needed but also the ectoparasite-host relationship and the mechanisms of resistance to ticks. In the early 1990s, vaccines inducing immunological protection of vertebrate hosts against tick infestations were developed. According de la Fuente et al. (2007), the vaccines reduced the number of engorging female ticks, their weight, and reproductive capacity and another studies. Field trials demonstrated that control of ticks by vaccination had the advantages of being cost-effective, reducing environmental contamination, and preventing the selection of drug-resistant ticks resulting from repeated acaricide application (de la Fuente et al., 2007). Research on functional aspects of the tissues and isolated organs are crucial for the description of the production sites of potential antigens for vaccine production against this scourge of domestic livestock (Kelly and Colley, 1988).

In the absence of effective control, livestock are lost to diseases transmitted by ticks, damaging the economy. Furthermore, it is also the high cost of treatment, along with the significant reduction in the production of milk, meat and wool, and also the depreciation of skins used for leather of the infected animals. Amongst the choices of control are high cost acaricides, the producers of which

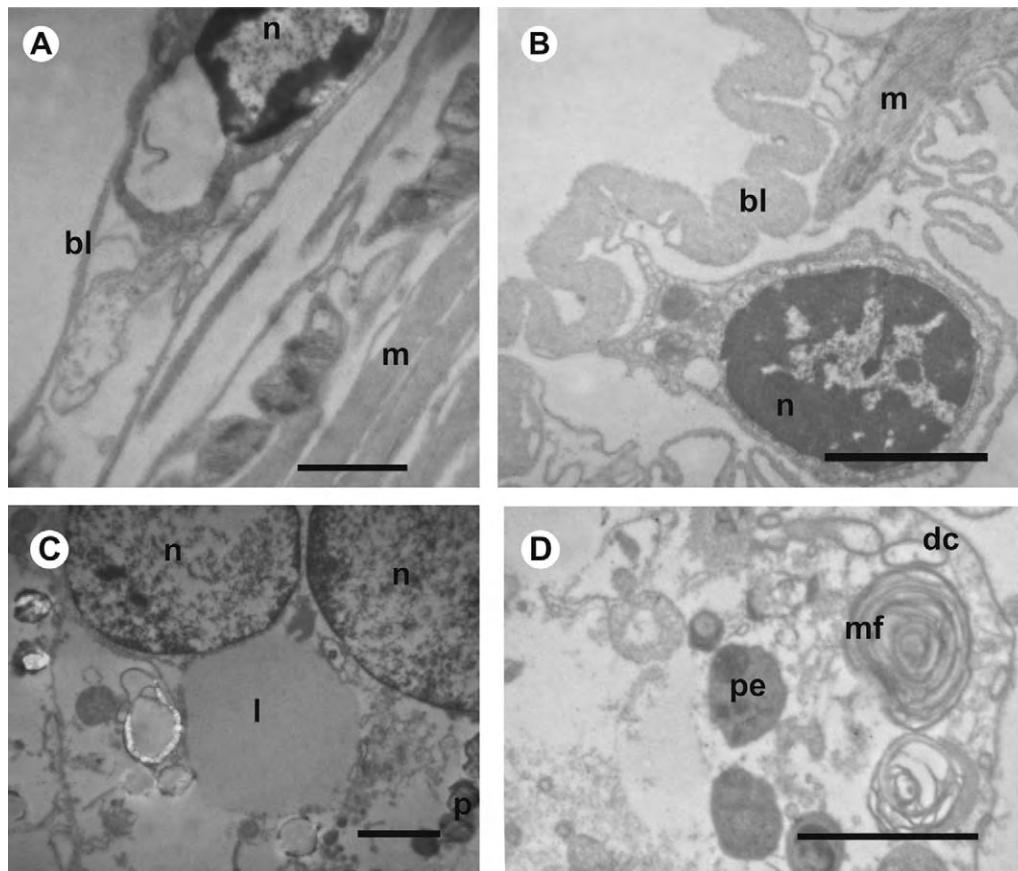
are constantly charged with the development of new chemical formulas required in view of the emergence of resistant strains of ticks (Soll, 1997).

In this way the present study was intended to demonstrate the ultrastructural changes and analyze the changes that the cells lining the midgut of female ticks of the species *A. cajennense* suffer when subjected to unfed, semi-engorgement and fully engorgement on rabbits, in first, second and third infestations, since this organ is a target attack of the host response, as well as it is important for vaccine studies.

## 2. Materials and methods

To perform this study, were used 30 adult female of *A. cajennense* ticks, collected in unfed, semi-engorged and fully engorged states, obtained from the colony maintained in the laboratory under controlled conditions in an environmental chamber (29 °C, 80% humidity and a photoperiod of 12 h). Some of the unfed females collected were released onto the host (New Zealand White rabbits).

For the allocation of ticks couples the partial dorsal region of the host was shaved and received a layer of special non-toxic glue (Britannia Adhesives-Unit 4, UK) for fixing the feeding chamber (Bechara et al., 1995). After 24 h of fixation couple of ticks were



**Fig. 2.** Photomicrographs of cells in the midgut of unfed *Amblyomma cajennense* females. (A) Detail of the muscle layer (m) cells with oval nuclei (n) and decondensed chromatin. bl=basal lamina. Bar: 1  $\mu\text{m}$ . (B) Detail of the basal lamina (bl) and thickened folds. The muscle layer (m) is observed. n=nuclei of the muscle layer. Bar: 2  $\mu\text{m}$ . (C) Detail of the cytoplasm of digestive cells with many lipid droplets (l) in addition to round nuclei (n). Bar: 1  $\mu\text{m}$ . (D) Digestive cells (dc) with cytoplasm showing mielinic figures (mf). pe=peroxisomes. Bar: 2  $\mu\text{m}$ .

placed inside the chamber. The females fixed in the host and did not released itself until the end of feeding, and the males fixed in, fed for a short period and released itself, repeating this behavior several times, such conduct being necessary for copulation to occur. After 6 days, some of the females were hardly removed and after about 8–10 days those who remained feeding became engorged and voluntarily fell off the host (they were also collected). Three infestations were carried out at 30 days intervals each.

In the laboratories of the Department of Biology, UNESP campus at Rio Claro SP, Brazil, unfed, semi-engorged and fully engorged ticks were placed in a freezer for thermal shock anesthesia and then the guts were removed in saline-PBS (7.5 g NaCl + 2.38 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + 2.72 \text{ g of } \text{KH}_2\text{PO}_4 + 1000 \text{ mL of distilled water}$ ) for chemical fixation and application of the technique of transmission electron microscopy.

### 2.1. Transmission electronic microscopy

The midguts were removed in 0.5% glutaraldehyde and fixed in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer for 2 h. After fixation the material was washed twice in a 0.1 M cacodylate buffer for 15 min and was post-fixed in 1% osmium tetroxide in a cacodylate buffer (0.1 M, pH 7.2) for 2 h. It was then washed twice in a 0.1 M cacodylate buffer for 15 min and in a solution of 10% alcohol for 15 min.

Contrasting process was performed in 2% uranyl acetate in 10% ethanol for 12 h. The material was dehydrated in increasing concentrations of acetone (50, 60, 70, 80, 90 and 95%) for 5 min each and finally 100% twice for 5 min.

Once dried, the material was embedded in Epon Araldite resin and placed in an oven at 60 °C for 48 h for polymerization. Ultrathin sections were contrasted with lead citrate, examined and photographed in a PHILIPS 100 TEM.

### 3. Results

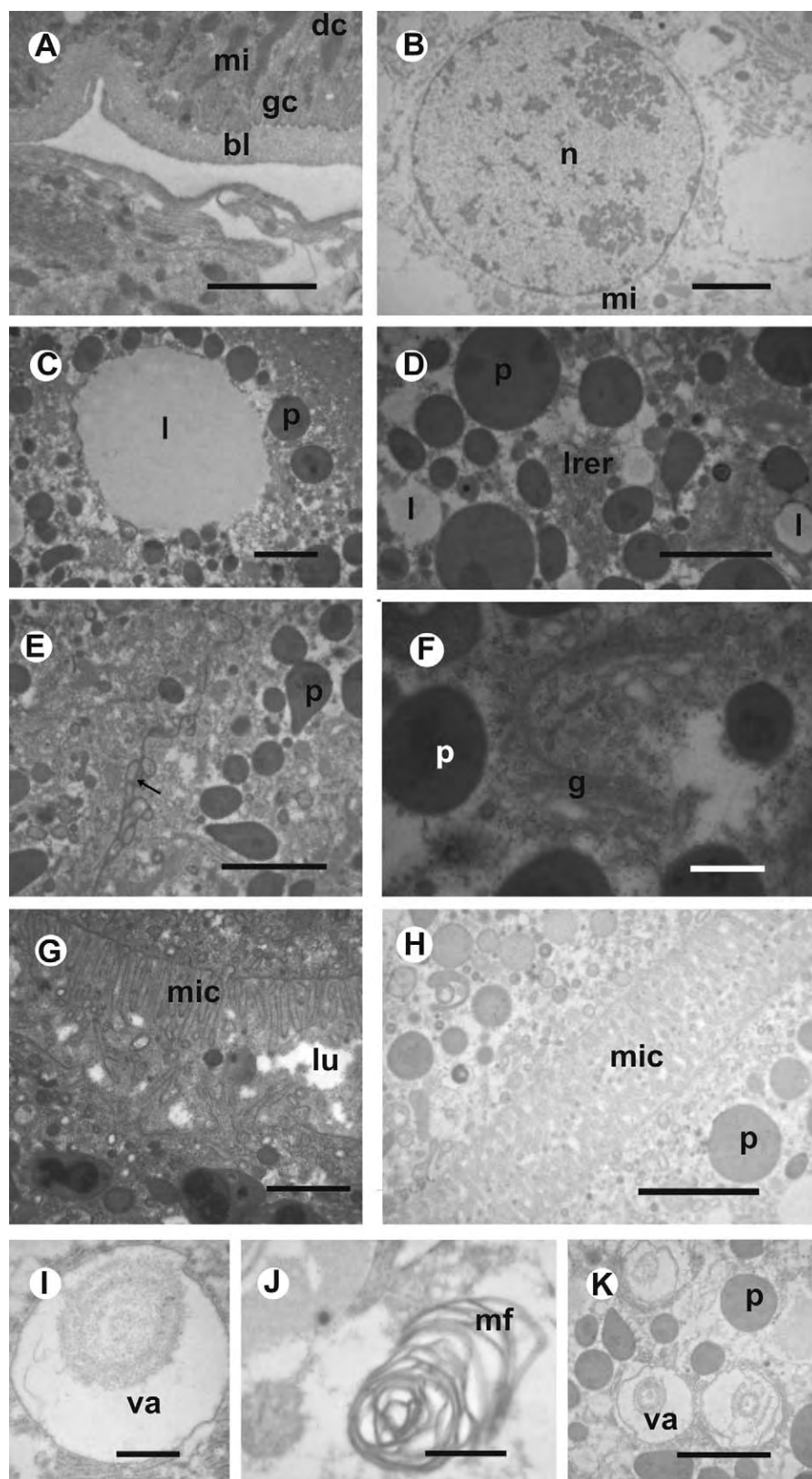
The ultrastructural analysis of the midgut of unfed female ticks of the species *A. cajennense* confirmed histological data showing that the outermost layer of the intestine is composed of muscle fibres, which according to the distension of the intestine, may have rounded or flat nuclei, with a predominance of decondensed chromatin and nucleoli (Figs. 1A and 2C). The basal lamina is thickened and in some regions with folds, also due to distension of the intestine (Fig. 2A and B). At the basal layer of the epithelium generative cells with their round nuclei and cytoplasm containing large amounts of lipid droplets are located.

The digestive cell presented cytoplasm with a drops of lipid material, as well as an accumulation of small electrondense vesicles, probably of a proteic nature (Fig. 2C).

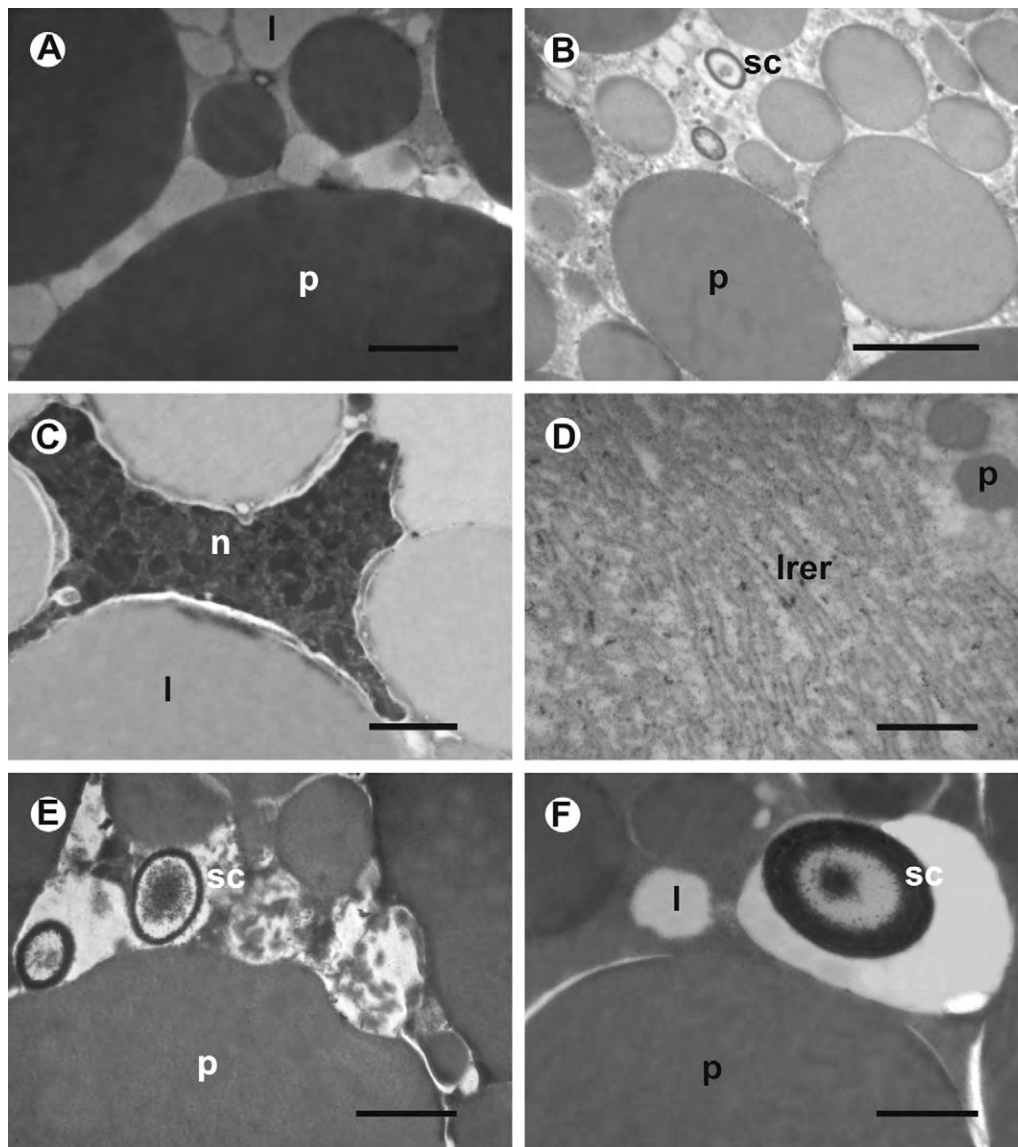
Few organelles are observed in the digestive cells of the midgut of *A. cajennense* ticks, however, some cells, probably are suffering degeneration, and they presents peroxisomes with fine granular contents inside and mielinic figures (Fig. 2D).

In the semi-engorged females subjected to the 1st infestation, a thickening muscle layer and a thick basal lamina that supports the layers of the midgut epithelium are observed (Fig. 3A).

Generative cells in these individuals have a large quantity of mitochondria, with various shapes and sizes, preferentially located



**Fig. 3.** Photomicrographs of cells in the midgut of semi-engorged *Amblyomma cajennense* females subjected to the 1st infestation. (A) View of the basal region where there is a thick basal lamina (bl), and basal area of the generative cells (gc) with a large amount of mitochondria (mi). dc = digestive cells. Bar: 2 μm. (B) Detail of the round nucleus (n) of the generative cells, with dispersed chromatin. mi = mitochondria. Bar: 2 μm. (C) and (D) Detail of the cytoplasm of digestive cells showing the presence of lipid droplets (l) and protein granules (p), the latter strongly electron-dense. lrer = lamellar rough endoplasmic reticulum. Bars: (C) = 2 μm and (D) = 2 μm. (E) Detail of two adjacent digestive cells linked by interdigitation (→). p = protein granules. Bar: 2 μm. (F) Detail of the digestive cell cytoplasm with Golgi regions (g) and electron-dense protein granules (p). Bar: 3 μm. (G) and (H) Detail of the apical region of the midgut epithelium where there is a large number of microvilli (mic) in apical region of the cell facing the lumen (lu). p = protein granules. Bars: (G) = 1 μm and (H) = 1 μm. (I)–(K) Detail of the vacuoles (va) present in the cytoplasm of some digestive cells with dense material inside, as well as the remains of cell membranes forming myelinic figures (mf). p = protein granules. Bars: (I) = 1 μm. (J) = 1 μm and (K) = 1 μm.



**Fig. 4.** Photomicrographs of cells in the midgut of engorged *Amblyomma cajennense* females subjected to the 1st infestation. (A) and (B) Large protein granules (p) and lipid droplets (l) in the cytoplasm of digestive cells. Spherocrystals (sc) were observed. Bars: (A) = 2  $\mu\text{m}$ , (B) = 2  $\mu\text{m}$ . (C) Detail of a nucleus (n) of a digestive cell is compressed by the presence of large lipid droplets (l) therefore becoming irregular. Bar: 1  $\mu\text{m}$ . (D) Detail of the cytoplasm of digestive cells showing a large amount of lamellar rough endoplasmic reticulum (lrer), p = protein granules. Bar: 1  $\mu\text{m}$ . (E) and (F) Details of different stages of spherocrystals formation (sc) in the cytoplasm of digestive cells of the midgut. p = protein granules, l = lipid droplets. Bars: (E) = 1  $\mu\text{m}$  and (F) = 2  $\mu\text{m}$ .

in the basal area of the cells (Fig. 3A). The nuclei of these cells are round with dispersed chromatin, but nucleoli are not observed (Fig. 3B).

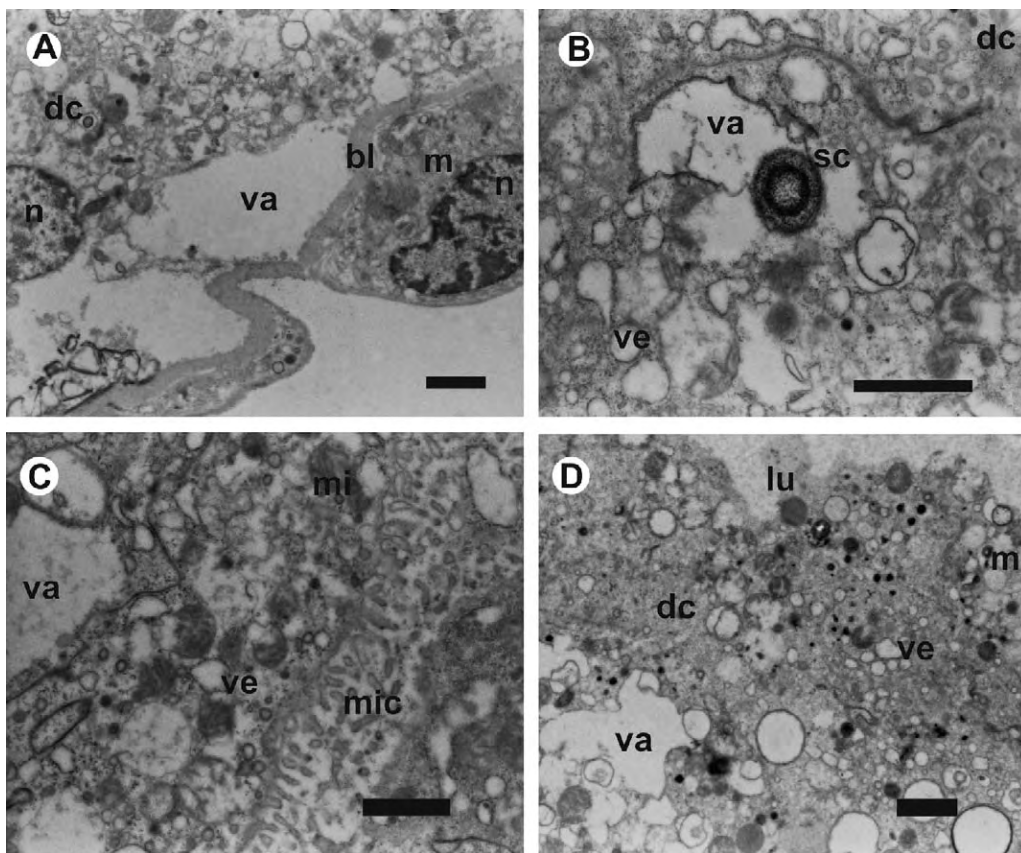
The digestive cells presented cytoplasm with a variety of elements ranging from lipid droplets, different from each other by the degree of condensation of the material they contain, electrondense protein granules in varied forms, and organelles such as mitochondria and Golgi regions, and ribosomes and poliribosomes (Fig. 3C–F, H, K). The digestive cells of the layer nearest the lumen show large quantities of microvilli on their apical region (Fig. 3G). In some regions vesicles are observed adjacent to these membrane specializations presenting electrondense contents. The digestive cells that are adjacent to each other remain together by interdigitations (Fig. 3E).

Due to friction that these digestive cells suffer, they are replaced by others. Those that are already in their final period of activity show in their cytoplasm large quantities of vacuoles containing membrane debris and mielinic figures (Fig. 3J). In some of them

still can be observed the presence of a preserved lamellar rough endoplasmic reticulum. In these individuals the observation of calcified structures (spherocrystals) in the cytoplasm is frequent and surrounded it there is a membrane that when the reinfestations will become more successful the more frequently they are observed.

In engorged females subjected to the 1st infestation, generative cells are not observed. The digestive cells have cytoplasm containing secretion granules with varied electrondensity (Figs. 1B and 4A, C), which puts pressure on the nuclei being it irregular (Fig. 4C). Were also observed large areas with a rough endoplasmic reticulum and many ribosomes (Fig. 4D). In these females larger quantities of spherocrystals are found (Figs. 1B and 4E, F), formed by concentric rings with varied in electrondensity and are contained in a membrane.

The midgut of semi-engorged female of *A. cajennense* ticks subjected to the 2nd infestation shows the muscular layer suffering disorganization, but also with the presence of intact cells where



**Fig. 5.** Photomicrographs of the midgut epithelium of semi-engorged *Amblyomma cajennense* females subjected to the 2nd infestation. (A) View from the basal region of digestive cells (dc) where there is a folded basal lamina (bl), as well as muscle cells (m) with their nuclei (n). va = vacuole. Bar: 1 µm. (B) Detail of the central cytoplasm of digestive cells (dc) with large vacuoles (va) containing cellular debris, and the presence of spherocrystals (sc). Bar: 1 µm. (C) Details of the apical portion of the midgut epithelial cell showing microvilli (mic) and mitochondria (mi) with the disarranged cristae. va = vacuole, ve = vesicles. Bar: 1 µm. (D) Detail of the lumen (lu) of digestive cells (dc) with small vesicles (ve), probably derived from the metabolism of the digestive cells (dc). va = vacuole; mi = mitochondria. Bar: 1 µm.

oval nuclei and a predominance of decondensed heterochromatin can be observed (Fig. 5A). The basal lamina in the intestine of individuals at this stage of feeding is very folded and detached from the base of the epithelium by the presence of large vacuoles with varying content (Fig. 5A).

The majority of digestive cells show intact cytoplasm (preserved organelles) and other ones presents disorganized regions. Spherocrystals of various sizes are observed in the cytoplasm (Fig. 5B). Some digestive cells of the epithelium (facing the lumen) are intact, and there is also the presence of preserved microvilli. Others are disorganized and with an apical region without these specializations (Fig. 5C).

Large amounts of irregular vacuoles with different electron-density are observed throughout the cytoplasm of most of the cells (Fig. 5A–D). Near the apical cell membranes facing the lumen of the intestine, mitochondria are observed with irregular ridges and disorganized cristae as well as presenting small vesicles with varied electron-density, which probably to merge to eliminate the plasma membrane by exocytosis on the intestinal lumen (Fig. 5C and D).

The midgut of engorged females of *A. cajennense* subjected to the 2nd infestation shows digestive cells with a larger cytoplasm due the number of vacuoles with a rounded shape and with different electron-density, a result of the varied contents (Fig. 6A and D). In the cytoplasm of digestive cells, rough endoplasmic reticulum cisternae those are still intact are observed, however, some of them are extremely dilated (Figs. 1C and 6B). In addition, rounded mitochondria with disorganized cristae are also observed, close to others that appear to be intact (Fig. 6C).

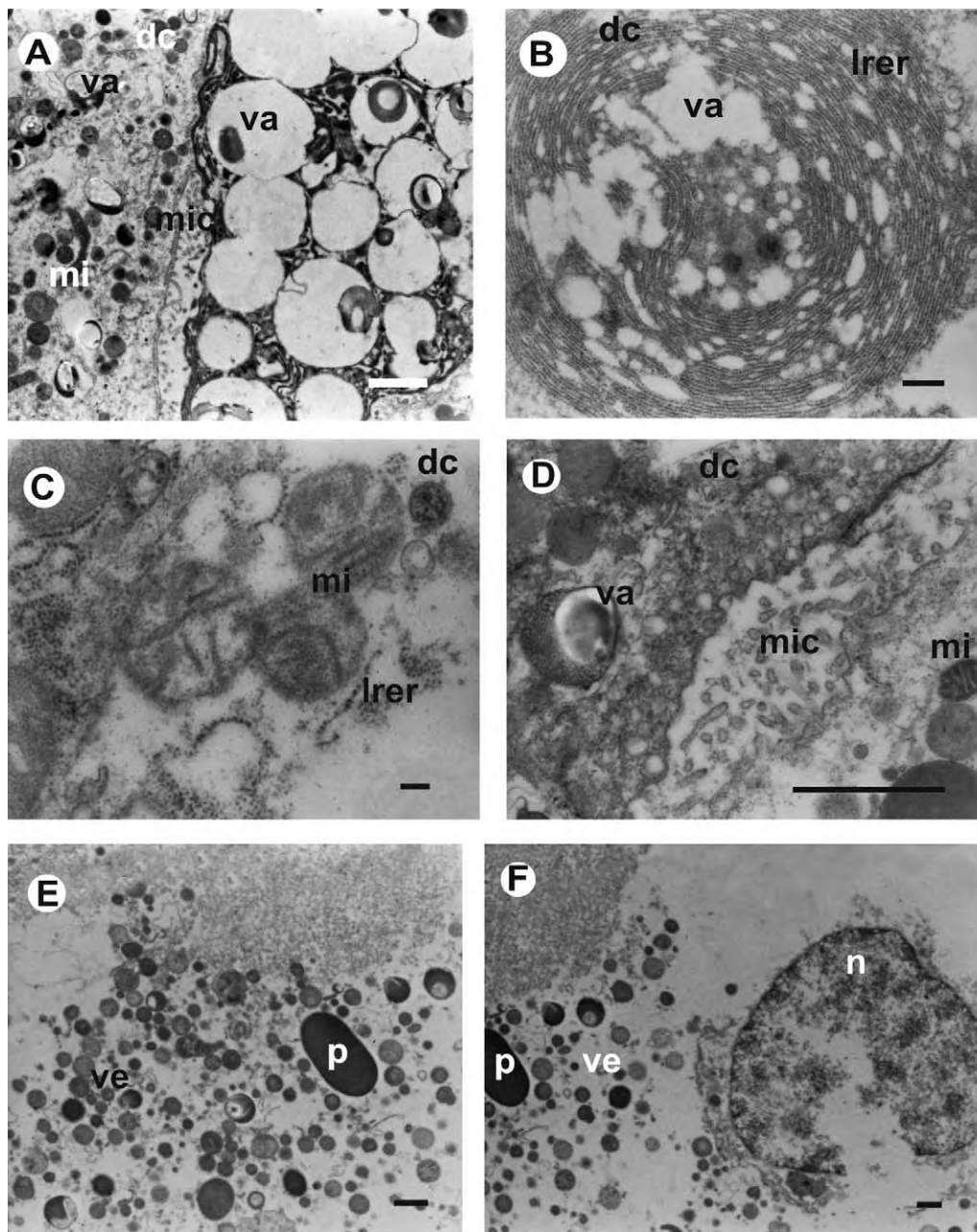
The apical region of digestive cells presents few and short microvilli (Fig. 6D). In the cytoplasm near the apical membrane large vacuoles with different contents and small vesicles of exocytosis are also observed (Fig. 6E and F).

In the lumen of the intestine of these individuals vesicles with varied content and electron-density are seen. Cell nuclei are also present in the lumen and besides having their shape altered and heterochromatin dispersed; they still present a broken envelope (Fig. 6F).

In semi-engorged females of *A. cajennense* subjected to the 3rd infestation the basal lamina of the midgut epithelium is thickened and preserved in some places and thinner and presenting large folds in others (Fig. 7A). In the basal area of the digestive cells, a large number of invaginations of the plasma membrane form an extensive labyrinth which contains the mitochondria of various sizes and shapes (Fig. 7A).

The digestive cells are intact and nuclei with the heterochromatin and nuclear envelope preserved, indicating that they are still active (Fig. 7B, D and E). In the cell layer that makes contact with the lumen of the intestine, the apical region of them has many elongated and preserved microvilli (Fig. 7E). In their central cytoplasm many electron-dense protein granules are observed, as well as many vesicles with electron-dense material in its interior (Fig. 7B and C). Large quantities of rough endoplasmic reticulum can still be observed, with dilated cisternae (Fig. 7D). The type of joint that occurs between the most apical cells of the epithelium is the interdigitation that is very clear in Fig. 7F.

The cytoplasm of the midgut of engorged female *A. cajennense* subjected to the 3rd infestation shows cells of the basal epithelium



**Fig. 6.** Photomicrographs of the midgut epithelium of engorged females of *Amblyomma cajennense* subjected to the 2nd infestation. (A) Apical cytoplasm of digestive cells (dc) showing large vacuoles (va) and another with microvilli (mic). mi = mitochondria. Bar: 1  $\mu$ m. (B) Detail of the cytoplasm of digestive cells (dc) showing lamellar rough endoplasmic reticulum (lrer) in disorganization process of and vacuolated cisternae. va = vacuole. Bar: 1  $\mu$ m. (C) Detail of the cytoplasm of digestive cells (dc) showing the occurrence of mitochondria (mi) with disorganized cristae. lrer = lamellar rough endoplasmic reticulum. Bar: 1  $\mu$ m. (D) Detail of the apical portion of the digestive cells (dc) with microvilli (mic) facing the lumen of the intestine. va = vacuole; mi = mitochondria. Bar: 1  $\mu$ m. (E) Detail of the lumen of the midgut with vesicles (ve) with varying sizes and electrondense and electroneucent, as well as heterogeneous and homogeneous contents. (p) protein granules. Bar: 1  $\mu$ m. (F) Detail of the nucleus (n) with a ruptured envelope releasing the contents into the lumen and many protein granules (p). ve = cytoplasmic vesicles. Bar: 1  $\mu$ m.

with many irregular and electrondense protein granules, different from those in other stages of feeding where they had more regular shapes (Figs. 1D and 8A–C, E, F). Lipid droplets with electrondense content can also be observed (Fig. 8D and F).

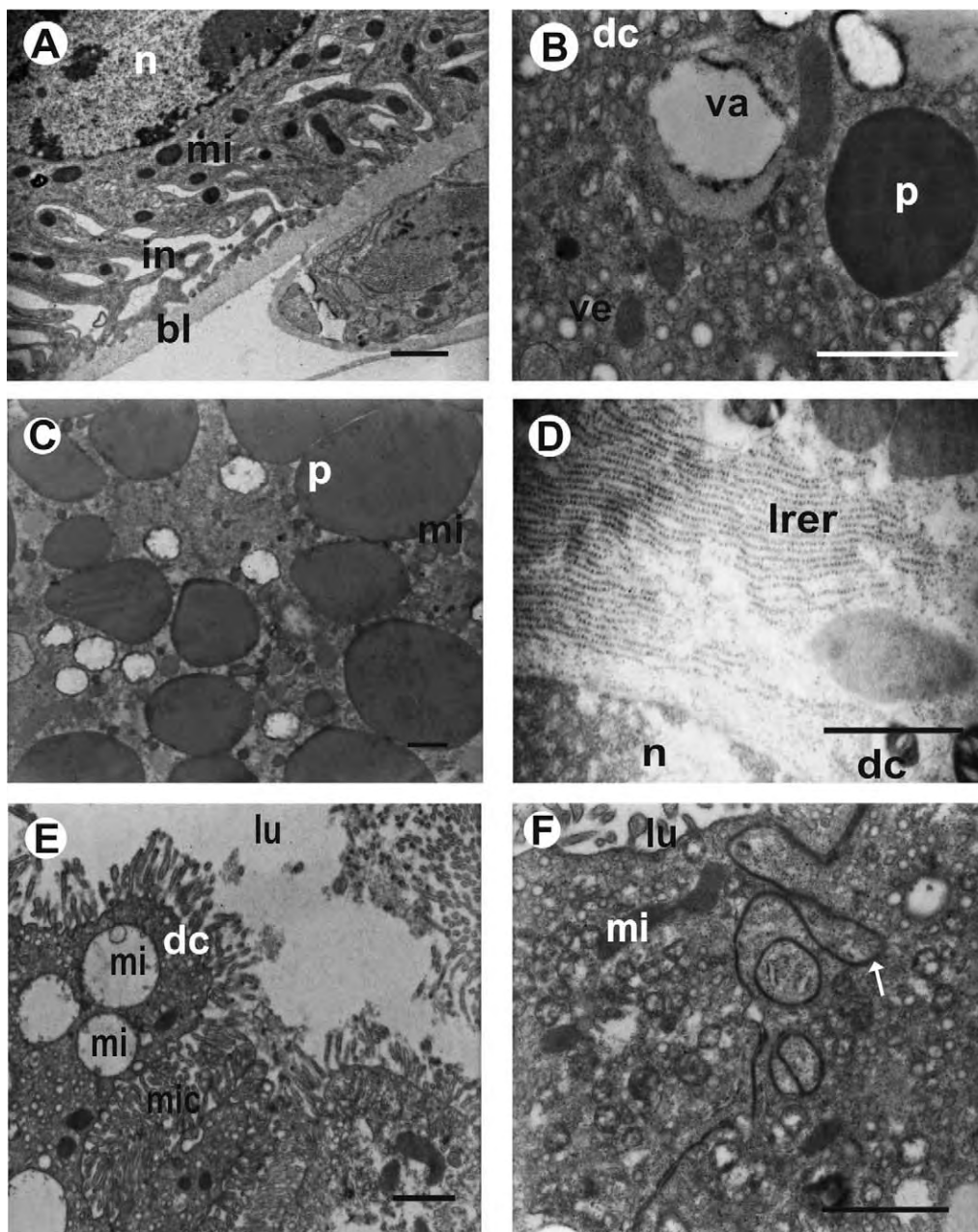
The nuclei of digestive cells show the chromatin in the form of lumps and the nuclear envelope is already showing signs of degeneration as well as the membranes of rough endoplasmic reticulum surrounding the nuclei (Fig. 8D). In the lumen of the intestine many lipid droplets and electrondense protein granules are observed (Fig. 8E and F).

All the results are summarized in Table 1.

#### 4. Discussion

This paper provides an ultrastructural information which confirms the data obtained by histology, i.e., showing that the midgut of the females of *A. cajennense* ticks undergoes changes during the feeding period, which become pronounced when reinfestation occurs.

The transmission electron microscopy showed the presence of lipid droplets in the cytoplasm of digestive cells of unfed and semi-engorged and engorged *A. cajennense* females when subjected to the 1st infestation, and also like in cells of the midgut in other

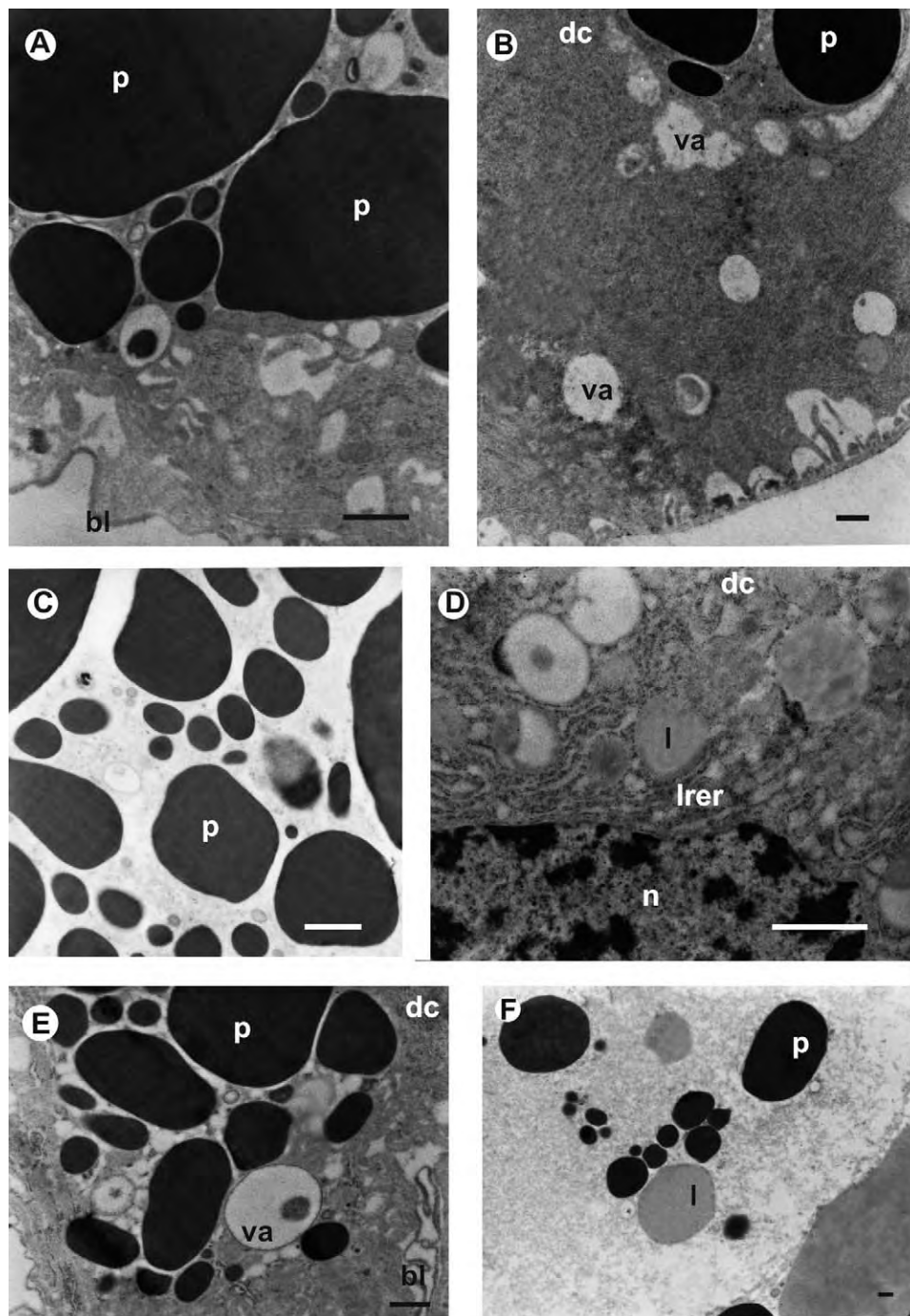


**Fig. 7.** Photomicrographs of cells in the midgut of a semi-engorged female of *Amblyomma cajennense* subjected to the 3rd infestation. (A) Details of the basal cell area with many invaginations (in) in the plasma membrane forming compartments containing large amounts of mitochondria (mi) (basal labyrinth). The basal lamina (bl) of the midgut epithelium of these individuals is thick. n = nucleus. Bar: 1  $\mu$ m. (B) Detail of the central cytoplasm of digestive cells (dc) with many protein granules (p), rounded vesicles (ve) and vacuoles (va). Bar: 1  $\mu$ m. (C) Details of many mitochondria (mi) with an absence or shortening of their cristae. p = protein granules. Bar: 1  $\mu$ m. (D) Central cytoplasm of the digestive cells (dc) with large amount of lamellar rough endoplasmic reticulum (lrer) with slightly dilated cisternae. n = nucleus of the digestive cells (dc). Bar: 1  $\mu$ m. (E) Detail of the apical portion of the epithelium of digestive cells (dc) with many elongated and preserved microvilli (mic). In the lumen (lu) of the cytoplasm of digestive cells (dc) mitochondria (mi) with short cristae are observed. Bar: 1  $\mu$ m. (F) Details of interdigitations ( $\rightarrow$ ) that join two apical digestive cells of the midgut epithelium. Note the presence of mitochondria (mi) of various shapes close to the junctions. lu = lumen. Bar: 1  $\mu$ m.

tick species such as *Dermacentor variabilis* and *Rhipicephalus appendiculatus* as demonstrated by other authors (Harrison and Foelix, 1999; Sonenshine, 1991). The lipids present in cells of the intestine might have different origins, i.e., would be the result of synthesis carried out by the cell itself, although in *A. cajennense* sites containing smooth endoplasmic reticulum were not observed, or could have been originated from the absorption of this element from the hemolymph and/or from the content in the lumen of the intestine result from the digestion of food ingested by the ectoparasite.

For the digestive cells, the analysis at electron microscopy level allowed us to identify in the engorged females of *A. cajennense* subjected to the 2nd infestation cells with various shapes and cytoplasmic contents, indicating that the epithelium is not uniformly formed as shown by analysis under light microscopy, obtained by Caperucci et al. (2009).

In semi-engorged females of *A. cajennense* subjected to the 1st infestation, engorged subjected to the 2nd infestation and semi-engorged subjected to the 3rd infestation the digestive cells had many microvilli, confirming literature data that show that typically



**Fig. 8.** Photomicrographs of cells in the midgut of engorged female *Amblyomma cajennense* subjected to the 3rd infestation. (A) Detail of digestive cells being supported by a basal lamina (bl) and featuring extremely thin folds (signs of disorganization). The cytoplasm is taken up fully by the presence of large amounts of electron dense protein granules (p) of various sizes. Bar: 1  $\mu$ m. (B) Detail of the basal portion of the epithelium, with electron lucent vacuoles (va) in the digestive cells (dc). p = protein granules. Bar: 1  $\mu$ m. (C) Detail of the apical portion of the digestive cells with protein granules (p). Bar: 1  $\mu$ m. (D) Detail of the cytoplasm of digestive cells (dc) with lipid droplets (l), lamellar rough endoplasmic reticulum (lrer) and nucleus (n) at the beginning of disorganization. Bar: 1  $\mu$ m. (E) and (F). Detail of the lumen of the intestine containing protein granules (p) and electron lucent lipid droplets (l). dc = digestive cells; bl = lamina basal; va = vacuólos. Bar: 1  $\mu$ m.

digestive cells of arthropods have striated edges that increase cell surface for both the secretion of enzymes and for nutrients absorption (Sonenshine, 1991), function that having been also performed by the individuals here studied.

Cells of the midgut of semi-engorged female *A. cajennense* ticks subjected to the 1st and 3rd infestations showed microvilli and some of them were still releasing vesicles (exocytic) towards the lumen. This could suggest the action of a mechanism of microapocrine secretion, i.e., small vesicles migrate through the interior

of the microvilli and would concentrate at their apex. This process would involve several occurrences of membrane fusion, as well as the participation of the annexins located in the microvillar membranes. Similar exocytic vesicles were found in the digestive cells of the anterior midgut of *Scaptotrigona postica* bees (Serrão and Cruz-Landim, 1996) and cells from the hindgut of other Hymenoptera (Priester, 1971; Nopanitaya and Mich, 1974; Santos et al., 1986; Terra et al., 1988). Santos et al. (1986) studying the midgut epithelium of the sugarcane borer *Diatraea saccharalis*



**Table 1**

Summary of the ultrastructural results obtained from the analysis of the midgut of females ticks of *Amblyomma cajennense* in different feeding and infestation situations.

Structures		Feeding stages						
		Unfed	Semi-engorged			Engorged		
			1st infestation	2nd infestation	3rd infestation	1st infestation	2nd infestation	3rd infestation
Generative cells	Intact	+	+	–	–	–	–	–
	Degeneration	–	–	–	–	–	–	–
	Lipid	+	–	–	–	–	–	–
	Intact LRER	–	–	–	–	–	–	–
	Degenerated LRER	–	–	–	–	–	–	–
	Protein	–	+	–	–	–	–	–
	Mitochondria							
	Intact	–	+	–	–	–	–	–
	Degenerated	–	–	–	–	–	–	–
Generative cells cytoplasm	Golgi regions	–	–	–	–	–	–	–
	Spherocrystals	–	–	–	–	–	–	–
	Microvilli	–	–	–	–	–	–	–
	Myelinic figures	–	–	–	–	–	–	–
	Vacuoles	–	–	–	–	–	–	–
	Vesicles	–	–	–	–	–	–	–
	Membrane invaginations	–	–	–	–	–	–	–
	Basal portion	–	–	–	–	–	–	–
Generative cells nuclei	Dispersed chromatin	+	+	–	–	–	–	–
	Condensed Chromatin	–	–	–	–	–	–	–
Digestive cells	Intact	+	+	+	+	+	+	+
	Degeneration	–	–	–	–	–	–	–
	Lipid	+	+	–	+	+	–	+
	Intact LRER	+	+	–	–	+	+	–
	Degenerated LRER	–	–	–	+	–	–	+
	Protein	+	+	–	+	+	+	+
	Mitochondria							
		Intact	–	+	–	–	+	–
		Degenerated	–	–	+	+	–	–
Digestive cells cytoplasm	Golgi regions	–	+	–	–	–	–	–
	Spherocrystals	–	–	+	–	+	–	–
	Microvilli	–	+	+	+	–	+	–
	Myelinic figures	+	+	–	–	–	–	–
	Vacuoles	–	+	+	+	–	+	+
	Vesicles	–	+	+	+	–	+	–
	Membrane invaginations	+	–	–	–	–	–	–
	Basal portion	–	–	–	–	–	–	–
Digestive cells nuclei	Dispersed chromatin	–	–	–	+	–	+	+
	Condensed chromatin	+	–	–	–	+	–	–
Intestine lumen	Cellular remains	–	+	–	+	–	+	+
		+ observed	– not observed					

and Espinoza-Fuentes et al. (1987) studying the anterior midgut of the *Apis mellifera*, *Melipona quadrifasciata anthidioides*, *Bombus morio* and *Euglossa townsendi* corbicular honeybee, in which were observed the presence of these vesicles, suggested that they were involved in the secretion of enzymes like trypsin which would act by transforming decomposed proteins in the stomach into simpler substances such as amino acids, which are more easily absorbed.

The midgut of female *A. cajennense*, as well as other arthropods, besides having the function of absorbing water, seems to have a role in the accumulation of ions, since the presence of spherocrystals in the cytoplasm of the digestive cells were often observed. The presence of spherocrystals in the apical region of the digestive cells suggested that these cells also have some excretory activity, participating in the cellular ion exchange as also suggested by Gouraton (1968) when studying the midgut of Homoptera and Cruz-Landim et al. (1996) when studied the midgut of *M. quadrifasciata anthidioides* bees. These same results were also found by Martoja and Ballan-Dufrançais (1984) studying the midgut of *Drosophila*, which suggested that spherocrystals would be involved in the regulatory mechanism of ions. These structures were also found in oocytes and salivary glands cells of *Rhipicephalus sanguineus* and *Amblyomma cajennense* female ticks respectively (Denardi et al., 2004; Pereira et al., 2009) respectively.

Published data have suggested that the initiation of the formation of spherocrystals in the cytoplasm of cells in general would be from the rough endoplasmic reticulum, where the contents of the cisternae would condense to extend them and thereby cause a loss of adhesion of the ribosomes to their membranes. The consecutive deposition of several lamellae in initial small inclusions would gradually increase the size of these concretions, resulting in a structure with alternating layers of electron-dense and electron-lucent materials, suggesting the occurrence of the same process in the digestive cells of *A. cajennense* females ticks.

The presence of spherocrystals in cytoplasm of different cells had been previously reported in midgut of *Rhinocricus padbergi* diplopods. In some individuals studied, this element was present in the apical region of the principal cells of the intestine. Also in other species of diplopods, calcium was observed in the cells of the fat body and in the mediobasal regions of the digestive cells, and was suggested that the epithelium of the intestine would be involved in the process of calcium transport of muscle fibres (Fantazzini et al., 2002). Moreover, according to some authors, the spherocrystals could also be associated with cell degeneration, as observed in the midgut of *A. mellifera* (Cruz-Landim et al., 1996) and silk glands of the *Galleria mellonella* moth (Sehnal and Akai, 1982), whereas if the calcium came to the hemolymph, osmotic problems could

be caused interfering with the functioning of muscles. Thus their retention in the midgut cells inactivated their harmful effects.

Other studies with the digestive system of arthropods also noted the presence of spherocrystals in the cytoplasm of the midgut. In *Coleotis terrestris* spiders, these structures have been described as compounds of phosphate and calcium carbonate and were considered important in the storage of calcium and other ions, thus acting as well in the detoxification of the individual (Ludwig and Alberti, 1988).

In this work, the utilization of transmission electron microscopy confirmed that the digestive cells of the midgut epithelium of *A. cajennense* secrete proteins, since there is a large quantity of rough endoplasmic reticulum present in them, corroborating data found concerning Ixodidae ticks of the species *D. variabilis* (Araman, 1979). Other authors also reported that in other ticks species, these proteins produced could also be further integrated in the formation of a plasma membrane which, in turn, would be involved in mechanisms for maintaining the electrochemical gradient that facilitates water absorption (Sonenshine, 1991).

The areas of the basal cells of the digestive epithelium of the midgut of semi-engorged female of *A. cajennense* subjected to the 3rd infestation had extensive membranous labyrinths suggesting an increase in the chances of exchange between the membranes of the digestive cells with those of the generative cells. The presence of large quantity of interdigitations in the digestive cells of semi-engorged female *A. cajennense* subjected to the 1st and 3rd infestations, connecting one digestive cell to another, would be a frequent feature in tissues that undergo intense movements related to the digestive process, causing an increase in epithelial resistance to the movements. The data obtained here corroborate those found in Argasidae ticks of the species *Ornithodoros papillipes* (Balashov, 1983).

The presence of invaginations in the basal area of the digestive cells suggests the establishment of two distinct compartments: an extra and other intracellular one. The first gives restricted access to hemolymph, causing the cell to concentrate solutes in this compartment, creating an osmotic gradient that facilitates water absorption, for example. The second would house large amounts of mitochondria likely to provide energy for the reabsorption of ions and then characterizing a place for the occurrence of high rates of active transport (Ribeiro et al., 1990). These data suggests that the same process occurs in the basal cells of the digestive midgut of female *A. cajennense* ticks.

In the digestive cells of the midgut of semi-engorged *A. cajennense* females subjected to the 3rd infestation major changes like the presence of mitochondria showing swelling and evidence of the loss of cristae were observed. Changes in mitochondria were also found in cells of the ventral intersegmental muscles of insects, when reabsorption of them in the process of transition from the larval stage to pupae would occur (Lockshin and Williams, 1964; Beaulaton and Lockshin, 1982). Under some adverse conditions such as a sudden increase in the quantity of calcium ions or oxidative stress, the mitochondria would suffer drastic changes that would be accompanied by the disorganization of their internal membranes, which would make them porous and swollen, a process that was called “transitory mitochondrial permeability”, which would be irreversible and lead to the death of the organelle (Proskuryakov et al., 2002), which was also observed here. Another important aspect that should be considered with the disorganization and degeneration of mitochondria would be the variation in levels of ATP inside the cell, as was reported previously by other authors indicating that when ATP levels go beyond the critical level it could have an influence on cell death, i.e., the cells could die by necrosis (Proskuryakov et al., 2002).

Therefore, in the *A. cajennense* females subjected to the 3rd infestation, there was no response from the host that had an effect on

the ectoparasite, through the occurrence of damage to the cells in its gut that were manifested also by changes in the mitochondria, organelles essential energy obtention by the cell.

The fact that there were degenerating organelles found in cells of the midgut of engorged females of *A. cajennense* subjected to the 2nd infestation, such as mitochondria and rough endoplasmic reticulum, would indicate that these were therefore in the process of death caused by components arising from the host, data that corroborate those found with *O. papillipes* ticks which also had disorganised mitochondrial cristae as a result of the loss of metabolic activity (Williams et al., 1985).

Although the cells of the midgut of *A. cajennense* females ticks in all infestations here analysed would possess cells with signs of cytoplasmic changes, the vast majority of nuclei, however, were intact, even though the cell was in a process of death (Lockshin and Zakeri, 2004). However, nuclei were observed in the lumen of the intestine, the result of cell lysis and subsequent leakage of the cytoplasmic contents, could suggest the formation of structures similar to apoptotic bodies.

Among the changes observed in digestive cells of the midgut of semi-engorged and engorged female *A. cajennense* when subjected to the 1st, 2nd and 3rd infestations intense vacuolation was also observed as well as in ticks of the other species like *O. moubata* (Coons et al., 1986) and in glands of the *Bombix mori* silkworm during metamorphosis (Morimoto et al., 1968). The presence of vacuoles in these cells might suggest: (a) the fusion of small vesicles containing products that should have been secreted and were not (to the lumen of the intestine), or (b) could be the result of processes that the autophagic cell was suffering due the presence of antibodies, the response of the host (in the case of the *Amblyomma* tick). Vacuolation was also observed at the beginning of the process of degeneration of the digestive cells, during the renovation of the ventricular epithelium of *A. mellifera* (Cruz-Landim et al., 1996).

What can be seen in the literature is that studies, specifically those using transmission electron microscopy, show morphophysiological changes that the epithelium of the ticks midgut would suffer during reinfestation, are still scarce and these work brought a new information about this matter.

## Acknowledgments

This research has been supported by FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) Grants no. 05/57707-2 and no. 2007/59020-0. The authors would like to thank Jaime R. Somera, Antonio Teruyoshi Yabuki, Gerson Mello Souza, and Monika lamonte for their technical support.

Part of this work has been facilitated through the International Consortium on Ticks and Tickborne Diseases (ICTTD-3) Coordination Action financed by the INCO Program of the European Commission Project No. 510561.

## References

- Araman, S., 1979. Protein digestion and synthesis in ixodid females. In: Rodriguez, J. (Ed.), Recent Advances in Acarology. Academic Press, New York, pp. 385–395.
- Balashov, Y.S., 1967. Blood-sucking ticks (Ixodoidea) vectors of disease of man and animals. Nauka, Leningrad. English Translation: 1972, Miscellaneous publications of the Entomological Society of America, 8: 161–376.
- Balashov, Y.S., 1983. In: Raikhel, A.S., Hoogstraal, I.I. (Eds.), An Atlas of Ixodid Tick Ultrastructure. Entomological Society of America (Special Publication), Lanham, 289 p.
- Beaulaton, J., Lockshin, R.A., 1982. The relation of programmed cell death to development and reproduction. Comparative studies and an attempt at classification. International Review Cytology 79, 215–235.
- Bechara, G.H., Szabó, M.P.J., Ferreira, B.R., Garcia, M.V., 1995. *Rhipicephalus sanguineus* tick in Brazil: feeding and reproductive aspects under laboratorial conditions. Brazilian Journal of Veterinary Parasitology 4, 61–66.
- Caperucci, D., Camargo-Mathias, M.I., Bechara, G.H., 2009. Histopathology and ultrastructure features of the midgut of adult females of the tick *Amblyomma*

- cajennense* Fabricius, 1787 (Acari: Ixodidae) in various feeding stages and submitted to three infestations. *Ultrastructural Pathology* 33, 249–259.
- Coons, L.B., et al., 1986. Morphology, physiology, and behavioral biology of ticks. *Morphology, Physiology and Behavioral Biology of Ticks*. Ellis Horwood, Chichester, 248–279.
- Cruz-Landim, C., Silva de Moraes, R.L., Serrão, J.E., 1996. Ultrastructural aspects of epithelial renewal in the midgut of adult worker bees (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Computational Biology* 1, 29–40.
- de la Fuente, J., Almazán, C., Canales, M., Pérez, J.M., Kocan, K.M., Willadsen, P., 2007. A ten-year review of commercial vaccine performance for control of tick infestations on cattle. *Animal Health Research Reviews* 8, 23–28.
- 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 *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology*, 379–395.
- Diehl, P.A., 1970. Zur Oogenese bei *Ornithodoros moubata* (Murray) (Ixodoidea: Argasidae) unter Besonderer Berücksichtigung der Vitellogenese. *Acta Tropica*. Basel, 301–355.
- Espinoza-Fuentes, F.P., Ribeiro, A.F., Terra, W.R., 1987. Microvillar and secreted digestive enzymes from *Musca domestica* larvae. Subcellular fractionation of midgut cells with electron microscopy monitoring. *Insect Biochemistry* 17, 819–827.
- Fantazzini, E., Fontanetti, C.S., Mathias, M.I.C., 2002. Midgut of the millipede, *Rhinocricus padbergi* Verhoeff, 1938 (Diplopoda: Spirobolida). *Histology and Histochemistry Arthropoda Selecta* 11, 135–142.
- Flechtmann, C.H.W., 1990. Ácaros de importância médico-veterinária. *Biblioteca Rural Livraria Nobel S A*, 45–74.
- Gouraton, J., 1968. Composition structure et mode the formation des concrections minerales dans l'intestine moyen des homopteres cereopides. *The Journal of Cell Biology* 37, 316–328.
- Grandjean, O., Aeschlimann, A., 1973. Contribution to the study of digestion in ticks: histology and fine structure of the midgut epithelium of *Ornithodoros moubata* Murray (Ixodoidea, Argasidae). *Acta Tropica* 30, 193–212.
- Harrison, W.F., Foelix, R.F., 1999. Microscopic anatomy of invertebrates. *Chelicerata Arthropoda* 8B, 267–514.
- Kelly, E.A.B., Colley, D.G., 1988. 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* 140, 2737–2745.
- Lockshin, R.A., Williams, C.M., 1964. Programmed cell death. II Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkmoths. *Journal Insect Physiology* 10, 643.
- Lockshin, R.A., Zakeri, Z., 2004. Apoptosis, autophagy, and more. *The Journal of Biochemistry and Cell Biology* 36, 2405–2419.
- Ludwig, M., Alberti, G., 1988. Mineral congregations, "spherites" in the midgut of *Coelotes terrestris* (Aranae): structure, composition and function. *Protoplasma* 143, 43–50.
- Martoja, R., Ballan-Dufrançais, C., 1984. The ultrastructure of digestive cells and excretory organs. In: King, R.R., Akai, H. (Eds.), *Insect Ultrastructure*, vol. 2, p. 624.
- Morimoto, T., et al., 1968. Studies on the Posterior Silk Gland of the Silkworm, *Bombyx mori*. III ultrastructural changes of posterior silk gland cells in the fourth larval instar. *The Journal of Cell Biology* 38, 604–614.
- Nopanitaya, W., Mich, D.W., 1974. Development cytology of the midgut in the flesh-fly *Sarcophaga bullata* (Parker). *Tissue and Cell* 6, 487–502.
- Pereira, C.P.M., Oliveira, P.R., Furquim, K.C.S., Bechara, G.H., Camargo-Mathias, M.I., 2009. Effects of fipronil (active ingredient of Frontline) on salivary gland cells of *Rhipicephalus sanguineus* females (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology* 166, 121–130.
- Priester, W., 1971. Ultrastructure of the midgut epithelial cells in the fly *Calliphora entirocephala*. *Journal of Ultrastructure* 36, 783–805.
- Proskuryakov, S.Y., et al., 2002. Necrosis: a specific form of programmed cell death. *Experimental Cell Research* 283, 1–16.
- Ribeiro, A. F., Ferreira, C., Terra, W. R., 1990. Morphological bases of insect digestion. In: Mellinger, Animal Nutrition and Transport Processes. In: *Nutrition in Wild and Domestic Animals* 96–105.
- Santos, C.D., Ribeiro, A.F., Ferreira, C., Terra, W.R., 1986. Differentiation centrifugation, calcium precipitation and ultrasonic disruption of midgut cells of *Erinnis ello* caterpillars, purification of cell microvilli and inferences concerning secretory mechanisms. *Canadian Journal of Zoology* 64, 490–500.
- Sehnal, F., Akai, H., 1982. Ultrastructure and function of the silk glands in *Galleria mellonella*. In: Akai, H., King, R.C., Movohoshi, S. (Eds.), *The Ultrastructure and Functioning of Insect Cells*. The Society for Insect Cells, pp. 135–138.
- Serrão, J.E., Cruz-Landim, C.A., 1996. Comparative study of digestive cells in different midgut regions of stingless bees (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *Journal of Advanced Zoology* 17, 1–6.
- Soll, M.D., 1997. The future of anthelmintic therapy from an industry perspective. In: van Wyk, J.A., van Schalkwyk, P.C. (Eds.), *Managing anthelmintic resistance in endoparasites*, p. 1–5. *Proceedings of the 16th International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology*, Sun City, South Africa, 10–15 August 1997.
- Sonenshine, D.E., 1991. *Biology of Ticks*. Oxford University Press 1, pp. 159–187.
- Terra, W.R., Espinoza-Fuentes, F.P., Ribeiro, A.F., Ferreira, C., 1988. The larval midgut of the housefly (*Musca domestica*): ultrastructure, fluid fluxes and secretion in relation in the organization of the digestion. *Journal of Insect Physiology* 34, 463–472.
- Williams, J.P., Barker, D.M., Sauer, J.R., Hair, J.A., Ownby, C., Koch, H., 1985. Ultrastructural changes in the midgut epithelium of unfed lone star ticks with increasing age. *Annals of the Entomological Society of America*, 62–69.

## *Capítulo 3*

---



**“Detecção ultraestrutural de proteínas e de açúcares totais no intestino médio de fêmeas de *Amblyomma cajennense* Fabricius, 1787 (Acari: Ixodidae) em diversos estágios de alimentação e submetidos à várias infestações”.**

Débora Caperucci<sup>1</sup>, Gervásio Henrique Bechara<sup>2</sup> and Maria Izabel Camargo Mathias<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Biociências, Departamento de Biologia, UNESP, Universidade Estadual Paulista, Avenida 24A, nº 1515, Rio Claro, S.P, Brazil, 13506-900, C. P. 0199.

<sup>2</sup> Departamento de Patologia Veterinária, FCAV, UNESP, Universidade Estadual Paulista, Via de Acesso Prof. Paulo Castellane, s/n, Jaboticabal, S.P, Brazil, 14884-900.

## RESUMO

O tubo digestório de *Amblyomma cajennense*, assim como o de outras espécies de carrapatos, encontra-se dividido em: intestino anterior, médio e posterior e é o órgão responsável pela digestão do sangue ingerido durante o repasto no hospedeiro. No presente estudo citoquímico ultraestrutural analisou-se o intestino médio de fêmeas submetidas ao jejum, ao semi e ao ingurgitamento completo em coelho hospedeiro, o qual foi submetido a três infestações, onde analisou-se as alterações que as células do epitélio sofreram. Citoquimicamente, ficou demonstrada a natureza fortemente protéica do intestino médio de *A. cajennense*, o que justifica a presença de um retículo endoplasmático rugoso desenvolvido nos indivíduos semi e ingurgitados quando submetidos à 1ª infestação e naqueles ingurgitados quando submetidos à 3ª infestação. Nas fêmeas em jejum não foram observados a presença de carboidratos indicando a ausência do mesmo, no epitélio intestinal de *A. cajennense*. Este estudo ultraestrutural veio demonstrar que os carboidratos seriam produzidos pelas células generativas e digestivas de fêmeas semi-ingurgitadas submetidas à 1ª infestação, naquelas ingurgitadas submetidas à 2ª e 3ª infestações, porém devido às restritas regiões citoplasmáticas em que este foram encontradas pode-se sugerir que os mesmos assim que são sintetizados seriam na sequência utilizados e, apenas poucas quantidades ficariam armazenadas na célula. A presença de lipídeos no intestino médio de *A. cajennense* em jejum e naqueles ingurgitados e submetidos à 1ª infestação, tanto no citoplasma das células digestivas como no das generativas foi confirmada. Embora não tenha sido observado retículo endoplasmático liso, grandes concentrações lipídicas foram detectadas na região



próxima à lâmina basal bem como no domínio apical das células do intestino. Nas fêmeas em jejum, naquelas ingurgitadas e submetidas à 1<sup>a</sup> e 2<sup>a</sup> infestações e naquelas semi-ingurgitadas e submetidas à 3<sup>a</sup> infestação, foram locais onde se observaram à presença de lipídeos localizadas próximas aos grânulos protéicos. Sendo assim, este trabalho veio mais uma vez demonstrar a grande participação das mitocôndrias na produção do lipídeo nos carrapatos, este agora encontrado nas células digestivas do intestino de *A. cajennense*. O emprego da técnica de Thiéry (1967) possibilitou a observação no intestino médio de carrapatos *A. cajennense* de fêmeas ingurgitadas e submetidas à 1<sup>a</sup> e 2<sup>a</sup> infestações de estruturas semelhantes à endosimbiontes, principalmente no citoplasma das células digestivas. O papel dos endossimbiontes no ciclo de vida dos carrapatos ixodídeos é muito difícil de ser determinada devido a uma grande variabilidade, e conhecimento sobre a sua dieta, comportamento e anatomia. Em conclusão, a presença destes microrganismos no intestino médio de *A. cajennense* incluindo no interior das células, sugere a sua participação na digestão dos alimentos, como organismos simbiontes, e representam uma nova possibilidade de explorar fontes de alimento no ambiente. Os dados aqui obtidos mostraram que o intestino das fêmeas do carrapato *A. cajennense* passa, de fato por grandes modificações durante o período de alimentação, as quais se tornam mais acentuadas quando realizam-se reinfestações. Estas modificações provavelmente devam-se a resposta imunológica do hospedeiro que devolve ao ectoparasita anticorpos e adquire assim resistência aos seus produtos secretados.



**Palavras-Chave:** *Amblyomma cajennense*; carrapatos; intestino médio; citoquímica; reinfestação, resistência.





## 1. Introdução

Os carrapatos são artrópodos de grande importância, pois podem transmitir diversos microrganismos ao homem e a outros animais, como vírus, rickettsias, espiroquetídeos e agentes causadores da sarna e várias outras dermatoses (REY, 2001). Interferem na Saúde Pública por serem vetores da *Rickettsia rickettsi*, agente etiológico da Febre Maculosa (FLECHTMANN, 1990). Além disso, podem causar grandes prejuízos à pecuária.

O carrapato *Amblyomma cajennense* é hematófago obrigatório e necessita de repasto em três hospedeiros, sendo portanto, trioxeno (FLECHTMANN, 1990).

Ultraestruturalmente as células do intestino médio dos ixodídeos em geral, são complexas, por possuírem diferentes organelas além de muitas inclusões citoplasmáticas refletindo assim as atividades multifuncionais do intestino médio dos carrapatos. Além das principais funções digestivas, as células do intestino médio servem também como um depósito de reservas nutricionais representado pelas inclusões intracelulares, resultado da digestão da hemoglobina presente no sangue do hospedeiro, bem como de reservatório de lipídeos e de carboidratos (BALASHOV, 1972; DIEHL, 1970; GRANDJEAN and AESCHLIMANN, 1973).

Cabe salientar que para o desenvolvimento de vacinas anticarrapato, não basta um melhor conhecimento da biologia do ácaro, da relação parasita-hospedeiro e dos mecanismos de resistência ao carrapato. Pesquisas sobre aspectos morfofuncionais de tecidos e órgãos isolados, são cruciais para a descrição de sítios produtores de antígenos potenciais para a produção de vacinas contra esse flagelo da pecuária nacional (KELLY e COLLEY, 1988).



Na ausência de controle eficaz, economicamente são perdidos animais de produção para as doenças transmitidas por carrapatos. Acrescentem-se ainda, os custos elevados nos tratamentos, além da significativa redução na produção de leite, carne e lã, e também depreciação do couro dos animais parasitados. Na opção pelo controle, são elevados os custos dos acaricidas, os quais são constantemente onerados com o desenvolvimento de novas fórmulas químicas necessárias, em virtude do surgimento de linhagens de carrapatos resistentes (SOLL, 1997).

A aplicação de técnicas de citoquímica ultraestrutural permite a detecção de compostos químicos no tecido estudado através do tratamento com sais de metais pesados, pois estes interagem com os elétrons e possibilitam a formação da imagem por meio de contraste em preto, dito eletrondenso, e branco, dito eletronlúcido. A quantidade de sais impregnados nos diversos constituintes celulares é diretamente proporcional ao contraste, de modo que componentes tais como proteínas, carboidratos, lipídeos, ácidos nucleicos, íons (ou moléculas inorgânicas) e enzimas, possam ser visualizados (CARVALHO, 2001).

Desta forma o presente trabalho teve como objetivo demonstrar as alterações ultraestruturais e analisar as alterações que as células do epitélio do intestino médio de fêmeas de carrapatos *Amblyomma cajennense* sofrem, quando submetidas ao jejum, semi-ingurgitamento e ao ingurgitamento, parasitando coelhos, em primeira, segunda e terceira infestações, tendo como foco principal verificar as alterações celulares que ocorrem no intestino médio, visto que este órgão é alvo para estudos com vacinas.

## 2. Material e Métodos

Para a realização do presente trabalho foram utilizadas 27 fêmeas adultas de *Amblyomma cajennense*, coletadas em jejum, semi e ingurgitadas, a partir de colônia mantida em laboratório em condições controladas em estufa BOD (29°C, 80% de umidade e fotoperíodo de 12 horas). Parte das fêmeas coletadas em jejum foram liberadas nos hospedeiros (coelhos New Zealand White).

Para a alocação dos casais de carrapatos parte da área da região dorsal do hospedeiro foi tosada e recebeu uma camada de cola especial e atóxica (Britannia Adhesives-Unit 4, UK) para fixação da câmara de alimentação (Bechara et al, 1995). Decorridas 24 horas da fixação, os carrapatos foram colocados no seu interior. As fêmeas se fixaram e não se desprenderam mais até o final da alimentação, e os machos se fixaram, alimentaram-se por um período e se desprenderam, repetindo este comportamento por várias vezes. Este comportamento é necessário para que a cópula ocorra. Após 6 dias da fixação das fêmeas, algumas foram retiradas e por volta de 8 a 10 dias aquelas que permaneceram se alimentando ingurgitaram e se desprenderam voluntariamente do hospedeiro também foram coletadas. Foram realizadas três infestações com intervalos de 30 dias cada.

Nos laboratórios do Departamento de Biologia da UNESP *campus* de Rio Claro S.P, Brasil, os carrapatos em jejum, semi e ingurgitados foram colocados em freezer para anestesia por choque térmico e, então, tiveram os intestinos retirados em solução salina-PBS (7.5 g de NaCl + 2.38 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 2.72 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 1000 mL de água destilada) para fixação química e aplicação das técnicas citoquímicas.



## 2.1. Citoquímica Ultraestrutural

Testes citoquímicos foram aplicados para detectar em nível ultraestrutural a presença de proteínas básicas (MacRAE; MEETZ, 1970) e açúcares totais (THIÉRY, 1967).

### 2.1.1. Detecção de Proteínas Básicas pelo Método da Prata Amoniacal (MacRAE; MEETZ, 1970)

Os intestinos das fêmeas de *A. cajennense* foram fixados em glutaraldeído 2.5%, lavados em água destilada, incubados durante 5 minutos à temperatura ambiente em solução de prata amoniacal (solução de nitrato de prata a 10% adicionada a uma solução concentrada de hidróxido de amônia). A seguir procedeu-se uma lavagem em água destilada e logo após os mesmos foram incubados em solução de formaldeído a 3%, durante 5 minutos, onde o material adquiriu a cor marrom.

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, 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. Procedeu-se então a inclusão em resina pura com catalisador para polimerização em estufa à 60°C por 24 horas.

Posteriormente, 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%), os ultrafinos foram coletados em grades de cobre e não passaram por contrastação, sendo diretamente observados e fotografados em microscópio eletrônico de transmissão PHILIPS CM 100.

### **2.1.2. Detecção de Açúcares Totais pelo Método de Thiery (1967)**

Os intestinos das fêmeas de *A. cajennense* foram preparados segundo rotina para microscopia eletrônica de transmissão. Após a ultramicrotomia, o material foi recolhido em grades de ouro, as quais flutuaram em ácido periódico a 1%, durante 15 a 20 minutos. Em seguida, foi incubado em tiosemicarbazina 1%, em ácido acético a 10%, durante 24 horas. Lavagens sucessivas em ácido acético 10%, 5% e 2% foram feitas, 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% durante 30 minutos, no escuro, à temperatura ambiente. Por fim, o material sem contrastação passou por lavagem em água destilada e foi observado e fotografado em microscópio eletrônico de transmissão PHILIPS CM 100.

## **3. Resultados**

### **3.1. Citoquímica Ultraestrutural**

#### **3.1.1. Proteínas Básicas e Açúcares Totais**

### **Indivíduos em Jejum**

A aplicação dos testes de citoquímica ultraestrutural demonstra que as células musculares que rodeiam externamente o intestino médio de fêmeas de carrapatos *Amblyomma cajennense*, na condição de jejum alimentar, não são positivas para proteínas, exceto na periferia das mesmas, próximo a membrana celular onde esparsa granulação positiva pode ser observada (Fig. 1D).

A lâmina basal é negativa ao teste (Figs. 1C).

Ainda nos indivíduos em jejum, onde o epitélio encontra-se pseudo-estratificado, a maioria das células tem no seu citoplasma grandes gotas lipídicas eletrólucidas, bem como grande quantidade de granulação eletrondensa positiva ao teste de proteínas. Esta granulação encontra-se preferencialmente localizada no domínio apical das células (Fig. 1B).

No domínio basal destas células observa-se a presença de áreas preenchidas por figuras mielínicas, bem como por esparsos grânulos eletrondensos e positivos ao teste da prata amoniacal (Fig. 1D). Contudo nessas regiões, ficam evidentes o predomínio de gotas lipídicas tanto no domínio apical quanto no basal (Figs. 1A, B, D). Não foram detectadas pelo teste de Thiéry regiões marcadas, indicando aí a ausência de açúcares totais.

### **Indivíduos Semi-Ingurgitados Submetidos à 1ª Infestação**

Nas fêmeas no estágio alimentar semi-ingurgitado e submetidas à 1ª infestação onde o intestino médio apresenta-se estratificado, o teste para detecção de

proteínas é positivo na maioria das células e das regiões celulares observadas (Figs. 2A, D, E, F).

O citoplasma basal das células generativas possui poucos e pequenos grânulos positivos para a prata (Figs. 2A, B).

Nas células digestivas observa-se por entre as microvilosidades esparsa granulação positiva ao teste (Fig. 2C). À medida que se percorre o citoplasma das células digestivas nota-se que a porção apical possui menor quantidade de regiões positivas, ao contrário das regiões mais basais, onde aí existem grânulos, inclusive alguns deles contendo tipos diferentes de subunidades no seu interior, positivos a prata (Figs. 2D, E).

Ao contrário do observado no intestino médio de fêmeas *A. cajennense* na condição de jejum, bem como nas semi-ingurgitadas, observa-se marcação para açúcares totais em diversas regiões das células digestivas e das generativas (Fig. 2G). No domínio basal das generativas a marcação positiva está concentrada ao redor do núcleo e sob a forma de fina granulação eletrondensa (Fig. 2H).

As células digestivas, apresentam as microvilosidades negativas ao teste de Thiéry (Fig. 2I), porém o citoplasma apical, adjacente as microvilosidades, é fortemente positivo. Espalhadas pelo citoplasma observam-se muitas regiões, entre os grânulos de secreção, que estão fortemente marcadas pelo teste (Figs. 2J, K).

### **Indivíduos Ingurgitados Submetidos à 1ª Infestação**

Nestes indivíduos fica clara a predominância de elementos protéicos em relação aqueles polissacarídicos no citoplasma das células digestivas, tanto na região

do citoplasma basal quanto na apical. Observa-se aqui grandes grânulos de proteína (Figs. 3A, B, C, E, H), os quais parecem ser o resultado da fusão de grânulos menores, todos distribuídos por entre as cisternas de retículo endoplasmático rugoso, os quais ocupam extensas áreas do citoplasma (Figs. 3A, D, F, I, J). No domínio apical destas células observam-se figuras mielínicas (Figs. 3B, C)

No citoplasma das células digestivas existem estruturas arredondadas ou irregulares com conteúdo eletrondenso sugerindo que sejam microorganismos endosimbiontes (Figs. 3D, G, H).

### **Indivíduos Semi-Ingurgitados Submetidos à 2ª Infestação**

O intestino médio desses indivíduos tem epitélio estratificado e é positivo ao teste para detecção da prata amoniacal.

Devido às grandes alterações pelas quais passam o epitélio devido à ação da resposta do hospedeiro, observa-se muitas células que perderam sua forma original e outras ainda que estão rompidas e liberando seu conteúdo para o lúmen do intestino (Fig. 4E).

No citoplasma basal e apical das células generativas são observados grânulos com diferentes tamanhos e eletrondensidades (Figs. 4A, B).

Vacúolos autofágicos podem ser observados em grande quantidade na região basal onde estão localizadas as células generativas (Figs. 4A, B).

Nas células localizadas nos estratos mais apicais do epitélio do intestino médio são observadas poucas microvilosidades e estas apresentam-se extremamente encurtadas (Fig. 4C). O teste da prata amoniacal é positivo, indicando a presença de



proteínas (Fig. 4B), enquanto que o de Thiéry é negativo nas microvilosidades, bem como para os restos celulares presentes no lúmen do intestino (Figs. 4E, F).

O teste para detecção de açúcares totais marca positivamente o citoplasma tanto das células generativas quanto das digestivas, onde observa-se granulação esparsa no citoplasma das mesmas (Fig. 4D).

### **Indivíduos Ingurgitados Submetidos à 2ª Infestação**

O intestino médio das fêmeas de *A. cajennense* ingurgitadas e submetidas à 2ª infestação tem o epitélio desorganizado onde as células digestivas estão com o citoplasma com fortes marcações para o teste de açúcares totais (Fig. 5C).

O domínio apical das células digestivas mostra extensas microvilosidades voltadas para o lúmen do intestino (Fig. 5A).

Para o teste da prata amoniacal o intestino médio destes indivíduos reage positivamente, apresentando forte marcação principalmente nos vacúolos e grânulos protéicos com conteúdos e tamanhos variados (Fig. 5E, G).

No lúmen do intestino são observados corpos multivesiculares com conteúdo granular positivo ao teste da prata amoniacal, e indicam que aí haja provável ocorrência de microorganismos endosimbiontes (Figs. 5B, D, F, G).

### **Indivíduos Semi-Ingurgitados Submetidos à 3ª Infestação**

Nesses indivíduos o epitélio do intestino médio encontra-se desorganizado e a citoquímica ultraestrutural mostra a lâmina basal positiva para a prata amoniacal. A



camada muscular é negativa ao teste (Fig. 6A). No domínio basal das células epiteliais são observadas mitocôndrias com vários tamanhos e formas (Fig. 6C). O núcleo é observado no lúmen do intestino (Fig. 6B).

Muitas e longas microvilosidades são observadas nas células dos estratos apicais do epitélio as quais são positivas para as proteínas e para os carboidratos (Figs. 6E, F, I).

No lúmen do intestino observam-se vesículas com conteúdos e eletrondensidades variados e sendo positivas tanto a prata quanto ao teste do Thiéry (Figs. 6D, E, G).

### **Indivíduos Ingurgitados Submetidos à 3ª Infestação**

Nas fêmeas no estágio alimentar ingurgitado e submetidas à 3ª infestação onde o epitélio está desorganizado observa-se que a camada muscular que envolve o intestino está positiva ao teste para detecção de proteínas e de açúcares totais (Fig. 7G).

O citoplasma das células da porção basal do epitélio é observado com grande quantidade de grânulos protéicos fortemente marcados para o teste de proteínas (Fig. 7A, B).

Por entre os grânulos protéicos são observados regiões do citoplasma com significativa marcação para o teste de Thiéry (Fig. 7E, F, H).

No citoplasma das células digestivas observam-se cisternas de retículo endoplasmático rugoso e mitocôndrias (Figs. 7C, D).

## *Legendas e Figuras*

---

**Figura 1:** Citoquímica ultraestrutural de células do intestino médio de fêmeas de *Amblyomma cajennense* em jejum submetidas ao teste para detecção de proteínas básicas e açúcares totais.

**A-B=** Detalhes do domínio apical das células onde são observados grânulos protéicos e eletrondensos (**p**) e grandes gotas lipídicas (**l**) eletrólucidas também são observadas.

**Barras:** A= 6µm; B= 6µm

**C=** Detalhe da lâmina basal (**bl**) negativa ao teste da prata amoniacal.

**p=** proteínas no citoplasma; **n=**núcleo celular

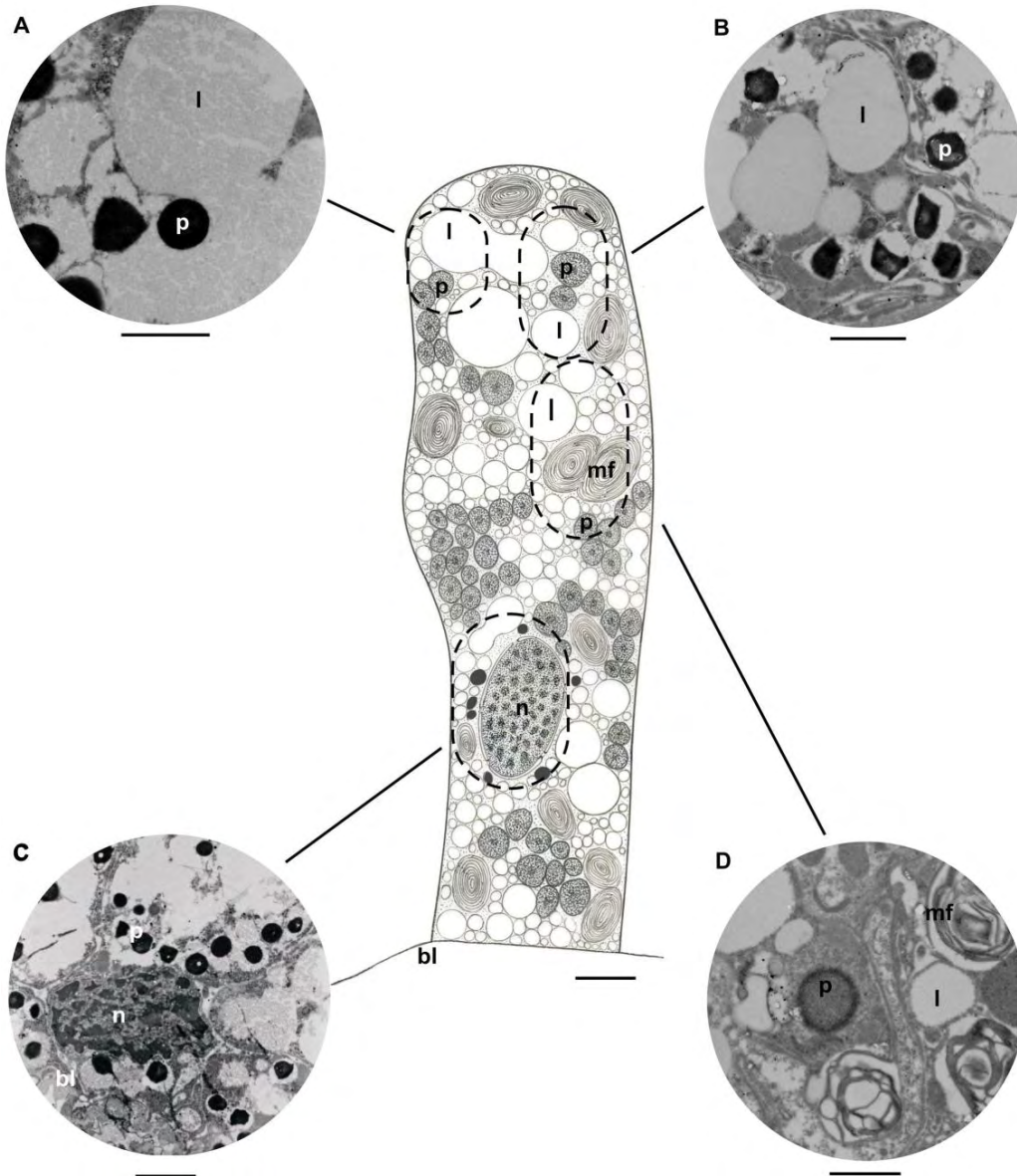
**Barra:** 6µm

**D=** Porção apical das células do intestino com áreas preenchidas por figuras mielínicas (**mf**).

**p=** proteínas; **l=** lipídeos

**Barra:** 6µm

# 1



**Figure 2:** Citoquímica ultraestrutural de células do intestino médio de fêmeas *Amblyomma cajennense* semi-ingurgitadas e submetidas à 1ª infestação o teste da citoquímica ultraestrutural para detecção de proteínas básicas e açúcares totais.

**A-F=** Detecção da prata amoniacal

**G-K=** Detecção de açúcares totais

**A, D, E, F=** Células do epitélio estratificado evidenciando as regiões positivas à prata na maioria delas.

**n=** núcleo; **p=** proteínas; **mi=** mitocôndrias; **va=** vacúolos

**Barras:** **A=** 10  $\mu\text{m}$ ; **D=** 2  $\mu\text{m}$ ; **E=** 6  $\mu\text{m}$ ; **F=** 2  $\mu\text{m}$

**B=** Detalhe do citoplasma basal das células generativas com pequenos grânulos positivos à prata. Detalhe do retículo endoplasmático rugoso lamelar (**lrer**).

**p=** proteínas

**Barra:** 6  $\mu\text{m}$

**C=** Detalhe da porção apical das células digestivas mostrando microvilosidades (**mic**) em corte transversal.

**Barra:** 6  $\mu\text{m}$

**G=** Detalhe de regiões citoplasmáticas das células digestivas mostrando reação positiva ao Thiéry (seta).

**Barra:** 2  $\mu\text{m}$

**H=** Detalhe da região basal com concentração de grânulos Thiéry positivos (seta) ao redor do núcleo (**n**).

**Barra:** 2  $\mu\text{m}$

**I=** Detalhe das microvilosidades (**mic**) das células digestivas, as quais mostraram-se negativas ao teste.

**p**= proteínas

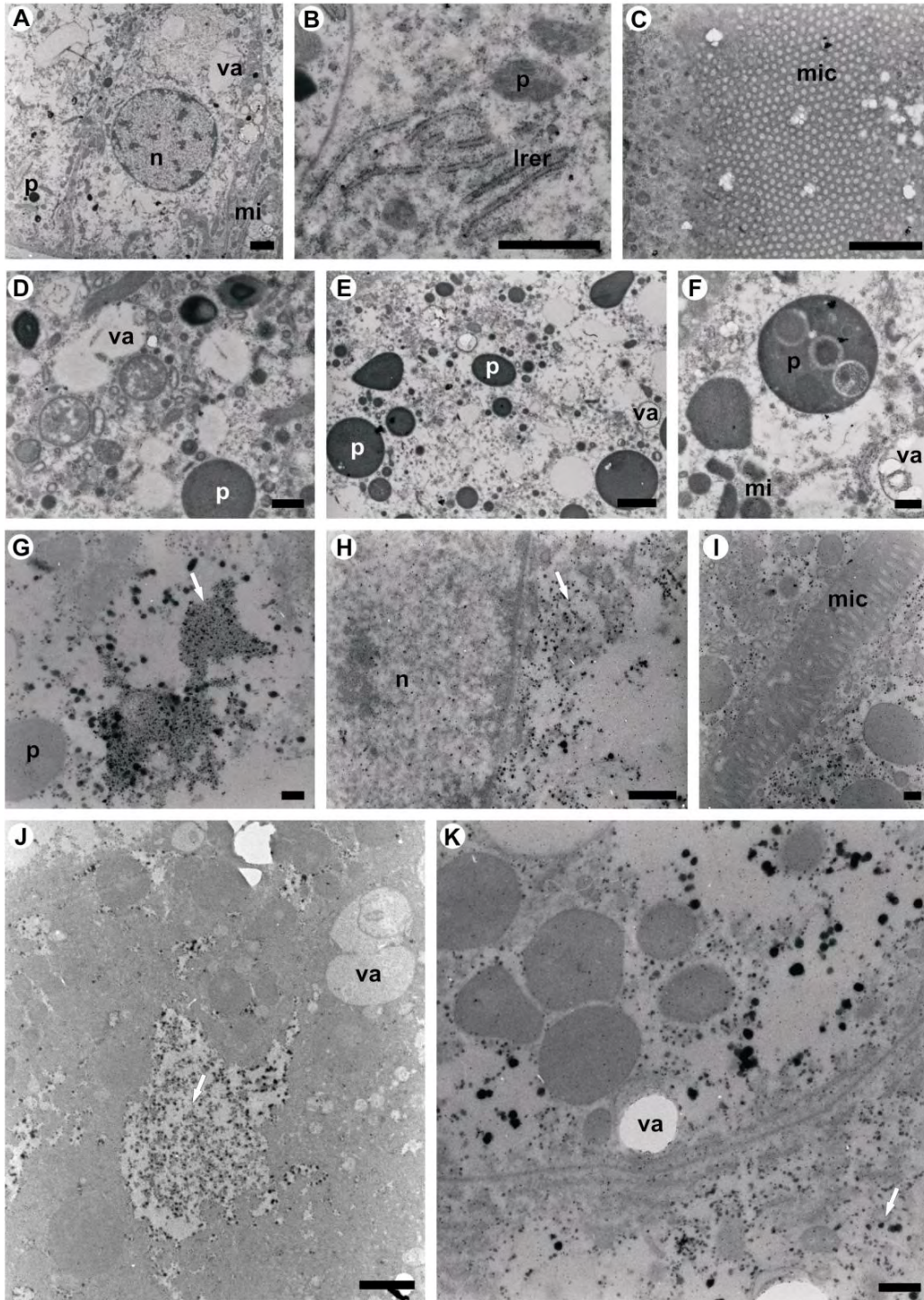
**Barra:** 2  $\mu\text{m}$

**J-K**= Detalhe do citoplasma das células digestivas com regiões marcadas positivamente pelo teste (seta).

**va**= vacúolos

**Barras:** **J**= 10  $\mu\text{m}$ ; **K**= 2  $\mu\text{m}$

# 2





**Figure 3:** Citoquímica ultraestrutural de células do intestino médio de fêmeas *Amblyomma cajennense* ingurgitadas e submetidas à 1ª infestação sob o teste da citoquímica ultraestrutural para detecção de proteínas básicas e açúcares totais.

**A-F, H=** Detecção da prata amoniacal

**G, I-J=** Detecção de açúcares totais

**A-C, E=** Detalhe do citoplasma apical das células digestivas.

**p=** proteínas; **n=**núcleo; **lrer=** retículo endoplasmático rugoso lamelar; **l=** lipídeos;

**mf=** figuras mielínicas

**Barras:** **A=** 7  $\mu\text{m}$ ; **B=** 5  $\mu\text{m}$ ; **C=** 5  $\mu\text{m}$ ; **E=** 10  $\mu\text{m}$

**F.** Detalhe do citoplasma basal das células digestivas e retículo endoplasmático rugoso lamelar (**lrer**).

**Barra:** 7  $\mu\text{m}$

**D, G-H=** Detalhes de estruturas eletrondensas e irregulares no citoplasma das células digestivas sugerindo serem microorganismos endossimbiontes (**be**).

**rer=** retículo endoplasmático rugoso; **p=** proteínas

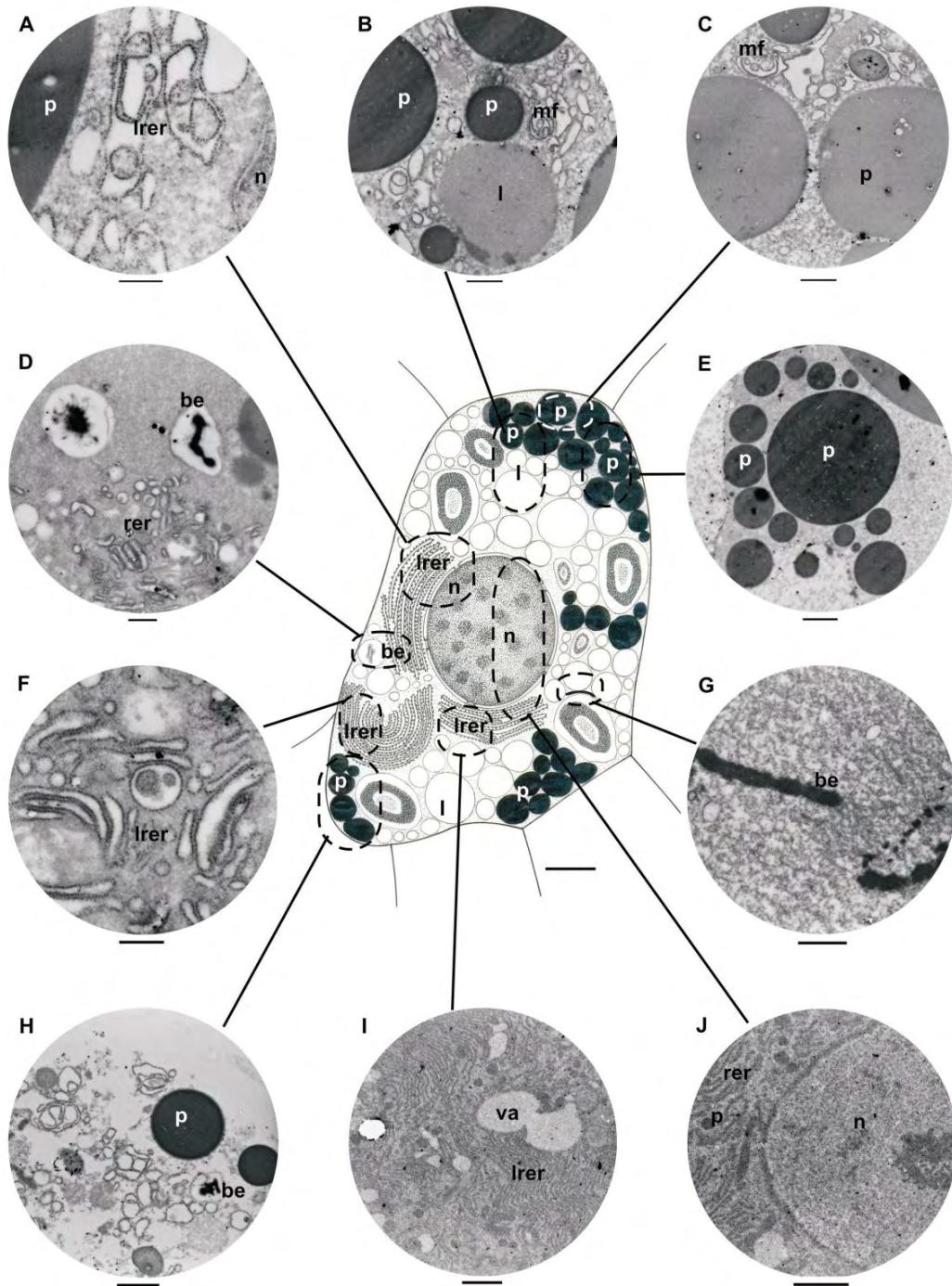
**Barras:** **D=** 5  $\mu\text{m}$ ; **G=** 7  $\mu\text{m}$ ; **H=** 5  $\mu\text{m}$

**I-J=** Detalhe do citoplasma basal das células digestivas com extensas áreas de retículo endoplasmático rugoso (**rer**) e retículo endoplasmático rugoso lamelar (**lrer**).

**va=** vacúolos; **n=**núcleo; **p=**proteína

**Barras:** **I=** 6  $\mu\text{m}$ ; **J=** 4  $\mu\text{m}$

3



**Figure 4:** Citoquímica ultraestrutural de células do intestino médio de fêmeas *Amblyomma cajennense* semi-ingurgitadas e submetidas à 2ª infestação sob o teste da citoquímica ultraestrutural para detecção de proteínas básicas e açúcares totais.

**A-C**= Detecção da prata amoniacal

**D-F**= Detecção de açúcares totais

**A-B**= Detalhes dos citoplasmas: basal e apical, das células generativas com grânulos protéicos (**p**) com diferentes tamanhos e eletrondensidades.

**va**= vacúolos autofágicos

**Barras:** **A**= 10  $\mu\text{m}$ ; **B**= 2 $\mu\text{m}$

**C**= Detalhe do estrato apical do epitélio mostrando as microvilosidades (**mic**) com granulação positivas à prata (**seta**).

**Barra:** 10  $\mu\text{m}$

**D**= Detalhe da esparsa granulação positivas ao Thiéry (**seta**) no citoplasma das células.

**mic**= microvilosidades; **p**= proteínas

**Barra:** 2  $\mu\text{m}$

**E**= Detalhe de microvilosidades (**mic**) desorganizadas e negativas ao teste de Thiéry.

Restos celulares (\*) no lúmen (**lu**) do intestino.

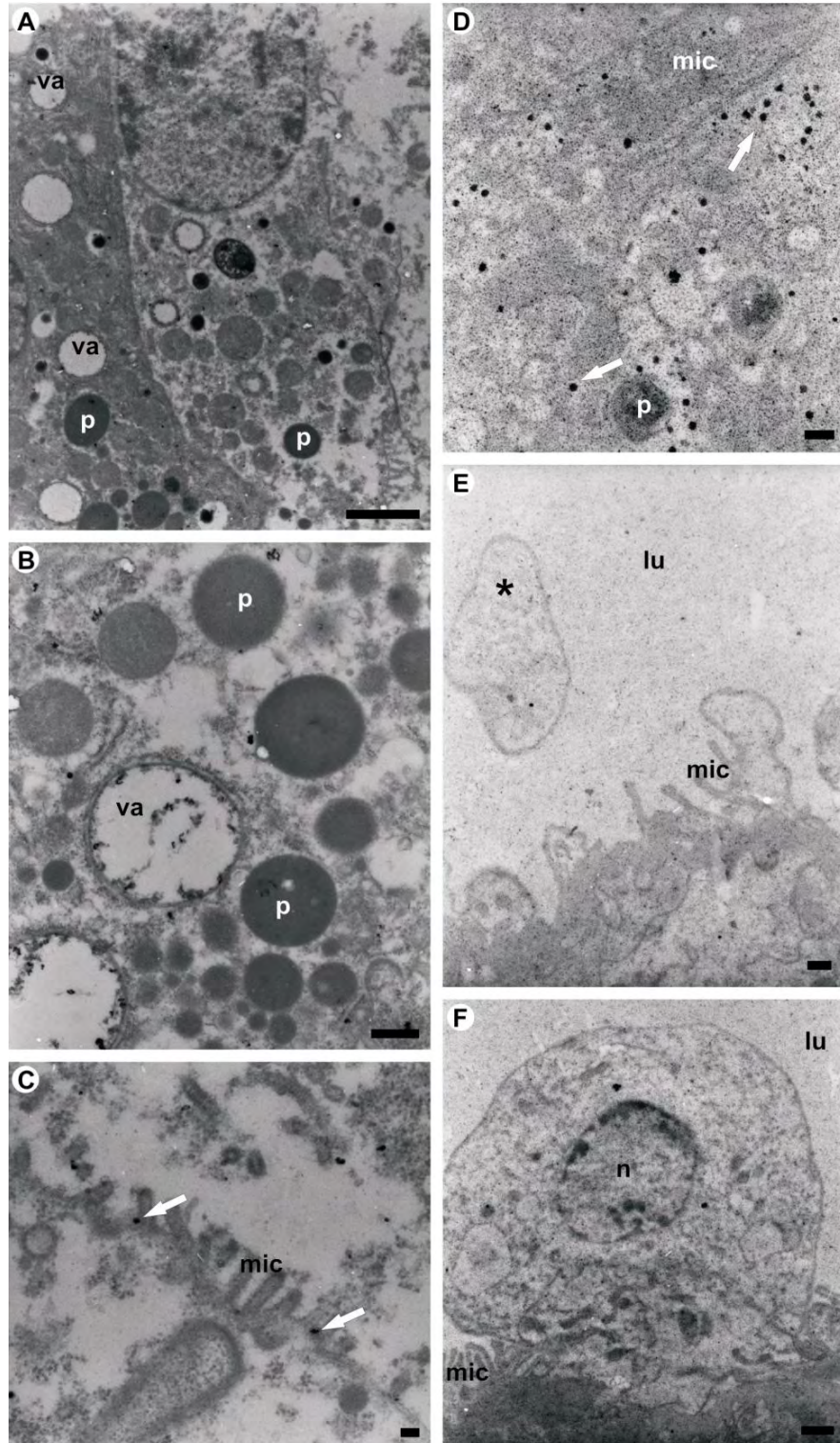
**Barra:** 2  $\mu\text{m}$

**F**= Detalhe de restos celulares no lúmen (**lu**) do intestino.

**mic**= microvilosidades; **n**=núcleo

**Barra:** 2  $\mu\text{m}$

# 4



**Figure 5:** Citoquímica ultraestrutural de células do intestino médio de fêmeas *Amblyomma cajennense* ingurgitadas e submetidas à 2ª infestação sob o teste da citoquímica ultraestrutural para detecção de proteínas básicas e açúcares totais.

**A, C=** Detecção de açúcares totais

**B, D-G=** Detecção da prata amoniacal

**A.** Detalhe do domínio apical das células digestivas mostrando microvilosidades (**mic**) negativas ao Thiéry.

**Barra:** 2  $\mu\text{m}$

**B, D, F-G=** Detalhe do lúmen do intestino com conteúdo positivo ao teste, indicando a presença de microorganismos endossimbiontes (**be**).

**l=** lípideos; **p=** proteínas

**Barras:** **B=** 10  $\mu\text{m}$ ; **D=** 2  $\mu\text{m}$ ; **F=** 2  $\mu\text{m}$ ; **G=** 5  $\mu\text{m}$

**C=** Citoplasma das células digestivas intensamente marcadas positivamente ao teste de Thiéry (seta).

**va=** vacúolos

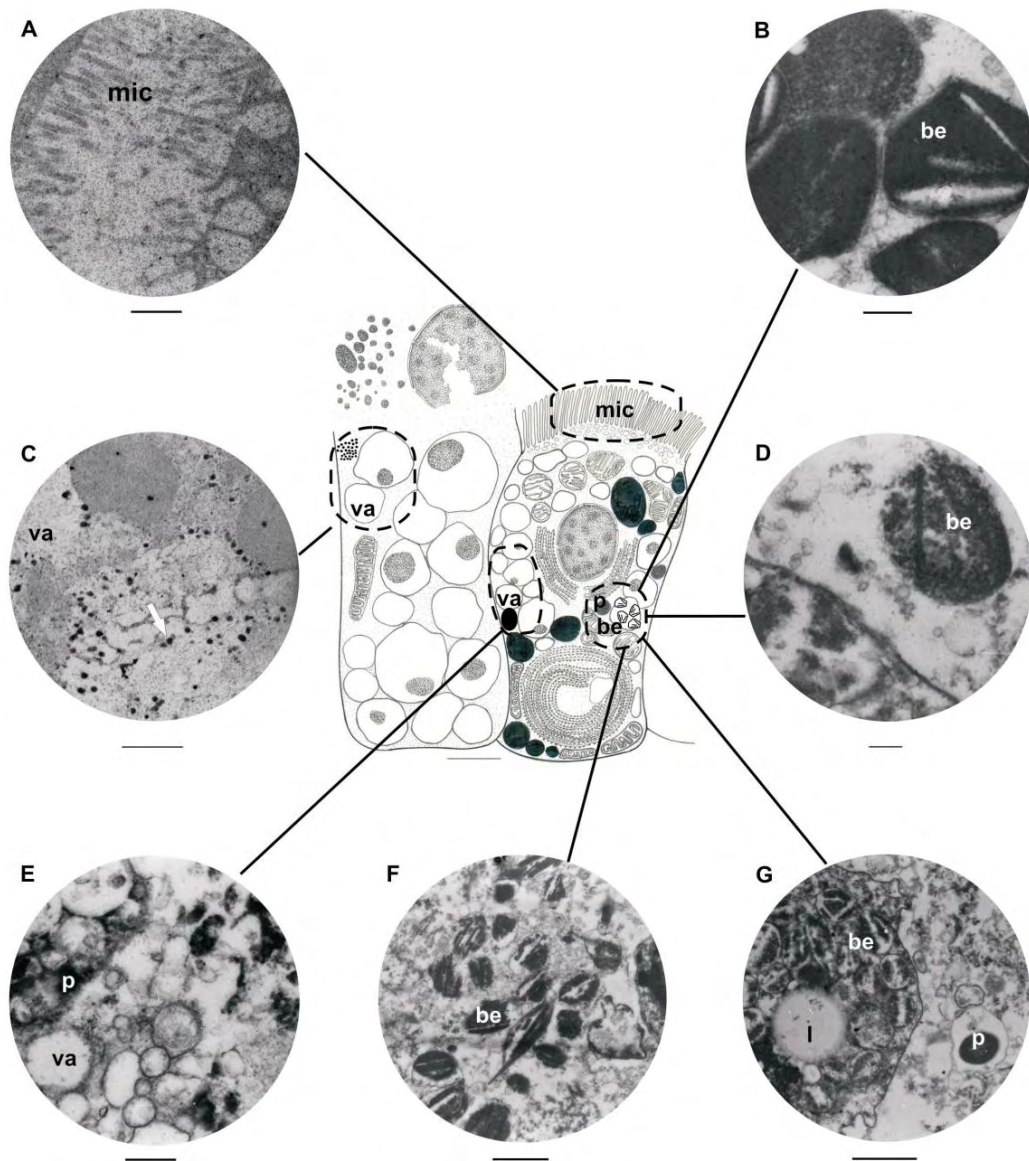
**Barra:** 2  $\mu\text{m}$

**E=** Detalhe das células digestivas do epitélio do intestino médio.

**p=** proteínas; **va=** vacúolos

**Barra:** 1  $\mu\text{m}$

5



**Figure 6:** Citoquímica ultraestrutural de células do intestino médio de fêmeas *Amblyomma cajennense* semi-ingurgitadas e submetidas à 3ª infestação sob o teste da citoquímica ultraestrutural para detecção de proteínas básicas e açúcares totais.

**A-F=** Detecção da prata amoniacal

**G-I=** Detecção de açúcares totais

**A=** Detalhe da lâmina basal (**bl**) positiva e da camada muscular (**m**) negativa ao teste da prata.

**in=** invaginações da lâmina basal

**Barra:** 6  $\mu\text{m}$

**B.** Detalhe do lúmen do intestino com núcleo (**n**).

**va=** vacúolos; **p=** proteínas

**Barra:** 1  $\mu\text{m}$

**C=** Detalhe do domínio basal das células epiteliais com mitocôndrias (**mi**) de diversos tamanhos e formas.

**Barra:** 1  $\mu\text{m}$

**D-E=** Lúmen do intestino com vesículas (**ve**) com eletrondensidades variadas e positivas ao teste da prata.

**va=** vacúolos; **ve=** vesículas; **p=** proteínas; **mic=** microvilosidades

**Barras:** **D=** 2  $\mu\text{m}$ ; **E=** 2  $\mu\text{m}$

**F, I=** Detalhe do domínio apical das células do epitélio com microvilosidades (**mic**) positivas à prata e negativa para o Thiéry.

**p=** proteínas; **ve=** vesículas; **va=** vacúolos

**Barras:** **F=** 1  $\mu\text{m}$ ; **I=** 1  $\mu\text{m}$

**G**= Lúmen do intestino com vesículas (**ve**) com eletrondensidades variadas e lipídeos

(**I**) positivos ao Thiéry.

**Barra:** 1  $\mu\text{m}$

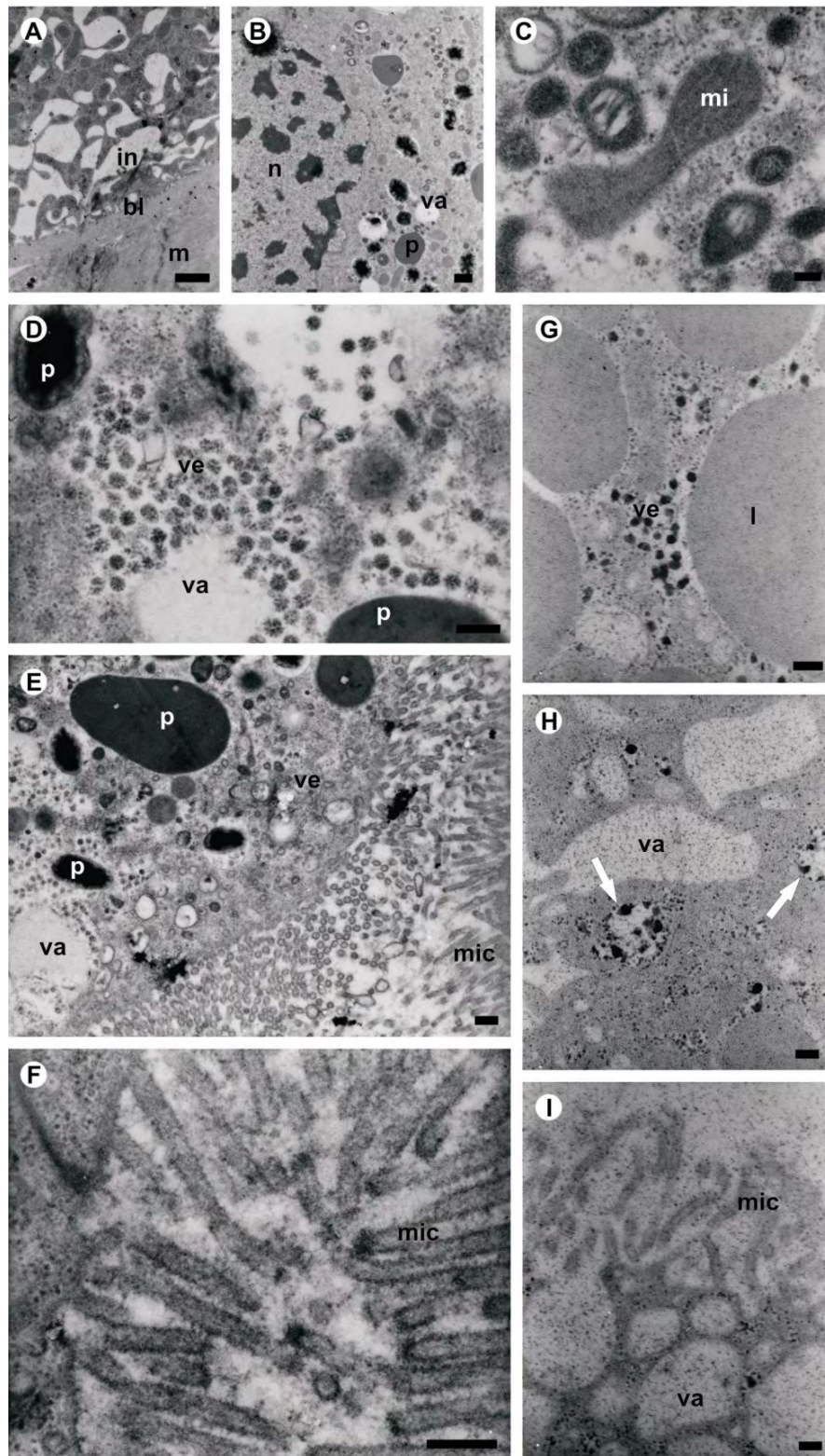
**H.** Detalhe dos vacúolos (**va**) no lúmen do intestino e regiões com fortes marcações

para o Thiéry (**seta**).

**Barra:** 1  $\mu\text{m}$



# 6



**Figure 7:** Citoquímica ultraestrutural de células do intestino médio de fêmeas *Amblyomma cajennense* ingurgitadas e submetidas à 3ª infestação sob o teste da citoquímica ultraestrutural para detecção de proteínas básicas e açúcares totais.

**A-D**= Detecção da prata amoniacal

**E-H**= Detecção de açúcares totais

**A-B**= Detalhe do citoplasma basal das células do epitélio com grânulos protéicos (**p**) fortemente positivos à prata.

**Barras:** **A**= 2 µm; **B**= 6 µm

**C-D**= Citoplasma das células digestivas com retículo endoplasmático rugoso lamelar (**lrer**) e mitocôndrias (**mi**).

**p**= proteínas

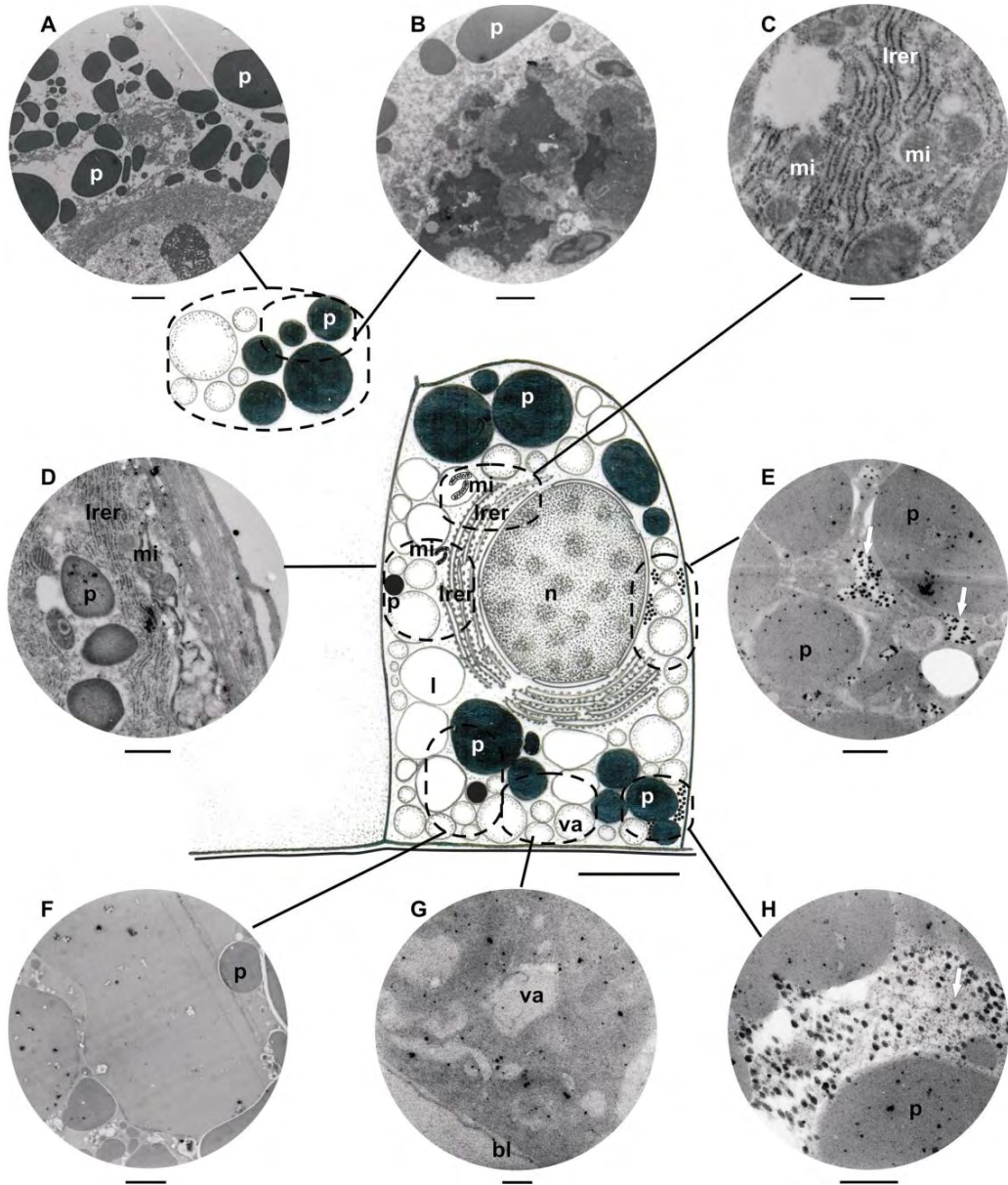
**Barras:** **C**= 1 µm; **D**= 2 µm

**E-H**= Detalhe de marcação positiva ao teste de Thiéry por entre a granulação protéica.

**p**= proteínas; **bl**= lâmina basal; **va**= vacúolos

**Barras:** **E**= 6 µm; **F**= 10 µm; **G**= 2 µm; **H**= 6 µm

7





#### 4. Discussão

O intestino médio nos carrapatos ixodídeos tem grande importância fisiológica, visto que é o órgão responsável pela digestão de todo o sangue ingerido durante o processo de alimentação. Devido à grande complexidade estrutural, poucos trabalhos estão disponíveis descrevendo as alterações morfológicas que nele ocorrem nas diferentes etapas do processo de alimentação. Além disso, há ainda menor quantidade de trabalhos que correlacionam as mudanças estruturais sofridas pelo epitélio desta região do intestino, associando-as a alimentação e à situações de sucessivas infestações, num hospedeiro.

O presente estudo trouxe informações ultraestruturais obtidas por meio da aplicação de técnicas citoquímicas, as quais mostraram que o intestino das fêmeas do carrapato *Amblyomma cajennense* passam, por grandes modificações durante o período de alimentação, que vão se tornando mais acentuadas quando realizam-se as reinfestações, principalmente quanto a produção de proteínas e carboidratos.

A alteração na histologia e histoquímica do epitélio intestinal já haviam sido demonstrados por Caperucci et al. (2009) quando do estudo desta mesma espécie de ectoparasita submetida as mesmas situações, e quando esta foi analisada ao nível de microscopia de luz.

Exceto nos indivíduos em jejum onde a necessidade de síntese e liberação de proteínas e enzimas digestivas seria menor, visto que o processo de alimentação ainda não teria se iniciado.



A presença de proteínas foi marcante nas células do epitélio do intestino médio de *A. cajennense* como já era de se esperar, visto que é grande a necessidade da síntese de enzimas digestivas quando o processo alimentar tem início demonstrando citoquimicamente, a natureza fortemente protéica do intestino médio de *A. cajennense*, fato que justificou a presença de um retículo endoplasmático rugoso desenvolvido nas células dos indivíduos semi e ingurgitados quando submetidos à 1ª infestação e naqueles ingurgitados quando submetidos à 3ª infestação, provavelmente devido ao início do processo alimentar, bem como estimulado pelas reinfestações, visto que o hospedeiro começou a produzir anticorpos contra o carrapato e este por sua vez precisou sintetizar enzimas para inibi-lo.

O transporte e a modificação de material celular via retículo endoplasmático rugoso estaria entre as funções gerais desta organela, que nas células do intestino médio de *A. cajennense* foi encontrado sob a forma lamelar nas fêmeas semi e ingurgitadas submetidas à 1ª infestação e, ingurgitadas e submetidas à 3ª infestação. Naquelas ingurgitadas submetidas à 1ª infestação, ele esteve sob a forma vesicular. Segundo Han e Bordereau (1982), a presença destas duas formas de retículo endoplasmático rugoso nas mesmas células poderia indicar funções distintas para cada uma, onde a vesicular seria a mais ativa e a lamelar, a menos ativa. No entanto, sabe-se que os ribossomos anexam-se às membranas do retículo endoplasmático, apenas quando este está ativo durante a realização dos processos de síntese protéica.

Desta forma os dados obtidos no presente trabalho sugerem que tanto a forma lamelar como a vesicular do retículo endoplasmático rugoso estariam ativos na



síntese protéica devido à grande necessidade de produção de enzimas digestivas durante o processo de alimentação do ectoparasita.

Outra função do retículo seria de síntese de amilases nas células digestivas do intestino médio de *A.cajennense* corroborando Cristofolletti et al. (2001), os quais descreveram a presença de vesículas contendo amilase, fundindo-se, e migrando para o ápice das células digestivas da região anterior do intestino médio de besouros da espécie *Tenebrio molitor*, onde aí seriam eliminadas por processo apócrino. Durante este processo ocorreria o desaparecimento das microvilosidades e a desorganização do citoplasma apical (CRISTOFOLETTI et al., 2001; FERREIRA et al., 2002), assim como também foi observado no presente estudo.

A presença de lipídeos no intestino médio de fêmeas de *A. cajennense* em jejum e naquelas ingurgitadas e submetidas à 1ª infestação, tanto no citoplasma das células digestivas como no das generativas ficou confirmada, por meio de grandes concentrações lipídicas que foram detectadas na região próxima à lâmina basal bem como no domínio apical destas células do intestino, embora não tenha sido observado extenso retículo endoplasmático liso.

Nas fêmeas em jejum, naquelas ingurgitadas e submetidas à 1ª e 2ª infestações e naquelas semi-ingurgitadas e submetidas à 3ª infestação, as gotas lipídicas estiveram principalmente localizadas próximas aos grânulos protéicos. A presença de gotas lipídicas no citoplasma do intestino de *A. cajennense*, pode ter ocorrido tanto devido à produção endógena quanto pela incorporação exógena de elementos oriundos da hemolinfa, corroborando Coons et al (1990) que descreveram esses mesmos processos ocorrendo nas células digestivas também em *Dermacenter variabilis*.



Ainda na questão de produção de lipídeos, este trabalho veio mais uma vez em carrapatos demonstrar a possibilidade da participação das mitocôndrias neste processo agora detectado estar ocorrendo também nas células digestivas do intestino médio de *A. cajennense*. A produção de lipídeos por mitocôndrias já havia sido relatada por Denardi et al (2007) quando estudaram a origem do lipídeo nas células secretoras de ácinos glandulares de fêmeas desta mesma espécie.

Além disso, as mitocôndrias também teriam a capacidade de armazenar substâncias como proteínas e lipídeos, por exemplo, no seu interior funcionando como pequenos depósitos na célula (ALBERTS et al., 2002).

Dados da literatura em outros carrapatos ixodídeos sugeriram ainda, fora à produção endógena, que poderia ocorrer transporte de lipídeo através de espaços intercelulares (SONENSHINE, 1991), sendo que alguns autores demonstraram ainda que esses espaços distender-se-iam para que o transporte pudesse ocorrer com mais facilidade e colapsariam quando cessasse o transporte (BERRIDGE; GUPTA, 1967).

O estudo dos carboidratos presentes nas células do intestino médio de fêmeas em jejum de *A. cajennense* demonstrou que esse elemento está ausente nessa fase de alimentação no epitélio intestinal de *A. cajennense*. No entanto ficou demonstrado que os carboidratos seriam produzidos pelas células generativas e digestivas das fêmeas semi-ingurgitadas submetidas à 1ª infestação, pelas ingurgitadas submetidas à 2ª e 3ª infestações, porém devido às restritas regiões citoplasmáticas onde estes foram encontrados, inferiu-se aqui que os mesmos, assim que fossem sintetizados, seriam na seqüência utilizados e, que apenas poucas quantidades ficariam armazenadas na célula, ou mesmo ainda que a sua síntese (ou incorporação exógena)



poderia ocorrer em baixas taxas nas fêmeas ingurgitadas submetidas à 1ª infestação e nas semi-ingurgitadas submetidas à 2ª e 3ª infestações.

Ao contrário, a presença dos carboidratos foi notável no conteúdo luminal do intestino médio de *A. cajennense*. Ainda com respeito ao estoque de carboidratos nas células a literatura descreveu que os artrópodes em geral exibiriam grande variedade de mecanismos hábeis os quais permitiriam estocar compostos energéticos, que seriam posteriormente utilizados, quando requeridos (SONENSHINE, 1991). Ainda nos Arthropoda, trabalhos que sejam específicos e que mostrem a origem dos carboidratos nas células, ainda são escassos, principalmente quando o objeto de estudo é o carrapato.

No presente trabalho com fêmeas ingurgitadas e submetidas à 1ª e 2ª infestações a MET demonstrou a presença de estruturas eletrondensas e, de formas variadas sugerindo serem endosimbiontes. Estes foram observados tanto localizados no interior do citoplasma das células digestivas, quanto no lúmen do intestino médio de *A. cajennense*.

Segundo dados da literatura existiriam vários registros da ocorrência de bactérias endosimbiontes as quais estariam alojadas na maioria dos órgãos das espécies de argasídeos e de ixodídeos, independentemente da origem geográfica dos mesmos. Essas bactérias seriam organismos que seriam veiculados via processos reprodutivos (transmissão transovariana) e que não causariam danos patogênicos aos carrapatos, mas sim, na maioria dos casos seriam patogênicos para os hospedeiros. Estudos de Cowdry (1925) e Mudrow (1932) mostraram que bactérias Gram-negativas e pleomórficas estariam presentes no sistema digestório de carrapatos *Ornithodoros moubata* durante todas as fases de vida. No entanto, o papel dos





endosimbiontes no ciclo de vida dos carrapatos ixodídeos tem ainda sido um problema a ser solucionado, devido a grande variabilidade, e ao pouco conhecimento e escassa literatura sobre a dieta desses mesmos endosimbiontes, seu comportamento e sua morfologia. Assim a presença destes microrganismos no intestino médio de *A. cajennense* vem sugerir a sua participação de alguma forma, ainda não conhecida, nos processos de digestão dos alimentos ingeridos pelo ectoparasita.

### **Agradecimentos**

Esse trabalho foi financiado pela FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), processo nº 05/57707-2. Os autores agradecem à Antônio Teruyoshi Yabuki, Mônica Iamonte, Gerson Mello Souza, Cristiane Márcia Mileo pelo suporte técnico.



## 5. Referências

AESCHLIMANN, A., Développement and embryonnaire d' *Ornithodoros moubata* (Murray) et transmission transovarienne de *Borellia duttoni*. **Acta Tropica**, Amsterdam, v. 15, n. 3 p. 15-64, 1958.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. **Molecular biology of the cell**. 4. ed. Garland Publishing, Inc., New York & London, 2002. p. 1294.

BALASHOV, Yu. S. A translation of bloodsucking ticks (Ixodidae) vectors of diseases of man and animals. **Miscellaneous Publications of the Entomological Society of America**, Lanham, v. 8, n. 5, p. 159 – 376, 1972.

BERRIDGE, M. J.; GUPTA, B.L. Fine-structural changes in relation to ion and water transport in the rectal papillae of the blowfly, *Calliphora*. **Journal of Cell Science**, Cambridge, v. 2, n. 1, p. 89 – 112, 1967.

CAPERUCCI, D., CAMARGO-MATHIAS, M. I., BECHARA, G. H. Histopathology and ultrastructure features of the midgut of adult females of the tick *Amblyomma cajennense* Fabricius, 1787 (Acari: Ixodidae) in various feeding stages and submitted to three infestations. **Ultrastructural Pathology**, v. 33, n. 6, p. 249–259, 2009.



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, n. 1, p. 125 – 142, 1990.

COWDRY, E. V. A group of microorganisms transmitted hereditarily in ticks and apparently unassociated with disease. *Journal Experimental Medicine*. v. **41**, p. 817–830, 1925.

CRISTOFOLETTI, P.T.; RIBEIRO, A. F.; TERRA, W. T. Apocrine secretion of amylase, exocytosis of trypsin along the midgut of *Tenebrio molitor* larvae. **Journal Insect Physiology**, USA, v. 47, n. 2, p. 143-155, 2001.

DIEHL, P. A. Zur Oogenese bei *Ornithodoros moubata* (Murray) (Ixodoidea: Argasidae) unter Besonderer Berücksichtigung der Vitellogenese. **Acta Tropica (Basel)**, Amsterdam, v. 27, n. 4, p. 301–355, 1970.

FERREIRA, C.; BELLINELLO, G. L.; RIBEIRO, A. F.; TERRA, W. R. 1990. Digestive enzymes associated with the glycocalix, microvillar membranes and secretory vesicles from midgut cells of *Tenebrio molitor* larvae. **Insect Biochemistry**, France, v. 20: p. 839-847, 1990.

HARRISON, W. F.; FOELIX, R. F. **Microscopic anatomy of invertebrates: chelicerate arthropoda**. 1.ed. New York; Wiley-Liss, 1999. v. 8B, p. 267 – 514.



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, n. 8, p. 2737 – 2745, 1988.

GRANDJEAN, O.; AESCHLIMANN, A. Contribution to the study of digestion in ticks: histology and fine structure of the midgut epithelium of *Ornithodoros moubata* Murray (Ixodoidea, Argasidae). **Acta Tropica (Basel)**, Amsterdam, v. 30, n. 4, p. 193 – 212, 1973.

HAN, S. I.; BORDEREAU, C. Origin and formation of the royal fat body of higher termite queens. **Journal Morphology**, v. 173, n. 6, p. 17–28, 1982.

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.

MUDROW, E. Uber die intrazellularen Symbionten der Zecken. **Zeitschrift für Parasitenkunde, Berlin, Germany**, v. 5, p. 138–183, 1932.

REY, L. **Parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 752 – 759.

THIERY, J. P. Mise en evidence des polysaccharides sur coupes fines en



microscopie electronique. **Journal of Microscopical**, Oxford, v. 6, p. 987 – 18, 1967.

SOLL, M. D. The future of anthelmintic therapy from an industry perspective. In: Workshop Held at International Conference of the WAAVP. 16, Sun City, South Africa, Managing Anthelmintic Resistance in Endoparasites: Ed Van Wyk, J. A. & Van Schalkwyk, P. C., 1997

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





**“Estudo histoquímico para detecção de proteínas, carboidratos e cálcio no intestino médio de fêmeas de carrapatos *Amblyomma cajennense* Fabricius, 1787 (Acari: Ixodidae), em vários estágios de alimentação e submetidos à três infestações”.**

Débora Caperucci <sup>1</sup>, Gervásio Henrique Bechara <sup>2</sup> and Maria Izabel Camargo Mathias <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Biociências, Departamento de Biologia, UNESP, Universidade Estadual Paulista, Avenida 24A, nº 1515, Rio Claro, S.P, Brazil, 13506-900, C. P. 0199.

<sup>2</sup> Departamento de Patologia Veterinária, FCAV, UNESP, Universidade Estadual Paulista, Via de Acesso Prof. Paulo Castellane, s/n, Jaboticabal, S.P, Brazil, 14884-900.

## Resumo

O objetivo deste trabalho foi o de analisar as alterações que as células do epitélio do intestino médio de fêmeas de carrapatos da espécie *A. cajennense* sofrem, por meio da aplicação de técnicas histoquímicas (azul de bromofenol para detecção de proteínas), (PAS/ Alcian blue para detecção de polissacarídeos com grupamentos 1-2 glicol e polissacarídeos ácidos) e von Kossa (para detecção de cálcio).

Os resultados do estudo histoquímico para detecção de proteínas mostraram que nas fêmeas em jejum o epitélio apresenta-se fracamente corado, ao contrário daqueles de 1ª infestação semi e ingurgitados e de 2ª semi-ingurgitados e, os quais mostraram-se fortemente corados pelo azul de bromofenol. Nos indivíduos ingurgitados de 2ª infestação e naqueles semi e ingurgitados de 3ª infestação o epitélio (desorganizado) reagiu fortemente, exceto aqueles de 3ª infestação semi-ingurgitados que apresentaram-se fracamente corados. As células digestivas e generativas também foram observadas em todas as fases estudadas, porém as secretoras somente foram naqueles semi-ingurgitados de 2ª infestação. O teste do PAS/alcian blue nas fêmeas em jejum revelou o epitélio com fraca positividade, assim como o daqueles semi-ingurgitados de 1ª infestação. Naqueles ingurgitados de 1ª infestação e semi de 2ª infestação o epitélio foi observado fracamente corado e naqueles ingurgitados de 2ª infestação e semi e ingurgitados de 3ª infestação o epitélio foi observado fracamente corado. As células digestivas e generativas também foram observadas, porém as células secretoras não. A técnica de von Kossa mostrou que o epitélio apresentou-se positivo em todas as situações estudadas. Assim como as células digestivas e as generativas, as secretoras foram observadas nas fêmeas semi-ingurgitadas de 2ª infestação. Sendo assim, o





presente estudo trouxe morfológicas por meio da aplicação de testes histoquímicos, sobre o intestino das fêmeas do carrapato *A. cajennense* mostrando que esse órgão passa, por grandes modificações durante o período de alimentação, as quais se tornam mais acentuadas quando realizam-se reinfestações.

**Palavras-Chave:** *Amblyomma cajennense*; carrapatos; intestino médio; histoquímica; reinfestação.

## 1. Introdução

Durante o ciclo de alimentação os carrapatos ixodídeos, passam por duas fases principais: a) na primeira fase ou de crescimento, ele ingere pequena quantidade de sangue, que é digerido rapidamente e é quando os órgãos crescem e se desenvolvem e b) na segunda ou de expansão, é quando ocorre a maior ingestão de sangue (BALASHOV, 1967).

Dentro do gênero *Amblyomma* encontra-se a espécie *A. cajennense* onde os adultos são popularmente conhecidos como carrapato-estrela, carrapato de cavalo ou rodoleiro, as larvas por carrapatinhos ou micuins, e as ninfas por vermelhinhos. O macho da espécie *A. cajennense* apresenta escudo ornamentado e recobrimdo a maior parte do corpo, e as fêmeas, tem o escudo também ornamentado, com áreas claras entremeadas por tons marrons-avermelhados, e manchas ou bandas escuras (GUGLIELMONE et al., 2006).

Os ixodídeos concentram o sangue que consomem de seu hospedeiro, portanto conseguem eliminar o excesso de água deste sangue, ou por transpiração corporal, ou pelos restos fecais, ou ainda através de suas glândulas salivares. A voracidade pela qual os carrapatos consomem o sangue pode resultar em sérios danos para o seu hospedeiro, principalmente quando há muitos carrapatos infestando um só indivíduo (SONENSHINE, 1991).

Durante as primeiras 12-24 horas após a fixação no hospedeiro (primeira fase) mudanças começam a ser observadas no epitélio do intestino médio dos carrapatos, tais como a proliferação e diferenciação das células generativas (SONENSHINE, 1991).



O sistema digestório dos carrapatos está envolvido na digestão de somente um tipo de alimento, o sangue. Outras funções dele incluiriam o armazenamento de alimento devido à ausência de enzimas digestivas extracelulares (GRANDJEAN, 1983), de água, bem como da regulação dos íons e da excreção. O sistema digestório dos carrapatos também tem sido descrito como sendo um reservatório onde patógenos podem se desenvolver (GUSHCHINA et al., 1984; KOCAN et al., 1987; HIGUCHI, 1987).

Morfo-histologicamente o sistema digestório dos carrapatos está dividido em três regiões: intestino anterior (estomodeu), médio (mesenteron), e posterior (proctodeu) e a maioria dos estudos, especificamente com o intestino médio tratam das mudanças histológicas das células epiteliais durante a ingestão/digestão do sangue (HUGHES, 1954; TILL, 1961; CHINERY, 1964; BALASHOV, 1972; RAIKHEL, 1975a; COONS et al., 1982; TARNOWSKI; COONS, 1989).

O intestino médio de carrapatos em jejum consiste de um epitélio pseudo-estratificado apoiado numa membrana basal e envolto externamente por camadas de músculos distribuídos circular e longitudinalmente (SONENSHINE, 1991) e em *Amblyomma cajennense* as camadas musculares foram encontradas dispostas circular e longitudinalmente, onde a camada circular envolve o tubo mais externamente (CAPERUCCI et al., 2009).

A maioria dos autores tem descrito que o epitélio do intestino médio é composto basicamente por dois tipos de células: as generativas e as digestivas que respondem diferentemente aos estados fisiológicos dos carrapatos, podendo ser encontradas em diferentes estágios de atividade. As células digestivas têm origem à



partir das generativas, que se diferenciam durante o período de alimentação (SONENSHINE, 1991).

No processo de parasitismo os carrapatos, a partir do momento que entram em contato com os hospedeiros na primoinfestaç o, estimulam o sistema imune destes últimos, o que provoca altera es histológicas no trato digestório dos ectoparasitas, devido às a es conjuntas das respostas inflamatórias primária imunes humorais e celulares do hospedeiro (BECHARA, informa o pessoal).

Adicionalmente, sabe-se que animais que desenvolvem resistência aos carrapatos tornam-se menos susceptíveis às doenças infecciosas por estes veiculadas (WIKEL et al., 1997; RODRIGUEZ et al., 1995) e a utiliza o apenas de animais com resistência natural a carrapatos impede, por outro lado o aproveitamento comercial das características genéticas de produ o desejáveis de raças susceptíveis ao carrapato.

Para o desenvolvimento de vacinas anticarrapato, não   suficiente apenas o conhecimento da biologia do ácaro, da rela o parasito-hospedeiro e dos mecanismos de resistência ao carrapato. Pesquisas sobre aspectos morfo-funcionais de tecidos e de órgãos isolados de carrapatos são cruciais para a descoberta de sítios produtores de potenciais antígenos para a produ o de vacinas contra esse flagelo da pecuária nacional (WILLADSEN et al., 1999).

Diante das informa es expostas e devido às diferenças morfológicas encontradas no intestino médio de fêmeas de carrapatos da espécie *Amblyomma cajennense* em vários estágios de alimenta o, o presente trabalho teve como objetivo principal:

a) Detectar histoquímicamente a presença de proteínas, carboidratos e cálcio nos tecidos e nas células do intestino médio de *A. cajennense*, na tentativa de se entender melhor a fisiologia deste órgão em hospedeiros que passaram por sucessivas infestações.

## 2. Material e Métodos

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Hospedeiros

Foram utilizadas coelhas provenientes do Biotério Central da UNESP, campus de Jaboticabal, S.P, Brasil, mantidas em gaiolas de contenção e alimentadas com ração apropriada e água *ad libitum*.

#### 2.1.2. Carrapatos

Para a realização deste trabalho foram utilizadas 10 fêmeas adultas de carrapatos, da espécie *Amblyomma cajennense*, em condições de jejum, semi-ingurgitadas e ingurgitadas, as quais foram cedidas pelo Prof. Dr. Gervásio Henrique Bechara do Departamento de Patologia Veterinária da UNESP *campus* de Jaboticabal (SP). Os machos (10) foram utilizados com o propósito de fecundar as fêmeas, e foram obtidos a partir de colônia mantida em laboratório em condições controladas em estufa BOD (29°C, 80% de umidade e fotoperíodo de 12 horas). Parte das fêmeas coletadas em jejum foram liberadas no hospedeiro seguindo os procedimentos de Bechara et al., (1995).

### **2.1.3. Liberação dos casais de *Amblyomma cajennense* na câmara de alimentação (BECHARA et al, 1995)**

Decorridas 24 horas da fixação da câmara, os indivíduos (cinco casais), foram colocados no interior da câmara.

A primeira observação desse microambiente foi feita aproximadamente 8 horas após a liberação dos casais (tempo necessário para se acomodarem), e a partir daí de 3 em 3 horas para acompanhar a fixação dos carrapatos na pele da coelha. De modo geral, as fêmeas, após algumas tentativas sem sucesso, se fixaram e não se desprenderam mais até o final da alimentação, enquanto que os machos se fixaram, permaneceram se alimentando por um período pequeno e se desprenderam, repetindo este comportamento muitas vezes, até copularem com as fêmeas.

Após 6 dias de fixação das fêmeas, algumas foram retiradas com o auxílio de pinça, para a realização das análises. Por volta de 8 à 10 dias as fêmeas que permaneceram se alimentando ingurgitaram e se desprenderam voluntariamente da coelha hospedeira. Foram realizadas três infestações com intervalos de 30 dias.

Nos laboratórios do Departamento de Biologia da UNESP *campus* de Rio Claro, SP, Brasil, os carrapatos em jejum, em alimentação e alimentados foram colocados em freezer por alguns minutos para anestesia por choque térmico e, então, tiveram os intestinos retirados em solução tamponada de salina-PBS (7.5 g de NaCl + 2.38 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 2.72 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 1000 mL de água destilada) para fixação e aplicação das diferentes técnicas.

## 2.2. Métodos

### 2.2.1. Histoquímica

Para os estudos histoquímicos do intestino médio de fêmeas de carrapatos da espécie *Amblyomma cajennense*, foram realizadas secções histológicas, obtidas através de inclusão do material em historesina JB-4, para rotina histológica. Entretanto, o material após ser dissecado foi fixado em diferentes fixadores de acordo com a técnica histoquímica utilizada.

### 2.2.2. Técnica do azul de bromofenol para detecção de proteínas (PEARSE, 1985)

Os intestinos foram fixados em Paraformaldeído 4% e NaCl 0.9% em tampão fosfato 10% (0.1M – pH 7.4) por aproximadamente 24 horas. Os cortes foram recolhidos em lâminas de vidro e corados com solução de Azul de Bromofenol à temperatura ambiente durante 2 horas, sendo em seguida banhados em solução aquosa de ácido acético 0.5%, durante 5 minutos. Logo após, as lâminas foram passadas no álcool butílico terciário por 5 minutos. Em seguida, foram secas, diafanizadas em xilol e montadas em Bálsamo do Canadá.

### 2.2.3. Técnica do PAS/ alcian blue para detecção de polissacarídeos com grupamentos 1-2 glicol e polissacarídeos ácidos (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983)

Os intestinos foram fixados em Bouin aquoso por 6 horas. As secções 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



lâminas contendo as secções foram colocadas no Reativo de Schiff por 30 minutos e lavadas em água corrente durante 10 minutos. A seguir, foram contra coradas com Hematoxilina durante 2 minutos e lavadas em água corrente. Posteriormente, foram secas, diafanizadas em xilol e montadas em Bálamo do Canadá.

#### **2.2.4. Técnica de von Kossa para detecção de cálcio (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA 1983)**

Os intestinos de 20 fêmeas foram fixados em paraformaldeído 4% por aproximadamente 24 horas. As lâminas contendo as secções obtidas com 4 $\mu$ 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 e em seguida, foram diafanizadas em xilol e montadas em Bálamo do Canadá para posterior observação e documentação fotográfica em fotomicroscópio MOTIC BA 300.



### 3. Resultados

#### 3.1. Detecção de Proteínas

##### Indivíduos em jejum

Os resultados do estudo histoquímico obtidos por meio da aplicação da técnica do azul de bromofenol mostram que nas fêmeas de carrapatos *Amblyomma cajennense* em jejum as células digestivas (maiores do que as generativas), do epitélio pseudo-estratificado possuem apenas as regiões citoplasmáticas intervacuolares positivas ao teste. Os próprios vacúolos são negativos, ao contrário dos núcleos das células de ambos os tipos que são fortemente positivos, além de estarem localizados em várias alturas (Fig. 1A).

A membrana basal e a camada muscular reagem positivamente ao teste (Figs. 1A, B).

##### Indivíduos semi-ingurgitados submetidos à 1ª infestação

No estágio alimentar semi-ingurgitado o intestino médio das fêmeas de *A. cajennense* submetidas à 1ª infestação apresentam tanto o citoplasma quanto o núcleo das células do epitélio, estratificado, fortemente coradas. Os vacúolos citoplasmáticos das células digestivas reagem com positividade ao teste (Figs. 1B, C).

A membrana basal é observada fortemente positiva, indicando a presença de elementos protéicos (Fig. 1B).

### **Indivíduos ingurgitados submetidos à 1ª infestação**

Nas fêmeas em estágio alimentar ingurgitado, submetidas à 1ª infestação, o epitélio do intestino médio ainda apresenta-se estratificado, apresentando reação positiva ao teste (Figs. 1D, F).

As células dos estratos do epitélio mais próximos do lúmen do intestino possuem citoplasma com vacuolização fracamente positiva ao azul de bromofenol (Figs. 1D, E).

Algumas células que estão em contato com o lúmen possuem grandes vacúolos negativos, outras células, no entanto parecem estar liberando partes do citoplasma com positividade ao teste ou mesmo parecem estar se desprendendo inteiros do epitélio em direção ao lúmen (Figs. 1E, F).

O domínio apical das células digestivas é o local onde existe maior vacuolização e esta apresenta-se fracamente positiva. As células dos estratos basais (células generativas ou indiferenciadas) possuem citoplasma fortemente corado pelo azul de bromofenol com a presença de alguns vacúolos fracamente positivos (Figs. 1E, F).

A camada muscular e os núcleos celulares reagem fortemente ao teste histoquímico (Fig. 1F).

### **Indivíduos semi-ingurgitados submetidos à 2ª infestação**

O epitélio do intestino médio de fêmeas *A. cajennense* neste estágio alimentar é observado estratificado e intensamente positivo ao teste. Os núcleos das células digestivas reagem positivamente deixando os nucléolos evidentes. Na base do epitélio estão localizadas células generativas, com citoplasma vacuolizado e intensamente positivo, indicando um alto conteúdo protéico (Figs. 2A, B).

Neste estágio são observadas as células secretoras, que reagem fortemente ao azul de bromofenol, evidenciando grande atividade de síntese protéica e ou armazenamento de proteínas. Estas células localizam-se isoladamente ou em pequenos grupos sempre por entre as células digestivas, estas também fortemente coradas (Fig. 2B) O citoplasma das células digestivas apresentam grande quantidade de grânulos citoplasmáticos de diversos tamanhos fortemente corados (Figs. 2A, B).

As camadas musculares apresentam-se espessas e poucos núcleos fracamente corados foram observados (Fig. 2C).

### **Indivíduos ingurgitados submetidos à 2ª infestação**

No estágio alimentar ingurgitado de fêmeas submetidas à 2ª infestação, o epitélio do intestino médio aparece desorganizado, porém positivo ao teste. É possível observar algumas células ainda com aspecto íntegro, porém, fracamente coradas, evidenciando um baixo conteúdo protéico. Alguns núcleos das células digestivas também são observados fracamente corados (Figs. 2E, F). As células digestivas e as generativas com aspecto íntegro são observadas fracamente coradas.

Próximo à membrana basal observa-se a presença de vacuolização fracamente positiva ao azul de bromofenol, em meio a restos citoplasmáticos também fracamente positivos (Fig. 2D).

A membrana basal apresenta-se espessada, fracamente positiva e com invaginações (Figs. 2D, E, F).

### **Indivíduos semi-ingurgitados submetidos à 3ª infestação**

No estágio alimentar semi-ingurgitado e submetidos à 3ª infestação, o epitélio ainda está desorganizado, porém fortemente positivo e muitos núcleos fortemente corados são observados (Fig. 3A).

O citoplasma da maioria das células digestivas é observado vacuolizado e fracamente positivo ao teste empregado (Fig. 3A).

As camadas musculares estão positivas ao teste e os núcleos da camada muscular apresentaram-se fracamente corados (Fig. 3A).

### **Indivíduos ingurgitados submetidos à 3ª infestação**

Nas fêmeas no estágio alimentar ingurgitado e submetidas à 3ª infestação, o epitélio do intestino médio é observado sem estratificação, desorganizado e fracamente corado, indicando aí a pouca quantidade de elementos protéicos. As poucas células ainda íntegras que persistem são observadas intensamente coradas e poucos núcleos fracamente corados foram observados (Figs. 3C, D).

No citoplasma das células digestivas, ainda íntegras, são observadas muitas esferas de natureza protéica, onde a maior positividade parece ocorrer na borda dos mesmos com centro com fraca positividade (Figs. 3C, D).

Neste estágio a membrana basal, apresenta-se fracamente corada, totalmente desorganizada e com invaginações na direção do epitélio (Figs. 3B, D).

As camadas musculares são evidentes e fracamente positivas ao teste (Fig. 3D).

### 3.2. Detecção de Polissacarídeos

#### Indivíduos em jejum

Os resultados do estudo histoquímico para detecção de polissacarídeos com grupamentos 1-2 glicol e polissacarídeos ácidos, obtidos por meio da aplicação da técnica do PAS/ alcian blue mostram que nas fêmeas de carrapatos *Amblyomma cajennense* em jejum o epitélio que encontra-se pseudo-estratificado está fracamente positivo, com os núcleos celulares observados fortemente corados, devido a contracoloração do material com hematoxilina (Fig. 4A).

As células digestivas e generativas apresentam o citoplasma com intensa granulação polissacarídica positiva localizada aleatoriamente. Poucos núcleos das células digestivas são observados (Fig. 4A).

Camadas musculares de fina espessura e fracamente positivas são observadas (Fig. 4A).

#### Indivíduos semi-ingurgitados submetidos à 1ª infestação

Nas fêmeas no estágio alimentar semi-ingurgitado o epitélio do intestino médio encontra-se estratificado onde as células das várias camadas são positivas ao teste (Figs. 4B, C).

As células digestivas, mais próximas do lúmen, apresentam maior vacuolização fracamente positiva no seu domínio apical. No lúmen do intestino médio destas fêmeas observa-se a presença de grandes esferas fracamente PAS positivas, bem como estruturas negativas ao PAS e hematoxilina positiva, sugerindo serem porções nucleares (Fig. 4C).

As camadas musculares reagiram fracamente ao teste (Fig. 4B).

### **Indivíduos ingurgitados submetidos à 1ª infestação**

Nos indivíduos no estágio alimentar ingurgitado, submetidos à 1ª infestação, o epitélio ainda é observado estratificado e as células reagem fracamente ao PAS (Figs. 4D, E, F, G).

As células dos estratos basais possuem citoplasma, com muitos vacúolos fracamente corados. As células dos estratos próximos ao lúmen possuem citoplasma medianamente positivo e vacúolos negativos. No domínio apical das células mais próximas do lúmen, provavelmente células digestivas, existe maior vacuolização fracamente positiva e com núcleos fortemente positivos (Figs. 4D, E, G).

Observa-se ainda a presença de polissacarídeos ácidos no espaço intercelular das células digestivas e generativas (Figs. 4D, F, G).

As células em contato direto com o lúmen possuem vacúolos negativos ao PAS. Algumas parecem estar liberando porções ou mesmo se desprendendo do epitélio em direção ao lúmen, sob a forma de esferas fortemente positivas (Fig. 4D).

### **Indivíduos semi-ingurgitados submetidos à 2ª infestação**

Nas fêmeas em estágio alimentar semi-ingurgitado submetidas à 2ª infestação, o epitélio apresenta-se estratificado e reage fracamente ao teste, evidenciando um baixo teor de polissacarídeos (Figs. 5A, B, C).

As células digestivas reagem positivamente ao teste e muitos vacúolos negativos são observados nos espaços intercelulares. Os núcleos apresentam fraca positividade.

No domínio basal das células digestivas observa-se grandes concentrações de pequenos grânulos de polissacarídeos ácidos (Figs. 5A, B).

As células generativas reagem fracamente ao teste com citoplasma positivo e vacuolizado (Figs. 5A, B, C). Os núcleos destas células reagem com fraca positividade.

A camada muscular é observada reagindo fracamente ao PAS (Figs. 5A, B, C).

### **Indivíduos ingurgitados submetidos à 2ª infestação**

Nestas fêmeas o epitélio do intestino médio aparece desorganizado e com fraca positividade. Alguns núcleos positivos são observados, bem como alguns nucléolos. Próximo à membrana basal observa-se a presença de vacúolos extracelulares negativos ao corante, em meio a restos citoplasmáticos também negativos (Fig. 5D).

O lúmen do intestino médio destes indivíduos é observado com a presença de muitas esferas fracamente positivas (Fig. 5D).

### **Indivíduos semi-ingurgitados submetidos à 3ª infestação**

Nos indivíduos semi-ingurgitados submetidos à 3ª infestação o epitélio ainda está desorganizado e é fracamente positivo ao PAS. Alguns núcleos das células digestivas foram observados fracamente positivos. O citoplasma das células digestivas e generativas estão vacuolizados apresentando-se fracamente corados e poucos núcleos destas últimas foram observados fracamente corados (Fig. 5E).

A camada muscular reage negativamente ao teste (Fig. 5E).

### **Indivíduos ingurgitados submetidos à 3ª infestação**

Nestas fêmeas submetidas à 3ª infestação o epitélio está completamente desorganizado e fracamente positivo ao teste. As poucas células íntegras observadas e que ainda persistem são PAS positivas (Fig. 5F).

O citoplasma das células digestivas apresentam grande quantidade de vacúolos fracamente corados. No lúmen das células digestivas são observadas muitas esferas de diversos tamanhos e fortemente PAS positivas (Figs. 5F, G).

Os núcleos das células digestivas reagem positivamente ao teste e pode-se notar a presença de nucléolos (Fig. 5G).

Neste estágio de infestação e nesta fase de alimentação a membrana basal, mostra-se totalmente desorganizada e com invaginações na direção do epitélio (Fig. 5F).

### **3.3. Detecção de Cálcio**

#### **Indivíduos em jejum**

Os resultados do estudo histoquímico para detecção de cálcio, obtidos por meio da aplicação da técnica do von Kossa mostram que nas fêmeas de carrapatos *Amblyomma cajennense* em jejum as células do intestino médio reagem fracamente ao teste (Fig. 6A).

A camada muscular que dá suporte ao epitélio pseudo-estratificado nesta situação de jejum é fina em espessura (Fig. 6A).



### **Indivíduos semi-ingurgitados submetidos à 1ª infestação**

Nas fêmeas no estágio alimentar semi-ingurgitado, o epitélio do intestino médio apresenta células digestivas e generativas positivas ao teste para detecção de cálcio (Fig. 6B).

As células digestivas apresentam maior vacuolização no domínio apical e seus núcleos reagem fortemente à técnica (Fig. 6B).

As células generativas apresentam o citoplasma vacuolizado e seus núcleos positivos ao von Kossa (Fig. 6B).

Os vacúolos observados em todas as células são negativos ao teste aplicado (Fig. 6B).

Concentrações de pequenas marcações cálcio positivas, são observadas nas células generativas basais do epitélio (Fig. 6B).

### **Indivíduos ingurgitados submetidos à 1ª infestação**

Nas fêmeas ingurgitadas as células generativas possuem o citoplasma fortemente corado pelo von Kossa e com apenas alguns vacúolos negativos ao corante (Fig. 6C).

As células digestivas possuem o citoplasma positivo ao teste e a vacuolização nelas presente é negativa (Fig. 6C).

Nas células generativas existem marcações de cálcio sob a forma de grânulos fortemente positivas ao von Kossa (Fig. 6C).

### **Indivíduos semi-ingurgitados submetidos à 2ª infestação**

Nestes indivíduos a membrana basal espessada está fracamente corada pelo von Kossa (Fig. 6D).

As células generativas apresentam-se fracamente coradas devido ao citoplasma vacuolizado (Fig. 6D).

As células digestivas são positivas ao teste e seus núcleos e nucléolos podem ser evidenciados. O citoplasma está altamente vacuolizado e entre os vacúolos são observadas esferas de cálcio fortemente positivas (Fig. 6D).

As células secretoras são fortemente positivas ao teste, destacando-se das células digestivas pela grande quantidade de esfero-cristais cálcio positivos (Fig. 6D).

### **Indivíduos ingurgitados submetidos à 2ª infestação**

Nos indivíduos no estágio alimentar ingurgitado e submetidos à 2ª infestação, o epitélio foi observado desorganizado (Figs. 6E, F).

São observadas no lúmen esferas arredondadas de vários tamanhos e medianamente coradas pelo von Kossa (Figs. 6E, F).

No lúmen são observadas marcações de cálcio fracamente positivas (Figs. 6E, F).

### **Indivíduos semi-ingurgitados submetidos à 3ª infestação**

Nestas fêmeas no estágio alimentar semi-ingurgitado e submetidas à 3ª infestação, o epitélio apresenta células digestivas e generativas que são negativas ao teste (Fig. 6G).

A membrana basal é observada negativa ao teste (Fig. 6G).

Pequenas marcações de cálcio são observadas fracamente coradas no lúmen do intestino (Fig. 6G).

### **Indivíduos ingurgitados submetidos à 3ª infestação**

Nas fêmeas de *A. cajennense* no estágio alimentar ingurgitado, as células digestivas do epitélio do intestino médio dos indivíduos submetidos à 3ª infestação possuem o citoplasma com grande quantidade de vacúolos fracamente positivos ao corante (Fig. 6H).

No lúmen do intestino são observadas muitas esferas de diversos tamanhos e fracamente positivas pelo von Kossa. Marcações de cálcio no lúmen do intestino são observadas fracamente coradas (Figs. 6H, I).

Nesta fase de alimentação e nesta infestação a membrana basal, mostra-se negativa ao corante (Fig. 6H).

#### 4. Legendas e Figuras

**Figura 1.** Secções histológicas do intestino médio de fêmeas de *A. cajennense* em jejum e submetidas à 1<sup>o</sup> infestação, coradas pelo Azul de Bromofenol para detecção de proteínas.

**A.** Fêmeas em jejum;

**B, C.** Fêmeas semi-ingurgitadas;

**D, E, F.** Fêmeas ingurgitadas.

**A.** Epitélio pseudo-estratificado com células digestivas (**dc**) e generativas (**gc**), núcleos (**n**) arredondados e vacúolos (**v**) negativos ao corante.

**m**=camada muscular; **lu**=lúmen do intestino

**Barra:** 10  $\mu\text{m}$

**B, C.** Epitélio estratificado fortemente corado com vacuolização (**v**) fracamente corada das células digestivas (**dc**).

**gc**=células generativas; **bm**=membrana basal, **n**=núcleo.

Barras: **B**= 10  $\mu\text{m}$       **C**= 50  $\mu\text{m}$

**D.** Epitélio estratificado fortemente positivo com células digestivas (**dc**) e generativas (**gc**) com o citoplasma vacuolizado (**v**) e fracamente positivo ao azul de bromofenol.

**Barra:** 50  $\mu\text{m}$

**E.** Detalhe dos grandes vacúolos (**v**) em contato com o lúmen (**l**) negativos ao corante, porém contendo no seu interior grosseira granulação positiva

**n**= núcleo do epitélio

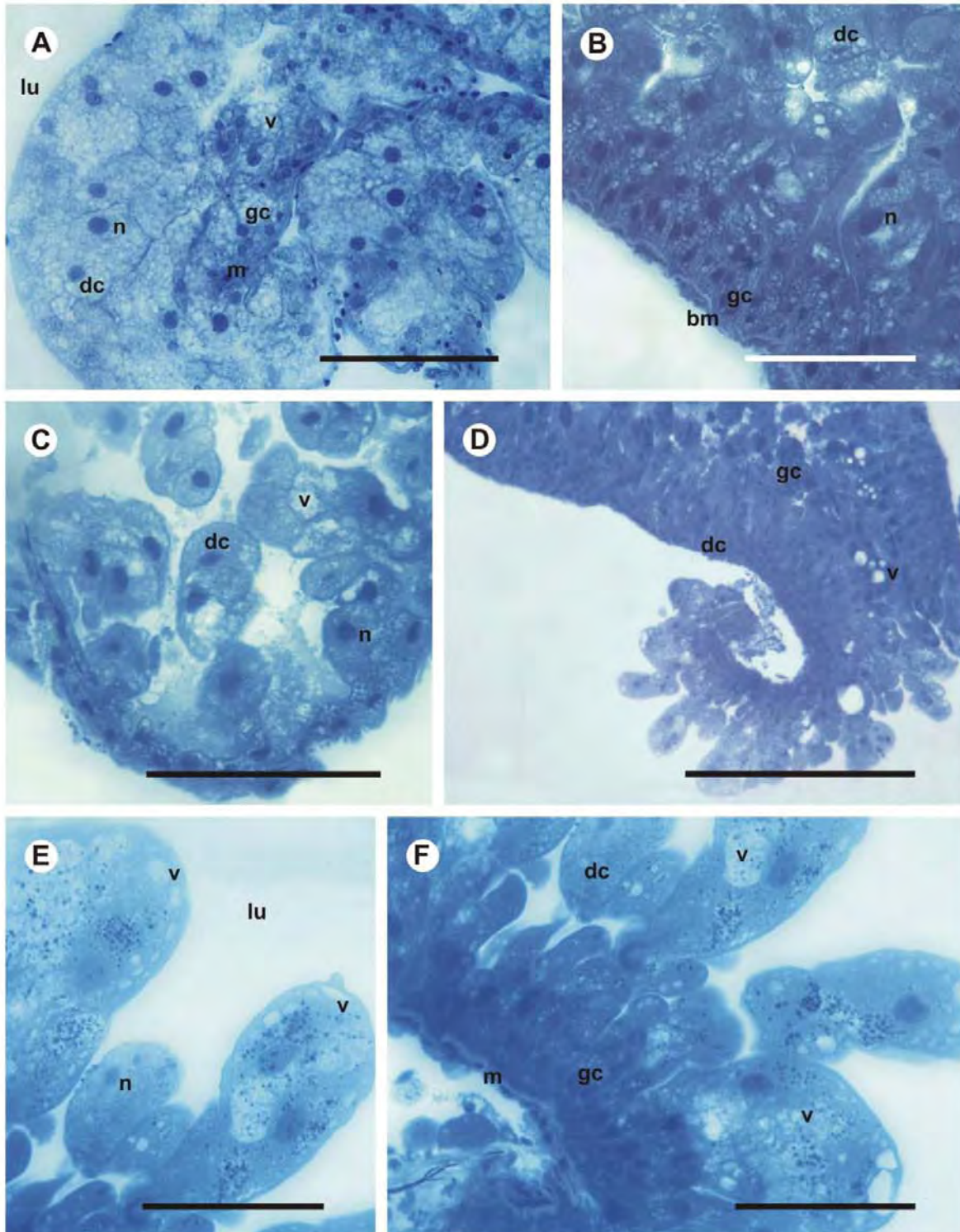
**Barra:** 10  $\mu\text{m}$

**F.** Detalhe do domínio apical das células digestivas (**dc**) com grande vacuolização (**v**) negativa ao teste. A camada muscular (**m**) encontra-se espessa.

**gc**= células generativas

**Barra:** 10  $\mu\text{m}$

# FIGURA 1



**Figura 2.** Secções histológicas do intestino médio de fêmeas de *A. cajennense* submetidas à 2ª infestação coradas pelo azul de bromofenol para detecção de proteínas, onde observa-se reação mais forte do que nos indivíduos de 1ª infestação.

**A, B, C.** Fêmeas semi-ingurgitadas;

**D, E, F.** Fêmeas ingurgitadas.

**A.** Epitélio estratificado com células digestivas (**dc**) e generativas (**gc**) com citoplasma pouco vacuolizado.

**bm**= membrana basal; **n**=núcleo

**Barra:** 5  $\mu\text{m}$

**B.** Detalhe das células secretoras (**sc**) reagindo fortemente ao azul de bromofenol, principalmente nas granulações citoplasmáticas. As células generativas (**gc**) não apresentam o citoplasma vacuolizado.

**dc**= células digestivas      **n**=núcleo

**Barra:** 10  $\mu\text{m}$

**C.** Detalhe da espessa camada muscular (**m**).

**dc**= células digestivas; **gc**= células generativas; **n**= núcleo, **v**= vacúolos

**Barra:** 10  $\mu\text{m}$

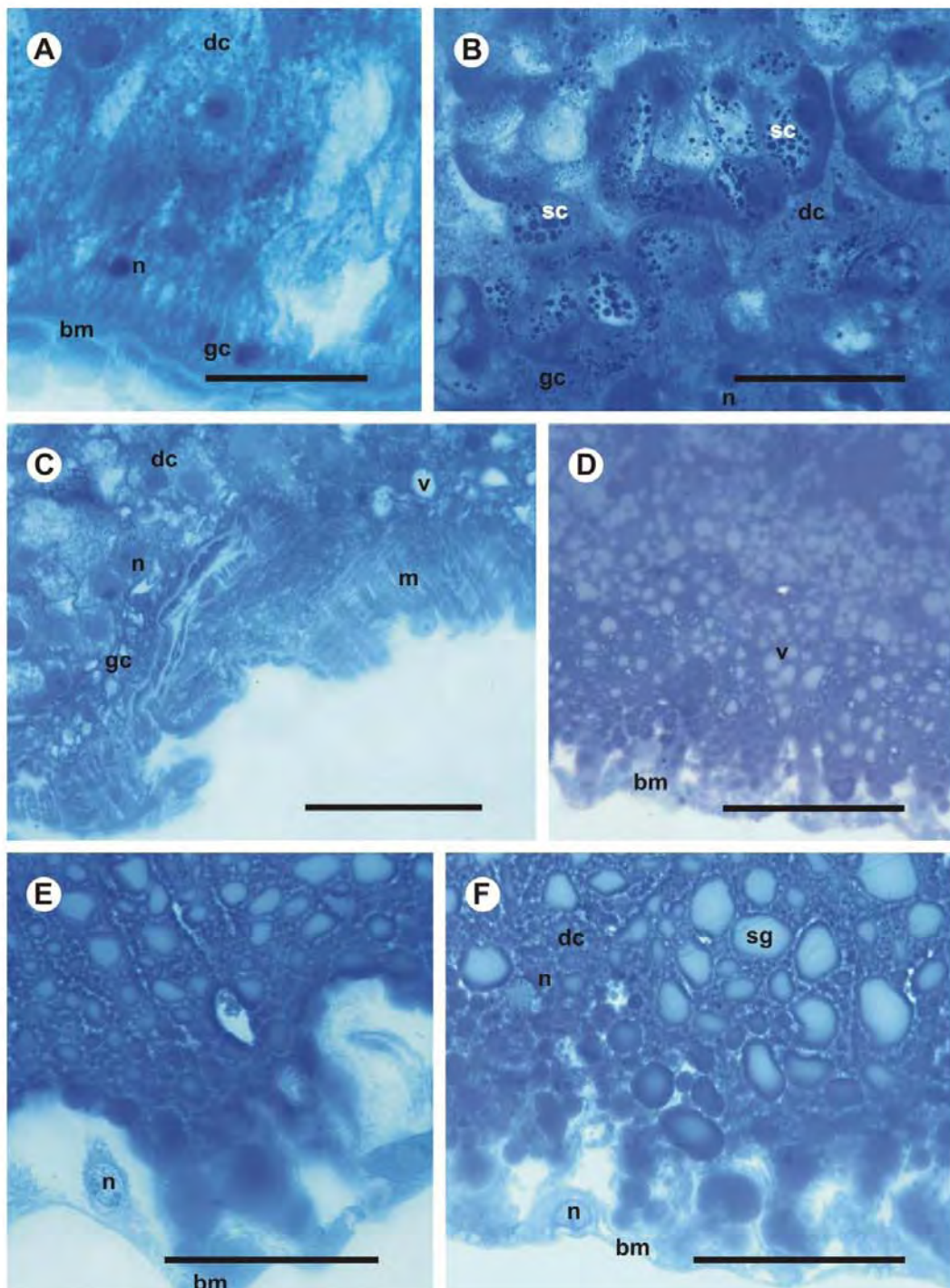
**D, E, F.** Detalhe da região próxima à membrana basal (**bm**), a qual encontrou-se desorganizada e reagiu fracamente ao azul de bromofenol. Observa-se à

presença de vacuolização (**v**) de algumas células em meio a restos citoplasmáticos de outras. Alguns núcleos (**n**) das células digestivas (**dc**) ainda podem ser observados. O citoplasma dos indivíduos ingurgitados submetidos à 2º infestação, apresentaram grânulos de secreção (sg) com a região central mais clara e a periférica mais escura.

**Barras: D= 5 µm      E= 10 µm      F= 10µm**



## FIGURA 2



**Figura 3.** Secções histológicas do intestino médio de fêmeas de *A. cajennense* submetidas à 3ª infestação coradas pelo Azul de Bromofenol para detecção de proteínas.

**A.** Fêmeas semi-ingurgitadas;

**B. C. D.** Fêmeas ingurgitadas.

**A.** Epitélio desorganizado com muitos núcleos (**n**) fortemente corados. A camada muscular (**m**) com seus núcleos (**★**) também foram observados.

**dc**= células digestivas; **lu**= lúmen

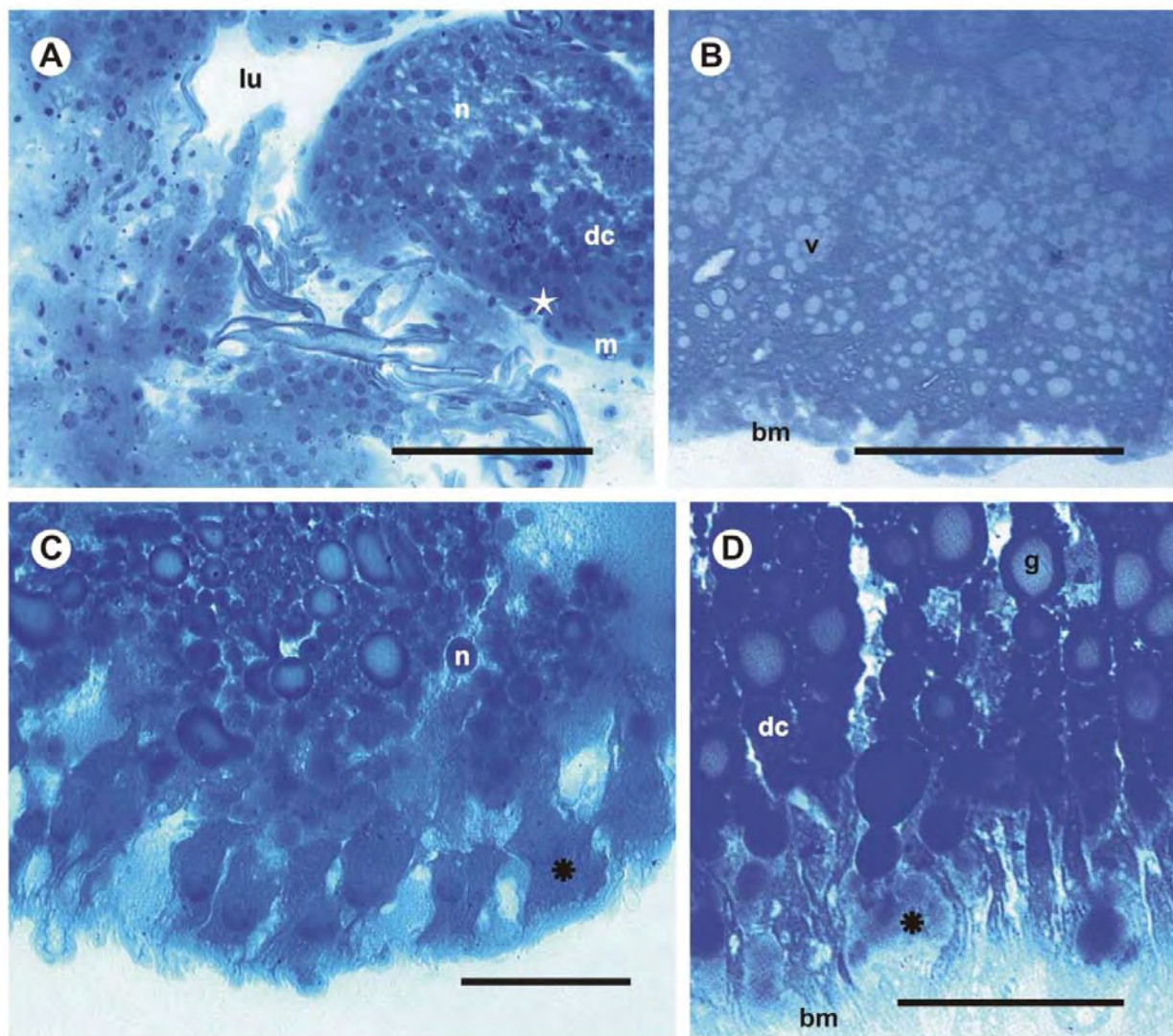
**Barra**= 10  $\mu$ m

**B, C, D.** Epitélio sem estratificação e desorganizado, com poucas células ainda íntegras (**\***). Nas células digestivas (**dc**) são encontrados grânulos (**g**) com a região central mais clara e a periferia mais escura. A membrana basal (**bm**) apresenta-se desorganizada e fracamente corada.

**n**= núcleo      **v**= vacúolos

**Barras:** **B**= 50  $\mu$ m      **C**= 10  $\mu$ m      **D**= 10  $\mu$ m

# FIGURA 3



**Figura 4.** Secções histológicas do intestino médio de fêmeas de *A. cajennense* em jejum e submetidas à 1º infestação, semi e ingurgitadas, coradas pelo PAS/alcian blue para detecção de polissacarídeos ácidos e neutros.

**A.** Fêmeas em jejum;

**B, C.** Fêmeas semi-ingurgitadas;

**D, E, F, G.** Fêmeas ingurgitadas.

**A.** Epitélio pseudo-estratificado evidenciando os núcleos (**n**) celulares. Células digestivas (**dc**) e generativas (**gc**) com citoplasma com intensa granulação (**g**).

**m**= camada muscular

**Barra**= 10  $\mu$ m

**B, C.** Detalhe das células digestivas (**dc**) onde existe maior vacuolização (**v**) e no lúmen (**lu**) nota-se a presença de grandes esferas (**sp**) fracamente PAS positivas.

**gc**= células generativas; **bm**= membrana basal; **m**= camada muscular

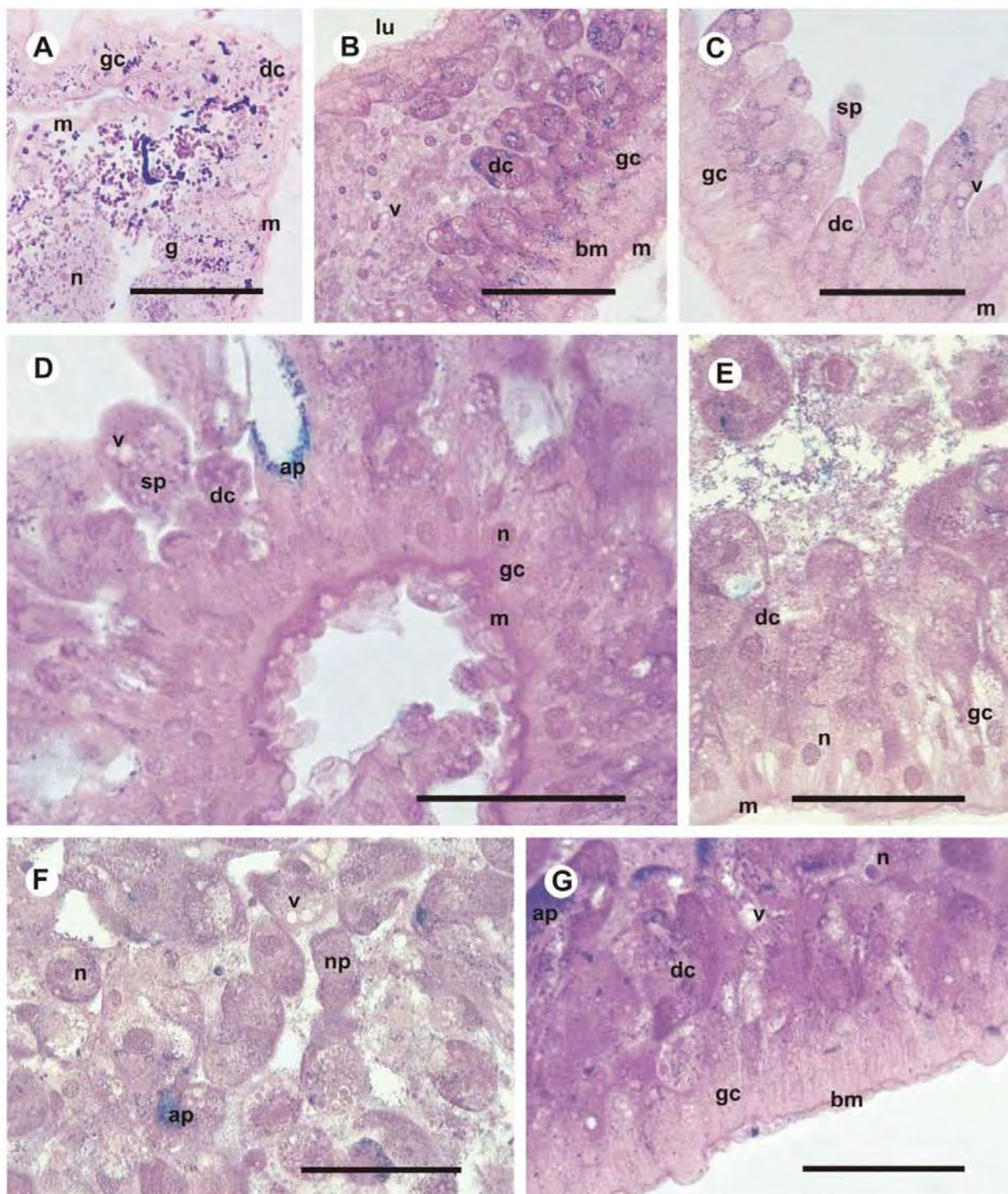
**Barras:** **B**= 10  $\mu$ m      **C**= 10  $\mu$ m

**D, E, F, G.** Epitélio estratificado. Detalhe do espaço intercelular das células digestivas (**dc**) e generativas (**gc**) onde observa-se a presença de polissacarídeos ácidos (**ap**) e neutros (**np**).

**n**= núcleos das células digestivas; **sp**= esferas; **m**= camada muscular; **bm**= membrana basal; **v**= vacúolos

**Barras:** **D**= 10  $\mu$ m      **E**=10  $\mu$ m      **F**= 10  $\mu$ m      **G**= 10  $\mu$ m

# FIGURA 4



**Figura 5.** Secções histológicas do intestino médio de fêmeas de *A. cajennense* submetidas à 2° e 3° infestações coradas pelo PAS/ alcian blue para detecção de polissacarídeos ácidos e neutros.

**A, B, C.** Fêmeas semi-ingurgitadas submetidas à 2° infestação;

**D.** Fêmeas ingurgitadas submetidas à 2° infestação;

**E.** Fêmeas semi-ingurgitadas submetidas à 3° infestação;

**F, G.** Fêmeas ingurgitadas submetidas à 3° infestação;

**A.** Detalhe do domínio basal das células digestivas (**dc**) com grandes concentrações de grânulos de polissacarídeos ácidos (**ap**).

**m**= camada muscular; **gc**= células generativas; **bm**=membrana basal

**Barra:** 10  $\mu$ m

**B, C.** Epitélio estratificado reagindo com fraca positividade ao teste. As células generativas (**gc**) são observadas reagindo fracamente ao PAS.

**dc**= células digestivas; **m**= camada muscular; **bm**=membrana basal; **ap**= polissacarídeos ácidos; **n**= núcleos das células digestivas.

**Barras:** **B**= 10  $\mu$ m      **C**= 10  $\mu$ m

**D.** Epitélio desorganizado e fracamente positivo, com alguns núcleos celulares (**n**). Detalhe da membrana basal (**bm**) com vacuolização (**v**) extracelulares negativos ao corante.

**nu**= nucléolo; **sp**= esferas

**Barra:** 10  $\mu$ m

**E.** Epitélio desorganizado com alguns núcleos (**n**) das células digestivas (**dc**). A camada muscular (**m**) com seus núcleos (**★**) são observados.

**gc**= células generativas

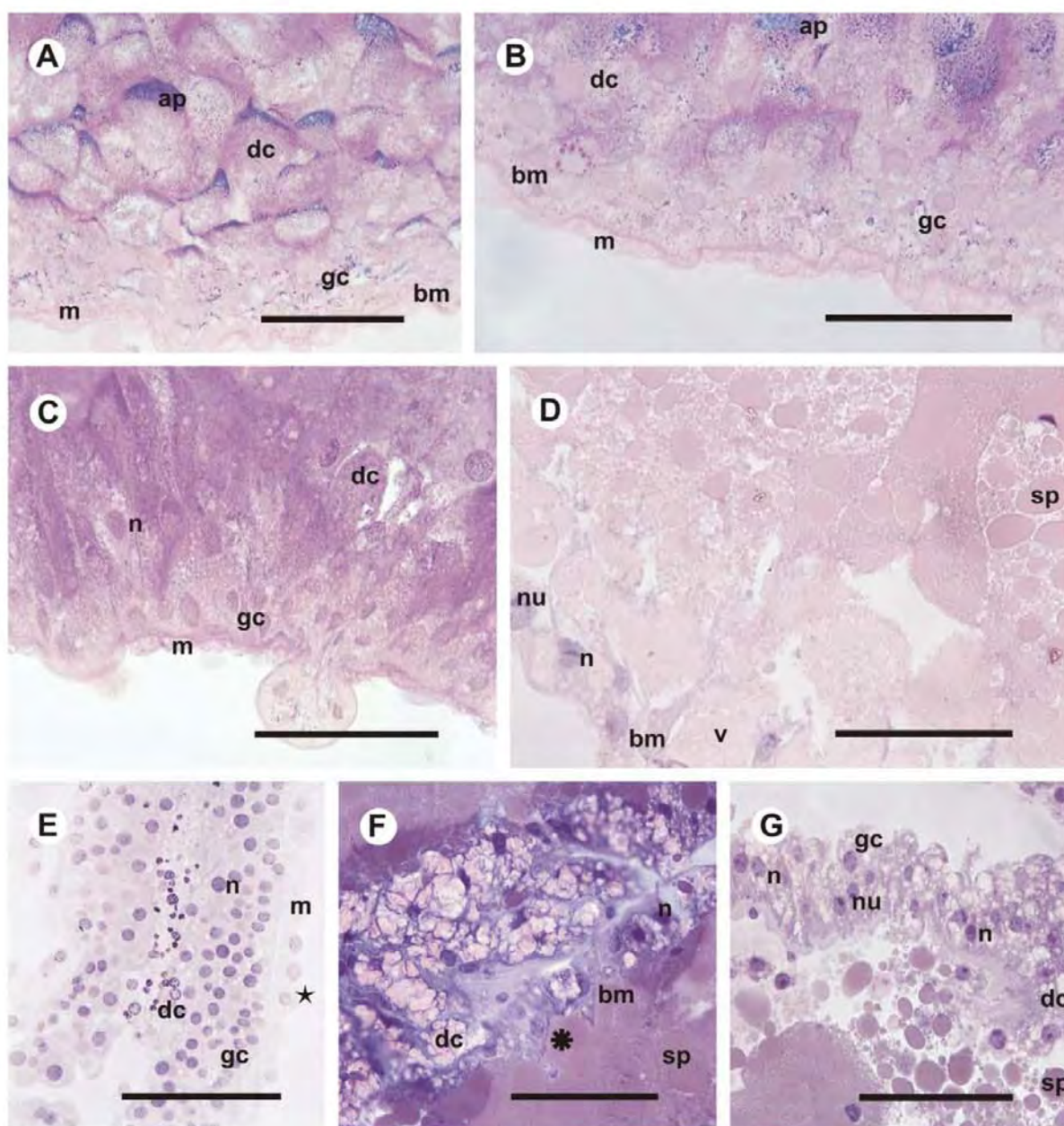
**Barra:** 10  $\mu\text{m}$

**F, G.** Epitélio desorganizado e fracamente positivo ao teste, com poucas células íntegras (**\***) positivas ao PAS. Detalhe do citoplasma das células digestivas (**dc**) com grande quantidade de vacúolos negativos (**v**). A membrana basal (**bm**) foi observada desorganizada, reagindo positivamente ao teste.

**n**= núcleo; **nu**= nucléolo; **sp**= esferas; **gc**= células generativas

**Barras:** **F**= 10  $\mu\text{m}$       **G**= 10  $\mu\text{m}$

# FIGURA 5





**Figura 6.** Secções histológicas do intestino médio de fêmeas de *A. cajennense* em jejum e submetidas à 1<sup>o</sup> infestação, semi e ingurgitadas, coradas pelo von Kossa para detecção de cálcio.

**A.** Fêmeas em jejum;

**B.** Fêmeas semi-ingurgitadas submetidas à 1<sup>a</sup> infestação;

**C.** Fêmeas ingurgitadas submetidas à 1<sup>a</sup> infestação;

**D.** Fêmeas semi-ingurgitadas submetidas à 2<sup>a</sup> infestação;

**E, F.** Fêmeas ingurgitadas submetidas à 2<sup>a</sup> infestação;

**G.** Fêmeas semi-ingurgitadas submetidas à 3<sup>a</sup> infestação;

**H, I.** Fêmeas ingurgitadas submetidas à 3<sup>a</sup> infestação.

**A.** Epitélio pseudo-estratificado evidenciando os núcleos (**n**) celulares. Células digestivas (**dc**) e generativas (**gc**).

**m**= camada muscular; ★= núcleo da camada muscular

**Barra**= 50 µm

**B.** Detalhe das células digestivas (**dc**) e generativas (**gc**) contendo grandes quantidades de vacúolos (**v**).

**n**= núcleo

**Barra**= 10 µm

**C.** Epitélio estratificado onde observam-se os núcleos (**n**) das células generativas (**gc**) e digestivas (**dc**), as quais possuem grande quantidade de vacúolos (**v**).

→ = marcações de cálcio      **m**= camada muscular

**Barra= 10  $\mu$ m**

**D.** Epitélio estratificado evidenciando as marcações de cálcio ( $\rightarrow$ ) nas células secretoras (**sc**) localizadas por entre as células digestivas (**dc**). As células generativas (**gc**) estão vacuolizadas (**v**).

**n**= núcleo das células digestivas      **m**= camada muscular

**Barra= 10  $\mu$ m**

**E-F.** Detalhes do epitélio do intestino médio (**ep**) desorganizado e negativo ao teste e do lúmen, evidenciando grandes esferas (**sp**) cálcio positivas.

$\rightarrow$  = marcações de cálcio      **n**= núcleo      **lu**= lúmen

**Barra= 10  $\mu$ m**

**G.** Epitélio desorganizado evidenciando os núcleos (**n**) e pouca marcação cálcio positiva ( $\rightarrow$ ).

**bm**= membrana basal

**Barra= 10  $\mu$ m**

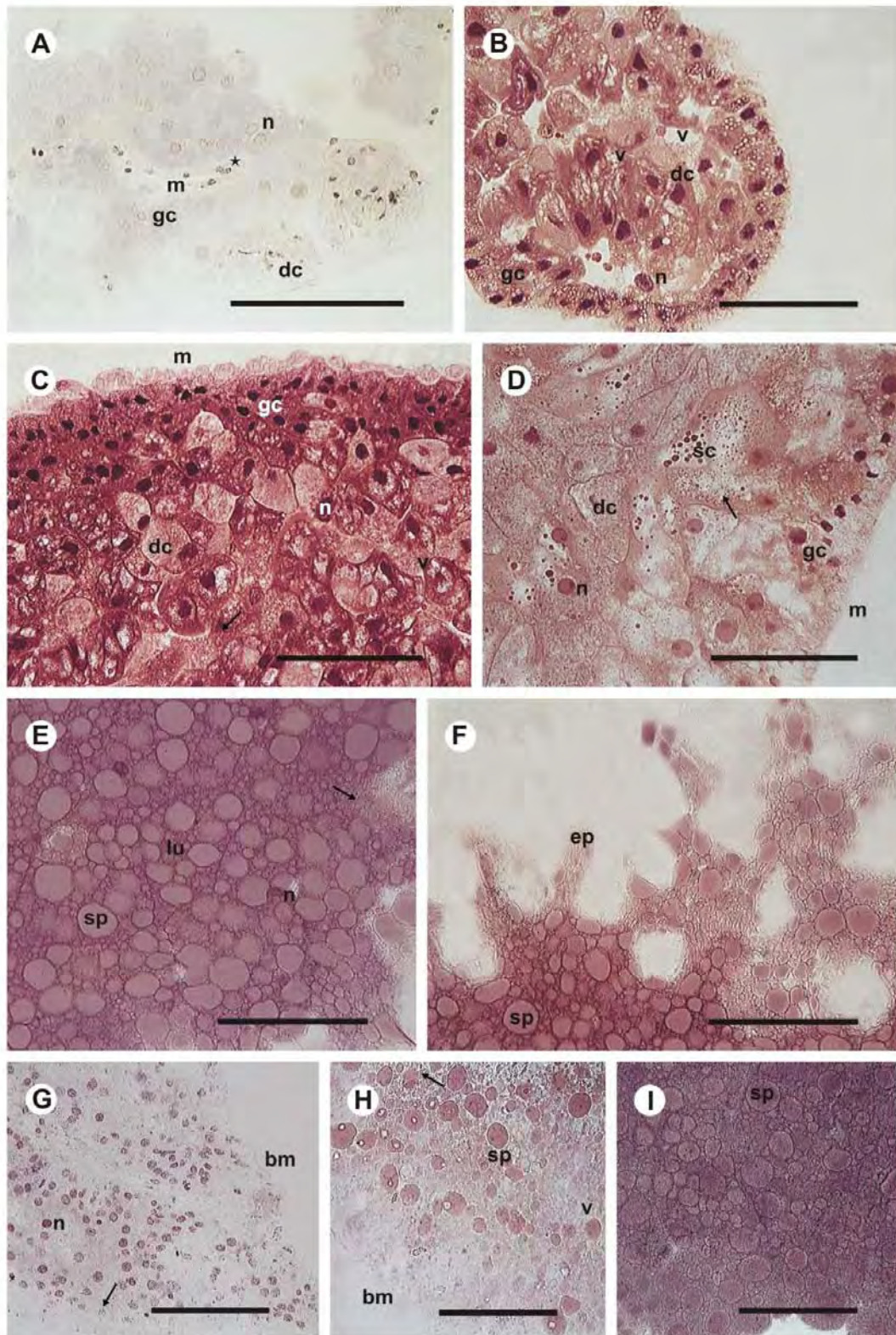
**H.** Detalhe da membrana basal (**bm**) negativa ao von Kossa.

$\rightarrow$ = marcações de cálcio      **sp**=esferas      **v**= vacúolos

**Barra= 10  $\mu$ m**

**I.** Detalhe do lúmen das células digestivas com muitas esferas (**sp**) de diversos tamanhos positivas ao cálcio.

# FIGURA 6



## 5. Discussão

O intestino médio, também nos carrapatos ixodídeos tem grande importância, visto que é o órgão responsável pela digestão de todo o sangue ingerido durante a alimentação. Devido a grande complexidade estrutural, poucos trabalhos descrevem suas alterações morfológicas no período de jejum e nas diferentes etapas do processo de alimentação destes ectoparasitas. Além disso, há ainda menor quantidade de trabalhos que correlacionam as mudanças estruturais sofridas pelo epitélio desta região do intestino, associando-as a alimentação em situações de sucessivas infestações, em um único hospedeiro.

Sendo assim, o presente estudo traz informações morfológicas obtidas por meio da histoquímica, mostrando que o intestino das fêmeas do carrapato *Amblyomma cajennense* passa, de fato por grandes modificações durante o período de alimentação, as quais se tornam mais acentuadas quando realizam-se reinfestações.

Quando analisado histoquimicamente, a aplicação do corante azul de bromofenol para detecção de proteínas, revelou que o epitélio do intestino dos indivíduos em jejum apresentou células com menores quantidades de proteínas no seu citoplasma provavelmente devido ao processo de alimentação não ter ainda iniciado e, portanto, não sendo necessária a produção das mesmas em grandes quantidades. As poucas proteínas que foram aí encontradas, provavelmente seriam as chamadas proteínas estruturais, pelo menos em parte, produzidas para serem utilizadas pelas próprias células, e/ou ainda parte delas poderiam estar sendo sintetizadas e armazenadas para uso posterior a partir do momento em que o carrapato iniciasse sua alimentação (HARRISON; FOELIX, 1999).

As células digestivas segundo a literatura, são consideradas as principais células presentes no epitélio do intestino médio de Arthropoda, e são por sua vez responsáveis pela síntese e secreção de enzimas digestivas e pela absorção de água e das substâncias digeridas (HARRISON; FOELIX, 1999). Estas foram as células em *A. cajennense* encontradas em maiores quantidades e apresentaram-se fortemente coradas pelo azul de bromofenol, inclusive apresentando granulações fortemente positivas principalmente nas fêmeas semi-ingurgitadas mostrando aí, a necessidade de produção de proteínas intestinais para auxiliarem na digestão do conteúdo luminal.

Em *A. cajennense* à medida que o processo de alimentação foi progredindo, observou-se nas células digestivas do intestino médio, um aumento na síntese de proteínas, detectado pela forte positividade destas células ao corante aplicado. No entanto, uma intensa vacuolização citoplasmática foi encontrada a qual reagiu fracamente ao corante nas fêmeas submetidas à 1º, 2º e 3º infestações e nos estágios de semi e completo ingurgitamento. Estes dados corroboram, aqueles encontrados para o intestino anterior e médio de carrapatos da espécie *R. appendiculatus* (TILL, 1961; COONS, et al, 1982), bem como em glândulas de seda de *Bombyx mori*, estas últimas durante o período da metamorfose do inseto (MORIMOTO et al, 1968).

Estes autores interpretaram a presença destes vacúolos como resultado da fusão de vesículas contendo secreção, as quais não liberaram seu conteúdo para o lúmen, indicando que em *A. cajennense*, no caso de reinfestação, o hospedeiro já poderia estar fabricando anticorpos contra os carrapatos, os quais poderiam estar afetando a fisiologia do intestino dos mesmos.

Outro fato observado foi que com o progresso do processo digestivo, as células do epitélio do intestino médio de *A. cajennense* começaram a apresentar maiores

quantidades de cálcio, o que não foi observado com muita frequência nos indivíduos em jejum.

A presença de esferas de cálcio também foi observada nas células do intestino médio de milípedes *Rhinocricus padbergi*. Em alguns dos indivíduos analisados, esse elemento estava presente na porção apical das células principais. Ainda em outras espécies de diplópodos, marcações de cálcio foram observadas também nas células do corpo gorduroso, entre as fibras musculares localizadas abaixo do epitélio, e nas porções mediobasais das células epiteliais e segundo os autores estes resultados poderiam sugerir que o epitélio do intestino estaria envolvido no transporte de cálcio (FANTAZZINI, et al, 2002).

Segundo alguns autores (CAMARGO-MATHIAS, et al 2002) o intestino médio de diplópodos seria um importante local para acumulação de minerais e teriam um importante papel na regulação iônica do organismo. Conseqüentemente, a eliminação cíclica desses grânulos estaria funcionando como uma forma de excretar os restos metabólicos o que acredita-se também estar ocorrendo nas células do intestino médio de *A. cajennense*, visto que no caso de reinfestação o hospedeiro já começa a produzir anticorpos enviando-os para o sangue, do qual o ectoparasita se alimentará.

Outros estudos ainda com sistema digestório de Arthropoda também apontaram a presença de estruturas compostas de cálcio no citoplasma das células do intestino médio e em aranhas *Coleotis terrestris* estas estruturas foram também chamadas de esfero-cristais sendo descritas como compostos de fosfato e de carbonato de cálcio e foram consideradas importantes na estocagem de cálcio e de outros íons, agindo dessa forma também na desintoxicação do indivíduo (LUDWIG; ALBERTI, 1988a). Já nos opiliões *Gya titanus* e *G. annulatus* (Sclerosomatidae), estas estruturas foram

observadas em fases bem avançadas (LUDWIG; ALBERTI, 1988a) e em abelhas *Melípona quadrifasciata* (CRUZ-LANDIM, 1971; CRUZ-LANDIM e HOFLING, 1972) os esferocristais foram freqüentemente observados no domínio apical das células digestivas do intestino médio.

Os esfero-cristais são estruturas que iniciam sua formação como corpúsculos esféricos de conteúdo eletrtransparente, e gradativamente vão formando anéis concêntricos e com eletrondensidades variadas. Em estágios mais avançados da sua produção essas concreções podem perder a eletrondensidade, indicando uma possível reutilização do material contido no seu interior, restando depois apenas algumas camadas eletrondensas (CHAPMAN, 1998).

Nas fêmeas de *A. cajennense* semi-ingurgitadas submetidas à 2<sup>o</sup> infestação, pode-se observar a presença do terceiro tipo celular, ou a então denominada célula secretora, reagindo fortemente ao azul de bromofenol (bem como ao teste para detecção de cálcio) evidenciando grande atividade de síntese protéica e/ou armazenamento de proteínas, inclusive sob a forma de grandes grânulos protéicos fortemente positivos já podendo ser observados mesmo na microscopia de luz.

Estas células secretoras são mais raras no epitélio do intestino médio do que os outros dois tipos celulares (digestivas e generativas). Muitos trabalhos têm sido realizados na tentativa de descrever morfológicamente estas células, bem como de estabelecer sua real função (HARRISON; FOELIX, 1999). Diferentemente do observado no presente estudo, Harrison e Foelix (1999) verificaram que as células secretoras estariam concentradas (em maior número) na região mais próxima ao lúmen do intestino. Segundo os mesmos autores estas células quando comparadas as

generativas e digestivas do epitélio do intestino médio, possuiriam o domínio basal mais estreito e o apical mais largo. Este último freqüentemente apresentaria protuberâncias e microvilosidades voltadas para o lúmen do intestino médio. O citoplasma seria constituído por numerosos grânulos de secreção, os quais seriam liberados durante ou após a alimentação, com função de auxiliar na digestão do sangue. Ainda segundo os mesmos autores, quando comparadas às células secretoras com as células digestivas, as primeiras seriam mais semelhantes entre si (HARRISON; FOELIX, 1999).

Ao contrário dos dados encontrados por estes autores, em *A. cajennense* as células secretoras foram observadas entremeando às digestivas ou isoladamente ou formando pequenos grupos, porém ainda assim apresentando muitas granulações protéicas fortemente positivas, bem como o próprio citoplasma entre os grânulos também apresentando forte positividade ao azul de bromofenol, indicando que estas células estariam ativas na síntese de proteínas. Além disso, a grande presença de cálcio nestas células, poderia estar indicando que em *A. cajennense*, além da fabricação de proteínas elas também teriam papel na detoxicação do indivíduo, eliminando restos de metabolismo, neste caso na forma de esfero-cristais de cálcio.

Segundo a função atribuída às células secretoras Harrison e Foelix (1999) relataram em carrapatos da espécie *Ornithodoros papillipes* que quando o sangue passasse pelo intestino, algumas células secretoras localizadas na região próxima do lúmen do intestino médio seriam para lá empurradas. Após se destacarem do epitélio, as mesmas se romperiam, aumentando consideravelmente, devido à liberação do seu citoplasma, a quantidade de secreção que se misturaria com o sangue provindo do hospedeiro e contido no lúmen do carrapato. Sabe-se também que as secreções destas células seriam compostas por glicoproteínas coloidais e enzimas hemolíticas, as quais





então realizariam parte da digestão do sangue devido à presença de enzimas com atividades lisossomais (HUGHES, 1954; CHINERY, 1964; TATCHELL, 1964; BALASHOV, 1967; KHALIL, 1971a, AGYEI et al, 1992). Em *A. cajennense* muito embora estas células não tenham sido observadas com frequência nas regiões próximas ao lúmen, provavelmente elas também desempenhem função semelhante descrita para outras espécies de carrapatos.

Dando suporte ao epitélio do intestino médio em fêmeas de *A. cajennense*, encontrou-se a membrana basal e a camada muscular, ambas em algumas situações com forte positividade ao azul de bromofenol evidenciando aí a existência de proteínas. Nos indivíduos ingurgitados submetidos à 2º e 3º infestação, a membrana basal reagiu fracamente ao corante e já indicando o início do aparecimento de dobras na direção do epitélio, e visto que é um caso de reinfestação, portanto, um início de desorganização desta região, prováveis efeitos dos anticorpos do hospedeiro, dados que corroboram aqueles encontrados para carrapatos da espécie *D. variabilis* (COONS, 1986; SONENSHINE, 1991).

A presença de um sistema muscular em *A. cajennense* estaria sugerindo que o transporte e transferência de alimento no intestino ocorreria por movimentos peristálticos, como é comumente observado nos indivíduos da ordem Acarina (BRODY et al, 1972; COONS, 1978; WOODRING; COOK, 1962). Dados semelhantes foram encontrados para carrapatos da espécie *R. appendiculatus* (HARRISON e FOELIX, 1999).

Os resultados do presente estudo para detecção de carboidratos, obtidos por meio da aplicação da técnica de PAS/alcian blue mostraram que nas fêmeas de carrapatos *A. cajennense* em jejum, de 1º, 2º e 3º infestações semi e ingurgitadas as



células digestivas e generativas do intestino médio apresentaram-se positivas ao teste, indicando a presença destes elementos, porém com maior predominância de polissacarídeos neutros.

As investigações sobre a presença de carboidratos nas células do intestino de carrapatos são praticamente ausentes, o que provoca dificuldades em se fazer comparações dos resultados aqui obtidos com os de outras espécies. A grande quantidade de carboidratos encontrada nas células de fêmeas em jejum de *A. cajennense* poderia sugerir que nesta espécie estivesse ocorrendo estocagem de material que forneceria a energia necessária para realização dos futuros processos digestivos.

Ainda a este respeito a literatura descreve que os artrópodes em geral exibem grande variedade de mecanismos hábeis para estocar compostos energéticos, os quais seriam posteriormente utilizados, isto quando requeridos (SONENSHINE, 1991). Essas reservas garantiriam a sobrevivência de indivíduos que eventualmente passassem por situação de privação de alimento, como, por exemplo, aquela observada nos opiliões *G. annulatus* e *G. titanus*, durante o inverno, sendo, portanto fundamentais no desenvolvimento dos indivíduos jovens, na reprodução dos adultos e em outros processos com gasto energético (LIPOVSEK et al, 2004). De acordo com Becker e Peters (1985a) os estoques de reserva dos tecidos não dependeriam da idade ou do sexo do animal, mas sim do estado nutricional em que ele se encontrasse, como o aqui observado nos indivíduos de *A. cajennense* em jejum.

Observou-se ainda em *A. cajennense* que quando os indivíduos iniciam o processo de alimentação a quantidade de polissacarídeos neutros nas células também vai diminuindo, com conseqüente surgimento de um suprimento de polissacarídeos ácidos (1º semi e 1º ingurgitada) confirmando que modificações no epitélio e na fisiologia do



intestino médio têm início. A marcação pelo azul de alcian mostra a presença de carboxilases e sulfatases, enzimas responsáveis pela transformação do ácido pirúvico em aldeído acético pela dissociação do grupo carboxila no metabolismo dos glicídios, indicando que provavelmente o carboidrato que antes encontrava-se armazenado nas células do intestino de *A. cajennense*, agora estaria sendo quebrado para ser utilizado nos processos digestivos.

Na literatura, trabalhos específicos com histoquímica sobre as alterações morfológicas que o epitélio do intestino médio de carrapatos sofre em condições de reinfestação, são ainda escassos.

## 6. Referências Bibliográficas

AGYEI, A. D., RUNHAM, N. W., BLACKSTOCK, N., Histochemical changes in the midgut of two ixodid tick species *Boophilus microplus* and *Rhipicephalus appendiculatus* during digestion of the blood meal. Amsterdam. Experimental and Applied Acarology, 13, 187-212, 1991.

ARTHUR, D. R., *Ticks: A monograph of the Ixodoidea: On the genera Dermacentor, Anocentor, Cosmiomma, Boophilus e Margaporus*. London: Cambridge University Press, 215p, 1960.

BALASHOV, YU. S. Blood-sucking ticks (Ixodoidea) vectors of disease of man and animals. Nauka, Leningrad. English Translation: 1972, Misc. Publ. Entomol. Soc of America 8: 161-376, 1967.

BALASHOV, Y.S., A translation of bloodsucking ticks (Ixodidae) vectors of diseases of man and animals. Miscellaneous Publications of the Entomological Society of America 8, p. 159-376, 1972.

BALASHOV, Yu. S., An atlas of ixodid tick ultrastructure. Tradução de Alexander S. Raikhel. s.1: Entomological Society of America, Special Publication p. 298, 1983.

BECHARA, G. H.; SZABÓ, M. P.J.; FERREIRA, B. R.; GARCIA, M. V. *Rhipicephalus sanguineus* tick in Brazil: feeding and reproductive aspects under laboratorial conditions. Brazilian Journal of Veterinary Parasitology, São Paulo, v. 4, n. 2, p. 61-66, 1995.



BECKER, A., PETERS, W., The ultrastructure of the midgut and the formation of peritrophic membranes in a harvestman, *Phalangium opilio* (Chelicerata Phalangida). *Zoomorphology* 105: 326-32, 1985

BRODY, A. R., MCGRATH, J. C., WHARTON, G. W. *Dermatophagoides farinae*: the digestive system. *J. New York Entomol. Soc.* 80, 152-177, 1972.

CAETANO, F. H. Morfologia comparada do trato digestivo de formigas da sub-família Myrmicinae (Hymenoptera: Formicidae), 128 f. Dissertação (Mestrado em Zoologia)- Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1977.

CAETANO, F. H. & CRUZ-LANDIM, C. Ultra estrutura das células colunares do ventrículo de *Camponotus Arboreus* (Hymenoptera.; Formicidae) e suas implicações funcionais. *Naturalia* 18: 91-100, 1983.

CAETANO, F.H. Anatomia, histologia e histoquímica do sistema digestivo e excretor de operarias de formigas (Hymenoptera, Formicidae). *Naturalia* 13: 129-74, 1988.

CAETANO, F.H. et al., Apocrine secretion in the ant, *Pachycondyla striata*, ventriculus (Formicidae: Ponerinae). *Cytobios* 80: 235-42, 1994.

CAETANO, F.H. et al., Ultramorphology and Histology of the midgut of *Pachycondyla (Neoponera) villosa* (Fabricius) Larvae (Formicidae: Ponerinae), *J. HYM. RES*, v. 10 (2), pp. 251-260, 2001.

CAETANO, F. H., et al., Ultra morphology of the digestive system of *Anastrepha fraterculus* and *Ceratitidis capitata* (Diptera Tephritidae), *Braz. J. Morphol. Sci* (2006) 23 (3-4), 455-462), 2006.



CAMARGO-MATHIAS, M. I., FANTAZZINI, E. R., FONTANETTI, C. S. Midgut of the millipede “*Rhinocricus padbergi*” Verhoeff, 1938 (Diplopoda: Spirobolida): histology and histochemistry. *Arthropoda Selecta* **11**, 135-142, 2002.

CAVALCANTE, V.M., CRUZ-LANDIM, C. Types of cells present in the midgut of the insects: a review. *Naturalia*. São Paulo, v. 24, p. 19-40, 1999.

CHAPMAN, F.R. The Insects: Structure and Function. 4<sup>a</sup>. edição. New York: Cambridge University, 770 p, 1998.

CHINERY, W. A. The midgut epithelium of the tick *Haemaphysalis spinigera* Neumann, 1897. *J. Med. Entomol.* 1: 206.-212, 1964.

COLLATZ, K.G. Structure and function of the digestive tract. In: *Ecophysiology of Spiders*. Nentwig, W. (Ed.). Springer Verlag, New York. pp. 229-238, 1986.

COONS, L. B. Fine structure of the digestive system of *Macrocheles muscaedomesticae* (Scopoli) (Acarina: Mesostigmata). *Int. J. Insect Morphol. Embryol.* 7, 137-153, 1978.

COONS, L. B. et al. *Rhipicephalus sanguineus*: Localization of vitelogenin synthesis by immunological methods and electron microscopy. *Experimental Parasitology*, San Diego, v. 59, p. 331- 339, 1982.

COONS, L. B., et al. Morphology, physiology, and behavioral biology of ticks. *Morphology, Physiology and Behavioral Biology of Ticks*. Chichester: Ellis Horwood, p. 248-279, 1986.



CRUZ-LANDIM, C., Notes on granules with concentric lamination present in the larval midgut of *Trigona (Scaptotrigona) postica* Latr. (Hymenoptera, Apidae). Rev. Bras. Pesquisas Med. Biol. 4: 13-16, 1971.

CRUZ-LANDIM, C., HOFLING, J. S., The post-embryonic changes in *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lep. (Hymenoptera, Apoidea). V. Development of the nervous system. Papeis avulsos de Zool., São Paulo, 26: 137-147, 1972.

CRUZ-LANDIM, C., SILVA DE MORAES, R. L., SERRÃO, J. E., Ultrastructural aspects of epithelial renewal in the midgut of adult worker bees (Hymenoptera: Apidae). J. Comp. Biol, v. 1, 29-40, 1996.

CRUZ-LANDIM, C., SERRÃO, J. E., MORAES, R. L. M. S. On the ultrastructure of the striated border of midgut digestive cells on *Apis mellifera* and *Melipona quadriaefasciata anthidioides*. (Hymenoptera, Apidae). Iheringia 82: 127-132, 1997.

CRUZ-LANDIM, C. Ultrastructural features of the regenerative cells of the bees (Hymenoptera: Apidae) midguts. *Sociobiology* 34: 597-603, 1999.

CRUZ-LANDIM, C., MORAES, R.L.S.M. Morte celular programada em abelhas como uma forma de redirecionar a morfologia e a fisiologia adaptativa. Editora e Tipografia Costa, Rio Claro, pp 48, 2000.

CRUZ-LANDIM, C., CAVALCANTE, V. M. Ultrastructural and cytochemical aspects of metamorphosis in the midgut of *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae: Apinae). *Zoological Society of Japan*. 20: 1099-107, 2003.



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 *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology*, v. 125, p.379-395, 2004.

DENARDI, S.E.; BECHARA, G.H.; CAMARGO-MATHIAS, M.I., Salivary gland cells of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) partially engorged females ticks. Lipids production by mitochondria. *Experimental Parasitology*, 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* (2008), doi:10.1016/j.micron.2007.12.002.

FANTAZZINI, E.; FONTANETTI, C.S.; MATHIAS, M. I. C. Midgut of the millipede, *Rhinodricus padbergi* Verhoeff, 1938 (Diplopoda: Spirobolida): Histology and histochemistry. *Arthropoda Selecta*, v. 11, n. 2, p. 135-142, 2002.

FURLONG, J.; DERESZ, F.; MATOS, L. L.; BALBI, M. V., The effect of cattle tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) infestation on milk yield and feed intake of Holstein X Zebu crossbreed cows. In: CONGRESSO PANAMERICANO DE CIÊNCIAS VETERINÁRIAS, 15., 1996, Campo Grande. Anais, p.340.

GRANDJEAN, O; AESCHLIMANN., A., Contribution to the study of digestion in ticks: Histology and fine structure of the midgut epithelium of *Ornithodoros moubata* Murray (Ixodoidea, Argasidae). *Acta Trop.* 30:193-212, 1973.

GRANDJEAN, O., Blood digestion in *Ornithodoros moubata* Murray *sensu stricto* Walton females (Ixodoidea: Argasidae) II. Modifications of midgut cells related to the





digestive cycle and to the triggering action of mating. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, v.58, n.5, p.493-514, 1983.

GUGLIELMONE, A. A., SZABÓ, M. P. J., MARTINS, J. R. S., ESTRADA-PEÑA, A. **Diversidade e importância de carrapatos na sanidade animal.** São Paulo, Vox/ICTTD-3/Butantan, 223p., 2006.

GUSHCHINA, E. A., ARISTOVA, V. L., GROMASHEVSKY, O. V., VOLTSIT, B. V., GUSHCHIN, D. K. L'VOV, and KLIMENKO, O. V., Electron microscope study of the midgut of ticks following experimental infection with Karshi virus [In Russian, English translation T1713, NAMRU-3, Cairo, Egypt.] *Vop.* 29:235-240, 1984.

HARRISON, W. F; FOELIX, R. F., *Microscopic Anatomy of Invertebrates*, v. 8B Chelicerata Arthropoda, p. 267-514, 1999.

HIGUCHI, S., Development of *Theileria sergenti* in the midgut of the tick *Haemaphysalis longicornis*. *Jpn. J. Vet. Sci.* 49: 341-347, 1987.

HUGHES, T. E. Some histological changes which occur in the gut epithelium of *Ixodes ricinus* female during gorging and up to oviposition. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 48: 397-404, 1954.

JUNQUEIRA, L C. U.; JUNQUEIRA, L. M. M. S. *Técnicas Básicas de Citologia e Histologia.* São Paulo: Santos, 1983, 123p.

KHALIL, G. M. Biochemical and physiological studies of certain ticks (Ixodoidea), Incorporation of tritiated tyrosine in the digestive system of nymphial *Argas (Persicargas) arboreus* (Argasidae). *Ann. Entomol. Soc. Amer.* 64: 1149-1154, 1971a.



KEMP, D. H, AGBEDE R., JOHNSTON L., GOUGH, J. M. Immunization of cattle against *Boophilus microplus* using extracts derived from adult female ticks: Feeding and survival of the parasite on vaccinated cattle. *Int. J. Parasitol*; 16(2):115–20, 1986.

KOCAN, K. M., MORZARIA, W. P., VOIGT, J. K, and IRVIN, A. D., Demonstration of colonies of *Cowdria ruminantium* in midgut epithelial cells of *Amblyomma variegatum*. *Am. J. Vet. Res.* 48: 356-360, 1987.

LEHANE, M. J. Peritrophic matrix structure and function. *Ann Rev. Ent.* 42: 525-550, 1997.

LIPOVSEK, S. et al., 2004. A contribution to the functional morphology in phalangiid harvestmen *Gyas annulatus* and *Gyas titanus* during their life cycle. *Tissue & Cell* 36: 275-82.

LUDWIG, M., ALBERTI, G. Mineral congregations, “spherites” in the midgut of *Coelotes terrestris* (Aranae): structure, composition e function. *Protoplasma* 143: 43-50, 1988a.

LUDWIG, M., ALBERTI, G. Peculiar of arachnid midgut glands. *Acta Zool. Fennica* 190, 255-9., 1990.

MORIMOTO, T. et al. Studies on the Posterior Silk Gland of the Silkworm, *Bombyx mori*. III Ultrastructural Changes of Posterior Silk Gland Cells in the Fourth Larval Instar. *J. Cell Biol. New York*, v. 38, p. 604-614, 1968.

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* 36: 437-447. 2005.

NUNES, E.T., BECHARA, G. H., CAMARGO-MATHIAS, M.I. Structural and cytochemical changes in the salivary glands of the *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini 1887) (Acari: Ixodidae) tick female during feeding, *Vet. Parasitol.* 140 (2006), pp. 114–123, 2006a.

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, *Exp. Parasitol.* 114 (2006), pp. 109–117. 2006b.

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

RODRIGUEZ, M.; PENICHET, M. L.; MOURIS, A. E.; LABARTA, V.; LORENZO, L. Effects of vaccination with Gava con the incident of *Babesia bovis* infections at the reduction in the lumber and frequency of acaricide treatments in cattle under production conditions in Cuba. In: *Recombinant vaccines for the control of cattle tick*. In: De La Fuente. J. (ED). Elphos Science., La Habana: Cuba, p. 187 – 199, 1995.

SERRÃO, J. E., CRUZ-LANDIM, C. A specialized midgut region in stingless bees (Hymenoptera: Apidae: Meliponinae). *Biocel* 20: 227-234, 1996a.

SONENSHINE, D. E. *Biology of Ticks*, Oxford University Press, v. 1, p. 159-187, 1991.



TATCHELL, R. J. Digestion in the tick *Argas persicus* Oken. *Parasitology* 54: 423-440, 1964.

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

THIERY, J. P. Mise en evidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie electronique. *J. Microscopic.* v. 6, p. 171-177, 1967.

WIKEL, S. K. et al., Infestation with pathogen free nymphs of *Ixodes scapularis* induces host resistance to transmittion of *Borrelia burgdorferi* by ticks. *Infect. Immun.*, Washington, v. 65, n. 1, p. 335-338, 1997.

WILLADSEN, P.; KEMP, D. Past, present and future of vaccination against ticks. Control de la Resistencia en garrapatas y moscas de importancia veterinaria y enfermedades que transmiten. In: SEMINARIO INTERNACIONAL DE PARASITOLOGIA ANIMAL, 4., 1999, Puerto Vallarta, Jalisco, Mexico, p. 131 – 140.

WOODRING, J. P., COOK, E. F. The internal anatomy, reproductive physiology and moulting process of *Ceratozetes cisalpinus* (Acarina: Oribatei). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 55, 165-177.

ZARA, F. J., CAETANO, F. H. Formação da membrana peritrófica em larvas de *Ectatomma edentatum* (ROGER, 1863) (Hymenoptera: Formicidae), *Rev. Brasil. Biol.*, 58 (1): 33-37, Rio Claro, 1997.

## *Discussão Geral*

---

## 5. DISCUSSÃO GERAL

O intestino médio, nos carrapatos ixodídeos assim como em outros Arthropoda tem grande importância fisiológica, visto que ele é responsável pela digestão de todo o sangue ingerido durante a alimentação. Devido a complexidade estrutural, poucos trabalhos descrevem suas alterações morfológicas no período de jejum, bem como nas demais fases do processo de alimentação destes ectoparasitas. Além disso, existem poucos trabalhos que correlacionam as mudanças estruturais que ocorrem no epitélio desta região do intestino, associando-as a alimentação do ectoparasita, com sucessivas infestações, em um só hospedeiro.

Os dados morfohistológicos, histoquímicos e ultraestruturais que foram aqui apresentados vêm mostrar que o intestino médio das fêmeas do carrapato *Amblyomma cajennense* passa, de fato por grandes modificações durante os



diferentes períodos de alimentação, as quais se tornam mais acentuadas quando realizam-se reinfestações.

O estudo ultramorfológico mostrou que o tubo digestório é composto por três regiões distintas: intestino anterior, médio e posterior, assim como observado nas demais espécies de carrapatos tanto da família Ixodidae, quanto da Argasidae (SONENSHINE, 1991). Os dados aqui apresentados também corroboraram aqueles obtidos por Harrison e Foelix (1999), que demonstraram que o intestino anterior, estaria localizado mais próximo da boca (hipostômio), seguido do intestino médio e do posterior, este último localizado próximo do bulbo retal e do reto, locais para onde seriam direcionados os resíduos da digestão.

No presente estudo com *A. cajennense* observou-se que os divertículos, estruturas comumente encontradas no tubo digestório de carrapatos estão presentes, em número de quatro, porém os mesmos se bifurcam (cada um deles origina dois ramos) resultando em oito ramos, os quais não atingem grandes comprimentos, dados estes que vem contrariar outros já relatados na literatura para outras espécies, onde registrou-se ramificações bastante extensas, como no caso de *Ornithodoros savignyi* e *O. moubata* (DOUGLAS, 1943; BALASHOV, 1972; SONENSHINE, 1991). Depois que o alimento chega ao intestino médio, nele são lançadas enzimas digestivas para completar a digestão e grande parte do alimento será armazenada também nas células dos divertículos dos carrapatos ixodídeos (SONENSHINE, 1991).

Nestas fêmeas de *A. cajennense* tanto em jejum quanto submetidas a diferentes situações de alimentação ficou claro que o intestino, como era de se esperar, está envolvido externamente por forte musculatura, constituída de camadas



musculares dispostas tanto circular quanto longitudinalmente, estando à primeira localizada mais externamente. Estes dados corroboraram aqueles obtidos por Sonenshine (1991) que também observou presença de forte musculatura no intestino médio da espécie *O. moubata*. Esse autor atribuiu a esta musculatura o papel de realizar e facilitar o peristaltismo involuntário, que seria responsável pelo deslocamento do alimento ao longo do tubo digestório, bem como pela mistura dos elementos no lúmen do mesmo, função esta que também seria atribuída à musculatura encontrada no intestino médio das fêmeas de carrapatos aqui estudadas.

Um dado que chamou a atenção no presente estudo e que foi pela primeira vez registrado em carrapatos, foi obtido a partir da utilização de técnicas de Microscopia Eletrônica de Varredura quando da observação da superfície do intestino médio, preferencialmente na porção anterior deste, bem como daquela dos divertículos. Notou-se a presença de protuberâncias (saliências como se fossem bolhas) que aqui foram denominadas de “nódulos”. A presença destas estruturas foi pela primeira vez relatada no intestino médio de mosquitos das espécies *Anastrepha fraterculus* e *Ceratitis capitata* por Caetano et al., (2006). Sua presença provavelmente seria o resultado dos espaços deixados entre as fibras musculares dispostas circular e longitudinalmente ao redor destes órgãos. O aspecto (mais, ou menos turgido) em *A. cajennense* provavelmente dar-se-ia pela quantidade de alimento presente no interior do divertículo e do próprio intestino.

Comparando-se a superfície do tubo digestório das fêmeas de *A. cajennense* nas diferentes situações de alimentação e em diferentes condições de infestação, ficou claro que os “nódulos” presentes na superfície do intestino apresentariam





mudanças morfológicas, as quais refletiriam a quantidade de sangue presente no interior do tubo digestório.

As análises histológicas, também revelaram mudanças na composição celular do intestino médio das fêmeas de *A. cajennense* submetidas às diferentes situações de estudo. Naquelas em jejum, ficou demonstrado que o epitélio do intestino médio é pseudo-estratificado e composto preferencialmente por dois tipos celulares: as células generativas e as digestivas, ambas apresentando características morfológicas diferentes, dados estes que corroboraram os dados obtidos por Harrison e Foelix (1999) e Sonenshine (1991), que estudaram carrapatos das espécies *Dermacentor andersoni* e *D. variabilis* (HARRISON; FOELIX, 1999; SONENSHINE, 1991).

Segundo a literatura já descreveu, as células digestivas seriam consideradas as principais células do epitélio do intestino médio, e seriam responsáveis pela produção e pela secreção de enzimas digestivas, além da absorção de água e de outras substâncias digeridas (HARRISON; FOELIX, 1999). Inclusive, nos indivíduos em jejum estas células poderiam estar sintetizando elementos que provavelmente seriam utilizados a partir do momento em que o carrapato iniciasse sua alimentação (HARRISON; FOELIX, 1999).

O presente estudo confirmou a presença em *A. cajennense* das células generativas, já descritas e observadas anteriormente em outros Arthropoda como em estudo desenvolvidos por Cruz-Landim et al. (1996) com abelhas da espécie *Melípona quadrifasciata*, que sugeriram que estas seriam as células tronco responsáveis pela reposição dos outros tipos de células do epitélio, quando passassem por degeneração natural devido ao desgaste e ao envelhecimento,

permitindo assim que o processo de renovação do epitélio por meio de divisões e de diferenciação celular fosse mantido, fato que aqui deva também estar ocorrendo.

À medida que o processo de alimentação progrediu e à medida que este foi associado à reinfestações, o epitélio do intestino médio de fêmeas de *A. cajennense* semi e ingurgitadas submetidas a 1ª infestação passou de pseudo-estratificado para estratificado, mudança esta necessária, visto que o atrito do alimento com o epitélio poderia danificá-lo. Desta forma, a partir de pseudo-estratificado (nos indivíduos em jejum), um processo de estratificação ocorreria no sentido de preservar a integridade do órgão, bem como de todo o organismo.

Neste epitélio, agora estratificado também verificou-se que as células digestivas aumentaram a sua frequência, porém as generativas ainda continuariam presentes e fazendo o papel de células tronco. Especificamente nas fêmeas ingurgitadas submetidas a 1ª infestação, ficou claro o processo de constrição (estrangulamento) no ápice das células digestivas, resultando na liberação de porções celulares na forma de esferas envoltas por membrana, abrigando pequena quantidade de citoplasma e sugerindo uma forma de liberação de secreção na forma apócrina, ou seja, a secreção produzida seria descarregada no lúmen ou ductos de órgãos, junto com porções do citoplasma apical, corroborando também dados de Caetano et al, (1994), que relataram a ocorrência de processo semelhante no intestino médio das formigas basais *Pachycondyla striata*. Os mesmos autores sugeriram ainda que, o desprendimento destas esferas dar-se-ia em função da necessidade de sua migração para o lúmen, onde aí estas poderiam ser encontradas em diferentes estágios de lise.

A membrana peritrófica ou matriz peritrófica foi observada no presente estudo apenas nas fêmeas ingurgitadas e submetidas a 1ª infestação, sugerindo que



esta tenha sido sintetizada pelas células digestivas. O fato de a membrana peritrófica ter sido observada somente nas fêmeas ingurgitadas poderia ser justificado pela grande quantidade de sangue que nessa fase do processo de alimentação estaria contido no lúmen do tubo digestório destes indivíduos, o que tornaria necessária a presença da mesma para separá-lo do epitélio.

Esta membrana é descrita como sendo um envoltório que se forma ao redor do alimento contido na luz do intestino médio, separando-o das células epiteliais que constituem sua parede e é secretada pelas células digestivas, em direção ao lúmen do intestino de alguns artrópodos tendo por função a proteção das células do intestino médio, seja do atrito do alimento, seja das próprias enzimas digestivas. A membrana peritrófica é constituída especialmente de quitina (um polissacarídeo nitrogenado), sob a forma de microfibrilas mergulhadas em matriz protéica constituída por peritrofinas (WIGGLESWORTH, 1965).

A estratificação do epitélio do intestino médio ainda se manteve nas fêmeas de *A. cajennense* semi-ingurgitadas e submetidas à 2ª infestação, porém aqui surgiu um terceiro tipo, a célula secretora, mais rara de ser encontrada neste epitélio, do que os outros tipos celulares já anteriormente descritos. Estas células tem gerado polêmica entre os estudiosos e alguns trabalhos têm sido realizados na tentativa de descrevê-las morfológicamente, bem como de estabelecer seu papel fisiológico (HARRISON; FOELIX, 1999). Esses mesmos autores verificaram a presença de células secretoras também na porção próxima ao lúmen do intestino de carrapatos *Ornithodoros papillipes*. Segundo os autores estas células quando comparadas com as células generativas e digestivas do epitélio do intestino médio, possuiriam o domínio basal mais estreito e o apical mais largo. Este último freqüentemente



apresentaria microvilosidades que estariam voltadas para ela, quando as células estivessem na camada que faz contato com o lúmen. O seu citoplasma seria constituído por numerosos grânulos de secreção, os quais seriam liberados durante ou após a alimentação, e teriam a função de auxiliar na digestão do sangue contido no lúmen. Ainda segundo esses mesmos autores, quando comparadas às células secretoras com as digestivas, as primeiras seriam mais semelhantes entre si (HARRISON; FOELIX, 1999). Esse mesmo estudo mostrou ainda que nestes carrapatos quando o sangue passasse pelo intestino, algumas células secretoras seriam empurradas em direção ao lúmen do intestino. Após se destacarem do epitélio, as mesmas degenerariam aumentando (devido à liberação do seu citoplasma), consideravelmente a quantidade de secreção no lúmen do intestino, a qual se misturaria com o sangue aí contido. Sabe-se também que as células secretoras liberariam sua secreção, (glicoproteínas coloidais e enzimas hemolíticas), para maior eficiência dos processos de digestão do sangue (HUGHES, 1954; CHINERY, 1964; TATCHELL, 1964; KHALIL, 1971a). No presente trabalho, no entanto, as células secretoras foram encontradas nas camadas intermediárias do epitélio intestinal e não naquela que faz contato direto com o lúmen.

Ao contrário do observado nas fêmeas semi-ingurgitadas de *A. cajennense*, nas ingurgitadas e submetidas a 2ª infestação o epitélio intestinal sofreu drástica desorganização, e as células não mais formaram estratos, e sim estiveram distribuídas irregularmente e apoiadas numa membrana basal também desestruturada, provavelmente resultado da reinfestação. A presença de invaginações na membrana basal do intestino médio destas fêmeas foi um dado que corroborou aqueles obtidos por Caetano et al. (1994), que mostraram a presença de numerosas invaginações em



intestinos de formigas da espécie *P. striata*, só que estes, a correlacionaram com a absorção de substâncias da hemolinfa e aqui correlacionamos com o efeito da reinfestação.

Nas fêmeas de *A. cajennense* semi e ingurgitadas submetidas à 3ª infestação o epitélio continuou desorganizado, sugerindo que esta morfologia seria ainda o resultado da ação dos anticorpos oriundos do hospedeiro, submetido a várias infestações, contra o organismo do carrapato.

Desta forma neste estudo ficou claro que o epitélio intestinal passou por muitas alterações morfológicas durante a alimentação, principalmente quando analisou-se os tubos digestórios de indivíduos em condição de reinfestação, devido à resposta imunológica do hospedeiro que devolveu ao ectoparasita os seus anticorpos provocando o surgimento de resistência e corroborando dados da literatura que demonstraram que hospedeiros previamente infestados conteriam anticorpos contra antígenos provenientes do intestino de outras espécies de carrapatos (SHAPIRO et al. 1987; BROWN, 1988).

A alteração na histologia do epitélio intestinal já havia sido demonstrada por Caperucci et al. (2009) quando do estudo desta mesma espécie de ectoparasita submetida a estas mesmas situações, só que em análise ao nível de microscopia de luz.

O estudo histoquímico dos intestinos médios de fêmeas de *A. cajennense* também forneceu importantes informações sobre a presença de proteínas, as quais nas células digestivas do epitélio do intestino dos indivíduos em jejum apresentou menores quantidades destas no seu citoplasma, provavelmente devido ao processo de alimentação não ter ainda iniciado e, portanto, não sendo necessária a produção das

mesmas (principalmente na forma de enzimas digestivas) e em quantidades significativas.

Já nas fêmeas semi-ingurgitadas as células digestivas apresentaram-se fortemente coradas pelo azul de bromofenol, evidenciando a presença de grânulos fortemente positivos, mostrando aí, a necessidade de produção de proteínas (enzimas) intestinais para auxiliarem na digestão do conteúdo luminal dos intestinos dos carrapatos.

A presença de proteínas sempre é marcante em células do epitélio intestinal. Isto já era esperado, visto que seria grande a necessidade da síntese de enzimas digestivas quando o processo alimentar tivesse início. Para obtenção de resultados no nível ultraestrutural utilizou-se a técnica da prata amoniacal que confirmou a presença de proteínas básicas, especificamente polipeptídeos básicos, sob a forma de grandes grânulos eletrondensos.

A forte marcação protéica células do intestino médio de *A. cajennense*, justificou a observação de retículo endoplasmático rugoso muito desenvolvido nos indivíduos semi e ingurgitados quando submetidos à 1ª infestação e naqueles ingurgitados quando submetidos à 3ª infestação. A presença de retículo endoplasmático rugoso nas células dos carrapatos coletados de hospedeiros reinfestados poderia estar relacionada com a necessidade tanto da produção de proteínas digestivas quanto da produção de enzimas que teriam a função de interagir com os anticorpos oriundos do hospedeiro, na tentativa de inativá-lo.

Nas fêmeas de *A. cajennense* semi-ingurgitadas submetidas à 1ª infestação, e nas ingurgitadas submetidas à 2ª infestação e semi-ingurgitadas submetidas à 3ª infestação as células digestivas apresentaram muitas microvilosidades, corroborando



dados da literatura que mostraram que tipicamente as células digestivas dos Arthropoda possuem bordas estriadas que aumentam a superfície de contato celular tanto para a secreção de enzimas como para absorção de nutrientes (SONENSHINE, 1991), função esta também desempenhada nos indivíduos em questão.

Embora não se tenha realizado teste histoquímico para detecção de lipídeos foi observado no intestino médio, de *A. cajennense* pela aplicação da microscopia eletrônica de transmissão a presença de gotas lipídicas no citoplasma das células digestivas. A presença de lipídeos nessa região do intestino dos Arthropoda, já foi registrada por outros autores em células do intestino médio de carrapatos *D. variabilis* e *Rhipicephalus appendiculatus* (HARRISON; FOELIX, 1999; SONENSHINE, 1991), e este elemento poderia ter diferentes origens, apresentando-se tanto como resultado da síntese realizada pela própria célula (endógena), como da absorção deste elemento a partir ou da hemolinfa e/ou do lúmen do intestino, proveniente da digestão do alimento ingerido. Foi observado lipídeo também no citoplasma das células digestivas de *A. cajennense* de fêmeas em jejum, semi e ingurgitadas quando submetidas à 1ª infestação. O lipídeo presente nas células do intestino poderia ter origens diferentes, sendo o resultado de síntese realizada pela própria célula, muito embora em *A. cajennense* não tivessem sido observados sítios contendo retículo endoplasmático liso ou, esse elemento poderia ainda ter origem a partir da sua absorção da hemolinfa e/ou do conteúdo presente no lúmen do intestino (exógena), proveniente da digestão do alimento ingerido pelo ectoparasita.

Além disso, sabe-se que as mitocôndrias seriam também organelas capazes de transformar substâncias, funcionando como pequenos depósitos no interior da célula (ALBERTS et al., 2002). As mitocôndrias poderiam abrigar no seu interior gotas



lipídicas, dados estes que corroboram com encontrados por Denardi et al., (2006) ao estudarem as glândulas salivares da mesma espécie de carrapato onde detectaram nas células glandulares a presença de mitocôndrias envolvidas com a produção de lipídeo. A confirmação desse processo seria que as células digestivas do intestino médio das fêmeas *A. cajennense* semi-ingurgitadas e submetidas à 3ª infestação apresentaram mitocôndrias inchadas e com características de perda de suas cristas. Outro aspecto importante que deveria ser considerado em relação à desorganização das mitocôndrias seria a variação dos níveis de ATP no interior da célula, o que já foi registrado anteriormente, por outros autores, visto que quando os níveis de ATP extrapolassem o nível crítico isso influenciaria na indução de processos de morte celular, onde as mesmas morreriam por necrose (PROSKURYAKOV et al, 2002).

Nas fêmeas de *A. cajennense* submetidas à 3ª infestação a resposta do hospedeiro atuou no organismo do ectoparasita, provocando danos nas células do seu intestino, os quais foram traduzidos também, pelas alterações mitocondriais, organela indispensável para a obtenção da energia a ser utilizada pela célula.

Outro fato importante observado nesse estudo foi à ocorrência de organelas em degeneração nas células do intestino médio de fêmeas de *A. cajennense* ingurgitadas e submetidas à 2ª infestação. Além das mitocôndrias o retículo endoplasmático rugoso, também se desorganizou indicando que estas células poderiam estar iniciando processos de morte provocados por componentes advindos do hospedeiro. Estes dados corroborariam aqueles encontrados para carrapatos *O. papillipes* que também mostraram desarranjos nas cristas mitocondriais, conseqüência da perda da sua atividade metabólica (WILLIAMS, et al., 1985).





Neste estudo foi também detectado a presença de carboidratos nas células do intestino médio de *A. cajennense*, obtidos por meio da aplicação das técnicas de PAS/alcian blue e de Thiéry que mostraram que nas fêmeas de carrapatos *A. cajennense* em jejum, de 1º, 2º e 3º infestações semi e ingurgitadas as células digestivas e generativas do intestino médio apresentar-se-iam positivas aos testes, indicando a presença deste elemento, porém ficando evidente a predominância dos polissacarídeos neutros.

As investigações sobre a presença de carboidratos nas células do intestino de carrapatos são praticamente inexistentes, o que dificulta a comparação dos resultados obtidos com os de outras espécies. A grande quantidade de carboidratos encontrada nas células de fêmeas em jejum de *A. cajennense* poderia sugerir que nesta fase estivesse ocorrendo estocagem do material energético que futuramente forneceria a energia necessária para realização dos processos digestivos.

Ainda a este respeito à literatura descreveu que os artrópodes em geral exibiriam grande variedade de mecanismos hábeis para estocar compostos energéticos, os quais seriam posteriormente utilizados, quando requeridos pelo organismo (SONENSHINE, 1991). Essas reservas garantiriam a sobrevivência dos indivíduos que eventualmente passassem por situação de privação de alimento, como, por exemplo, aquela observada nos opiliões *Gyas annulatus* e *G. titanus*, durante o inverno, sendo, portanto fundamentais no desenvolvimento dos indivíduos jovens, na reprodução dos adultos e em outros processos que teriam gasto energético (LIPOVSEK et al, 2004). De acordo com Becker e Peters (1985a) os estoques de reserva dos tecidos não dependeriam da idade ou do sexo do animal, mas sim do



estado nutricional em que o mesmo se encontrasse, como o aqui observado nas fêmeas de *A. cajennense* (em jejum).

Observou-se ainda em *A. cajennense* que quando os indivíduos iniciam o processo de alimentação a quantidade de polissacarídeos neutros nas células diminui, com conseqüente aumento do suprimento de polissacarídeos ácidos (1º semi e 1º ingurgitada) confirmando que as modificações não ocorrem apenas no epitélio mas também na fisiologia do intestino médio destes ectoparasitas. A marcação pelo azul de alcian sugeriu a presença de carboxilases e sulfatases, enzimas responsáveis pela transformação do ácido pirúvico em aldeído acético pela dissociação do grupo carboxila no metabolismo dos glicídios, indicando que provavelmente o carboidrato que antes encontrava-se armazenado nas células do intestino de *A. cajennense*, agora estaria sendo quebrado para ser utilizado nos processos digestivos.

Este estudo ultraestrutural veio demonstrar também que os carboidratos seriam produzidos pelas células generativas e digestivas de fêmeas semi-ingurgitadas submetidas à 1ª infestação, naquelas ingurgitadas submetidas à 2ª e 3ª infestações, porém devido às restritas regiões citoplasmáticas em que estes foram encontrados poder-se-ia sugerir que os mesmos assim que fossem sintetizados já seriam na seqüência utilizados, restando apenas poucas quantidades armazenadas nas células.

Outro elemento foi detectado no intestino médio de *A. cajennense* e que com o progresso do processo digestivo, aumentou nas células deste, foram os esferocristais (cálcio) nas fêmeas semi e ingurgitadas de 1ª, 2ª e 3ª infestações, o que indicou que as células do epitélio do intestino médio, além do processo de digestão e de absorção de água também estariam envolvidas no transporte de esferocristais,



provável produto da compactação de resíduos metabólicos o que, ao contrário não foi observado com muita frequência nos indivíduos em jejum.

Segundo alguns autores (CAMARGO-MATHIAS, et al 2002) que estudaram outros Arthropoda, no caso, os diplópodos, abordando a presença de cálcio no intestino médio, seria um importante sítio de acumulação de minerais e teria importante papel na regulação iônica do organismo. Conseqüentemente, a eliminação cíclica desse material inorgânico estaria funcionando como uma forma do organismo excretar seus restos metabólicos.

A origem dos esferocristais, segundo dados da literatura dar-se-ia à partir do retículo endoplasmático rugoso, cujo conteúdo de suas cisternas se condensaria, alargando-as e causando assim a perda de adesão dos ribossomos às suas membranas. A deposição consecutiva de lamelas em pequenas inclusões aumentaria gradativamente o tamanho das concreções, resultando em uma estrutura com alternância de camadas sucessivas de materiais, que no nível ultraestrutural apareceriam eletrondensas e eletrólúcidas, como o observado nas células digestivas de *A. cajennense*.

A ultraestrutura deixou claro no presente estudo que os domínios basais das células digestivas do epitélio do intestino médio de fêmeas *A. cajennense* semi-ingurgitadas e submetidas à 3ª infestação apresentaram extensos labirintos membranosos sugerindo um aumento nas chances de trocas entre a membrana das células digestivas com aquelas das células generativas. A presença de grande quantidade de interdigitações nas células digestivas de fêmeas de *A. cajennense* semi-ingurgitadas e submetidas à 1ª e 3ª infestações, ligando uma célula digestiva à outra adjacente, seria característica freqüente em tecidos que sofressem intensos

movimentos e poderiam estar relacionadas ao processo digestivo que devido ao inchaço e aumento do intestino necessitariam de mais resistência do epitélio aos movimentos peristálticos, dados estes que foram aqui obtidos e que corroboraram aqueles encontrados nos carrapatos argasídeos da espécie *O. papillipes* (BALASHOV, 1983).

Embora o intestino médio das fêmeas de carrapatos *A. cajennense* em todas as infestações possuíssem células com sinais de alterações citoplasmáticas, foram encontrados núcleos íntegros, mesmo estando, a célula em processo de morte (LOCKSHIN; ZAKERI, 2004). No entanto, observou-se também presença de núcleos envoltos por membrana e contendo um halo de citoplasma no interior do lúmen do intestino, resultado da fragmentação e/ou lise celular e conseqüente extravasamento do seu conteúdo, sugerindo aí a formação de estruturas semelhantes a corpos apoptóticos.

Dentre as alterações observadas nas células digestivas do intestino médio de fêmeas de *A. cajennense* quando submetidas à 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup> e 3<sup>a</sup> infestações semi e ingurgitadas a intensa vacuolização citoplasmática também foi observada assim como foi em carrapatos da espécie *O. moubata* (COONS et al., 1986).

No presente trabalho com fêmeas ingurgitadas e submetidas à 1<sup>a</sup> e 2<sup>a</sup> infestações a MET demonstrou a presença de estruturas eletrondensas e, de formas variadas sugerindo serem endosimbiontes. Estes foram observados tanto localizados no interior do citoplasma das células digestivas, quanto no lúmen do intestino médio de *A. cajennense*.

Segundo dados da literatura existiriam vários registros da ocorrência de bactérias endosimbiontes as quais estariam alojadas na maioria dos órgãos das



espécies de argasídeos e de ixodídeos, independentemente da origem geográfica dos mesmos. Essas bactérias seriam organismos que seriam veiculados via processos reprodutivos (transmissão transovariana) e que não causariam danos patogênicos aos carrapatos, mas sim, na maioria dos casos seriam patogênicos para os hospedeiros. Estudos de Cowdry (1925) e Mudrow (1932) mostraram que bactérias Gram-negativas e pleomórficas estariam presentes no sistema digestório de carrapatos *Ornithodoros moubata* durante todas as fases de vida. Contudo o papel dos endossimbiontes no ciclo de vida dos carrapatos ixodídeos tem ainda sido um problema a ser solucionado, devido a grande variabilidade, e ao pouco conhecimento e escassa literatura sobre a dieta desses mesmos endossimbiontes, seu comportamento e sua anatomia. Assim a presença destes microrganismos no intestino médio de *A. cajennense* vem sugerir a sua participação de alguma forma, ainda não conhecida, nos processos de digestão dos alimentos ingeridos pelo ectoparasita.

Assim os dados aqui obtidos para o intestino médio de fêmeas de *A. cajennense* permitiram estabelecer que á medida que se sucederam às infestações no mesmo hospedeiro, este tornou-se resistente, e as fêmeas do ectoparasita necessitaram de 25 dias para completar seu ciclo de alimentação, o que em situação normal aconteceria por volta dos 15 dias.

*Conclusões*

---

## 6. CONCLUSÕES

- O intestino de fêmeas de *Amblyomma cajennense* apresenta quatro divertículos que se bifurcam resultando em oito ramos;
- O intestino médio está envolvido externamente por forte musculatura, disposta tanto em camadas circulares como longitudinais, estando a primeira localizada mais externamente;
- Pela primeira vez é registrada a presença de nódulos na superfície do intestino médio, bem como dos divertículos, resultado dos espaços que ficam entre o cruzamento das fibras musculares;
- Nas fêmeas em jejum o intestino médio é histologicamente formado por epitélio pseudo-estratificado com a presença de dois tipos de células: as generativas e as digestivas;
- As células generativas, de reposição ou tronco estão na região basal do epitélio do intestino médio tendo como função a reposição dos outros tipos celulares, os quais sofreriam degeneração natural, devido ao desgaste e ao envelhecimento;
- As células digestivas do intestino médio de *A. cajennense*, são as principais e mais frequentes células e são responsáveis pela síntese e secreção de enzimas digestivas e pela absorção de água e de substâncias digeridas;



- Nas fêmeas semi e ingurgitadas submetidas à 1ª infestação o epitélio sofre estratificação, provavelmente para proteger o carrapato da ação dos anticorpos do hospedeiro. Este continua com a mesma histologia nas fêmeas semi-ingurgitadas e submetidas à 2ª infestação;
  
- Nas fêmeas ingurgitadas e submetidas à 2ª infestação e semi e ingurgitadas submetidas à 3ª infestação o epitélio do intestino perde a estratificação e se desorganiza, provavelmente devido à ação dos anticorpos liberados pelo hospedeiro reinfestado;
  
- As células secretoras são observadas no intestino médio a partir do estágio semi-ingurgitado de fêmeas submetidas à 2ª infestação, sendo ativas na síntese e no armazenamento de proteínas, liberando secreção que se misturaria com o sangue, contido no lúmen do carrapato, provindo do hospedeiro;
  
- Grânulos protéicos foram encontrados em grandes quantidades nas fêmeas semi-ingurgitadas, produzidas para serem utilizadas pelas próprias células (estruturais) ou ainda sendo sintetizadas e armazenadas para uso posterior a partir do momento em que o carrapato iniciasse sua alimentação;
  
- Carboidratos foram observados nas células digestivas e generativas do intestino de *A. cajennense* em jejum, de 1ª, 2ª e 3ª infestações, sugerindo a ocorrência de estocagem de material fonte de energia para a realização dos processos digestivos;





- Esferocristais foram observados no citoplasma das células digestivas do intestino médio indicando também a ação destas na detoxicação do indivíduo por meio da eliminação de restos do metabolismo;
  
- À medida que se sucederam às infestações no mesmo hospedeiro, este tornou-se mais resistente, e as fêmeas de *A. cajennense* necessitaram de mais dias para completar seu ciclo de alimentação, no caso 25 dias sendo que o que é relatado em situação normal acontece por volta de 15 dias.

## *REFERÊNCIAS*

---



## 7. REFERÊNCIAS

AESCHLIMANN, A., Développement and embryonnaire d' *Ornithodoros moubata* (Murray) et transmission transovarienne de *Borellia duttoni*. **Acta Tropica**, Amsterdam, 15:15-64, 1958.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. **Molecular biology of the cell**. 4. ed. Garland Publishing, Inc., New York & London, 2002. p. 1294.

ARAGÃO, H. Notas sobre ixódidas brasileiros. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 3, n. 2, p. 145 – 195, 1911.

ARAGÃO, H. Ixodidas brasileiros e de alguns países limitrophes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 3, n. 4, p. 759 – 843, 1936.

ARAMAN, S. Protein digestion and synthesis in ixodid females. In: Rodriguez, J. (Ed.), **Recent Advances in Acarology**, Academic Press, New York, p.385–395, 1979.

ARTHUR, D. R. **Ticks: A monograph of the Ixodoidea: On the genera *Dermacentor*, *Anocentor*, *Cosmiomma*, *Boophilus* e *Margaporus***. Cambridge University Press, London, 1960, p. 215.



BALASHOV, Yu.S. Blood-sucking ticks (Ixodoidea) vectors of disease of man and animals. Nauka, Leningrad. English Translation:1972, **Miscellaneous publications of the Entomological Society of America**, v. 8, p.161–376, 1967.

BALASHOV, Yu. S. A translation of bloodsucking ticks (Ixodidae) vectors of diseases of man and animals. **Miscellaneous Publications of the Entomological Society of America**, Lanham, v. 8, n. 5, 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, p. 98-128, 1983.

BEAULATON, J.; LOCKSHIN, R. A. The relation of programmed cell death to development and reproduction. Comparative studies and an attempt at classification. **International Review of Cytology**, New York, v. 79, p. 215-235, 1982.

BECHARA, G. H.; SZABÓ, M. P. J.; FERREIRA, B. R.; GARCIA, M. V. *Rhipicephalus sanguineus* tick in Brazil: feeding and reproductive aspects under laboratorial conditions. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, São Paulo, v. 4, n. 2, p. 61 – 66, 1995.

BECKER, A., PETERS, W., The ultrastructure of the midgut and the formation of peritrophic membranes in a harvestman, *Phalangium opilio* (Chelicerata Phalangida). **Zoomorphology**, Germany, v. 105, p. 326-32, 1985.

BELOZEROV, V. N. Diapause and biological rhythms in ticks. In: OBENCHAIN, F. O. & GALUN, R. (Ed). **Physiology of ticks**. Oxford: Pergamon, 1982. v. 13, p. 469 – 500.

BERRIDGE, M. J.; GUPTA, B.L. Fine-structural changes in relation to ion and water transport in the rectal papillae of the blowfly, *Calliphora*. **Journal of Cell Science**, Cambridge, v. 2, n. 1, p. 89 – 112, 1967.

BROWN S. J. Evidence for regurgitation by *Amblyomma americanum*. **Veterinary Parasitology**, Michigan USA, v. 28, p. 335–42, 1988.



CAETANO, F. H. Morfologia comparada do trato digestivo de formigas da sub-família Myrmicinae (Hymenoptera: Formicidae), 128 f. Dissertação (Mestrado em Zoologia)-Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1977.

CAETANO, F. H.; TORRES, JR. A. H.; CAMARGO-MATHIAS, M. I.; TOMAKE, E. M. Apocrine secretion in the ant, *Pachycondyla striata*, ventriculus (Formicidae: Ponerinae). **Cytobios** V. 80 p. 235-42, 1994.

CAETANO, F.H.; ZARA, F. J. Ultramorphology and Histology of the midgut of *Pachycondyla (Neoponera) villosa* (Fabricius) Larvae (Formicidae: Ponerinae), **Journal of Hymenoptera Research**, v. 10, n. 2, p. 251-260, 2001.

CAETANO, F. H.; SOLFERINI, V. N.; BRITTO, F. B. Ultra morphology of the digestive system of *Anastrepha fraterculus* and *Ceratitis capitata* (Diptera Tephritidae), **Brazilian Journal Morphology Science**, v. 23 (3-4), p. 455-462, 2006.

CAMARGO-MATHIAS, M. I., FANTAZZINI, E. R., FONTANETTI, C. S. Midgut of the millipede "*Rhinocricus padbergi*" Verhoeff, 1938 (Diplopoda: Spirobolida): histology and histochemistry. **Arthropoda Selecta**, v. 11, p. 135-142, 2002.

CAPERUCCI, D., CAMARGO-MATHIAS, M. I., BECHARA, G. H. Histopathology and ultrastructure features of the midgut of adult females of the tick *Amblyomma cajennense* Fabricius, 1787 (Acari: Ixodidae) in various feeding stages and submitted to three infestations. **Ultrastructural Pathology**, v. 33, n. 6, p. 249–259, 2009

CAPERUCCI, D., CAMARGO-MATHIAS, M. I., BECHARA, G. H. Ultrastructure features of the midgut of the female adult *Amblyomma cajennense* ticks Fabricius, 1787 (Acari: Ixodidae) in several feeding stages and subjected to three infestations. **Micron** (2010) doi:10.1016/j.micron.2010.05.015

CHINERY, W. A. The midgut epithelium of the tick *Haemaphysalis spinigera* Neumann 1987. **Journal of Medical Entomology**, Lawrence, v. 1, n. 1, p. 206 – 212, 1964.

COONS, L. B., TARNOWSKI, B. I.; OURTH, D. *Rhipicephalus sanguineus*: Localization of vitelogenin synthesis by immunological methods and electron microscopy. **Experimental Parasitology**, San Diego, v. 59, n.4 , 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, 1986. p. 248 – 279.

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, n. 1, p. 125 – 142, 1990.

COWDRY, E. V. A group of microorganisms transmitted hereditarily in ticks and apparently unassociated with disease. **Journal Experimental Medicine**. v. 41, p. 817–830, 1925.

CRISTOFOLETTI, P.T.; RIBEIRO, A. F.; TERRA, W. T. Apocrine secretion of amylase, exocytosis of trypsin along the midgut of *Tenebrio molitor* larvae. **Journal of Insect Physiology**, USA, v. 47, n. 2, p. 143-155, 2001.

CRUZ-LANDIM, C.; SILVA DE MORAES, R. L.; SERRÃO, J. E. Ultrastructural aspects of epithelial renewal in the midgut of adult worker bees (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Computational Biology*, v. 1, p.29-40, 1996.

DIEHL, P. A. Zur Oogenese bei *Ornithodoros moubata* (Murray) (Ixodoidea: Argasidae) unter Besonderer Berücksichtigung der Vitellogenese. **Acta Tropica (Basel)**, Amsterdam, v. 27, n. 4, p. 301–355, 1970.

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, n. 3, 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, n. 1, 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**, v. 39, n. 7, p. 875 – 883, 2007.



DOUGLAS, J. R. The internal anatomy of *Dermacentor andersoni* Stiles. **University of California Publications**, California. v.7, p. 202-272, 1943.

ESPINOZA-FUENTES, F. P., RIBEIRO, A. F., TERRA, W. R., Microvillar and secreted digestive enzymes from *Musca domestica* larvae. Subcellular fractionation of midgut cells with electron microscopy monitoring. **Insect Biochemistry**, France, v. 17 p. 819-827, 1987.

FANTAZZINI, E.; FONTANETTI, C.S.; MATHIAS, M. I. C. Midgut of the millipede, *Rhinocricus padbergi* Verhoeff, 1938 (Diplopoda: Spirobolida): Histology and histochemistry. **Arthropoda Selecta**, v. 11, n. 2, p. 135-142, 2002.

FERREIRA, C.; BELLINELLO, G. L.; RIBEIRO, A. F.; TERRA, W. R. 1990. Digestive enzymes associated with the glycocalix, microvillar membranes and secretory vesicles from midgut cells of *Tenebrio molitor* larvae. **Insect Biochemistry**, France, v. 20, p. 839-847, 2002.

FLECHTMANN, C. H. W. **Ácaros de importância médico-veterinária**. 1. ed. São Paulo: Nobel, 1990. p. 45 – 74.

GOURATON, J. Composition structure et mode the formation des concretions minerales dans l'intestine moyen des homopteres cereopides. **Journal of Cell Biology**. v. 37, p. 316-328, 1968.

GUGLIELMONE, A. A., SZABÓ, M. P. J., MARTINS, J. R. S., ESTRADA-PEÑA, A. **Diversidade e importância de carrapatos na sanidade animal**. São Paulo, Vox/ICTTD-3/Butantan, 223p., 2006.

GRANDJEAN, O.; AESCHLIMANN, A. Contribution to the study of digestion in ticks: histology and fine structure of the midgut epithelium of *Ornithodoros moubata* Murray (Ixodoidea, Argasidae). **Acta Tropica (Basel)**, Amsterdam, v. 30, n. 4, p. 193 – 212, 1973.

GRANDJEAN, O. Blood digestion in *Ornithodoros moubata* Murray sensu stricto Walton females (Ixodoidea: Argasidae) II. Modifications of midgut cells related to the digestive cycle and to the triggering action of mating. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparee**, Paris, v. 58, n. 5, p. 493 – 514, 1983.



HAN, S. I.; BORDEREAU, C. Origin and formation of the royal fat body of higher termite queens. **Journal Morphology**, v. 173, n. 6, p. 17–28, 1982.

HIGUCHI, S. Development of *Theileria sergenti* in the midgut of the tick *Haemaphysalis longicornis*. **Japanese Journal of Veterinary Science**, Sapporo, v. 49, n. 2, p. 341 – 347, 1987.

HARRISON, W. F.; FOELIX, R. F. **Microscopic anatomy of invertebrates: chelicerate arthropoda**. 1.ed. New Cork: Wiley-Liss, 1999. v. 8B, p. 267 – 514.

HUGHES, T. E. Some histological changes which occur in the midgut epithelium of *Ixodes ricinus* female during gorging and up to oviposition. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, London, v. 48, n. 3, p. 397 – 404, 1954

JAWORSKI, D. C.; BARKER, D. M.; WILLIAMN, J. P.; SAUER, J. R.; OWNBY, C. L.; HAIR, J. A. Age-related changes in midgut ultrastructure and surface tegument of unfed adult lone star ticks. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 69, n. 4, p. 701 – 708, 1983.

JUNQUEIRA, L. C. U.; JUNQUEIRA, L. M. M. S. **Técnicas Básicas de Citologia e Histologia**. 1. ed. São Paulo: Santos, 1983. p.123.

KAUFMAN, W. R. Gluttony and sex in female ixodid ticks: How do they compare to other blood-sucking arthropods? **Journal of Insect Physiology**, USA, v. 53, n. 3, p. 264–273, 2007.

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, n. 8, p. 2737 – 2745, 1988.

KOCAN, K. M.; MORZARIA, W. P.; VOIGT, J. K.; IRVIN, A. D. Demonstration of colonies of *Cowdria ruminantium* in midgut epithelial cells of *Amblyomma cajennense*. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v. 48, n. 3, p. 356 – 360, 1987.





LEWIS, G. E.; TAYLOR, A.C.; HII, J., KELLY, D. J.; DAVIS, D. R. A serological survey of scrub, tick, and endemic typhus in Sabah, East Malaysia, Routh Asia. **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, Thailand, v. 17, n. 4, p. 613 – 619, 1986.

LIPOVSEK, S.; LETOFSY-PAPST, I.; HOFER, F.; PABST, M. A. A contribution to the functional morphology in phalangiid harvestmen *Gyas annulatus* and *Gyas titanus* during their life cycle. **Tissue & Cell** v. 36, p. 275-82, 2004.

LOCKSHIN, R. A.; WILLIAMS, C. M. Programmed cell death. II Endocrinepotentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkmths. **Journal of Insect Physiology**. Oxford, v. 10, p. 643, 1964.

LOCKSHIN, R. A.; ZAKERI, Z. Apoptosis, autophagy, and more. **Journal of Biochemistry & Cell Biology**, Exeter, v. 36, p. 2405-2419, 2004.

MARTOJA, R., BALLAN-DUFRANÇAIS, C., The ultrastructure of digestive cells and excretory organs. In: KING, R. R., AKAI, H. 1984. **Insect Ultrastructure**, New York: Plenum Press, 624p, 1984.

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.

MCMULLEN, H. L.; SAUER, J. R.; BURTON, R. L. Possible role of uptake of water vapour by ixodid salivary glands. **Journal of Insect Physiology**, USA, v. 22, n. 9, p. 1281–1285, 1976.

MUDROW, E. Uber die intrazellularen Symbionten der Zecken. **Zeitschrift für Parasitenkunde, Berlin, Germany**, v. 5, p. 138–183, 1932.

NEEDHAM, G. R.; TELL, P. R. Off-host physiological ecology of ixodid ticks. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 36, n. 2, p. 659 – 681, 1991.

NOPANITAYA, W., MICH, D. W., Development cytology of the midgut in the flesh-fly *Sarcophaga bullata* (Parker). **Tissue Cell**, v. 6, n. 487-502, 1974.



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, n. 5, p. 437 – 447, 2005.

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, n. 1, p. 114 – 123, 2006a.

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, n. 2, p. 109 – 117, 2006b.

NUNES, E. T.; FURQUIM, K. C. S.; BECHARA, G. H.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Cell death in salivary glands of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) females at semi-engorged feeding stage. **Ultrastructural Pathology**, Bristol, v.3, p.1–13, 2010.

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, n. 2, p. 146 – 156, 2005a.

OLIVEIRA, P. R., BECHARA, G. H., DENARDI, S. E., NUNES, E. T., SZABÓ, M. P. J., CAMARGO-MATHIAS, M. Comparison of the external morphology of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) ticks from Brazil and Argentina. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 129, n. 2, 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, n. 3, 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, n. 2, 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, n. 4, p. 407 – 413, 2007b.

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

PEREIRA, C. P. M.; OLIVEIRA, P. R.; FURQUIM, K. C. S.; BECHARA, G. H.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Effects of fipronil (active ingredient of Frontline) on salivary gland cells of *Rhipicephalus sanguineus* females (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 166, p. 121–130, 2009.

PRIESTER, W. Ultrastructure of the midgut epithelial cells in the fly *Calliphora entirocephala*. **Journal of Ultrastructure Research**, v. 36, n. 5, p. 78-805.

PROSKURYAKOV, S.Y. Necrosis: a specific form of programmed cell death. **Experimental Cell Research**, v. 283, p. 1-16, 2002.

RAIKHEL, A. S. An electron microscopical study of intracellular digestion in midgut cells of the tick *Hyalomma asiaticum*. I. Formation the primary and secondary lysosomes. **Cytologia**, Japan, v. 17, n. 7, p. 748 – 753, 1975a.

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, n. 3, p. 203 – 215, 2007

REY, L. **Parasitologia**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1973. p. 695.

REY, L. **Parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 752 – 759.

RIBEIRO, A. F.; FERREIRA, C.; TERRA, W. R. Morphological bases of insecto digestion. In: MELLINGER, Journal of Animal Nutrition and Transport Processes. I. **Nutrition in Wild and Domestic Animals**, v. 5, p. 96 – 105, 1990.



RODRIGUEZ, M.; PENICHET, M. L.; MOURIS, A. E.; LABARTA, V.; LORENZO, L. Effects of vaccination with Gava con the incident of *Babesia bovis* infections at the reduction in the lumber and frequency of acaricide treatments in cattle under production conditions in Cuba. In: Recombinant bacines for the control of cattle tick. In: De La Fuente. J. (ED). **Elphos Science.**, La Habana: Cuba, p. 187 – 199, 1995.

RUDOLPH, D. KNULLE, W. Site and mechanism of water vapour uptake from the atmosphere in ixodid ticks. **Nature**, London, v. 249, n. 5452, p. 84 – 85, 1974.

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

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, n. 3, p. 299 – 311, 2005.

SANTOS, C. D., RIBEIRO, A. F., FERREIRA, C., TERRA, W. R., The larval midgut of the cassav hornworm (*Erinnis ello*). Ultrastructure, fluid fluxes and secretory activity in relation to the organization digestion. **Cell and Tissue Research**. v. 237, p. 565-574, 1984.

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, n. 7, p. 1069 – 1078, 2000.

SEHNAL, F.; AKAI, H. Ultrastructure and function of the silk glands in *Galleria mellonella*. In: H. Akai, R. C. King and S. Movohoshi, Editors, **The Ultrastructure and Functioning of Insects Cells**, The Society for Insect Cells, Japan (1982), p. 135–138, 1982.

SERRÃO, J. E., CRUZ-LANDIM, C. A comparative study of digestive cells in different midgut regions of stingless bees (Hymenoptera, Apidae, Meliponini), **Journal of Advanced Zoology**, Índia, v.17, p. 1-6, 1996b.



SOLL, M. D. The future of anthelmintic therapy from an industry perspective. In: Workshop Held at International Conference of the WAAVP. 16, Sun City, South Africa, Managing Anthelmintic Resistance in Endoparasites: Van Wyk, J. A. & Van Schalkwyk, 1997.

SONENSHINE, D. E. **Biology of Ticks**. 1. ed. New York: Oxford University Press, 1991. v. 1, p. 159–187.

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

SHAPIRO S. Z., BUSCHER. G., DOBBELAERE. D. Acquired resistance to *Rhipicephalus appendiculatus* (Acarina: Ixodidae): identification of an antigen eliciting resistance in rabbits. **Journal Medical Entomology**, Florida, v. 24, p. 147-54, 1987.

STORER, T. I.; USINGER, R. L. **Zoologia Geral**. 6. ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 2005. 816 p.

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, n. 4, p. 263 – 289, 1989.

TATCHELL, R. J. Digestion in the tick *Argas persicus*. **Parasitology**, Oken, v. 54, n. 6, p. 423-440, 1964.

TERRA, W. R., ESPINOZA-FUENTES, F. P., RIBEIRO, A. F., FERREIRA, C., The larval midgut of the housefly (*Musca domestica*): ultrastructure, fluid fluxes and secretion in relation in the organization of the digestion. **Journal of Insect Physiology**, USA, v. 34, p. 463-72, 1988.

THIERY, J. P. Mise en evidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie electronique. **Journal of Microscopical**, Oxford, v. 6, n. 3, 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, n. 6, p.1 – 124, 1961.



WALL, R.; SHEARER, D. **Veterinary Entomology**. London: Chapman & Hall, 1997. 439 p.

WALKER, A. **The arthropods of humans and domestic animals: a guide to preliminary identification**. 2. ed. London: Chapman and Hall, 1994. p. 25 – 29.

WALL, R.; SHEARER, D. **Veterinary Entomology**. 1. ed. London: Chapman and Hall, 1997. 338 p.

WIKEL, S. K.; RAMACHANDRA, R. N.; BERGMAN, D. K.; BURKOT, T. R.; PIESMAN, J. Infestation with pathogen free nymphs of *Ixodes scapularis* induces host resistance to transmittion of *Borrelia burgdorferi* by ticks. **Infection and Immunity**, Washington, v. 65, n. 1, p. 335 – 338, 1997.

WIGGLESWORTH, V. B. The hormonal regulation of growth and reproduction in insects. In: BEAMENT, J. W. L., THEHERNE, J. E., WIGGLESWORTH, V. B. (Eds). **Advances in Insect Physiology**. New York: Academic Press, 1965. p. 247-336.

WILLADSEN, P.; KEMP, D. Past, present and future of vaccination against ticks. Control de la Resistencia en garrapatas y moscas de importancia veterinaria y enfermedades que transmitem. In: SEMINARIO INTERNACIONAL DE PARASITOLOGIA ANIMAL, 4., 1999, Puerto Vallarta, Jalisco, mexico, p. 131 – 140.

WILLIAMS, J. P.; BARKER, D. M.; SAUER, J. R.; HAIR, J. A.; OWNBY, C.; KOCH, H. Ultrastructural changes in the midgut epithelium of unfed one star tocks with increasing age. **Annals of the Entomological Society of America**, Canadá, v. 78, n. 1, p. 62 – 69, 1985.